

# Sinteza i karakterizacija novih hibridnih urea harmina i meflokina

---

Tušek, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:421963>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



**Sara Tušek**

**Sinteza i karakterizacija novih hibridnih  
urea harmina i meflokina**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

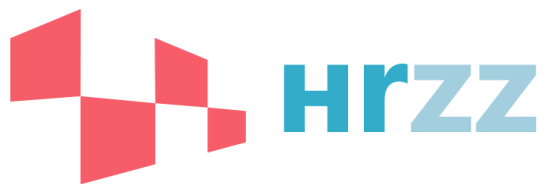
*Zahvaljujem se dr. sc. Pavić na nesebičnoj pomoći, stručnom vodstvu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala djelatnicima Zavoda za Farmaceutsku kemiju na ugodnoj atmosferi i pomoći u laboratoriju.*

*Najveća zahvala mojoj obitelji na pruženoj bezuvjetnoj ljubavi, podršci, razumijevanju i motivaciji.*

*Hvala svim mojim prijateljima na pet godina ispunjenih smijehom, druženjima i prekrasnim uspomnama.*

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



## KRATICE

ADMA	acetaldehid dimetil acetal
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije
ATP	adenozin-trifosfat
Boc	butiloksikarbonil
<i>braf</i>	ljudski gen koji kodira protein B-Raf
<i>braf</i> V600E	ekson V600E na genu BRAF
BtcCl	klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline
CCR5	kemokinski receptor tipa 5
CCD 18Lu	humana stanična linija fibroblasta pluća
CDK	kinaza ovisna o ciklinima
CDI	karbonildiimidazol
COVID-19	koronavirusna bolest 2019
CYP	citokrom P450
C-33A	humana stanična linija karcinoma epitelnih stanica maternice
DCM	diklormetan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta
ESI	ionizacija elektroraspršivanjem
HeLa	humana stanična linija karcinoma vrata maternice
HIV	virus humane imunodeficijencije
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
Hsp 90	protein toplinskog šoka 90
IL	interleukin
IR	infracrveno zračenje
MAO	monoaminooksidaza
MS	spektrometrija masa
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
<i>Pf</i> CRT	transporter na klorokin rezistentnim sojevima <i>Plasmodium falciparum</i>
PPAR- $\gamma$	receptor za aktivator proliferacije peroksisoma tipa 2

SAR	odnos strukture i biološke aktivnosti
S <sub>N</sub> 2	nukleofilna supstitucija tipa 2
SŽS	središnji živčani sustav
SW480	humana staničan linija adenokarcinoma kolona
TBAHS	tetrabutilamonijev hidrogensulfat
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctena kiselina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TPSA	ploština zone polarne površine
<i>t<sub>t</sub></i>	temperatura tališta
UV	ultraljubičasto zračenje
VEGFR-2	receptor za vaskularni endotelni faktor rasta tipa 2

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hibridni lijekovi .....	2
1.2. 4-Aminokinolini .....	4
1.2.1. Mehanizam antimalarijskog djelovanja .....	4
1.2.2. Problem rezistencije i sinteza novih derivata aminokinolina .....	6
1.2.3. Meflokin .....	7
1.3. $\beta$ -karbolini .....	7
1.3.1. Harmin .....	8
1.4. Prenamjena lijekova .....	9
1.5. Uree .....	11
1.5. Utjecaj na farmakokinetiku i farmakodinamiku .....	11
1.5. Derivati uree kao lijekovi .....	12
1.6. Sinteza urea .....	13
<b>2. Obrazloženje teme</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Materijali i metode</b> .....	<b>18</b>
3.1. Sinteza N <sup>1</sup> -(2,8 bis(trifluorometil)kinolin-4-il)etan-1,2-diamina (1) .....	21
3.2. Sinteza tert-butil(2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)etil)karbamata (2) .....	22
3.3. Sinteza 2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)etan-1-amina (3) .....	22
3.4. Sinteza 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ola (harmola, 4) .....	23
3.5. Sinteza tetr-butil(2-(1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il) etil)karbamata (5) .....	23

3.6. Sinteza 2-(1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)etan-1-amina (6) .....	24
3.7. Sinteza 6-metoski-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2-eva trifluoroacetata (7) .....	24
3.8. Sinteza 6-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indola (8).....	25
3.9. Sinteza 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indola (9) .....	25
3.10. Sinteza tert-butil(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-il)oksi)etil)karbamata (10).....	26
3.11. Sinteza 2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-il)oksi)etan-1-amina (11) .....	27
3.12. Sinteza derivata harmina i kinolina 12a-c .....	27
3.12.1. Sinteza 1-(2-((2,8-bis(trifluorometil)kinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-(7- metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)etil)uree (12a) .....	27
3.12.2. Sinteza 1-(2-((2,8-bis(trifluorometil)kinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil- 9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)oksi)etil)uree (12b) .....	28
3.12.3. Sinteza 1-(2-((2,8-bis(trifluorometil)kinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil- 9H-pirido[3,4-b]indol-6-il)oksi)etil)uree (12c) .....	30
<b>4. Rezultati i rasprava .....</b>	<b>32</b>
<b>5. Zaključak .....</b>	<b>48</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>50</b>
<b>7. Sažetak/Summary .....</b>	<b>55</b>
<b>8. Prilozi .....</b>	<b>58</b>

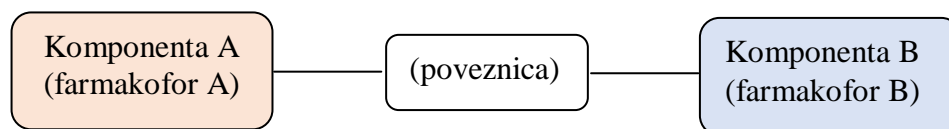


## **1. UVOD**

## 1.1. Hibridni lijekovi

Bolesti poput karcinoma, sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS-a), malarije i tuberkuloze imaju kompleksnu patofiziologiju te predstavljaju velik javnozdravstveni problem. Kako su u patogenezu takvih bolesti uključeni brojni medijatori upale, nerijetko je jedan lijek nedostatan za njihovu kontrolu, stoga se danas sve češće koriste kombinacije lijekova (Gasco i sur., 2017). Prednost kombiniranja lijekova je sinergističko djelovanje na različite mete te smanjena rezistencija. Isto tako, u kombinacijama se koriste niže doze lijekova, stoga je učestalost nuspojava uglavnom manja. U terapiji se mogu koristiti dva ili više pojedinačnih lijekova. Također, mogu se koristiti takozvane hibridne molekule (Timmerman i sur., 1994).

