

Harmicini - sinteza i karakterizacija 1,2,3 - triazolskih derivata harmina i cimetne kiseline

Beban, Leona

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:710743>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



Leona Beban

**Harmicini - sinteza i karakterizacija 1,2,3 -
triazolskih derivata harmina i cimetine kiseline**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

*Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Ivani Perković na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu
i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala djelatnicima Zavoda za Farmaceutsku kemiju Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta
na ugodnom društvu i nesebičnoj pomoći tijekom rada u laboratoriju.*

*Najveće hvala mami, tati i djedu na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, razumijevanju i motivaciji
koju mi svakodnevno pružate.*

*Naposlijetku, hvala na smijehu, druženjima i prekrasnim uspomenama stvorenim tijekom
studentskih dana svim mojim prijateljima, a posebno Vlatki, Karli, Kevinu i Filipu.*

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



KRATICE

AAD – antibiotikom uzrokovani proljev (engl. *Antibiotic Associated Diarrhea*)

ACT – artemisinininska kombinirana terapija (engl. *Artemisinin – based Combination Therapy*)

ADMP – 2 – azido – 1, 3 – dimetilimidazolin – heksafluorofosfat

ASAK – artesunat - amodiakin

ASMK – artesunat - meflokin

BDNF – moždani neurotrofni faktor (engl. *Brain – Derived Neurotrophic Factor*)

CAD – derivat cimetine kiseline (engl. *Cinnamic Acid Derivates*)

CoA – koenzim A

CYP – citokrom P450

CuAAC – alkin – azid cikloadicija katalizirana uz Cu (I) (engl. *Copper(I) – catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition*)

DBCO – dibenzociklooktini

DBU – 1, 8 – diazabiciklo – [5.4.0] undec – 7 – en

DHA – PPK – dihidroartemisinin - piperakin

DHFR – dihidrofolat reduktaza

DHPS – dihidropterotat sintaza

DMF – dimetilformamid

FAO – Organizacija za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organisation*)

G6PD – glukoza – 6 fosfat dehidrogenaza

HTS – pretraživanje visokog kapaciteta (engl. *High Throughput Screening*)

MW – mikrovalni reaktor

NPP – novi putevi permeabilnosti (engl. *New Permeability Pathways*)

PA – artesunat - pironaridin

PTC – peptidil transferazni centar

RuAAC – rutenijem katalizirana alkin – azid cikloadicija (engl. *Ruthenium – catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition*)

SP – sulfadoksin - pirimetamin

SPAAC – reakcija azida i cikloalkina (engl. *Strain – Promoted Alkyne – Azide Cycloadditions*)

TACT – trojna terapija bazirana na derivatima artemisininina (engl. *Triple artemisinin – based combination therapy*)

TCEP – tris (2 - karboksietil) fosfin

TGS – metom vođena sinteza (engl. *Target Guided Synthesis*)

THPTA - tris-(hidroksipropiltriazolilmetil)amin

TMS – tetrametilsilan

TNF α – faktor tumorske nekroze alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor Alpha*)

UDP – uridin difosfat

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 MALARIJA.....	2
1.1.1 Malarija kao bolest.....	2
1.1.2 Životni ciklus plazmodija.....	2
1.1.3 Klinička slika bolesti.....	4
1.1.4 Prevencija i liječenje malarije.....	4
1.1.4.1 Liječenje nekomplikirane malarije uzrokovane <i>P. falciparum</i>	4
1.1.4.2 Liječenje nekomplikirane malarije uzrokovane <i>P. falciparum</i> za visokorizične skupine.....	5
1.1.4.3 Liječenje nekomplikirane malarije uzrokovane parazitima <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> ili <i>P. knowlesi</i>	6
1.1.5 Kemoprofilaksa malarije.....	6
1.1.6 Rezistencija na antimalarike.....	6
1.1.7 Srpasta anemija i malarija.....	9
1.2 PRIRODNI PRODUKTI I NJIHOVI DERIVATI U TERAPIJI MALARIJE.....	9
1.2.1 Artemisinin.....	9
1.2.2 Kinin.....	11
1.2.3 Atovakvon.....	12
1.2.4 Antibiotici u liječenju malarije.....	13
1.2.5 Prirodni spojevi kao spojevi uzori za sintezu novih derivata kao potencijalnih antimalarika.....	13
1.2.5.1 Harmin i njegovi derivati.....	13
1.2.5.2 Derivati cimetine kiseline.....	14
1.3 ANTIMALARICI U KLINIČKIM STUDIJAMA.....	15
1.4 CLICK KEMIJA.....	18
1.4.1 Reakcije cikloadicije.....	18
1.4.1.1 CuAAC – Bakrom katalizirana reakcija azida i alkina.....	18
1.4.1.2 RuAAC – Rutenijem katalizirana reakcija azida i alkina.....	19
1.4.1.3 SPAAC – Reakcija azida i cikloalkina.....	19
1.4.2 Mogućnosti primjene reakcija cikloadicije.....	19
2. OBRAZLOŽENJE TEME	22
3. MATERIJALI I METODE	25
3.1 Opći postupak sinteze derivata cimetnog alkohola.....	26
3.2 Opći postupak sinteze azida cimetine kiseline (2a,b).....	27

3.2.1	Sinteza 1-[(1 <i>E</i>)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-metoksibenzena (2a).....	27
3.2.2	Sinteza [(1 <i>E</i>)-3-azido-2-metilprop-1-en-1-il]benzena (2b)	28
3.3	Sinteza harmola	28
3.4	Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>] indola (3a).....	29
3.5	Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (3b)	30
3.6	Sinteza 1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (3c)	32
3.7	Sinteze <i>N</i> – harmicina	33
3.7.1	Sinteza 4-({7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il}metil)-1-[(2 <i>E</i>)-3-(4- metoksi fenil)prop-2-en-1-il]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazola (4a).....	33
3.7.2	Sinteza 4-({7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il}metil)-1-[(2 <i>E</i>)-2-metil-3- fenilprop-2-en-1-il]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazola (4b).....	34
3.8	Sinteze <i>O</i> – harmicina	35
3.8.1	Sinteza 1-[(2 <i>E</i>)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-7-il}oksi)metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazola (5a)	35
3.8.2	Sinteza 1-[(2 <i>E</i>)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol- 7-il}oksi)metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazola (5b).....	36
3.9	Sinteze <i>N</i> , <i>O</i> -bis-harmicina	37
3.9.1	Sinteza 1-[(2 <i>E</i>)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-4-{{7-({1-[(2 <i>E</i>)-3-(4- metoksifenil) prop-2-en-1-il]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il}metoksi)-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il}metil}-1 <i>H</i> -1,2,3-triazola (6a)	37
3.9.2	Sinteza 1-[(2 <i>E</i>)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-4-{{1-metil-7-({1-[(2 <i>E</i>)-2-metil-3- fenilprop-2-en-1-il]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il}metoksi)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il}metil}-1 <i>H</i> - 1,2,3-triazola (6b)	38
4.	REZULTATI I RASPRAVA	39
5.	ZAKLJUČCI	53
6.	LITERATURA	55
7.	SAŽETAK/SUMMARY	62
8.	PRILOZI	66
9.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1 MALARIJA

1.1.1 Malarija kao bolest

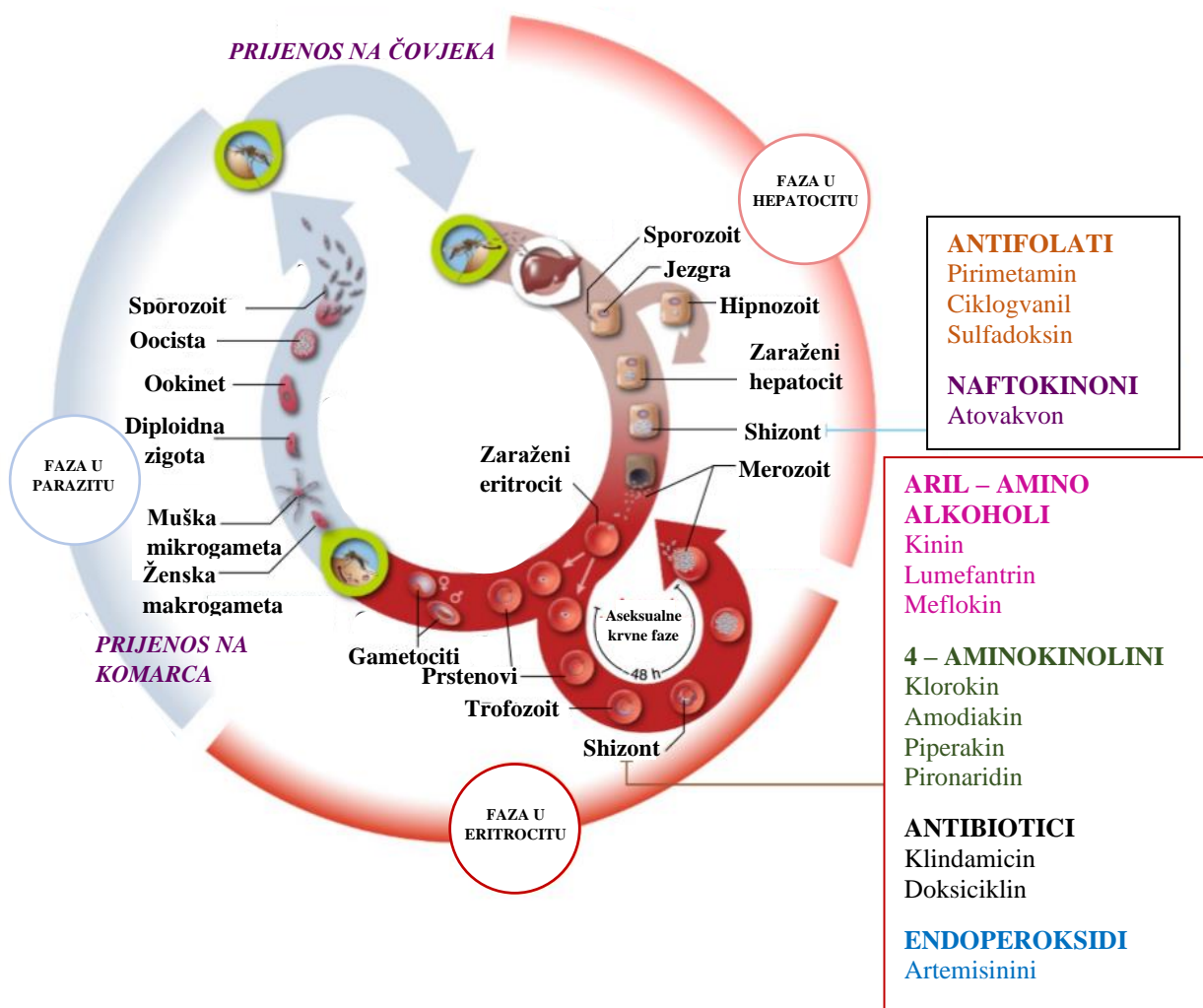
Malarija je životno ugrožavajuća zarazna bolest uzrokovana parazitima roda *Plasmodium* koje s jedinke na jedinku prenose zaražene ženke komaraca roda *Anopheles*. Pet je vrsta *Plasmodium* parazita (*P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*) koje mogu uzrokovati malariju, a najveću prijetnju predstavljaju *P. falciparum* te *P. vivax*. Ovi paraziti su jednostanični eukarioti koji u organizmu domaćina mogu živjeti unutar eritrocita ili hepatocita – ovisno o fazi životnog ciklusa. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2018. godine, gotovo svi slučajevi malarije u Africi (99,7%) bili su uzrokovani vrstom *P. falciparum*. Ista vrsta parazita uzrokovala je većinu oboljenja u regijama Zapadni Pacifik (65%), Istočno Sredozemlje (71%) te Jugoistočna Azija (50%), dok je u Sjevernoj i Južnoj Americi dominantan uzročnik malarije (75%) bio *P. vivax* (World Malaria Report 2019).

Smatra se kako postoji više od 400 vrsta komaraca roda *Anopheles*, od kojih oko 30 vrsta mogu biti vektori za prijenos malarije. Intenzitet prijenosa bolesti putem navedenih komaraca ovisi o samom komarcu, vrsti parazita, domaćinu te okolišnim čimbenicima kao što su temperatura, vlažnost zraka te padaline. Najkritičniji period prijenosa zabilježen je ubrzo nakon kišnog dijela godine (<https://www.who.int>).

1.1.2 Životni ciklus plazmodija

Životni ciklus parazita iz roda *Plasmodium* u domaćinu odvija se kroz eritrocitnu i hepatocitnu fazu (Slika 1). Zaražena ženka komarca roda *Anopheles* pri ubodu čovjeka/životinje u potkožno tkivo unosi sporozoite parazita koji unutar nekoliko sati od uboda dospijevaju u krvotok. U kratkom vremenskom roku od ulaska u krvotok (oko 20 minuta) sporozoiti se pomoću apikalnog kompleksa vežu za receptore na hepatocitima te ulaze u njih. Unutar vakuole hepatocita razmnožavaju se shizogonijom kroz 1 do 2 tjedna te nastaju shizonti koji u sebi sadrže mnoštvo merozoita. Potom dolazi do rupture zaraženih stanica jetre te posljedično pucanja shizonta čime u krvotok ulaze merozoiti. Eritrocitna faza počinje ulaskom merozoita u eritrocit, također omogućena apikalnim kompleksom kojim se vežu za receptore na eritrocitima. U eritrocitu merozoiti prvo sazrijevaju do faze prstenastih mladih trofozoita koji prelaze u ameboidne zrele trofozoite, da bi finalno kroz niz dioba nazvanih eritrocitna shizogonija nastali shizonti koji su i u ovoj životnoj fazi puni merozoita. Analogno hepatocitnoj fazi, pucanjem stanice eritrocita oslobađa se velik broj merozoita koji se kratko vrijeme (oko 30 minuta) zadržavaju u krvotoku, nakon čega ulaze u nove eritrocite. No, određeni dio merozoita unutar

crvene krvne stanice ne prolazi eritrocitnu shizogoniju, već diferencira u gametocite. Nakon što komarac *Anopheles* opet ubode zaraženu jedinku, u njegov probavni sustav ulaze gametociti koji se u želucu komarca razvijaju u gamete. Nakon oplodnje nastaje zigota koja se naziva ookineta. Ona potom prolazi želučani epitel te se razvija u oocistu unutar koje se razvijaju novi sporozoiti. Prsnućem oociste oni se prošire po organizmu komarca. Ovime je krug zatvoren, komarac u sebi nosi sporozoite kojima će zaraziti novu jedinku te će se cijeli ciklus odvijati ponovo (Kalenić i sur., 2013).



Slika 1. Prikaz životnog ciklusa parazita roda *Plasmodium* (Preuzeto i prilagođeno iz Blasco i sur., 2017)

1.1.3 Klinička slika bolesti

Ovisno o rodu plazmodija koji je izvor bolesti, vremena inkubacije se razlikuju. Najkraće vrijeme inkubacije ima vrsta *P. falciparum*: 9 – 14 dana, dok do pojave prvih znakova bolesti pri zarazi vrstom *P. vivax* prođe 12 – 17 dana. Inkubacija pri zarazi vrstom *P. ovale* uobičajeno traje 16 – 18 dana. Simptomi malarije nakon zaraze *P. malariae* javljaju se tek nakon mjesec dana od uboda zaraženog komarca, a zabilježeni su i slučajevi da prođu i godine do razvoja simptoma (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>).

Prvi se simptomi bolesti obično javljaju 10-15 dana nakon uboda komarca zaraženog *P. falciparum*, a karakteristični su: glavobolja, groznica, znojenje i povišena tjelesna temperatura. Temperatura može narasti i preko 40 °C i to u trenutku kad hepatociti sa shizontima pucaju i u krvotok ulaze merozoiti. Oslobođeni merozoiti potiču makrofage na lučenje velikih količina TNF- α . Ovakva stanja nazivaju se malarični napadaji, a ponavljaju se u razmacima 24-72 sata, ovisno o vrsti plazmodija kojom je jedinka zaražena. Posebno je opasna zaraza parazitom *P. falciparum* jer može dovesti do cerebralne malarije, odnosno začepjenja kapilara u mozgu. Od ostalih komplikacija, moguće je da se kod bolesnika razvije teška anemija, zatajenje bubrega te zatajenje pluća koje vodi u metaboličku acidozu (Kalenić i sur., 2013).

1.1.4 Prevencija i liječenje malarije

U zemljama s visokom stopom pojavnosti malarije razvijeno je nekoliko načina obrane protiv ove ugroze. Prvi je način kontrole prskanje komaraca insekticidom. Druga mjera kako pojedinac može izbjeći zarazu je spavanjem ispod mreža tretiranih insekticidom. Konačno, lijekovi antimalarici koriste se kako bi smanjili stopu bolesti i smrtnost (Bhattarai i sur., 2007).

Prema WHO smjernicama iz 2015. godine, liječenje malarije podijeljeno je na temelju uzročnika i težini bolesti u nekoliko kategorija opisanih u nastavku.

1.1.4.1 Liječenje nekomplikirane malarije uzrokovane *P. falciparum*

Temelj liječenja nekomplikirane malarije uzrokovane *P. falciparum* je terapijska kombinacija lijekova bazirana na artemisininu (ACT; engl. *Artemisinin – based Combination Therapy*). Taj režim uključuje derivat artemisinina u kombinaciji s dugodjelujućim partnerskim lijekom (Dini i sur., 2018). Derivati artemisinina su brzodjelujući te je njihova uloga uništiti što veći broj parazita unutar prvih 48 sati. Dugodjelujući partnerski lijek ima ulogu uništiti preostale parazite u organizmu te smanjiti razvoj rezistencije na derivat artemisinina. Isto tako, njegovo dugo zadržavanje u organizmu pruža netom izliječenom organizmu profilaksu od nove zaraze.

Preporučene kombinacije su sljedeće: artemeter - lumefantrin, artesunat - amodiakin, artesunat - meflokin, artesunat - SP te dihidroartemisinin - piperakin (Ashley EA i sur., 2018). Ova se terapija prema trenutnim smjernicama ne smije primijeniti na žene u prvom tromjesečju trudnoće zbog opasnosti od malformacija fetusa (WHO Guidelines for the treatment of malaria, 2015.). U novije vrijeme počelo se istraživati i trojnu terapiju baziranu na derivatima artemisininina nazvanu TACT (engl. *Triple artemisinin-based combination therapy*). Istraživanja provedena na kombinacijama: dihidroartemisinin - piperakin - meflokin te artemeter - lumefantrin - amodiakin pokazala su kako su navedene kombinacije visoko djelotvorne i sigurne u liječenju nekomplicirane malarije uzrokovane *P. falciparum*. Osim blagog porasta slučajeva povraćanja unutar sat vremena od primjene navedenih kombinacija, nisu zabilježene nove nuspojave osim onih već poznatih kad se lijekovi primjenjuju u monoterapiji (van der Pluijm i sur., 2020).

1.1.4.2 Liječenje nekomplicirane malarije uzrokovane *P. falciparum* za visokorizične skupine

U skupinu pacijenata visokog rizika svrstavaju se trudnice u prvom tromjesečju zbog opasnosti od kongenitalnih oštećenja i potencijalne teratogenosti koju je u nekim animalnim studijama pokazala ACT terapija (Clark, 2017). Iako je trenutna razina dokaza niska, lijekovi koji se smatraju sigurnima u prvom tromjesečju trudnoće su kinin i klindamicin te smjernice Svjetske zdravstvene organizacije preporučuju liječenje kroz 7 dana kombinacijom kinin - klindamicin (WHO Guidelines for the treatment of malaria, 2015). Tretman malarije u drugom i trećem tromjesečju trudnoće bazira se na ACT – terapiji pri čemu je artemeter - lumefantrin kombinacija pokazala prihvatljivu učinkovitost uz blaži profil nuspojava, ali i najkraće profilaktičko djelovanje. Kombinacija dihidroartemisinin - piperakin pokazala je najbolju učinkovitost i prihvatljiv sigurnosni profil (Pekyi i sur., 2016). Meta analiza izrađena na uzorku trudnica s područja Afrike i Azije objavljena 2017. godine pokazala je kako, u usporedbi s kininom, ACT terapija ne pokazuje povećanu embriotoksičnost ni rizik od spontanog pobačaja (Rogerson, 2017). Usprkos ovoj studiji u trenutno važećim smjernicama WHO-a malarija se kod trudnica u prvom tromjesečju još uvijek ne tretira ACT režimom. HIV-pozitivni pacijenti također su rizična skupina zbog svog imunokompromitiranog statusa. Temelj terapije malarije kod ove skupine pacijenata je ACT režim, no postoje određena ograničenja. Primjerice kod pacijenata koji su na terapiji efavirenzom, treba izbjegavati kombinaciju antimalarika artemeter - lumefantrin jer su oba spoja primarno supstrati enzima CYP3A4, a efavirenz, osim što je supstrat tog enzima, je i njegov induktor te stoga može utjecati na promjenu koncentracije

navedenih antimalarika (Maganda i sur., 2014). Poseban oprez pri liječenju ACT režimom potreban je u djece s tjelesnom masom ispod 5 kg, putnika s nerazvijenom imunosti na bolest te osoba s nekomplikiranom hiperparazitemijom (WHO Guidelines for the treatment of malaria, 2015).

1.1.4.3 Liječenje nekomplikirane malarije uzrokovane parazitima *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ili *P. knowlesi*

U slučajevima kad vrsta parazita nije sa sigurnošću potvrđena, smjernice preporučuju liječenje ACT režimom kao za nekomplikiranu malariju uzrokovanu *P. falciparum*. U područjima s visokim udjelom infekcija uzrokovanim klorokin - rezistentnim parazitom, prva linija liječenja trebao bi biti ACT režim, dok se kod trudnica u prvom tromjesečju preporučuje kinin. Za prevenciju relapsa malarije uzrokovane *P. vivax* i *P. ovale* pretežno se koristi primakin, a doza mu se određuje ovisno o statusu G6PD. Međutim kod trudnica i dojilja se profilaksa u ovim slučajevima provodi klorokinom do poroda, odnosno prestanka dojenja, nakon čega je moguće prijeći na primakin (WHO Guidelines for the treatment of malaria, 2015).

1.1.5 Kemoprofilaksa malarije

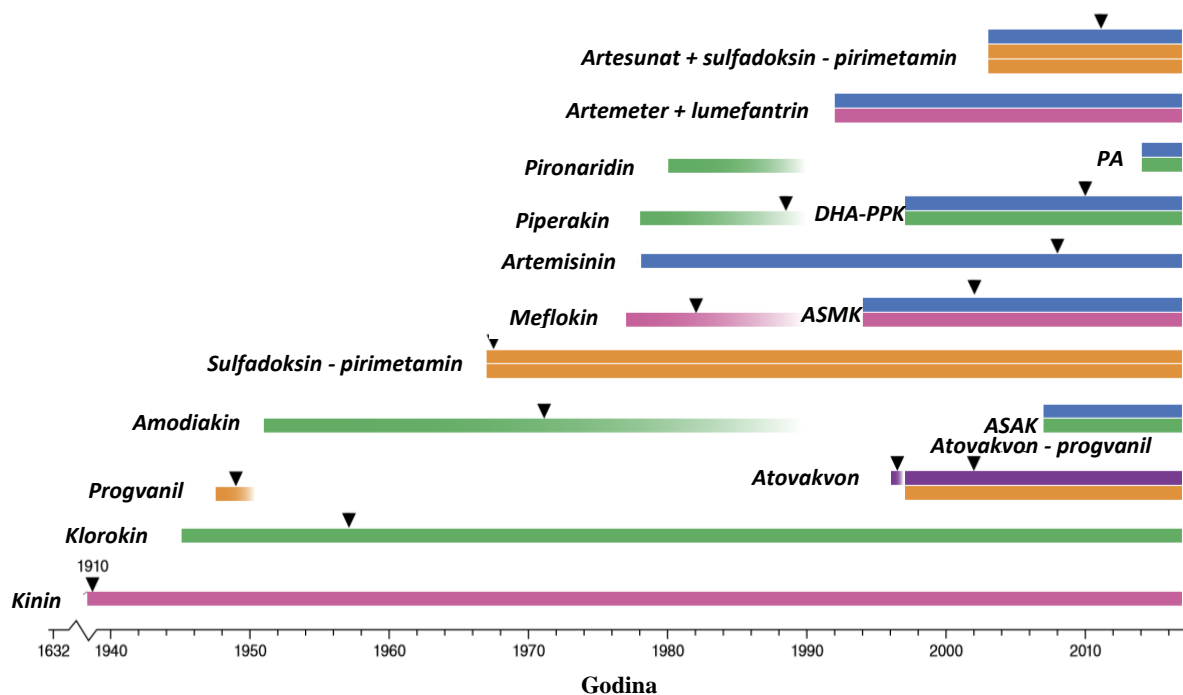
Kemoprofilaksa je primjena lijeka u svrhu prevencije razvoja bolesti. Kemoprofilaksa se koristi kod bolesti koje su česte u populaciji ili onih gdje je klinički utjecaj infekcije visok. Profilaktički lijekovi mogu se uzimati prije ili nakon izlaganja infektivnom agensu (McBride, 2010). Intermitentni preventivni tretman provodi se za sve trudnice od drugog tromjesečja trudnoće te djecu u područjima s umjerenom transmisijom, a kombinacija koja se primjenjuje je sulfadoksin - pirimetamin (SP). Sezonska kemoprofilaksa u području Sahela primjenjuje se na djeci starosti 3-59 mjeseci kombinacijom intermitentnih doza SP-a uz amodiakin u terapijskim dozama i to u maksimalno četiri ciklusa. Putnici u malarijom obuhvaćena područja primaju jedan od sljedećih lijekova u preventivne svrhe: atovakvon - progvanil, doksiciklin, meflokin ili primakin, dok HIV-pozitivne pacijente na terapiji kotrimoksazolom kao profilaksom od oportunističkih infekcija, ta kombinacija lijekova štiti i od malarije (Ashley i sur., 2018).

1.1.6 Rezistencija na antimalarike

Antimikrobna rezistencija sposobnost je mikroorganizama da razviju otpornost na antimikrobne lijekove koji su se do tada koristili za liječenje infekcija koje takvi mikroorganizmi uzrokuju (<https://www.hzjz.hr>). Vodeći problem vezan uz lijekove protiv malarije je razvoj rezistencije parazita na terapiju. Slika 2. prikazuje kronološki koliko vremena

je prošlo od početka primjene pojedinih antimalarika u terapiji do pojave rezistencije. Kinin, kao prvi antimalarik, otkriven oko 1630. godine, odolijevao je rezistenciji nekoliko stoljeća. Ona se pojavila početkom 20. stoljeća što je dovelo do potrebe za razvojem novih antimalarika. Bez obzira na činjenicu da su slučajevi rezistencije zabilježeni, kinin se i danas koristi u indikacijama navedenima u prethodnom odlomku. Otkriće novog antimalarika dogodilo se u četrdesetim godinama 20. stoljeća, a radilo se o 4-aminokinolinskom spoju klorokinu. Klorokin je bio glavni lijek protiv malarije idućih godina, ali u drugoj polovici pedesetih godina pojavila se rezistencija na klorokin. Još jedan lijek je istovremeno ušao u terapiju, progvanil koji djeluje kao inhibitor enzima dihidrofolat reduktaze (DHFR). Progvanil je prolijek koji u organizmu metaboličkim reakcijama prelazi u svoj aktivni oblik ciklogvanil. Samo godinu dana nakon njegove prve kliničke primjene, zabilježena je rezistencija te je spoj iščezao iz upotrebe. Polovicom 20. stoljeća pojavio se još jedan spoj iz skupine 4-aminokinolina: amodiakin. Ovaj je spoj 20 godina odolijevao rezistenciji, ali je ista zabilježena u ranim sedamdesetim godinama. Do 1990. godine potpuno je nestao iz upotrebe, ali se vratio početkom 21. stoljeća kao fiksna kombinacija s artesunatom. Učinkovitost ove kombinacije varira, ali se i dalje primjenjuje u područjima gdje je stopa izlječenja amodiankinom u 28-dnevnoj monoterapiji veća od 80%. Ista se kombinacija ne preporuča u područjima u kojima je česta rezistencija na klorokinsku terapiju zbog moguće križne rezistencije na amodiakin (Lin i sur., 2010). Povijesno prva pojava fiksne kombinacije lijekova u terapiji malarije dogodila se krajem 1960-ih godina kad su u kliničku upotrebu ušli sulfadoksin i pirimetamin (SP). Ubrzo nakon početka primjene došlo je do rezistencije. Rezistencija na sulfadoksin povezuje se s mutacijama na genu koji kodira za dihidropterotat sintazu (DHPS), a rezistencija na pirimetamin vezana je uz točkaste mutacije na DHFR. SP se danas primjenjuje kao sredstvo prevencije kod trudnica i sezonske kemoprevencije u kombinaciji s amodiakinom. SP se primjenjuje samostalno ili u kombinaciji s artesunatom u područjima gdje se pojavila rezistencija na SP. Krajem sedamdesetih i početkom osamdesetih godina 20. stoljeća u terapiju su uvedeni artemisinini, meflokin te dva nova 4-aminokinolina: piperakin i pironaridin. Bez obzira na pojavu rezistencije, danas su u upotrebi kao prva linija liječenja nekomplikirane malarije u sklopu ACT režima. Iako je i na monoterapiju meflokinom došlo do pojave rezistencije, fiksna kombinacija artemisininskog derivata artesunata i meflokina u upotrebi je i danas. Pironaridin je ubrzo nakon pojave u kliničkoj uporabi iščezao. S druge pak strane, piperakin je, nakon pojave rezistencije krajem 80-tih godina, ubrzo vraćen u primjenu u obliku fiksne kombinacije s dihidroartemisininom. Navedena se kombinacija koristi i danas, a iz upotrebe je potisnula artesunat - meflokin. Od 1990. do danas, u kliničku upotrebu ušle su sljedeće kombinacije: artesunat - SP, atovakvon -

progvanil te artemeter - lumefantrin. Iz svega navedenog vidljivo je kako se u zadnjih tridesetak godina fokus istraživača s monoterapije prebacio na kombiniranu terapiju malarije obzirom da plazmodij na monoterapiju razmjerno brzo stvara otpornost (Blasco i sur., 2017).



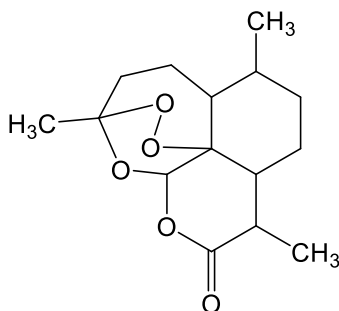
Slika 2. Vremenski prikaz otkrića pojedinih antimalarika i pojave rezistencije na njih. Trakama u boji su prikazana razdoblja korištenja pojedinog lijeka u terapiji malarije. Boja pojedine trake predstavlja skupinu u koju pripada pojedini lijek: plavom bojom su označeni endoperoksidni spojevi, narančastom antifolati, zelenom 4-aminokinolini, ružičastom arilamino alkoholi, a ljubičastom naftokinoni. Crnim trokutićem označena je prva zabilježena pojava rezistencije na lijek. PA (pironaridin - artesunat), DHA - PPK (dihidroartemisinin - piperakin), ASMK (artesunat - meflokin), ASAK (artesunat - amodiakin) (preuzeto i prilagođeno iz Blasco i sur., 2017)

1.1.7 Srpasta anemija i malarija

Srpasta anemija je autosomno-recesivna bolest koja nastaje kao posljedica pogreške u sintezi hemoglobina. Eritrociti koji u sebi nose abnormalno sintetizirani hemoglobin više nisu bikonkavnog oblika, već poprimaju oblik srpa, što pogoduje agregaciji eritrocita u cirkulaciji. Posljedično začepljuju male krvne žile u cirkulaciji i podložni su hemolizi (Damjanov i sur., 2018). Isto tako prilikom provlačenja kroz male krvne žile mogu oštetiti njihov endotel, a osim toga imaju i smanjen kapacitet i kvalitetu transporta kisika kroz organizam (<https://www.afro.who.int/>). Razlog nastanka morfološki i funkcionalno abnormalnih eritrocita je u tome što se jedan od lanaca globinskog dijela hemoglobina sintetizira s defektom. Na položaju 6 u β -lancu hemoglobina dolazi do zamjene aminokiseline glutamata valinom. Ta zamjena uzrokuje nastanak hidrofobnog područja na početku β -lanca koje ima tendenciju stvaranja hidrofobnih interakcija s drugom hidrofobnom regijom koju tvore fenilalanin na položaju 85 te valin na položaju 88 β -lanca susjedne molekule. Uslijed križnog povezivanja lanaca u defektnom hemoglobinu nastaju vlaknasti molekularni agregati koji ometaju protok krvi (Berg i sur., 2013). Uzastopnom polimerizacijom molekula HbS i promjenom oblika eritrocita oštećuje se njihova membrana i postaje propusnija što uzrokuje gubitak kalijevih iona i vode iz stanice te s druge strane gomilanje kalcijevih iona u stanici. Ove promjene dovode do gubitka plastičnosti eritrocita te oni postaju krhki i skraćenog životnog vijeka (Gamulin i sur., 2018). Nositelji gena za srpasta anemiju otporni su na malariju uzrokovanu *P. falciparum* iz razloga što se u abnormalnim eritrocitima karakterističnima za anemiju srpastih stanica ne može pravilno odviti tzv. eritrocitna faza životnog ciklusa plazmodija (Berg i sur., 2013).

1.2 PRIRODNI PRODUKTI I NJIHOVI DERIVATI U TERAPIJI MALARIJE

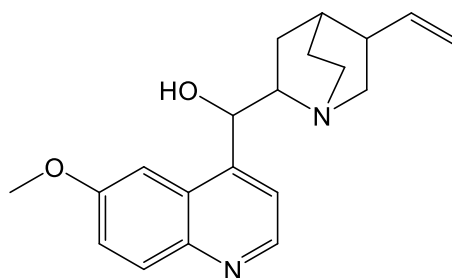
1.2.1 Artemisinin



Slika 3. Strukturna formula artemisinina

Artemisinin je seskviterpenski lakton s endoperoksidnim mostom izoliran iz lista biljke slatki pelin, lat. *Arthemisia annua*, *Asteraceae* (Klayman, 1985). Spoj je otkriven 70-tih godina prošlog stoljeća od strane tima znanstvenika na čijem je čelu bila Tu Youyou, a koja je zbog svog doprinosa 2015. nagrađena Nobelovom nagradom u području fiziologije/medicine (<https://www.nobelprize.org/>). Sama biljka slatki pelin rabila se u kineskoj tradicionalnoj medicini u obliku čaja za snižavanje povišene tjelesne temperature kroz više od 2000 godina (Hommel, 2008). Cilj projekta znanstvenice Youyou, nazvanog Project 523, bio je istražiti recepture u Tradicionalnoj kineskoj medicini kojima se tretirala groznica. Istražili su oko 2000 recepata koje su koristili Kinezi, od kojih su njih 640 uzeli na detaljniju evaluaciju. Biljka *A. annua* nalazila se u većini recepata koje su znanstvenici detaljnije analizirali te su tako došli i do artemisinina koji je pokazao antimalarijsko djelovanje (Su i sur., 2015). Spoj djeluje na eritrocitnu fazu ciklusa plazmodija. U artemisininu djelovanjem Fe^{2+} iona oslobođenih nakon razgradnje hemoglobina u inficiranim eritrocitima dolazi do redukcije endoperoksidnog mosta te se stvaraju njegovi slobodni radikali. Nastali radikali potiču daljnji nastanak radikala i elektrofilnih specija koje poprečnim povezivanjem i alkilacijom DNA uzrokuju smrt inficirane stanice. Osim navedenog mehanizma postoje dokazi kako artemisinin ulazi u direktnu interakciju s *Pf*ATP6 kalcijevom pumpom prisutnom u plazmodiju (Shandilya i sur., 2013). Spoj se primjenjuje oralnim putem, a zbog njegove netopljivosti u vodi tijekom godina razvijeni su bolje topljivi analozi koji su pokazali bolju aktivnost. U prvom redu radi se o artesunatu i dihidroartemisininu topljivima u vodi te artemeteru koji ima bolju topljivost u lipidima. Artemisinin, artesunat i artemeter se u jetri metaboliziraju u dihidroartemisinin. Poluvijek eliminacije navedenih spojeva je u rasponu 1-3 sata (Katzung i sur., 2011) što predstavlja problem jer se koncentracija lijeka u organizmu brže smanjuje nego što lijek uspjeva ispuniti svoj puni potencijal djelovanja. Zbog svoje brze eliminacije *in vivo* ovaj spoj nije prikladan u profilaktičke svrhe (Su i sur., 2015). Kao što je ranije opisano, artemisinin i njegovi derivati dio su ACT režima liječenja malarije. Općenito ovi su spojevi blagog profila nuspojava koje uključuju proljev, mučninu i povraćanje te omaglicu. No, uzevši u obzir da su navedena stanja ujedno i simptomi bolesti, nije sigurno jesu li artemislini ili sama malarija uzročnici GIT – nuspojava. Rijetko se mogu javiti poremećaji krvi kao što su smanjen broj neutrofila i anemija, a kod pacijenata s alergijom na porodicu *Asteraceae* moguće je da artemisinin izazove reakcije preosjetljivosti (WHO Guidelines for the treatment of malaria, 2015).

