

Sinteza i karakterizacija harmicina; novih 1,2,3-triazolskih derivata harmina i cimetine kiseline

Konjevod, Vedrana

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:163:638674>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Vedrana Konjevod

**Sinteza i karakterizacija harmicina; novih 1,2,3-
triazolskih derivata harmina i cimetine kiseline**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

Zahvaljujem se prvenstveno svojoj mentorici, doc.dr.sc. Ivani Perković, na ukazanom povjerenju i strpljenju, te prenesenom znanju i pruženoj pomoći u svim koracima izrade ovog rada. Zahvaljujem se i ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na njihovoj ljubaznosti i susretljivosti koji su moj boravak ondje učinili ugodnim i vrijednim iskustvom.

Zahvaljujem se i svojim roditeljima na pruženoj prilici studiranja i strpljenju koje su imali sa mnom kroz sve ovo vrijeme. Zahvaljujem sestri i prijateljima uz koje je sve bilo ljepše i lakše.

Posebno hvala Juri čije su me ljubav i podrška dovele do tu. AMDG

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



KRATICE

5-HT R	5-hidroksitriptaminski receptor
AChE	acetilkolinesteraza
ADMP	2-azido-1,3-dimetilimidazolin heksafluorofosfat
BGC-823	stanična linija humanog karcinoma želuca
BCRP	protein koji uzrokuje rezistenciju raka dojke na lijekove (engl. <i>Breast cancer resistance protein</i>)
BZR	benzodiazepinski receptor
CAD	derivati cimetine kiseline (engl. <i>cinnamic acid derivatives</i>)
CDK	ciklin ovisna kinaza (engl. <i>Cyclin dependent kinase</i>)
CuAAC	bakar-katalizirajuća-azid-alkin cikloadicija
DBU	1,8-diazabiciklo[5,4,0]undeka-7-en
DEAD	dietilazodikarboksilat
DIAD	diizopropilazodikarboksilat
DMF	<i>N, N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMT	<i>N, N</i> -dimetiltriptamin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DPPA	difenilfosforilazid
DYRK1A	kinaza 1A dvojne specifičnosti regulirana fosforilacijom tirozina (engl. <i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i>)
HeLa	stanična linija humanih epitelnih stanica karcinoma cerviksa
HepG2	stanična linija humanog karcinoma jetre
HPLC-MS/MS	tehnika vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске masene spektrometrije
HT-29	stanična linija humanog kolorektalnog karcinoma
IC_{50}	koncentracija koja inhibira rast 50 % stanica

INN	međunarodno nezaštićeno ime (engl. <i>International Nonproprietary Name</i>)
IR	infracrveno elektromagnetsko zračenje (engl. <i>Infra red</i>)
MAO	monoaminooksidaza
MCF-7	stanična linija humanog adenokarcinoma dojke
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MS	masena spektrometrija
MW	mikrovalni reaktor
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PAF	faktor agregacije trombocita
<i>Pf</i> ATP-aze 4	<i>Plasmodium falciparum</i> adenilpirofosfataza-4
<i>Pf</i> Dd2	<i>Plasmodium falciparum</i> Dd2 klorokin rezistentan soj
<i>Pf</i> 3D7	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 klorokin osjetljivi soj
<i>Pf</i> IspD	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat citidiltransferaza
<i>Pf</i> Hsp90	<i>Plasmodium falciparum</i> protein toplinskog šoka 90
PLA-801	stanična linija humanog karcinoma pluća nemalih stanica
PPAR γ	receptor gama aktiviran peroksizomskim proliferatorom (engl. <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
TEA	Trietilamin
TfN ₃	trifluorometansulfonilazid
THF	tetrahidrofur
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TMSN ₃	trimetilsililazid
TNF- α	faktor nekroze tumora
t_i	temperatura tališta
UV	ultraljubičasto zračenje
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. β -karbolini	1
1.1.1. Struktura i fizikalno-kemijska svojstva harmina i njegovih derivata	4
1.1.2. Harmin i njegovi derivati u prirodi	5
1.1.3. Biološko i farmakološko djelovanje harmina i njegovih derivata	7
1.1.3.1. Harmin i ostali β -karbolini	7
1.1.3.2. β -karbolinski konjugati.....	13
1.1.3.3. Antimalarijsko djelovanje harmina i derivata	16
1.2. Cimetna kiselina	18
1.2.1. Struktura i fizikalno-kemijska svojstva cimetne kiseline i njezinih derivata (CAD)	18
1.2.2. Antimalarijsko djelovanje cimetne kiseline i derivata.....	19
1.3. Organski azidi.....	21
1.3.1. Primjena organskih azida.....	21
1.3.2. Primjeri dobivanja organskih azida.....	24
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	27
3. MATERIJALI I METODE.....	29
3.1. Sinteza derivata harmina (1,2).....	30
3.1.1. Sinteza harmola (1-metil-2,9-dihidropirido[3,4-b]indol-7-ona).....	30
3.1.2. Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-b]indola (1).....	30
3.1.3. Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-b]indola (2).....	31
3.2. Sinteza etil (<i>E</i>)-3-(4-klorofenil)prop-2-enoata	32
3.3. Sinteza (4-klorofenil)metanola (4)	32
3.4. Opći postupak za sintezu CAD azida (5a,b) (Kitamura i sur., 2012).....	32
3.4.1. [(1 <i>E</i>)-3-azidoprop-1-en-1-il]benzen (5a).....	33
3.4.2. Sinteza 1-[(1 <i>E</i>)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-klorobenzena (5b).....	33
3.5. Opći postupak sinteze <i>N</i> -supstituiranih triazolskih derivata harmola i cimetne kiseline (6a,b).....	33
3.5.1. Sinteza 4-({7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-9-il} metil)-1-[(2 <i>E</i>)-3-fenilprop-2-en-1-il]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazola (6a).....	33
3.5.2. Sinteza 4-({7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-9-il} metil)-1-[(2 <i>E</i>)-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-il]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazola (6b).....	34
3.6. Opći postupak sinteze <i>O</i> -supstituiranih triazolskih derivata harmola i cimetne kiseline (7a,b).....	35

3.6.1. Sinteza 4-[(1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-7-il)oksi)metil]-1-[(2 <i>E</i>)-3-fenilprop-2-en-1-il]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazola (7a)	35
3.6.2. Sinteza 1-[(2 <i>E</i>)-3-(4-klorofenil)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 (7b).....	36
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	37
5. ZAKLJUČAK.....	51
6. LITERATURA	52
7. SAŽETAK /SUMMARY	60
8. PRILOZI.....	64
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Malarija predstavlja jedan od najizazovnijih svjetskih javnozdravstvenih problema. Prema izvješću Svjetske zdravstvene organizacije “World Malaria Report“ u 2018. godini 228 milijuna ljudi diljem svijeta je zaraženo malarijom, od kojih je 405 tisuća umrlo. Žrtve malarije su primarno djeca mlađa od 5 godina, većinom iz Subsaharske regije u Africi. Malarija je bolest koju uzrokuje parazit iz roda *Plasmodium*. Od svih pet vrsta plazmodija koje napadaju čovjeka, *Plasmodium falciparum* se smatra najvirulentnijim te je povezan s visokim stopama smrtnosti i pobola. Poteškoće u razvoju učinkovitog cijepliva protiv malarije, mutacije vektora kao i sve veće širenje rezistencije plazmodija na postojeće antimalarike ukazuju na potrebu za otkrićem novih, sigurnih i djelotvornih lijekova u kontroli malarije. Jedan od pristupa u razvoju novih lijekova je modifikacija strukture prirodnih produkata s izraženom biološkom aktivnosti u svrhu poboljšanja njihovog djelovanja.

1.1. β -karbolini

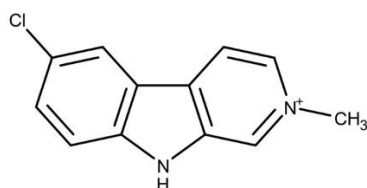
β -karbolini pripadaju skupini prirodnih i sintetskih, strukturno sličnih indolskih alkaloida, dobivenih biosintezom izvedeni iz L-triptofana, prekursora serotonina. Sadržavaju piridinski prsten uklopljen u indolski kostur uz različite stupnjeve nezasićenosti (dihidro, tetrahidro, aromatski β -karbolini) pri čemu piridinski dušik karakterizira bazičniji karakter u odnosu na kiseliji indolski dušik. Ovisno o pH i otapalu, β -karbolini postoje u četiri forme: kation, neutralna forma, zwitterion, anion (Slika 1.).



Slika 1. Opće strukturne formule β -karbolina

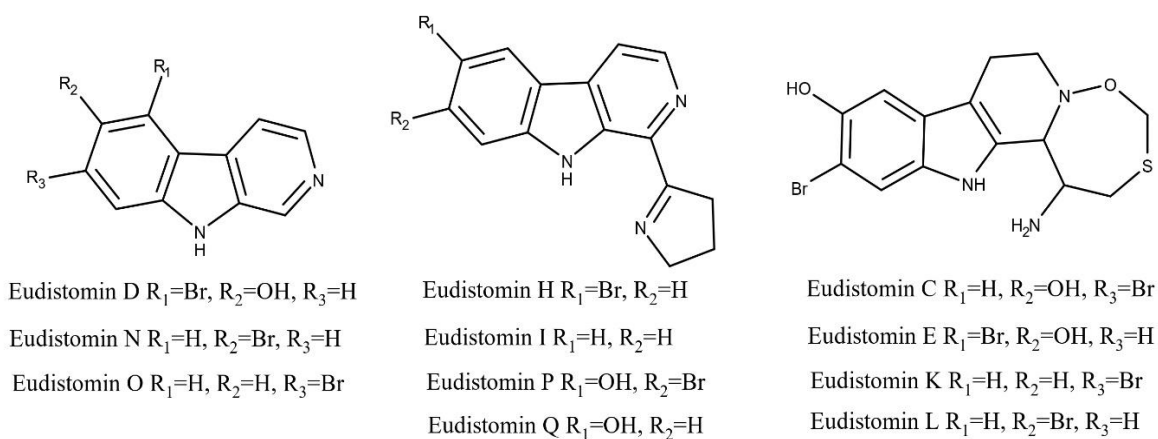
Iako su ovi alkaloidi dosta zastupljeni u kopnenim vrstama, poput biljke ljubičaste pasiflore (*Passiflora incarnata*, *Pasifloraceae*) i nekih vrsta škorpiona, velika grupa β -karbolina je izolirana iz morskih beskralježnjaka spužvi, mekih koralja, plaštenjaka, mahovnjaka i žarnjaka. Iz cijanobakterije *Nostoc* 78-12A je izoliran alkaloid nostokarbolin

zanimljiv zbog svojeg antimalarijskog učinka (Slika 2.) (Bonazzi i sur., 2009; Becher i sur., 2005).



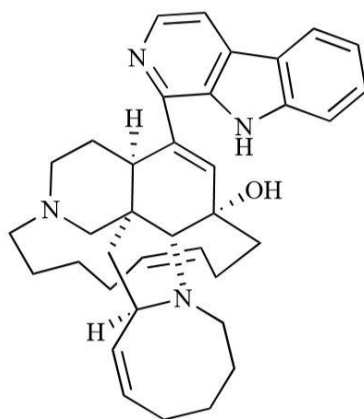
Slika 2. Strukturna formula nostokarbolina

Iz potkoljena plaštenjaka, izdvaja se rod *Eudistoma*, iz čijih su pripadnika izolirani brojni bioaktivni β -karbolinski derivati karakteristični po prisutnosti oksatiazepinskog prstena, 3,4-dihidropirola ili atoma broma u svojim strukturama poznati pod nazivom *eudistomini* (Slika 3.) (Cao i sur., 2007).



Slika 3. Strukturne formule eudistomina

Manzamani su strukturno kompleksniji alkaloidi iz određenih vrsta morskih spužvi, u kojima je β -karbolinski dio povezan s pentacikličkim diaminskim prstenom kojemu je okosnica pirolo[2,3-a]izokinolin. Ti su prirodni spojevi pokazali antitumorsko, antimalarijsko, tuberkulostatsko i antileishmanijsko djelovanje (Slika 4.) (Rao i sur., 2003).



Slika 4. Strukturna formula manzamina A

Kako su β -karbolini često prisutni u namirnicama, njihov važan izvor je prehrana (Cao i sur., 2007), iako je poznato da se u manjoj mjeri stvaraju i endogeno u organizmu sisavaca, poput pinolina (McIsaac i sur., 1961). Tako je kod biljaka i sisavaca poznata Pictet-Spenglerova reakcija kondenzacije između indolalkilamina, poput triptofana i njegovih derivata, i aldehida kojom se dobivaju tetrahidro- β -karbolini. U novije vrijeme, njihova antimikrobna, antiparazitska, antitumorska i antivirusna svojstva su od većeg interesa u odnosu na njihovo definirano djelovanje na CNS (Badal i sur., ured., 2017).

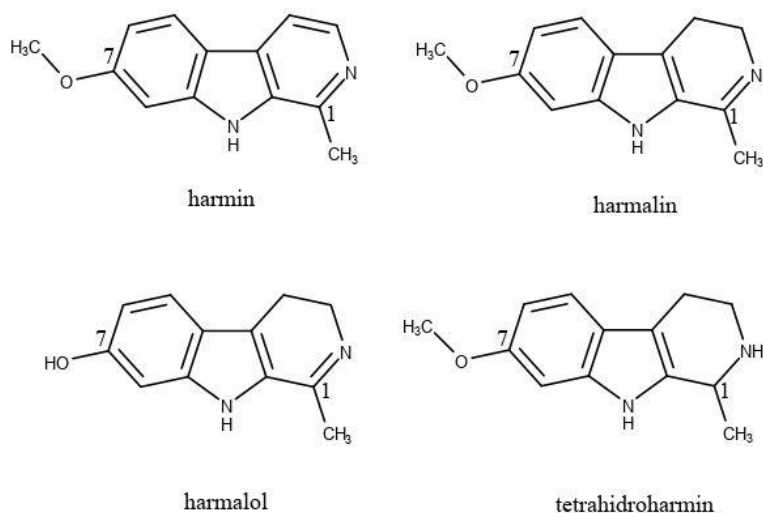


Slika 5. Rod morskih škverica, M. Caullery (*Eudistoma* sp., *Polycitoridae*) (preuzeto s <https://inaturalist.nz/taxa/131618-Eudistoma>)



Slika 6. Ljubičasta pasiflora C. Linnaeus (*Passiflora incarnata*, *Passifloraceae*) (preuzeto s <https://inaturalist.nz/taxa/502611-Passiflora-incarnata---cincinnata>)

1.1.1. Struktura i fizikalno-kemijska svojstva harmina i njegovih derivata



Slika 7. Strukturne formule harmina i njegovih derivata

Harmin, poznat kao telepatin i banisterin, pripada posebnoj skupini fluorescirajućih β -karbolina slične kemijske strukture poznatoj pod nazivom *harmala alkaloidi*. Uz harmin, poznatiji pripadnici skupine su: harmalin, harmalol, te tetrahydroharmin (Slika 7.). Karakterizira ih prisutnost metilnog supstituenta na C-1 atomu piridinskog prstena, prisutnost metoksi ili hidroksilne skupine na benzenskoj jezgri (C-7) te različiti stupnjevi zasićenosti piridinskog prstena. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva *harmala alkaloida* dana su u Tablici 1.

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva harmina i odabranih derivata

	Harmin	Harmalin	Harmalol	Tetrahidroharmin
Molekulska formula	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O
Relativna molekulska masa	212,25	214,26	200,24	216,28
Talište/°C	264-265	250-251	211-212	199
Log <i>P</i>	1,54	1,35	1,03	1,3
p <i>K</i> _a	13,54	14,95	9,53	18,03

1.1.2. Harmin i njegovi derivati u prirodi

Harmin je, uz ostale *harmala alkaloide*, značajnije prisutan u sjemenkama sirijske rutvice (*Peganum harmala*, *Nitrariaceae*), biljke s Bliskog Istoka tradicionalno korištene kao emenagog, laktagog, abortiv, purgativ i antimalarik, te u listovima, stabljici i kori južnoameričke liane *Banisteriopsis caapi* (Badal i sur., ured., 2017; Cao i sur., 2007, Chen i sur., 2004). Obje biljke se koriste zbog svojih psihoaktivnih učinaka.

Sirijska rutvica je višegodišnja samonikla i grmolika biljka koja raste u uvjetima bez puno oborina, poput stepa i pjeskovitih područja, karakterističnih za istočnu mediteransku i iransku regiju, Sjevernu Afriku, Bliski Istok i zapadni dio SAD-a. Visine je od 0,3 do 0,8 m s kratkim žiličastim korijenjem, bijelim cvijetovima i okruglim perikarpom koji nosi više od 50 sjemenki. Biljka je dobro poznata u Iranu, te je široko rasprostranjena i korištena u medicinske svrhe u Centralnoj Aziji, Sjevernoj Africi i Srednjem Istoku. Analitičke studije kemijskog sastava biljke ukazuju da su njezini najvažniji konstituenti alkaloidi β-karbolinskog tipa poput harmalola, harmalina i harmina koji su u biljci prisutni u koncentracijskom rasponu od 2 do 7% (Moloudizargari i sur., 2013).



Slika 8. Sjemenke sirijske rutvice, C. Linnaeus (*Peganum harmala*, *Nitrariaceae*) (preuzeto s https://en.wikipedia.org/wiki/Peganum_harmala#/media/File:Peganum-harmala-seeds.jpg)

B.caapi je južnoamerička halucinogena penjačica iz porodice *Malpighiaceae* dobro poznata kao glavni sastojak napitka *ayahuasca*. Taj psihodelični napitak tradicionalno koriste različite etničke skupine u ritualne, medicinske i rekreacijske svrhe. Glavne komponente prisutne u *B.caapi* su β -karbolini (0,05-1,95 % suhe mase): harmin, harmalin i tetrahidroharmin (Gibbons i sur., 2013).



Slika 9. Dušna loza, Morton (*Banisteriopsis caapi*, *Malpighiaceae*) (preuzeto s <https://inaturalist.nz/taxa/327802-Banisteriopsis-caapi>)

B. caapi se u *ayahuasci* tradicionalno koristi s biljkama poput broćevke chacrone (*Psychotria viridis*), koje sadržavaju *N,N*-dimetiltriptamin (DMT); derivat i strukturni analog triptamina s izraženim psihodeličnim učinkom. Uzet *per os*, DMT podliježe deaminaciji perifernim monoamino-oksidadama čime se inaktivira. Ako se konzumira *per os* uz inhibitore monoamino-oksidade poput harmina ili harmalina, DMT zadržava jaki psihodelični učinak (McKenna i sur., 1984).

Od ostalih sporednih prirodnih izvora harmina, zabilježeno je još tridesetak biljnih i životinjskih vrsta, uključujući neke vrste leptira iz porodice *Nymphalidae*, duhan, marakuju i matičnjak.

1.1.3. Biološko i farmakološko djelovanje harmina i njegovih derivata

Harmin i derivati imaju izrazito široki farmakološki profil. U literaturi je opisano njihovo antimikrobno, antimalarijsko, antihipertenzivno, vazorelaksirajuće, tuberkulostatsko, antioksidativno, osteoprotektivno, antidijabetičko, antitumorsko, antiproliferativno, antidepresivno, halucinogeno, antivirusno, protuupalno, anksiogeno, antiangiogeno, sedirajuće, agitirajuće, hipotermijsko, prokonvulzivno, antikonvulzivno, antitrombotsko, analgetsko i citotoksično djelovanje (Moloudizargari i sur., 2013; Patel i sur., 2012; Cao i sur., 2007).

1.1.3.1. Harmin i ostali β -karbolini

Interakcija s 5-HT receptorima, BZR, imidazolinskim receptorima, opioidnim te dopaminergičkim receptorima djelomice je odgovorna za brojne neurofarmakološke učinke β -karbolina poput sedirajućeg, antikonvulzivnog, prokonvulzivnog ili halucinogenog djelovanja.

U nekontroliranim kliničkim uvjetima, dokazano je da harmin i harmalin djeluju halucinogeno kod ljudi, prvi od kojih postiže učinak u dozi od 200 mg isključivo nakon *i.v.* primjene, a potonji u dozi većoj od 1 mg/kg nakon *i.v.* primjene, odnosno 4 mg/kg nakon *p.o.* primjene. U istoj su studiji, uz harmin i harmalin, ispitani i 6-metoksiharmalan i 6-metoksitetrahydroharmalan koji su pokazali učinak u dozi od 1,5 mg/kg nakon oralne primjene. Pretpostavljeno je da 6-metoksi supstituent i zasićenost trickličkih prstenova pojačavaju halucinogeni učinak (Efron i sur., 1967).

Za BZR kod sisavaca je poznato da posreduju u anksiolitičkom, sedativnom, antikonvulzivnom i miorelaksirajućem djelovanju 1,4-benzodiazepina. U novije vrijeme otkriveno je dosta nebenzodiazepinskih molekula, među kojima je i dobro proučena skupina β -karbolina, čiji predstavnici pokazuju različit afinitet za BZR. Takve molekule osim što poništavaju djelovanje benzodiazepina, posjeduju i farmakološko djelovanje suprotno benzodiazepinima (inverzni agonisti GABA_A). U publikacijama su navedeni derivati harmina čija su djelovanja suprotna benzodiazepinima proučavana na životinjskim modelima. Uočena je veza između jačine afiniteta vezanja za BZR i supstitucije esterskom skupinom u položaju 3 β -karbolina (Cao i sur., 2007).

Određeni derivati harmina izolirani iz morskog mahovnjaka *Cribricellina cribraria* pokazali su antimikrobnu aktivnost protiv bakterija: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* te gljivica: *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, i *Cladisporum resinae*. Također, zapažen je i umjeren učinak na HSV-1 i virus poliomijelitisa (Prinsep i sur., 1991).

Harmalin je pokazao značajnu antiparazitsku aktivnost protiv bićaša *Leishmania mexicana amazonensis in vitro* i *in vivo*, i to djelotvornost na intracelularnu amastigotnu formu toga parazita (Evans i sur., 1987), dok su harman i harmin inhibirali i vanstaničnog bičastog promastigota (Giorgio i sur., 2004).

Za norharman, harmin i harman zabilježena je i tripanosomicidna aktivnost na *Trypanosoma cruzi* epimastigote dvaju različitih sojeva (Rivas i sur., 1999).

Različite frakcije alkaloidnog ekstrakta sjemenki sirijske rutvice pokazale su o dozi ovisan centralni i periferni analgetski učinak koji se gubi kod tretmana s naloksonom, što upućuje na opioididima posredovan mehanizam analgezije. Alkaloidni ekstrakt je sadržavao: harmin, harmalol, harman, harmalin, vasicin i vasicinon, te se od svih frakcija najučinkovitijom pokazala ona s identificiranim harmalinom (Farouk i sur., 2008; Monsef i sur., 2003).

Jedna je studija pokazala da harmin preko Wnt signalnog puta regulira ekspresiju PPAR γ , glavnog regulatora adipogeneze. Inhibitori PPAR γ su tiazolidindionski antidijabetici. Harmin tako oponaša učinke PPAR γ liganada na gensku ekspresiju adipocita i inzulinsku osjetljivost bez nuspojava tipičnih za tiazolidindione (Waki i sur., 2007).

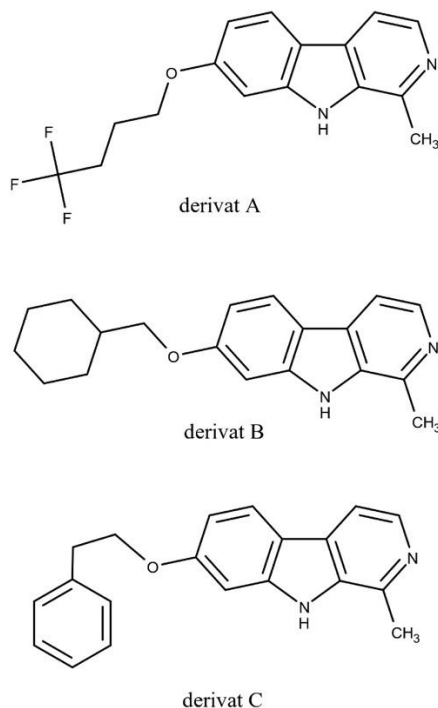
Postoje *in vivo* i *in vitro* studije o anaboličkom učinku harmina na kosti. Harmin preko različitih signalnih puteva u miševima inhibira formaciju i diferencijaciju osteoklasta zaduženih za resopciju kosti, a potiče diferencijaciju osteoblasta (Yonezawa i sur., 2011).

Zabilježena je i uloga harmina u aktiviranju intrinzičnih i ekstrinzičnih puteva apoptoze, reguliranju transkripcijskih faktora i proinflamatornih citokina. Harmin je *in vivo* pokazao antiangiogenu aktivnost, a *in vitro* inhibitorno djelovanje na TNF- α (Hamsa i sur., 2010).

Na antiagregacijsku aktivnost *in vitro* su testirani *harmala alkaloidi* iz sirijske rutvice. Za harman i harmin je uočeno da inhibiraju kolagenom posredovanu aktivaciju trombocita što ih čini potencijalnim spojevima uzorima za razvoj novih lijekova u liječenju aterotrombotskih oboljenja (Im i sur., 2009).

Norharman i harman su reverzibilni kompetitivni inhibitori monoamino oksidaze (MAO), od kojih norharman djeluje na MAO-A, a harman na MAO-B izoformu enzima (May i sur., 1991). Harmin posjeduje antidepresivnu aktivnost kroz interakciju s MAO-A i nekoliko staničnih receptora uključujući i serotoninske receptore 5-HT $2A$, te je zbog selektivnosti i reverzibilnog inhibitornog djelovanja na MAO-A manje podložan izazivanju hipertenzivnih kriza. Većina MAO inhibitora u primjeni na enzim djeluje ireverzibilno i neselektivno (Réus i sur., 2010). Kad se uz primjenu MAO inhibitora konzumira hrana bogata tiraminom, poput sira, dolazi do nakupljanja tiramina kojemu je inhibiran metabolizam, posljedičnog otpuštanja većih

količina noradrenalina iz presinaptičkih vezikula što uzrokuje hipertenzivnu krizu (engl. *cheese syndrome*). Zbog svega navedenoga, u potrazi za učinkovitijim lijekovima, sintetizirani su *O*-alkilirani derivati harmina, od kojih su spojevi s lipofilnim grupama poput cikloheksilne (derivat **B**), benzenskog prstena (derivat **C**) ili alifatskog lanca (derivat **A**) snažnije inhibirali MAO-A izoformu enzima u odnosu na harmin (Slika 10.). Derivat **A** s trifluorobutiloksi skupinom pokazao je najveću aktivnost i selektivnost za MAO-A izoformu enzima (Reniers i sur., 2011).



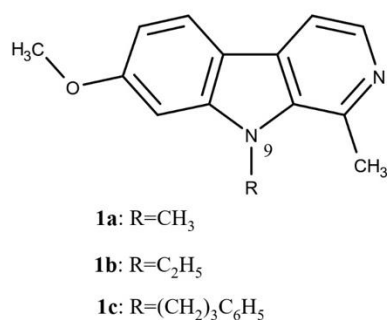
Slika 10. *O*-alkilirani derivati harmina s lipofilnim skupinama

Smatra se da je inhibicija MAO-B odgovorna za anti-parkinsonični učinak kod nekih derivata harmina (Sokmen i sur., 1999), dok se inhibicija MAO-A, uz poznato antidepresivno djelovanje, povezuje i s patogenom Parkinsonove bolesti; dopaminskim aktivnim transporterom posredovana dopaminergična toksičnost (Storch i sur., 2004).

Otkriveno je da su harmin i njegovi derivati snažni inhibitori tau fosforilacije i protein kinaze DYRK1A za koju se pokazalo da je pretjerano eksprimirana u brojnim bolestima, npr. kod tumorigeneze i kod nekontrolirane proliferacije stanica te da je uključena u kemorezistenciju tumorskih stanica (Ma i sur., 2010). U novije vrijeme, DYRK1A povezuje s hiperfosforilacijom tau proteina (inače važan za stabilizaciju citoskeleta) uslijed čega nastaju neurofibrilarne nakupine karakteristične za Alzheimerovu bolest (Frost i sur., 2011).

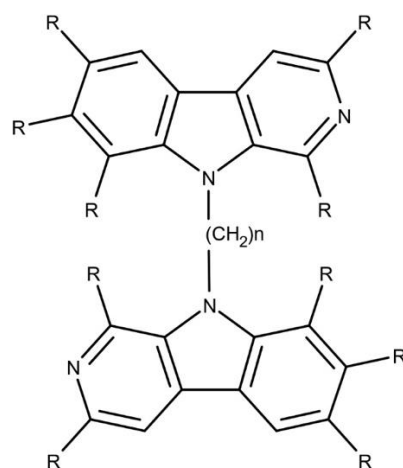
Harmin posjeduje antiproliferativno djelovanje zahvaljujući antiangiogenoj aktivnosti endotelnih stanica, indukciji apoptoze i inhibiciji BCRP-om posredovanog lijek efluksnog proteina (Ma i sur., 2010).

U literaturi postoje brojni podaci o interakciji harmina i njegovih derivata s DNA. Oni se zbog β -karbolinskog planarnog prstena mogu interkalirati između parova baza. Osim toga mogu inhibirati enzime koji sudjeluju u popravku DNA. Dokazana je osobita sposobnost interkaliranja samog harmina, ali i njegovih 9-supstituiranih nezasićenih derivata, kao i značajno inhibitorno djelovanje na enzime humanu topoizomerazu I i II, CDK (Slika 11.) (Cao i sur., 2005b).