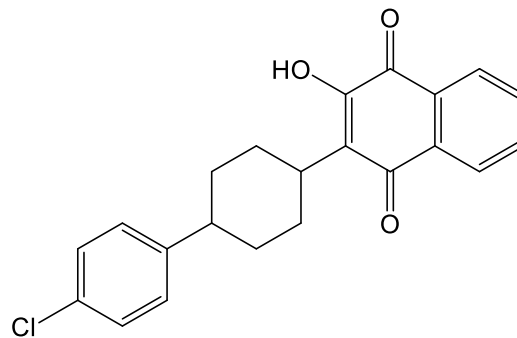
1.2.2 Kinin



Slika 4. Strukturna formula kinina

Kinin, kao i njegov dijastereomer kinidin su alkaloidi pronađeni u kori kininovca, a po kemijskoj strukturi pripadaju skupini 4-supstituiranih aminokinolina. 1820. godine francuski znanstvenici Pierre Pelletier i Joseph Caventou izolirali su alkaloid kinin iz kore biljke *Cinchona spp.* (Rosenthal, 2001). Shema sinteze ovog spoja objavljena je 1944. na čelu sa znanstvenicima Woodwardom i Doeringom (Woodward i sur., 1944). Djeluje gametocidno za *P. vivax*, *P. ovale* te *P. malariae*, ali ne i *P. falciparum*. Ovaj spoj ima jako shizontocidno djelovanje protiv plazmodija u eritrocitnoj fazi životnog ciklusa. Mehanizam djelovanja kinina nije još uvijek potpuno razjašnjen. Postoje tri mehanizma koji su zasad prihvaćeni. Prvi mehanizam je interkalacija u DNA plazmodija čime ometa procese transkripcije i translacije. Drugi mehanizam je interakcija s masnim kiselinama unutar eritrocita čime sprječava sazrijevanje shizonata i uzrokuje hemolizu eritrocita. Treći mehanizam je ometanje procesa razgradnje hemoglobina koji je toksičan za parazita (Kuhlmann i Fleckenstein, 2017). Mogući putevi primjene su peroralno i parenteralno (Salako i sur., 1992). Nakon unosa u organizam, kinin prolazi intenzivan metabolizam uglavnom preko CYP3A4 čime nastaje 3-hidroksikinina koji je, uz nepromijenjeni kinin njegov glavni metabolit u urinu (Mirghani i sur., 2003). Kinin je lijek uske terapijske širine, a česte nuspojave ovog lijeka su: tinitus, glavobolja i vrtoglavica, mučnina te disforija; zajednički nazvane „cinchonizam“. Poremećaj sluha najčešće je reverzibilan, a ovisi o koncentraciji primijenjenog lijeka (WHO Guidelines for the treatment of malaria, 2015). Kinin je jaki stimulator sekrecije inzulina iz pankreasa pa stoga može izazvati hiperinzulinemijsku hipoglikemiju. Kod teških oblika malarije hipoglikemijska kriza kao posljedica primjene lijeka ima slične simptome kao simptomi bolesti (znojenje, tahikardija, žmarci) što otežava razlikovanje simptoma bolesti i nuspojave lijeka (Guerrant i sur., 2011).

1.2.3 Atovakvon



Slika 5. Strukturna formula atovakvona

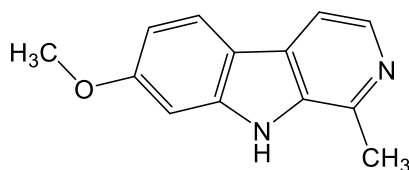
Ekstrakt kore biljaka iz porodice *Bignoniaceae* tradicionalno se koristi u liječenju malarije. U gotovo svim vrstama ove porodice pronađen je spoj lapahol koji posjeduje antifungalno, antibakterijsko, citostatsko i antimalarijsko djelovanje, te je stoga iskorišten kao spoj uzor u razvoju atovakvona (Zofou i sur., 2013). Mehanizam antimalarijskog djelovanja atovakvona je u tome što inhibira citokrom bc₁ kompleks (ubikvinol – citokrom c oksidoreduktazu) čime se u stanici blokira sinteza ATP-a (Birth i sur., 2014). Osim u liječenju malarije, atovakvon se može primjenjivati i kod pneumocistoze uzrokovane *Pneumocystis jirovecii*. Za tu indikaciju primarno se koriste kombinacija lijekova sulfametoksazol - trimetoprim te pentamidin, međutim atovakvon se bolje podnosi. Uz to, atovakvon u kombinaciji s azitromicinom koristi se kod babezioze, bolesti pasa i mačaka srodnoj malariji (Ryan, 2018). Atovakvon u kombinaciji s progvanilom primjenjuje se kao profilaksa kod putnika koji odlaze u područja zahvaćena malarijom (Nicosia i sur., 2008). Moguće je koristiti navedenu kombinaciju i u liječenju nekomplikirane malarije putnika koji su se vratili iz područja zahvaćenih malarijom, a nisu koristili kemoprofilaksu prije odlaska te kod nekomplikirane malarije uzrokovane *P. falciparum* i *P. knowlesi* (Plewes i sur., 2019). Sam atovakvon je izrazito lipofilna molekula koja se slabo apsorbira iz GIT-a, a nakon apsorpcije veže se oko 99% za proteine plazme. Obzirom da podliježe enterohepatičkoj cirkulaciji, atovakvon se većinom eliminira nepromijenjen fecesom s poluvremenom eliminacije 2 do 3 dana (Katzung i sur., 2011). Fiksna kombinacija atovakvon - progvanil može djelovati i na hepaticku fazu ciklusa te nema značajnijih nuspojava (Biamonte i sur., 2013). Najčešće su glavobolja, kašalj te gastrointestinalne smetnje, dok se vrtoglavica i oralne ulceracije javljaju rijetko. Također, kombinacija je sigurna za primjenu u trudnoći (WHO Guidelines for the treatment of malaria, 2015).

1.2.4 Antibiotici u liječenju malarije

Neki antibiotici posjeduju umjereno antimalarijsko djelovanje. Iako su preslabi i presporog djelovanja da bi se koristili u monoterapiji, u kombinaciji s drugim antimalaricima mogu biti prilično učinkoviti. U takvim kombinacijama brzodjelujući antimalarici (npr. artemisinin ili njegovi derivati) smanjuju koncentraciju plazmodija, a antibiotik služi kao pomoćni lijek koji uništava preostale parazite ili one rezistentne na osnovni brzodjelujući lijek. Također, antibiotike je moguće koristiti i u profilaksi bolesti kod rizičnih skupina kao što su primjerice trudnice i HIV – pozitivni pacijenti u područjima s rasprostranjenom malarijom. Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina na ribosomima bakterija, u plazmodiju to čine djelovanjem na parazitski plastid apikoplast (Katzung i sur., 2011). Od antibiotika u liječenju i kemoprofilaksi malarije koriste se najčešće linkozamid klindamicin (Obonyo i sur., 2012) i tetraciklin doksiciklin (Vardanyan i Hrubi, 2006).

1.2.5 Prirodni spojevi kao spojevi uzori za sintezu novih derivata kao potencijalnih antimalarika

1.2.5.1 Harmin i njegovi derivati



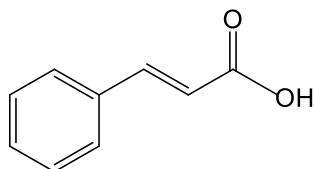
Slika 6. Strukturna formula harmina

Osim navedenih lijekova koje je proizvela priroda i primjenjuju se kao antimalarici, postoji još čitav niz spojeva iz prirodnih izvora koji među ostalim djelovanjima posjeduju i antimalarijsko. Takvi spojevi imaju potencijal da budu spojevi uzori u razvoju novih antimalarika. Iz sjemenki biljke *Peganum harmala* izolirani su β -karbolinski alkaloidi: harmin, harmalin, harman i harmalol koji pokazuju različita farmakološka djelovanja: antifungalno, antibakterijsko, insekticidno, antileišmanijsko te antiparazitno. Pokazano je da navedeni β – karbolinski spojevi koje posjeduje ova biljka pokazuju vrlo snažnu inhibitornu aktivnost na *P. falciparum* (Niroumand i sur., 2015). Mehanizam djelovanja harmina je inhibicija proteina Hsp90, visokokonzerviranog šaperona koji se, među ostalim, nalazi i u organizmu plazmodija. Inhibicija proteina događa se kompetitivnim vezanjem harmina na *N*-terminalnu ATP – vezujuću domenu proteina Hsp90 (Shahinas i sur., 2012). Inhibitori Hsp90 istražuju se i kao potencijalni citostatici što znači da bi mogli biti toksični i za ljudske stanice (Biamonte i sur.,

2013). Ovaj spoj u novije vrijeme istražuje se i zbog svog djelovanja kod depresije. Studije su pokazale kako spoj smanjuje bihevioralne i biokemijske promjene povezane s depresijom i nakon akutne i nakon kronične primjene. Studije na hipokampusu štakora pokazale su povišenje razina BDNFa nakon primjene harmina što bi moglo imati pozitivan učinak na neuroplastičnost mozga (Dos Santos i Hallak, 2019). Studije vezane uz farmakokinetiku navedenih spojeva u trenutku pisanja ovog rada ograničenog su pristupa i nekonzistentne što upućuje na potrebu za dodatnim istraživanjima u ovom području.

Kao dio tradicionalne medicine u Zapadnoj i Središnjoj Africi koristi se biljka *Guiera senegalensis*. Listovi ove biljke pripremaju se u obliku dekokta kod gastrointestinalnih problema, respiratornih infekcija, reumatizma te malarije. Između ostalih, u biljci se nalazi alkaloid harman kojem se pripisuje antimalarijsko djelovanje (Shahinas i sur., 2010).

1.2.5.2 Derivati cimetine kiseline



Slika 7. Strukturna formula cimetine kiseline

Cimetna kiselina je monokarboksilna kiselina koja se u prirodi može pronaći u biljci *Cinnamomum cassia*. Ovaj spoj FAO je registrirala kao dodatak prehrani te se može koristiti kao korigens okusa (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Spoj se istraživao kao potencijalni: antioksidans, hepatoprotektivni agens, anksiolitik, antidijabetik, hipolipemik i repelent (Sharma, 2011). U novije vrijeme se istražuju derivati koji povezuju antimalarike koji se koriste u terapiji s derivatima cimetine kiseline. Razlog za to jesu otkrića kako derivati cimetine kiseline pokazuju inhibitorno djelovanje na rast *P. falciparum* u eritrocitnoj fazi životnog ciklusa, odnosno imaju antimalarijski potencijal. Derivati cimetine kiseline to čine inhibicijom NPP-ova koji se nalaze na membranama eritrocita, a plazmodiju služe za unos nutrijenata, izbacivanje nepotrebnih produkata te regulaciju volumena i ionskog balansa unutar inficiranog eritrocita (Pérez i sur., 2012). Stoga povezivanjem dvaju kemijskih entiteta koji zasebno posjeduju djelovanje na parazite roda *Plasmodium* u novu hibridnu molekulu, to djelovanje se pojačava dok se istovremeno poboljšava sigurnosni profil i smanjuje rizik od rezistencije (Pérez i sur., 2013). Na temelju ovih istraživanja opravdano je harmin, koji i sam posjeduje antimalarijsko djelovanje povezati s cimetnom kiselinom i njezinim derivatima.

1.3 ANTIMALARICI U KLINIČKIM STUDIJAMA

U trenutku pisanja ovog rada, a prema podacima službene stranice o lijekovima za liječenje malarije, u fazi kliničkih ispitivanja 10 je potencijalnih lijekova (www.mmv.org). Većina spojeva u razvoju su krvni shizontocidi protiv nekomplikirane malarije uzrokovane *P. falciparum*. Ispituju se njihove karakteristike u sklopu monoterapije te u kombinacijama s drugim već registriranim ili također potencijalnim antimalaricima. Istraživanja na ovom području vrlo su dinamična, a rezultati se u literaturi nalaze s vremenskim odmakom, te je za pretpostaviti kako u trenutku pisanja rada postoji još nekolicina potencijalnih antimalarika kojima se ispituju farmakokinetičke, sigurnosne i značajke učinkovitosti, te određuje režim doziranja. Neki od potencijalnih antimalarika detaljnije su opisani u nastavku teksta.

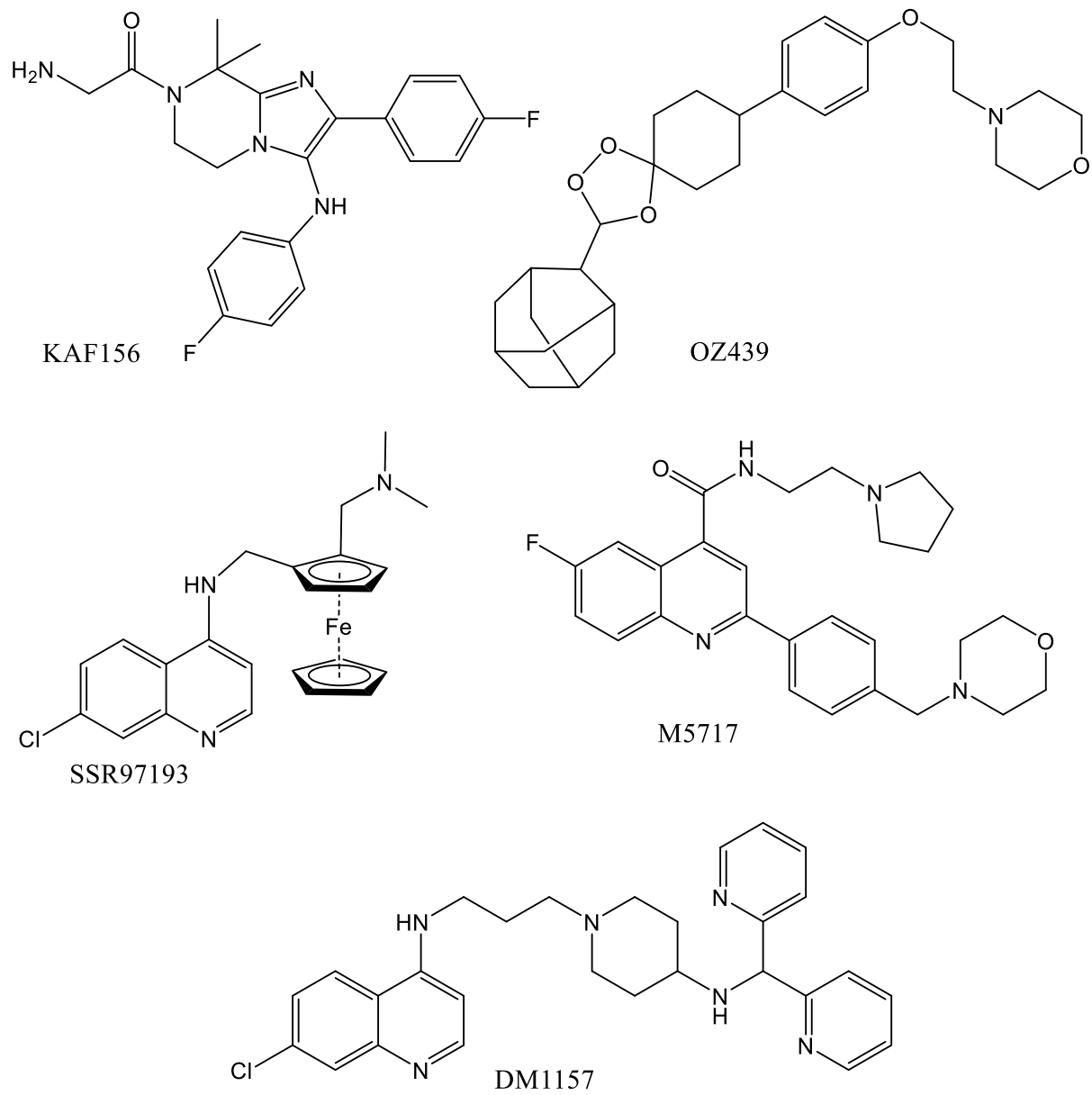
Ganaplacid, spoj s kodnim imenom KAF156, jedan je u nizu antimalarika u fazi kliničkih ispitivanja. Radi se o prvom potencijalnom antimalariku iz skupine imidazolopiperazina (Diagana, 2015). Mehanizam djelovanja spoja još nije otkriven, no ono što je dosad uočeno je kako se smanjena osjetljivost na spoj povezuje s mutacijama plazmodija na CARL genskom lokusu te genima koji kodiraju za transporter UDP-galaktoze i transportere acetil-CoA (<https://www.mmv.org/>). U prekliničkim studijama je uočeno kako je ganaplacid djelotvoran na sve faze plazmodija u čovjeku te nisu zabilježene opasne nuspojave. Trenutno se provodi faza II ispitivanja u kombinaciji s partnerskim lijekom lumefantrinom (Koller i sur., 2018). Dosad je ganaplacid pokazao vrlo dobru aktivnost protiv parazita rezistentnih na trenutnu terapiju te ubrzano uklanjanje plazmodija iz zaraženog organizma (unutar prvih 48 sati). Uz navedeno, nakon primjene 800 mg spoja, on ostaje u koncentraciji višoj od minimalne parazitocidne koncentracije dulje od 8 dana (<https://www.clinicaltrials.gov>).

Kombinacija dvaju kemijskih entiteta nazvanih artefenomel (OZ439) i ferokvin (SSR97193) krajem 2019. godine završila je s IIb fazom kliničkih ispitivanja. Artefenomel je dugodjelujući sintetski ozonid s poluvremenom eliminacije između 46 i 62 sata (Ashley i Phyo, 2018). Prednost artefenomela je njegova mogućnost dužeg vremena zadržavanja u plazmi u odnosu na prijašnju terapiju, čime je osigurana veća izloženost parazita lijeku. Također postoji mogućnost da zbog navedenog artefenomel učinkovito djeluje nakon samo jedne primjenjene doze (van Huijsduijnen i sur., 2019). Ferokvin je spoj iz skupine 4-aminokinolina koji je u *in vitro* studijama pokazao djelotvornost na piperakin i klorokin rezistentne parazite, a poluvrijeme eliminacije iznosilo je 16 sati (Ashley i Phyo, 2018). Rezultati faze IIb kliničke studije do zaključenja ovog rada nisu objavljeni, odnosno pristup im je ograničen. Ako se pokaže kako je faza IIb uspješno završena, velik je potencijal za registraciju ove kombinacije u borbi protiv

malarije. Također, artefenomel (OZ439) je uz spoj OZ609 testiran na djelotvornost protiv *P. falciparum* koji imaju mutacije na genskom lokusu za protein kelch 13 za kojeg se smatra da uzrokuje rezistenciju na artemisinine. Ova dva spoja pokazala su se djelotvornima na kelch 13 mutiranim izolatima što bi značilo da se na ovaj način potencijalno može prevladati rezistencija na artemisinin i njegove derivate (Walz i sur., 2019).

Rezistencija na klorokin potaknula je razvoj novih spojeva koji bi je prevladali. Tako je primjerice spoj DM1157 razvijen iz klorokina. DM1157 djeluje inhibitorno na stvaranje β – hemozina, ali s mnogo višom razinom inhibicije nego što je to potvrđeno kod klorokina (Tse i sur., 2019). Lijek je ušao u prvu fazu kliničkih ispitivanja na Duke University School of Medicine, North Carolina gdje se na uzorku 50 zdravih dobrovoljaca u dobi od 18 do 45 godina ispitala sigurnost primjene i farmakokinetički parametri nakon primjene ovog spoja. Studija je bila dvostruko slijepa i randomizirana te podijeljena u 3 dijela. Ispitivana je sigurnost nakon: pojedinačnih doza 9-900 mg i ponavljanih doza 150-900 mg te sigurnost i tolerabilnost lijeka ovisno o tome uzme li se s hranom ili ne. Uz sigurnosne, određeni su i farmakokinetički parametri za sva tri dijela studije (<https://www.nih.gov>). No, studija je prekinuta 2019. godine jer se DM1157 pokazao toksičnim u višim dozama, dok u nižim dozama nije bio učinkovit (<https://clinicaltrials.gov>).

M5717 spoj je koji inhibira sintezu proteina u plazmodiju djelujući na elongacijski faktor 2 (EF2). Također, i ovdje je riječ o tvari koja djeluje na eritrocitni dio ciklusa parazita. Faza I kliničkih ispitivanja bila je provedena na volonterima s područja Australije, a završena je u ljeto 2019. godine. Spoj je dugodjelujući pa bi se mogao primjeniti kao dio ACT režima liječenja, ukoliko se u nastavku kliničkih ispitivanja pokaže dobrim (<https://www.mmv.org>).



Slika 8. Strukturne formule potencijalnih antimalarika u fazi kliničkih ispitivanja

1.4 CLICK KEMIJA

Pojam *click* reakcije u znanost 2001. godine uveo je K. Barry Sharpless. Prema njegovoj definiciji, *click* kemija obuhvaća reakcije koje karakterizira visoko iskorištenje, široka mogućnost primjene i jednostavnost reakcijskih uvjeta. Polazne tvari i reagensi za *click* reakcije moraju biti lako dostupni spojevi. Ako je nužno korištenje otapala, ona moraju biti bezopasna (npr. voda) te bi se morala lako ukloniti nakon provedene reakcije. Pored toga, nusprodukti ovih reakcija moraju se moći otkloniti nekromatografskim metodama (primjerice destilacijom ili kristalizacijom), a produkti reakcija su stereospecifični, no ne nužno i enantioselektivni te su stabilni u fiziološkim uvjetima (Kolb i sur., 2001). Postoji nekoliko vrsta *click* reakcija koje ulaze u definiciju *click* kemije, a to su: reakcije nukleofilnog otvaranja, ne-aldolne reakcije karbonilnih spojeva, Michaelove adicije i reakcije cikloadicije (Gandhi i sur., 2012). Od svih vrsta, reakcije cikloadicije najčešće su korištene *click* reakcije.

1.4.1 Reakcije cikloadicije

Cikloadicijske reakcije vrsta su kemijskih reakcija u kojima se azid adira na alkin uslijed čega dolazi do zatvaranja 1,2,3-triazolskog prstena. Katalizator je u nekim slučajevima potreban, dok se druge vrste cikloadicije mogu provesti bez njega. U nastavku su opisani podtipovi reakcija ove skupine.

1.4.1.1 CuAAC – Bakrom katalizirana reakcija azida i alkina

Ovaj tip reakcije naziva se još i Huisgenova 1, 3 dipolarna cikloadicija. Najčešće je korišten tip *click* reakcije koji obuhvaća formaciju 1,2,3-triazolskog prstena nukleofilnom adicijom dušikovog atoma iz azida na elektropozitivan ugljikov atom terminalnog alkina ili cikloalkina kataliziran Cu (I) ionima (Gandhi i sur., 2012). 1,2,3-triazol koji nastaje u tim reakcijama služi ili kao farmakofor ili kao poveznica između dva dijela složene molekule. Dosad je otkriveno kako spojevi s ovim heterocikličkim prstenom pokazuju antibakterijsko, antihelmintičko, antifungalno, antimalarijsko, tripanocidno te citostatsko djelovanje (Salehi i sur. 2016). Jednovalentne ione bakra moguće je direktno koristiti dodatkom CuBr ili Cu (I). Loše strane ovog načina provođenja reakcije su što se mora provoditi u redukcijskoj atmosferi te uz organska otapala što se ne smatra ekološki prihvatljivim. Također, potrebno je i maskirati pojedine skupine zaštitnim sredstvima uz dodatak baze obzirom da se reakcija provodi u agresivnim otapalima. Druga mogućnost stvaranja Cu (I) je redukcijom dvovalentnih bakrovih spojeva *in situ*. Neka od mogućih redukcijskih sredstava su natrijev askorbat, hidrazin i TCEP. *In situ* redukcija katalizatora svoje pozitivne strane ima u tome što ju je moguće provoditi u

vodi te ne zahtijeva atmosferu bez kisika, a i jeftinija je od prve opisane metode. Loša joj je karakteristika moguća redukcija Cu (II) u Cu (0), ali ona se može izbjeći dodatkom THPTA koji će stabilizirati bakrov spoj. Postoje još neki načini generiranja Cu (I) iona za katalizu, kao što je oksidacija elementarnog bakra solima amina. No taj postupak se danas izbjegava jer je dugotrajan te zahtijeva kiseli medij koji bi mogao negativno utjecati na neku od skupina polaznog spoja (Hein i sur., 2008).

1.4.1.2 RuAAC – Rutenijem katalizirana reakcija azida i alkina

Za razliku od CuAAC, koja je ograničena samo na terminalne alkine, ovaj tip cikloadicije obuhvaća i alkine kojima trostruka veza nije na terminalnim C atomima. Reakcija alkina i azida odvija se u prisutnosti Ru (II) kompleksa koji sadrži [Cp*₂RuCl] u nekom aprotičnom otapalu. Najčešće korištena otapala su benzen, toluen, THF i dioksan. Protična otapala nisu pogodna jer se pokazalo kako se njihovom primjenom smanjuje iskorištenje i povećava količina nusprodukata reakcije. Reakcijom također nastaje 1,2,3-triazol. Iako je moguće provesti reakciju na sobnoj temperaturi zbog visoke reaktivnosti navedenog rutenijevog kompleksa, u praksi se može koristiti povišena temperatura kako bi se smanjilo trajanje sinteze (Johannson i sur., 2016).

1.4.1.3 SPAAC – Reakcija azida i cikloalkina

Analogno reakciji azida i alkina, Huisgenova cikloadicija može se provesti i na cikličkim spojevima kojom također nastaju stabilni 1,2,3-triazoli. Za razliku od CuAAC, ove reakcije ne trebaju prisutnost metalnih iona da bi se provele (Mbua i sur., 2011). Ciklički spojevi koji se koriste za ovaj tip reakcije su cikloooktini, najčešće dibenzo-cikloooktini (DBCO). Razlog uporabe DBCO spojeva je taj što se reakcije mogu provoditi u vodenom mediju, a kinetika je brza. Također, uvjeti reakcije mogu biti blagi bez straha da će se pri fiziološkim uvjetima temperature i pH dogoditi reakcije DBCO s amino i hidroksilnim skupinama prisutnim u biomolekulama (<https://clickchemistrytools.com/>).

1.4.2 Mogućnosti primjene reakcija cikloadicije

1,2,3-triazol koji nastaje cikloadicijskim reakcijama pokazao se kao vrlo dobra poveznica između dvije molekule zbog svoje otpornosti na metaboličku razgradnju. Također ovaj heterociklički prsten ima mogućnost stvaranja vodikovih veza zbog čega pokazuje visok potencijal vezanja na biološke molekule – potencijalne mete lijekova. Stvaranje vodikovih veza uz navedeno i povećava topljivost spoja što je još jedna od prednosti (Agalave i sur., 2011).

Triazolski prsten smatra se bioizosteom amidne skupine, ali za razliku od nje puno je otporniji na metaboličku razgradnju proteazama i peptidazama *in vivo* (Meyer i sur., 2016). Stoga ne čudi činjenica da se područje *click* kemije, a posebno reakcija cikloadicija danas koriste u različitim granama kemijske industrije.

Strategija metom vođene sinteze (TGS) podrazumijeva mogućnost da biološka meta u mnoštvu manjih fragmenata „odabire“ liganade koji će se na nju vezati i reagirati kako bi nastala aktivna molekula lijeka na samom mjestu djelovanja. Inačice TGS strategije imaju potencijal primjene u području *in situ click* kemije (Thirumurugan i sur., 2013). U nastavku teksta ovaj je pristup opisan na primjeru enzima acetilkolinesteraze.

Začetnik *click* kemije Sharpless, u sklopu implementacije svoje ideje u praktičnu primjenu, radio je pokuse na malim molekulama – potencijalnim inhibitorima acetilkolinesteraze. Rad njegovog tima temeljio se na pretpostavci kako dvije male molekule nastale dekonstrukcijom aktivne tvari mogu, uz pomoć enzima acetilkolinesteraze koji ih usmjeri u pravilnu orijentaciju, reagirati bez prisutnosti katalizatora te stvoriti aktivan lijek *in situ*. Ovo je otkriće važno iz više razloga, ali onaj koji se nameće kao glavni jest smanjena opasnost od potencijalnog toksičnog učinka lijeka prije nego lijek dođe do mjesta djelovanja (Bourne i sur., 2016). Isti pristup upotrebljen je kod razvoja lijekova inhibitora HIV-proteaze (Whiting i sur., 2006).

Pri sintezi lijekova – kandidata za tuberkulostatike vrlo je zanimljiva uloga triazola. Naime analiza međuovisnosti strukture i aktivnosti pokazala je kako prisutnost atoma akceptora vodikove veze unutar heterocikličkog aromatskog prstena posjeduje veću djelotvornost protiv mikobakterija u usporedbi sa spojevima koji u sebi nemaju takav prsten (Agalave i sur., 2011).

Označavanje biomolekula još je jedna u nizu primjena ove vrste kemije u znanosti. Svojstva *click* kemije da su dovoljni blagi uvjeti za odvijanje reakcija, razlog su zbog kojeg se mogu koristiti pri markiranju peptida, proteina i protutijela. Biomolekule je nužno obrađivati u vodenom mediju, na sobnoj temperaturi da ne dođe do njihove denaturacije. No reakcije obilježavanja biomolekula radioizotopom neposrednim putem problematične su jer zahtijevaju više temperature i organska otapala u reakcijama. Taj postupak mogao bi uništiti organsku makromolekulu. Zbog toga se postupak obilježavanja provodi na način da se s radioizotopom prvo označi manja molekula – prostetska skupina koja podnosi agresivnije uvjete reakcije. Tako radioizotopno obilježena prostetska skupina može se spojiti unutar organizma *click* reakcijom s biomolekulom (proteinom, nukleinskom kiselinom). Time dobivamo obilježenu biomolekulu kojoj je sačuvan integritet (Meyer i sur., 2016).

Click reakcije pronašle su svoju primjenu i u industriji materijala, napose polimera. Primjer za to su razgranate dendrimerne strukture koje su bile poseban izazov za sintezu zbog problema pri pročišćavanju produkata te nedovoljnoj čistoći produkata. Otkriće i implementacija Cu (I) kataliziranih *click* reakcija uvelike olakšala proizvodni proces (Moses i Moorhouse, 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Malarija je jedna od najopasnijih infektivnih bolesti u svijetu s glavnim žarištima u predjelima subsaharske Afrike, jugoistočne Azije te istočnog Sredozemlja. Ova bolest kod oboljelih može izazvati mnoge teške posljedice i komorbiditete. U prvom redu razvija se teška anemija, mogući su respiratorni problemi te teži oblici dijareje. U teškim slučajevima bolesti pacijent je pod rizikom od zatajenja bubrega ili začepljenja krvnih žila u mozgu što konačno dovede do ishemijskog moždanog infarkta.

Prema podacima WHO-a procijenjeni broj slučajeva zaraze malarijom 2018. godine iznosio je 228 milijuna na globalnoj razini, od čega je 405 tisuća slučajeva imalo smrtni ishod. Posebno je zabrinjavajuća činjenica kako se od ukupnog broja smrtnih slučajeva, čak 272 tisuće odnosilo na populaciju djece mlađe od 5 godina što ih čini najrizičnijom skupinom za fatalni ishod. Trudnice su također rizična skupina jer bolest može dovesti do spontanih pobačaja, teške anemije djeteta te rađanja djece niske porođajne težine. 94% smrtnih ishoda ograničeno je na područje Afrike, od čega najviše u Nigeriji, DR Kongu, Tanzaniji, Angoli, Mozambiku te Nigeru. Potreba za prevencijom i liječenjem malarije nužna je na spomenutom području obzirom na visoku napučenost i nizak životni standard stanovnika (World Malaria Report, 2019).

Trenutno najveći problem u terapiji malarije je rezistencija na antimalarike koja se brzo razvija. Znanstvena zajednica prepoznala je problem, te je potraga za novim antimalaricima vrlo aktivna kako bi se pronašli novi lijekovi po mogućnosti s novim mehanizmima djelovanja što bi predstavljalo značajan napredak u terapiji i dovelo do smanjenja broja slučajeva i smrtnosti. Trenutno postoji desetak spojeva u fazi kliničkih ispitivanja, od kojih se neki ispituju kao fiksne kombinacije dviju aktivnih supstanci.

Harmin je β -karbolinski indolaminski alkaloid iz skupine harmala alkaloida. Osim harmina u navedenu skupinu ulaze i: harmalin, tetrahidroharmin, harman, norharman, tetrahidroharman, harmol, harmalol, peganin te deoksipeganin. Harmin se većinom nalazi u biljkama roda *Peganum*, npr. *P. harmala* te *Eurycoma longifolia*. Spoj pokazuje mnoge farmakološke učinke, između ostalog: antimikrobni, antiproliferativni, antioksidativni, antidepresivni, protuupalni i neuroprotektivni učinak (Javeed i sur., 2018). Mehanizam antimalarijskog djelovanja harmina je moguće povezan s inhibicijom Hsp90, vrlo istraživanog šaperonskog proteina, koji u eukariotskim stanicama pomaže pri procesu pravilnog smatanja proteina. Pravilno smotani proteini mogu obavljati svoje regulatorne funkcije, dok oni kod kojih je smatanje izostalo ili je krivo provedeno nisu funkcionalni, te ih stanice obilježe za proces ubiquitinacije, odnosno uništavanja (Murillo-Solano i sur., 2017). Stoga bi inhibicija Hsp90 u plazmodiju prouzročila

nastajanje nefunkcionalnih proteina, a kako su oni neophodni za normalno odvijanje svih procesa, parazit ne može opstati.

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija novih konjugata harmina i cimetine kiseline povezanih 1,2,3-triazolskom poveznicom. Povezivanje harmina s derivatima cimetine kiseline, također nositeljima antimalarijskog djelovanja, preko 1,2,3-triazola kao poveznice, moglo bi rezultirati novim derivatima s pojačanim antimalarijskim djelovanjem.

Ispitivanje antimalarijskog djelovanja sintetiziranih spojeva biti će provedeno naknadno te izlazi iz okvira ovog rada.

3. MATERIJALI I METODE

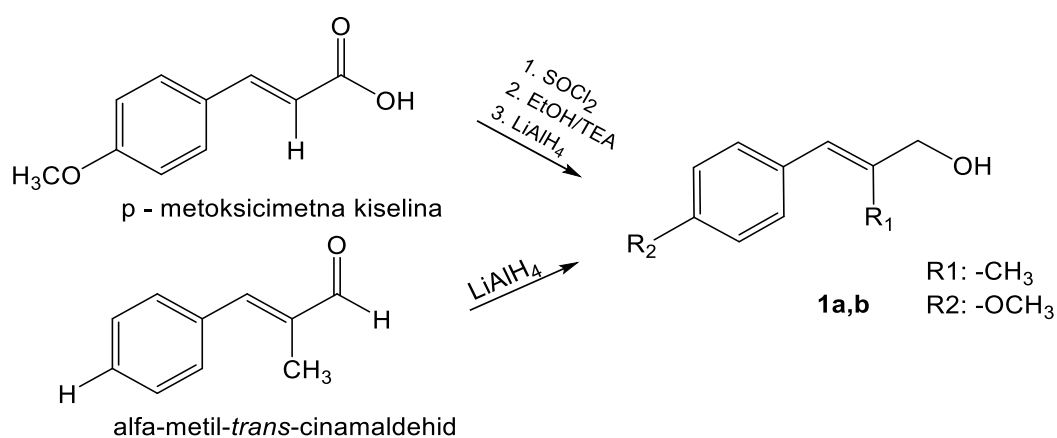
Tališta (t_r) spojeva određena su na uređaju Stuart SMP3 (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. H^1 i C^{13} spektri snimljeni su na uređaju Bruker AV- 400 (Bruker, Billerica, MA, SAD) pri 300 MHz za H^1 i pri 75 MHz za C^{13} . Uzorci su mjereni u cjevčicama debljine 5 mm u $DMSO - d_6$ otopinama pri temperaturi od 20 °C. Kao unutarnji standard korišten je TMS, a kemijski pomaci izraženi su u odnosu na njega u ppm. IR spektri snimljeni su na spektrofotometru FT-IR PerkinElmer Paragon 500 (Perkin Elmer, UK), a spektri masa na HPLC – MS/MS spektrometru (Agilent Technologies Triple Quadropole 6420).

Tijek kemijskih reakcija te čistoća produkata i međuprodukata kontrolirani su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Kao nepokretna faza TLC-a korištene su silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka), a kao pokretne faze korištene su smjese otapala: cikloheksan / etil-acetat (9:1 i 2:1), cikloheksan / etil-acetat / metanol (3:1:0,5, 1:1:0,5) i DCM / metanol (95:5, 97:3). Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063 – 0,200 mm (Kemika, Hrvatska), uz iste pokretne faze kao i za TLC. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ($\lambda = 254$ nm) i parama joda.

ADMP, α -metil-*trans*-cinamaldehyd, bezvodni eter DBU, cezijev karbonat, harmin, $LiAlH_4$, natrijev hidrid, propargil – bromid i tionil klorid nabavljeni su od tvrtke Sigma – Aldrich (SAD). Bakrov (II) acetat nabavljen je od tvrtke Alfa – Aesar (SAD). Harmol je pripremljen reakcijom cijepanja metilnog etera prisutnog u harminu upotrebom bromovodične kiseline (Frédérick i sur., 2012).

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

3.1 Opći postupak sinteze derivata cimernog alkohola



Otopina 0.053 g *p*-metoksicimetne kiseline (0,3 mmol), 1,1 mL tionil klorida (1,78 g, 0,015 mol) i dvije kapi DMF-a u suhom toluenu miješana je na sobnoj temperaturi 1 sat. Otapalo je

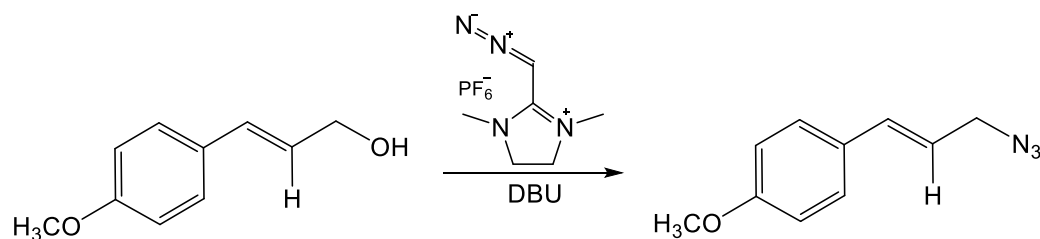
upareno pod sniženim tlakom i dva puta napareno kako bi se uklonio preostali tionil klorid. Dobiveni sirovi produkt kiselinskog klorida otopljen je u suhom diklormetanu i ta otopina je dokapana u otopinu 0,304 g TEA (0.3 mmol) u 5 ml apsolutnog etanola. Reakcijska smjesa miješana je 1 sat na sobnoj temperaturi. Otapala su uparena pod sniženim tlakom. Ostatak je otopljen u 30 ml smjese etil-acetat/voda = 1:1. Organski sloj je ekstrahiran vodom 2×30 ml, osušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni **ester** je korišten u idućem koraku bez daljnjeg čišćenja.