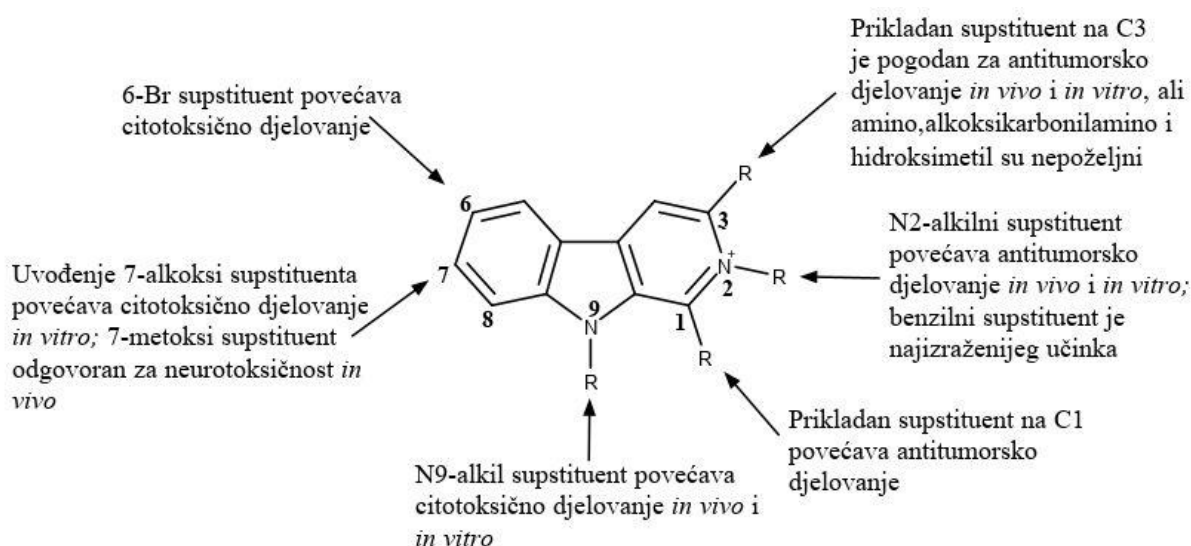
Slika 11. 9-supstituirani nezasićeni derivati harmina s djelovanjem na DNA

Sintetizirani su i bivalentni β -karbolini, s pretpostavkom da će pokazati još bolja antitumorska svojstva u odnosu na monovalentne β -karboline jer se jače vežu za DNA bis-interkalacijom i uzrokuju veće strukturne promjene DNA. Ipak, takvi su spojevi pokazali skromnije antitumorsko djelovanje i probleme s topljivosti u vodi (Slika 12.) (Shi i sur., 2012).



Slika 12. Opća strukturna formula bivalentnih β -karbolina

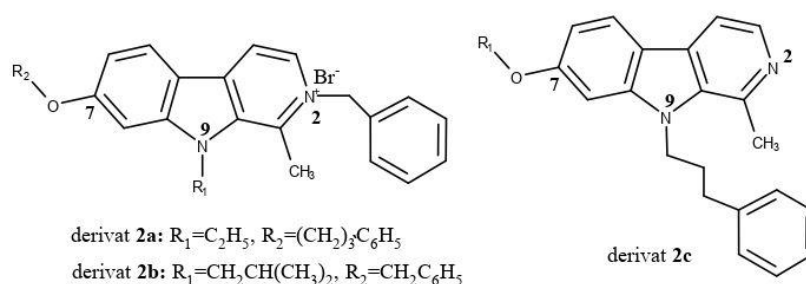
Jaku citotoksičnost *in vitro* i skromnu antitumorsku djelatnost *in vivo* na modelima miševa (Lewis plućni karcinom i Sarkom 180) pokazali su N-9-alkilirani karbolinski derivati, C-3-supstituirani derivati, C-1-supstituirani derivati te derivati s C-7-alkoksi supstituentom kod kojih je uočeno da duljina lanca utječe na citotoksičnost i specifičnost djelovanja na stanične linije. Selektivnu su i izraženu citotoksičnost pokazali C-6-bromirani karbolinski derivati, dok su N-2-alkilirani karbolinski derivati s benzilnim supstituentom, pokazali specifičnu citotoksičnost *in vitro* i *in vivo*. Daljnja su istraživanja dovela do zaključka o bitnoj ulozi β -karbolinske strukture u sintezi novih citostatika kojoj uvođenje prikladnih supstituenata u položaje 2, 3, 7 i 9 povećava antitumorsku aktivnost, a smanjuje toksičnost. Primjerice, duži i razgranatiji alkil-arilni supstituent na položaju C-9 povećava antitumorsku aktivnost dok etoksikarbonilni ili karboksilni supstituent na položaju C-3 smanjuje neurotoksičnost. Također je uočeno da metoksi grupa na položaju C-7 ima ključnu ulogu u neurotoksičnim učincima pa je predložena njezina zamjena aril-alkoksi grupom, a za N-2-benzilni supstituent je dokazana važna uloga u modulaciji citotoksične aktivnosti; određeni derivati s tim supstituentom su pokazali IC_{50} vrijednost manju od 10 μ M protiv većine ispitanih humanih staničnih linija karcinoma, što je bolje i od referentnog cisplatina. Tako je uočeno i da različiti heterociklički prstenovi na položaju C-1 i C-3 pozitivno djeluju na antitumorsku aktivnost (Slika 13.) (Cao i sur., 2012; Cao i sur., 2010; Cao i sur., 2005a; Xiao i sur., 2001; Ishida i sur., 1999).



Slika 13. Mjesta modifikacije strukture β -karbolina

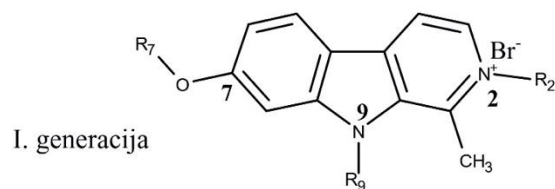
Zabilježeno je mikromolarno citotoksično djelovanje harmina i njegovih 2,7,9-supstituiranih derivata na nekoliko linija humanih karcinoma, uključujući HeLa (stanična linija humanih epitelnih stanica karcinoma cerviksa), KB (stanična linija karcinoma nazofarinksa),

HepG2 (stanična linija humanog karcinoma jetre), Bel-7402 (stanična linija humanog karcinoma jetre), BGC-823 (stanična linija humanog karcinoma želuca), HT-29 (stanična linija humanog kolorektalnog karcinoma) i MCF-7 (stanična linija humanog karcinoma dojke). Većina derivata harmina u ovom istraživanju pokazala je *in vitro* jače citotoksično djelovanje od samog harmina. Za derivate s N-2-benzilnim supstituentom (derivat **2a**, **2b**) potvrđena je antitumorska aktivnost jača od harmina *in vivo* na modelima miševa sa Sarkomom 180, dok je za derivate harmina s C-9-alkoksi-arilnim supstituentom (derivat **2c**) potvrđena aktivnost usporediva s harminom na istim modelima. Akutna toksičnost i neurotoksičnost su za izabrane derivate ispitane na modelima miševa, te je utvrđen izostanak toksičnosti za derivate bez N-2-benzilnog i C-7-metoksi supstituenta (derivat **2c**) (Slika 14.) (Cao i sur., 2012).



Slika 14. 2,7,9-trisupstituirani derivati harmina i 7,9-disupstituirani derivat harmina

Jako submikromolarno antiproliferativno *in vitro* djelovanje na više staničnih linija humanih karcinoma zabilježeno je za 2,7,9-trisupstituirane derivate harmina optimirane topljivosti pri fiziološkom pH i lipofilnosti unutar Lipinski pravila. Topljivost je u odnosu na prvu generaciju (**3a-c**) poboljšana uvođenjem polarnih supstituenata (**4**) čime je smanjena lipofilnost, međutim ti derivati druge generacije su zbog provedenih modifikacija izgubili antiproliferativno djelovanje (Slika 15.). Zatim je metodom računalne kemije postavljen CoMFA (engl. *Comparative Molecular Field Analysis*) model pomoću kojega se došlo do zaključaka o steričkim (mali i razgranati supstituenti na N-2 i N-9) i elektrostatskim (pozitivan naboj od trećeg supstituenta na N-2) doprinosima za poboljšanje antiproliferativne aktivnosti. Model je procjenio odgovarajuću lipofilnost i antiproliferativnu aktivnost za 8 novih molekula od kojih su sintetizirane 3 s optimalnim skupom svojstava te je za njih određena topljivost i antiproliferativno djelovanje (**5a,b,c**) (Meinguet i sur., 2015).



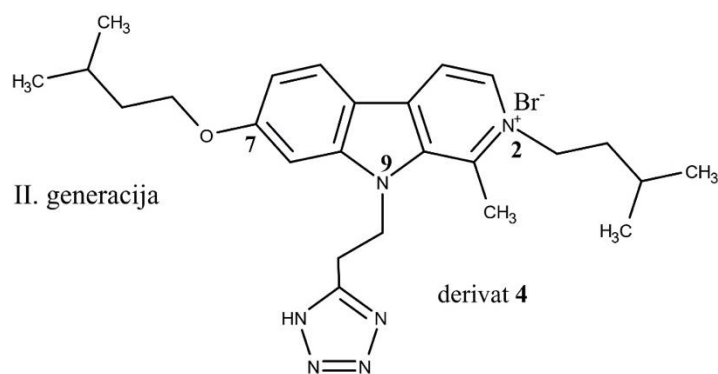
derivat **3a**: $R_2=R_7=R_9=C_6H_5$

derivat **3b**: $R_2=4-F-C_6H_5$, $R_7=R_9=3-F-C_6H_5$

derivat **3c**: $R_2=C_6H_5$, $R_7=R_9=CH_2-C_6H_{11}$

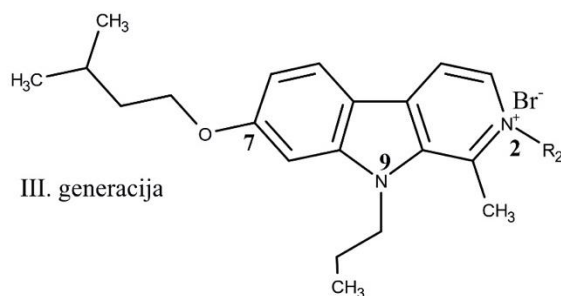
$IC_{50} \leq 2,7 \mu M$

$S < 72,5 \mu g/mL$



$IC_{50} > 100 \mu M$

$S > 205,6 \mu g/mL$



derivat **5a**: $R_2=C_2H_5$

derivat **5b**: $R_2=C_3H_7$

derivat **5c**: $R_2=CH_2-CH(CH_3)_2$

$IC_{50} \leq 0,6 \mu M$

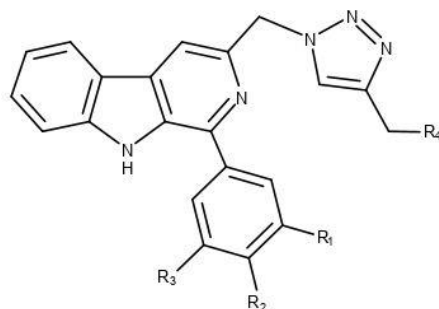
$S > 185 \mu g/mL$

Slika 15. Optimiranje topljivosti i aktivnosti 2,7,9-supstituiranih derivata harmina

1.1.3.2. β -karbolinski konjugati

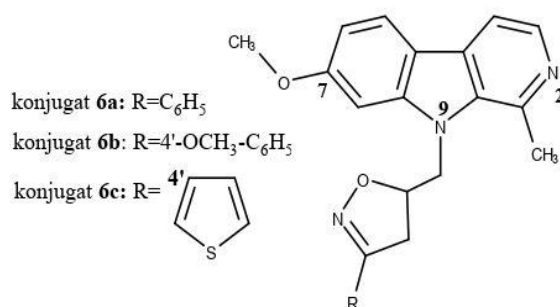
Click kemija je pojam kojim se opisuju reakcije u kemijskoj sintezi u kojima produkti brzo nastaju kovalentnim vezanjem najmanje dviju manjih molekulskih jedinica. Takve reakcije su: stereospecifične, jednostavne za izvođenje, visokog iskorištenja, široke primjene,

produkti se lako izoliraju te se provode bez ili u netoksičnim i lako uklonjivim otapalima (Kolb i sur., 2001). Ovaj princip je korišten u sintezi 3-supstituiranih derivata β -karbolina. Metodom Cu (I) katalizirane 1,3-dipolarne cikloadicije dobivene su hibridne molekule sastavljene od β -karbolina koje na C-3 atomu ima kovalentno vezane supstituente preko 1,2,3-triazolske poveznice. Sintetiziranim spojevima su izmjerene IC_{50} koncentracije za više staničnih linija humanih karcinoma koje su se nalazile u mikromolarnom rasponu. Međutim, citotoksično djelovanje je uglavnom bilo slabije od samog harmina (Shankaraiah i sur., 2016) (Slika 16.).



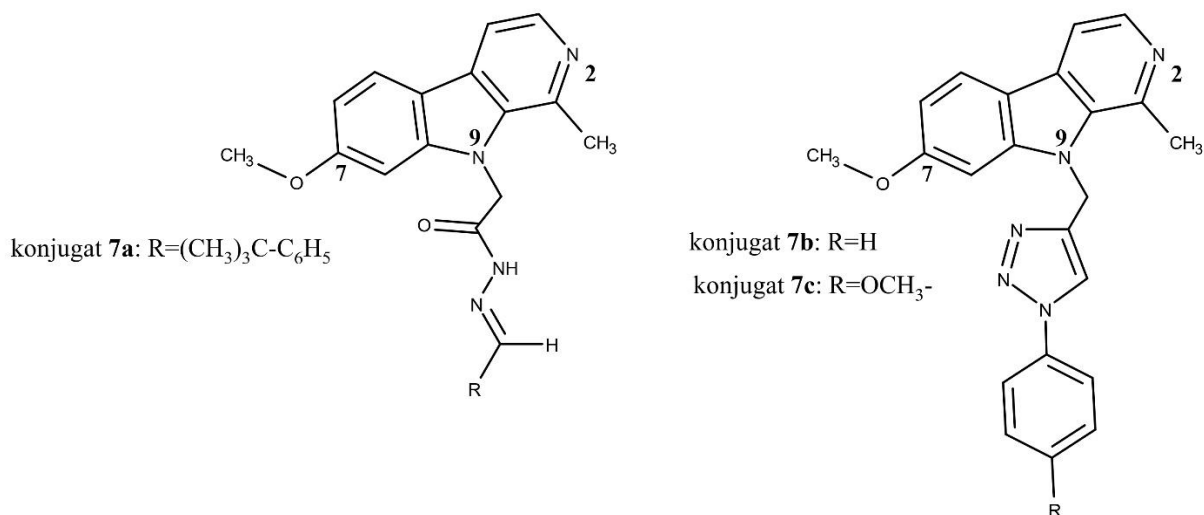
Slika 16. Opća strukturna formula konjugata β -karbolina s triazolskom poveznicom

Jedan od zanimljivijih primjera utjecaja supstituenta na citotoksično djelovanje naveden je za N-9-alkilirane derivate harmina. Riječ je o skupini spojeva koji preko izoksazolinske poveznice spajaju harmin i različite alkilarilne i heterocikličke supstituente u jednu molekulu. Izoksazolin je dobiven 1,3-dipolarnom cikloadicijom nitrilnih oksida na dvostruku vezu N-9-alilnog derivata harmina (Slika 17.). Neki konjugati su pokazali najjače djelovanje na MCF-7 (stanična linija humanog adenokarcinoma dojke) staničnu liniju; konjugat **6a** s fenilnim supstuentom je imao IC_{50} 0,2 μ M što je manje od referentnih harmina i doksorubicina. Bez obzira na prirodu supstituenta, supstitucija fenilne skupine u *para* položaju rezultira smanjenjem aktivnosti (**6b**). Konjugat **6c** s tiofenskim supstuentom je isto pokazao jako djelovanje na MCF-7 (Filali i sur., 2015).



Slika 17. Konjugati harmina s izoksazolinskom poveznicom

Istraživanja su pokazala da harmin inhibira enzim acetilkolinesterazu (AChE). Inhibicija AChE može djelovati povoljno na zaustavljanje Alzheimerove bolesti (Zhao i sur., 2013). Tako su sintetizirani N-9-alkilirani derivati harmina s triazolskom, hidrazonskom i dihidrazidnom poveznicom koji spajaju harmin s različitim cikličkim supstituentima (Slika 18.). Međutim, ti konjugati nisu inhibirali AChE. Zanimljivo, *N*-propargilirani harmin koji je bio međuprodukt u sintezi ovih spojeva, imao je IC_{50} vrijednost od 1,9 μ M, što je bolje od samog harmina i registriranog galantamina. Spojevima je ispitano i citotoksično djelovanje na nekoliko staničnih linija karcinoma; MCF-7 (humani karcinom dojke), OVCAR-3 (humani karcinom jajnika) i HCT-116 (humani karcinom kolona). Umjereno citotoksično djelovanje na sve ispitane stanične linije pokazali su konjugati s hidrazonskom poveznicom; najaktivniji spoj bio je konjugat s 4-*tert*-butilfenilnim supstitentom (**7a**). Od konjugata s triazolskom poveznicom najaktivniji je bio konjugat nesupstituiranim fenilnim supstituentom (**7b**) i to selektivno na MCF-7. Uočeno je da *para*-supstitucija fenila kod konjugata s hidrazonskom poveznicom pogoduje citotoksičnoj aktivnosti, dok kod konjugata s triazolskom poveznicom (**7c**) rezultira padom aktivnosti. Konjugati s dihidrazidnom poveznicom nisu pokazali citotoksično djelovanje (Filali i sur., 2016).



Slika 18. Konjugati harmina s hidrazonskom i triazolskom poveznicom

Također, otkriveno je da određeni konjugati β -karbolina s peptidima posjeduju značajnu antiagregacijsku i antiadhezijsku aktivnost na ADP i PAF-om potaknutu agregaciju trombocita *in vitro*, a antitrombotsku aktivnost *in vivo* na modelima štakora (Zhao i sur., 2006).

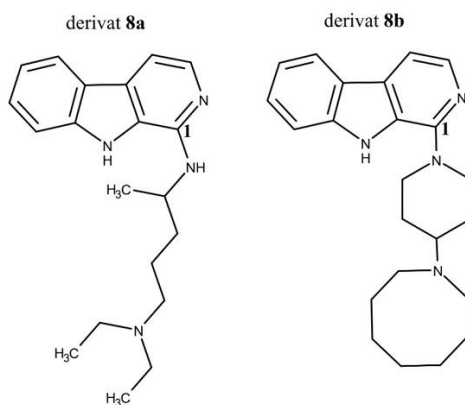
1.1.3.3. Antimalarijsko djelovanje harmina i derivata

Harmin i njegovi derivati čine izrazito zanimljivo područje interesa u razvoju novih antimalarika. Harmin je pokazao selektivno inhibitorno djelovanje na *PfHsp90* u odnosu na humani Hsp90. Hsp90 je visoko očuvani eukariotski šaperon koji na N-kraju ima ATP-aznu domenu, ključnu za interakciju s ciljanim proteinima. Hsp proteini imaju ključnu ulogu u normalnoj metaboličkoj aktivnosti stanica te omogućuju pravilno smatanje proteina. Uključeni su u unutarstanični promet proteina, ekspresiju gena, stanični ciklus, kao i diferencijaciju, te se zbog svih navedenih značajki u novije vrijeme istražuju kao mete novih citostatika i antimalarika. *PfHsp90* kod plazmodija ima ključnu ulogu u prilagodbi parazita s hladnokrvnih insektnih vektora na toplokrvne sisavce, i njegova djelatnost je ključna u eritrocitnoj fazi životnog ciklusa truskovca (Bayih i sur., 2016). Harmin se kompetitivno veže za ATP vezujuću domenu na *PfHsp90*.

In vitro ispitivanja antimalarijskog djelovanja su pokazala kako harmin djeluje sinergistički s drugim antimalaricima (klorokinom i artemisininom), dok je *in vivo* na modelima miševa uočeno da potencira učinak klorokina (Shahinas i sur., 2012).

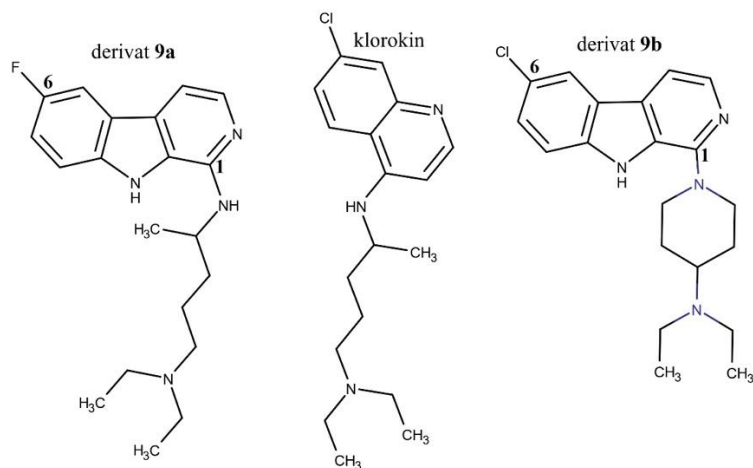
Uz još neke prirodne β -karboline antimalarijskog djelovanja (nostokarbolin, manzamini), značajna je biljka *Eurycoma longifolia* iz koje su izolirani harman-1-propionska kiselina i harmin-1-propionska kiselina, a koje su se pokazali učinkovitima protiv dva soja *P. falciparum*: W2, D6 (Kardono i sur., 1991).

Sintetizirana serija 1-amino supstituiranih β karbolina, analoga klorokina (**8a**) i manzamina A (**8b**), pokazala je značajno djelovanje na parazite *T. cruzi*, *P. falciparum* (K1 soj), *T. brucei rhodesiense*, s IC_{50} vrijednostima za *P. falciparum* u rasponu od 4,59 do 0,35 μ M, no ujedno su pokazali znakove citotoksičnosti na stanicama mioblasta štakora (Slika 19.) (Boursereau i sur., 2004).



Slika 19. 1-amino- β -karbolinski derivati

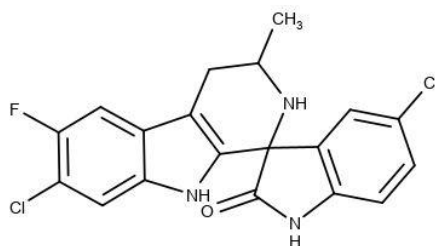
Priređeni su i 1-amino-6-halo- β -karbolini koji na položaju 1 preko amino skupine imaju alifatski ostatak po uzoru na antimalarik klorokin, od kojih su najbolje djelovanje pokazali 6-kloro i 6-fluoro derivati supstituirani s kraćim primarnim aminima (**9a**), dok su oni sa sekundarnim aminima, poput piperidina (**9b**) pokazali slabije djelovanje. Oni su u *in vitro* na dva soja *P. falciparum* (3D7 i K1) pokazali antiplazmodijsko djelovanje s IC_{50} vrijednostima u rasponu od 0,15 do 1,8 μ M. Nisu pokazali značajnu citotoksičnost na humane stanice (Slika 20.) (Thompson i sur., 2012).



Slika 20. 1-amino-6-halo- β -karbolinski derivati

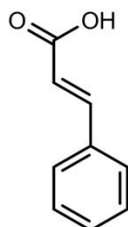
Neki C-6-halogenirani tetrahidro derivati harmina su pokazali *in vitro* antimalarijsko djelovanje s mikromolarnim IC_{50} vrijednostima, u *in vitro* ispitivanjima nisu bili toksični za zdrave ljudske stanice, a pokazali su i *in vivo* antimalarijsko djelovanje na miševima uz povećanu stopu preživljavanja. Bromirani analog je pokazao aditivni učinak u kombinaciji s dihidroartemisininom što upućuje na mogućnost korištenja ovih spojeva kao lijekova partnera (Bayih i sur., 2016).

Postoje i primjeri sintetskih derivata β -karbolina s djelovanjem različitim od dosad registriranih antimalarika kojima su nove mete enzimi poput *Pf*IspD ili *Pf*ATP-aze 4, na posljednju od kojih djeluje spiroindolon cipargamin, koji se nalazi u drugoj fazi kliničkih ispitivanja (Imlay i sur., 2015; Spillman i sur., 2015) (Slika 21.).



1.2. Slika 21. Strukturna formula cipargamina Cimetna kiselina

Cimetna kiselina je biljni metabolit; prekursor u sintezi velikog broja prirodnih spojeva biljnog porijekla: lignina, tanina, flavonoida, izoflavonoida, fenilpropanoida, stilbena, kumarina, pigmenata, brojnih mirisnih komponenti i nekih alkaloida, poput morfina i kolhicina (Slika 22.) (Guzman i sur., 2014).



Slika 22. Cimetna kiselina

1.2.2. Struktura i fizikalno-kemijska svojstva cimetne kiseline i njezinih derivata (CAD)

Cimetna kiselina je bijela kristalinična tvar bez mirisa, loše topljiva u vodi, a dobro topljiva u brojnim organskim otapalima. To je monokarboksilna kiselina sastavljena od akrilne kiseline s fenilnim supstuentom na poziciji 3 koji čine C6-C3 okosnicu. Ubraja se u stirene i skupinu biološki značajnih cimetnih kiselina. Prisutna je u formi *cis* i *trans* izomera, od kojih je potonji zastupljeniji (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamic-acid). Nudi tri glavna reaktivna mjesta za sintezu: supstituciju na fenilnom prstenu, adiciju na α , β -nezasićeni sustav i reakcije karboksilnih kiselina (De i sur., 2012).

Cimetna kiselina je međunarodno nezaštićeno ime (INN) za (*E*)-3-fenilprop-2-ensku kiselinu. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva cimetne kiseline dana su u Tablici 2.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva cimetine kiseline

Cimetna kiselina	
Molekulska formula	C ₉ H ₈ O ₂
Relativna molekulska masa	148,16
Talište	133 °C
Vrelište	300 °C
log <i>P</i>	2,13
p <i>K</i> _a	4,44
Topljivost u vodi	500 /L

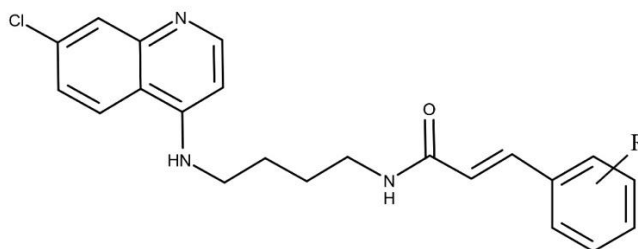
1.2.2. Antimalarijsko djelovanje cimetine kiseline i derivata

Cimetna kiselina i njezini derivati (CAD) imaju izrazito raznolik farmakološki profil. U literaturi je opisano njihovo antimikrobno, antikancerogeno, antimalarijsko, antiaterogeno, antifungalno, tuberkulostatsko, antioksidativno, antidijabetičko, antivirotsko i antiinflamatorno djelovanje. Također, opisani su i različiti mehanizmi djelovanja. Primjerice, interakcija s membranom patogena se povezuje s antimikrobnim djelovanjem CAD dok se aktivacija kaspaza, inhibicija histonske deacetilaze i generiranje reaktivnih kisikovih vrsta povezuje s antiproliferativnim djelovanjem. Cimetna kiselina i CAD su često korišteni farmakofori u dizajniranju novih spojeva s biološkim djelovanjem. Utvrđena je važna uloga prirodnih, semisintetskih i sintetskih CAD u poboljšavanju svojstava i prenamjeni klasičnih antimalarika (Da Silva i sur., 2020).

Antimalarijski učinak CAD se pripisuje sposobnosti inhibicije laktatnog transportera, ključnog za preživljavanje parazita u eritrocitnoj fazi (Kanaani i Ginsburg, 1992). Naime, dokazano je da plazmodijem zaraženi eritrociti pojačano proizvode mliječnu kiselinu iz glukoze u odnosu na zdrave eritrocite. Uz to je otkriveno da određeni CAD inhibiraju proizvodnju ATP-a i promet glicina, sorbitola i glukoze u zaraženim eritrocitima u većem omjeru nego što inhibiraju laktatni transporter. Stoga je, u skladu s racionalnim pristupom u dizajnu lijekova, predložena molekulska hibridizacija postojećih antimalarika s CAD. Cilj tog pristupa bio je razvoj učinkovitih antimalarika sinergističkog ili šireg spektra djelovanja otpornih na rezistenciju, farmakokinetičke ili farmakodinamičke nedostatke povezane s primarnom molekulom lijeka (Meunier i sur., 2008).

Kao značajniji primjer poboljšanja svojstava klasičnog antimalarika uvođenjem CAD u strukturu, izdvaja se skupina konjugata s krvnim shizontocidom klorokinom u kojem je

aminokinolinski dio molekule preko fleksibilne i hidrofobne butilne poveznice povezan s CAD. *In vitro* je dokazano nanomolarno djelovanje na klorokin rezistentnom soju *P. falciparum* s IC_{50} vrijednosti usporedivom s referentnim artemisininom (Slika 23.).



Slika 23. Opća strukturna formula konjugata aminokinolina i CAD-a s butilnom poveznicom

Pokazano djelovanje nije bilo povezano s inhibicijom hemoglobinaza i inhibicijom formiranja hemozoina (mehanizam djelovanja klorokina), pa je pretpostavljeno da novi konjugat ima dodatni mehanizam djelovanja. Kao mogući mehanizam djelovanja predložena je inhibicija transporta nutrijenata ključnih za preživljavanje intraeritrocitne forme parazita (Peres i sur., 2012). Navedeni spoj je poslužio kao predložak daljnim istraživanjima koja su dovela do otkrića o dualnom djelovanju takvih klorokinskih konjugata. Oni su se pokazali djelotvorni *in vitro* protiv jetrene i krvne faze parazita, što do tada nije bilo zabilježeno za 4-supstituirane kinoline poput klorokina. Također, otkriven je značajan pad u aktivnosti kod: a) zamjene 4-amino-7-klorokinske jezgre s drugim heterociklom, b) zamjene amidne veze esterskom, c) korištenja poveznice koja nije butilna, d) uvođenja 2 supstituenta na benzenski prsten CAD te e) ukidanja *para*- supstitucije na benzenskom prstenu cimetne kiseline (Peres i sur., 2013a). Daljnjim *in vivo* ispitivanjima najaktivnijih spojeva iz skupine u enkapsulaciji u imuno-PEG liposomima potvrđeno je njihovo djelovanje (Moles i sur., 2017).

Ista istraživačka skupina je istraživala konjugate CAD sa tkivnim shizontocidom primakinom učinkovitim protiv jetrene faze parazita. Iako su autori za takve konjugate pretpostavili djelotvornost protiv više životnih faza parazita, spomenuti spojevi su pokazali isključivo djelotvornost protiv jetrene faze parazita, u mikromolarnom rasponu vrijednosti (Peres i sur., 2013b).

Povezivanje CAD s primakinom je istraživala i istraživačka skupina Zavoda za farmaceutsku kemiju FBF-a (Pavić i sur., 2016). Razvijeni su acilsemikarbazidni i amidni derivati primakina s CAD koji su *in vitro* na šest staničnih linija karcinoma imali IC_{50} u mikromolarnim koncentracijama, što je učinilo primakinske konjugate zanimljivima i za neoplastične indikacije. Ista je grupa nedavno prijavila antipazmodijsku djelatnost derivata

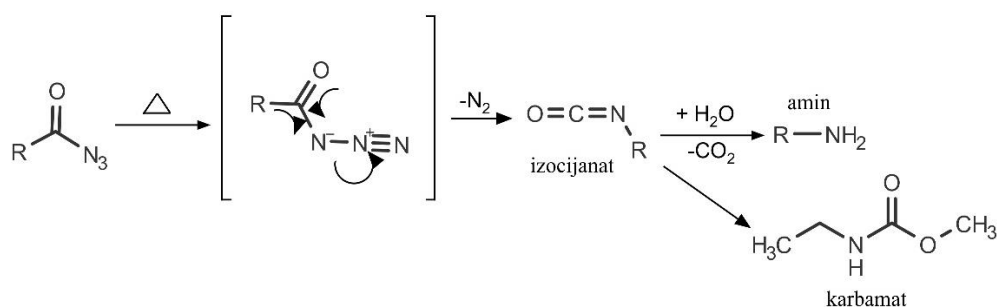
primakina i fumaridamida, diamida fumarne kiseline, strukturno sličnih CAD po fenilnom prstenu i α , β -nezasićenom sustavu (Beus i sur., 2019).

1.3. Organski azidi

Organski azidi su široko korišteni spojevi od svoga otkrića zbog visoke reaktivnosti i 1,3-dipolarnoga karaktera unatoč toksičnosti i eksplozivnosti. Strukturno, organski azidi su građeni od triju atoma dušika u linearnoj formi blago savinutoj, te pokazuju različitu kemijsku aktivnost: N1 atom može djelovati kao nukleofil, dok N3 atom pokazuje elektrofilnu djelatnost. Upravo ih 1,3-dipolarni karakter čini posebno korisnima zato što omogućuje reakcije cikloadicije (Huisgen) s nezasićenim vezama koje daju triazoline, triazole i tetrazole. Od ostalih značajnijih reakcija, izdvajaju se reakcije s otpuštanjem plinovitog dušika kojim nastaju visoko reaktivni nitreni.

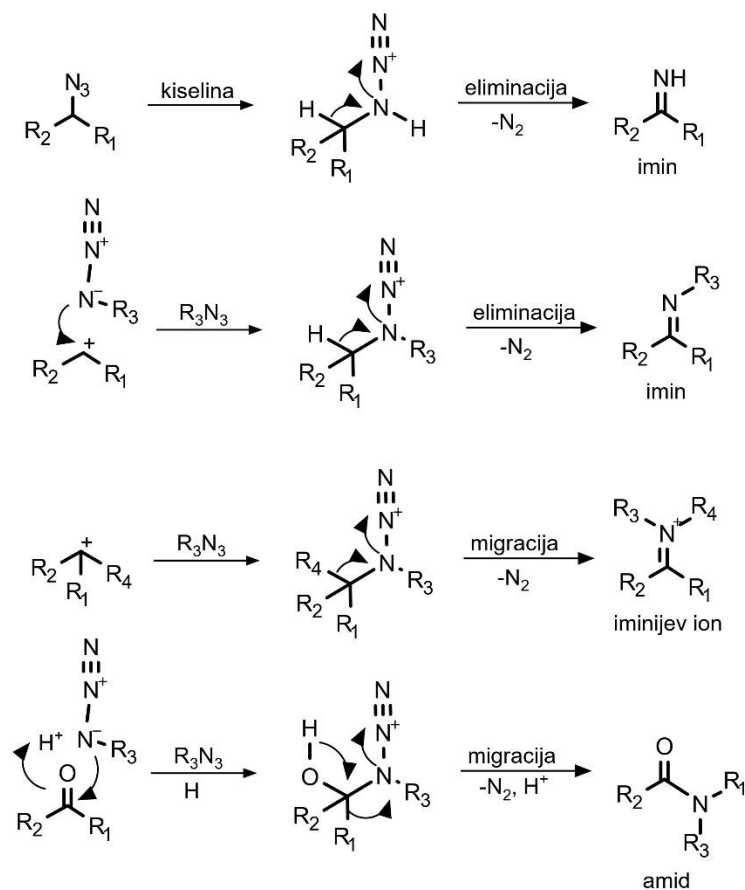
1.3.1. Primjena organskih azida

Brojne organske reakcije koje uključuju azide pronašle su primjenu u sintetskim procesima u području biologije, kemije, medicine i poljoprivrede. Neki od poznatijih primjera primjene azida su: Curtiusova reakcija preraspodjele, Schmidtova reakcija preraspodjele, reakcije cikloadicije, reakcije C-H insercije posredovane nitrenima te reakcije redukcije azida uvedenih zbog maskiranja amino skupina. Curtiusova reakcija preraspodjele služi za dobivanje izocijanata iz alkil ili aril acil azida migracijom supstituenta (Shema 1).



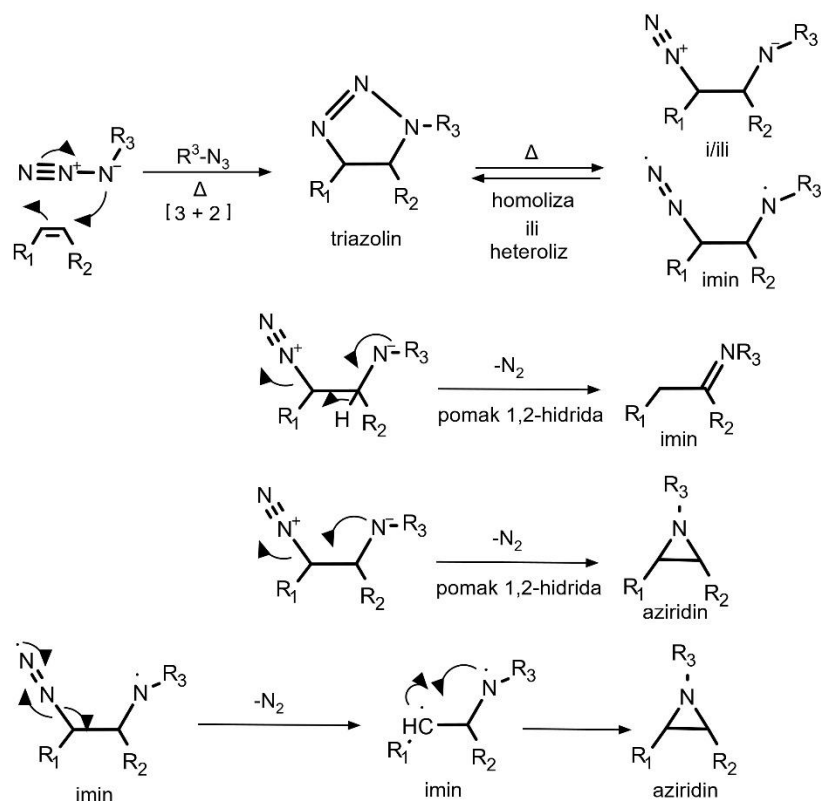
Shema 1. Prikaz Curtiusove reakcije preraspodjele

Korisna je i pristupačna metoda jer se njome dodatkom vode mogu dobiti amini, a dodatkom alkohola mogu se dobiti karbamati koji su dobre maskirajuće skupine amina. Schmidtova reakcija preraspodjele je reakcija kojom tercijarni ili sekundarni alkilazidi u kiselim uvjetima gube dušik eliminacijom ili migracijom supstituenata (Shema 2).



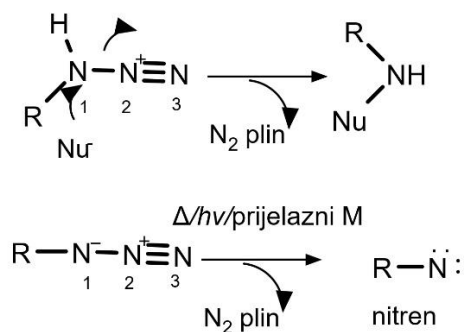
Shema 2. Prikaz Schmidtove reakcije preraspodjele

Sekundarni alkilazidi daju nesupstituirane imine, a terciarni supstituirane imine. Da bi se izbjegla upotreba azidne kiseline, reakcija se izvodi s alkilazidima i karbokationima ili karbonilima; od sekundarnih karbokationa nastaju supstituirani imini, od stabilnih terciarnih karbokationa migracijom supstituenta nastaju iminijevi ioni, dok od karbonila migracijom supstituenta nastaju amidi, tj. ako je riječ o intramolekulskoj reakciji, nastaju laktami, često prisutni i bitni u farmaceutskoj kemiji. Zbog spomenutog 1,3-dipolarnog karaktera, organski azidi mogu dati cikloadicijske produkte (Shema 3).



Shema 3. Mehanizam reakcije azid-olefin [3+2] cikloadicije

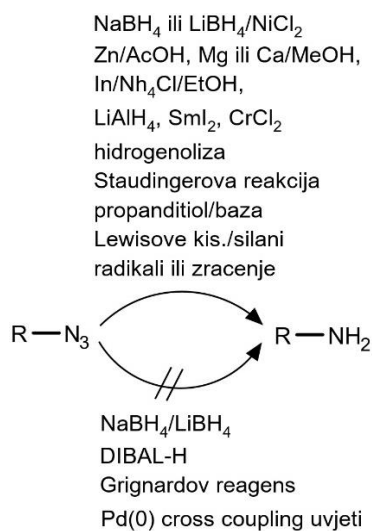
U većini slučajeva, riječ je o reakcijama između azida i alkina kojim nastaju triazolini, neotporni na zagrijavanje i kisele uvjete. Uslijed otvaranja prstena, ti β-diazoamini mogu dati imine ili aziridine, ovisno o supstratima. Reakcija C-H insercije posredovana nitrenima počiva na svojstvu azida da uslijed zagrijavanja ili fotoiradijacije otpuštaju plinoviti dušik i nestabilne visoko reaktivne nitrene (Shema 4).



Shema 4. Reakcije otpuštanja plinovitog dušika i tvorbe nitrena

Tom se reakcijom mogu uspostaviti C-N veze. Korisni primjeri su nastanak indola iz *ortho*-azidostirena te nastanak karbazola iz biarilazida. Važna primjena azida u organskoj

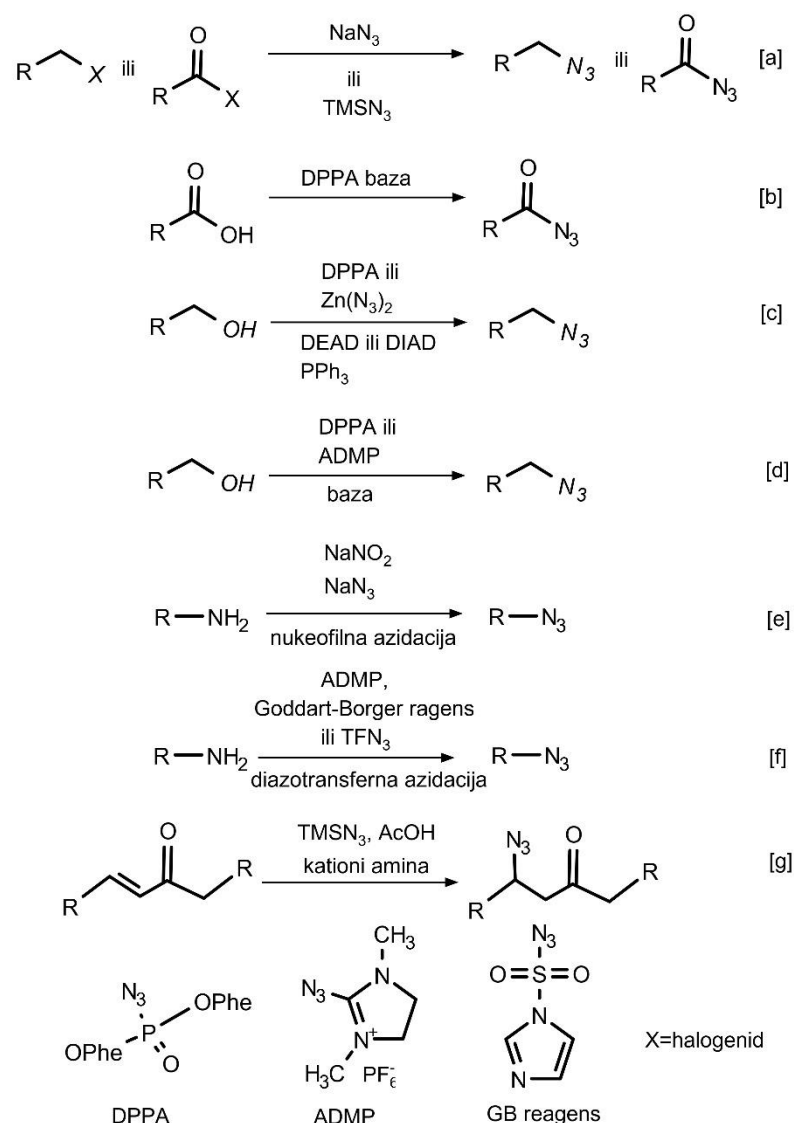
sintezi je i u uvođenju i zaštiti amino skupina. Odabirom prikladnih uvjeta redukcije, iz azida se mogu dobiti primarni amini u visokom iskorištenju (Shema 5) (Tanimoto i sur., 2013).



Shema 5. Tipični primjeri redukcije azida u amine i uvjeti koje azidi toleriraju

1.3.2. Primjeri dobivanja organskih azida

Postoji nekoliko općih metoda pripreme organskih azida koje isključuju korištenje hlapljive i toksične azidne kiseline.



Shema 6. Primjeri reakcija dobivanja organskih azida

Na Shemi 6 prikazani su neki primjeri dobivanja organskih azida. Najčešće korištena metoda je S_N2 azidacija alkil ili acil halida/sulfonata korištenjem nukleofilnog NaN_3 (a), dok je za dobivanje aril azida raširena Dutt-Wormallova reakcija u kojoj diazonijeva sol reagira sa sulfonamidom dajući diazoaminosulfinat koji se hidrolizom prevodi u ciljani azid i sulfinsku kiselinu. Za prevođenje karboksilnih kiselina (b) i alkohola (c, d), često se koristi Shioiri reagens DPPA (difenilfosforilazid) u bazičnim uvjetima. Kod zamjena hidroksilne skupine, kao donor azida koriste se još i cinkov azid (c) i ADMP (2-azido-1,3-dimetilimidazolin heksafluorofosfat) (d). Mitsunobu reakcijski uvjeti (PPh_3 ; trifenilfosfin i azidokarboksilati DEAD/ DIAD) su korišteni kod zamjene hidroksilne skupine alifatskih alkohola azidnom skupinom s donatorom DPPA ili cinkovim azidom (c). Nedostatak ove metode je taj što je potrebno izolirati željeni azid od trifenilfosfinoksida, nusprodukta PPh_3 . Opisana je i direktna

reakcija pretvorbe bez Mitsunobu uvjeta uz Shioiri reagens ili ADMP u bazičnim uvjetima (d). Upravo su Kitamura i sur. (2012.) za ADMP dokazali da je riječ o sigurnom i relativno stabilnom donoru azidne skupine arilnim i alkilnim alkoholima čime nastaju pripadajući azidi u blagim reakcijskim uvjetima i lako se izoliraju od nusprodukta reakcije, 2-imidazolidinona topljivog u vodi. Istraživačka skupina je otkrila i da je najprikladnija baza za reakciju DBU (1,8-diazabicyklo[5,4,0]undeka-7-en). Naime, s tim se reagensom reakcija prijenosa azida izvodi u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi ili 0°C u THF-u uz visoko iskorištenje. Azidi se mogu pripremiti i iz primarnih amina preko formacije diazonijeva kationa i zatim nukleofilne azidacije (e), čime se često dobivaju arilni azidi (spomenuta Dutt-Wormallova reakcija). Još jedna metoda pripreme azida iz primarnih amina je reakcija diazotransferne azidacije (f) koja je donedavno bila problematična zbog eksplozivnog i nestabilnog TfN₃ (trifluorometansulfonilazid) reagensa. Međutim, to je riješeno pojavom novih i sigurnijih reagensa poput ADMP-a i Goddard Borgerovog reagensa (imidazol-1-sulfonilazid). Zabilježena je i reakcija 1,4-adicije azida na α,β -nezasićene karbonile koja ide preko eniminskog međuprodukta u prisutnosti metansulfonske kiseline (g) (Tanimoto i sur., 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija odabranih harmicina, hibridnih spojeva koji povezuju dva farmakofora s antimalarijskim učinkom u jednu molekulu; β -karboline harmin ili harmol te derivate cimetine kiseline (CAD). Za harmin je antimalarijski učinak dokazan *in vitro* i *in vivo*, dok je za derivate cimetine kiseline otkriveno da pojačavaju učinak antimalarika kad su kovalentno vezani za njih (Rajić i sur., 2019.)

Farmakofori su u ovom slučaju povezani 1,2,3-triazolskim prstenom, poveznicom koja je ujedno i bioizoster amidne veze. Taj se prsten inače zbog pogodnih svojstava (umjerena dipolnost, sposobnost formiranja vodikovih veza s biomolekularnim metama, rigidna struktura, stabilnost *in vivo*) uvodi u brojne lijekove gdje doprinosi njihovoj biološkoj aktivnosti (Hou i sur., 2012).

Primjenjena regioselektivna metoda sinteze ciljanih 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola je Cu (I) katalizirana organski azid-terminalni alkin 1,3-dipolarna cikloadicija (CuAAC) (Tireli i sur., 2017). Derivati cimetine kiseline su iskorišteni za pripremu azida, dok su harmin i harmol u reakcijama *N*- i *O*-propargiliranja iskorišteni za dobivanje redom *N* i *O*-alkina.

U literaturi su opisani brojni primjeri molekulske hibridizacije kao jednog od pristupa u racionalnom dizajniranju lijekova. Tom se strategijom povezuju dva ili više farmakofora bioaktivnih supstanci rezultat čega je nova molekula poboljšanih svojstava i učinkovitosti u odnosu na roditeljske molekule (Viegas i sur., 2007).

Učinkovit način povezivanja molekula je i spomenuta cikloadicija katalizirana bakrom (I) koja svojim značajkama udovoljava većini kriterija *click* kemije. Glavne su značajke te reakcije blagi reakcijski uvjeti bez nastanka toksičnih nusprodukata i nastanak stereospecifičnog produkta koji se lako izdvaja iz reakcijske smjese u visokom iskorištenju (Kolb i sur., 2001).

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija dvaju novih *N*-supstituiranih triazolskih derivata harmina i dvaju novih *O*-supstituiranih triazolskih derivata harmola s cimetnom kiselinom i 4-klor-cimetnom kiselinom.

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada ispitat će se antimalarijsko djelovanje novih spojeva i to na eritrocitnu fazu *P. falciparum* (klorokin osjetljivi Pf3D7 i klorokin-rezistentni PfDd2 sojevi) i na jetrenu fazu *P. berghei*. Toksičnost za humane stanice ispitat će se humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma HepG2.

3. MATERIJALI I METODE

Tališta (t_r) su određena na Stuart Melting Point Apparatus instrumentu (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka), te cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5), cikloheksan/etil-acetat (2:1 i 9:1) i diklormetan/metanol (9,7:0,3 i 9,5:0,5) kao pokretne faze. 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 u tankoslojnoj kromatografiji. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ($\lambda = 254$ nm) i parama joda.

IR spektri snimljeni su na FT-IR Perkin Elmer Paragon 500 spektrometru (eng. *Perkin Elmer*, SAD). ¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance III HD (Bruker, SAD) kod 300, odnosno 400 MHz za ¹H i kod 75 odnosno 101 MHz za ¹³C NMR. Uzorci su mjereni u DMSO-*d*₆ otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama od 5 mm. Kemijski pomaci dani su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (engl. *Agilent Technologies Triple Quadripole 6410*, SAD).

Tionil-klorid, diklormetan, ledena octena kiselina, trietilamin (TEA), 4-klorocimena kiselina, cimetni alkohol, harmin, litij aluminij hidrid, bromovodična kiselina, natrijev hidrid, propargil bromid, cezijev karbonat, 2-azido-1,3-dimetilimidazolinheksafluorofosfat (ADMP) i 1,8-diazabiciklo[5,4,0]undeka-7-en (DBU) nabavljeni su od tvrtke *SigmaAldrich* (SAD), dok su trietilamin (TEA) i bakrov (II) acetat nabavljeni od tvrtke *Alfa-Aesar*.

Harmol je pripremljen po prilagođenom literaturnom postupku iz harmina uz korištenje smjese HBr/ledene octene kiseline u mikrovalnom reaktoru (Frédérick i sur., 2012).

Bezvodna otapala dobivena su sljedećim postupcima. Bezvodni toluen: toluen je ekstrahiran vodom, zatim je osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destiliran i čuvan nad natrijem. Bezvodni dimetilformamid (DMF): smjesa 1 L DMF-a i 100 mL bezvodnog toluena destilirana je, pri čemu prvo destilira azeotropna smjesa toluena i vode, a zatim čisti DMF. Čuvan je nad aktiviranim molekulskim sitima. Bezvodni diklormetan: diklormetan je ekstrahiran vodom, sušen iznad kalcijeva klorida i predestiliran. Bezvodni eter: eter je ekstrahiran 3 puta otopinom kalcijevog klorida (w = 10 %), 1 puta otopinom sumporne kiseline (w = 5 %), 1 puta vodom, 1 puta otopinom natrijevog karbonata (w = 5 %) i 1 puta otopinom željezovog(II) sulfata (w = 5 %). Nakon toga eter je ispran do neutralnog pH, sušen nad

bezvodnim kalcijevim kloridom 24 h, predestilirani i čuvan nad elementarnim natrijem. Sve ostale kemikalije bile su *p. a.* čistoće.

3.1. Sinteza derivata harmina (1,2)

3.1.1. Sinteza harmola (1-metil-2,9-dihidropirido[3,4-b]indol-7-ona)

0,255 g harmina (1,2 mmol), 3 mL ledene octene kiseline i 1,5 mL 40 % otopine HBr stavljeni su u jednofunkcijski mikrovalni reaktor na 130 °C, 150W i 20 min. Tijek reakcije je praćen tankoslojnom kromatografijom uz eluent diklormetan/metanol (3:1). Reakcijska smjesa je ubačena u 100 ml destilirane vode, potom zaluzena 5% otopinom NaOH do *pH* ~ 9. Ekstrakcija je provedena 4 × 30 mL etil-acetata. Organski slojevi su sakupljeni, isprani vodom, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Sirovi harmol je rastrljan u smjesi etera i diklormetana (3:1) i odsisan.

Iskorištenje: 0,198 g (83%).

t_r 304–307 °C.

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3282, 2480, 1636, 1574, 1454, 1366, 1298, 1234, 1174, 1110, 990, 896, 838, 800.

ESI-MS: m/z 199.0 (M+1)⁺.

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.

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

0,12 g harmina (1 mmol) je otopljeno u 4 mL suhog DMF-a. Pod atmosferom argona, dodano je 0,108 g 60% natrijevog hidrida u mineralnom ulju (2,7 mmol). Zatim je u reakcijsku smjesu dokapano 0,284 mL 80% otopine propargil bromida u toluenu (3 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi pod atmosferom argona 2 h. Tijek reakcije je praćen tankoslojnom kromatografijom. Po završetku, reakcijska smjesa je prelivena na 50 ml vode i ekstrahirana diklormetanom (4 × 30 ml). Organski slojevi su sakupljeni i isprani s vodom, osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom i upareni pod sniženim tlakom. Nakon

kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (9,5:0,5) i rastrljavanja u dietil eteru dobiven je konačni produkt **1**.

Iskorištenje: 0,138 g (55 %).

t_r 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 8,0 (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).

¹³C 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.

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

0,198 g harmola (1 mmol) je otopljen u suhom DMF-u (4 ml). Pod atmosferom argona dodan je cezijev karbonat (0,456 g, 1,4 mmol). Zatim je u reakcijsku smjesu dokapana 80% otopina propargil bromida u toluenu (0,095 ml, 1,1 mmol). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi i pod atmosferom argona u vremenskom trajanju od 2 sata. Tijek reakcije je praćen tankoslojnom kromatografijom. Po završetku, reakcijska smjesa je dodana u 50 ml vode. Produkt je ekstrahiran diklormetanom (4 × 30 ml). Organski slojevi su sakupljeni, isprani s vodom, osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom i upareni pod sniženim tlakom. Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (9,7:0,3; 9,5:0,5) i rastrljavanja u dietil eteru dobiven je konačni produkt **2**.

Iskorištenje: 0,132 g (56 %).

t_r 159–161 °C.

ESI-MS: m/z 237.2 (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, $J = 2,3$ Hz); 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.

3.2. Sinteza etil (*E*)-3-(4-klorofenil)prop-2-enoata

Otopina 4-klorocimetne 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 TEA (0.304 g, 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 nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni ester je korišten u idućem koraku bez daljnjeg čišćenja.

3.3. Sinteza (4-klorofenil)metanola (4)

Smjesi etil (*E*)-3-(4-klorofenil)prop-2-enoata 0,061 g (0,29 mmol) u suhom dietil eteru, dodan je LiAlH_4 (1,0 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 nad bezvodnim natrijevim sulfatom i upareni pod sniženim tlakom. Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava cikloheksan/etil-acetat (2:1) dobiven je alkohol 4.

3.4. Opći postupak za sintezu CAD azida (5a,b) (Kitamura i sur., 2012)

Otopini odgovarajućeg alkohola (spoj 4 ili cimetni alkohol 3; 0,5 mmol) u suhom THF-u dodani su na 0 °C 0,171 g ADMP-a (0,6 mmol) i 0,097 mL DBU (0,099 g, 0,65 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 10 minuta na 0 °C, razrijeđena zasićenom otopinom NH_4Cl (20 mL) i ekstrahirana diklormetanom (2×30 ml). Organski slojevi su sakupljeni i ekstrahirani zasićenom otopinom NaCl-a (2×30 ml), osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani

i upareni pod sniženim tlakom. Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava cikloheksan/etil-acetat (9:1) dobiveni su azidi **5** u obliku uljastih produkata.

3.4.1. [(1*E*)-3-azidoprop-1-en-1-il]benzen (**5a**)

Količina cimetnog alkohola **3**: 0,067 g.

Iskorištenje: 0,054 g (68 %).

IR (film, ν/cm^{-1}): 3027, 2926, 2100, 1493, 1448, 1351, 1236, 967, 883, 746, 693.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 7,51-7,28 (m, 5H); 6,71 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz); 6,44-6,34 (m, 1H); 4,04 (d, 2H, $J = 6,5$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 136,31, 134,24, 129,16, 128,53, 127,00, 123,56, 52,60.

Sinteza 1-[(1*E*)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-klorobenzena (**5b**)

Količina alkohola **3**: 0,084 g.

Iskorištenje: 0,070 g (72 %).

IR (film, ν/cm^{-1}): 3034, 2927, 2855, 2100, 1594, 1492, 1255, 1091, 1013, 968, 844, 796.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 7,56-7,50 (m, 2H), 7,45-7,39 (m, 2H), 6,70 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz), 6,46-6,39 (m, 1H), 4,05 (dd, 2H, $J = 6,5, 1,2$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz): δ 134,84, 132,43, 132,27, 128,68, 128,27, 124,23, 52,02.

3.5. Opći postupak sinteze *N*-supstituiranih triazolskih derivata harmina i cimetne kiseline (**6a,b**)

Otopini spoja **1** (0,05 g, 0,2 mmol) i odgovarajućeg azida (**5a,b**; 0,22 mmol) u 6 mL metanola dodan je Cu (II) acetat (0,01 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 20 sati na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom.

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

Količina azida **5a**: 0,035 g.

Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (9,7:0,3; 9,5:0,5) dobiven je konačni produkt **6a**.

Iskorištenje: 0,052 g (64 %).

t_t 202–203 °C.

ESI-MS: m/z 410.1 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3122, 3079, 2935, 1621, 1570, 1496, 1450, 1404, 1343, 1253, 1218, 1177, 1129, 1096, 1049, 973, 924, 848, 817, 771, 740, 697.

¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 8,19 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,11 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 8,02 (s, 1H), 7,91 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 7,40-7,23 (m, arom., 6H), 6,89 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,1$ Hz), 6,54-6,40 (m, 2H), 5,90 (s, 2H), 5,09 (d, 2H, $J = 5,4$ Hz), 3,88 (s, 3H), 3,06 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 160,69, 144,06, 142,84, 140,96, 137,66, 135,65, 134,60, 133,35, 128,77, 128,67, 128,11, 126,49, 123,75, 122,91, 122,50, 114,42, 112,37, 109,50, 94,12, 55,65, 51,25, 39,73, 22,97.

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

Količina azida **5b**: 0,043 g

Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5) i rastrljavanjem u dietil eteru dobiven je konačni produkt **6b**.

Iskorištenje: 0,050 g (56 %).

t_t 177–178 °C.

ESI-MS: m/z 444.2 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3126, 3048, 3000, 2930, 2836, 1626, 1562, 1510, 1450, 1408, 1324, 1252, 1224, 1168, 1136, 1044, 970, 924, 846, 816, 738.

¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 8,18 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 8,00 (s, 1H), 7,87 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 7,43-7,36 (m, 4H), 7,34 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz), 6,89 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,52-6,46 (m, 2H), 5,89 (s, 2H), 5,09 (d, 2H, $J = 4,8$ Hz), 3,88 (s, 3H), 3,04 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 160,54, 144,12, 142,66, 141,12, 138,08, 134,65, 134,62, 132,47, 131,98, 128,64, 128,22, 128,53, 124,80, 122,90, 122,38, 114,48, 112,25, 109,31, 94,13, 55,61, 51,15, 39,73, 23,23.

3.6. Opći postupak sinteze *O*-supstituiranih triazolskih derivata harmola i cimetne kiseline (7a,b)

Otopini 0,047 g spoja **2** (0,2 mmol) i odgovarajućeg azida **5** (0,22 mmol) u 6 mL metanola je dodan Cu (II) acetat (0,01 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 20 sati na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom.

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

Količina azida **5a**: 0,035g .

Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (9,5:0,5) dobiven je konačni produkt **7a**.

Iskorištenje: 0,029 g (37 %).

t_r 133–134 °C.

ESI-MS: m/z 396.3 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1630, 1560, 1450, 1422, 1328, 1278, 1216, 1172, 1052, 1008, 968, 804, 772, 692, 650.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 11,47 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,15 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz), 8,06 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 7,80 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz), 7,44-7,26 (m, 5H), 7,18 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz), 6,90 (dd, 1H, $J = 8,7, 2,1$ Hz), 6,64-6,47 (m, 2H), 5,29 (s, 1H), 5,21 (d, 2H, $J = 5,7$ Hz), 2,72 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) δ 158,72, 143,00, 141,76, 141,32, 137,72, 135,68, 133,58, 128,61, 128,08, 127,11, 126,51, 124,42, 123,64, 122,56, 115,13, 111,89, 109,46, 95,93, 61,51, 51,30, 20,27.