Smjesi 0.061 g estera dobivenog u prethodnom koraku (0,29 mmol), odnosno 0.042 g α -metil-*trans*-cinamaldehyda (0,29 mmol), u suhom dietil eteru dodan je LiAlH_4 (0,5 mmol) u atmosferi zasićenoj argonom na -5°C . Reakcijska smjesa je miješana tri sata na -5°C te je prekinuta dodatkom 20 mL vode i zakiseljena 1 % otopinom HCl do prestanka pjenjenja. Ekstrahirana je etil-acetatom 2×20 ml. Organski slojevi su isprani vodom, osušeni iznad bezvodnog natrijevog sulfata i uparen pod sniženim tlakom. Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava cikloheksan/etil-acetat (2:1) dobiveni su alkoholi **1a/b**.

3.2 Opći postupak sinteze azida cimetne kiseline (2a,b)

Otopini 0.5 mmol odgovarajućeg alkohola (**1a,b**) u suhom THF-u dodano je 0.171 g ADMP-a (0.6 mmol) i 0.097 mL DBU (0.099 g, 0.65 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na 0°C 10 minuta. Potom je reakcijskoj smjesi dodana zasićena otopina NH_4Cl te je smjesa ekstrahirana 2×30 mL DCM-a. Organski slojevi su sakupljeni i ekstrahirani 2×30 mL zasićene otopine NaCl, osušeni nad bezvodnim Na_2SO_4 i upareni pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan / etil-acetat = 9:1, dobiveni su odgovarajući azidi **2a,b**.

3.2.1 Sinteza 1-[(1*E*)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-metoksibenzena (2a)



Količina alkohola **1a**: 0.082 g.

Iskorištenje: 0.039 g **2a** (41 %).

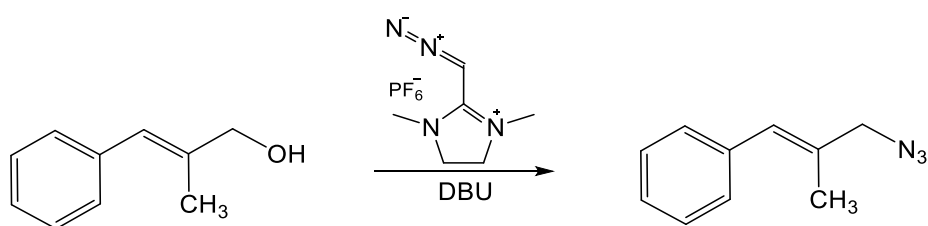
ESI-MS m/z : 301.1 ($\text{M}+1$)⁺.

IR (film, ν/cm^{-1}) 3035, 3004, 2953, 2935, 2837, 2101, 1652, 1607, 1512, 1464, 1250, 1175, 1034, 970, 841, 803.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 7.44 – 7.71 (m, 2H), 6.93 – 6.89 (m, 2H), 6.65 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 6.27 – 6.18 (m, 1H), 3.99 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 159.23, 133.69, 128.44, 127.89, 120.42, 114.11, 55.13, 52.36.

3.2.2 Sinteza [(1E)-3-azido-2-metilprop-1-en-1-il]benzena (2b)



Količina alkohola **1b**: 0.074 g.

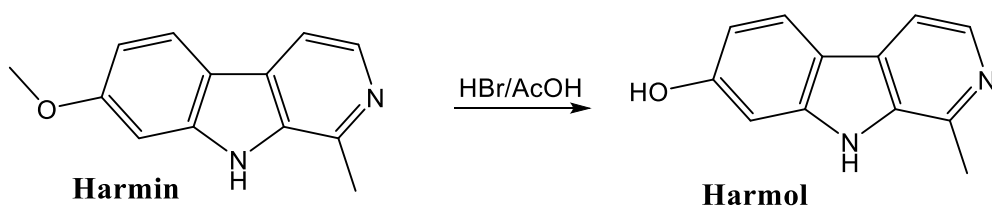
Iskorištenje: 0.061 g **2b** (71 %).

ESI-MS m/z : 353.1 ($M+1$)⁺.

IR (film, ν/cm^{-1}) 3035, 2926, 2068, 2101, 1605, 1510, 1351, 1290, 1115, 968, 883, 746, 693. ^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 7.41 – 7.27 (m, 5H), 6.57 (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 1.89 (s, 3H);

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 136.50, 132.75, 128.75, 128.33, 128.25, 126.90, 58.67, 16.15;

3.3 Sinteza harmola



0.250 g **harmina** (1.178 mmol) dodano je u 3 mL octene kiseline i 1.5 mL 47% HBr te miješano u mikrovalnom reaktoru (MW) 20 minuta (130 °C, 150 W). Reakcijska smjesa je ohlađena i dodana u 100 mL vode te dokapavanjem 5% NaOH zalužena do pH oko 9. Smjesa je ekstrahirana 3 × 30 mL etil-acetata. Organski spojevi su sakupljeni, isprani vodom, osušeni nad

bezvodnim Na₂SO₄ i upareni pod sniženim tlakom. Sirovi **harmol** pročišćen je rastrljavanjem smjesom eter / DCM (3:1).

Iskorištenje: 0.185 g **harmola** (79 %).

t_i 304 – 307 °C.

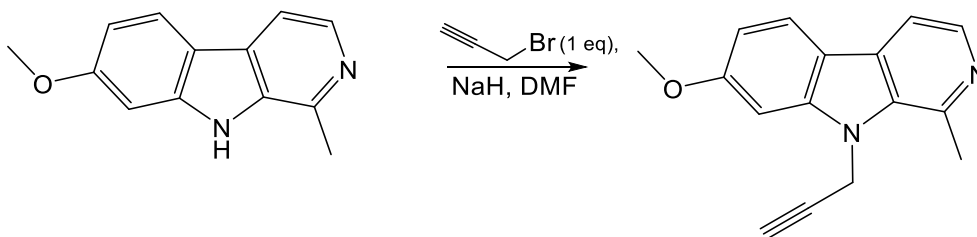
ESI-MS *m/z*: 199.0 (M+1)⁺.

IR (KBr, *v/cm*⁻¹) 3282, 2480, 1636, 1574, 1454, 1366, 1298, 1234, 1174, 1110, 990, 896, 838, 800.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz) δ 11.22 (s, 1H,), 9.73 (s, 1H,), 8.12 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz), 7.94 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.74 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz), 6.91 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 6.71 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.1 Hz), 2.70 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J*/Hz) δ 158.24, 142.27, 140.89, 137.59, 134.41, 127.51, 122.52, 113.87, 111.64, 109.65, 96.60, 20.24.

3.4 Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-b] indola (**3a**)



0.212 g harmina (1 mmol) otopljeno je u 4 mL suhog DMF-a. U atmosferi zasićenoj argonom dodano je 0.108 g 60% disperzije natrijevog hidrida u mineralnom ulju (2.7 mmol), nakon čega je dokapano 0.284 mL 80% otopine propargil bromida u toluenu (3 mmol). Reakcijska smjesa je miješana pod atmosferom argona 2 sata. Smjesa je dodana u 50 mL vode. Produkt je ekstrahiran 4 × 30 mL DCM-a. Organski slojevi su sakupljeni, ekstrahirani vodom, sušeni nad bezvodnim Na₂SO₄ i upareni pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu DCM / metanol = 95:5 i rastrljavanjem u dietil eteru.

Iskorištenje: 0.138 g **3a** (55%).

t_i 147 – 149 °C

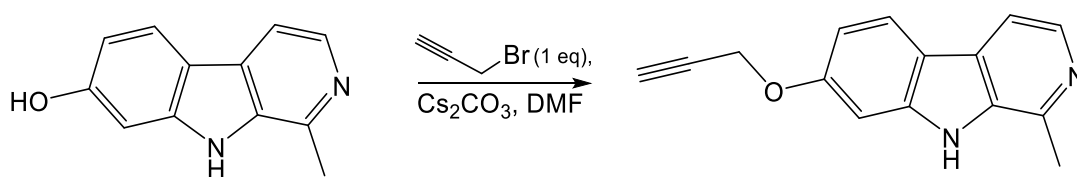
ESI-MS *m/z*: 251.2 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}) 3270, 3064, 2118, 1616, 1568, 1494, 1450, 1402, 1340, 1294, 1254, 1226, 1192, 1170, 1138, 1042, 976, 922, 830, 806, 722, 690, 648.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 8.20 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.88 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 7.33 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 6.90 (dd, 1H, $J = 8.6$ Hz, 2.1 Hz), 5.45 (d, 2H, $J = 2.3$ Hz), 3.91 (s, 3H), 3.37 (t, 1H, $J = 2.3$ Hz), 3.05 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 160.72, 142.60, 141.09, 138.53, 134.40, 128.92, 122.50, 114.42, 112.29, 109.70, 93.83, 80.25, 75.59, 55.68, 34.22, 22.49;

3.5 Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-b]indola (**3b**)



U otopinu 0.198 g harmola (1 mmol) u 4 mL suhog DMF-a dodano je 0.456 g cezijevo karbonata (1.4 mmol) u atmosferi zasićenoj argonom. U reakcijsku smjesu je potom dokapano 0.095 mL 80% otopine propargil bromida u toluenu (1.1 mmol). Reakcija je miješana 2 sata na sobnoj temperaturi pod atmosferom argona nakon čega je dodana u 50 mL vode i ekstrahirana 4×30 mL DCM-a. Organski slojevi su sakupljeni te isprani vodom, sušeni nad bezvodnim Na_2SO_4 i upareni pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu DCM / metanol = 97:3 te potom DCM / metanol = 95:5 i rastrljavanjem u dietil eteru.

Iskorištenje: 0.132 g **3b** (56%).

t_i 159 – 161 °C.

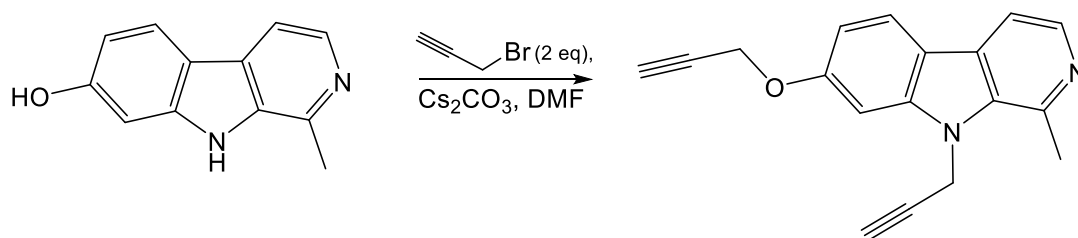
ESI-MS m/z : 237.2 ($\text{M}+1$)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}) 3272, 3068, 2960, 2868, 2774, 2118, 1632, 1566, 1484, 1454, 1328, 1276, 1166, 1136, 1108, 1070, 1024, 948, 816, 704, 684.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11.55 (s, 1H), 8.17 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.85 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 7.13 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 6.89 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, 2.3 Hz), 4.93 (d, 2H, $J = 2.3$ Hz), 3.64 (t, 1H, $J = 2.3$), 2.74 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 157.94, 141.67, 141.33, 137.59, 134.60, 127.17, 122.68, 115.35, 112.06, 109.55, 96.00, 78.44, 55.75, 20.22;

3.6 Sinteza 1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-b]indola (3c)



U otopinu 0.198 g harmola (1 mmol) u 4 mL suhog DMF-a dodano je 0.912 g cezijevog karbonata (2.8 mmol) u atmosferi zasićenoj argonom. U reakcijsku smjesu je potom dokapano 0.190 mL 80% otopine propargil bromida u toluenu (2.2 mmol). Reakcija je miješana 2 sata na sobnoj temperaturi pod atmosferom argona nakon čega je dodana u 50 mL vode i ekstrahirana 4×30 mL DCM-a. Organski slojevi su sakupljeni te isprani vodom, sušeni nad bezvodnim Na_2SO_4 i upareni pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu DCM / metanol = 97:3 te potom DCM / metanol = 95:5 i rastrljavanjem u dietil eteru.

Iskorištenje: 0.164 g **3c** (60%).

t_f 147 – 149 °C.

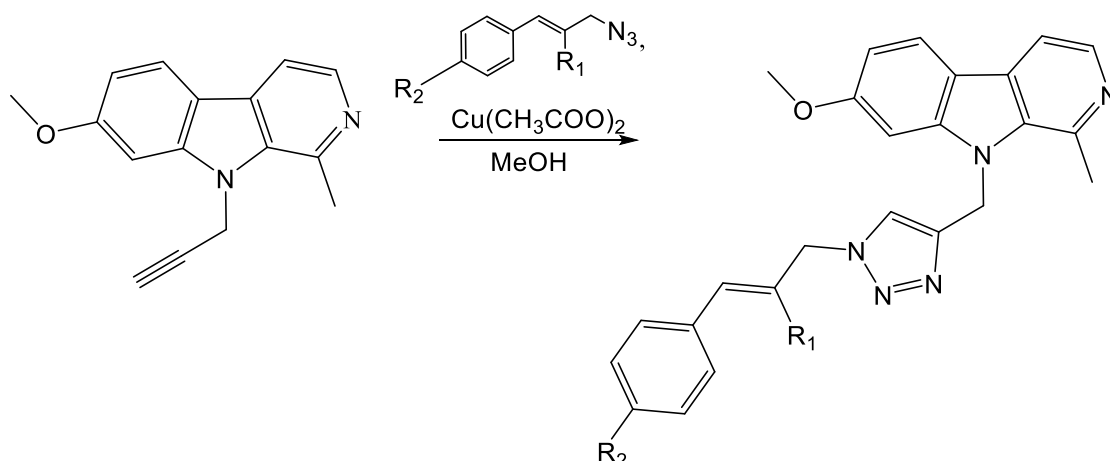
ESI-MS m/z : 275.2 ($\text{M}+1$)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}) 3288, 3178, 2926, 2108, 1626, 1566, 1500, 1444, 1404, 1372, 1330, 1260, 1182, 1140, 1042, 976, 928, 814, 718, 686.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 8.22 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 8.14 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.91 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 7.41 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 6.97 (dd, 1H, $J = 8.6$ Hz, 2.1 Hz), 5.43 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz), 4.97 (d, 2H, $J = 2.3$ Hz), 3.61 (t, 1H, $J = 2.3$ Hz), 3.06 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 158.50, 142.34, 141.20, 138.59, 134.51, 128.81, 122.55, 115.08, 112.41, 109.78, 95.44, 80.14, 79.19, 78.32, 75.64, 56.00, 39.73, 34.27, 22.49;

3.7 Sinteze *N* – harmicina



U otopinu 0,05 g spoja **3a** (0,2 mmol) u 6 mL metanola dodani su 0,01 mol bakrovog (II) acetata i 0,22 mmol odgovarajućeg azida (**2a,b**). Reakcijska smjesa je miješana nasobnoj temperaturi 20 sati te je otapalo upareno. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan / etil-acetat / metanol (3:1:0.5, odnosno 1:1:0.5) i rastrljavanja u dietil eteru, dobiveni su spojevi **4a/4b**.

3.7.1 Sinteza 4-((7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)metil)-1-[(2*E*)-3-(4-metoksi fenil)prop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazola (**4a**)

Količina azida **2a**: 0.042 g.

Iskorištenje: 0.062 g **4a** (71%).

t_f 178 – 179 °C.

ESI-MS m/z : 440.2 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}) 3127, 3083, 2956, 2837, 1622, 1567, 1511, 1445, 1406, 1343, 1251, 1176, 1135, 1051, 974, 926, 825.

¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 8.17 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.99 (s, 1H), 7.87 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 7.34 – 7.31 (m, 3H), 6.90 – 6.86 (m, 3H), 6.47 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 6.30 – 6.23 (m, 1H), 5.88 (s, 2H), 5.05 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.88 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.05 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 160.56, 159.21, 144.09, 142.68, 141.14, 138.08, 134.67, 133.14, 128.77, 134.60, 128.53, 122.78, 122.40, 121.15, 114.48, 114.07, 112.27, 109.34, 94.13, 55.62, 55.12, 51.39, 39.73, 23.24.

3.7.2 Sinteza 4-({7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil)-1-[(2*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazola (**4b**)

Količina azida **2b**: 0.038 g.

Iskorištenje: 0.053g **4b** (63%).

t_r 151 – 152 °C.

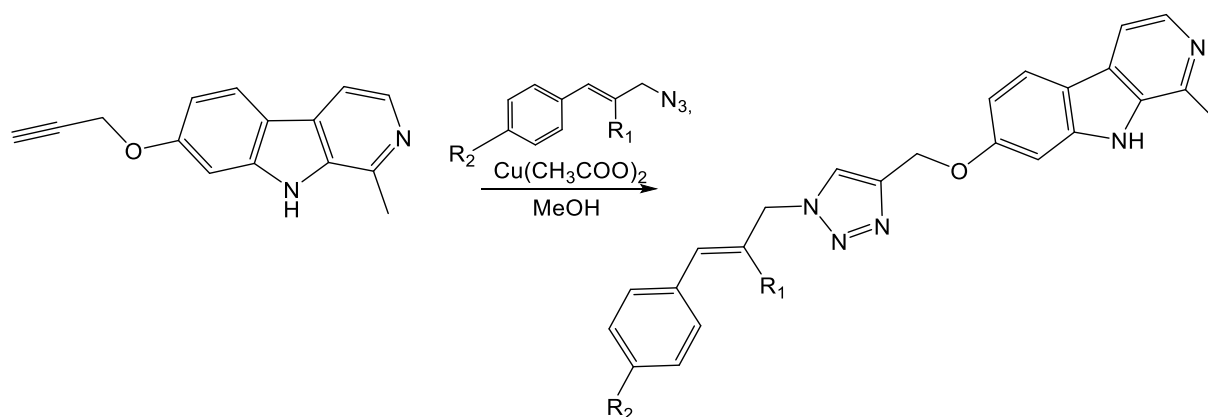
ESI-MS m/z : 424.2 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}) 3427, 3129, 3057, 2993, 2932, 2839, 1625, 1570, 1496, 1450, 1406, 1340, 1298, 1250, 1219, 1172, 1127, 1042, 973, 924, 815, 743, 700.

¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 8.18 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.99 (s, 1H), 7.88 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 7.36 – 7.24 (m, 5H), 7.18 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 6.88 (dd, 1H, $J = 8.6, 1.8$ Hz), 6.29 (s, 1H), 5.90 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 1.68 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 160.54, 144.06, 142.71, 141.06, 138.01, 136.25, 134.66, 132.87, 128.58, 128.24, 127.91, 126.88, 123.22, 122.32, 114.47, 112.18, 109.32, 94.09, 57.01, 55.58, 39.75, 23.10, 15.44.

3.8 Sinteze *O* – harmicina



U otopinu 0,047 g spoja **3b** (0,2 mmol) u 6 mL metanola dodani su 0,01 mol bakrovog (II) acetata i 0,22 mmol odgovarajućeg azida (**2a,b**). Reakcijska smjesa je miješana nasobnoj temperaturi 20 sati te je otapalo upareno. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu DCM / metanol (95:5), odnosno cikloheksan / etil-acetat / metanol (3:1:0.5) i rastrljavanja u dietil eteru, dobiveni su spojevi **5a/5b**.

3.8.1 Sinteza 1-[(*2E*)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi]metil]-1*H*-1,2,3-triazola (**5a**)

Količina azida **2a**: 0.042 g.

Iskorištenje: 0.049 g **5a** (57%).

t_f 215 – 216 °C.

ESI-MS m/z : 426.1 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}) 3137, 3078, 2961, 2932, 2872, 2840, 1620, 1567, 1510, 1438, 1315, 1281, 1243, 1172, 1142, 1112, 1027, 969, 879, 815, 772, 741, 682, 634.

¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11.65 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.19 (bs, 1H, $J = 4.4$ Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.89 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 7.35 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.21 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz), 6.93 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.1$ Hz), 6.86 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 6.56 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 6.41 – 6.31 (m, 1H), 5.31 (s, 2H), 5.17 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz), 3.74 (s, 3H), 2.76 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 159.21, 159.07, 142.90, 142.21, 140.82, 136.55, 133.97, 133.33, 128.28, 127.88, 127.77, 124.44, 122.89, 121.07, 114.95, 114.04, 112.28, 109.92, 95.83, 61.49, 55.10, 51.47, 19.73.

3.8.2 Sinteza 1-[(2E)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)oksi)metil]-1H-1,2,3-triazola (5b)

Količina azida **2b**: 0.038 g.

Iskorištenje: 0.063g **5b** (78%).

t_r 94 – 96 °C

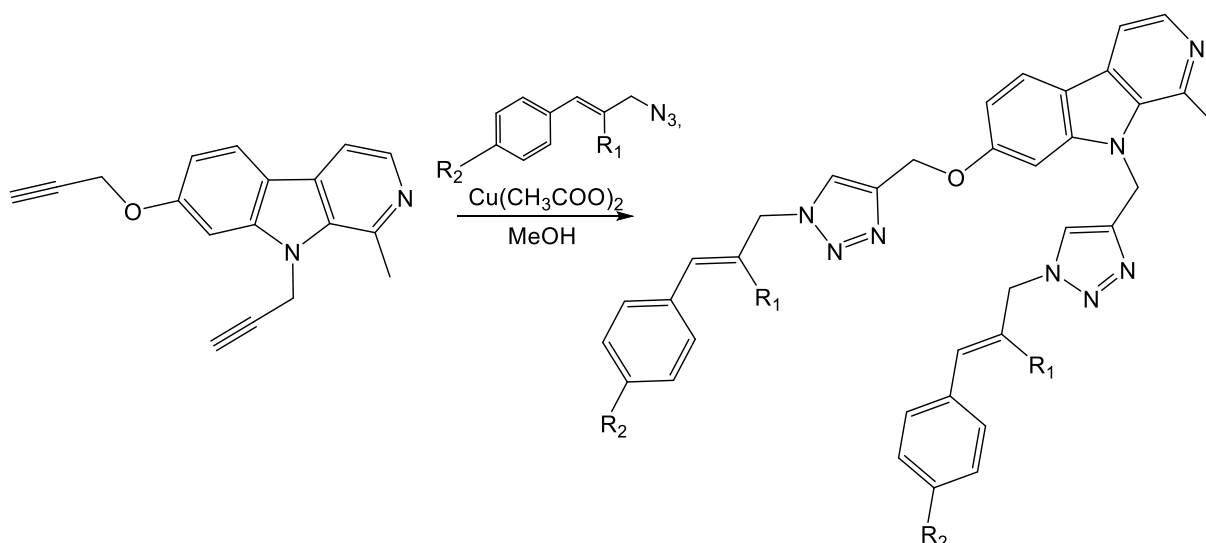
ESI-MS m/z : 410.1 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}) 3134, 3059, 2946, 2866, 1628, 1567, 1483, 1446, 1382, 1328, 1281, 1234, 1168, 1051, 1016, 942, 879, 814, 695, 670.

¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11.52 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.16 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz), 8.07 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.83 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 7.41 – 7.23 (m, 5H), 7.19 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 6.92 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.2$ Hz), 6.44 (s, 1H), 5.31 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 2.73 (s, 3H), 1.76 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 158.80, 142.98, 141.88, 141.21, 137.43, 136.32, 134.57, 132.81, 128.71, 128.39, 128.28, 127.29, 126.96, 124.88, 122.70, 115.09, 112.03, 109.65, 95.91, 61.51, 57.30, 20.17, 15.60.

3.9 Sinteza *N*, *O*-bis-harmicina



U otopinu 0,055 g spoja **3b** (0,2 mmol) u 6 mL metanola dodani su 0,01 mol bakrovog (II) acetata i 0,44 mmol odgovarajućeg azida (**2a,b**). Reakcijska smjesa je miješana nasobnoj temperaturi 20 sati te je otapalo upareno. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu DCM / metanol (95:5), odnosno cikloheksan / etil-acetat / metanol (1:1:0.5) i rastrljavanja u dietil eteru, dobiveni su spojevi **6a/6b**.

3.9.1 Sinteza 1-[(*2E*)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-4-[[7-({1-[(*2E*)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}metoksi)-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il]metil]-1*H*-1,2,3-triazola (**6a**)

Količina azida **2a**: 0.084 g.

Iskorištenje: 0.073 g **6a** (56%).

t_i 115 – 117 °C.

ESI-MS m/z : 653.4 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}) 3124, 3056, 3004, 2956, 2934, 2838, 1624, 1570, 1512, 1448, 1408, 1344, 1304, 1252, 1176, 1136, 1032, 970, 810.

¹HNMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J/Hz) δ 8.31 (s, 1H), 8.19 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 8.11 – 8.08 (m, 2H), 7.89 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 7.56 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 7.34 (dd, 4H, $J = 13.3, 8.7$ Hz), 6.94 (dd, 1H, $J = 8.6, 1.9$ Hz), 6.88 – 6.84 (m, 4H), 6.58 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 6.49 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 6.40 – 6.21 (m, 2H), 5.89 (s, 2H), 5.33 (s, 2H), 5.16 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.05 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz), 3.74 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.08 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 159.24, 159.19, 143.91, 142.82, 142.58, 141.15, 137.85, 133.41, 133.16, 128.58, 128.28, 128.26, 127.87, 127.81, 124.51, 122.90, 122.47, 121.08, 121.02, 114.71, 114.05, 112.36, 109.99, 95.16, 61.49, 55.10, 51.48, 51.38, 39.66, 23.13.

3.9.2 Sinteza 1-[(2*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-4-[[1-metil-7-({1-[(2*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}metoksi)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il]metil]-1*H*-1,2,3-triazola (**6b**)

Količina azida **2b**: 0.076 g.

Iskorištenje: 0.096 g **6b** (77%).

t_i 87 – 88 °C.

ESI-MS m/z : 621.4 (M+1) $^+$.

IR (KBr, ν/cm^{-1}) 3104, 3052, 2982, 2930, 1622, 1566, 1494, 1446, 1406, 1332, 1252, 1220, 1176, 1136, 1044, 1014, 920, 812.

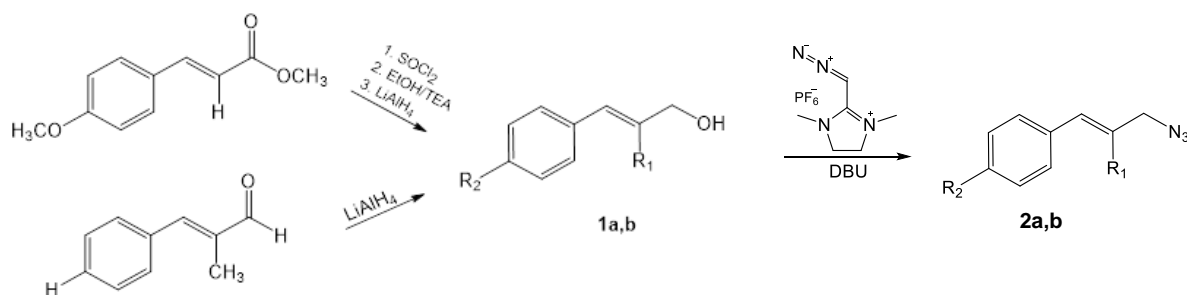
^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 8.32 (s, 1H), 8.19 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 8.12 – 8.09 (m, 2H), 7.89 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 7.58 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 7.34 – 7.17 (m, 10H), 6.95 (dd, 1H, $J = 8.6, 1.9$ Hz), 6.47 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 5.91 (s, 2H), 5.33 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 3.07 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.68 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 159.16, 143.95, 142.81, 142.58, 141.14, 137.98, 136.30, 136.26, 134.69, 132.81, 132.71, 128.66, 128.59, 128.55, 128.25, 128.23, 128.49, 128.03, 126.93, 126.86, 124.93, 123.40, 122.41, 114.75, 112.26, 109.96, 95.22, 61.54, 57.33, 57.07, 39.66, 23.12, 15.53, 15.46.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U prethodnom poglavlju opisane su reakcije kojima su β -karbolinska i cimetna struktura povezane u jednu molekulu. Građevni elementi koji su u reakciji cikloadicije povezani u jednu molekulu bili su propargilni derivati harmin/harmol i azidi dobiveni iz metilnih derivata cimetine kiseline. Imajući u vidu kako harmin, cimetna kiselina i njezini derivati, između ostalih, pokazuju i antimalarijsko djelovanje, moguće je da i složene molekule dobivene njihovom sintezom posjeduju to djelovanje ili da im se djelovanje čak i pojača. Navedeni kemijski entiteti spajaju se Huisgenovom reakcijom 1,3-dipolarne acikloadicije između azidne i alkinske skupine. Kao poveznica između propargiliranih derivata harmina i azida cimetine kiseline u toj reakciji nastaje 1,2,3-triazol.

Azidi **2a** i **2b** dobiveni su ili iz odgovarajućeg aldehida (u slučaju α -metilnog derivata) ili iz kiseline (u slučaju *p*-metoksi derivata). Aldehid i kiselina su prevedeni u odgovarajući derivat cimetnog alkohola (**1a,b**). U slučaju aldehida, odgovarajući alkohol dobiven je u jednom reakcijskom koraku (redukcija s LiAlH_4) dok je u slučaju kiseline, prvo bilo potrebno *p*-metoksicimetnu kiselinu prevesti u odgovarajući etilni ester preko kiselinskog klorida te zatim dobiveni ester reducirati do alkohola, opet s LiAlH_4 . Kod reakcija redukcije važno je naglasiti da se reakcijska smjesa mora hladiti ispod 0°C kako bi se izbjegla redukcija dvostruke veze. Postupak redukcije proveden je u atmosferi zasićenoj inertnim plinom argonom kako bi se isključila mogućnost odvijanja oksidacijskih procesa posredstvom kisika iz zraka. Nakon što su iz derivata cimetine kiseline dobiveni alkoholi **1**, oni su prevedeni u azide **2** uz ADMP koji u ovom slučaju predstavlja donora azidne skupine. Obzirom da se reakcija mora provoditi u bazičnim uvjetima, u reakcijsku smjesu dodan je DBU, a temperatura reakcije održavana je na 0°C . Opisanoj reakcijom dobiveni su derivati azidi **2a** i **2b**, koji su korišteni u reakciji sinteze konačnih produkata.



	R ₁	R ₂
SPOJEVI A	H	OCH ₃
SPOJEVI B	CH ₃	H

Shema 1. Sinteza azida cimetine kiseline

Druga građevna jedinica potrebna za reakciju cikloadicije je alkin. Obzirom da u molekuli harmina ne postoji terminalna trostruka veza koja bi mogla reagirati s azidima, potrebno ju je uvesti. Iz tog su razloga sintetizirani propargilni derivati harmina, odnosno harmola, **3a-c**.

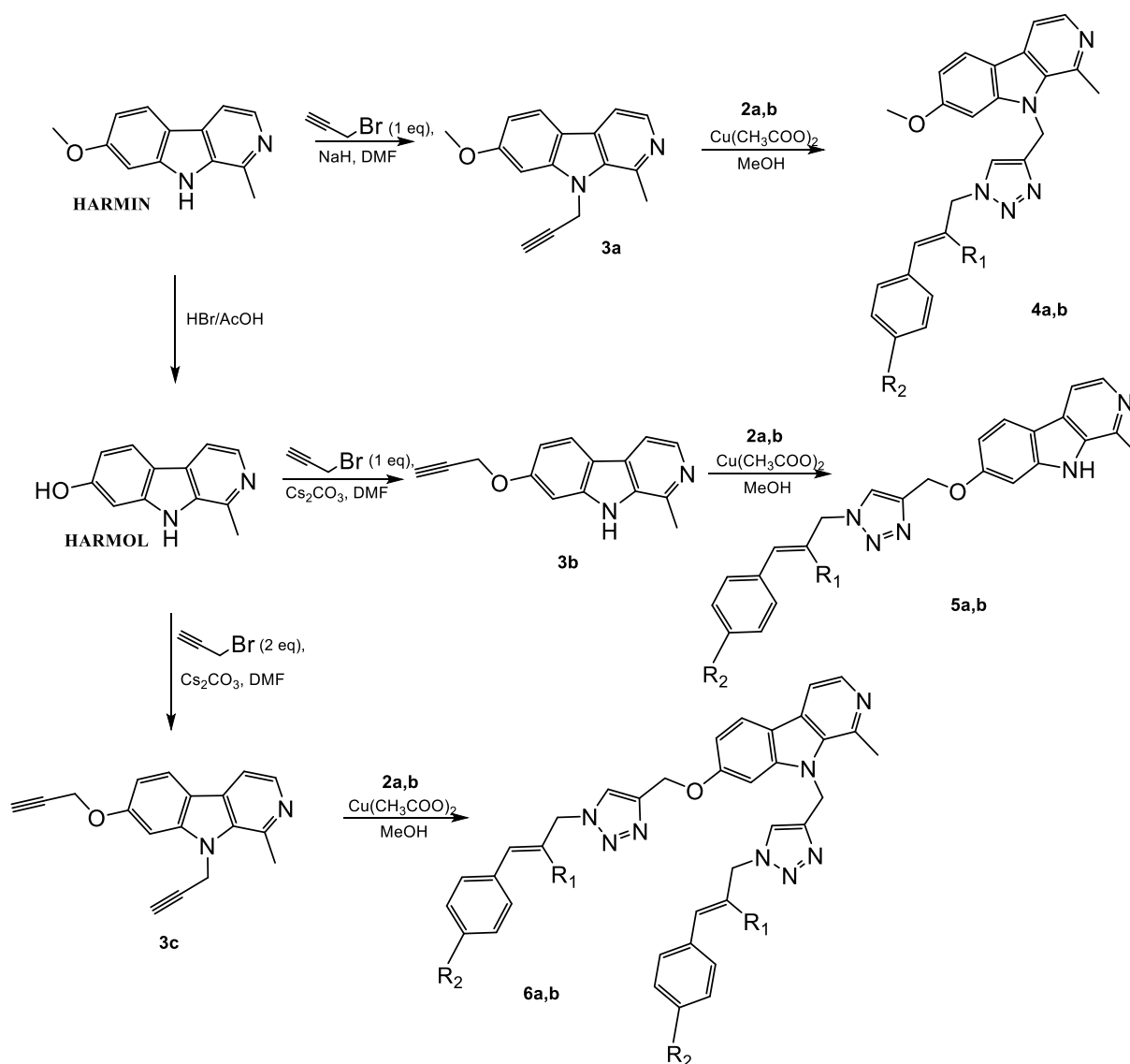
Obzirom da se propargilni derivati za sintezu *O*- i bis-harmicina dobivaju iz harmola, za te je reakcije iz harmina prvo pripremljen harmol reakcijom hidrolize metoksi skupine u kiselom. Reakcija je provedena dodatkom bromovodične i ledene octene kiseline u mikrovalnom reaktoru na 130 °C kroz 20 minuta. To je reakcija nukleofilne supstitucije u kojoj prvo dolazi do protoniranja kisikovog atoma pri čemu se stvaraju pogodni uvjeti za cijepanje eterske veze i vezanje metilne izlazne skupine na halogenid. Obzirom da je u kiselim uvjetima, kakvi vladaju u reakcijskoj smjesi nakon što je dodan HBr, harmol u obliku soli, smjesu je po završetku potrebno zaluziti kako bi oslobodili harmol iz oblika soli. Dodatkom 5% NaOH do *pH* oko 9, harmol prelazi u oblik topljiv u organskim otapalima. Kao nusprodukti navedenog postupka stvaraju se soli bromovodične i octene kiseline koje zaostaju u vodenom sloju nakon ekstrakcije.

Proces propargiliranja harmina i harmola način je uvođenja terminalnog alkina u molekulu. Ove reakcije se provode u atmosferi zasićenoj inertnim plinom argonom kako bi se spriječile moguće nusreakcije s kisikom iz zraka. Potrebno je osigurati bazične uvjete da bi atom na koji će se adirati propargil derivat bio što nukleofilniji. Obzirom da je indolski atom dušika slabiji nukleofil od kisikovog atoma, u reakciji propargiliranja harmina potrebna je jača baza te se u tu svrhu koristi natrijev hidrid (NaH). Za reakciju na harmolu baza izbora će biti cezijev karbonat (Cs₂CO₃) čija je uloga deprotoniranje fenolne skupine harmola čime nastaje fenoksidni anion koji je jači nukleofil od ishodišnih fenola. Cs₂CO₃ omogućuje da se reakcija odvija na kisikovom, a ne na dušikovom atomu. Alkilirajući agens za propargiliranje je propargil bromid. Ova reakcija zove se i Williamsonova sinteza po svom idejnom začetniku Alexanderu Williamu Williamsonu koji je reakcijom između halogenida i alkoksida različitih alkilnih ostataka uspio razjasniti razliku između alkohola i etera (Williamsonova reakcija <http://struna.ihjj.hr>). Navedenim postupkom dobiveni su propargilni derivati harmina/harmola (**3a-c**) potrebni za cikloadicijsku reakciju obrađenu u nastavku.

Nakon što su dobiveni derivati azida cimetne kiseline i alkini, moguće je provesti Huisgenovu 1,3-cikloadiciju. Reakcije su provedene u blagim uvjetima pri sobnoj temperaturi i tlaku zraka, bez korištenja suhih otapala. Reakcijama je dodan bakrov (II) acetat koji je reduciran *in situ* u Cu(I) koji služi kao katalizator te osigurava regioselektivno nastajanje 1,4-supstituiranih 1,2,3-triazola. Tijek reakcija i čistoća spojeva kontrolirana je TLC-om. Po završetku reakcija,

produkti (**4-6**) pročišćeni su kromatografijom na koloni uz različite pokretne faze ovisno o svojstvima konačnih produkata. Na početak svake kolone dodan je aluminijev oksid kako bi zadržavao ione bakra. Produkti dobiveni s kromatografije na koloni dodatno su pročišćeni rastljavaњem u dietil eteru. Iskorištenja u sintezi konačnih produkata **4-6** iznosila su između 56 i 78%.