3.6.2. Sinteza 1-[(2E)-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-il]-4-{1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il}oksi)metil]-1H-1,2,3-triazola (7b)

Količina azida **5b**: 0,043 g.

Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,3), te rastrljavanjem u dietil eteru, dobiven je konačni produkt **7b**.

Iskorištenje: 0,040 g (47 %).

t_r 216–218 °C.

ESI-MS: m/z 430.2 (M+1)⁺.

IR (KBr, ν cm⁻¹): 3135, 3100, 3080, 2959, 2874, 2758, 1627, 1567, 1486, 1438, 1415, 1392, 1325, 1277, 1238, 1222, 1175, 1134, 1104, 1070, 1053, 1033, 1015, 969, 826, 809, 743, 695.

¹H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J /Hz) δ 11,49 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,16 (d, 1H, J = 5,3 Hz), 8,07 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,82 (d, 1H, J = 5,3 Hz), 7,46 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,36 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,19 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 6,91 (dd, 1H, J = 8,7,2,2 Hz), 6,62-6,56 (m, 2H), 5,30 (s, 2H), 5,21 (d, 2H, J = 4,9 Hz), 2,73 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J /Hz) δ 158,79, 143,02, 141,83, 141,30, 137,61, 134,67, 134,59, 132,52, 132,25, 128,66, 128,29, 127,23, 124,74, 124,58, 122,69, 115,11, 112,02, 109,57, 95,87, 61,47, 51,27, 20,25.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Harmin je β -karbolinski alkaloid raznolikog farmakološkog djelovanja. Od osobitog interesa je antiplazmodijski učinak nekih sintetičkih derivata ovog spoja, koji su do danas nedovoljno istraženi. Za cimetnu kiselinu i derivate je poznato da *in vitro* pojačavaju antiplazmodijski učinak 4- i 8-aminokinolinskih antimalarika kad su kovalentno povezani (Perez i sur., 2012).

U literaturi su opisani brojni primjeri molekulske hibridizacije kao jednog od pristupa u racionalnom dizajniranju lijekova. Tom se strategijom povezuju dva ili više farmakofora bioaktivnih supstanci, što rezultira novom molekulom poboljšanih svojstava i učinkovitosti u odnosu na roditeljske molekule (Viegas i sur., 2007). Stoga su sintetizirane serije novih potencijalno biološki aktivnih hibrida harmina i derivata cimetne kiseline regioselektivnom 1,3-dipolarnom cikloadicijom terminalnih alkina i organskih azida.

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija četiriju novih, u literaturi dosad neopisanih 1,2,3-triazolskih derivata harmina i cimetne kiseline; *N*-supstituiranih triazolskih derivata harmina i cimetne (**6a**), odnosno 4-klorocimetne kiseline (**6b**), te *O*-supstituiranih triazolskih derivata harmola i cimetne (**7a**), odnosno 4-klorocimente kiseline (**7b**).

Za sintezu tih derivata odabran je reakcijski put koji uključuje prevođenje harmina u *N*-propargilirani oblik **1**, odnosno harmola u *O*-propargilirani oblik **2**. Spojevi **1** i **2** s azidima derivata cimetne kiseline (**5a,b**) u reakciji Huisgenove cikloadicije daju konačne 1,2,3-triazolske derivate harmina i cimetne kiseline (**6a,b** i **7a,b**).

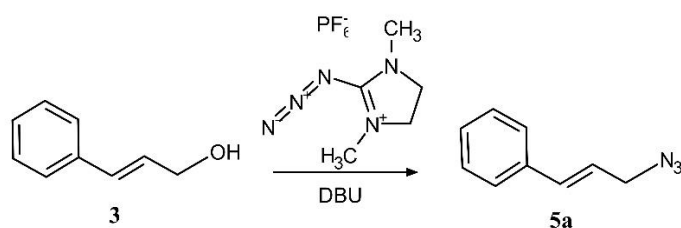
Početni spoj u sintezi *O*-derivata bio je harmol koji je dobiven reakcijom *O*-demetilacije harmina, uz ledenu octenu kiselinu i 47 % otopinu HBr u jednofunkcijskom mikrovalnom reaktoru na 130 °C kroz 20 min (Shema 7.) Sintetski postupak je preuzet iz rada Frederick i sur., 2012, uz prilagodbu uvjeta reakcije; korištenjem mikrovalnog reaktora ova reakcija je provedena kroz 20 min umjesto 48 sati koliko je bilo vrijeme trajanja reakcije iz spomenutog rada bez primjene mikrovalnog reaktora. Vodena otopina harmola zalužena je otopinom 5%-tne NaOH do pH 9. Harmol je u obliku baze te je topljiv u organskoj fazi, tj. etil-acetatu. Sakupljene organske slojeve potrebno je naknadno ekstrahirati vodom.

Reakcija propargiliranja harmola provodi se u suhom DMF-u, polarnom i aprotičnom otapalu. Bazični cezijev karbonat (1,4 eq) služi za deprotoniranje fenolne skupine čime nastaje fenoksidni međuprodukt koji je jači nukleofil od sekundarnog amina u heterocikličkom prstenu. Zatim se dokapava otopina alkilirajućeg agensa, propargil-bromida (1 eq), pri istim reakcijskim uvjetima, u trajanju od dva sata. U ovom slučaju je jako važno da se otopina propargil-bromida

ne doda u suvišku jer u tom slučaju dolazi do supstitucije i na indolskom prstenu harmola. Dobiveni produkt bio je dominantno *O*-propargilirani harmol, uz malu količinu *N,O*-bis-propargiliranog harmola, koji je u ovom slučaju nusprodukt. Ako bi se u reakciju dodalo 2 eq deprotonirajućeg i alkilirajućeg agensa nastao bi gotovo isključivo *N,O*-bis-propargilirani derivat. Reakcija *O*-alkiliranja, u kojoj dolazi do nukleofilnog napada fenoksidne skupine harmola na elektronima siromašni dio molekule alkilirajućeg agensa potpomognuta slabom bazom, cezijevim karbonatom, klasični je primjer Williamsonove reakcije sinteze etera. Izbor cezijeveg karbonata je omogućio brzo provođenje reakcije u blagim uvjetima što ga čini praktičnom i prikladnom alternativom ostalim metodama *O*-alkilacije, koje često uključuju agresivnije uvjete, duže reakcije, manje prinose i skuplje reagense (Flessner i sur., 1999; Parrish i sur., 1999). Dobiveni *O*-propargilirani harmol (**2**) je nakon izolacije i pročišćavanja iskorišten u daljnjim reakcijama sinteze.

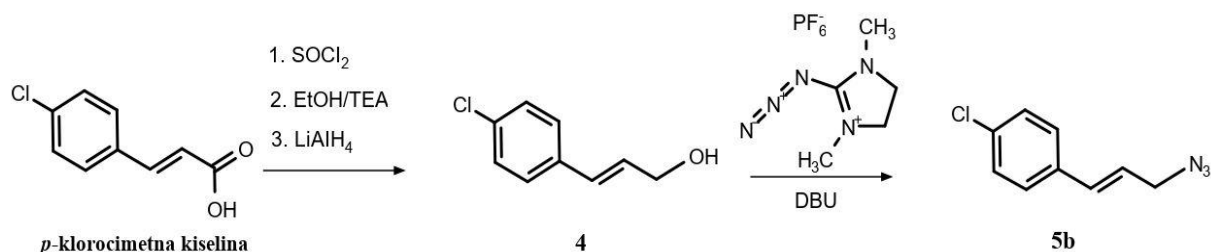
Harmin je preveden u *N*-propargilirani oblik u reakciji *N*-alkiliranja potpomognutoj snažnom bazom NaH. Kako je indolski dušik u neutralnom stanju slab nukleofil, potrebno ga je aktivirati deprotoniranjem jakom bazom poput NaH čime se dobije dobar nukleofilni anion (Sundberg; 1996). Ostali reakcijski uvjeti su bili istovjetni reakciji *O*-alkiliranja harmola, a dobiveni produkt (**1**) je nakon izolacije i pročišćavanja iskorišten u daljnjim reakcijama sinteze.

Derivati cimetne kiseline (CAD) su iskorišteni za dobivanje azida u više koraka. Cimetni alkohol (**3**) je komercijalno dostupan te su time izbjegnute reakcije esterifikacije i redukcije. U tom slučaju odgovarajući azid (**5a**) dobiven je u jednom koraku (Shema 7.).



Shema 7. Sinteza azida **5a**

4-Klorocimetna kiselina je u reakciji s tionil kloridom prevedena u kiselinski klorid veće reaktivnosti od same kiseline. Kiselinski klorid je u drugom koraku reagirao s alkoholom dajući odgovarajući ester koji je bez pročišćavanja korišten u daljnjim reakcijama. U trećem koraku esteru je dodan reducens LiAlH₄ u uvjetima koji su omogućili očuvanje dvostruke veze u strukturi novonastalog alkohola; temperatura reakcijske smjese nije smijela prelaziti 0 °C. Dobiveni alkohol (**4**) je nakon izolacije i pročišćavanja iskorišten za dobivanje odgovarajućeg azida (Shema 9.)(**5b**).

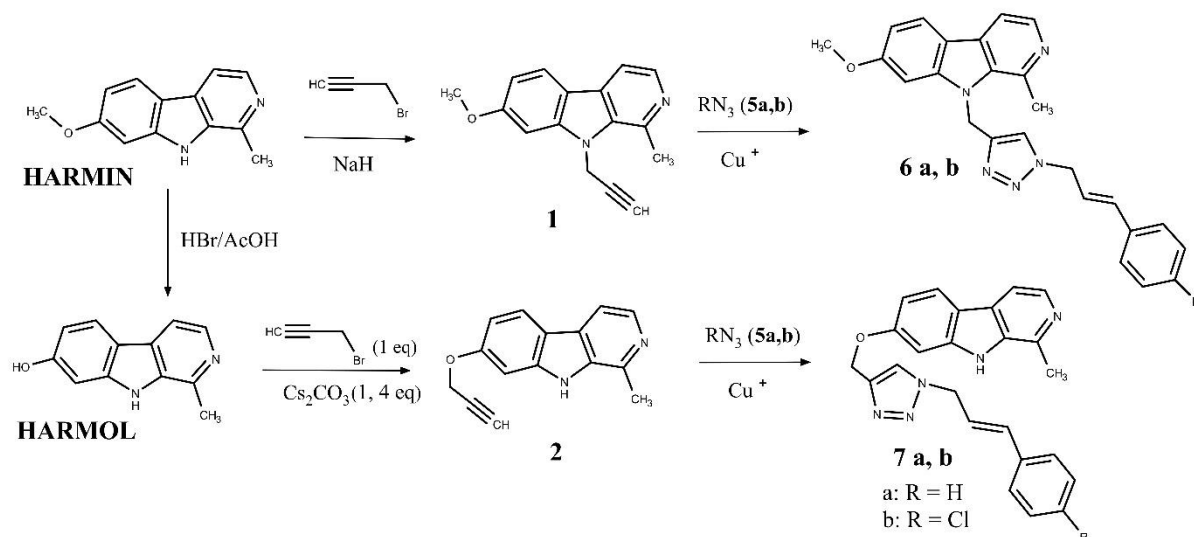


Shema 8. Sinteza azida **5b**

Alkoholi **3** i **4** u reakciji s 2-azido-1,3-dimetil-imidazolinheksafluorofosfatom (ADMP) kao donorom azido skupine u prisutnosti bazičnog 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-ena (DBU) iskorišteni su za transformaciju u odgovarajuće azide **5**. Glavne prednosti ovog tipa reakcije za uvođenje azidne skupine arilnim i alkilnim alkoholima su: a) korištenje ADMP-a, sigurnog i relativno stabilnog donora azidne skupine čime nastaju pripadajući azidi u blagim reakcijskim uvjetima koji se lako izoliraju od nusprodukta 2-imidazolidinona topljivog u vodi i b) korištenje baze DBU (1,8-diazabiciklo[5,4,0]undeka-7-en) s kojom je reakcija prijenosa azida moguća na sobnoj temperaturi ili 0°C u THF-u za 10 minuta uz visoko iskorištenje (Kitamura i sur., 2012). Obje reakcije su izvedene pri temperaturi od 0°C (**5a,b**) u THF-u, te su se pokazale uspješne.

Reakcijom propargiliranog harmina (**1**) ili harmola (**2**) s azidom odgovarajućeg derivata cimetne kiseline (**5a,b**) dobiveni su konačni produkti, 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolski derivati (**6a,b** i **7a,b**).

Primjenjena regioselektivna metoda sinteze je Cu (I) katalizirana organski azid-terminalni alkin Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija (CuAAC), jedna od poznatijih reakcija u *click* kemiji. Otkriće katalitičkog značaja jednovalentnih iona Cu pokazalo se presudnim za upotrebu ove metode. Upravo je primjena tih iona omogućila favorizirano nastajanje 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolskih regioizomera, te je uz to povećala brzinu reakcije, prinos, te je zbog snižavanja energije aktivacije omogućila njezino provođenje bez povišenja temperature (Tireli i sur., 2017). U našim uvjetima, Huisgenova reakcija je izvedena na sobnoj temperaturi u otopini metanola, uz *in situ* redukciju Cu(II) acetata kao izvora Cu (I) iona. Shema 9 sažeto prikazuje nastanak alkinskih reaktanata **1** i **2**, kao i nastanak konačnih produkata **6a,b** i **7a,b** Huisgenovom metodom sinteze.



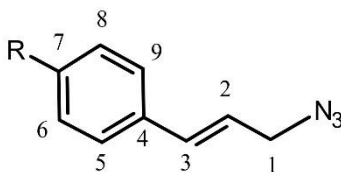
Shema 9. Sinteza novih derivata harmina

Uvođenje triazolskih prstenova u molekule je od osobitog interesa u farmaceutskoj kemiji jer se pokazalo da su zbog aromatske stabilizacije otporni na kiselu/bazičnu hidrolizu i različite reduktivne ili oksidativne uvjete, što ih čini relativno otpornim na metaboličku degradaciju. Postoje brojni primjeri 1,2,3-triazola zanimljivih bioloških svojstava, poput antibakterijskog, anti-HIV ili antialergijskog djelovanja. Također, poznati su brojni lijekovi koji u svojoj strukturi sadrže i 1,2,3-triazolski prsten, koji doprinosi njihovoj biološkoj aktivnosti. Poznati primjeri uključuju antikonvulziv rufinamid, antibiotik cefalosporin prve generacije cefatrizin i inhibitor β -laktamaze tazobaktam (Kategaonkar i sur., 2010).

U pripravi harmicina (**6a,b** i **7a,b**) najveću poteškoću predstavljalo je pročišćavanje produkata. Kao najbolji način pročišćavanja pokazala se kromatografija na koloni (nepokretna faza silikagel, pokretna faza diklormetan/metanol 9,5:0,5 i 9,3:0,7 te cikloheksan/etilacetat/metanol 3:1:0,5 i 1:1:0,3). Čisti produkti **6b** i **7b** redom su dobiveni prekrizacijom iz smjese dietil etera i petroletera ili samo dietil etera.

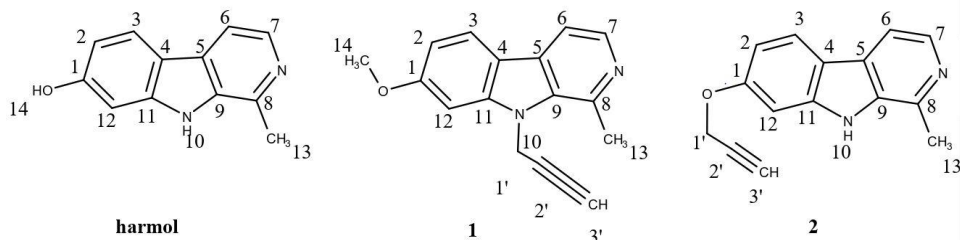
Strukture novih i ranije opisanih spojeva određene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS). Novim spojevima određene su i temperature tališta.

Tablica 3. Analitički i spektroskopski podaci i kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima azida **5a i **5b****



Spoj	5a	5b
R	H	Cl
t_f (°C)	Ulje	Ulje
Molekulska formula	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3$	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_3\text{Cl}$
M_r	161.20	195.65
IR (KBr, ν/cm^{-1})	3027, 2926, 2100, 1493, 1448, 1351, 1236, 967, 883, 746, 693.	3034, 2927, 2855, 2100, 1594, 1492, 1255, 1091, 1013, 968, 844, 796.
^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz):	7,51-7,28 (m, arom., 5H, 5-9), 6,71 (d, 1H, 3, $J = 15,8$ Hz), 6,39 (dt, 1H, 2, $J = 15,8, 6,5$ Hz), 4,04 (d, 2H, 1, $J = 6,5$ Hz).	7,56-7,50 (m, arom., 2H, 5,9), 7,45-7,39 (m, arom., 2H, 6,8), 6,70 (d, 1H, 3, $J = 15,9$ Hz), 6,42 (dt, 1H, 2, $J = 15,8, 6,5$ Hz), 4,05 (dd, 2H, 1, $J = 6,5, 1,2$ Hz).
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz):	136,31 (4), 134,24 (2), 129,16 (6,8), 128,53 (3), 127,00 (5,9), 123,56 (7), 52,60 (1).	134,84 (4), 132,43 (7), 132,27 (2), 128,68 (5,9), 128,27 (6,8), 124,23 (3), 52,02 (1).

Tablica 4. Analitički i spektroskopski podaci i kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima harmola, *N*- i *O*-propargiliranih derivata harmina (1,2)



Spoj	harmol	1	2
t_f (°C)	304-307	147-148	159-161
Molekulska formula	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$
M_r	198.22	250.30	236.27
MS (m/z)	199.0 ($\text{M}+1$) ⁺	251.2 ($\text{M}+1$) ⁺	237.2 ($\text{M}+1$) ⁺
IR (KBr, ν/cm^{-1})	3282, 2480, 1636, 1574, 1454, 1366, 1298, 1234, 1174, 1110, 990, 896, 838, 800.	3270, 3064, 2118, 1616, 1568, 1494, 1450, 1402, 1340, 1294, 1254, 1226, 1192, 1170, 1138, 1042, 976, 1042, 976, 922, 830, 806, 722, 690, 648.	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):	11,22 (s, 1H, 10), 9,73 (s, 1H, 14), 8,12 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 7,94 (d, 1H, 3, $J = 8,5$ Hz), 7,74 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 6,91 (d, 1H, 12, $J = 2,0$ Hz), 6,71 (dd, 1H, 2, $J = 8,5, 2,1$ Hz), 2,70 (s, 3H, 13).	8,20 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,10 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,33 (d, 1H, 8, $J = 2,1$ Hz), 6,90 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$ Hz, 2,1 Hz), 5,45 (d, 2H, 1', $J = 2,3$ Hz), 3,91 (s, 3H, 14), 3,37 (t, 1H, 3', $J = 2,3$ Hz), 3,05 (s, 3H, 13).	11,55 (s, 1H, 10), 8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 8,10 (d, 1H, 3, $J = 8,7$ Hz), 7,85 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,13 (d, 1H, 12, $J = 2,1$ Hz), 6,89 (dd, 1H, 2, $J = 8,7$ Hz, 2,3 Hz), 4,93 (d, 2H, 1', $J = 2,3$ Hz), 3,64 (t, 1H, 3', $J = 2,3$ Hz), 274 (s, 3H, 13).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz):	158,24 (1), 142,27 (8), 140,89 (11), 137,59 (7), 134,41 (9), 127,51 (4), 122,52 (3), 113,87 (5), 111,64 (6), 109,65 (2), 96,60 (12), 20,24 (13).	160,72 (1), 142,60 (8), 141,09 (11), 138,53 (7), 134,40 (9), 128,92 (4), 122,50 (3), 114,42 (5), 112,29 (6), 109,70 (2), 93,83 (12), 80,25, 75,59 (2'), 55,68 (14), 34,22 (1'), 22,49 (13).	157,94(1), 141,67(8), 141,33 (11), 137,59(7), 134,60(9), 127,17(4), 122,68(3), 115,35 (5), 112,06(6), 109,55(2), 96,00(12), 78,44(2'), 55,75 (1'), 20,22(13).
--	---	---	--

Tablica 5. Analitički i spektroskopski podaci *N*-supstituiranih triazolskih derivata harmina 6a i 6b

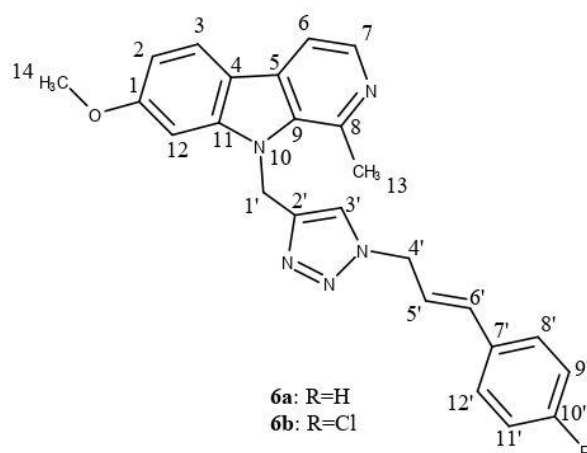
Spoj	6a	6b
R	H	Cl
t_f (°C)	202–203 °C	177–178 °C
Molekulska formula	$\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}$	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}$
M_r	411,50	445,94
MS (m/z)	410,1 (M+1) ⁺ .	444,2 (M+1) ⁺ .
IR (KBr, ν/cm^{-1})	3122, 3079, 2935, 1621, 1570, 1496, 1450, 1404, 1343, 1253, 1218, 1177, 1129, 1096, 1049, 973, 924, 848, 817, 771, 740, 697.	3126, 3048, 3000, 2930, 2836, 1626, 1562, 1510, 1450, 1408, 1324, 1252, 1224, 1168, 1136, 1044, 970, 924, 846, 816, 738.

Tablica 6. Analitički i spektroskopski podaci *O*-supstituiranih triazolskih derivata harmina 7a i 7b

Spoj	7a	7b
R	H	Cl
t_f (°C)	133–134 °C	216–218 °C
Molekulska formula	$\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}$	$\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}$
M_r	394,47	428,91
MS (m/z)	396,3 (M+1) ⁺	430.2 (M+1) ⁺ .

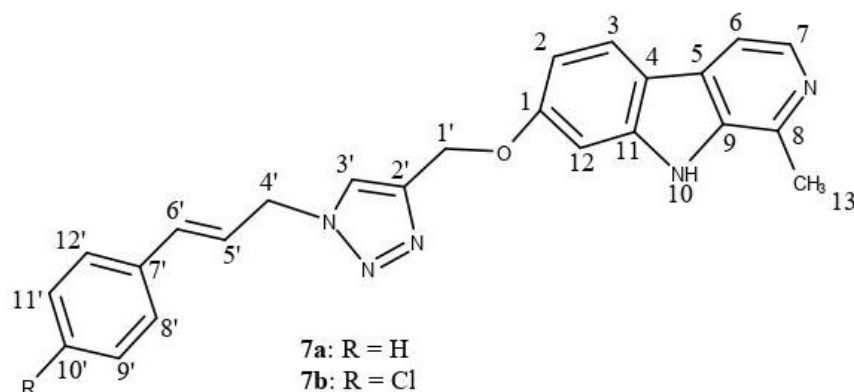
IR (KBr, ν / cm^{-1})	1630, 1560, 1450, 1422, 1328, 1278, 1216, 1172, 1052, 1008, 968, 804, 772, 692, 650.	3135, 3100, 3080, 2959, 2874, 2758, 1627, 1567, 1486, 1438, 1415, 1392, 1325, 1277, 1238, 1222, 1175, 1134, 1104, 1070, 1053, 1033, 1015, 969, 826, 809, 743, 695.
-------------------------------------	---	--

Tablica 7. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima *N*-supstituiranih triazolskih derivata harmina **6a i **6b****



Spoj	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz):	^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz):
6a	8,19 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,11 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 8,02 (s, 1H, 3'), 7,91 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,40-7,23 (m, arom., 6H, 8'-12', 8), 6,89 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,1$ Hz), 6,54-6,40 (m, 2H, 5', 6'), 5,90 (s, 2H, 1'), 5,09 (d, 2H, 4', $J = 5,4$ Hz), 3,88 (s, 3H, 14), 3,06 (s, 3H, 13).	160,69 (1), 144,06 (2'), 142,84 (8), 140,96 (11), 137,66 (7), 135,65 (9), 134,60 (7'), 133,35 (5'), 128,77 (4), 128,67 (9',11'), 128,11 (6'), 126,49 (8', 12'), 123,75 (10'), 122,91 (3'), 122,50 (3), 114,42 (5), 112,37 (6), 109,50 (2), 94,12 (12), 55,65 (14), 51,25 (4'), 39,73 (1'), 22,97 (13).
6b	8,18 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 8,00 (s, 1H, 3'), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,43-7,36 (m, 4H, 8', 9', 11', 12'), 7,34 (d, 1H, 8, $J = 2,1$ Hz), 6,89 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,52-6,46 (m, 2H, 5', 6'), 5,89 (s, 2H, 1'), 5,09 (d, 2H, 4', $J = 4,8$ Hz), 3,88 (s, 3H, 14), 3,04 (s, 3H, 13).	160,54 (1), 144,12 (2'), 142,66 (8), 141,12 (11), 138,08 (7), 134,65, 134,62 (7', 9), 132,47 (10'), 131,98 (5'), 128,64, 128,22 (8', 9', 11', 12'), 128,53 (4), 124,80 (6'), 122,90 (3'), 122,38 (3), 114,48 (5), 112,25 (6), 109,31 (2), 94,13 (12), 55,61 (14), 51,15 (4'), 39,73 (1'), 23,23 (13).

Tablica 8. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima *O*-supstituiranih triazolskih derivata harmina 7a i 7b



Spoj	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz):	^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz):
7a	11,47 (s, 1H, 10), 8,30 (s, 1H, 3'), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 4,4$ Hz), 8,06 (d, 1H, 3, $J = 8,7$ Hz), 7,80 (d, 1H, 6, $J = 5,1$ Hz), 7,44-7,26 (m, 5H, 8'-12'), 7,18 (d, 1H, 12, $J = 2,0$ Hz), 6,90 (dd, 1H, 2, $J = 8,7,2,1$ Hz), 6,64-6,47 (m, 2H, 5', 6'), 5,29 (s, 1H, 1'), 5,21 (d, 2H, 4', $J = 5,7$ Hz), 2,72 (s, 3H, 13).	158,72 (1), 143,00 (2'), 141,76 (8), 141,32 (11), 137,72 (7), 135,68 (9), 133,58 (5'), 128,61 (9',11'), 128,08 (10'), 127,11 (4), 126,51 (8',12'), 124,42 (3'), 123,64 (6'), 122,56 (3), 115,13 (5), 111,89 (6), 109,46 (2), 95,93 (12), 61,51 (1'), 51,30 (4'), 20,27 (13).
7b	11,49 (s, 1H, 10), 8,30 (s, 1H, 3'), 8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,7$ Hz), 7,82 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,46 (d, 2H, 8', 12', $J = 8,6$ Hz), 7,36 (d, 2H, 9', 11', $J = 8,6$ Hz), 7,19 (d, 1H, 12, $J = 2,1$ Hz), 6,91 (dd, 1H, 2, $J = 8,7,2,2$ Hz), 6,62-6,56 (m, 2H, 5', 6'), 5,30 (s, 2H, 1'), 5,21 (d, 2H, 4', $J = 4,9$ Hz), 2,73 (s, 3H, 13).	158,79 (1), 143,02 (2'), 141,83 (8), 141,30 (11), 137,61 (7), 134,67, 134,59 (7',9), 132,52 (10'), 132,25 (5'), 128,66, 128,29 (8',9',11',12'), 127,23 (4), 124,74, 124,58 (3',6'), 122,69 (3), 115,11 (5), 112,02 (6), 109,57 (2), 95,87 (12), 61,47 (1'), 51,27 (4'), 20,25 (13).

Besplatna web aplikacija SwissADME je korištena za izračun molekularnih (fizičko-kemijskih) deskriptora na osnovu kojih je napravljena računalna predikcija farmakokinetičkih svojstva. Dokazano je da rana procjena farmakokinetičkih parametara u istraživanju lijekova značajno smanjuje udio promašaja u kliničkoj fazi. Kako je preferirani način primjene lijeka oralni, od

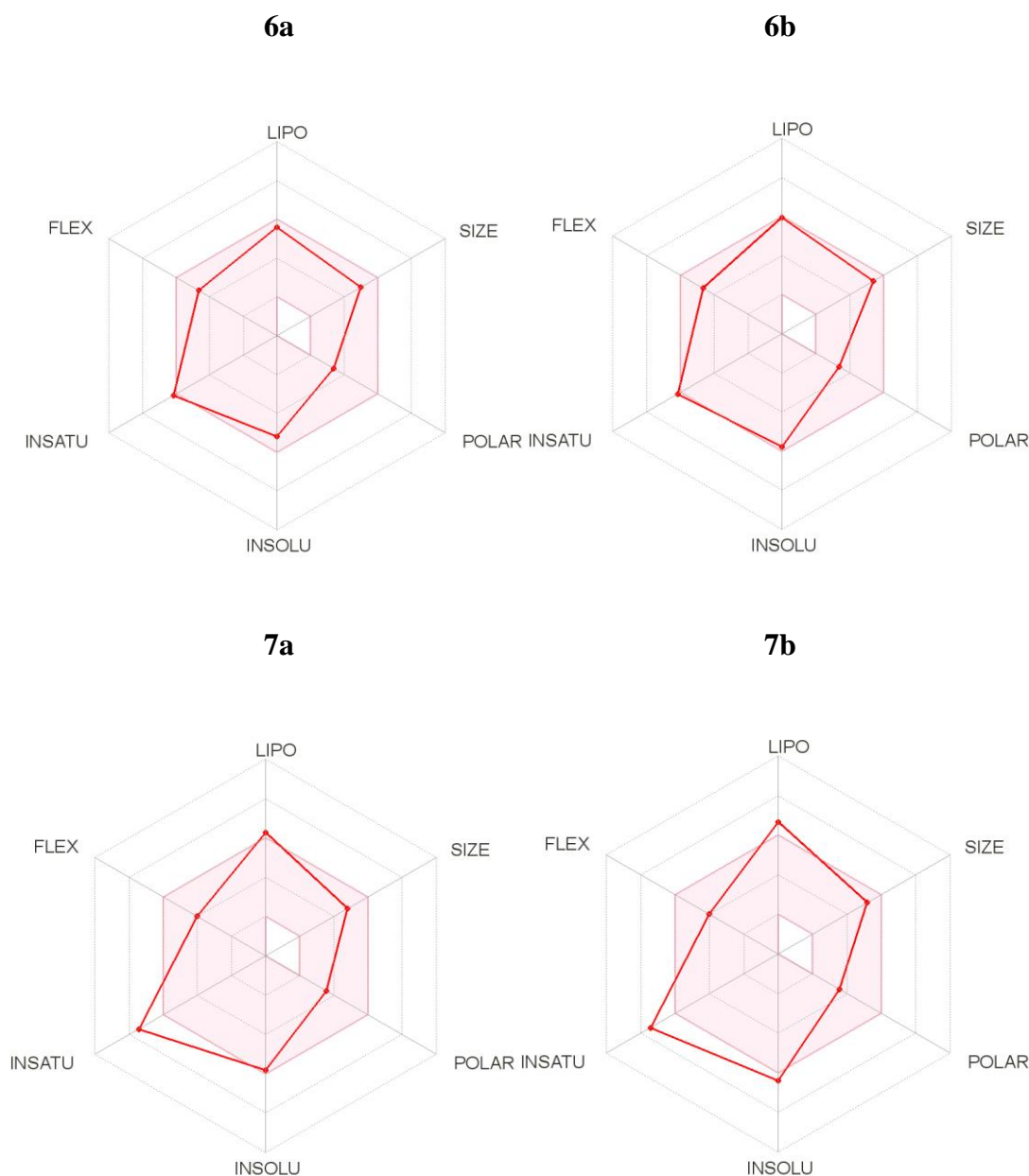
novosintetiziranog lijeka se očekuje dobra oralna bioraspoloživost koja je posljedica apsorpcije lijeka iz gastrointestinalnog trakta. Stoga su postavljeni algoritmi koji uvidom u fizičko-kemijske parametre predviđaju oralnu bioraspoloživost lijeka. Uz izuzetke, većina oralno aktivnih lijekova, zadovoljava Lipinskijevo pravilo 5. Prema Lipinskiju, da bi molekula bila dobre oralne bioraspoloživosti, treba imati relativnu molekulska masu manju od 500, ne smije sadržavati više od 5 donora vodikovih veza, ne smije sadržavati više od 10 akceptora vodikovih veza te izračunata vrijednost logaritma particijskog koeficijenta ($\log P$) mora bit manja od 5 (između -1 do +5) (Lipinski i sur., 1997). Često se primjenjuju i Veberova pravila koja zahtjevaju: polarnost površine (zbroj donora i akceptora vodikovih veza) ne veću od 12, broj rotirajućih veza ne većih od 10 i topološku ploštinu zone polarne površine (TPSA) manju od 140 \AA^2 (Veber i sur., 2002). Tablica 8. nudi prikaz navedenih parametara za konačne produkte iz ovog rada; **6a,b** i **7a,b**.