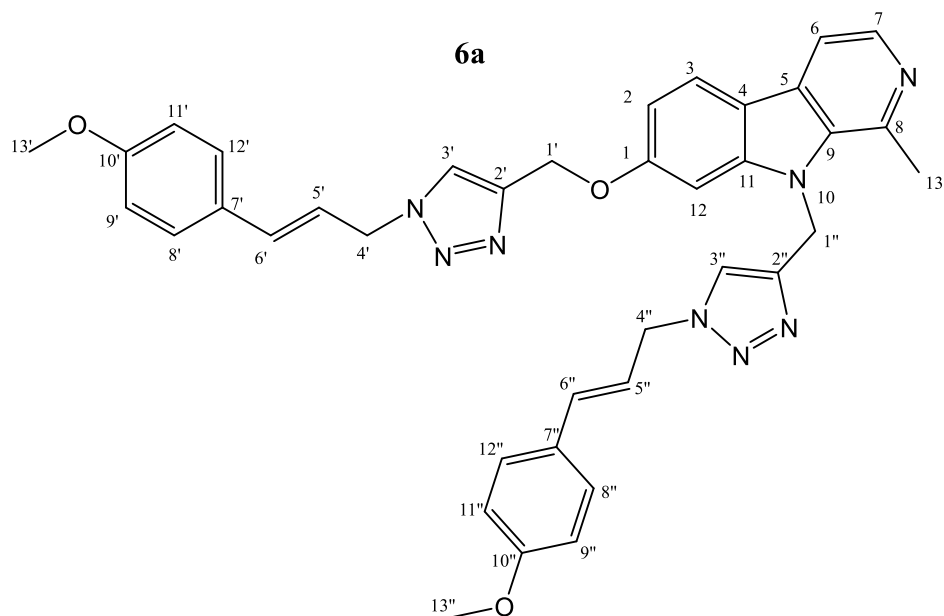
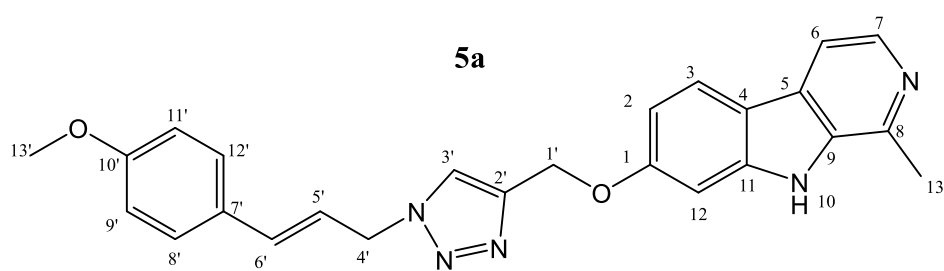
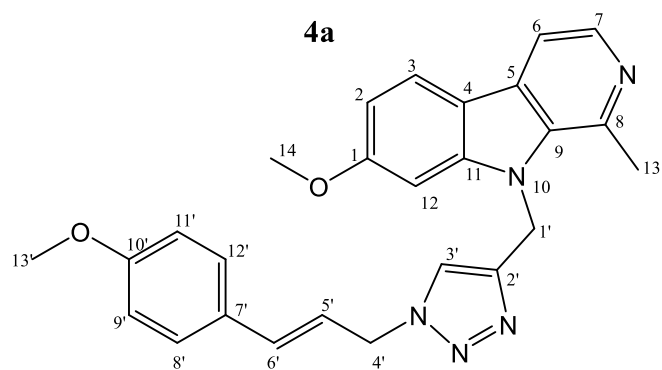
Produkti iz ovog rada novi su spojevi te je provedena njihova strukturna karakterizacija. Ona obuhvaća spektroskopske i analitičke metode: IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS te određivanje temperature tališta.



Shema 2. Sinteze propargilnih derivata te Huisgenove 1,3-cikloadicije na propargilnim derivatima harmina i harmola

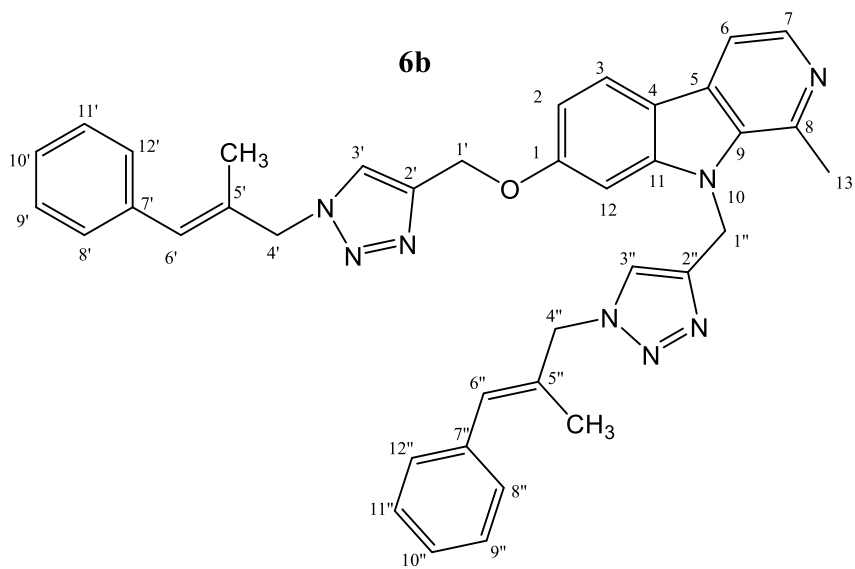
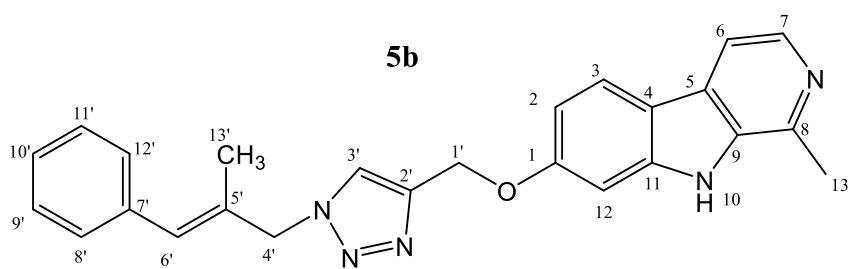
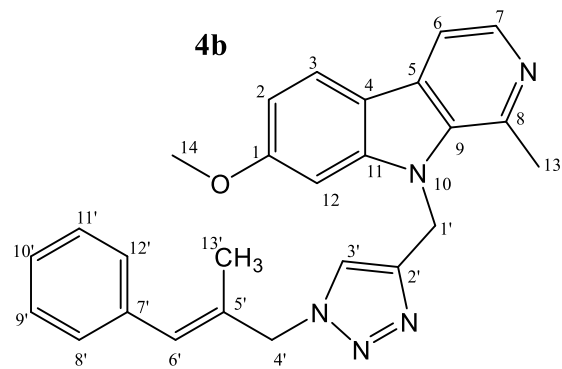
Tablica 1. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima za harmicine dobivene sintezom propargilnih derivata harmina/harmola s azidom dobivenim iz *p*-metoksicimetne kiseline.

Spoj	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)
4a	δ 8.17 (d, 1H, 7, $J = 5.2$ Hz), 8.09 (d, 1H, 3, $J = 8.6$ Hz), 7.99 (s, 1H, 3'), 7.87 (d, 1H, 6, $J = 5.2$ Hz), 7.34 – 7.31 (m, 3H, 8', 12', 8), 6.90 – 6.86 (m, 3H, 9', 11', 2), 6.47 (d, 1H, 6', $J = 15.8$ Hz), 6.30 – 6.23 (m, 1H, 5'), 5.88 (s, 2H, 1'), 5.05 (d, 2H, 4', $J = 6.0$ Hz), 3.88 (s, 3H, 14), 3.74 (s, 3H, 13'), 3.05 (s, 3H, 13);	δ 160.56 (1), 159.21 (10'), 144.09 (2'), 142.68 (8), 141.14 (11), 138.08 (7), 134.67 (9), 133.14 (5'), 128.77 (4), 134.60 (7'), 128.53 (8', 12'), 122.78 (3'), 122.40 (3), 121.15 (6'), 114.48 (5), 114.07 (9', 11'), 112.27 (6), 109.34 (2), 94.13 (12), 55.62 (14), 55.12 (13'), 51.39 (4'), 39.73 (1'), 23.24 (13);
5a	δ 11.65 (s, 1H, 10), 8.29 (s, 1H, 3'), 8.19 (bs, 1H, 7, $J = 4.4$ Hz), 8.10 (d, 1H, 3, $J = 8.7$ Hz), 7.89 (d, 1H, 6, $J = 5.0$ Hz), 7.35 (d, 2H, 8', 12', $J = 8.7$ Hz), 7.21 (d, 1H, 12, $J = 1.9$ Hz), 6.93 (dd, 1H, 2, $J = 8.7, 2.1$ Hz), 6.86 (d, 2H, 9', 11', $J = 8.7$ Hz), 6.56 (d, 1H, 6', $J = 15.8$ Hz), 6.41 – 6.31 (m, 1H, 5'), 5.31 (s, 2H, 1'), 5.17 (d, 2H, 4' $J = 6.3$ Hz), 3.74 (s, 3H, 13'), 2.76 (s, 3H, 13);	δ 159.21, 159.07 (1,10'), 142.90 (2'), 142.21 (8), 140.82 (11), 136.55 (7), 133.97 (9), 133.33 (5'), 128.28 (4), 127.88 (8', 12'), 127.77 (7'), 124.44 (3'), 122.89 (3), 121.07 (6'), 114.95 (5), 114.04 (9', 11'), 112.28 (6), 109.92 (2), 95.83 (12), 61.49 (1'), 55.10 (13'), 51.47 (4'), 19.73 (13);
6a	δ 8.31 (s, 1H, 3'), 8.19 (d, 1H, 7, $J = 5.2$ Hz), 8.11 – 8.08 (m, 2H, 3, 3''), 7.89 (d, 1H, 6, $J = 5.2$ Hz), 7.56 (d, 1H, 12, $J = 1.8$ Hz), 7.34 (dd, 4H, 8', 8'', 12', 12'', $J = 13.3, 8.7$ Hz), 6.94 (dd, 1H, 2, $J = 8.6, 1.9$ Hz), 6.88 – 6.84 (m, 4H, 9', 9'', 11', 11''), 6.58 (d, 1H, 6', $J = 15.8$ Hz), 6.49 (d, 1H, 6'', $J = 15.8$ Hz), 6.40 – 6.21 (m, 2H, 5', 5''), 5.89 (s, 2H, 1''), 5.33 (s, 2H, 1'), 5.16 (d, 2H, 4', $J = 6.3$ Hz), 5.05 (d, 2H, 4'', $J = 6.3$ Hz), 3.74 (s, 3H, 13'), 3.73 (s, 3H, 13''), 3.08 (s, 3H, 13);	δ 159.24, 159.19 (1, 10', 10''), 143.91 (8), 142.82, 142.58 (2', 2''), 141.15 (11), 137.85 (7), 133.41, 133.16 (5', 5''), 128.58 (4), 128.28, 128.26 (7', 7''), 127.87, 127.81 (8', 8'', 12', 12''), 124.51 (3'), 122.90 (3''), 122.47 (3), 121.08, 121.02 (6', 6''), 114.71 (5), 114.05 (9', 9'', 11', 11''), 112.36 (6), 109.99 (2), 95.16 (12), 61.49 (1'), 55.10 (13', 13''), 51.48, 51.38 (4', 4''), 39.66 (1''), 23.13 (13);



Tablica 2. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima za harmicine dobivene sintezom propargilnih derivata harmina/harmola s azidom dobivenim iz α -metil *-trans*-cinamaldehyda.

Spoj	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)
4b	δ 8.18 (d, 1H, 7, $J = 5.1$ Hz), 8.09 (d, 1H, 3, $J = 8.6$ Hz), 7.99 (s, 1H, 3'), 7.88 (d, 1H, 6, $J = 5.2$ Hz), 7.36 – 7.24 (m, 5H, 8' – 12'), 7.18 (d, 1H, 8, $J = 7.6$ Hz), 6.88 (dd, 1H, 2, $J = 8.6$, 1.8 Hz), 6.29 (s, 1H, 6'), 5.90 (s, 2H, 1'), 5.02 (s, 2H, 4'), 3.88 (s, 3H, 14), 3.04 (s, 3H, 13), 1.68 (s, 3H, 13');	δ 160.54 (1), 144.06 (2'), 142.71 (8), 141.06 (11), 138.01 (7), 136.25 (5'), 134.66 (9), 132.87 (7'), 128.58 (9', 11'), 128.24 (8', 12'), 127.91 (6'), 126.88 (4), 123.22 (3'), 122.32 (3), 114.47 (5), 112.18 (6), 109.32 (2), 94.09 (12), 57.01 (4'), 55.58 (14), 39.75 (1'), 23.10 (13), 15.44 (13');
5b	δ 11.52 (s, 1H, 10), 8.29 (s, 1H, 3'), 8.16 (d, 1H, 7, $J = 4.6$ Hz), 8.07 (d, 1H, 3, $J = 8.7$ Hz), 7.83 (d, 1H, 6, $J = 5.2$ Hz), 7.41 – 7.23 (m, 5H, 8' – 12'), 7.19 (d, 1H, 12, $J = 2.1$ Hz), 6.92 (dd, 1H, 2, $J = 8.7$, 2.2 Hz), 6.44 (s, 1H, 6'), 5.31 (s, 2H, 1'), 5.13 (s, 2H, 4'), 2.73 (s, 3H, 13), 1.76 (s, 3H, 13');	δ 158.80 (1), 142.98 (2'), 141.88 (8), 141.21 (11), 137.43 (7), 136.32 (9), 134.57 (7'), 132.81 (5'), 128.71 (9', 11'), 128.39 (6'), 128.28 (8', 12'), 127.29 (4), 126.96 (10'), 124.88 (3'), 122.70 (3), 115.09 (5), 112.03 (6), 109.65 (2), 95.91 (12), 61.51 (1'), 57.30 (4'), 20.17 (13), 15.60 (13');
6b	δ 8.32 (s, 1H, 3'), 8.19 (d, 1H, 7, $J = 5.2$ Hz), 8.12 – 8.09 (m, 2H, 3, 3''), 7.89 (d, 1H, 6, $J = 5.2$ Hz), 7.58 (d, 1H, 12, $J = 1.8$ Hz), 7.34 – 7.17 (m, 10H, 8' – 12', 8'' – 12''), 6.95 (dd, 1H, 2, $J = 8.6$, 1.9 Hz), 6.47 (s, 1H, 6''), 6.32 (s, 1H, 6'), 5.91 (s, 2H, 1''), 5.33 (s, 2H, 1'), 5.13 (s, 2H, 4'), 5.02 (s, 2H, 4''), 3.07 (s, 3H, 13), 1.75 (s, 3H, 13'), 1.68 (s, 3H, 13');	δ 159.16 (1), 143.95 (8), 142.81, 142.58 (2', 2''), 141.14 (11), 137.98 (3), 136.30, 136.26 (7', 7''), 134.69 (9), 132.81, 132.71 (5', 5''), 128.66, 128.59 (9', 9'', 11', 11''), 128.55 (4), 128.25, 128.23 (8', 8'', 12', 12''), 128.49 (6'), 128.03 (6''), 126.93, 126.86 (10', 10''), 124.93 (3'), 123.40 (3''), 122.41 (3), 114.75 (5), 112.26 (6), 109.96 (2), 95.22 (12), 61.54 (1'), 57.33, 57.07 (4', 4''), 39.66 (1''), 23.12 (13', 13''), 15.53, 15.46 (13', 13'');



Tablica 3. Valni brojevi u IR spektrima za harmicine dobivene sintezom propargilnih derivata harmina/harmola s azidima 2.

Spoj	4a: N – derivat	5a: O – derivat	6a: bis – derivat
IR (KBr, ν/cm^{-1})	3127, 3083, 2956, 2837, 1622, 1567, 1511, 1445, 1406, 1343, 1251, 1176, 1135, 1051, 974, 926, 825;	3137, 3078, 2961, 2932, 2872, 2840, 1620, 1567, 1510, 1438, 1315, 1281, 1243, 1172, 1142, 1112, 1027, 969, 879, 815, 772, 741, 682, 634;	3124, 3056, 3004, 2956, 2934, 2838, 1624, 1570, 1512, 1448, 1408, 1344, 1304, 1252, 1176, 1136, 1032, 970, 810;
	4b: N – derivat	5b: O – derivat	6b: bis – derivat
	3427, 3129, 3057, 2993, 2932, 2839, 1625, 1570, 1496, 1450, 1406, 1340, 1298, 1250, 1219, 1172, 1127, 1042, 973, 924, 815, 743, 700;	3134, 3059, 2946, 2866, 1628, 1567, 1483, 1446, 1382, 1328, 1281, 1234, 1168, 1051, 1016, 942, 879, 814, 695, 670;	3104, 3052, 2982, 2930, 1622, 1566, 1494, 1446, 1406, 1332, 1252, 1220, 1176, 1136, 1044, 1014, 920, 812;

Kombinacijom internetskih programa SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) i Chemicalize (<http://chemicalize.com/>) na temelju strukturnih formula ciljnih spojeva izračunati su farmakokinetički parametri. Analizom parametara navedenih u tablicama 4 i 5 moguće je predvidjeti fizikalna i kemijska svojstva pojedinih molekula. Pored toga, moguće je orijentacijski odrediti oralnu bioraspodivnost spojeva što predstavlja ključno svojstvo prilikom dizajniranja novog lijeka. Oralna bioraspodivnost predviđa se pomoću različitih alata, a najpoznatije metode su Lipinskijeva i Veberova pravila. Lipinskijeva pravila iz 1997. godine nalažu kako pojedina molekula ima veću vjerojatnost loše apsorpcije i permeacije ako joj je relativna molekulska masa (M_r) veća od 500, logaritam particijskog koeficijenta ($\log P$) veći od 5, te ako ima više od 5 donora i 10 akceptora vodikove veze. Valja napomenuti kako se Lipinskijeva pravila ne odnose na spojeve koji su supstrati pojedinih transportera u gastrointestinalnom traktu, nego isključivo na spojeve koji se apsorbiraju pasivnom difuzijom (Benet i sur., 2016). Kao svojevrsna kritika i korekcija Lipinskijevih pravila, 2002. godine pojavila su se Veberova pravila. Ova pravila nalažu kako rotirajućih veza u molekuli može biti maksimalno 10, zbroj donora i akceptora vodikove veze ne smije prelaziti 12, a topološka ploština zone polarne površine (TPSA) mora biti manja od 140 \AA^2 (Veber i sur., 2002). U tablicama 3 i 4 prikazani su izračunati parametri za derivate **4a,b/5a,b/6a,b**.

Tablica 4. Pregled svojstava novosintetiziranih harmicina **4a/5a/6a**.

SPOJ	4a	5a	6a
Kemijska formula	$C_{26}H_{25}N_5O_2$	$C_{26}H_{25}N_5O_2$	$C_{38}H_{36}N_8O_3$
M_r / gmol^{-1}	439.52	425.49	652.76
$t_r / ^\circ\text{C}$	178 – 179	215 – 216	115 – 117
ESI-MS/ m/z ($M+1$) ⁺	440.2	426.1	653.4
$\log P$	2.68	2.48	3.29
TPSA/ A^2	66.99	77.85	106.93
Broj rotirajućih veza	6	7	13
Broj donora vodikove veze	0	1	0
Broj akceptora vodikove veze	5	5	8
Zbroj donora i akceptora vodikove veze	5	6	8
Lipinskijeva pravila	4/4	4/4	2/4
Veberova pravila	3/3	3/3	2/3

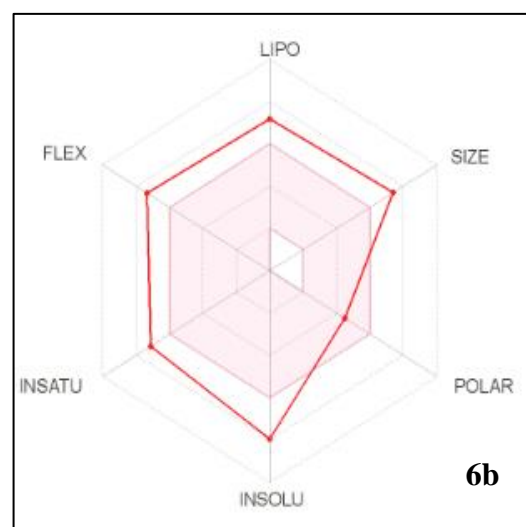
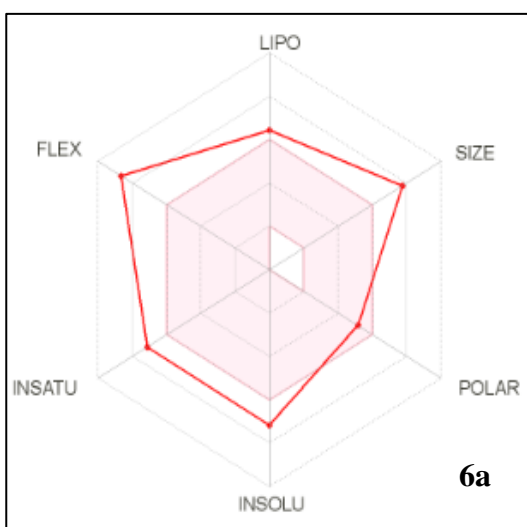
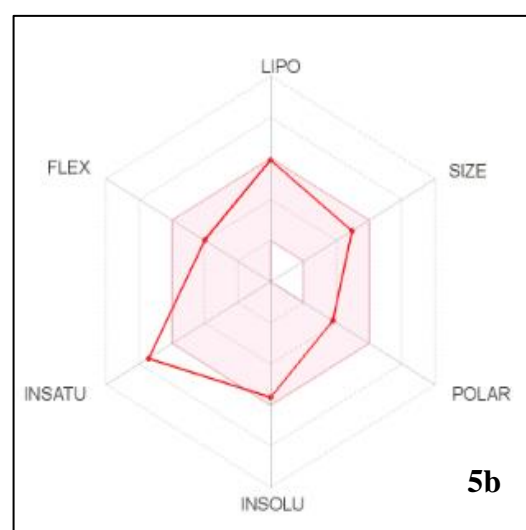
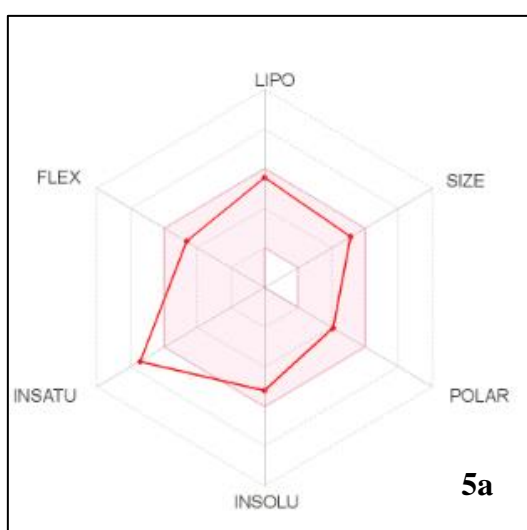
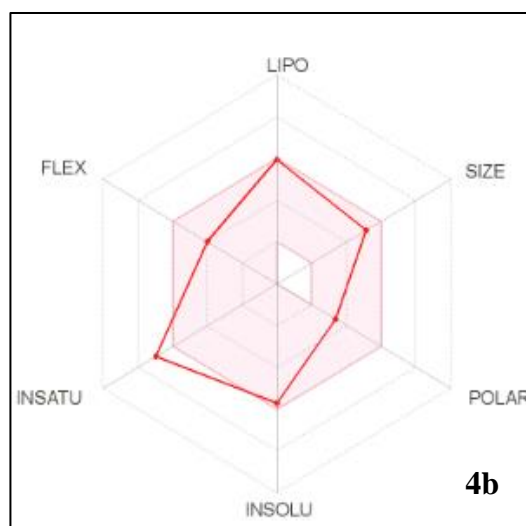
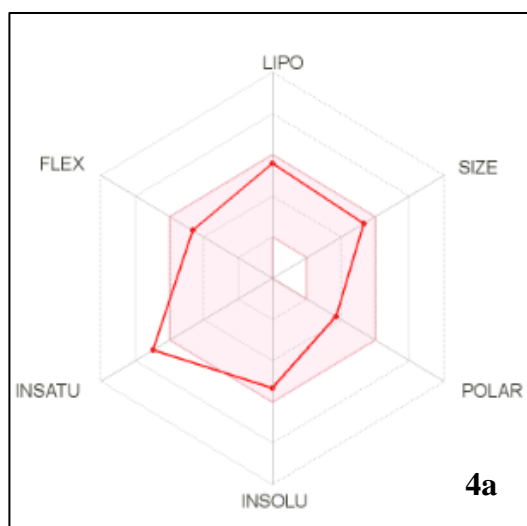
Tablica 5. Pregled svojstava novosintetiziranih harmicina **4b/5b/6b**.

SPOJ	4b	5b	6b
Kemijska formula	C ₂₆ H ₂₅ N ₅ O	C ₂₅ H ₂₃ N ₅ O	C ₃₈ H ₃₆ N ₈ O
M_r / g mol ⁻¹	423.52	409.49	620.76
t_r / °C	151 – 152	94 – 96	87 – 88
MS – ESI/ m/z (M+1) ⁺	424.2	410.1	621.4
log P	3.21	3.01	4.29
TPSA/ Å ²	57.76	68.62	88.47
Broj rotirajućih veza	6	6	11
Broj donora vodikove veze	0	1	0
Broj akceptora vodikove veze	4	4	6
Zbroj donora i akceptora vodikove veze	4	5	6
Lipinskijeva pravila	4/4	4/4	2/4
Veberova pravila	3/3	3/3	2/3

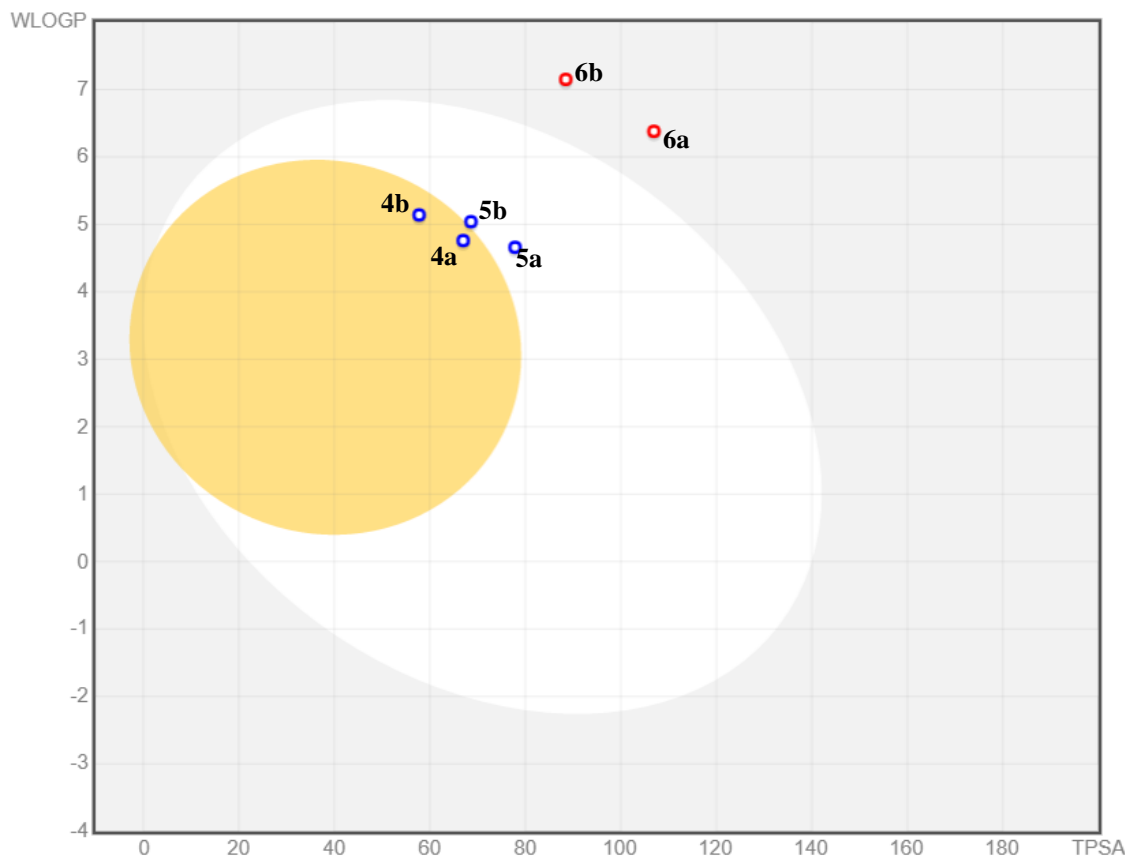
Analizom navedenih parametara moguće je zaključiti da *N*- i *O*- derivati odgovaraju Lipinskijevim i Veberovim pravilima te je stoga moguće očekivati dobru oralnu bioraspoloživost spojeva iz serije **4** i **5**. S druge strane, *bis*-derivati pokazuju odstupanja od pravila te je stoga za pretpostaviti da spojevi iz serije **6** neće imati dobru oralnu bioraspoloživost.

Pomoću online programa SwissADME na temelju izračunatih parametara moguće je stvoriti jedinstveni grafički prikaz izračunatih parametara koji utječu na oralnu bioraspoloživost. Takav prikaz naziva se *Bioavailability radar*, a parametri koji ulaze u njega su : LIPO, SIZE, POLAR, INSOLU, INSATU i FLEX. (Slika 9.) Lipofilnost molekule (LIPO) je izražena vrijednošću logaritma particijskog koeficijenta te mora biti u rasponu vrijednosti između -0.7 i +5.0. Veličina molekule (SIZE) izražena je pomoću molarne mase i treba se kretati između 150 i 500 g mol^{-1} . Polarnost molekule (POLAR) izražena je pomoću vrijednosti topološke ploštine zone polarne površine (TPSA) koja mora iznositi između 20 i 130 Å^2 . Netopljivost molekule (INSOLU) izražena je pomoću negativne vrijednosti logaritma molarne topljivosti koja je izračunata topološkom metodom Delaneyja (logS), a maksimalno može iznositi 6. Nezasićenost molekule (INSATU) izražena je udjelom sp^3 hibridiziranih ugljikovih atoma u ukupnom broju ugljikovih atoma te može iznositi maksimalno 0.25. Fleksibilnost molekule (FLEX) izražena je brojem vodikovih veza kojih može biti maksimalno 9. Opisanih šest parametara grafički je prikazano u obliku šesterokuta pri čemu svaki pojedini parametar predstavlja jedan vrh šesterokuta. Idealna je situacija da svaki vrh šesterokuta upada u ružičasti dio plohe jer to označava kako određeni parametar pozitivno korelira s oralnom bioraspoloživošću. Oni vrhovi koji se ne nalaze unutar ružičaste zone izlaze iz optimalnih okvira (Daina i sur., 2017).

Analizom dobivenih *Bioavailability radara* vidljivo je kako niti jedan od spojeva **4a,b/5a,b/6a,b** ne zadovoljava optimalne INSATU vrijednosti. Spojevi **4a,b/5a,b** zadovoljavaju ostalih 5 parametara, dok *bis*-derivati **6a,b** zadovoljavaju samo POLAR parametar te je stoga moguće zaključiti kako bi ta dva spoja nakon peroralne primjene imali izuzetno nisku bioraspoloživost.



Slika 9. Bioavailability radar sintetiziranih derivata (preuzeto s web stranice <http://www.swissadme.ch>)



Slika 10. Boiled EGG model novosintetiziranih derivata **4a,b/5a,b/6a,b** (preuzeto s web stranice <http://www.swissadme.ch>)

Pomoću programa SwissADME opcijom boiled EGG napravljena je predikcija prolaska krvno – moždane barijere i barijere gastrointestinalnog trakta na temelju strukture molekule. Također, pomoću navedene opcije moguće je predvidjeti koje su od novosintetiziranih molekula supstrati P – glikoproteina.

Za molekule koje upadaju u područje grafikona obojeno žutom bojom (**4a,b**) prema strukturi je vjerojatno da bi pasivno prolaze krvno – moždanu barijeru. Molekule koje se nalaze u području bijele boje (**5a,b**) vjerojatno bi se iz gastrointestinalnog trakta apsorbirale pasivnim putem. Plavom oznakom označene su molekule (**4a,b/5a,b**) za koje je na temelju strukture pretpostavljeno da bi bile supstrat P – glikoproteina, dok za one označene crveno (**6a,b**) nije vjerojatno da su supstrati ovog efluksnog transportera lociranog primjerice na krvno – moždanoj i barijeri gastrointestinalnog trakta (Daina i sur., 2017).

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog diplomskog rada bio je sintetizirati 1,2,3-triazolske derivate harmina/harmola i cimetne kiseline. Diplomski rad proveden je u sklopu HRZZ projekta pod nazivom: „Derivati harmina kao potencijalni antimalarici“ koji se provodi na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

U okviru rada sintetizirano je šest ciljnih spojeva:

- 4-({7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil)-1-[(2*E*)-3-(4-metoksi fenil)prop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol (**4a**)
- 4-({7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil)-1-[(2*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol (**4b**)
- 1-[(2*E*)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il}oksi)metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**5a**)
- 1-[(2*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il}oksi)metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**5b**)
- 1-[(2*E*)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-4-{[7-({1-[(2*E*)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}metoksi)-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**6a**)
- 1-[(2*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-4-{[1-metil-7-({1-[(2*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}metoksi)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**6b**)

Pored toga, sintetizirane su i građevne komponente za sintezu ciljnih spojeva. Azidi derivata cimetne kiseline **2a,b** dobiveni su iz derivata cimetne kiseline postupkom preko njihovih kiselinskih klorida, alkohola te estera. Propargilni derivati **3a-c** sintetizirani su postupkom Williamsonove sinteze iz harmina i harmola.

Ciljni spojevi **4a,b/5a,b/6a,b** strukturno su karakterizirani spektroskopskim i analitičkim metodama (IR, MS, ¹H i ¹³C NMR, *t*_r) čiji su spektri priloženi u dijelu rada *Prilozi*. Također konačnim produktima su na temelju strukture predviđena svojstva oralne bioraspodivnosti, te vjerojatnosti prolaska gastrointestinalne i krvno-moždane barijere pomoću programa SwissADME. Za ciljne je spojeve računalno provjerena i vjerojatnost da budu supstrati P – glikoproteina.

Navedenim će spojevima nadalje biti ispitano antimalarijsko i citotoksično djelovanje što izlazi iz okvira ovog diplomskog rada.

6. LITERATURA

1. Agalave SG, Maujan SR, Pore VS. *Click chemistry: 1,2,3-triazoles as pharmacophores. Chem Asian J*, 2011, 6, 2696-2718.
2. Ashley EA, Phyho AP. Drugs in development for malaria, *Drugs*, 2018, 78, 861-879.
3. Ashley EA, Phyho AP, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet*, 2018, 391, 1608-1621.
4. Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea TI. BDDCS, The Rule of Five and Drugability. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 101, 89-98.
5. Berg J, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013. str. 195.
6. Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, Mårtensson A, Abbas AK, Khatib R, Al – mafazy A, Ramsan M, Rotllant G, Gerstenmaier JF, Molteni F, Abdulla S, Montgomery SM, Kaneko A, Bjorkman A. Impact of artemisinin – based combination therapy and insecticide – treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS Med*, 2007, 4, 1784-1790.
7. Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23, 2829-2843.
8. Birth D, Kao WC, Hunte C. Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome bc1 complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action. *Nat Commun*, 2014, 5, 4029.
9. Blasco B, Leroy D, Fidock DA. Antimalarial drug resistance: linking Plasmodium falciparum parasite biology to the clinic. *Nat Med*, 2017, 8, 917-928.
10. Bourne Y, Sharpless KB, Taylor P, Marchot P. Steric and dynamic parameters influencing in situ cycloaddition to form triazole inhibitors with crystalline acetylcholinesterase, *J Am Chem Soc*, 2016, 138, 1466-1477.
11. Chemicalize, <http://chemicalize.com/>, pristupljeno 2.3.2020.
12. Cu – free *Click Chemistry Tools*, <https://clickchemistrytools.com/wp-content/uploads/2019/03/SPAAC.pdf>, pristupljeno 14.2.2020.
13. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug – likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep – UK*, 2017, 7, 42717.
14. Damjanov I, Seiwert S, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2018., str. 316.
15. Diagona TT. Supporting malaria elimination with 21st century antimalarial agent drug discovery. *Drug Discov Today*, 2015, 20, 1265-1270.
16. Dini S, Zaloumis S, Pengxing C, Price RN, Fowkes FJI, van der Pluijm RW, McCaw JM, Simpson JA. Investigating the efficacy of triple artemisinin – based combination

- therapies (TACTs) for treating Plasmodium falciparum malaria patients using mathematical modeling. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2018, 62. 11: e01068-18.
17. DM1157. <https://clinicaltrials.gov>, pristupljeno 1.2.2020.
 18. Dos Santos RG, Hallak JEC. Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience. *Epilepsy Behav*, 2019, 106300.
 19. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. Zagreb, Medicinska Naklada, 2018. str. 849.
 20. Gandhi PS, Gaikwad PL, Jagdale DM, Kadam VJ, Growing advances and applications of click reactions, *Am J PharmTech Res*, 2012, 2, 83-103.
 21. Guerrant RL, Walker DH, Weller P. Tropical infectious diseases : principles, pathogens and practice 3rd Edition. Edinburgh, Elsevier 2011. str. 656.
 22. Guidelines for the Treatment of Malaria 3rd edition, *WHO*, 2015.
 23. Hein CD, Liu XM, Wang D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm Res*, 2008, 5, 2216-2230.
 24. Hommel M. The future of artemisinins: natural, synthetic or recombinant? *J Biol*, 2008, 7, 38
 25. Hooft van Huijsduijnen R, Wells T, Tanner M, Wittlin S. Two successful decades of Swiss collaborations to develop new anti-malarials. *Malar J*, 2019, 18, 94.
 26. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/antimikrobna-rezistencija/>, pristupljeno 18.4.2020.
 27. Javeed M, Rasul A, Hussain G, Jabeen F, Rasool B, Safiq N, Ali M. Harmine and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in human diseases. *Bangladesh J Pharmacol*, 2018, 7, 203-213.
 28. Johannson JR, Beke – Somfai T, Stålsmeden AS, Kann N. ruthenium – catalyzed azide – alkyne cycloaddition reaction: scope, mechanism and applications, *Chem Rev*, 2016, 116, 14726-14768.
 29. KAF156. <https://www.mmv.org/>, pristupljeno 1.2.2020.
 30. Kalenić S i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada 2013. str. 604-609.
 31. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada 2011., str. 908., 910., 911.
 32. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical function from a Few Good Reactions. *Angew Chem – Int Ed*, 2001, 40, 2004-2021.