Tablica 9. Pregled parametara izračunatih putem web aplikacije SwissADME

Spoj	6a	6b	7a	7b
$\log P$	3,70	3,99	3,71	4,03
Broj donora vodikove veze	0	0	1	1
Broj akceptora vodikove veze	4	4	4	4
Zbroj donora i akceptora vodikove veze	4	4	5	5
Broj rotirajućih veza	7	7	6	6
TPSA* (\AA^2)	57,76	57,76	62,63	62,63
Lipinskijeva pravila	4/4	4/4	4/4	4/4
Veberova pravila	3/3	3/3	3/3	3/3

Prema podacima iz Tablice 8., svi spojevi zadovoljavaju i Veberova i Lipinskijeva pravila pa im se predviđa dobra oralna bioraspoloživost.

Grafički prikaz *Bioavailability radar* šest fizičko-kemijskih svojstava koja utječu na oralnu bioraspoloživost preuzet je s aplikacije SwissADME (Slika 24.).

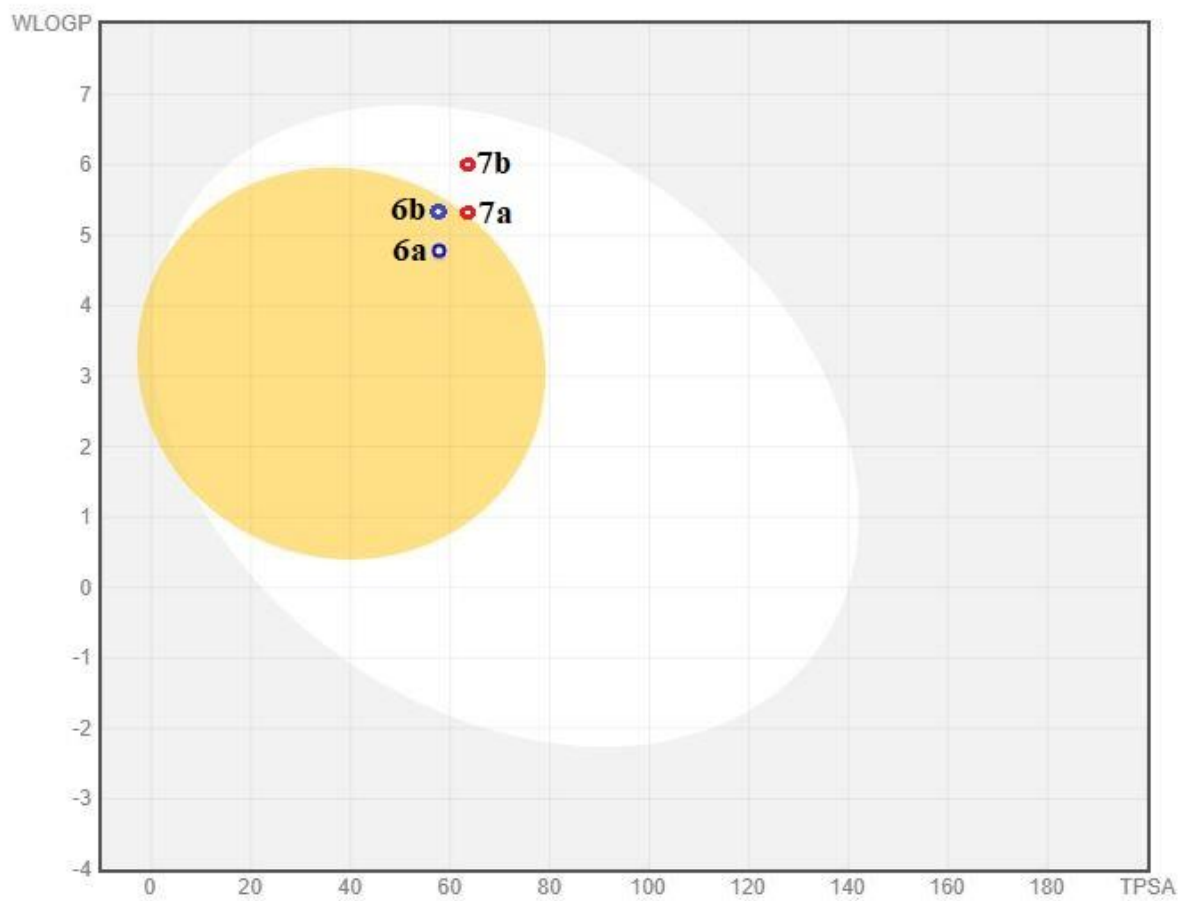


Slika 24. *Bioavailability radar* novosintetiziranih spojeva **6a,b** i **7a,b** (preuzeto s <http://www.swissadme.ch>)

Prikaz sa Slike 24. smješta svaki fizičko-kemijski parametar u jedan vrh šesterokuta, unutar kojega je ružičastim područjem određen optimalan raspon svakog parametra. Parametri uključeni u prikaz su: lipofilnost, veličina molekule, polarnost, netopljivost, nezasićenost i fleksibilnost. Lipofilnost (LIPO) je predstavljena vrijednošću logaritma partijskog koeficijenta, te propisuje vrijednosti od -0,7 do 5. Veličina molekule (SIZE) je predstavljena molekulskom masom, propisuje vrijednosti između 150 i 500 g/mol. Polarnost molekule (POLAR) je predstavljena topološkom ploštinom zone polarne površine (TPSA) određene između 20 i 130 Å². Netopljivost (INSOLU) je predstavljena negativnim logaritmom molarne

topljivosti, i ne smije biti veća od 6. Nezasićenost (INSATU) je predstavljena udjelom ugljika u sp^3 hibridizaciji u odnosu na ukupan broj ugljika, te ne smije biti manja od 0,25. Fleksibilnost (FLEX) je predstavljena brojem rotirajućih veza, i ne smije biti veća od 9 (Daina i sur., 2017). Od šest parametara uzetih u obzir, niti jedan ne zadovoljava sve kriterije, spojevi **6a,b** i **7a** ne zadovoljavaju nezasićenost molekule (0,24; 0,24; 0,16), dok spoj **7b** uz nezasićenost molekule (0,16) ne zadovoljava i netopljivost (6,41) (Slika 24.).

Grafički prikaz Boiled EGG model predviđa farmakokinetičke parametre poput gastrointestinalne apsorpcije i moždane penetracije na osnovu fizičko-kemijskih parametara lipofilnosti i polarnosti molekule (Slika 25.). Za molekule označene crvenom točkom, prikaz ukazuje da nisu supstrati P-glikoproteina, dok za molekule označene plavom točkom ukazuje da jesu supstrati P-glikoproteina. P-glikoproteini su membranski proteini uključeni u transport brojnih spojeva te su izraženije prisutni u tankom crijevu, jetri, bubrezima, i krvno moždanoj barijeri. Specifični su za vrlo široki niz supstrata, te stoga mogu prenositi/istisnuti veliki broj lijekova. Oni se protive unutarstaničnom nakupljanju molekula lijeka koje su im supstrati istiskujući ih natrag iz stanice, u lumen crijeva ili u krvotok, ometajući na taj način bilo apsorpciju ili ciljano djelovanje lijeka supstrata. Primjerice, prekomjerna ekspresija P-glikoproteina u tumorskim stanicama je važan mehanizam rezistencije na brojne antitumorske lijekove, dok kod bakterija P-glikoproteini doprinose otpornosti na antibiotike (Jalšenjak i sur., 1998). Za molekule koje se nalaze unutar žutog područja, prikaz predviđa da bi mogle prelaziti krvno-moždanu barijeru, dok za molekule koje se nalaze unutar bijelog područja predviđa pasivnu apsorpciju u probavnom traktu (Daina i sur., 2017). Sa Slike 25. vidljivo je da za spojeve **6a,b** model predviđa da su supstrati P-glikoproteina dok **7a,b** to nisu. Također, za **7a,b** spojeve je predviđena pasivna apsorpcija u probavnom traktu, dok je za **6a,b** predviđena mogućnost prelaska krvno-moždane barijere.



Slika 25. *Boiled EGG* model novosintetiziranih spojeva **6a,b** i **7a,b** (preuzeto s <http://www.swissadme.ch>)

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu opisana je sinteza novih 1,2,3-triazolskih derivata harmina koji u svojoj strukturi sadrže derivate cimetine kiseline. Sinteza i karakterizacija provedena je u okviru istraživanja derivata harmina kao potencijalnih antimalarijskih lijekova koje se provodi proteklih nekoliko godina na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Sintetizirani su i karakterizirani sljedeći spojevi koji do sada nisu opisani u literaturi:

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

Opisana je i sinteza prekursora u sintezi, harmola, *N*-propargiliranog harmina (**2**), *O*-propargiliranog harmola (**1**), te azida cimetine (**5a**) i 4-klorocimetine kiseline (**5b**), koji su već opisani u literaturi.

Svim novosintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta.

Za konačne produkte (**6a,b** i **7a,b**) je temeljem izračuna molekularnih deskriptora napravljena računalna predikcija njihovih farmakokinetičkih svojstava., najvažnije od kojih je oralna bioraspoloživost.

U daljnjim ispitivanjima, koja prelaze okvir ovog rada, sintetiziranim derivatima je ispitano antimalarijsko i citotoksično djelovanje.

6. LITERATURA

Azide, 2020, <https://en.wikipedia.org/wiki/Azide>, pristupljeno 12.5.2020.

Becher PG, Beuchat J, Gademann K, Jüttner F. Nostocarboline: isolation and synthesis of a new cholinesterase inhibitor from *Nostoc 78-12A*. *J Nat Prod*, 2005, 68, 1793-1795.

Beus M, Fontinha D, Held J, Rajic Z, Uzelac L, Kralj M, Prudêncio M, Zorc B. Primaquine and chloroquine fumardiamides as promising antiplasmodial agents. *Molecules*, 2019, 24, pii E2812.

Bonazzi S, Barbaras D, Patiny L, Scopelliti R, Schneider P, Cole S T, Kaiser M, Brun R, Gademann, K. Antimalarial and antitubercular nostocarboline and eudistomin derivatives: Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 18, 1464-1476.

Boursereau, Y; Coldham, Synthesis and biological studies of 1-amino β carbolines. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14, 5841-5844.

Cao R, Fan W, Guo L, Ma Q, Zhang G, Li J, Qiu L. Synthesis and structure–activity relationships of harmine derivatives as potential antitumor agents. *Eur J Med Chem*, 2012, 60, 135-143.

Cao R, Guan X, Shi B, Chen Z, Ren Z, Peng W, Song H. Design, synthesis and 3D-QSAR of β -carboline derivatives as potent antitumor agents. *Eur J Med Chem*, 2010, 45, 2503-2515.

Cao, R, Peng W, Chen H, Hou X, Guan H, Chen Q, Ma Y, Xu A. Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of 1,3-bisubstituted and 1,3,9-trisubstituted beta-carboline derivatives. *Eur J Med Chem*, 2005a, 40, 249-257.

Cao R, Peng W, Chen H, Ma Y, Liu X, Hou X, Guan H, Xu A. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005b, 338, 1557-1563.

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

Chen Q, Chao R, Chen H, Hou X, Yan H, Zhou S, Peng W, Xu A. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *Int J Cancer*, 2004, 114, 675– 682.

Cinnamic acid, 2020, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamic-acid>, pristupljeno 11.5.2020.

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.

De P, Bedos-Belval F, Vanucci-Bacque C, Baltas M. Cinnamic Acid Derivatives in Tuberculosis, Malaria and Cardiovascular Diseases - A Review. *Curr Org Chem*, 2012, 16, 747-768.

Dias A, Varela AP, Macanita AL, Becker RS. β -Carboline photosensitizers. Photophysics, kinetics and excited-state equilibria in organic solvents, and theoretical calculations. *J Phys Chem*, 1992, 96, 10290-1296.

Dodd RH, Ouannes C, Robert-Gero M, Potier P. Hybrid molecules: growth inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy-beta-carbolines. *J Med Chem*, 1989, 32, 1272-1276.

Evans AT, Croft SL. Antileishmanial activity of harmaline and other tryptamine derivatives. *Phytother Res*, 1987, 1, 25-27.

Farouk L, Laroubi A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L: Possible mechanisms involved. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115, 449-454.

Filali I, Belkacem MA, Ben Nejma A, Souchard JP, Ben Jannet H, Bouajila J. Synthesis, cytotoxic, anti-lipoxygenase and anti-acetylcholinesterase capacities of novel derivatives from harmine. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31, 23-33.

Filali I, Bouajila J, Znati M, Bousejra-El Garah F, Ben Jannet H. Synthesis of new isoxazoline derivatives from harmine and evaluation of their anti-Alzheimer, anti-cancer and anti-inflammatory activities. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2015, 30, 371-376.

Frédéric R, Bruyère C, Vancraeynest C, Reniers J, Meinguet C, Pochet L, Backlund A, Masereel B, Kiss R, Wouters J. Novel trisubstituted harmine derivatives with original in vitro anticancer activity. *J Med Chem*, 2012, 55, 6489-6501.

Frost D, Meechoovet B, Wang T, Gately S, Giorgetti M, Shcherbakova I, Dunckley T. β -Carboline Compounds, Including Harmine, Inhibit DYRK1A and Tau Phosphorylation at Multiple Alzheimer's Disease-Related Sites. *PLoS One*, 2011, 6, ppi: E19264.

Gibbons S, Arunotayanun W. Natural product Fungal and herbal. U: Novel psychoactive substances. Dargan P, Wood D, Academic Press, 2013, str. 345-362.

Giorgio C, Delmas F, Ollivier E, Elias R, Balansard G, Timon-David P. In vitro activity of the beta-carboline alkaloids harmane, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol*, 2004, 106, 67-74.

Guzman JD. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules*, 2014, 19, 1292-1349.

Hamsa TP, Kuttan G. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649, 64-73.

Harmine, 2020, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Harmine>, pristupljeno 23.01.2020.

Harmaline, 2020, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Harmaline>, pristupljeno 23.01.2020.

Harmalol, 2020, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Harmalol>, pristupljeno 23.01.2020.

Hou J, Liu X, Shen J, Zao G, Wang PG. The impact of click chemistry in medicinal chemistry. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7, 489-501.

Ishida J, Wang H, Bastow KF, Hu CQ, Lee KH. Antitumor agents 201. Cytotoxicity of harmine and beta-carboline analogs. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9, 3319-3324.

Im JH, Jin YR, Lee JJ, Yu JY, Han XH, Im SH, Hong JT, Yoo HS, Pyo MY, Yun P. Antiplatelet activity of β -carboline alkaloids from *Peganum harmala*: A possible mechanism through inhibiting PLC γ 2 phosphorylation. *Vasc pharmacol*, 2009, 5-6, 147-152.

Imlay LS, Armstrong CM, Masters MC, et al. *Plasmodium* IspD (2-C-Methyl-D-erythritol 4-Phosphate Cytidyltransferase), an Essential and Druggable Antimalarial Target. *ACS Infect Dis*, 2015, 1(4), 157-167.

- Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str 148.
- Kanaani J, Ginsburg H. Effects of cinnamic acid derivatives on in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and on the permeability of the membrane of malaria-infected erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36, 1102-1108.
- Kardono LBS, Angerhofer CK, Tsauri S, Padmawinata K, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Cytotoxic and Antimalarial Constituents of the Roots of *Eurycoma longifolia*. *J Nat Prod*, 1991, 54, 1360-1367.
- Kategaonkar AH, Shinde PV, Kategaonkar AH, Pasale SK, Shingate BB, Shingare MS. Synthesis and biological evaluation of new 2-chloro-3-((4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)quinoline derivatives via click chemistry approach. *Eur J Med Chem*, 2010, 45, 3142–3146.
- Khan FA, Maalik A, Iqbal Z, Malik I. Recent pharmacological developments in β -carboline alkaloid “harmaline”. *Eur J Pharmacol*, 2013, 721, 391-394.
- Kim H, Sablin SO, Ramsay RR. Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 337, 137-142.
- Kitamura M, Koga T, Yano M, Okauchi T. Direct Synthesis of Organic Azides from Alcohols Using 2-Azido-1,3-dimethylimidazolium Hexafluorophosphate. *Synlett*, 2012, 23, 1335-1338.
- Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem*, 2001, 11, 2004-2021.
- Kukula-Koch WA, Widelski J. Alkaloids. U: Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies. Badal S, Delgoda R. Academic Press, 2017, str.163-198.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev*, 1997, 23, 3-5.
- May T, Rommelspacher H, Pawlik MJ. Harmane binding experiments. *Neurochem*, 1991, 56, 490-499.
- McIsaac W M, Farrell G. Adrenoglomerulotropin. *Arch Biochem Biophys*, 1961, 94, 543-544.

McKenna DJ, Towers GH, Abbott F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and beta-carboline constituents of ayahuasca. *J Ethnopharmacol*, 1984, 2, 195-223.

Meinguet C, Bruyère C, Frédérick R, et al. 3D-QSAR, design, synthesis and characterization of trisubstituted harmine derivatives with in vitro antiproliferative properties. *Eur J Med Chem*, 2015, 94, 45-55.

Meunier B. Hybrid molecules with a dual mode of action: Dream or reality? *Acc Chem Res*, 2008, 41, 69-77.

Moles E, Galiano S, Gomes A, Quiliano M, Teixeira C, Aldana I, Gomes P, Fernández-Busquets X. ImmunoPEGLiposomes for the targeted delivery of novel lipophilic drugs to red blood cells in a falciparum malaria murine model. *Biomaterials*, 2017, 145, 178-191.

Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, Asghari H, Shayegh J. Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. *Pharmacogn Rev*, 2013, 7, 199-212.

Monsef HR, Ghobadi A, Iranshahi M, Abdollahi M. Antinociceptive effects of Peganum harmala L. alkaloid extract on mouse formalin test. *J Pharm Pharm Sci*, 2004, 7, 65-69.

Naranjo C. Psychotropic properties of harmala alkaloids. U: Ethnopharmacological search for psychoactive drugs, Efron DK, Holmstedt B, Kline NS Washington DC, U.S. Government printing office, 1967, str. 385-391.

Patel K, Gadewar M, Tripathi R, Prasad SK, Dinesh Kumar Patel A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid ‘‘Harmine’’. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 8, 660-664.

Pavic K, Perkovic I, Gilja P, Kozlina F, Ester K, Kralj M, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E, Zorc B. Design, synthesis and biological evaluation of novel primaquine-cinnamic acid conjugates of the amide and acylsemicarbazide type. *Molecules*. 2016, 21, pii: E1629.

Peganum harmala, 2020,
https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Peganum_harmala&oldid=934090391,
pristupljeno 2.2.2020.

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*, 2013a, 56, 556-567.

Pérez B, Teixeira C, Albuquerque IS, Gut J, Rosenthal PJ, Prudêncio M, Gomes M, PRIMACINS, N-cinnamoyl-primaquine conjugates, with improved liver-stage antimalarial activity, *Med Chem Commun* 2013b, 3, 1170-1172.

Pérez B, Teixeira C, Gut J, Rosenthal PJ, Gomes JR, Gomes P. Cinnamic acid/chloroquinoline conjugates as potent agents against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *ChemMedChem*, 2012, 7, 1537-1540.

Prinsep MR, Blunt JW, Munro MH. New cytotoxic beta-carboline alkaloids from the marine bryozoan, *Cribricellina cribraria*. *J Nat Prod*, 1991, 54, 1068-1076.

Rajić Z, Perković I, Raic-Malic S, Marinovic M, Poje G, Prudencio M; Fontinha D, Held J. Harmicines as novel antiplasmodial leads. *JMMC*, Prag, 2019, 27-27.

Rao KV, Santarsiero BD, Mesecar AD, Schinazi RF, Tekwani BL, Hamann MT. New Manzamine Alkaloids with Activity against Infectious and Tropical Parasitic Diseases from an Indonesian Sponge. *J Nat Prod*, 2003, 66, 823-828.

Reniers J, Robert S, Frederick R, Masereel B, Vincent S, Wouters J. Synthesis and evaluation of β -carboline derivatives as potential monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 19, 134-144.

Réus GZ, Stringari RB, de Souza B, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Hallak JE, et al. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. *Oxid Med Cell Longev*, 2010, 3, 325-331.

Rivas P, Cassels BK, Morello A, Repetto Y. Effects of some beta-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol*, 1999, 122, 27-31.

Shahinas D, MacMullin G, Benedict C, Crandall I, Pillai DR. Harmine Is a Potent Antimalarial Targeting Hsp90 and Synergizes with Chloroquine and Artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56, 4207-4213.

Shankaraiah N, Jadala C, Nekkanti S, Senwar KR, Nagesh N, Shrivastava S, Kamal A. Design and synthesis of C3-tethered 1,2,3-triazolo- β -carboline derivatives: Anticancer activity, DNA-binding ability, viscosity and molecular modeling studies. *Bioorg Chem*, 2016, 64, 42-50.

Shi B, Cao R, Fan W, Guo L, Ma Q, Chen X, Song H. Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel bivalent β -carbolines. *Eur J Med Chem*, 2013, 60, 10-22.

Silva AT, Bento CM, Pena AC, Figueiredo LM, Prudêncio C, Aguiar L, Silva T, Ferraz R, Gomes MS, Teixeira C, Gomes P. Cinnamic Acid Conjugates in the Rescuing and Repurposing of Classical Antimalarial Drugs. *Molecules*, 2019, 25, pii: E66.

Sokmen A, Jones BM, Erturk M. The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 1999, 67, 79-86.

Spillman NJ, Kirk K. The malaria parasite cation ATPase PfATP4 and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2015, 5, 149-162.

Srivastava SK, Agarwal A, Chauhan PMS, Agarwal SK, Bhaduri AP, Singh SN, Fatima N, Chatterjee RK. Potent 1,3-Disubstituted-9H-pyrido[3,4-b]indoles as New Lead Compounds in Antifilarial Chemotherapy *J Med Chem*, 1999, 42, ppi E1667.

Storch A, Hwang YI, Gearhart DA, Beach JW, Neafsey EJ, Collins MA, et al. Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of beta-carbolinium derivatives related to Parkinson's disease: Relationship to transporter-dependent uptake. *J Neurochem*, 2004, 89, 685-694.

Sundberg RJ. Indoles. Charlottesville, Virginia 22901, USA, Academic Press, 1996, str.504.

SwissADME, 2020, <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 14.06.2020.

Tanimoto H, Kakiuchi K. Recent Applications and Developments of Organic Azides in Total Synthesis of Natural Products. *Nat Prod Commun*, 2013, 8, 1021-1034.

Tetrahydroharmine, 2020, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrahydroharmine>, pristupljeno 23.01.2020.

Thompson MJ, Louth JC, Little SM, Jackson MP, Boursereau Y, Chen B, Coldham I. Synthesis and Evaluation of 1-Amino-6-halo- β -carbolines as Antimalarial and Antiprion Agents. *ChemMedChem*, 2012, 7, 578-586.

Tireli M, Maračić S, Lukin S, Juribašić Kulcsar M, Žilić D, Cetina M, Halasz I, Raić-Malić S, Užarević K. Solvent-free copper-catalyzed click chemistry for the synthesis of novel N-heterocyclic hybrids based on quinolone and 1, 2, 3-triazole. *Beilstein J Org Chem*, 2017, 13, 2352-2363.

Varela AP, Burrows HD, Graca Miguel M, Douglas P, Triplet state studies of β -carbolines. *J Photochem Photobiol A*, 2001, 146, 29-36.

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.

Viegas-Junior CJ, Barreiro E, Manssour Fraga CA. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Curr Med Chem*, 2007, 14, 1829-1852.

Waki H, Park KW, Mitro N, Pei L, Damoiseaux R, Wilpitz DC, et al. The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPAR gamma expression. *Cell Metab*, 2007, 5, 357-370.

World Health Organization, 2020, <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>, pristupljeno 16.5.2020

Xiao S, Lin W, Wang C, Yang M. Synthesis and biological evaluation of DNA targeting flexible side-chain substituted beta-carboline derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11, 437-441.

Yonezawa T, Hasegawa S, Asai M, Ninomiya T, Sasaki T, Cha BY, et al. Harmine, a β -carboline alkaloid, inhibits osteoclast differentiation and bone resorption in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650, 511-518.

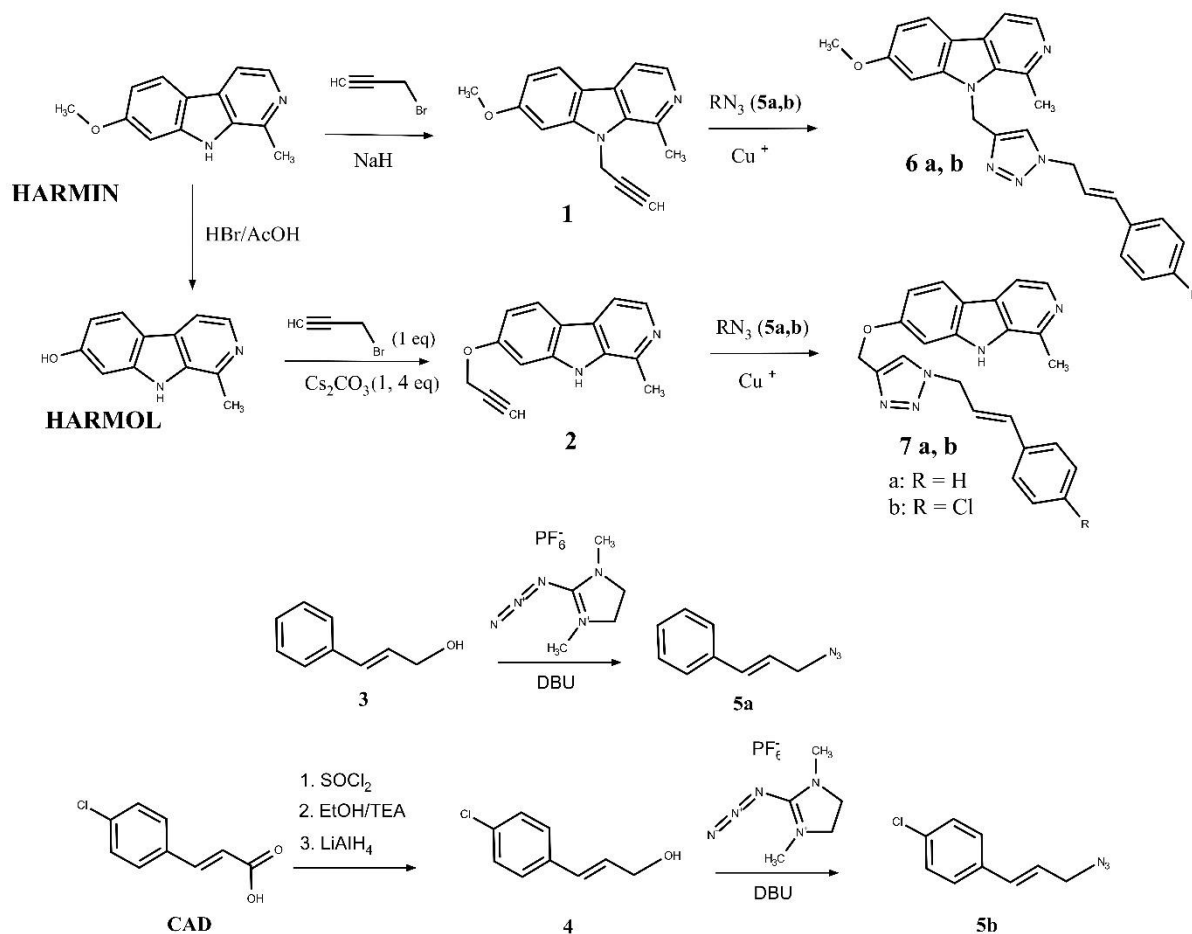
Zhao M, Bi L, Bi W, Wang C, Yang Z, Ju J, Peng S. Synthesis of new class dipeptide analogues with improved permeability and antithrombotic activity. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14, 4761-4774.

Zhao T, Ding K, Zhang L, Cheng X, Wang C, Wang Z. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities of β -Carboline and Quinoline Alkaloids Derivatives from the Plants of Genus *Peganum*. *J Chem (Special issue: Bioactive natural products)*, 2013, Volume 2013, 48-53.

7. SAŽETAK /SUMMARY

Sinteza i karakterizacija harmicina; novih 1,2,3-triazolskih derivata harmina i cimetine kiseline

Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija četiriju novih *harmicina*, hibridnih spojeva koji preko triazolske poveznice vežu dva farmakofora s antimalarijskim učinkom u jednu molekulu; β -karboline harmin ili harmol te derivate cimetine kiseline (CAD).



Za sintezu ciljanih spojeva odabran je prikazani reakcijski put koji je uključio prevođenje derivata cimetine kiseline u azide (**5a,b**), dok su harmin i harmol u reakcijama *N*- i *O*-propargiliranja iskorišteni za dobivanje redom *N* i *O*-alkina (**1,2**). Terminalni alkini **1** i **2** s azidima dobivenim iz derivata cimetine kiseline (**5a,b**) u reakciji Huisgenove cikloadicije katalizirane bakrom (I) dali su konačne produkte, 1,2,3-triazolske derivate harmina i cimetine kiseline (**6a,b** i **7a,b**).

Svim novosintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta.

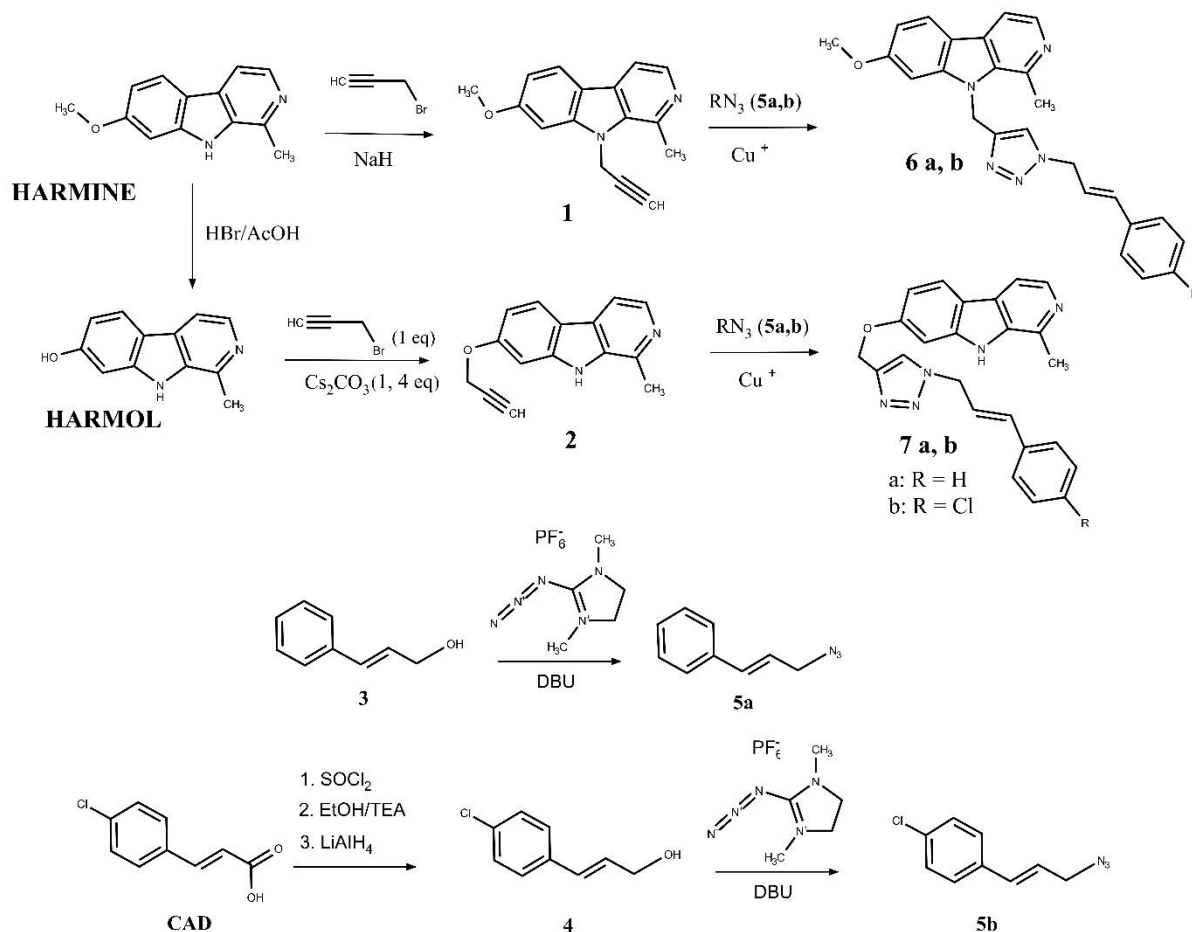
Za konačne produkte (**6a,b** i **7a,b**) je temeljem izračuna molekulskih deskriptora napravljena računalna predikcija njihovih farmakokinetičkih svojstava., najvažnije od kojih je oralna bioraspoloživost.

U daljnjim ispitivanjima, koja prelaze okvir ovog rada, sintetiziranim derivatima je ispitano antimalarijsko i citotoksično djelovanje.

Ključne riječi: harmin, derivati cimetine kiseline, organski azidi, *click* kemija, Huisgenova cikloadicija, antimalarici

Synthesis and characterization of harmicines; novel 1,2,3-triazole derivatives of harmine and cinnamic acid

The aim of this thesis was synthesis and characterization of four new *harmicines*, hybrids which through triazole spacer comprise two pharmacophores with antimalarial activity into single molecule; *i.e.* β -carboline harmine or harmol and cinnamic acid derivatives (CAD).



The shown reaction pathway chosen for the synthesis of final compounds has included obtaining azides **5a,b** from cinnamic acid derivatives in several steps, while harmine and harmol have generated *N*- and *O*-alkynes (**1,2**) in the reactions of *N*- and *O*-propargylations. Cu(I) catalyzed organic azide-terminal alkyne cycloaddition was employed for preparation of final 1,2,3-triazole *N*- (**6a,b**) and *O*- derivatives (**7a,b**) of harmine and cinnamic acid from above mentioned reactants.

The structures of the newly synthesized compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS). Besides, the melting points of solid compounds were determined.

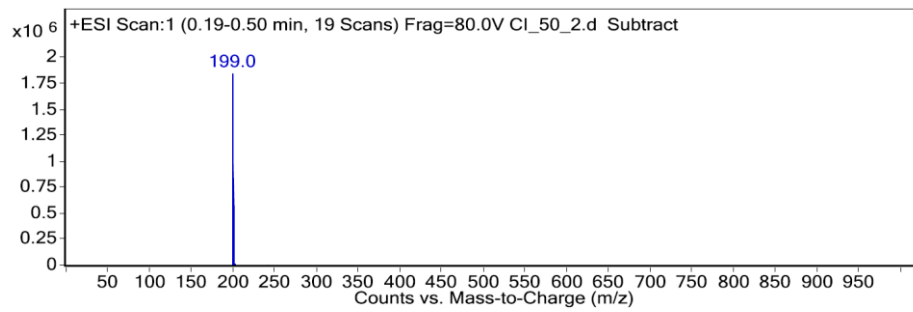
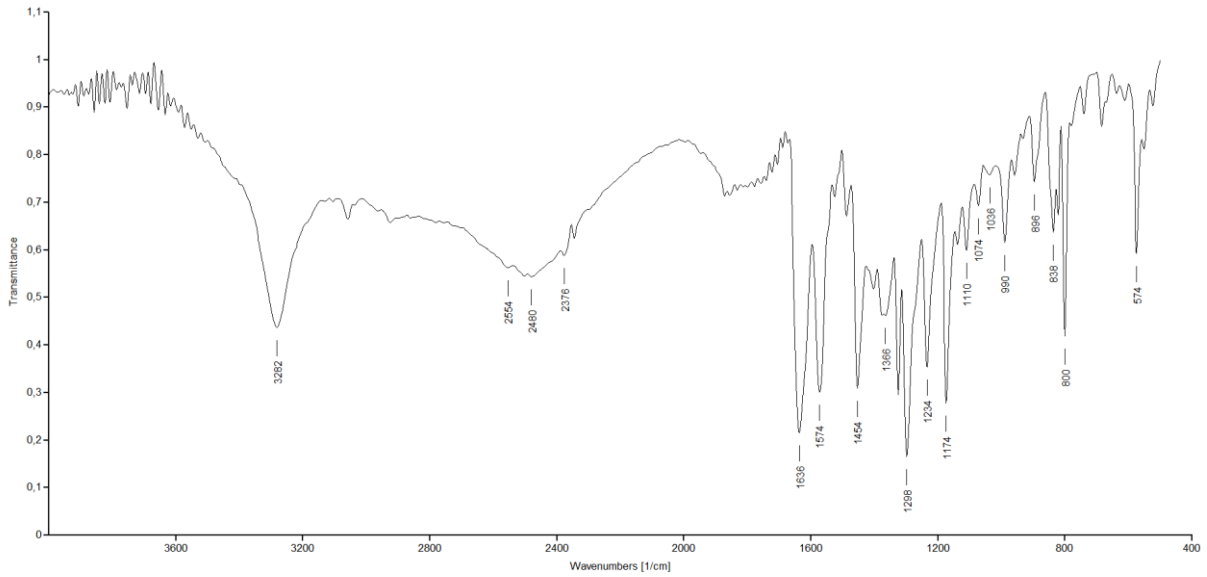
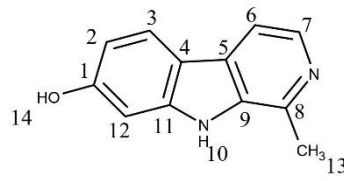
Computer models have been fostered for the prediction of pharmacokinetical properties of the final compounds (**6a,b** i **7a,b**), most important property being oral bioavailability.

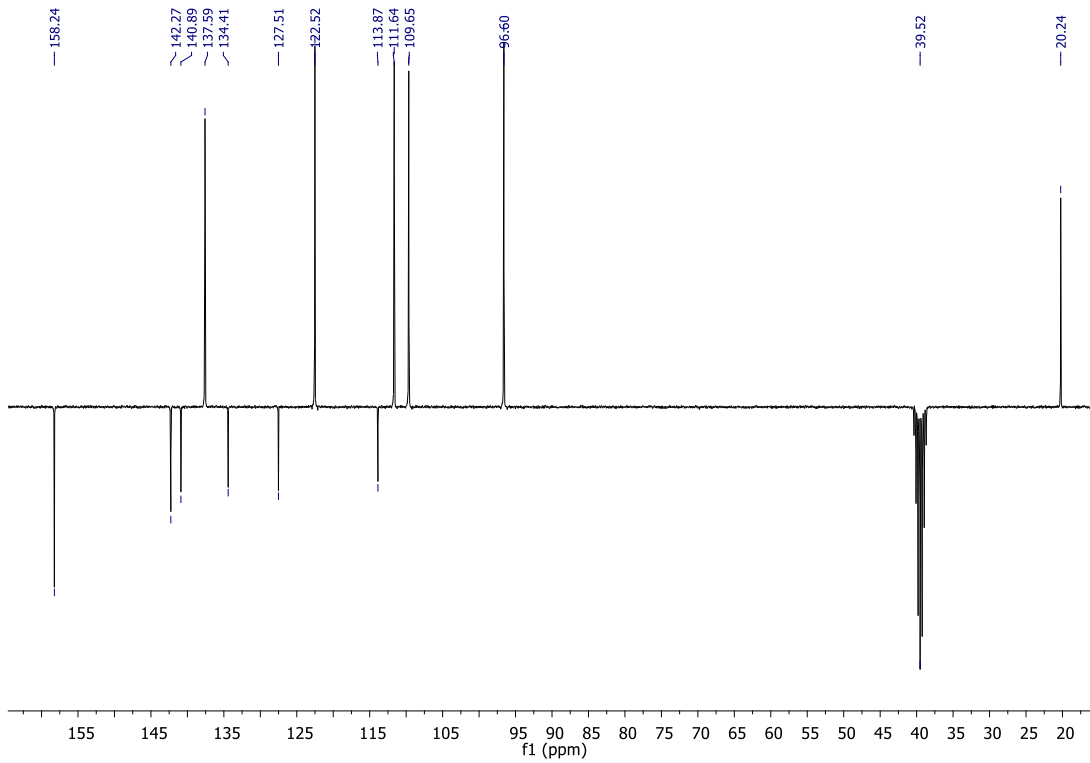
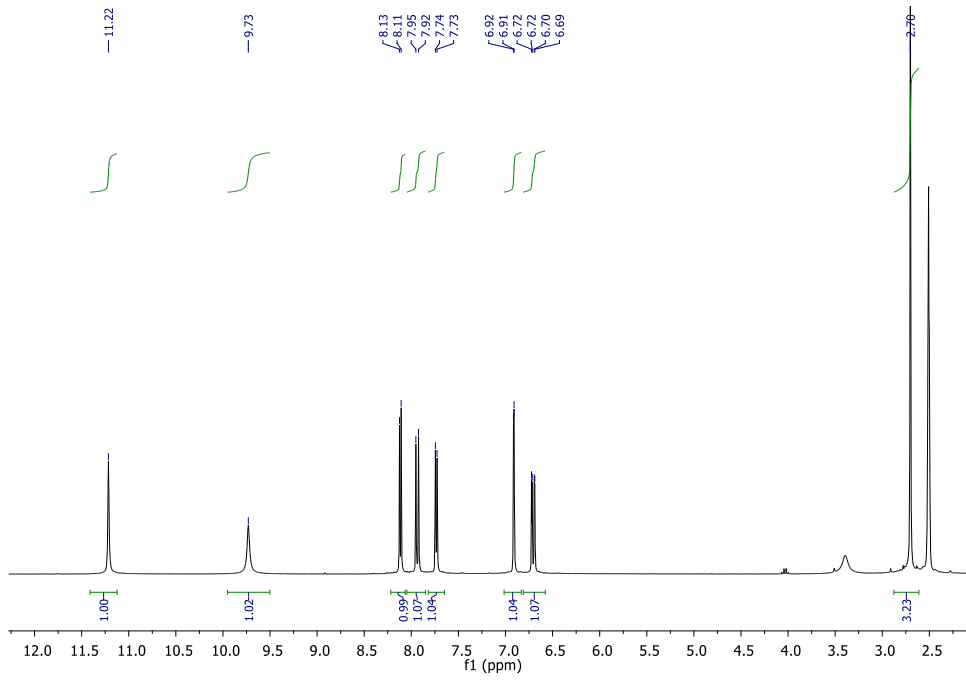
Subsequent studies, that have surpassed this thesis, had also investigated antimalarial and citotoxic activity of the final compounds.

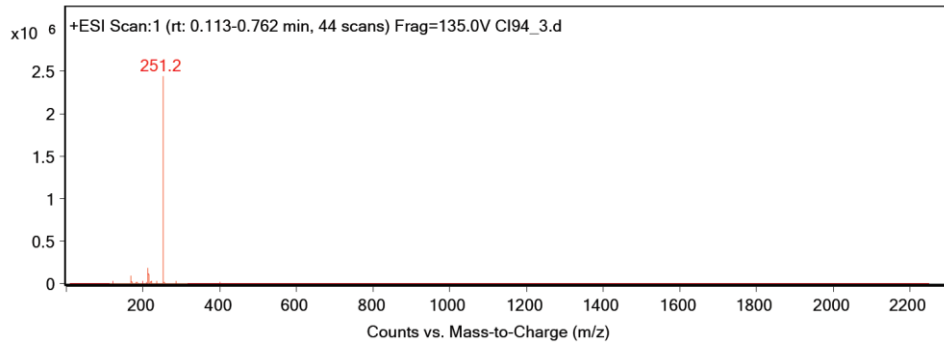
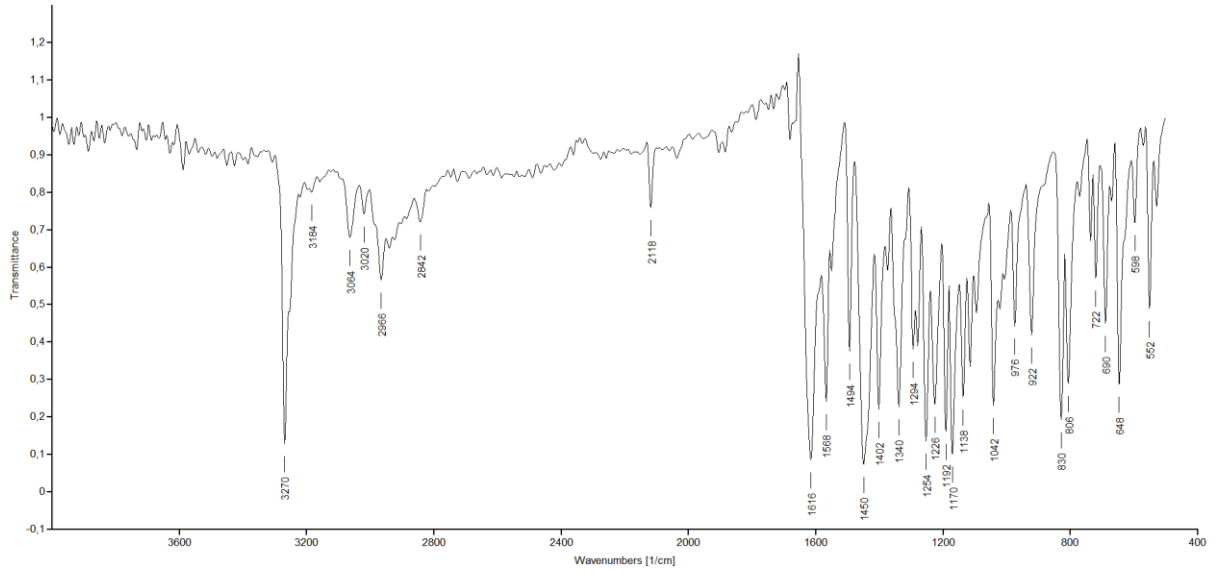
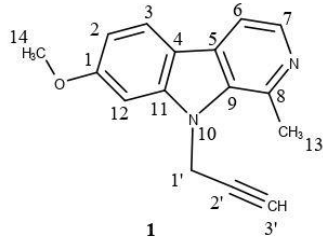
Keywords: harmine, cinnamic acid derivatives, organic azides, *click* chemistry, Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition, antimalarial drugs

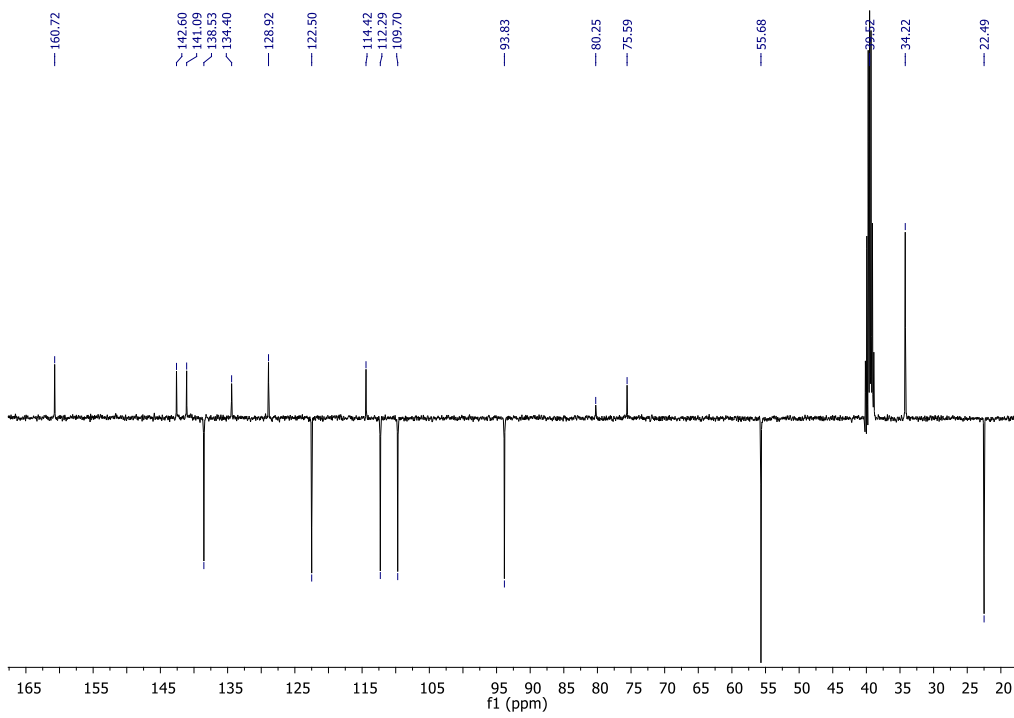
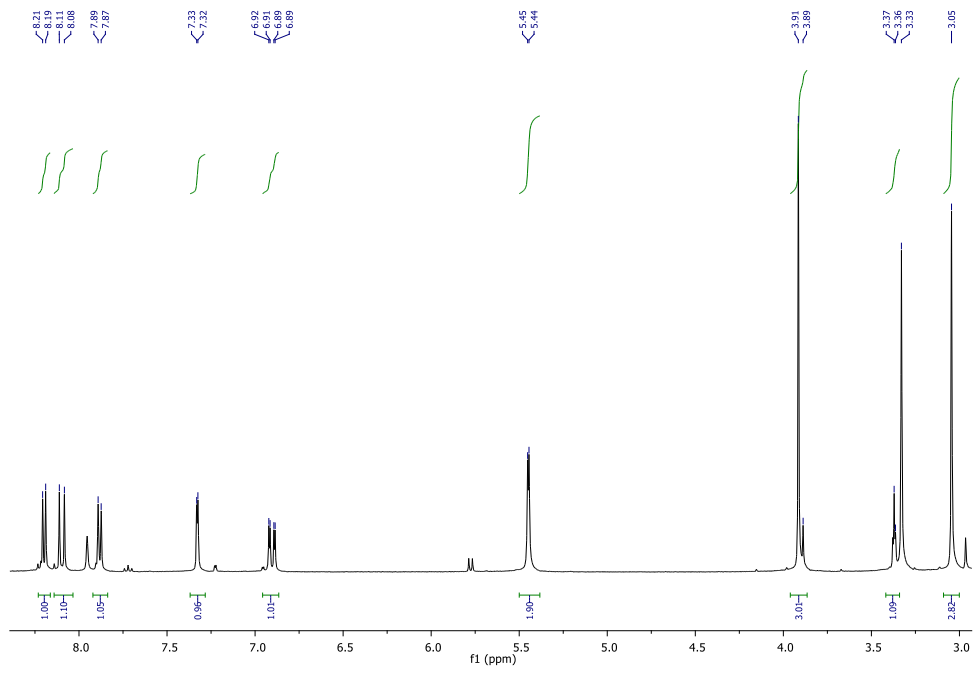
8. PRILOZI

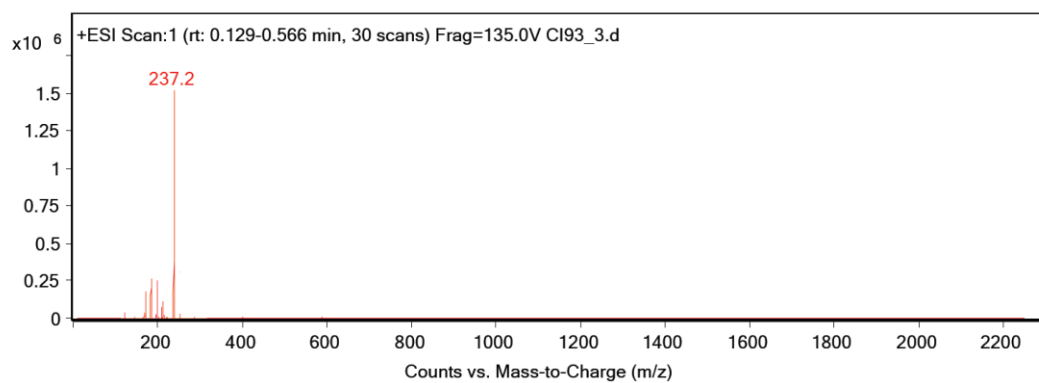
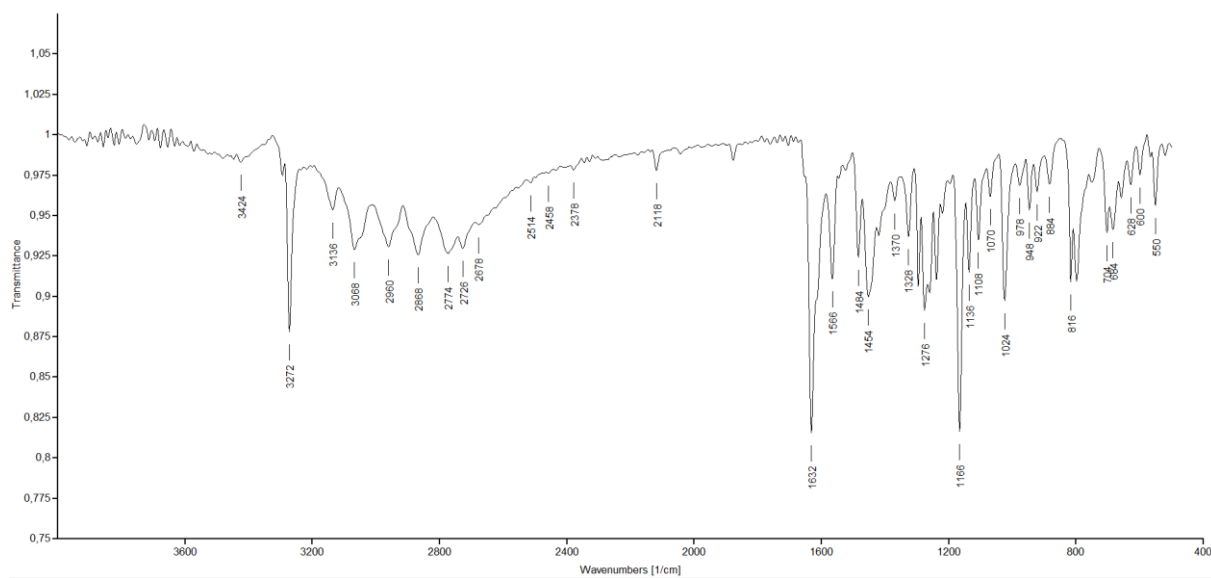
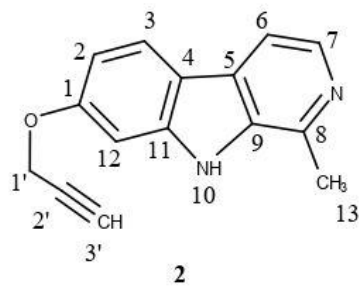
Harmol

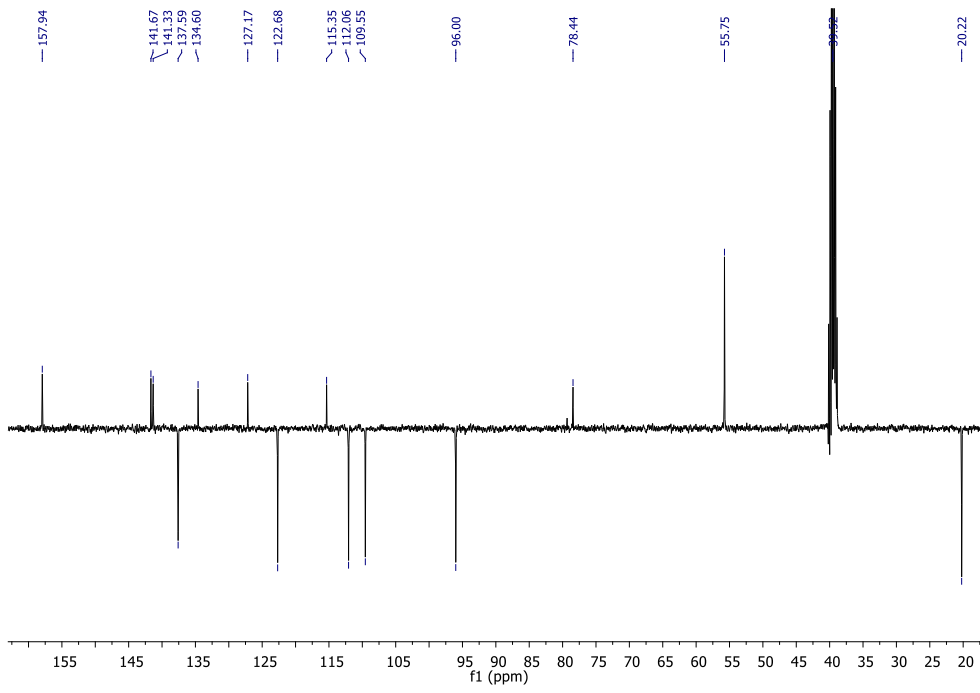
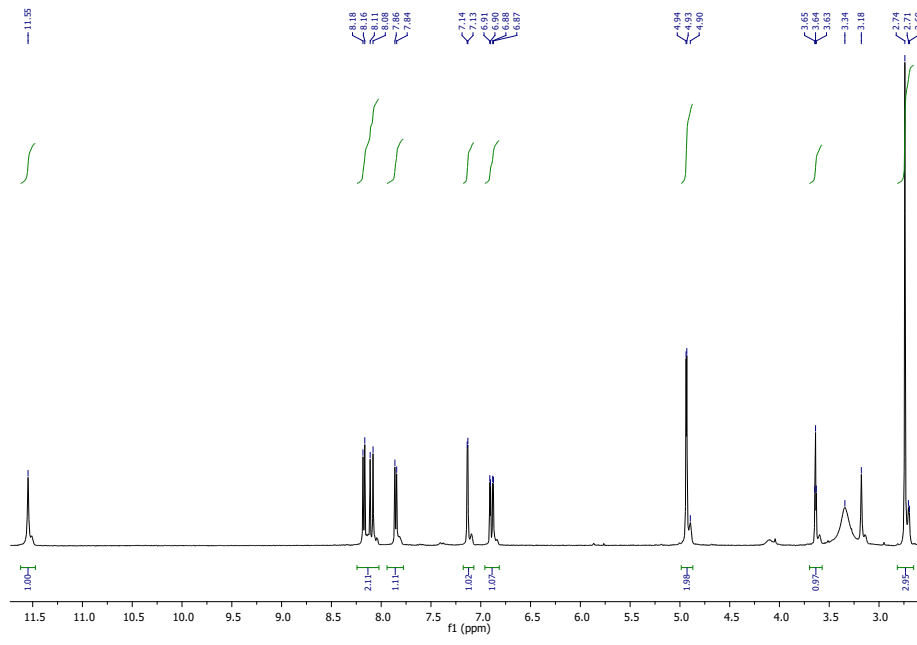