33. Koller R, Mombo – Ngoma G, Grobusch MP. The early preclinical and clinical development of ganaplacide (KAF156), a novel antimalarial compound. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27, 803-810.
34. Kuhlmann FM, Fleckenstein JM. Antiparasitic Agents. U: Infectious diseases 4th edition. Cohen J, Powderly WG i Opal SM urednici. Edinburgh, Elsevier, 2017, str. 1345-1372.
35. Lin JT, Juliano JJ, Wongsrichanalai C. Drug-resistant malaria: the era of ACT. *Curr Infect Dis Rep*, 2010, 12, 165-173.
36. Maganda BA, Ngaimisi E, Kamuhabwa AA, Aklillu E, Minzi OM. The influence of nevirapine and efavirenz – based anti – retroviral therapy on the pharmacokinetics of lumefantrine and anti – malarial dose recommendation in HIV – malaria co – treatment. *Malar J*, 2014, 13, 205.
37. McBride WJH. Chemoprophylaxis of tropical infectious diseases. *Pharmaceuticals*, 2010, 3, 1561-1575.
38. Mbua NE, Guo J, Wolfert MA, Steet R, Boons GJ. Strain promoted alkyne – azide cycloadditions, *ChemBioChem*, 2011, 8, 1912-1921.
39. Medicines for Malaria Venture <http://www.mmv.org/>, pristupljeno 20.1.2020.
40. Meyer JP, Adumeau P, Lewis JS, Zeglis BM. Click chemistry and radiochemistry: the first ten years, *Bioconjug Chem*, 2016, 27, 2791-2807.
41. Mirghani RA, Hellgren U, Bertilsson L, Gustafsson LL, Ericsson O. Metabolism and elimination of quinine in healthy volunteers, *Eur J Clin Pharmacol*, 2003, 59, 423-427.
42. Moses JE, Moorhouse AD. The growing applications of click chemistry. *Chem Soc Rev*, 2007, 36, 1249-1262 .
43. MSD priručnik dijagnostike i terapije. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/izvancrijevniprotozoi/malarija>, pristupljeno: 17.3.2020.
44. Murillo-Solano C, Dong C, Sanchez CG, Pizzaro JC. Identification and characterization of the antiplasmodial activity of Hsp90 inhibitors. *Malar J*, 2017, 16, 292
45. M5717. <https://www.mmv.org> , pristupljeno 15.2.2020.
46. Early stage clinical trial of antimalarial drug begins <https://www.nih.gov/>, pristupljeno 1.2.2020.
47. Nicosia V, Colombo G, Consentino M, Di Matteo S, Mika F, De Sanctis S, Ratti S, Vinci M. Assessment of acceptability and ease of use of atovaquone/proguanil

- medication in subjects undergoing malaria prophylaxis. *Ther Clin Risk Manag*, 2008, 4, 1105-1110.
48. Niroumand MC, Farzaei MH, Amin G. Medicinal properties of *Peganum harmala* L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: a review. *J Tradit Chin Med*, 2015, 35, 104-109.
49. Obonyo CO, Juma EA. Clindamycin plus quinine for treating uncomplicated falciparum malaria: a systematic review and meta – analysis. *Malar J*, 2012, 11, 2.
50. Pekyi D, Ampromfi AA, Tinto H, Traore – Coulibaly M, Tahita MC, Valea I, Mwapasa V, Kalilani – Phiri L, Kalanda G, Madanitsa M, Ravinetto R, Mutabingwa T, Gbekor P, Tagbor H, Antwi G, Menten J, De Crop M, Claeys Y, Schurmans C, Van Overmeir C, Thriemer K, Van Geertruyden JP, D'Alessandro U, Nambozi M, Mulenga M, Hachizovu S, Kabuya JB, Mulenga J. Four artemisinin – based treatments in African pregnant women with malaria. *N Engl J Med*, 2016, 374, 913-927.
51. Pérez B, Teixeira C, Gut J, Rosenthal PJ, Gomes JRB, Gomes P. Cinnamic acid / chloroquinoline conjugates as potent agents against chloroquine – resistant *Plasmodium falciparum*. *Chem Med Chem*, 2012, 7, 1537-1540.
52. Pérez BC, Teixeira C, Albuquerque IS, Gut J, Rosenthal PJ, Gomes JRB, Prudêncio M, Gomes P. N-cinnamoylated chloroquine analogues as dual-stage antimalarial leads. *J Med Chem*, 2013, 56, 556-567.
53. Plewes K, Leopold SJ, Kingston HVF, Dandorp AM. Malaria: what's new in the management of malaria? *Infect Dis Clin North Am*, 2019, 33, 39-60.
54. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 1.7.2020
55. Rogerson SJ. Management of Malaria in Pregnancy. *Indian J Med Res*, 2017, 146, 328-333.
56. Rosenthal PJ. Antimalarial chemotherapy: Mechanisms of action, resistance and new directions in drug discovery. Totowa New Jersey, Humana Press 2001. str. 16.
57. Ryan ET. Antiparasitic agents. U: Principles and practice of pediatric infectious diseases 5th edition. Long SS, Probes CG, Fischer M urednici, Edinburgh, Elsevier 2018., 1567-1589.
58. Salako LA, Sowunmi A. Disposition of quinine in plasma, red blood cells and saliva after oral and intravenous administration to healthy adult Africans. *Eur J Clin Pharmacol*, 1992, 42, 171-174.
59. Salehi P, Babanezhad – Harikandei K, Bararjanian M, Al – Harrasi A, Esmaeili MA, Aliahmadi A. Synthesis of novel 1,2,3-triazole tethered 1,3-disubstituted β -carboline

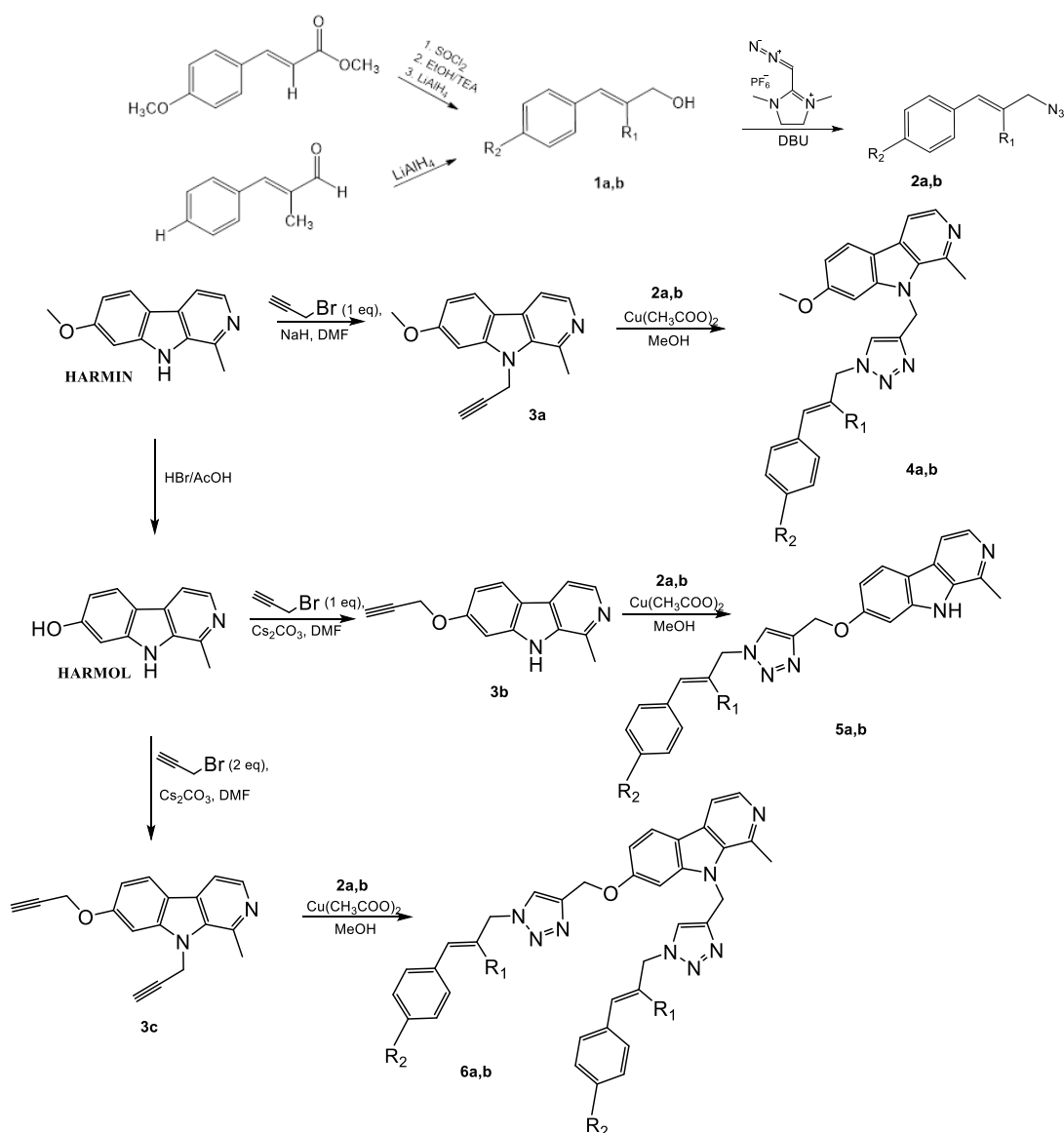
- derivatives and their cytotoxic and antibacterial activities. *Med Chem Res*, 2016, 25, 1895-1907.
60. Shahinas D, Liang M, Datti A, Pillai DR. A repurposing strategy identifies novel synergistic inhibitors of Plasmodium falciparum Heat Shock Protein 90. *J Med Chem*, 2010, 3, 3552-3557.
 61. Shahinas D, MacMullin G, Benedict C, Crandall I, Pillai DR. Harmine is a potent antimalarial targeting Hsp90 and synergizes with chloroquine and artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 6, 4207-4213.
 62. Sharma P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. *J Chem Pharm Res*, 2011, 3, 403-423
 63. Su X, Miller LH. The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci China Life Sci*, 2015, 58, 1175-1179.
 64. SwissADME, <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 2.3.2020.
 65. The Nobel Prize. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/tu/facts/>, pristupljeno 19.4.2020.
 66. Thirumurugan P, Matosiuk D, Jozwiak K. Click chemistry for drug development and diverse chemical biology applications. *Chem Rev*, 2013, 113, 4905-4979.
 67. Tse EG, Korsik M, Todd MH. The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malar J*, 2019, 18, 93.
 68. Van der Pluijm RW, Tripura R, Hoglund RM, Phyto AP, Lek D, ul Islam A, Anvikar AR, Satpathi P, Satpathi S, Behera PK, Tripura A, Baidya S, Onyamboko M, Hoang Chau N, Sovann Y, Suon S, Sreng S i sur. Triple artemisinin-based combination therapies versus artemisinin-based combination therapies for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: a multicentre, open-label, randomised clinical trial. *The Lancet*, 2020, 395, 1345-1360.
 69. Vardanyan RS, Hruby VJ. Antibiotics. U: Synthesis of essential drugs. Vardanyan RS, Hruby VJ urednici, Edinburgh, Elsevier, 2006, 425-498.
 70. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615-2623.
 71. Whiting M, Muldoon J, Lin YC, Silverman SM, Lindstorm W, Olson AJ, Kolb HC, Finn MG, Sharpless B, Elder JH, Fokin VV. Inhibitors of HIV-protease by using in situ click chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, 45 str. 1435-1439.
 72. Williamsonova reakcija <http://struna.ihjj.hr>, pristupljeno 19.3.2020.

73. Woodward RB, Doering WE. The total synthesis of quinine¹. *J Am Chem Soc*, 1944, 66, 849-849.
74. World Health Organisation, <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malaria>_ pristupljeno 30.12.2019.
75. World Health Organisation, <https://www.afro.who.int/health-topics/sickle-cell-disease>, pristupljeno 20.1.2020.
76. World Health Organisation, <https://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/> pristupljeno 20.4.2020.
77. World Health Organisation, World malaria report 2019., Geneva; WHO, 2019.
78. Zofou D, Kuete V, Titanji VPK. Antimalarial and other protozoal products from African medicinal plants. U: Medicinal plant research in Africa. Kuete V urednik, Edinburgh, Elsevier, 2013, str. 661-709.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Harmicini; sinteza i karakterizacija 1,2,3 - triazolskih derivata harmina i cimetne kiseline

Ovaj diplomski rad izrađen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na Zavodu za farmaceutsku kemiju, a obuhvaća sintezu i karakterizaciju novih derivata harmina kao potencijalnih antimalarika. Cilj rada je sinteza i karakterizacija šest novih 1,2,3-triazolskih derivata harmina koji u strukturi sadrže derivate cimetne kiseline. Harmol je dobiven iz harmina postupkom hidrolize etera. Azidi **2** su dobiveni iz odgovarajućih derivata cimetne kiseline. Taj postupak uključivao je prevođenje kiseline u kiselinski klorid, zatim u ester te nakon toga redukciju u alkohol koji je potom preveden u odgovarajući azid (**2a/b**). Konačni produkti (**4-6**) sintetizirani su iz propargiliranih derivata harmina / harmola i u reakciji Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije između dobivenih alkina **3** i azida **2**.



Po završetku sinteze, ciljnim je spojevima i međuproduktima struktura utvrđena spektroskopskim metodama IR, ^1C i ^{13}C NMR, MS te su im određene temperature tališta.

Pomoću programskih alata SwissADME i Chemicalize te Lipinskijevih i Veberovih pravila utvrđeno je kako spojevi **6a i 6b** imaju lošu oralnu biorasploživost, dok derivati **4a,b/5a,b**, uz manja odstupanja, vjerojatno imaju dobru oralnu biorasploživost.

Sintetiziranim derivatima u nastavku istraživanja bit će ispitana biološka svojstva.

Ključne riječi: harmin, harmol, *click* kemija, 1,2,3-triazol, cimetna kiselina, malarija.

Harmicines; synthesis and characterization of harmine and cinnamic acid 1,2,3 - triazole derivatives

This paper is a part of an ongoing research at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Medicinal Biochemistry, University of Zagreb and includes the synthesis and characterisation of new harmine derivatives as potential antimalarials. The aim of this diploma thesis was the synthesis and characterization of six new 1,2,3-triazole harmine derivatives. Harmol was obtained by demethylation of harmine. Azide derivatives containing cinnamic moiety were obtained in a process that included these steps: converting acid to the acid chloride, then retaining the ester, then reduction to alcohol and finally converting alcohol into corresponding azide (**2a,b**). The target compounds (**4a,b/5a,b/6a,b**) were synthesized from propargylated harmine/harmole derivatives and azides in the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition.

After the synthesis, the target products were characterized using conventional spectroscopic methods: IR, ^1H and ^{13}C NMR and MS. Melting points of the compounds were also determined.

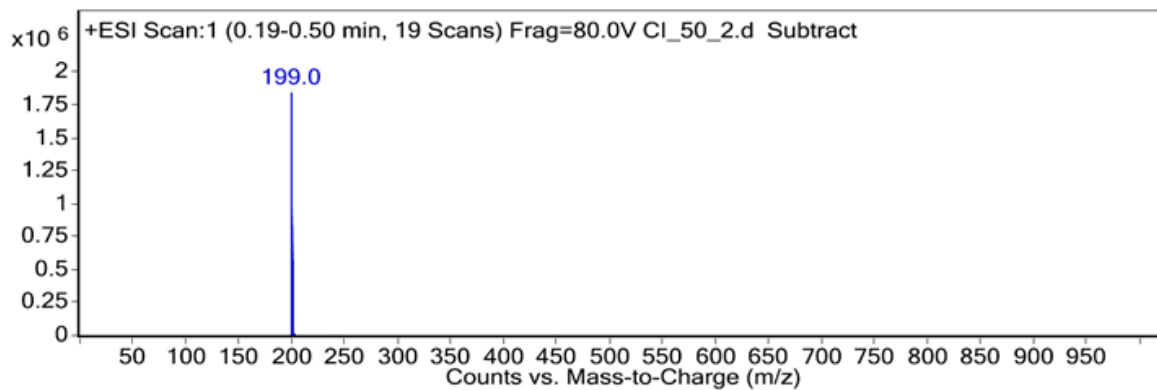
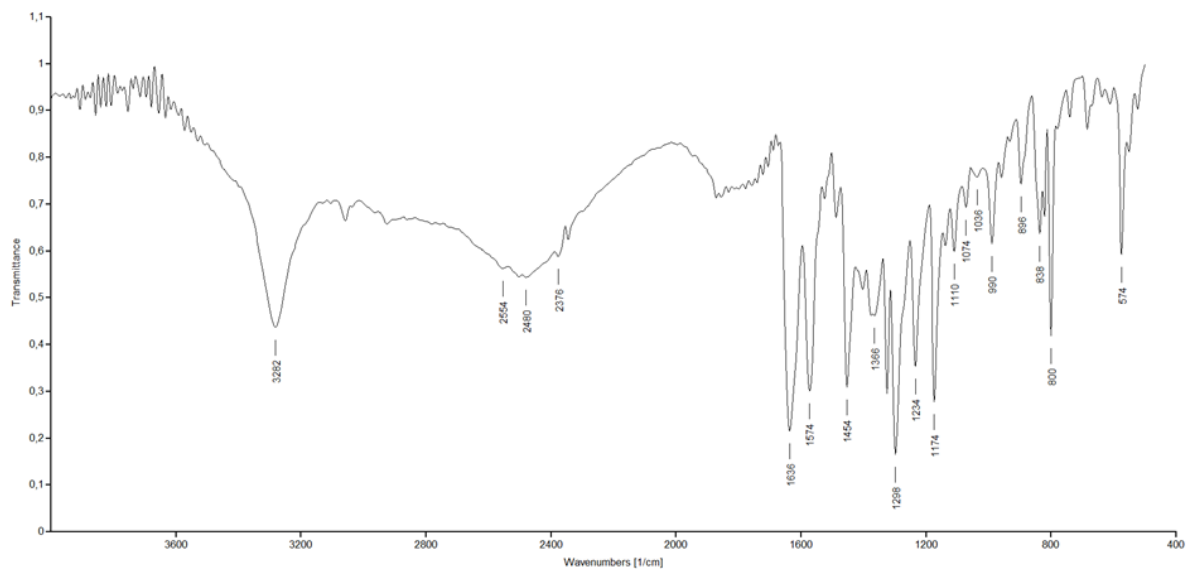
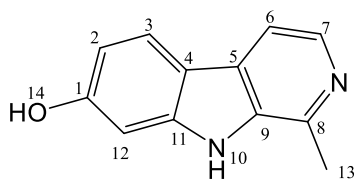
Using computer tools available on web, SwissADME and Chemicalize, along with Weber and Lipinski Criteria it was predicted that the compounds **6a,b** don't have good oral bioavailability, while compounds **4a,b/5a,b** are likely to have better oral bioavailability.

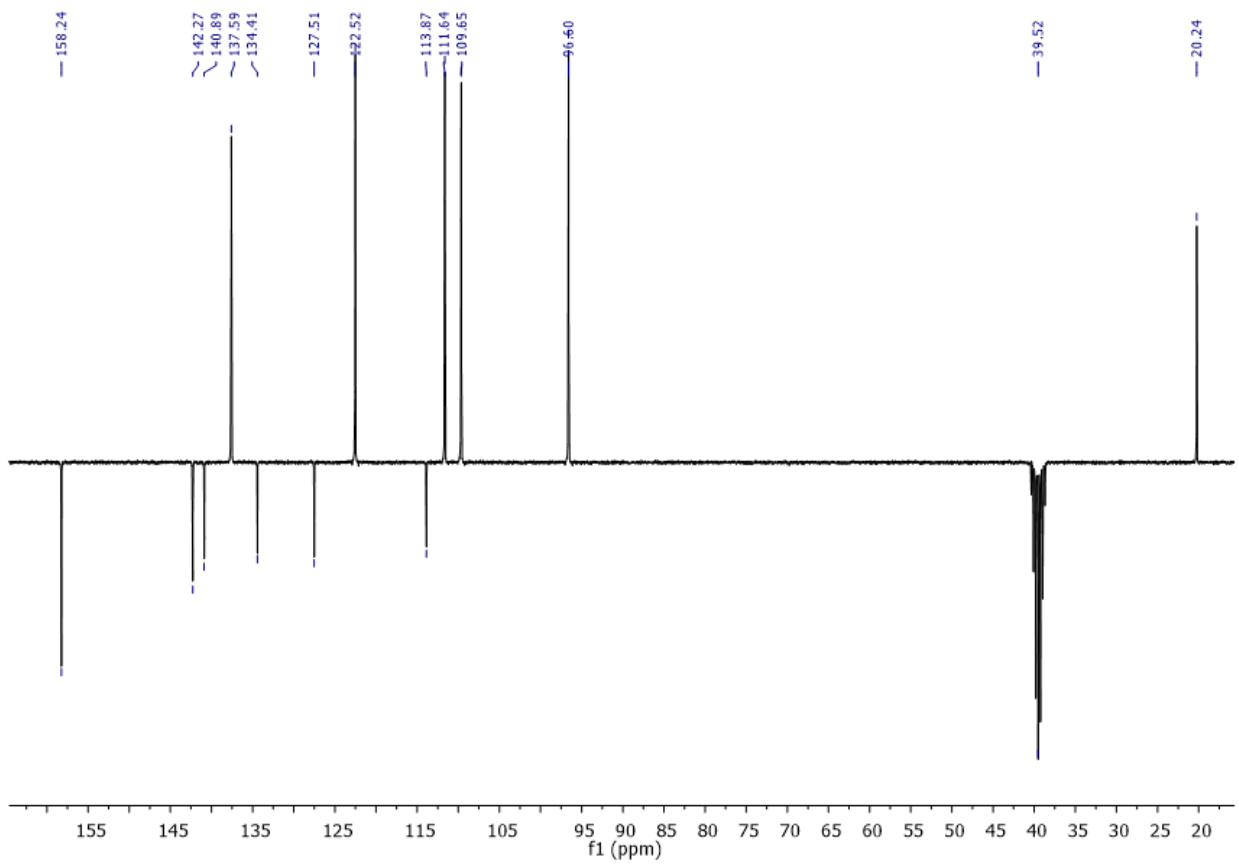
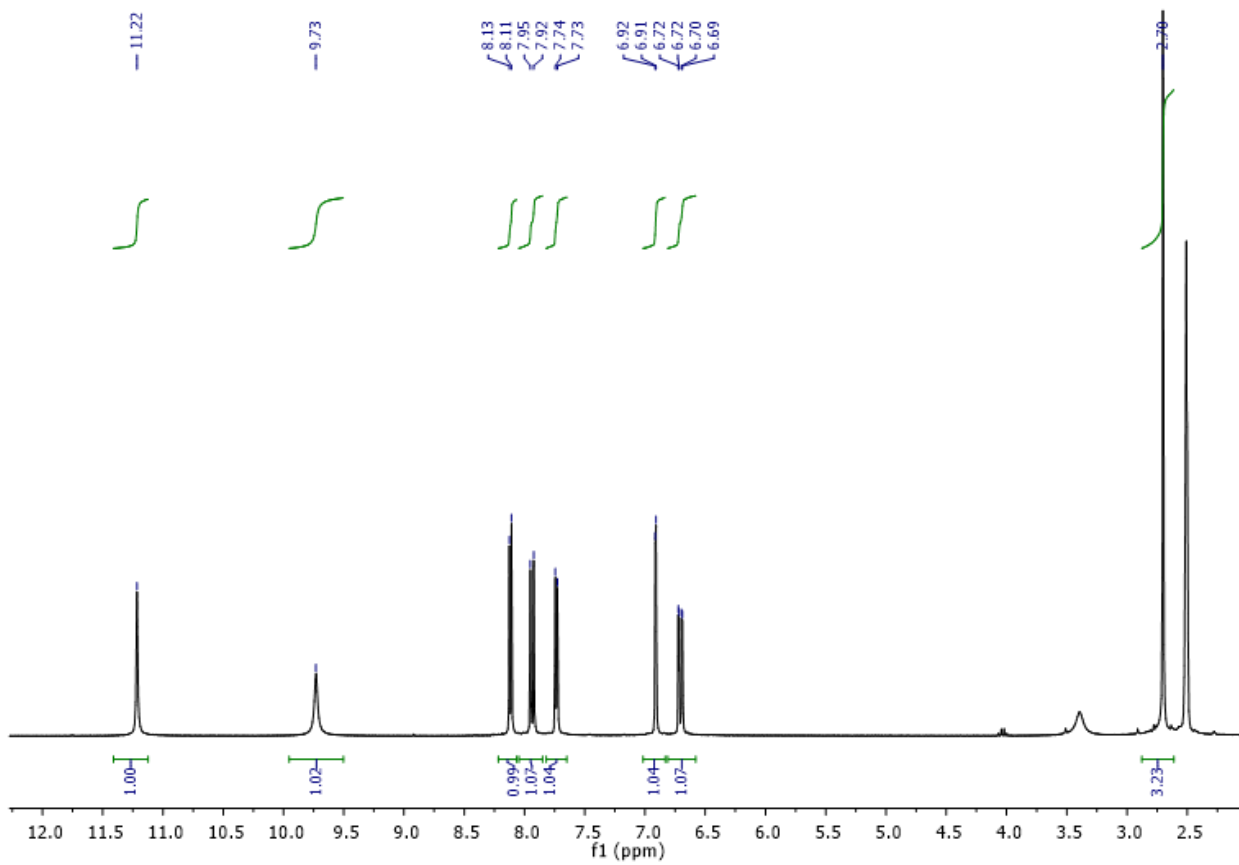
Further studies will investigate antimalarial potential and biological properties of synthesised derivatives.

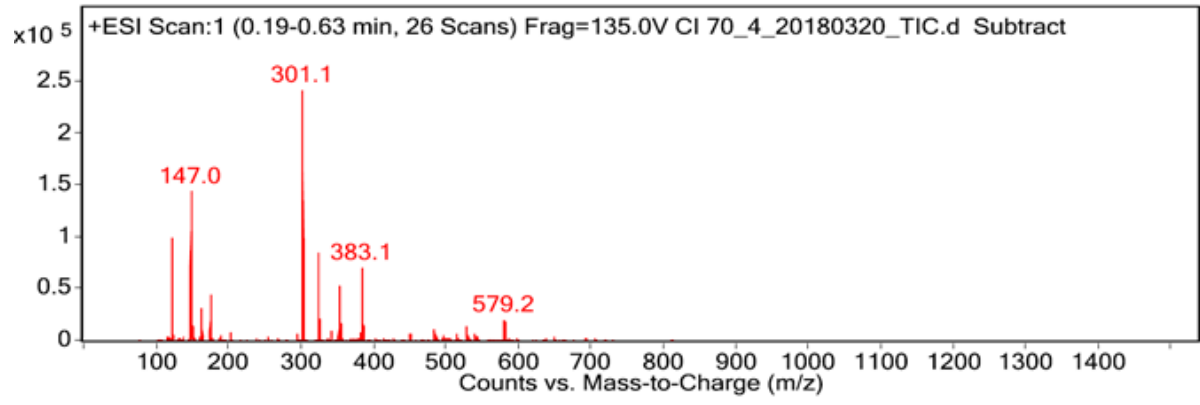
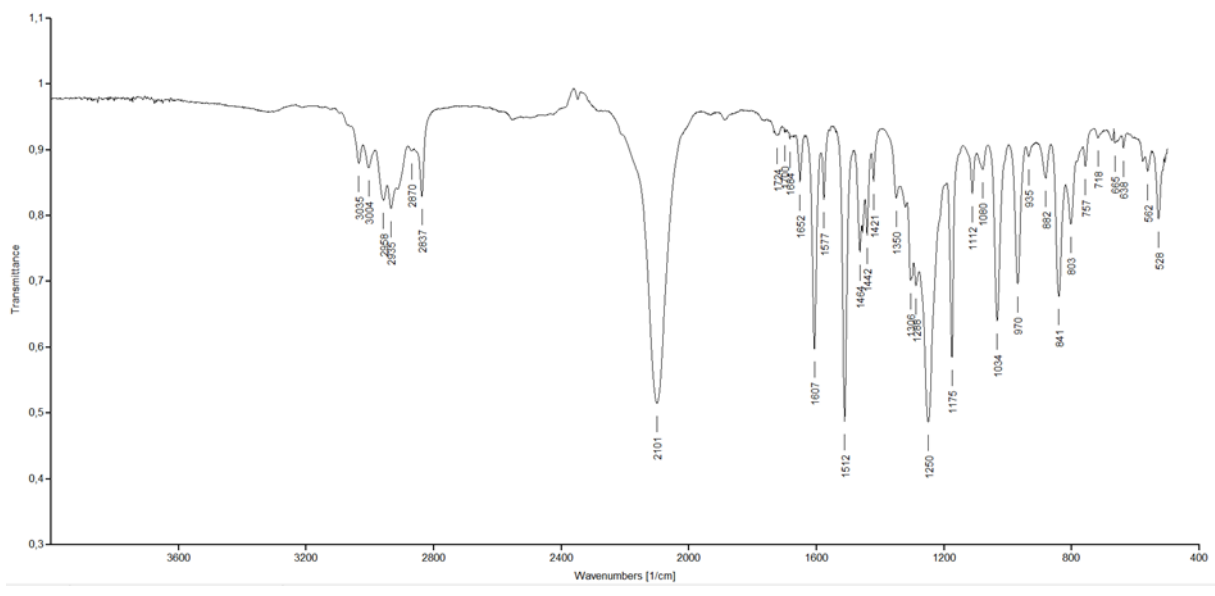
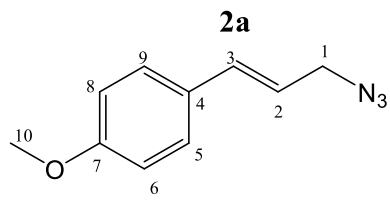
Keywords: harmine, harmole, *click* chemistry, 1,2,3-triazole, cinnamic acid, malaria.

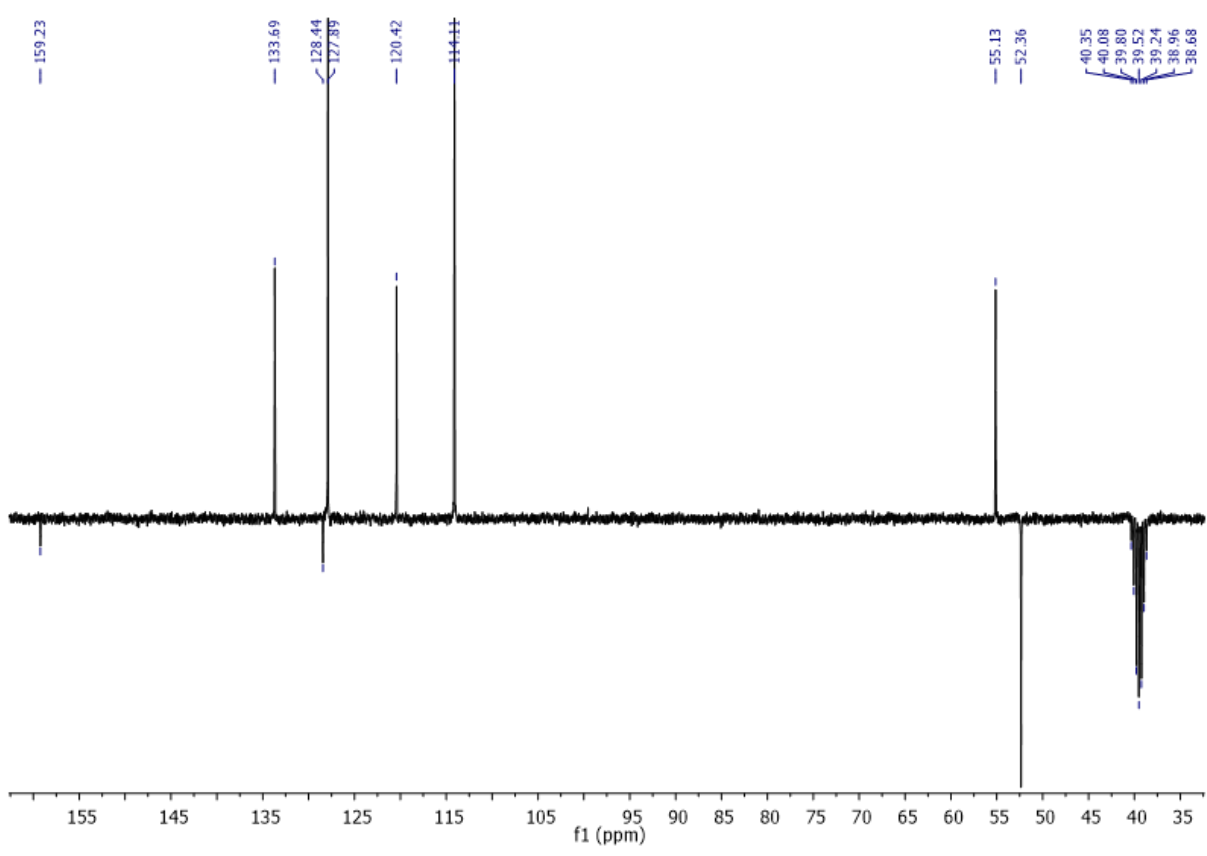
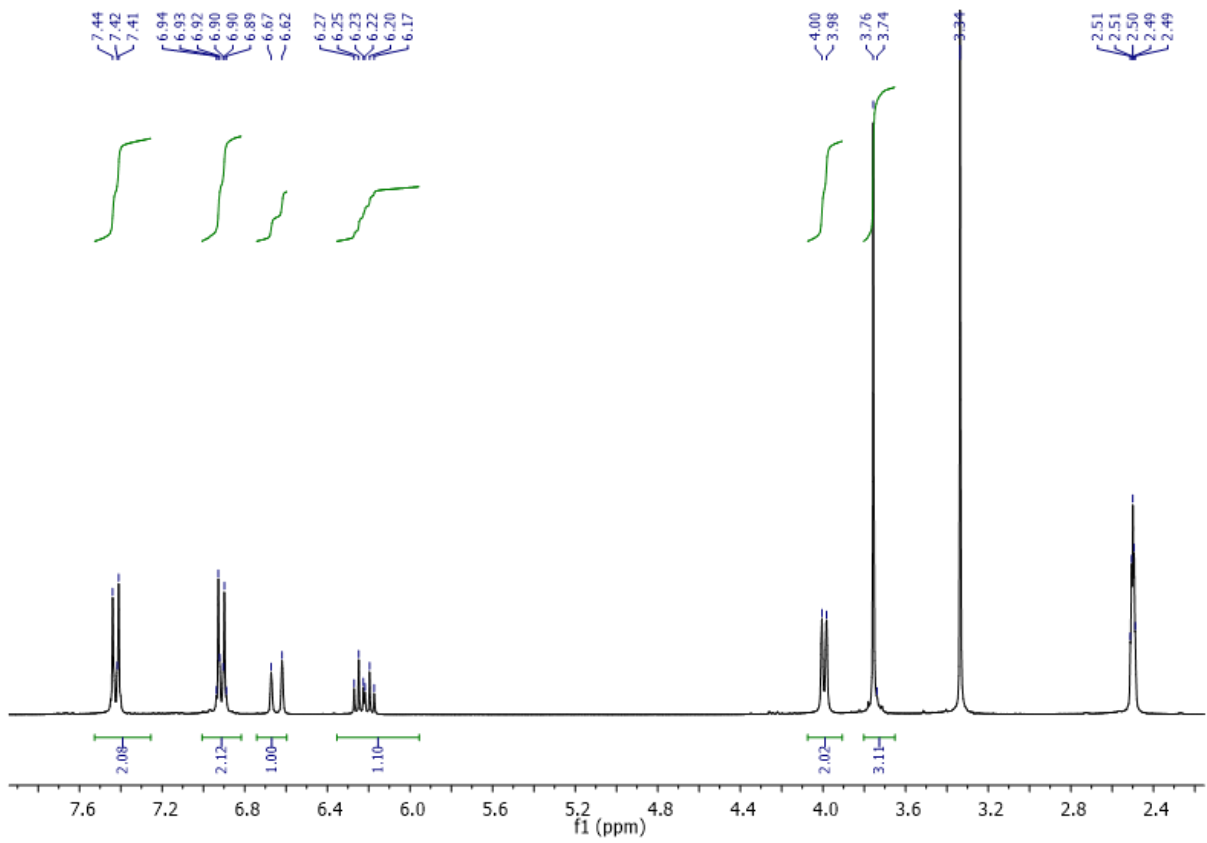
8. PRILOZI

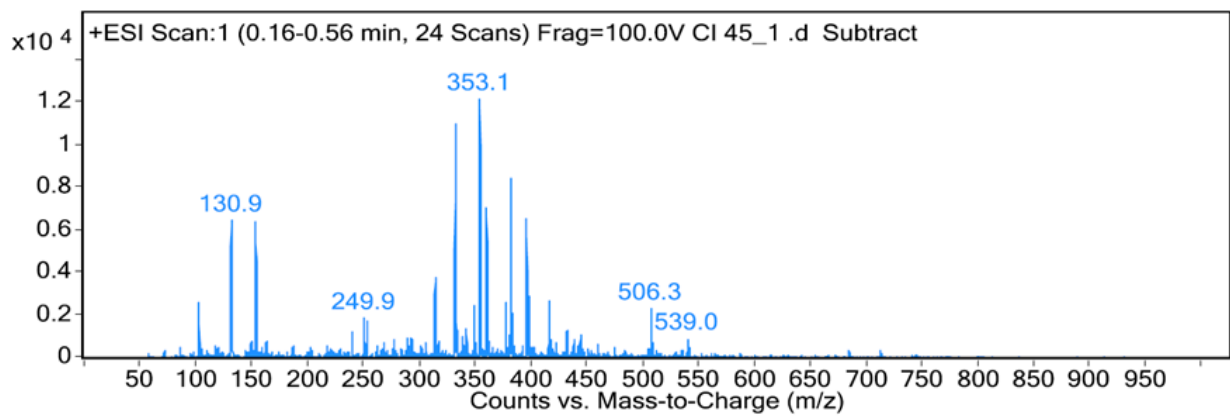
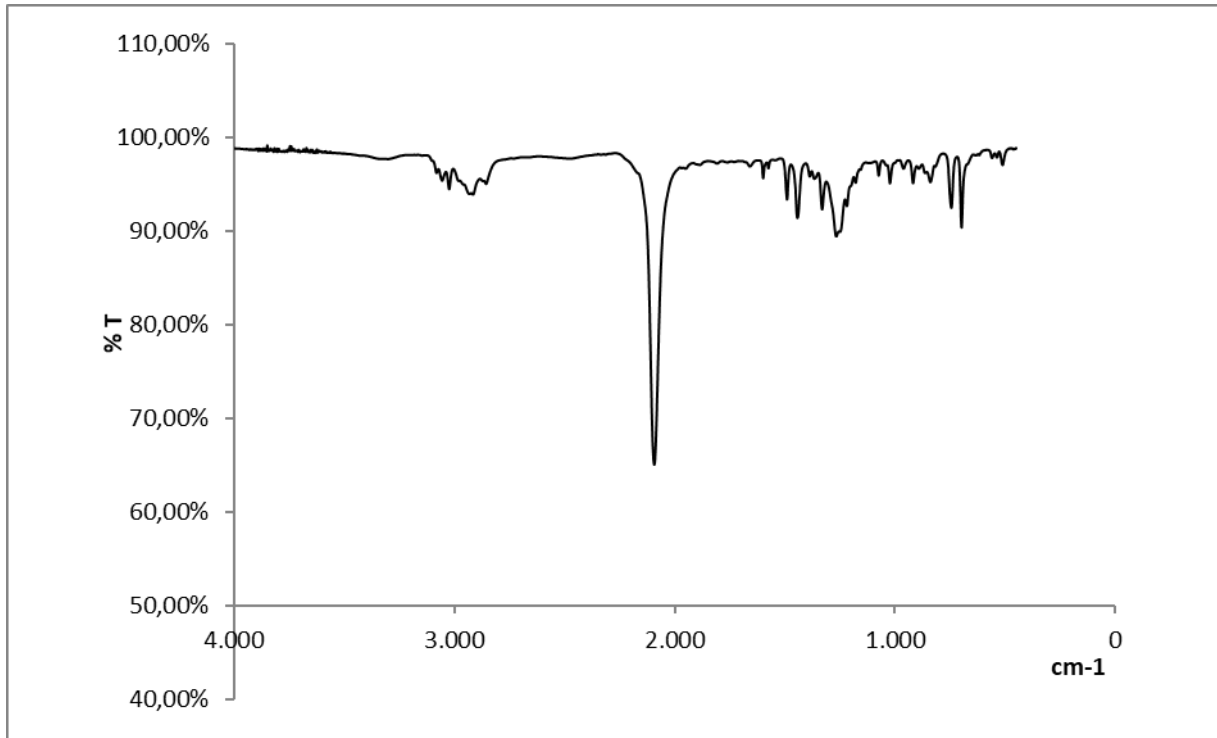
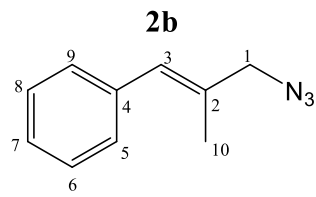
HARMOL

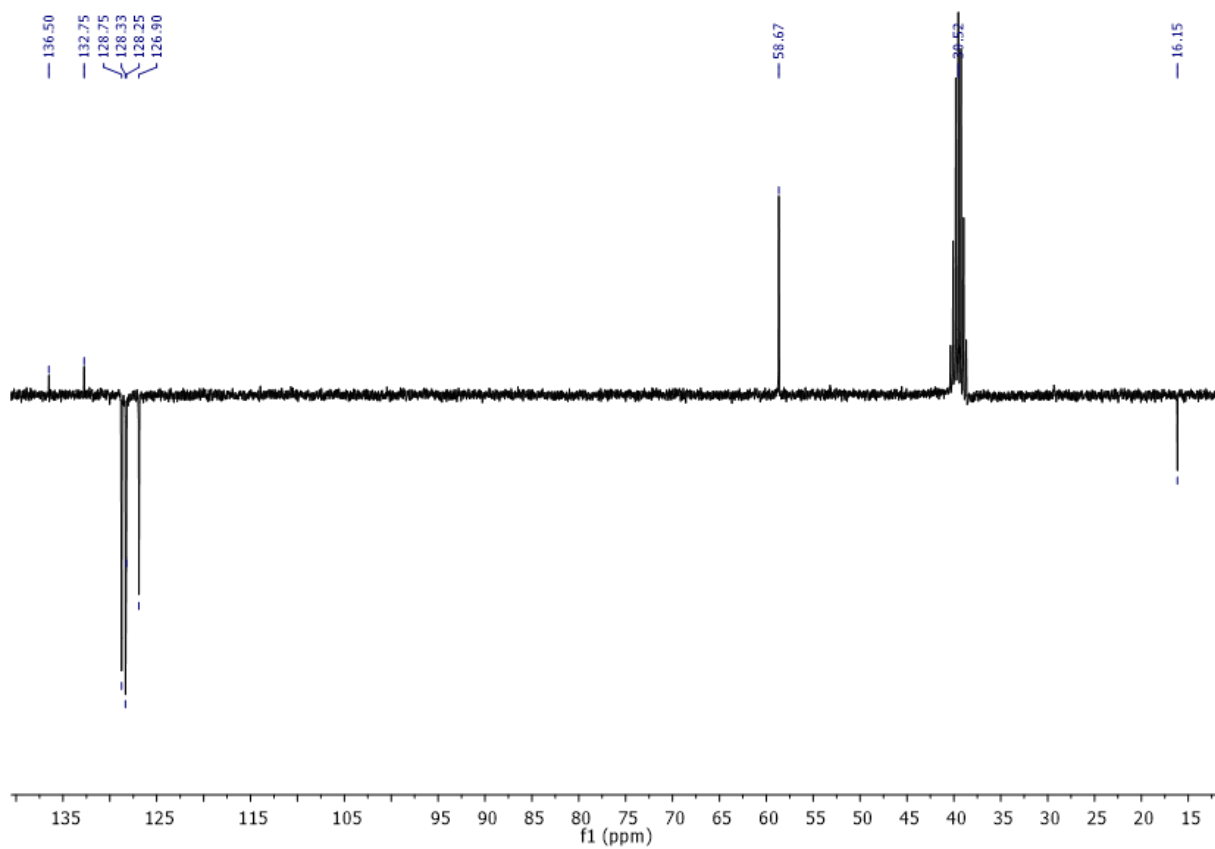
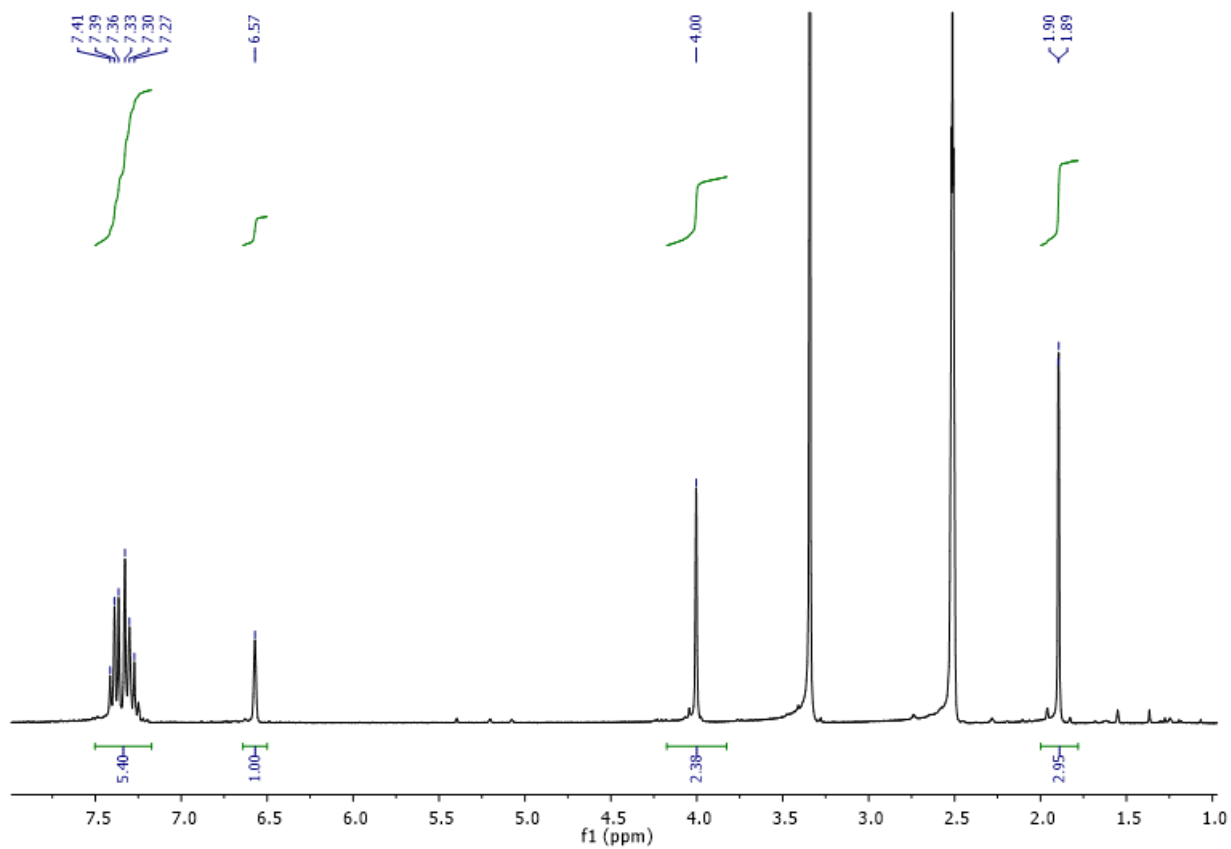


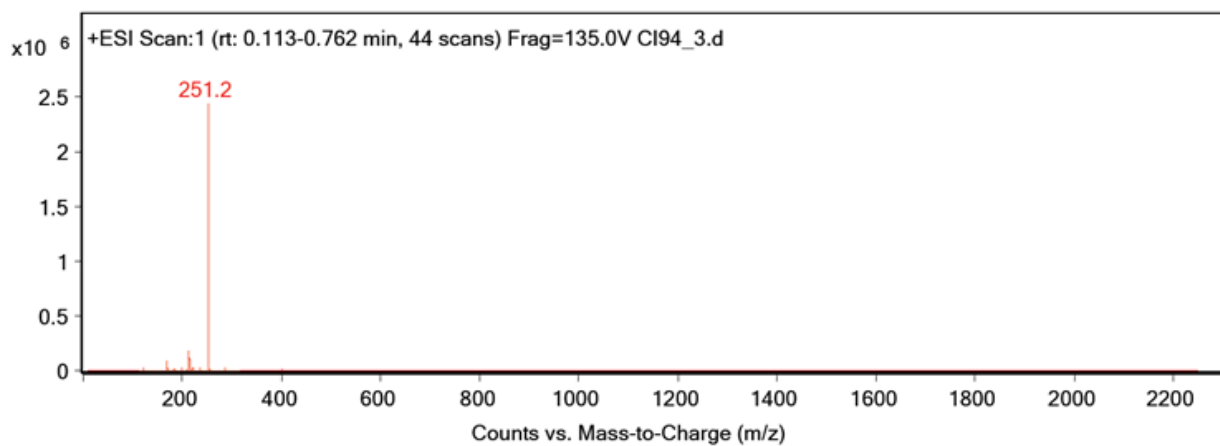
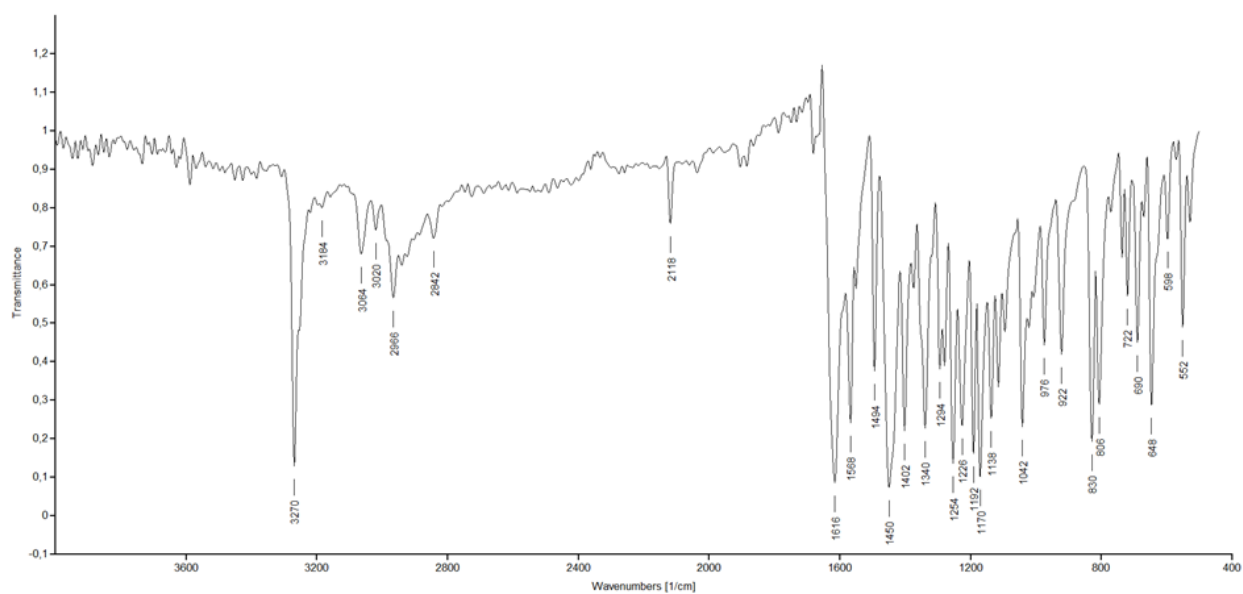
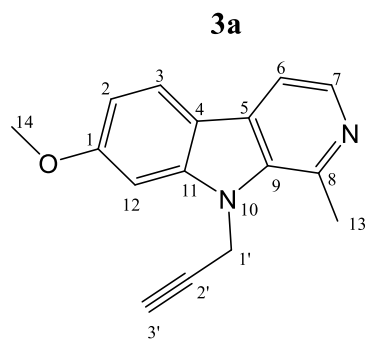


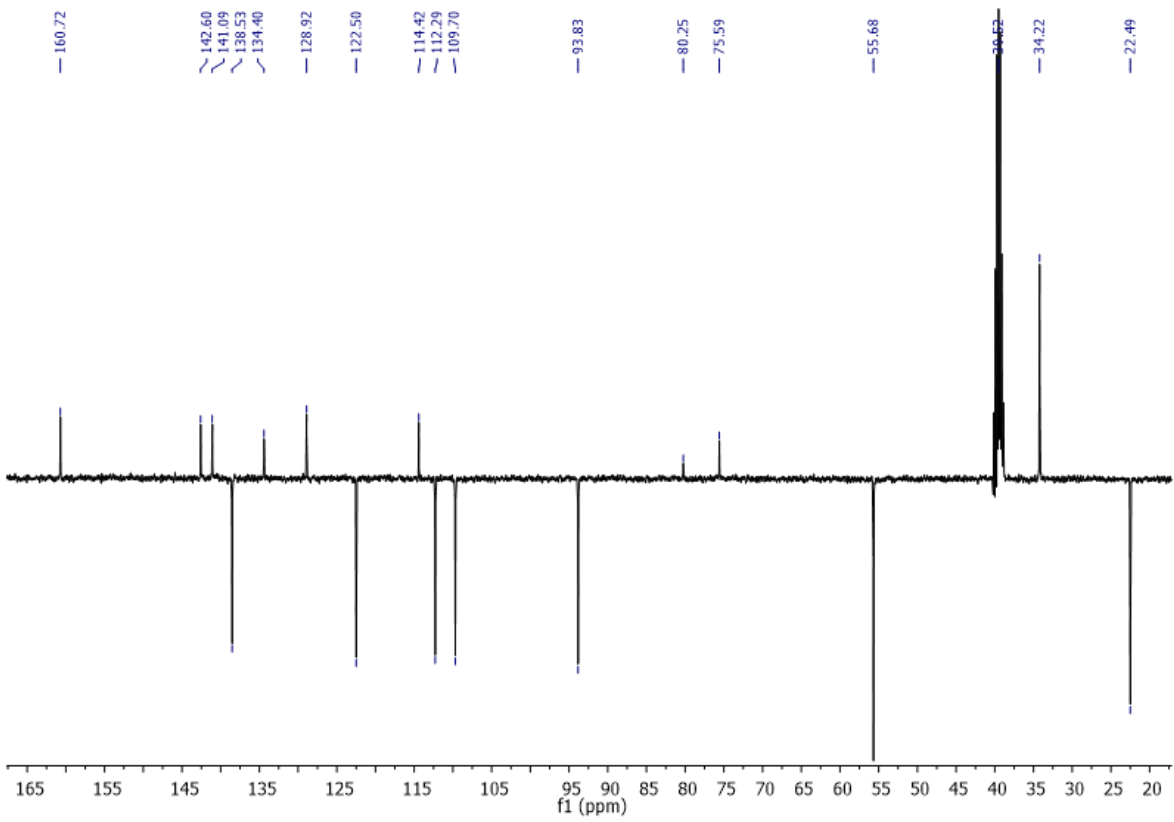
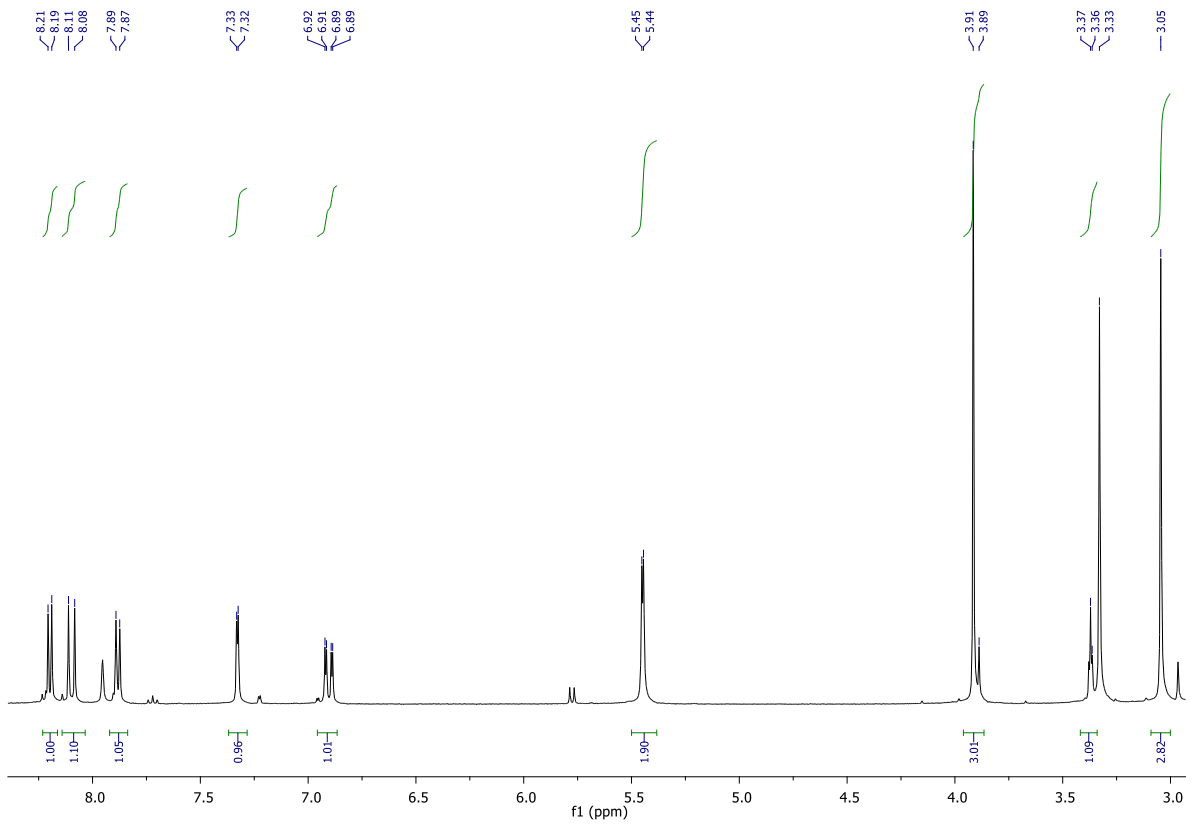




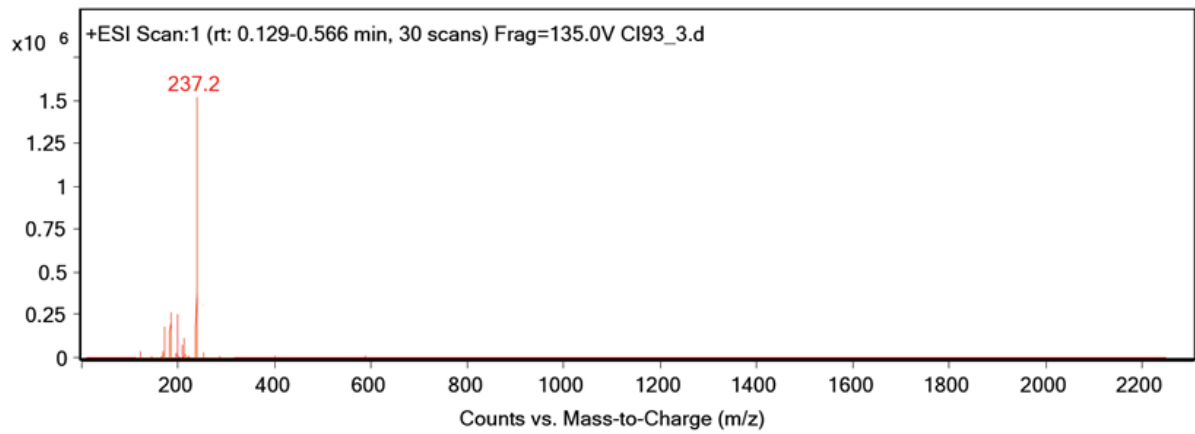
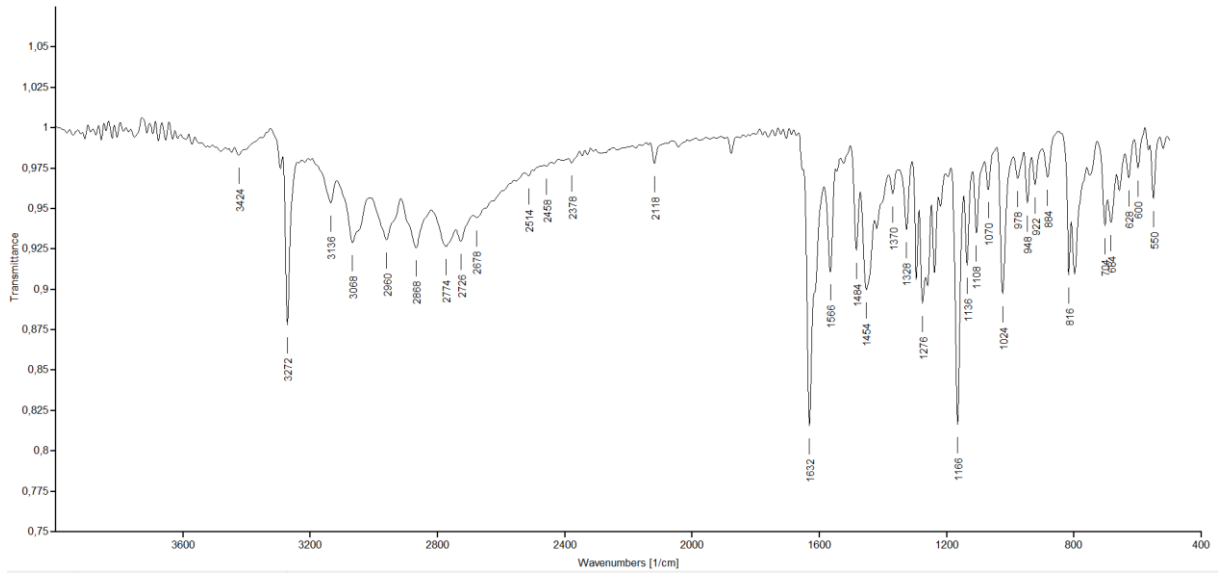
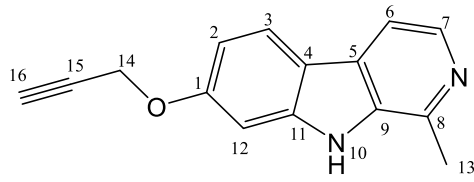


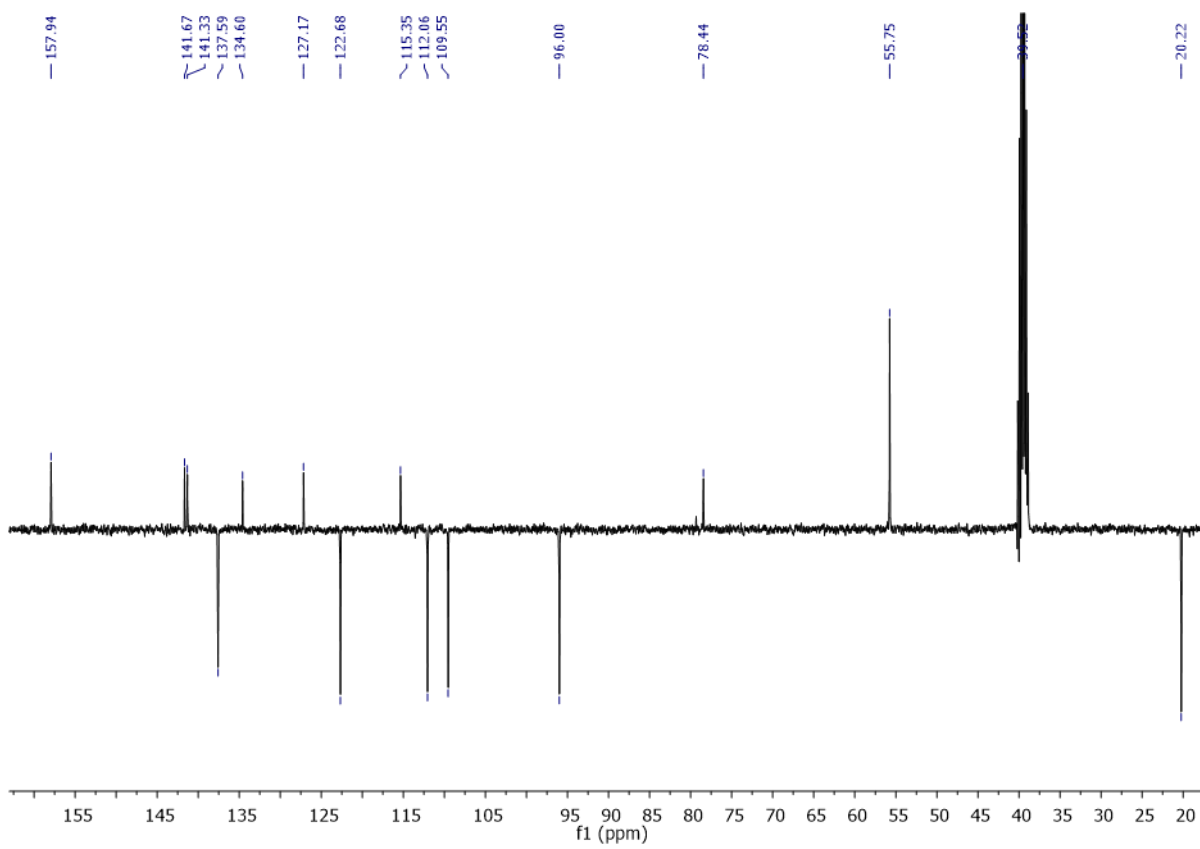
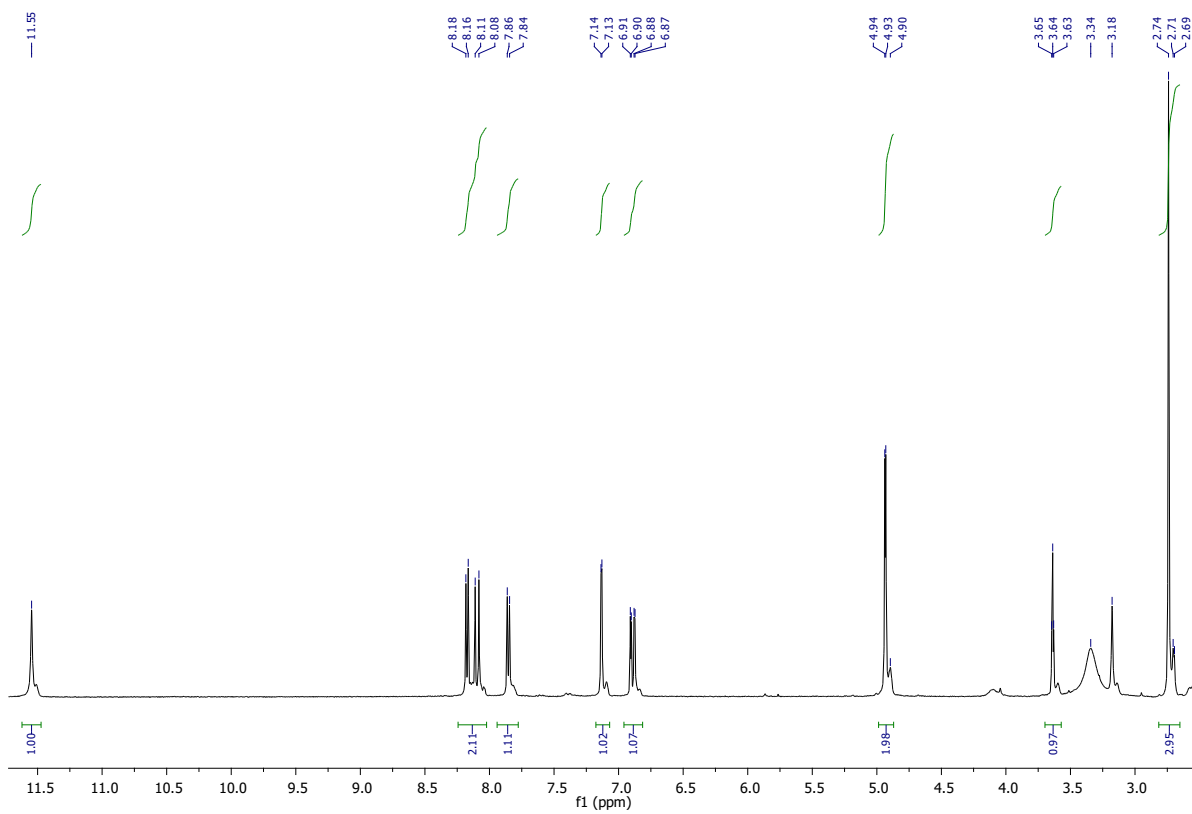


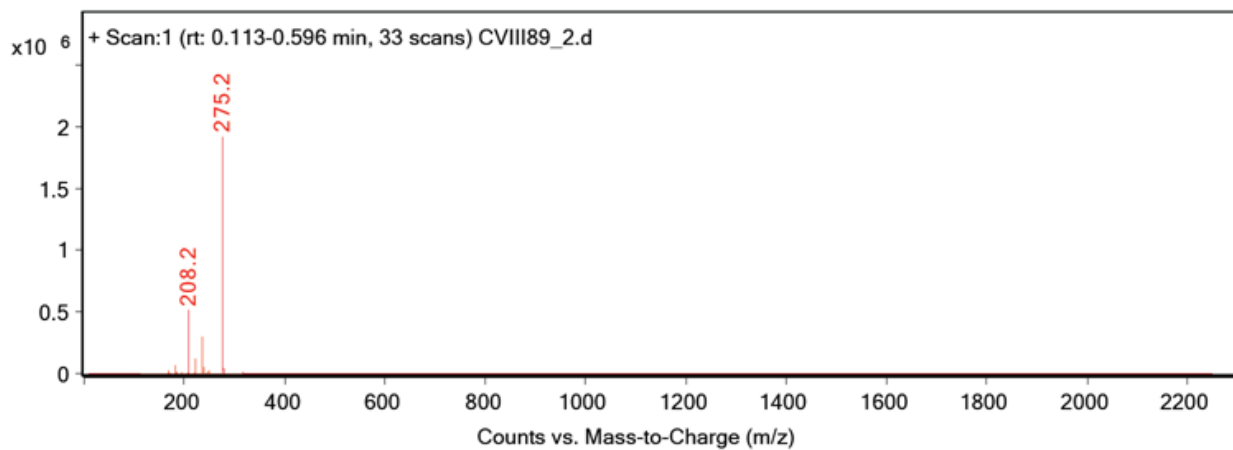
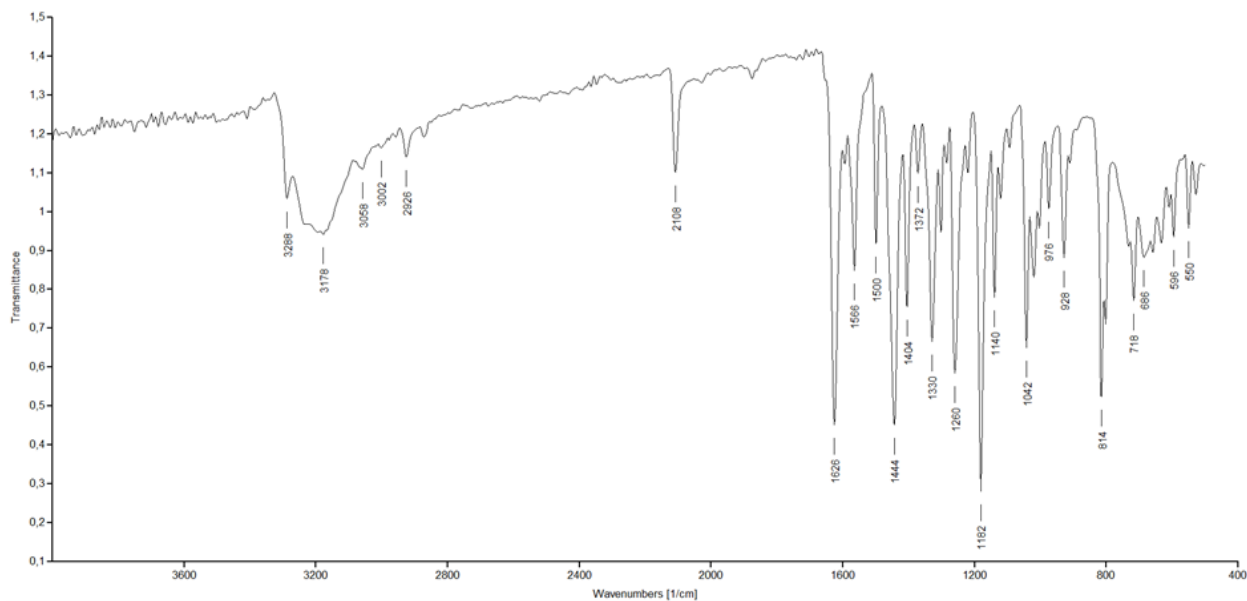
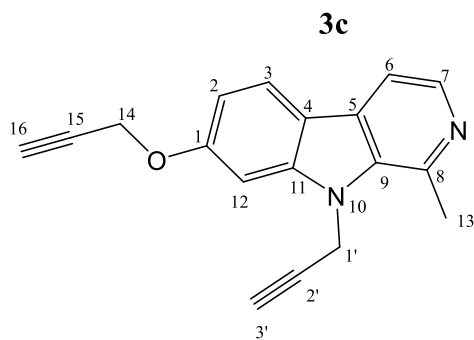