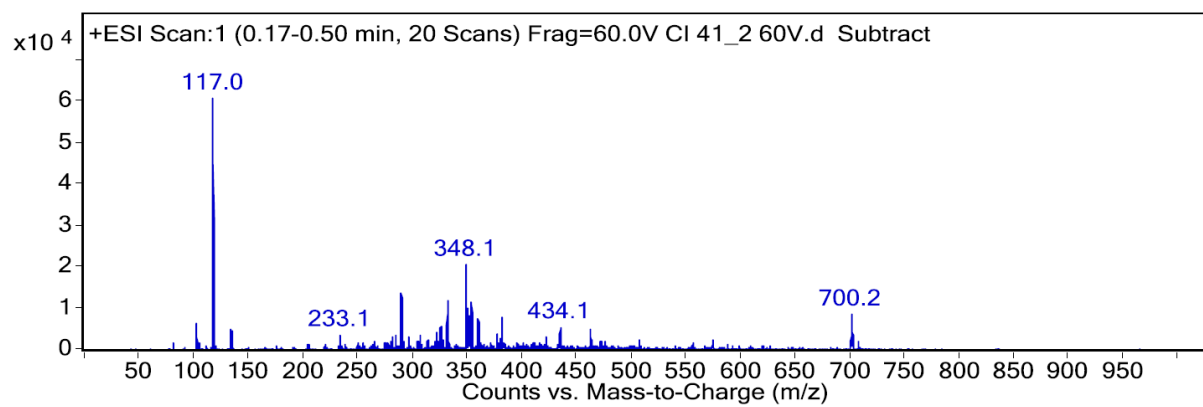
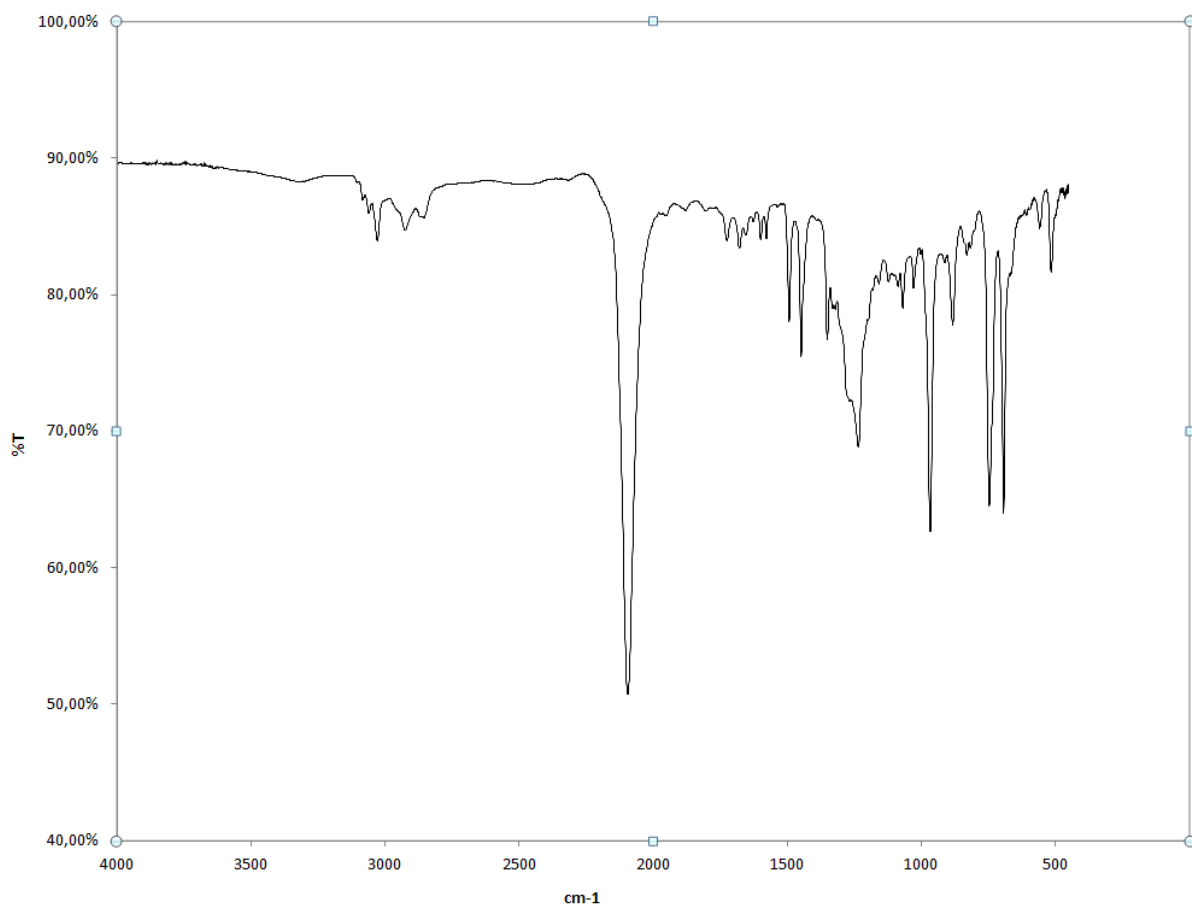
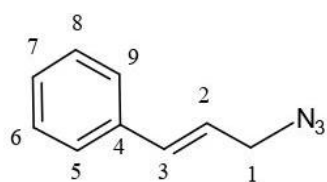


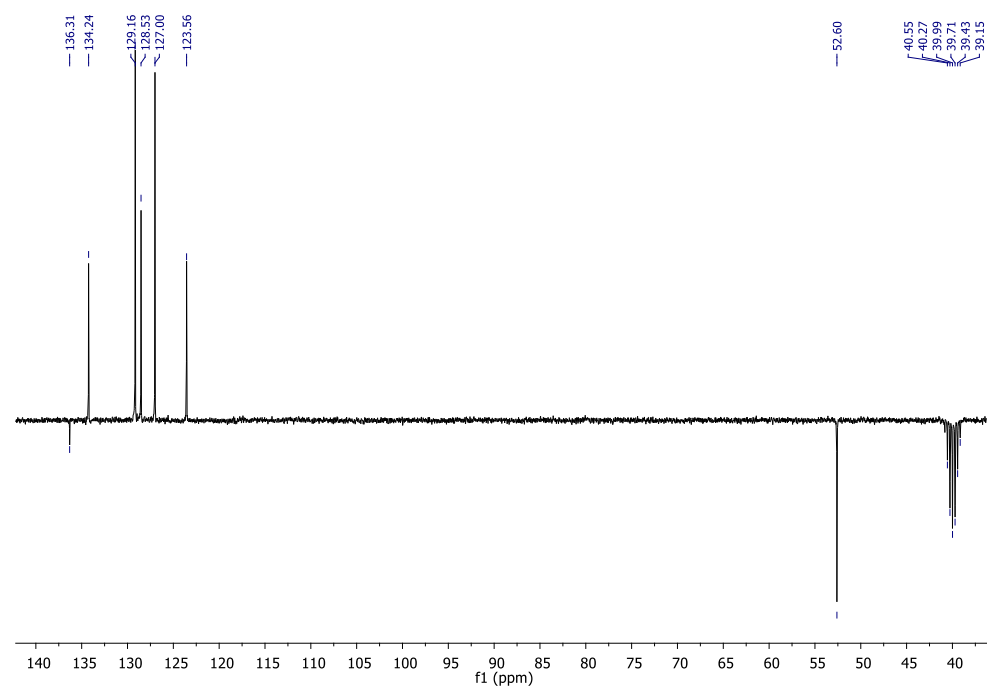
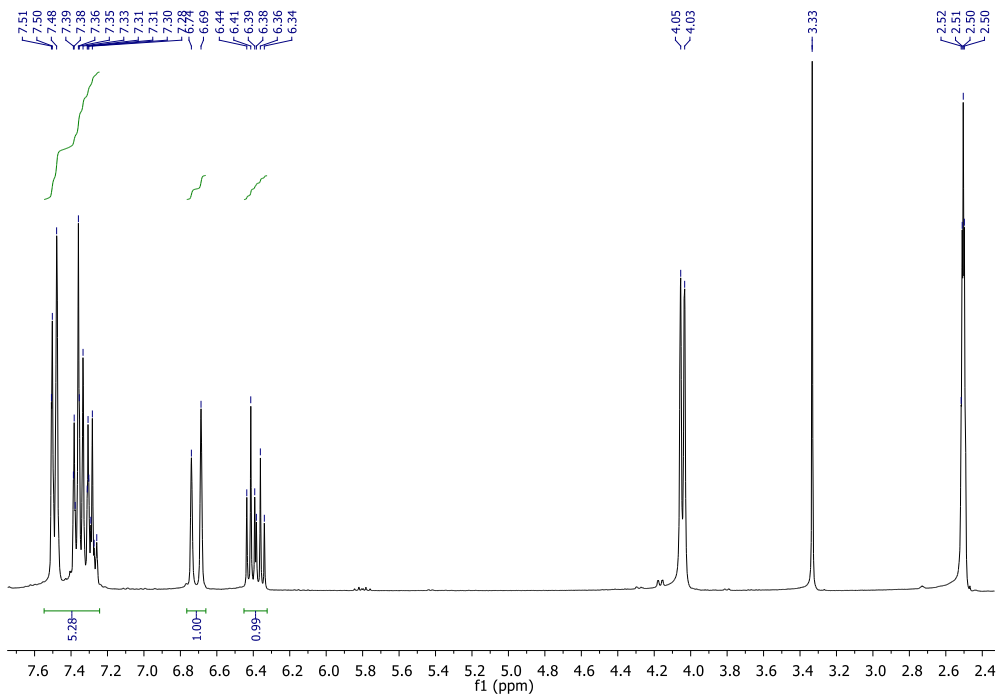




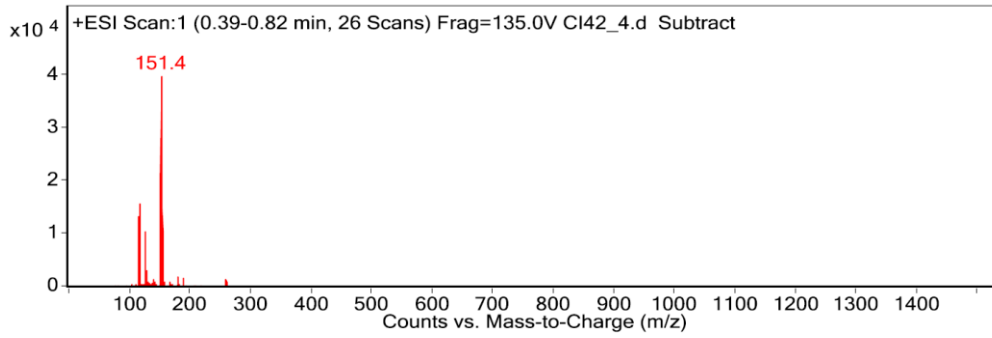
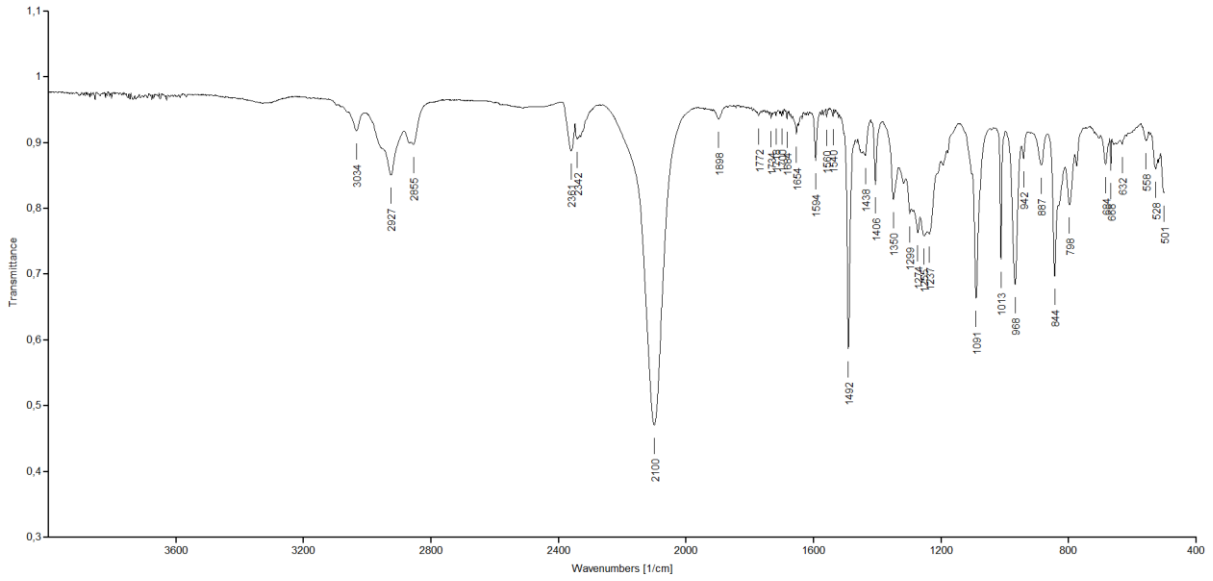
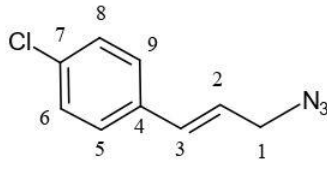


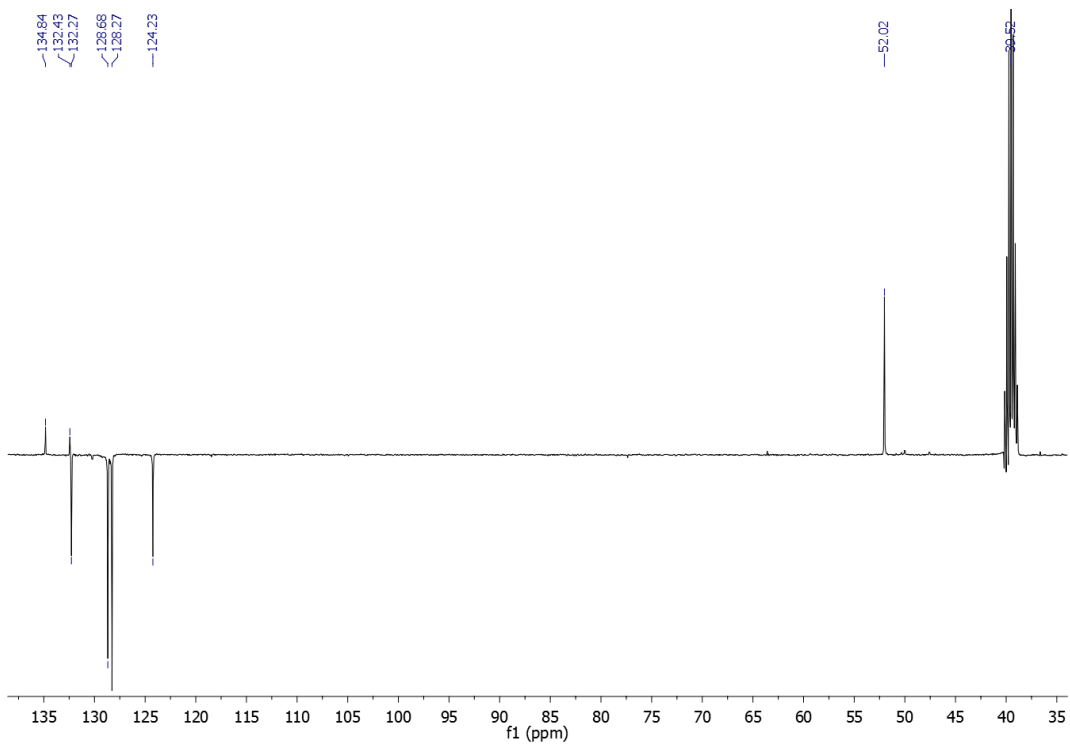
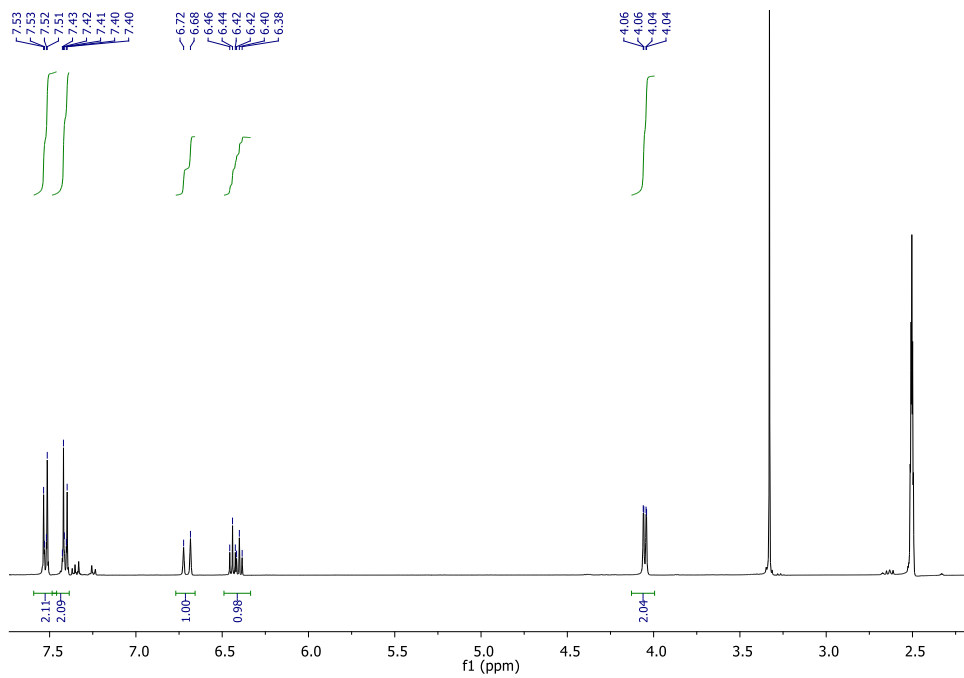
5a



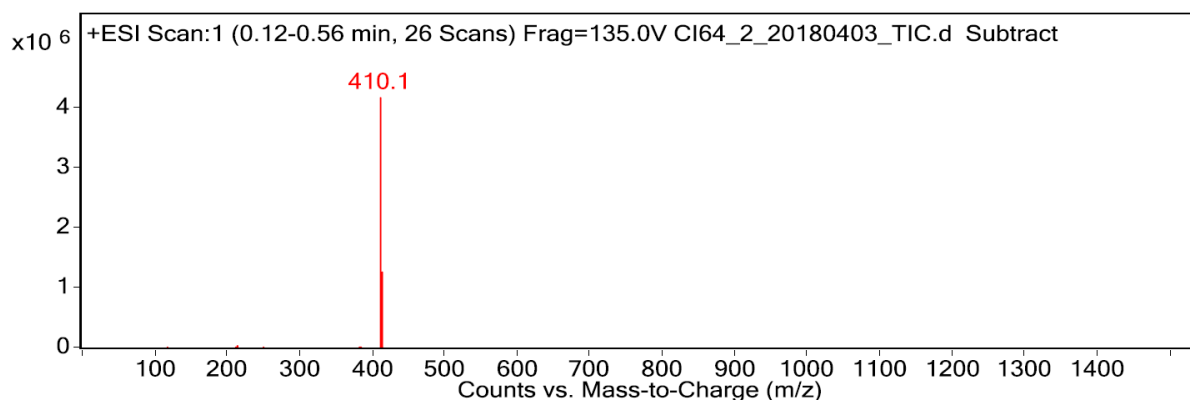
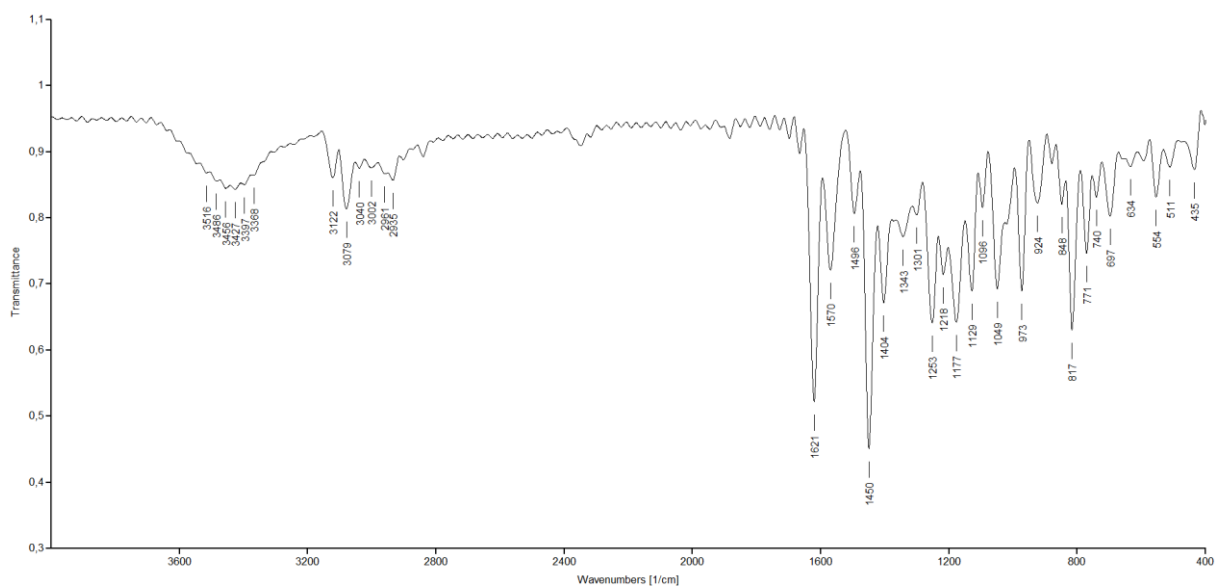
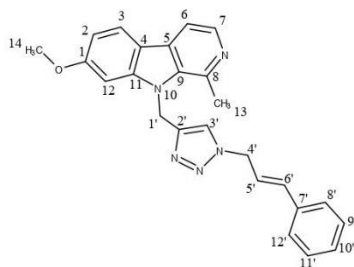


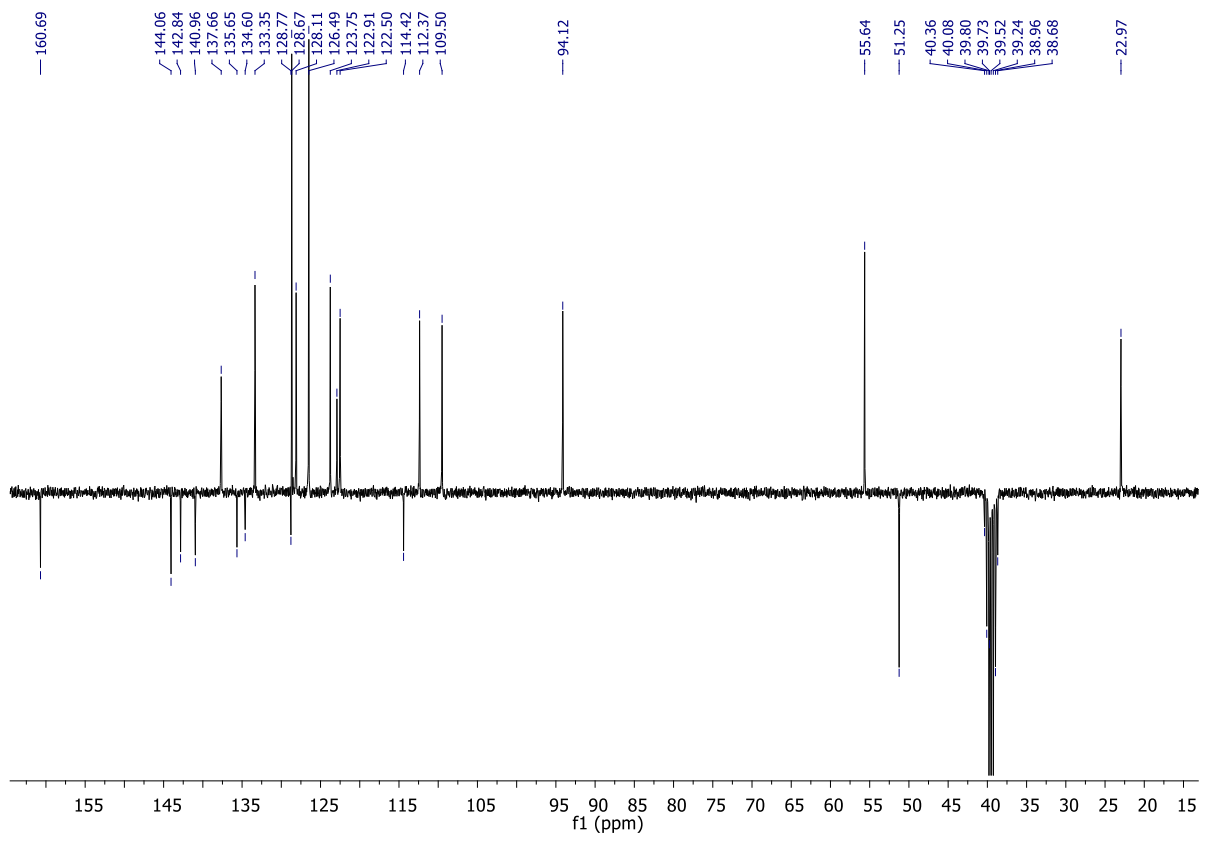
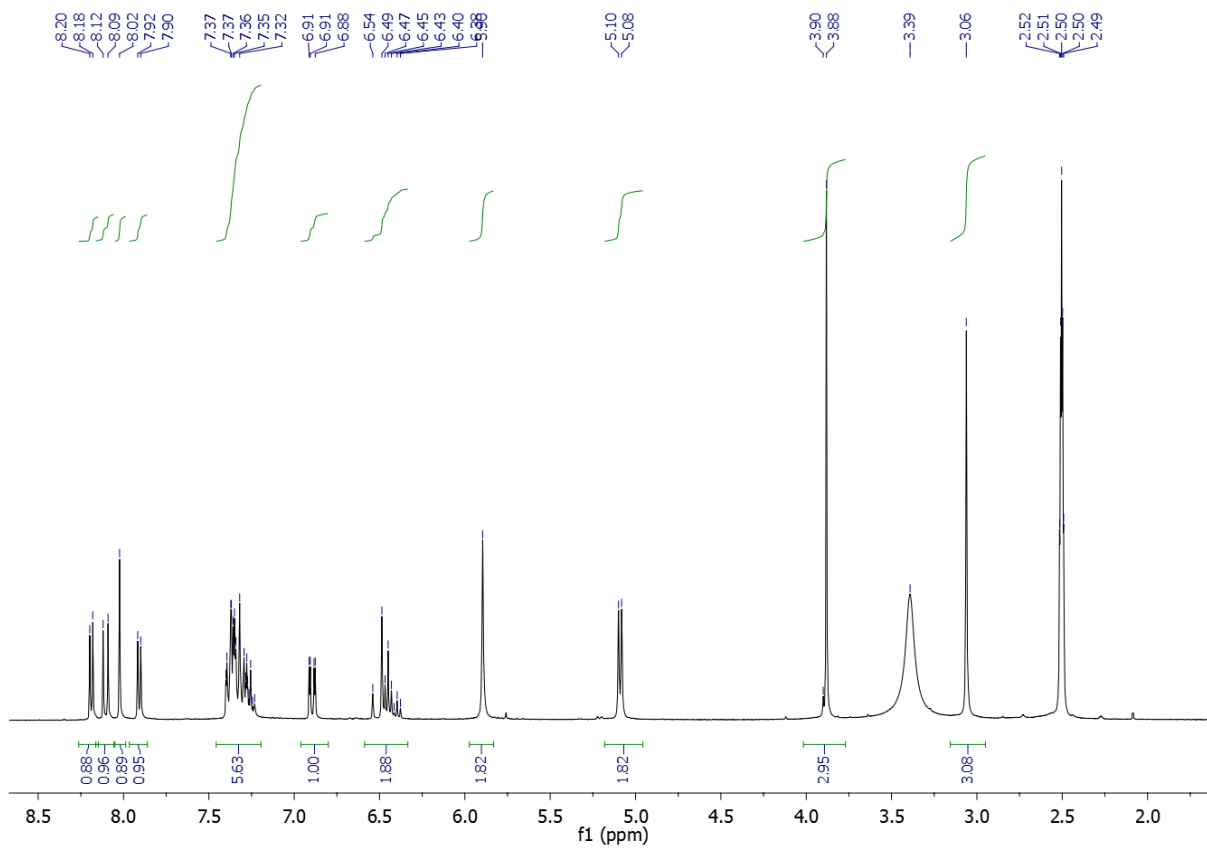
5b