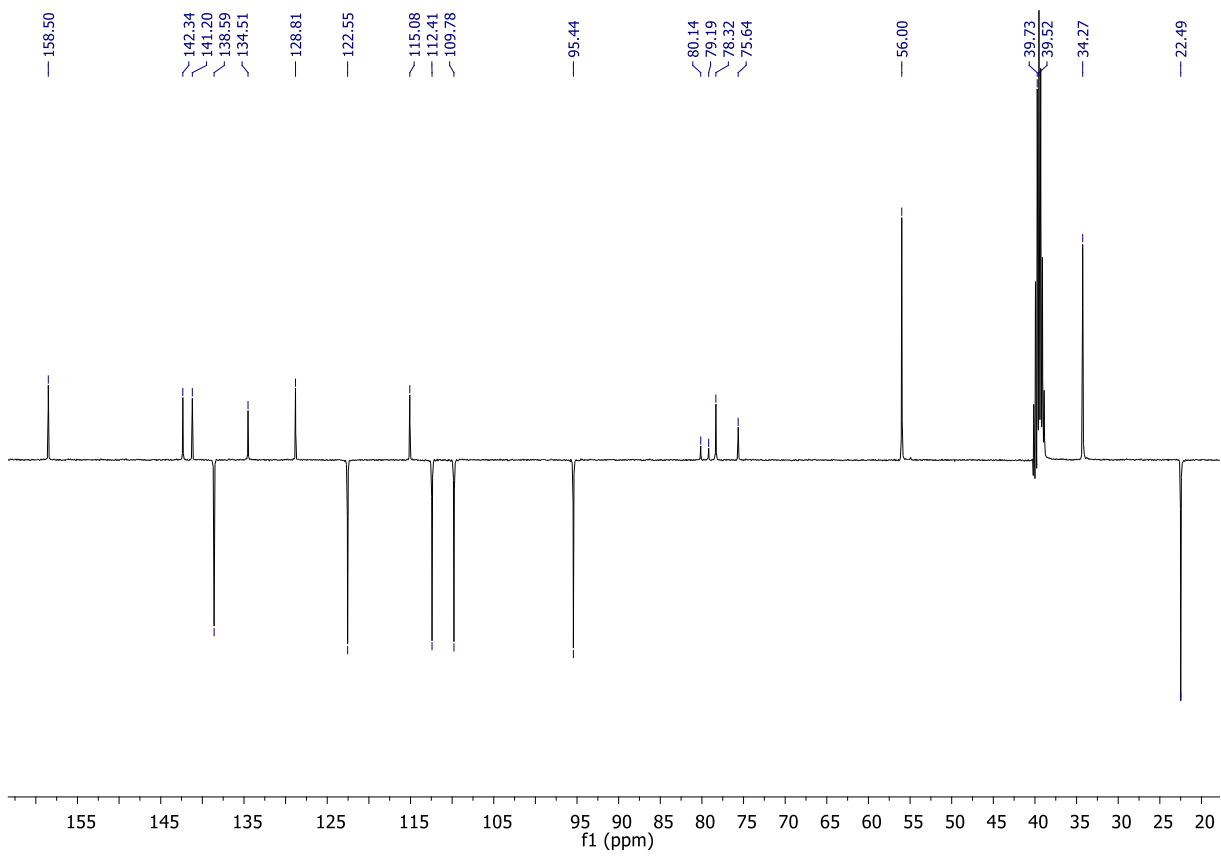
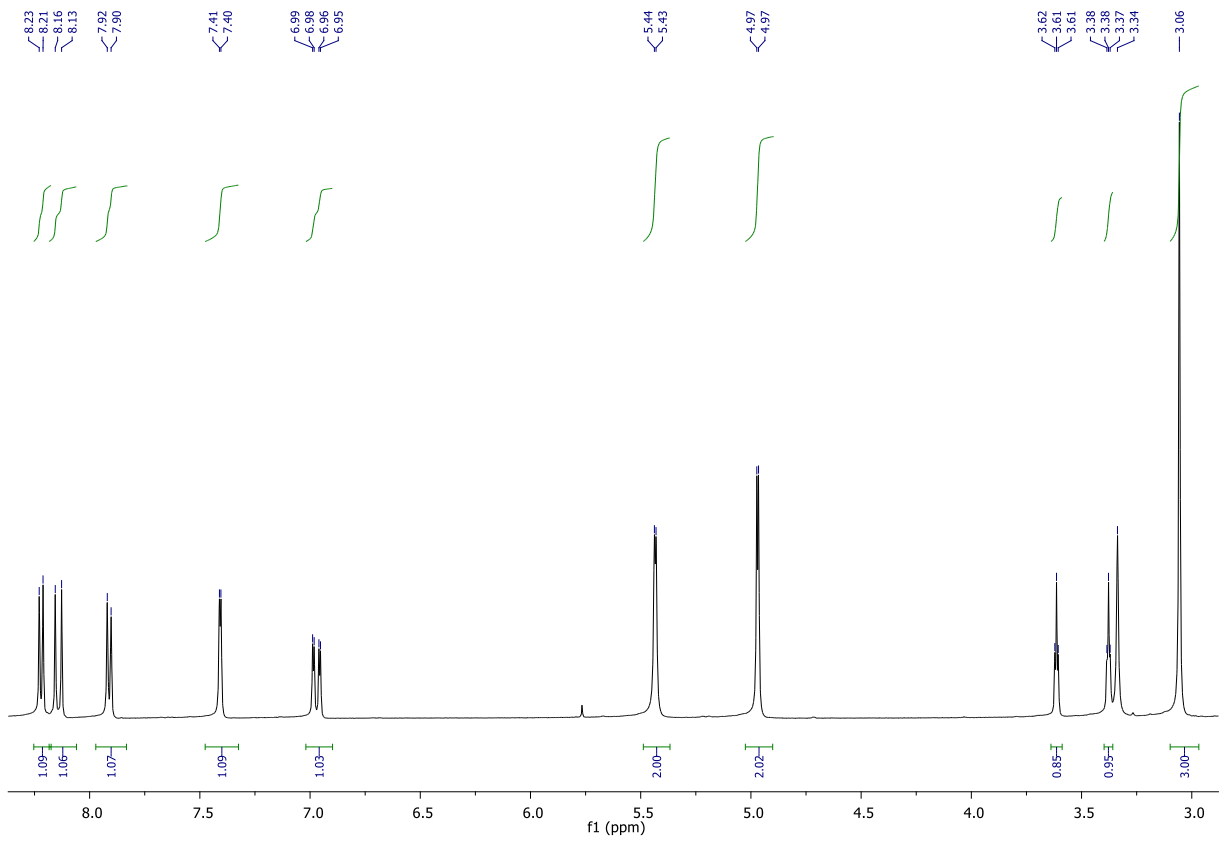


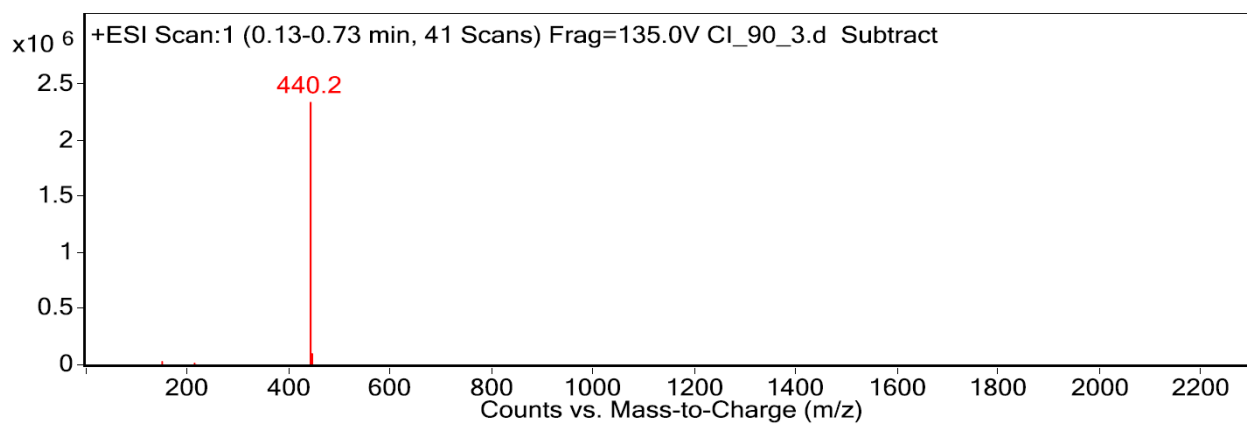
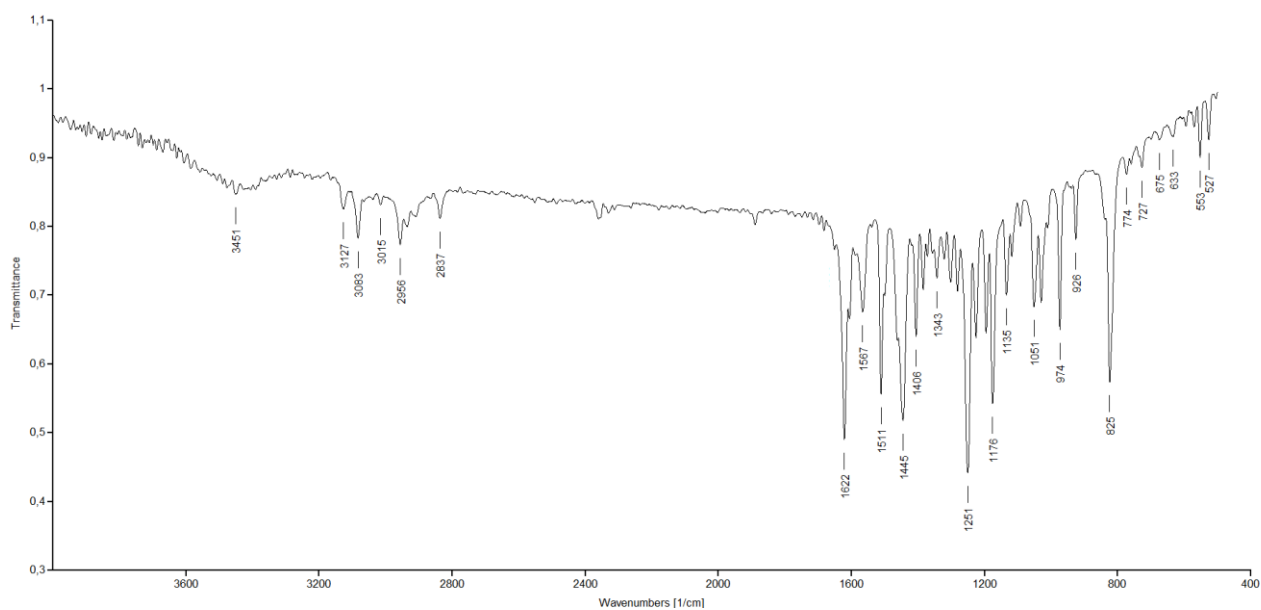
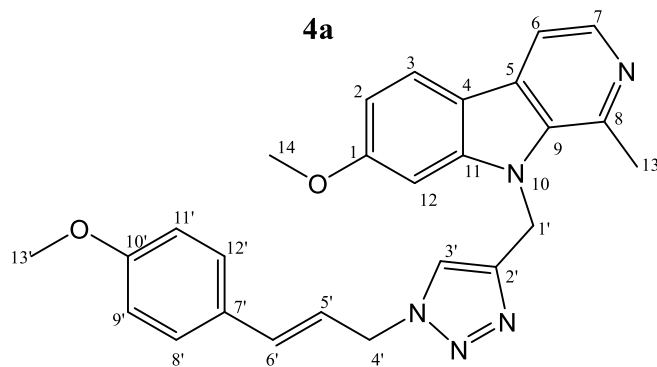
3b

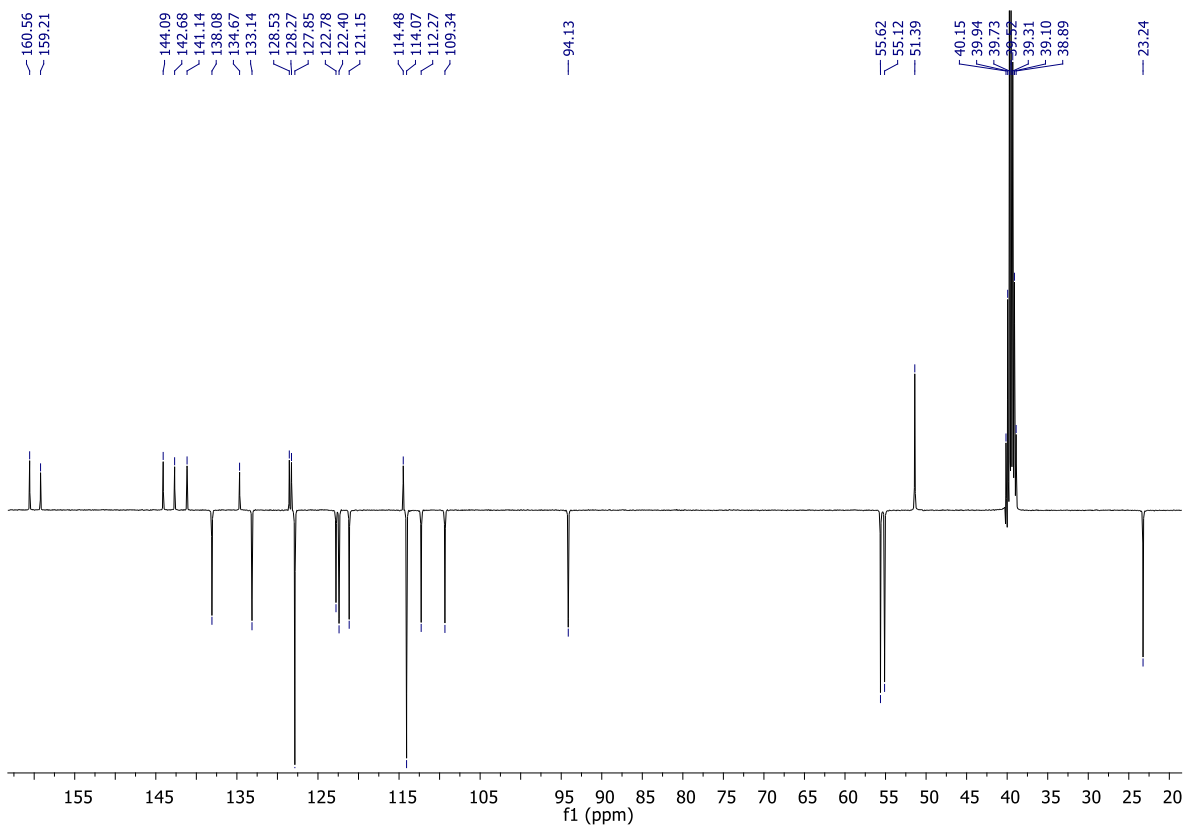
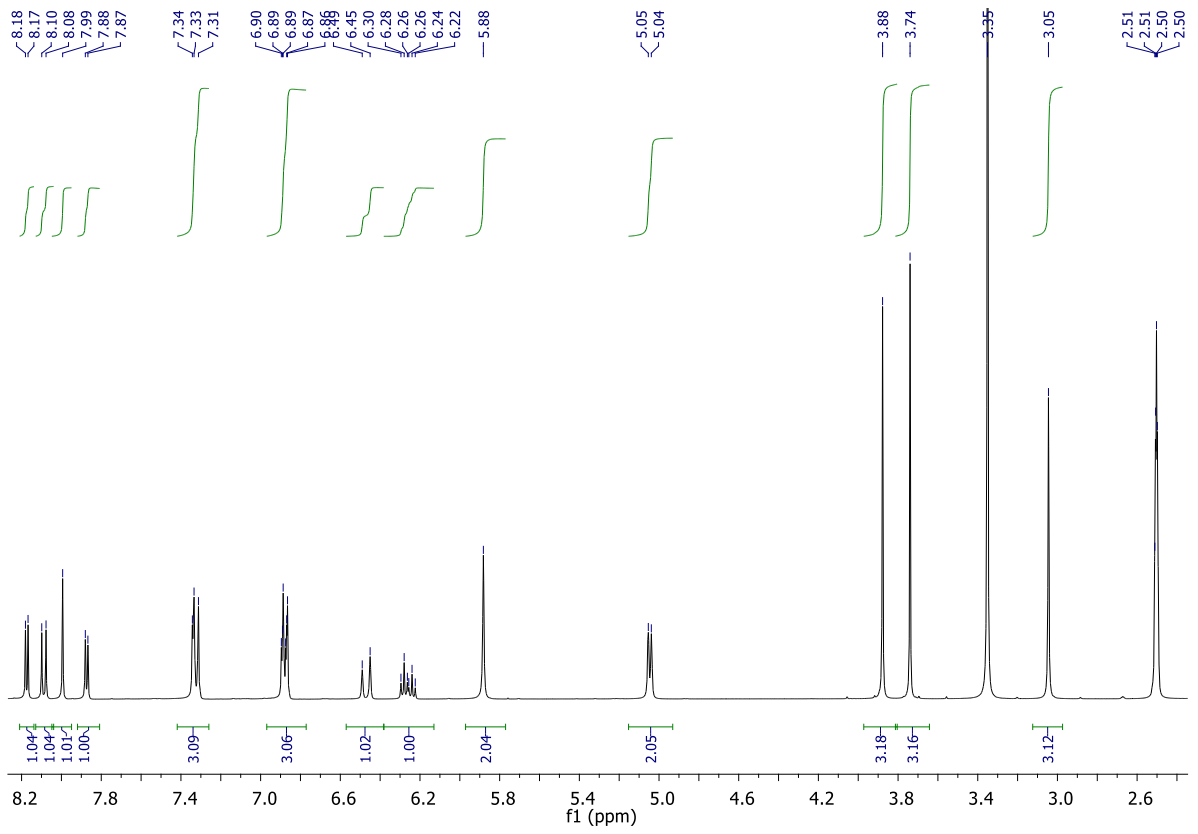


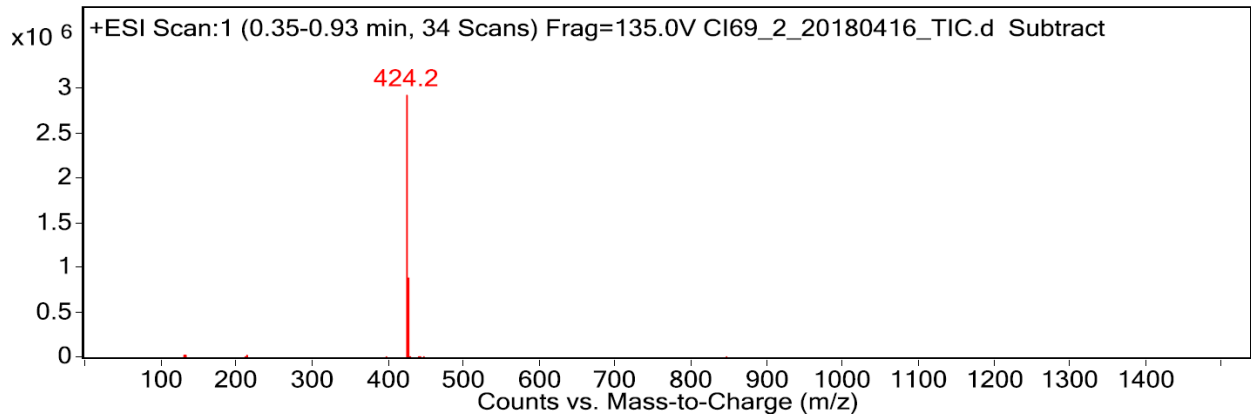
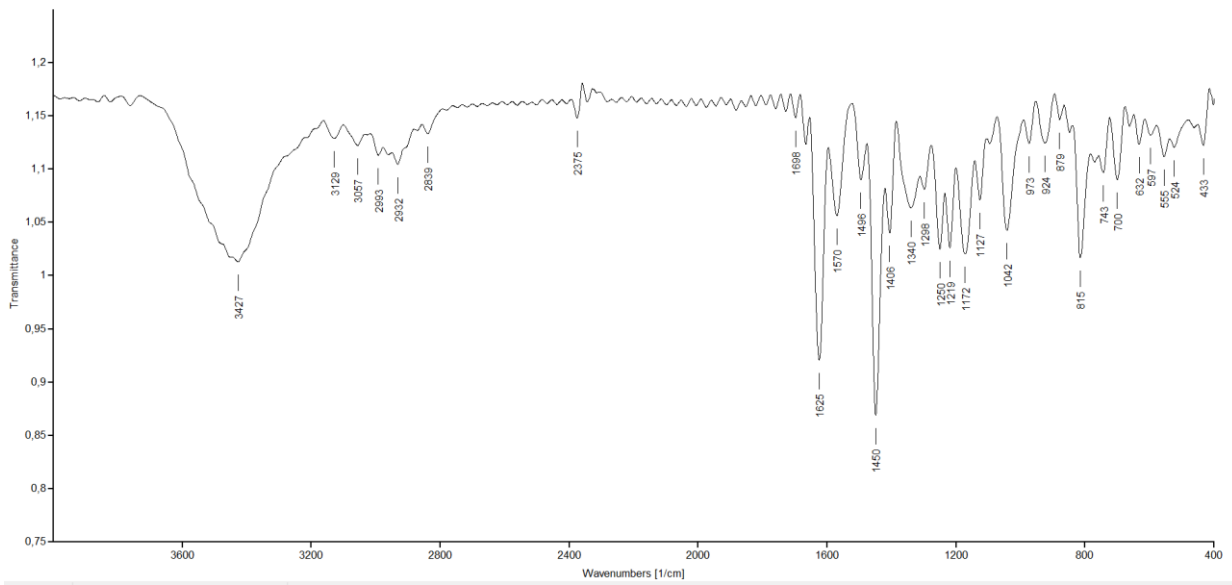
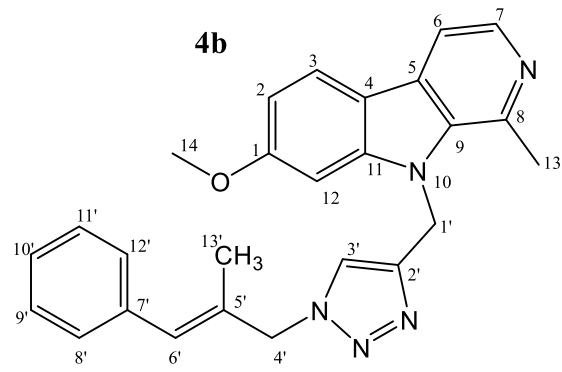


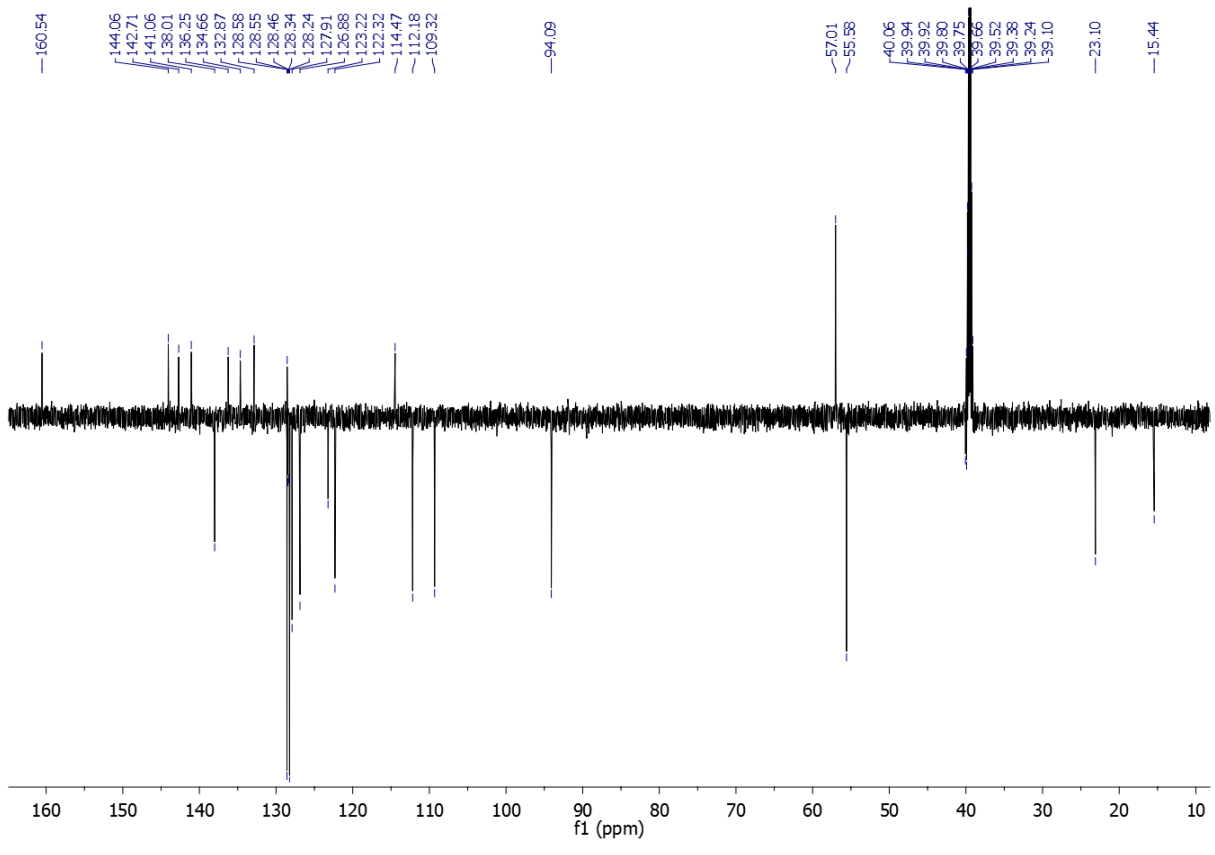
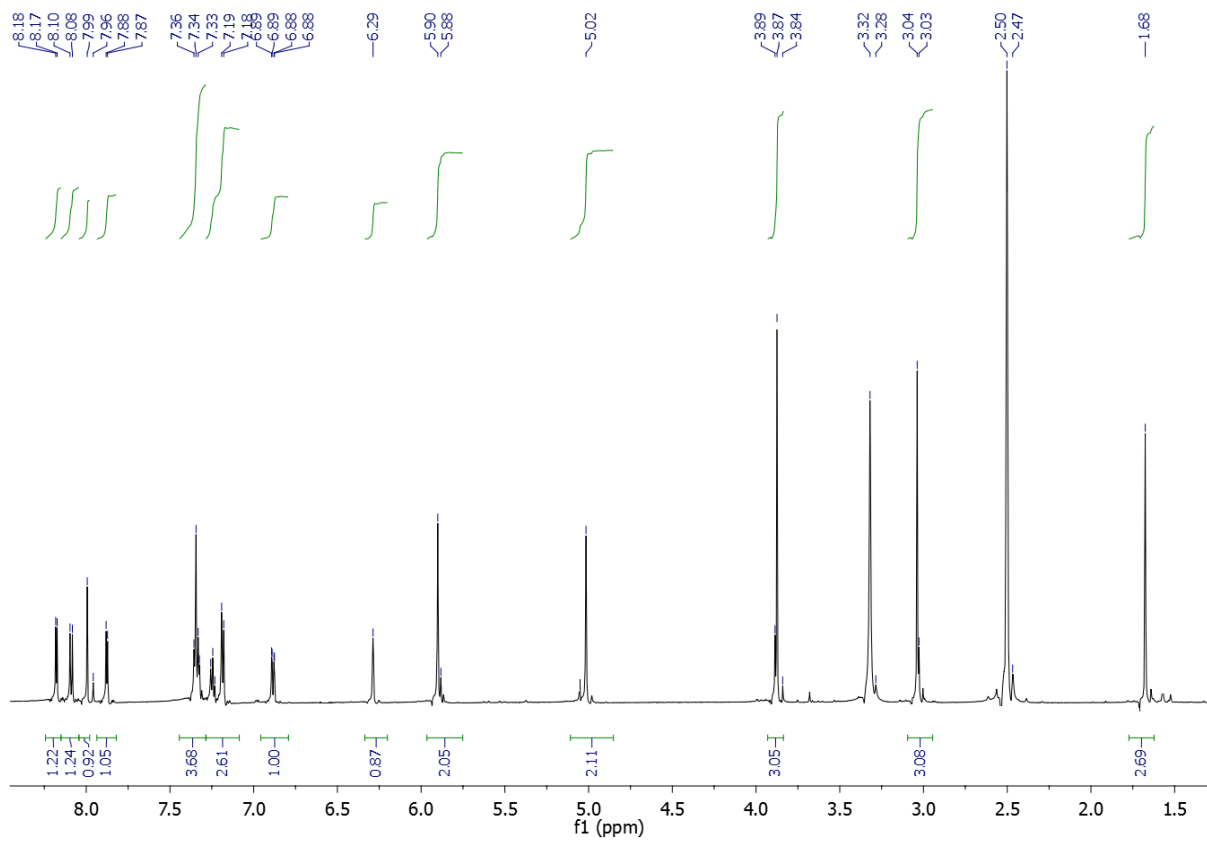


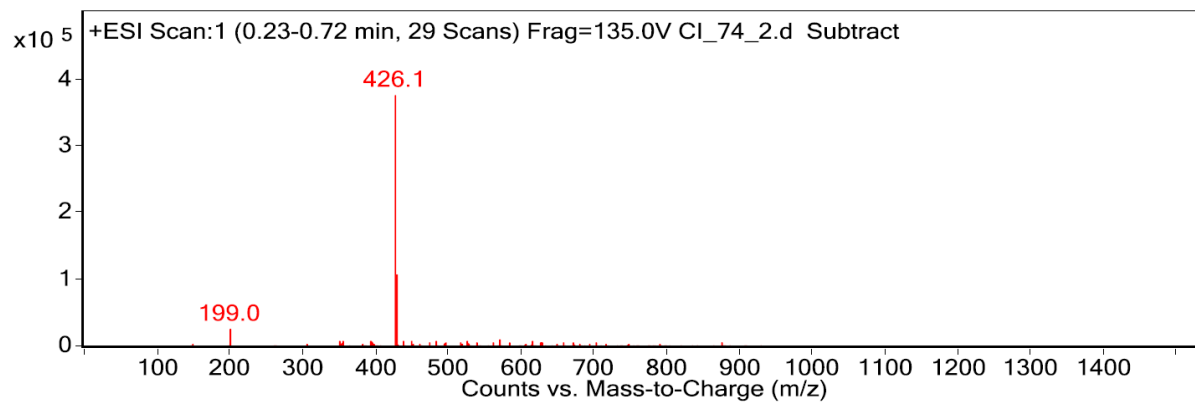
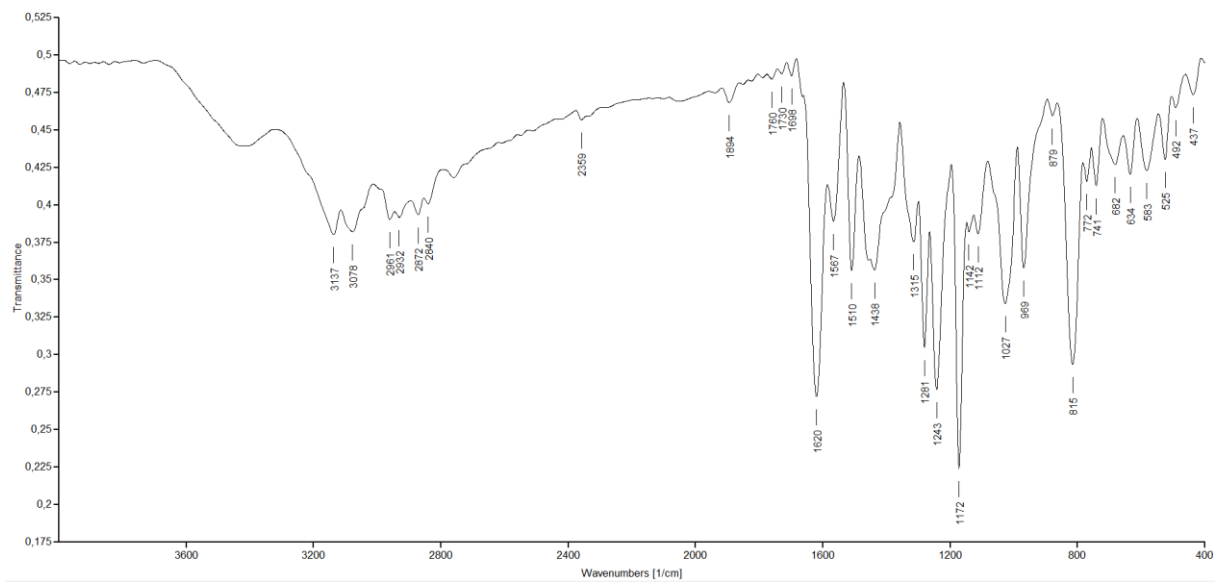
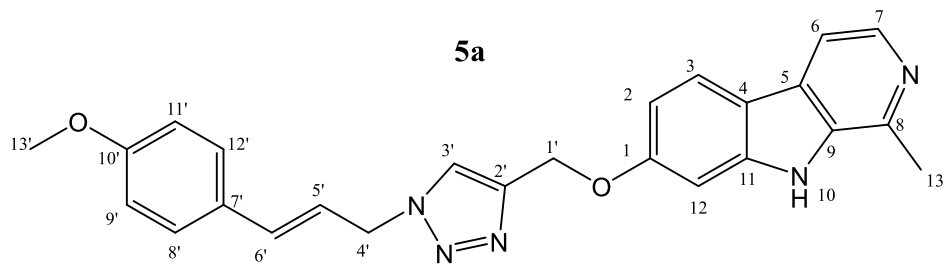


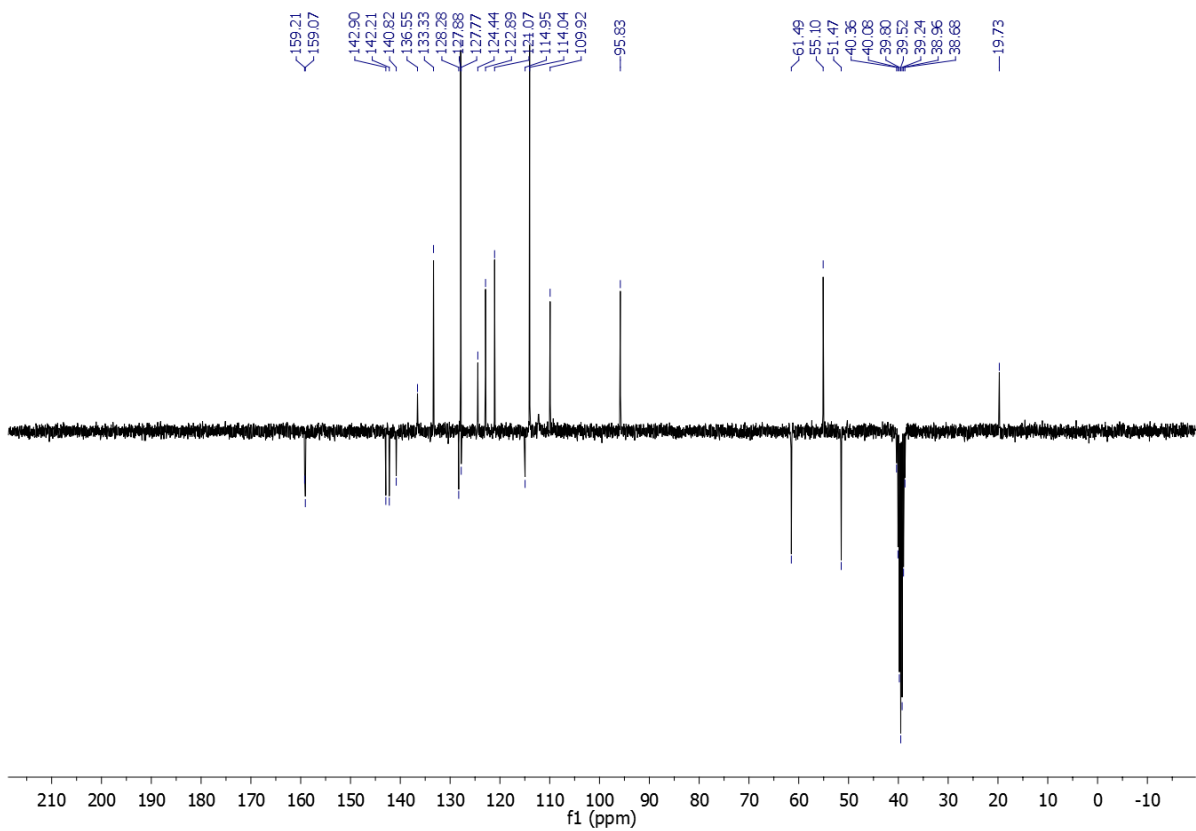
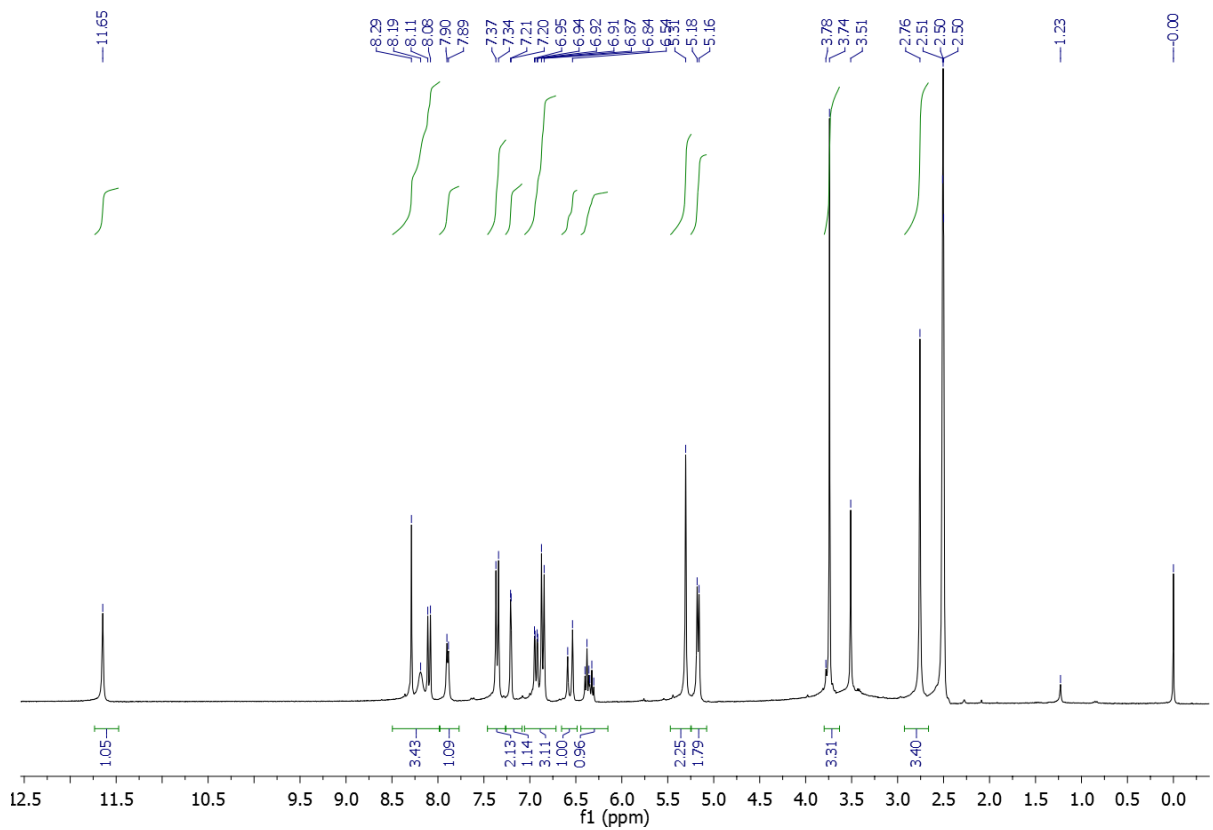