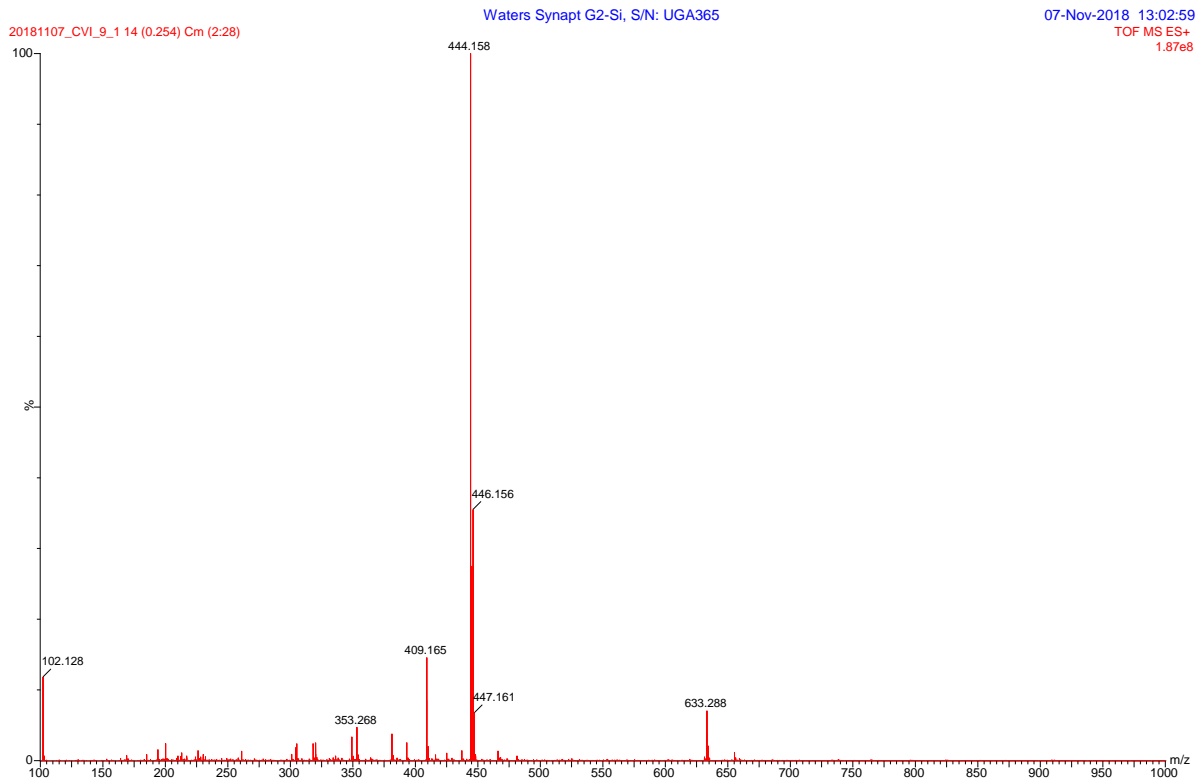
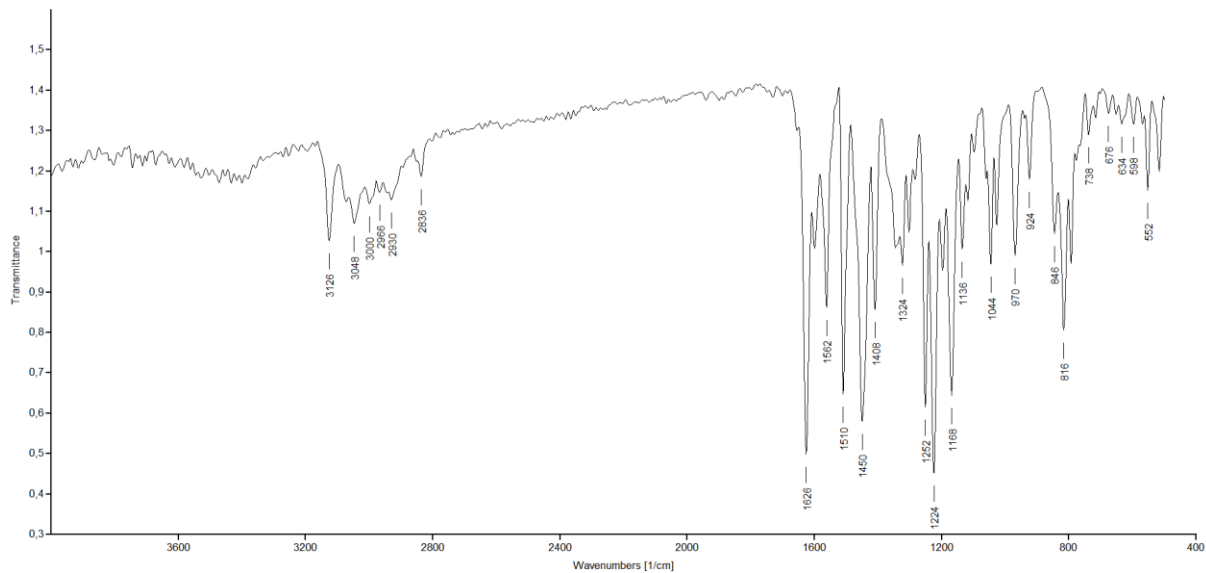
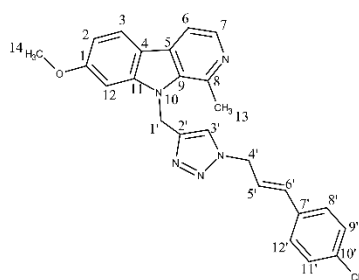


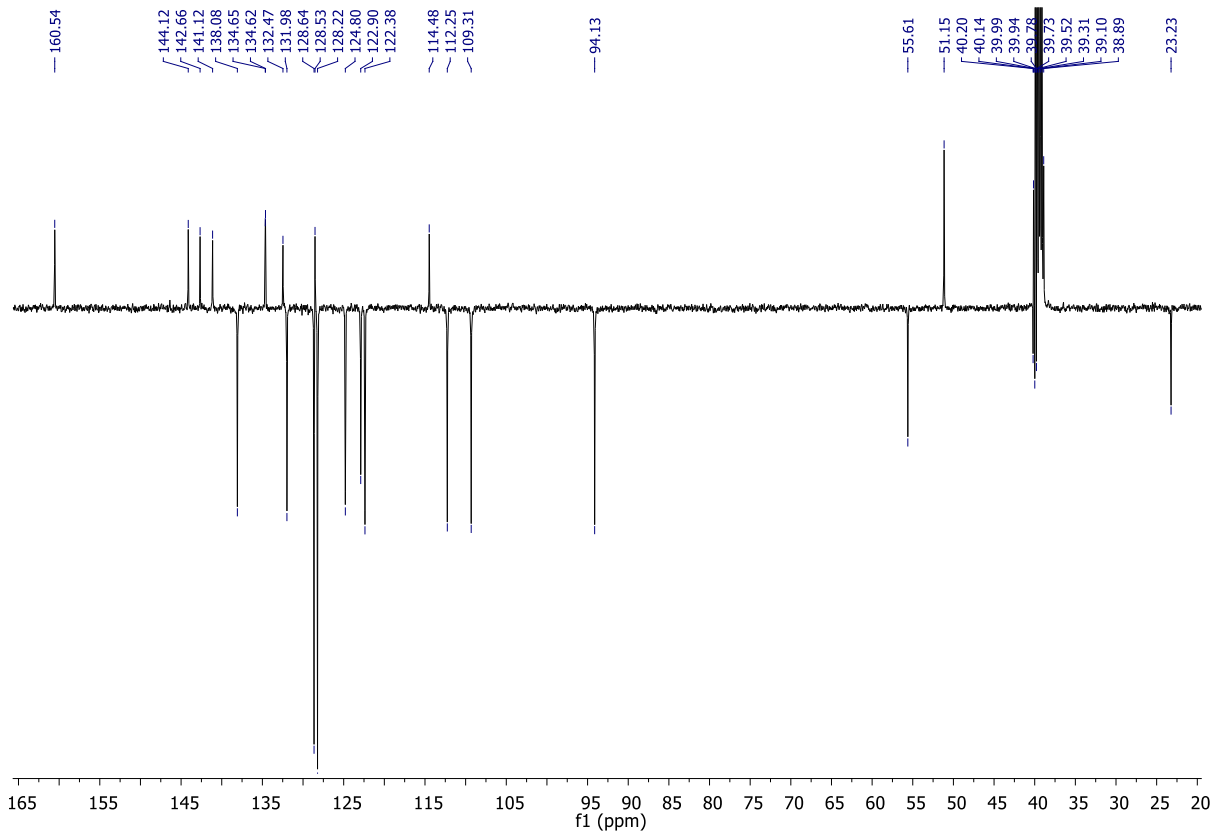
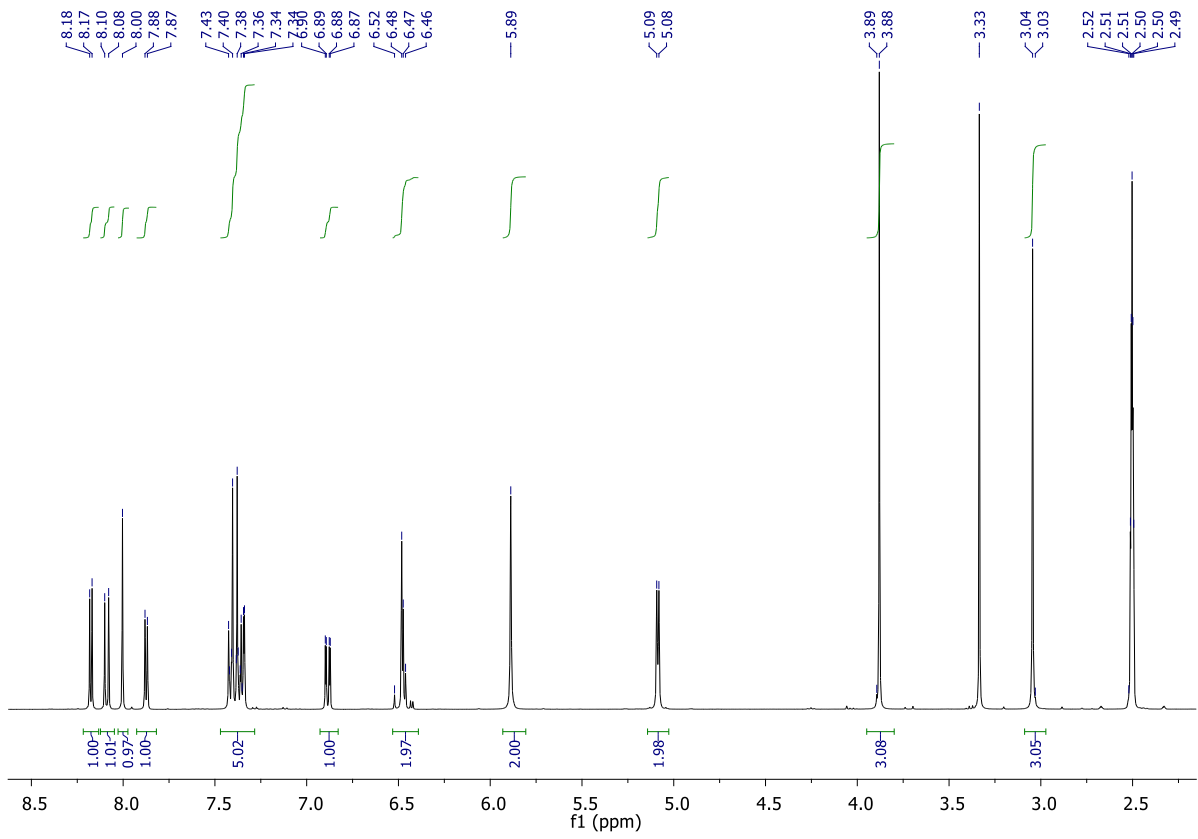
6a



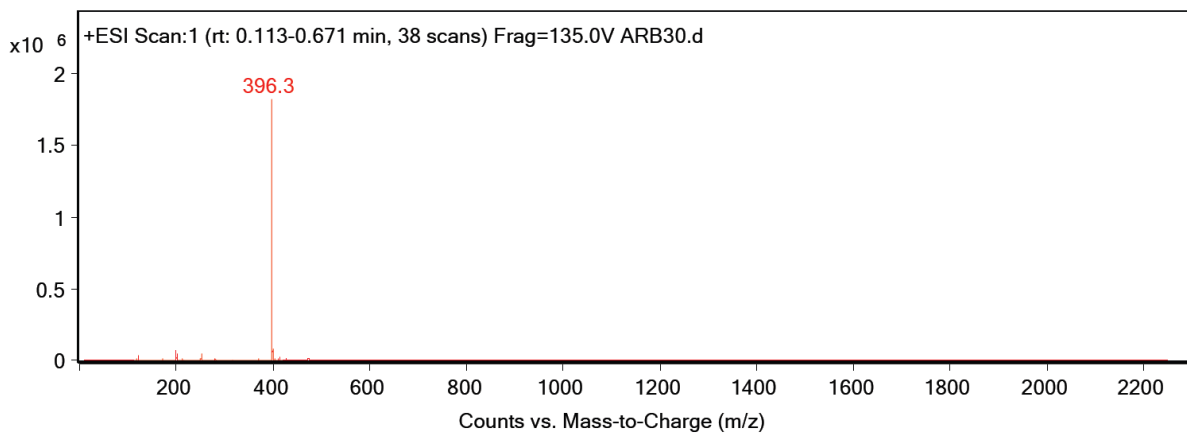
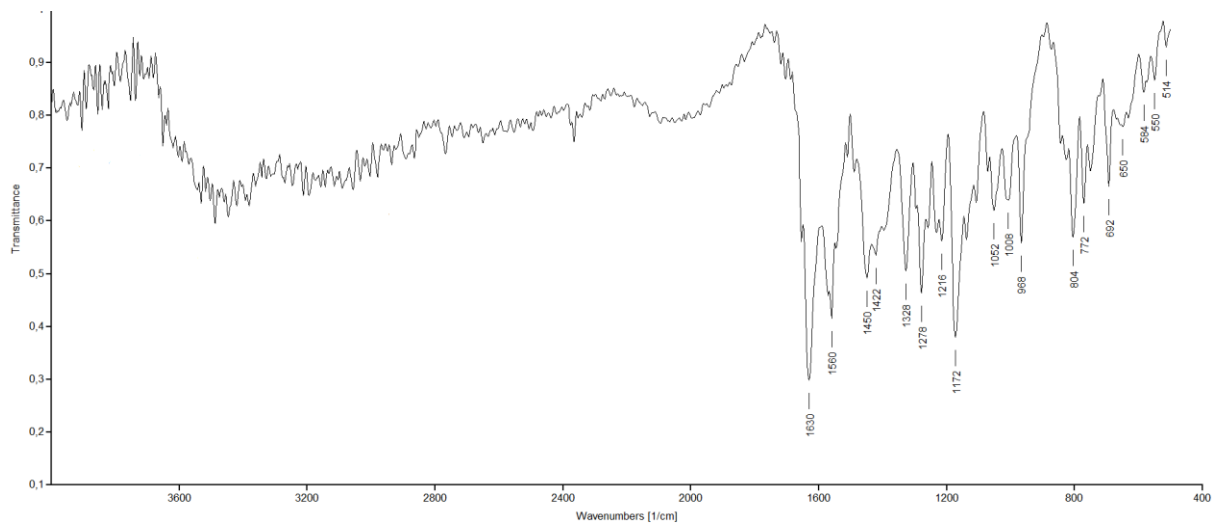
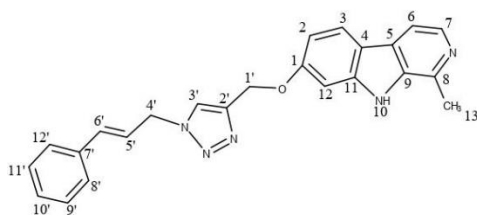


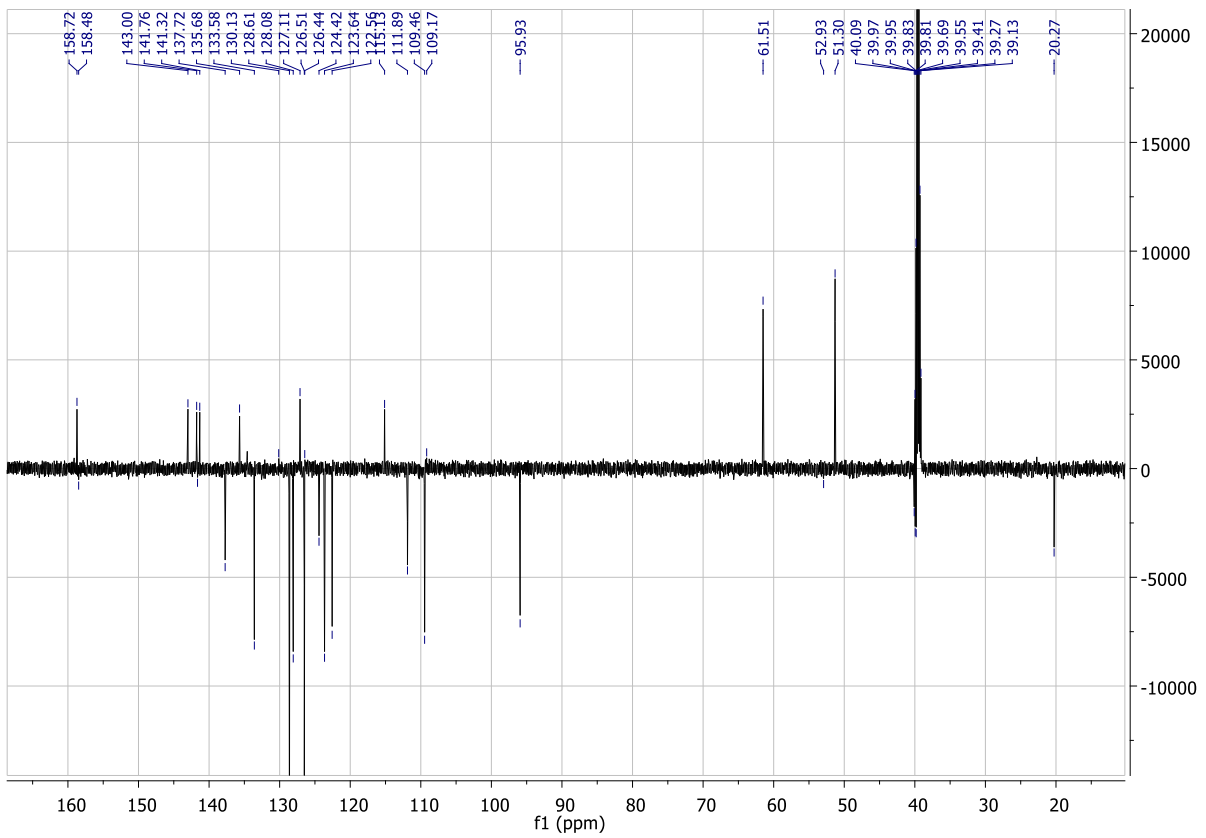
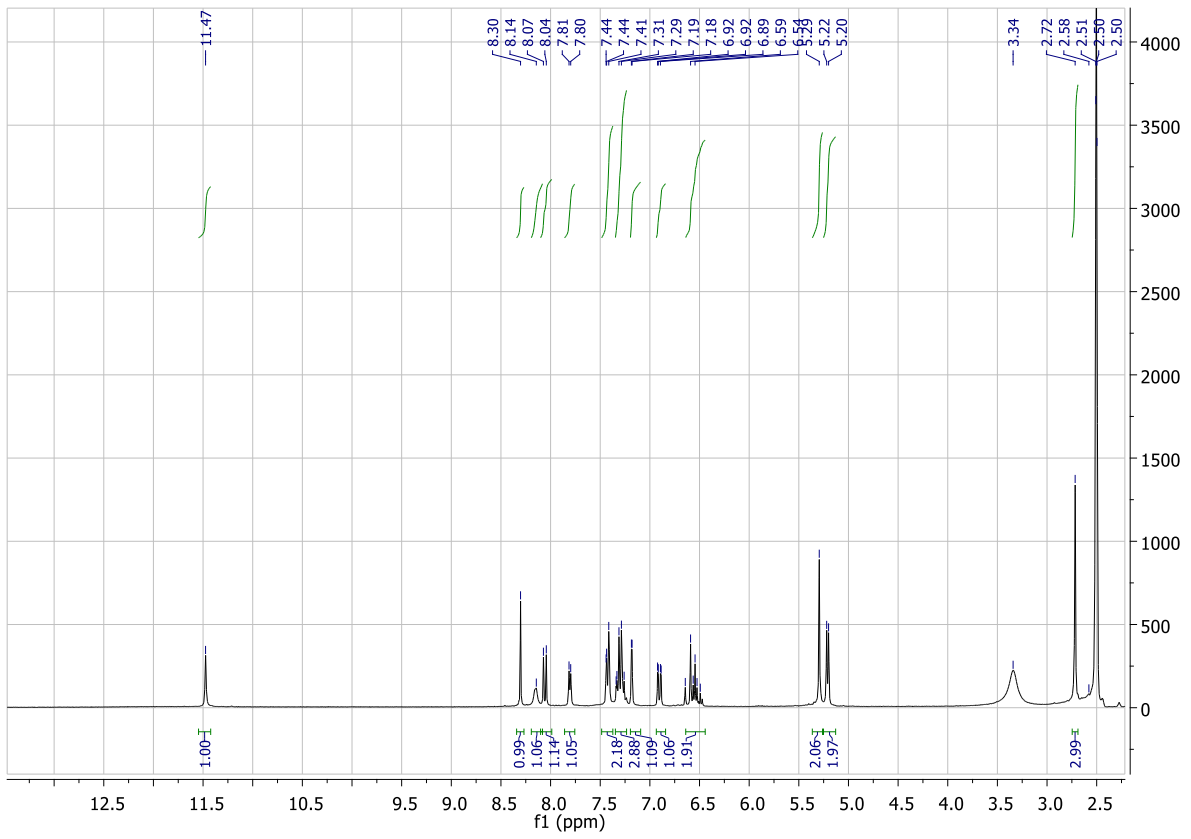
6b



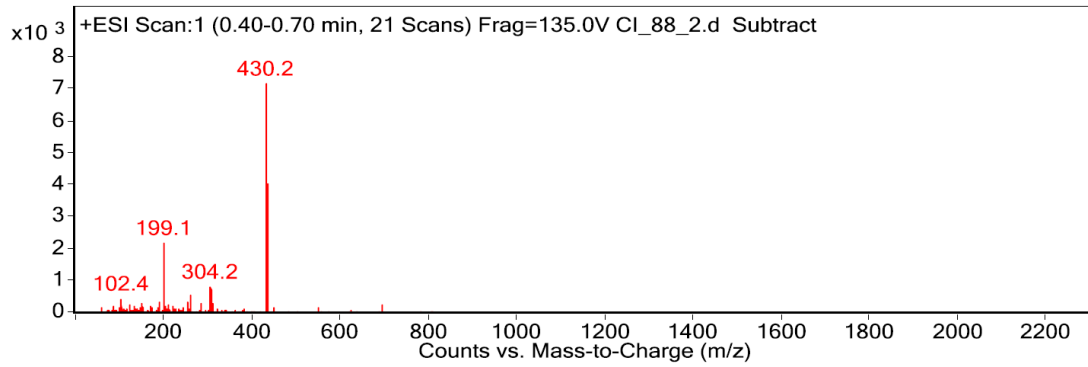
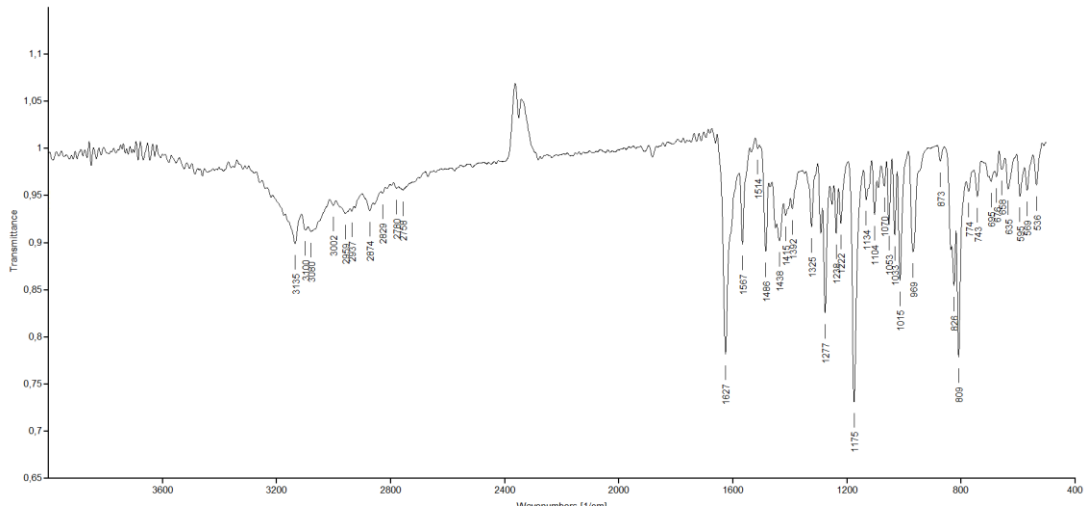
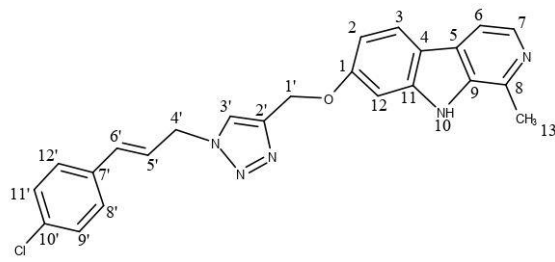


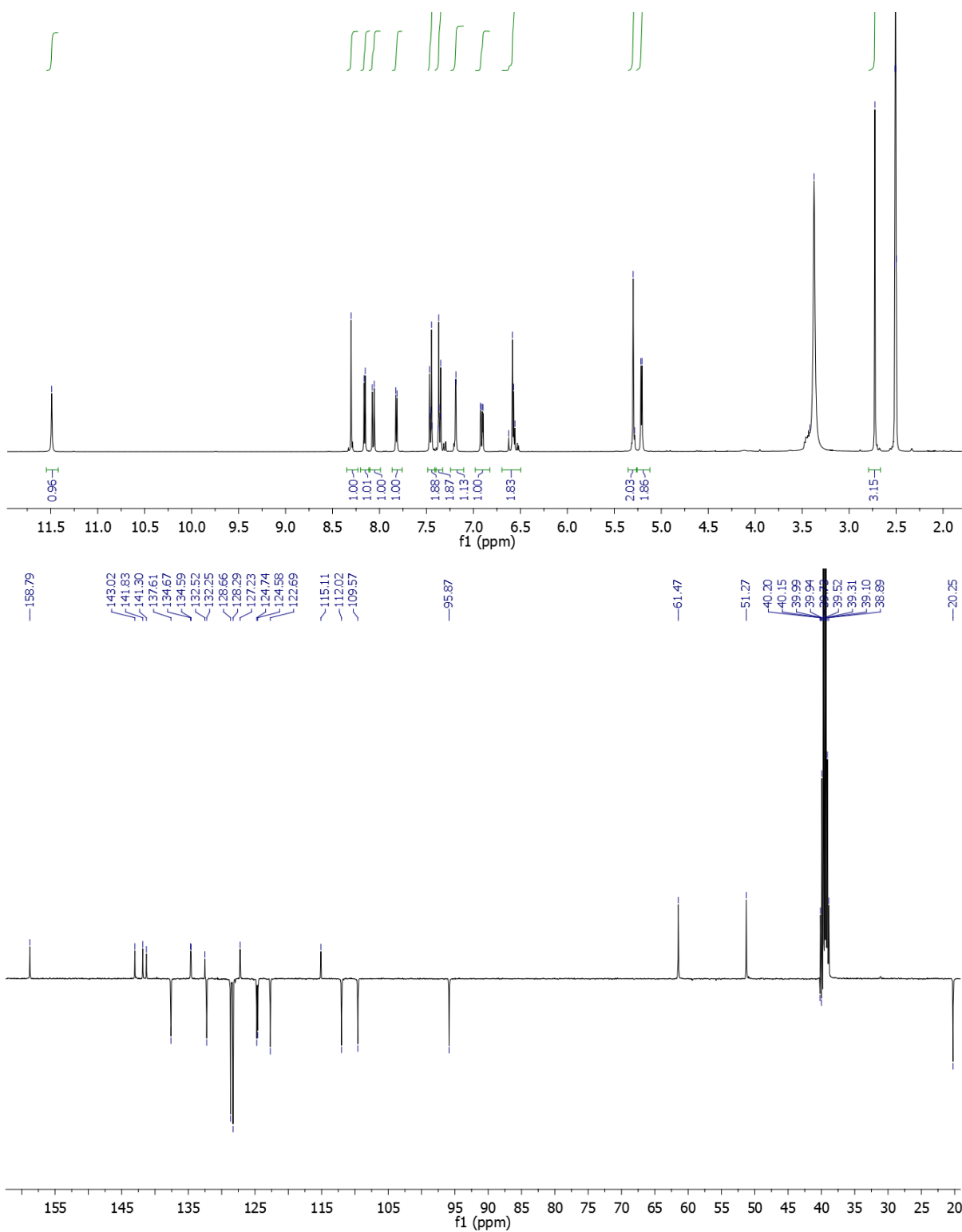
7a





7b





9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC
DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA HARMICINA; NOVIH 1,2,3-TRIAZOLSKIH DERIVATA HARMINA I CIMETNE KISELINE

Vedrana Konjevod

SAŽETAK

Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija četiriju novih *harmicina*, hibridnih spojeva koji preko triazolske poveznice vežu dva farmakofora s antimalarijskim učinkom u jednu molekulu; β -karboline harmin ili harmol te derivate cimetne kiseline (CAD). Za sintezu ciljanih spojeva odabran je prikazani reakcijski put koji je uključio prevođenje derivata cimetne kiseline u azide (**5a,b**), dok su harmin i harmol u reakcijama *N*- i *O*-propargiliranja iskorišteni za dobivanje redom *N* i *O*-alkina (**1,2**). Terminalni alkini **1** i **2** s azidima dobivenim iz derivata cimetne kiseline (**5a,b**) u reakciji Huisgenove cikloadicije katalizirane bakrom (I) dali su konačne produkte, 1,2,3-triazolske derivate harmina i cimetne kiseline (**6a,b** i **7a,b**). Svim novosintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta. Za konačne produkte (**6a,b** i **7a,b**) je temeljem izračuna molekulskih deskriptora napravljena računalna predikcija njihovih farmakokinetičkih svojstava., najvažnije od kojih je oralna bioraspoloživost. U daljnjim ispitivanjima, koja prelaze okvir ovog rada, sintetiziranim derivatima je ispitano antimalarijsko i citotoksično djelovanje.

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

Rad sadrži: 81 stranica, 34 grafičkih prikaza, 9 tablica i 87 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: harmin, harmin, derivati cimetne kiseline, organski azidi, click kemija, Huisgenova cikloadicija, antimalarici

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. Zrinka Rajić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

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

Vedrana Konjevod

SUMMARY

The aim of this thesis was synthesis and characterization of four new harmicines, hybrides which through triazole spacer comprise two pharmacophores with antimalarial activity into single molecule; i.e. β -carboline harmine or harmol and cinnamic acid derivatives (CAD). The shown reaction pathway chosen for the synthesis of final compounds has included obtaining azides 5a,b from cinnamic acid derivatives in several steps, while harmine and harmol have generated N- and O-alkynes (1,2) in the reactions of N- and O-propargylations. Cu(I) catalyzed organic azide-terminal alkyne cycloaddition was employed for preparation of final 1,2,3-triazole N- (6a,b) and O-derivatives (7a,b) of harmine and cinnamic acid from above mentioned reactants. The structures of the newly synthesized compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS). Besides, the melting points of solid compounds were determined. Computer models have been fostered for the prediction of pharmacokinetical properties of the final compounds (6a,b i 7a,b), most important property being oral bioavailability. Subsequent studies, that have surpassed this thesis, had also investigated antimalarial and citotoxic activity of the final compounds.

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

Thesis includes: 81 pages, 34 figures, 9 tables and 87 references. Original is in Croatian language.

Keywords: harmine, cinnamic acid derivatives, organic azides, click chemistry, Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition, antimalarial drugs

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
Zrinka Rajić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mirela Matić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2020.