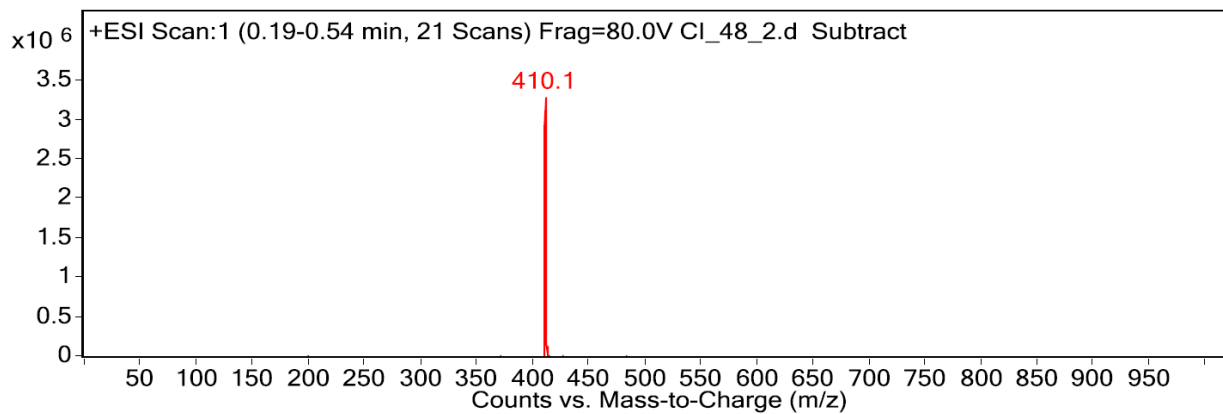
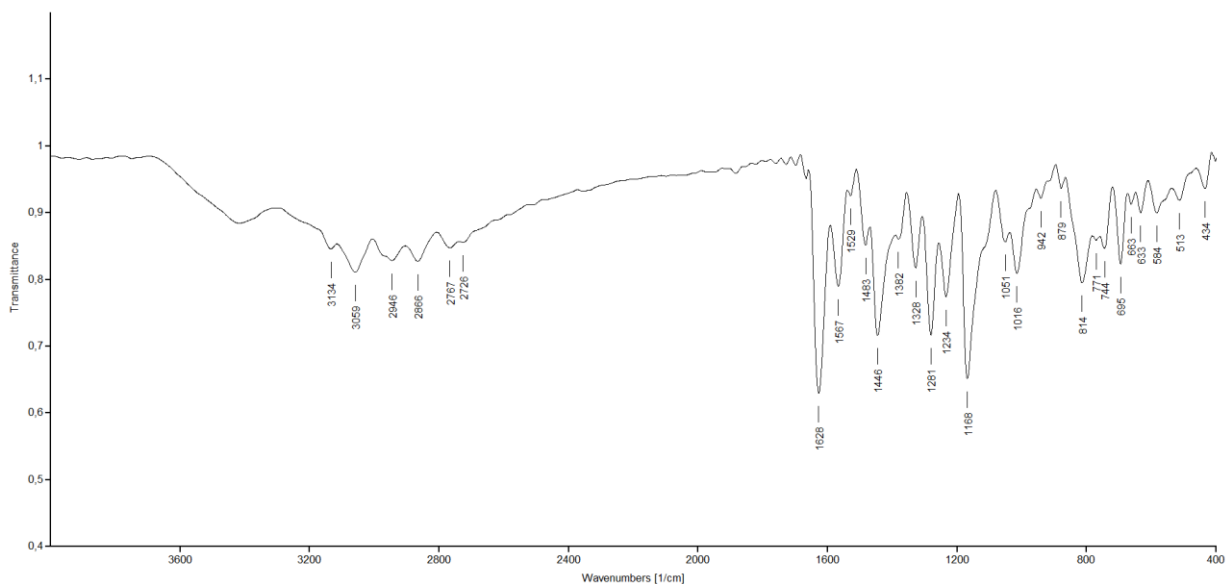
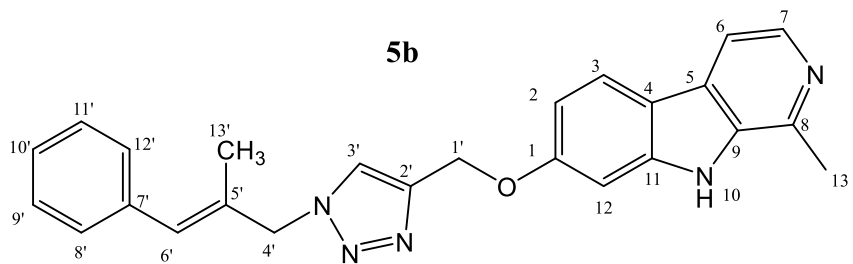


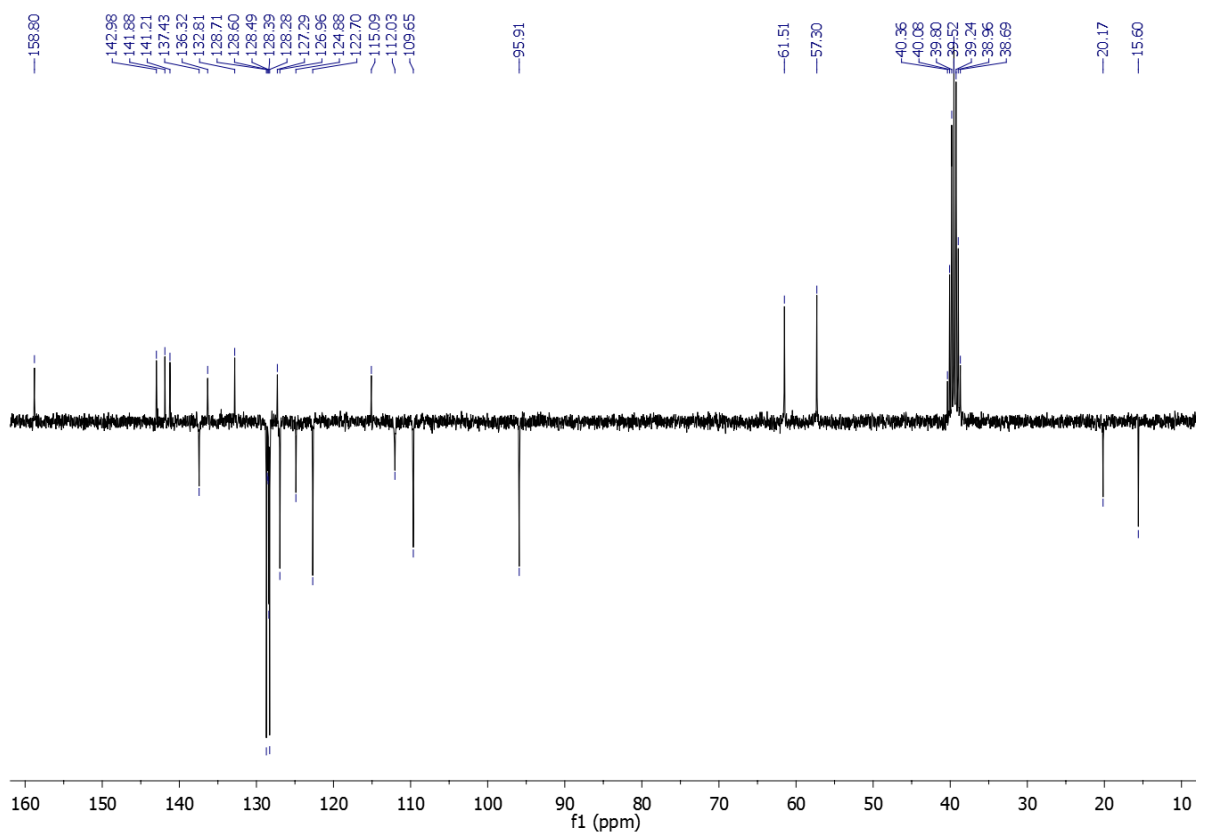
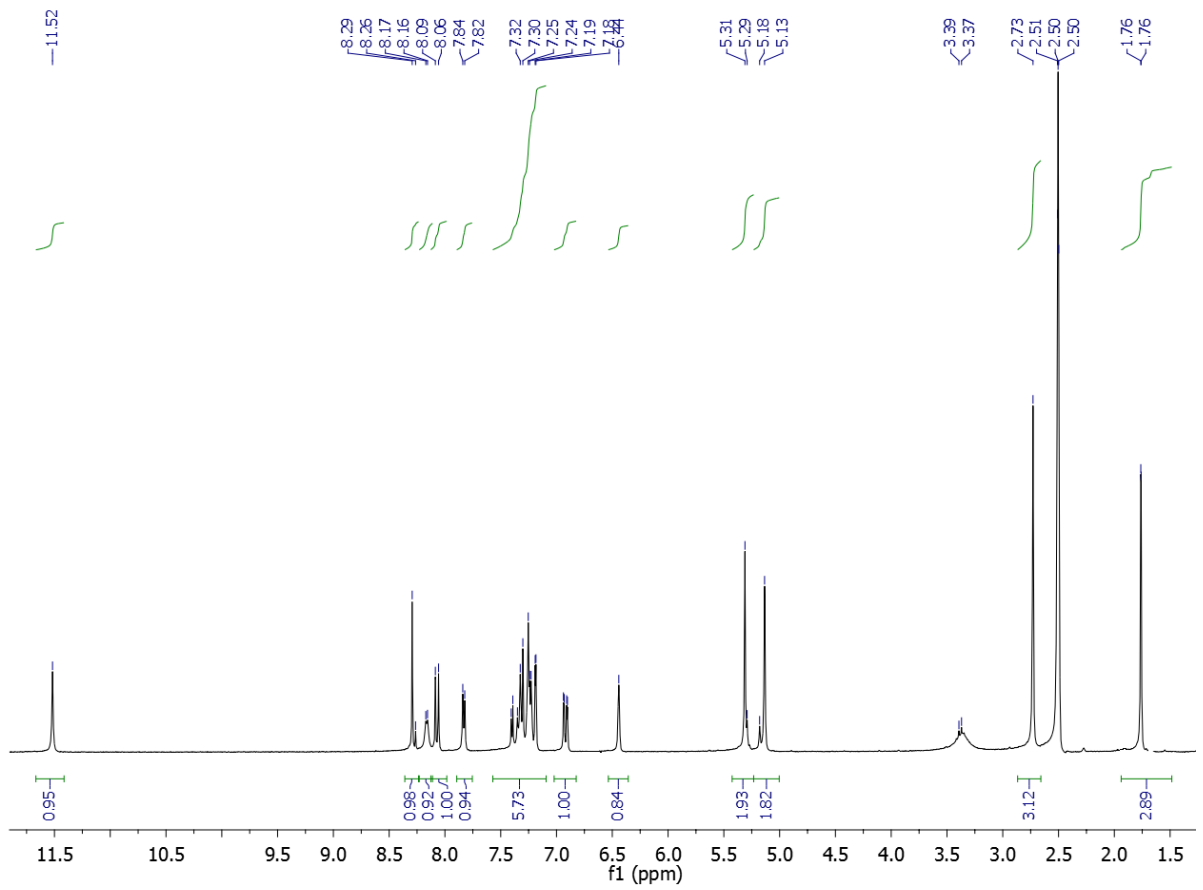


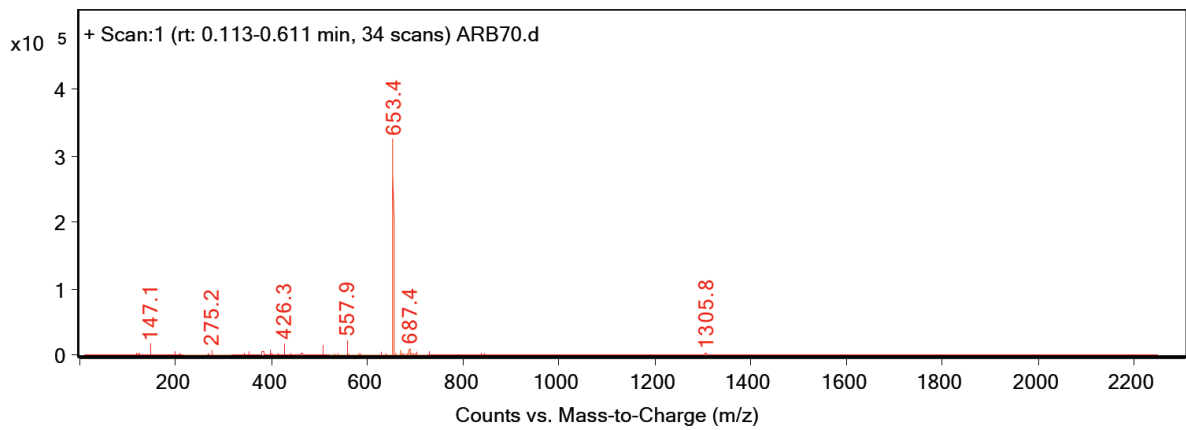
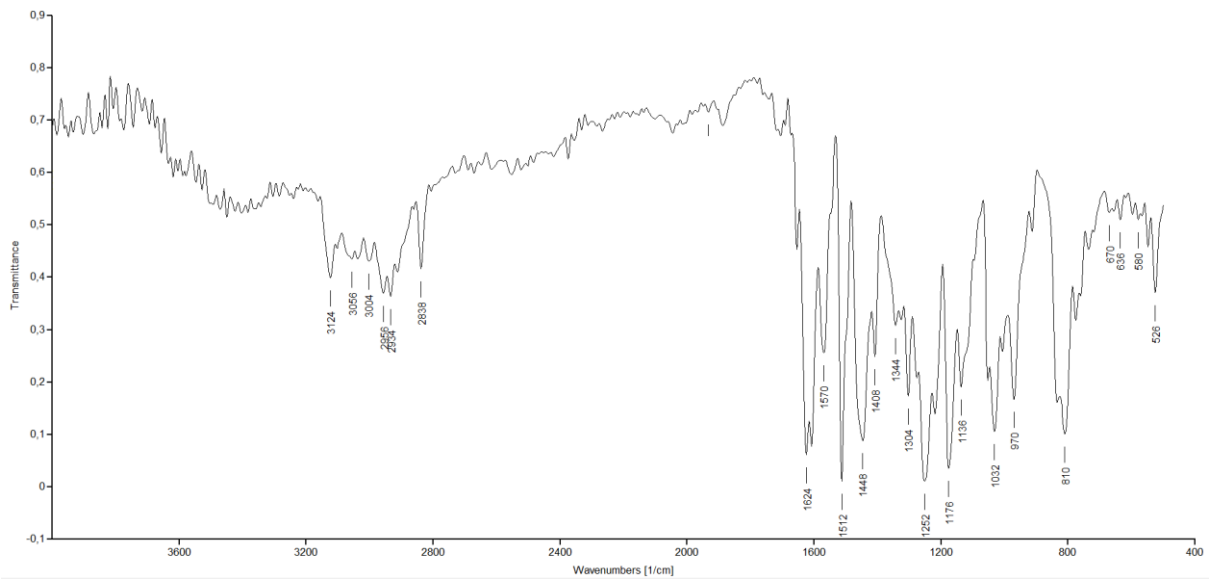
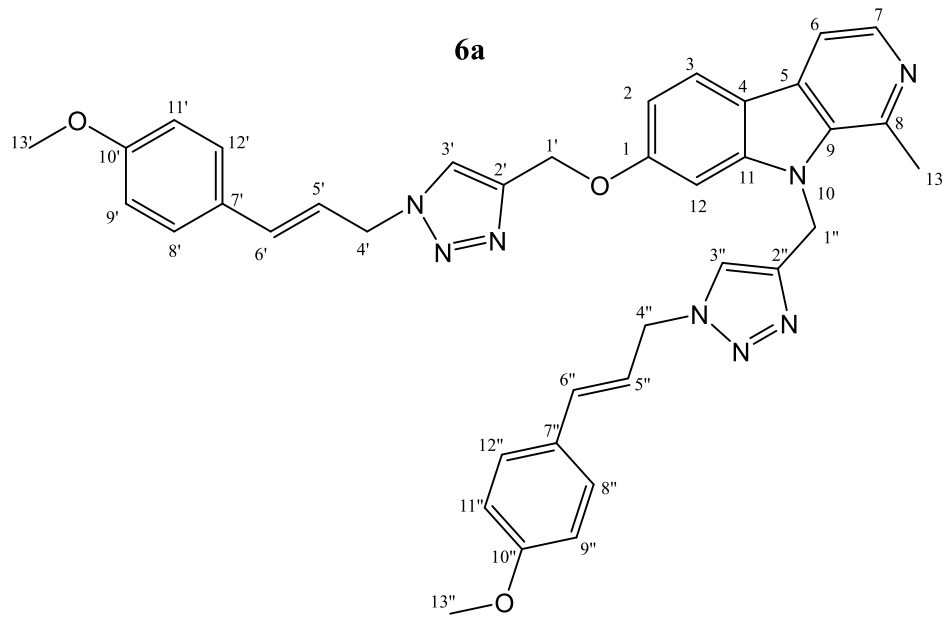


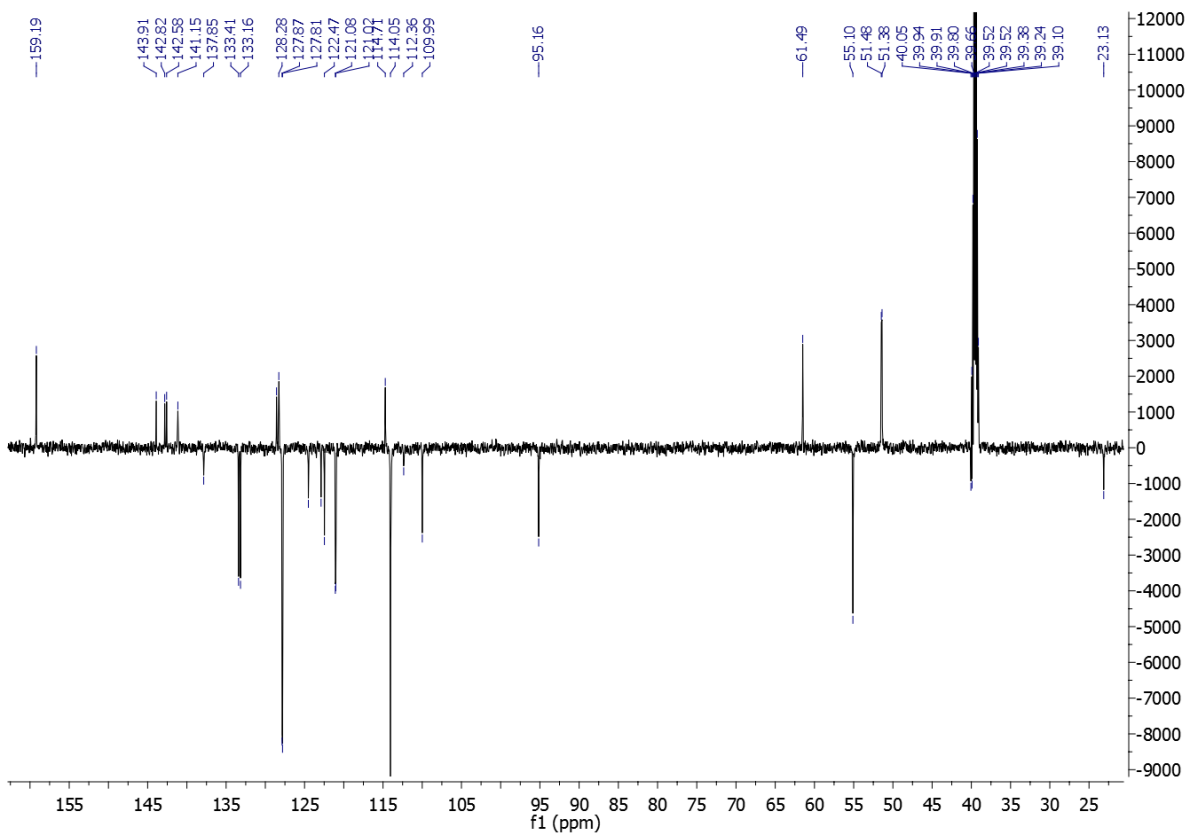
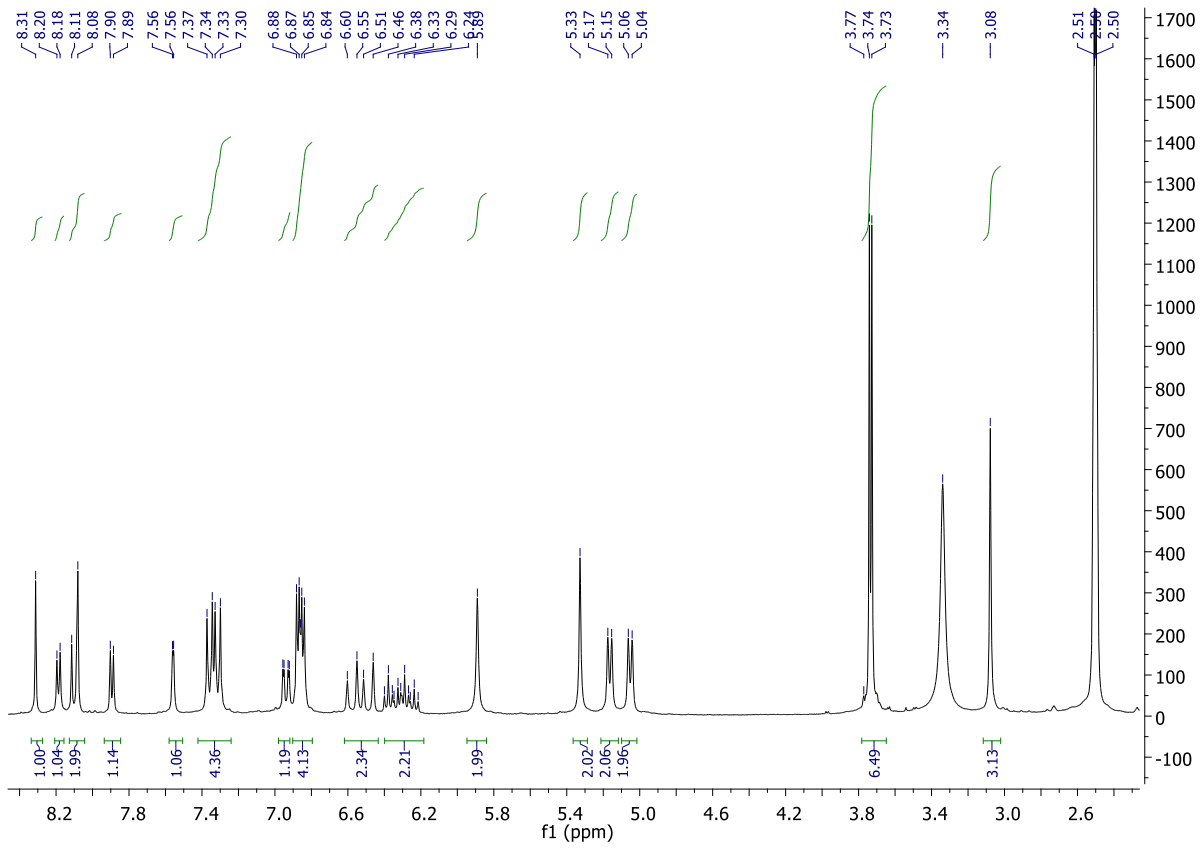


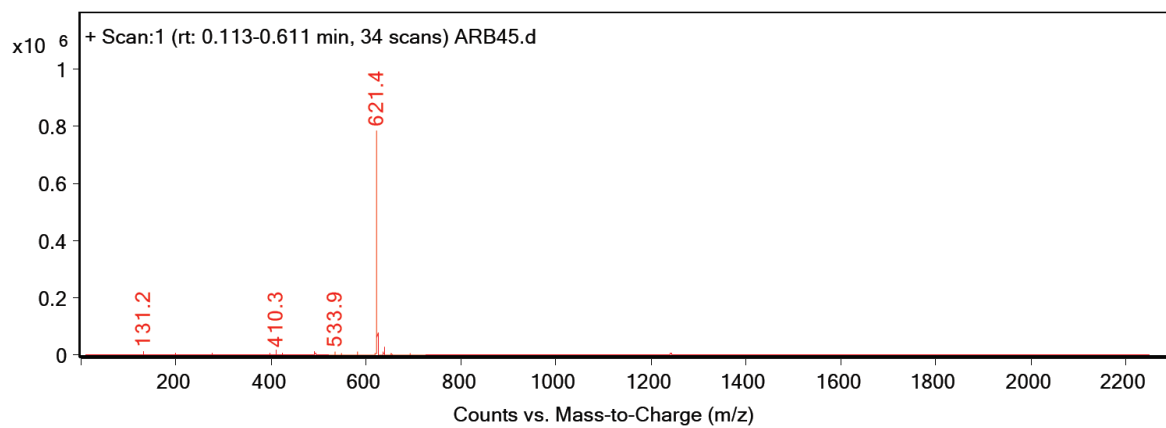
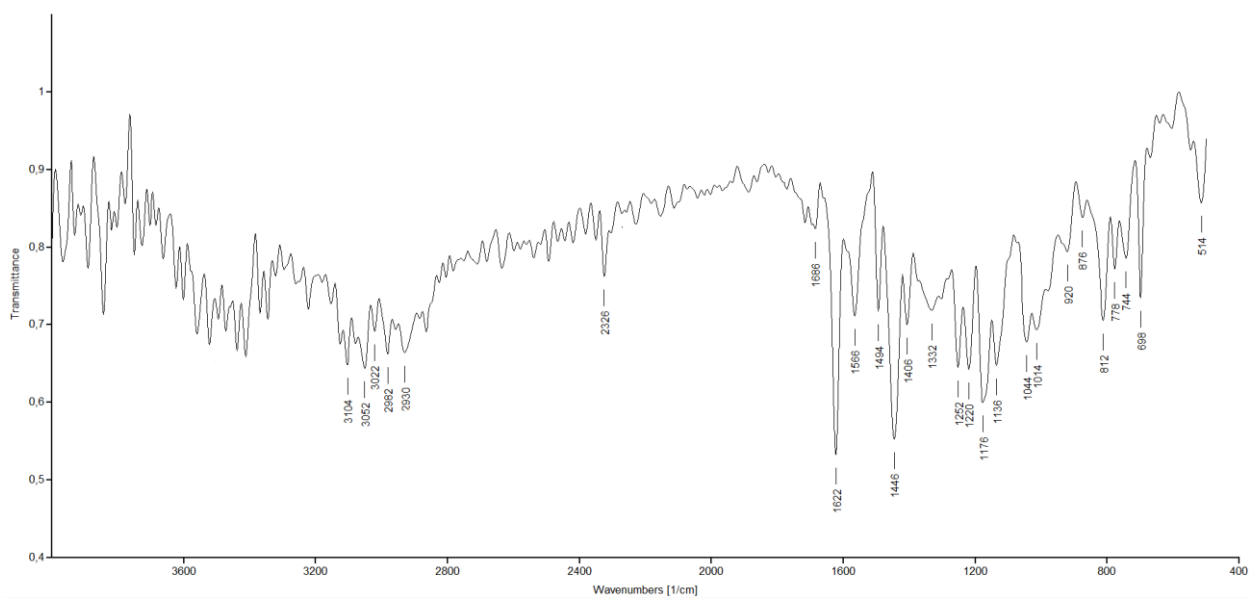
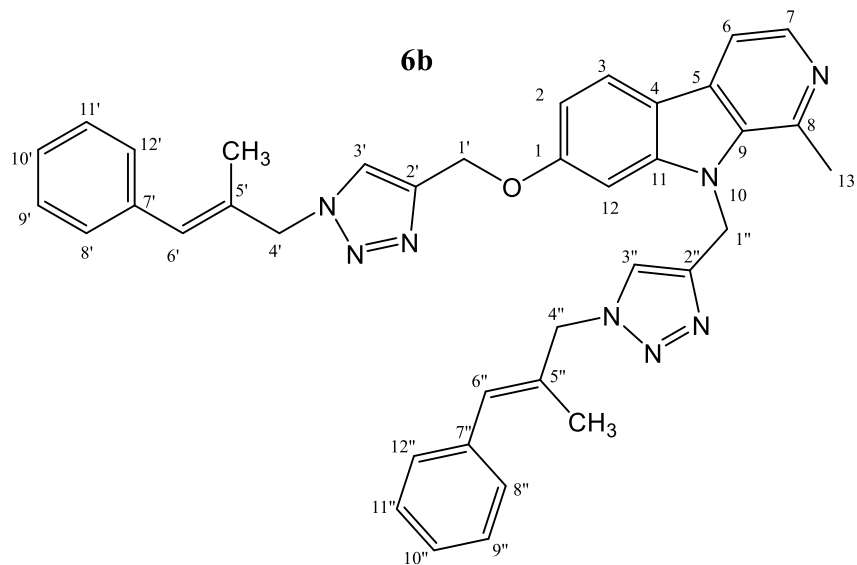


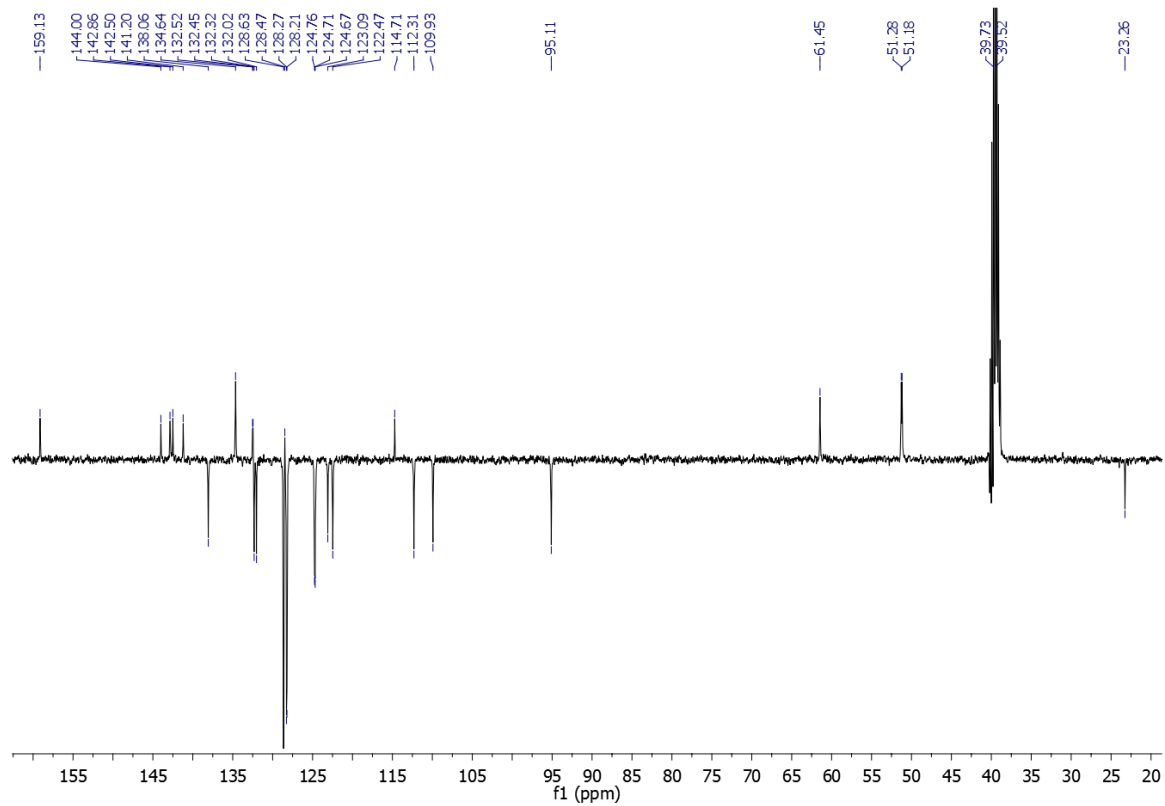
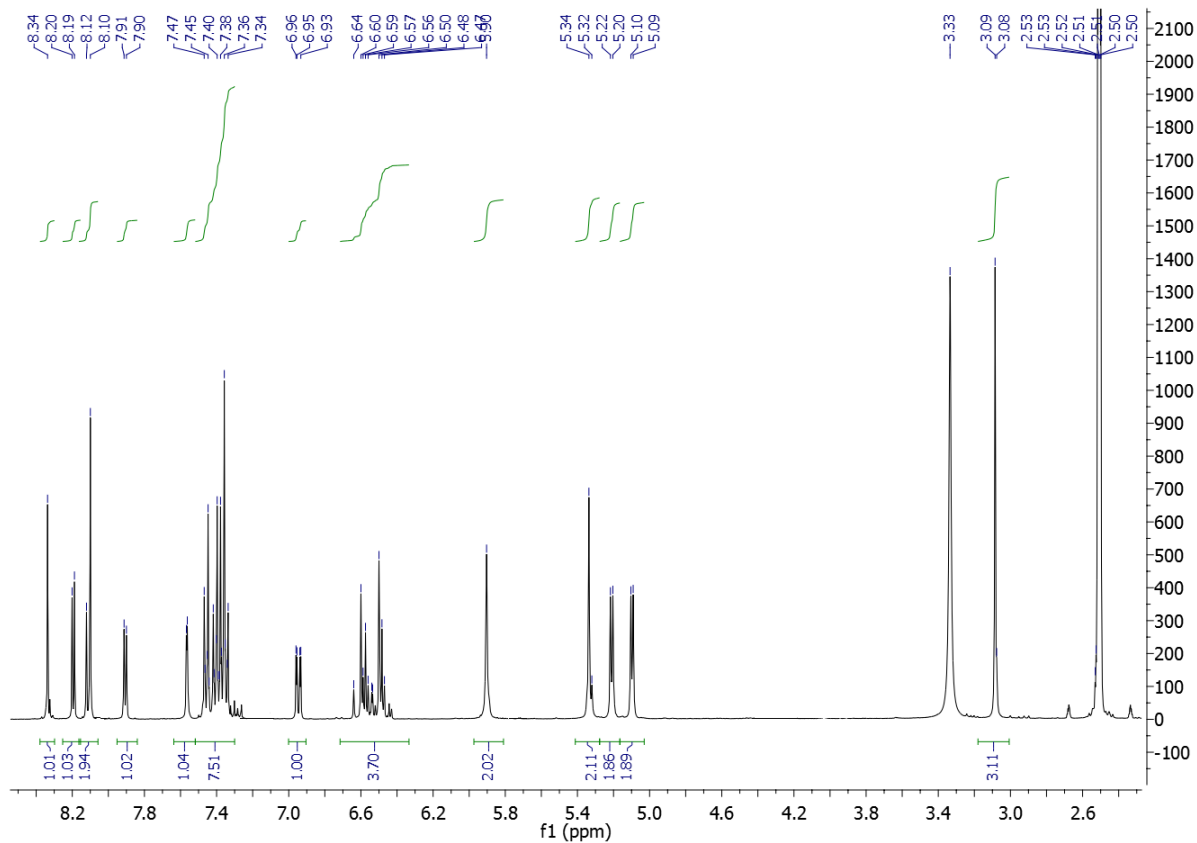












**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /
BASIC DOCUMENTATION CARD**

HARMICINI - SINTEZA I KARAKTERIZACIJA 1,2,3 - TRIAZOLSKIH DERIVATA HARMINA I CIMETNE KISELINE

Leona Beban

SAŽETAK

Ovaj diplomski rad izrađen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na Zavodu za farmaceutsku kemiju, a obuhvaća sintezu i karakterizaciju novih derivata harmina kao potencijalnih antimalarika. Cilj rada je sinteza i karakterizacija šest novih 1,2,3-triazolskih derivata harmina koji u strukturi sadrže derivate cimetne kiseline. Harmol je dobiven iz harmina postupkom hidrolize etera. Azidi **2** su dobiveni iz odgovarajućih derivata cimetne kiseline. Taj postupak uključivao je prevođenje kiseline u kiselinski klorid, zatim u ester te nakon toga redukciju u alkohol koji je potom preveden u odgovarajući azid (**2a/b**). Konačni produkti (**4-6**) sintetizirani su iz propargiliranih derivata harmina / harmola i u reakciji Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije između dobivenih alkena **3** i azida **2**.

Po završetku sinteze, ciljnim je spojevima i međuproduktima struktura utvrđena spektroskopskim metodama IR, ^1C i ^{13}C NMR i MS te su im određene temperature tališta.

Pomoću programskih alata SwissADME i Chemicalize te Lipinskijevih i Veberovih pravila utvrđeno je kako spojevi **6a** i **6b** imaju lošu oralnu biorasploživost, dok derivati **4a,b/5a,b**, uz manja odstupanja, vjerojatno imaju dobru oralnu biorasploživost.

Sintetiziranim derivatima u nastavku istraživanja bit će ispitana biološka svojstva.

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

Rad sadrži: 89 stranica, 28 grafičkih prikaza, 5 tablica i 78 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: harmin, harmol, *click* kemija, 1,2,3-triazol, cimetna kiselina, malarija.

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

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

Dr. sc. Kristina Pavić, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Dr. sc. Miranda Sertić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

HARMICINES - SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF 1,2,3 - TRIAZOLE HARMINE AND CINNAMIC ACID DERIVATIVES

Leona Beban

SUMMARY

This paper is a part of an ongoing research at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Medicinal Biochemistry, University of Zagreb and includes the synthesis and characterisation of new harmine derivatives as potential antimalarials. The aim of this diploma thesis was the synthesis and characterization of six new 1,2,3-triazole harmine derivatives. Harmol was obtained by demethylation of harmine. Azide derivatives containing cinnamic moiety were obtained in a process that included these steps: converting acid to the acid chloride, then retaining the ester, then reduction to alcohol and finally converting alcohol into corresponding azide (**2a,b**). The target compounds (**4a,b/5a,b/6a,b**) were synthesized from propargylated harmine/harmole derivatives and azides in the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition.

After the synthesis, the target products were characterized using conventional spectroscopic methods: IR, ¹H and ¹³C NMR and ESI-MS. Melting points of the compounds were also determined. Using computer tools available on web, SwissADME and Chemicalize, along with Weber and Lipinski Criteria it was predicted that the compounds **6a,b** don't have good oral bioavailability, while compounds **4a,b/5a,b** are likely to have better oral bioavailability.

Further studies will investigate antimalarial potential and biological properties of synthesised derivatives.

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

Thesis includes: 89 pages, 28 figures, 5 tables and 78 references. Original is in Croatian language.

Keywords: harmin, harmol, click chemistry, 1,2,3 – triazole, cinnamic acid, malaria.

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

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

The thesis was accepted: July 2020.