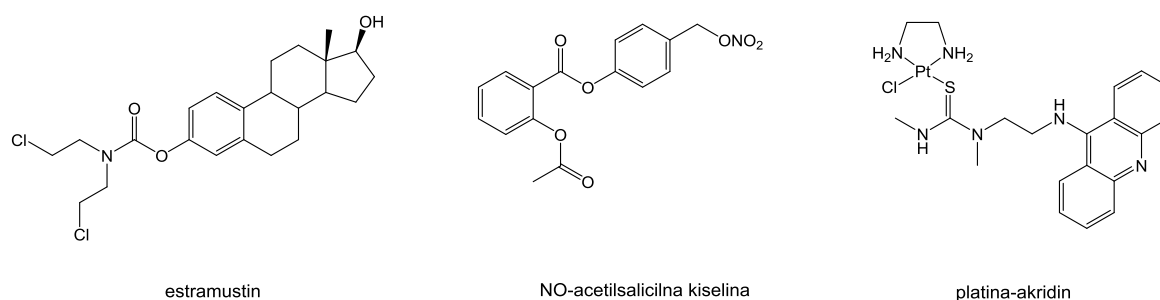
Procesom molekularne hibridizacije spajaju se dva ili više farmakofora u jednu strukturu s ciljem stvaranja multifunkcionalnih hibridnih molekula. Takve molekule imaju poboljšana svojstva u odnosu na lijek sa samo jednim farmakoforom. Naime, hibridne molekule mogu djelovati na više meta te mogu imati bolji farmakokinetički profil (Chu i sur., 2019).



**Slika 1.** Pojednostavljeni prikaz hibridnih lijekova

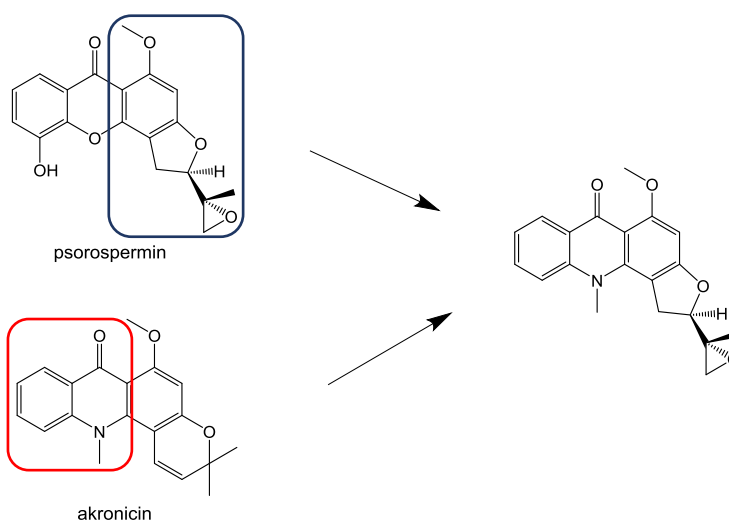
Molekule mogu biti povezane direktno (Slika 1) kao što je u slučaju citostatika estramustina. U strukturi estramustin sadrži dušikov iperit i estradiol povezane karbamatnom skupinom (Slika 2). Kod direktno povezanih hibridnih lijekova komponente su najčešće povezane esterskom, amidnom ili karbamatnom vezom. To su zapravo prolijekovi te u organizmu djelovanjem enzima nastaju dvije zasebne aktivne komponente. One se zatim vežu na različite mete uključene u patogenezu bolesti. Kako je količina enzima ograničena, primjenom prolijekova može se postići produljeno djelovanje lijeka. Druga mogućnost je spajanje lijekova poveznicom (Slika 1), a odabir iste može značajno utjecati na djelovanje lijeka. Postoje dva tipa poveznica – poveznice podložne razgradnji i metabolički stabilne poveznice. Spojevi s poveznicom podložnoj razgradnji također su prolijekovi pa njihovim metabolizmom nastaju dvije molekule. NO-Acetilsalicilna kiselina primjer je hibridnog lijeka s poveznicom

podložnoj razgradnji (Slika 2). Kada je prisutna rezistencija na građevne elemente hibridnog lijeka, koriste se kemijski i enzimski stabilne poveznice. One omogućuju lijeku da lijek ostaje nepromijenjen pa ga tumor ili mikroorganizam ne mogu prepoznati. Primjer lijeka koji ima stabilnu poveznicu je platina-akridin, a nalazi se na Slici 2 (Grediya i sur., 2009).



**Slika 2.** Primjeri hibridnih lijekova

Postoji i treća skupina hibridnih lijekova, takozvani „preklopljeni“ hibridni lijekovi. Specifični su po tome što se tijekom hibridizacije ne spajaju čitave molekule, već samo dijelovi struktura važni za biološku aktivnost. Na Slici 3 prikazan je „preklopljeni“ hibridni lijek nastao spajanjem citostatika psorospermina i akronicina (Fortin i sur., 2013).

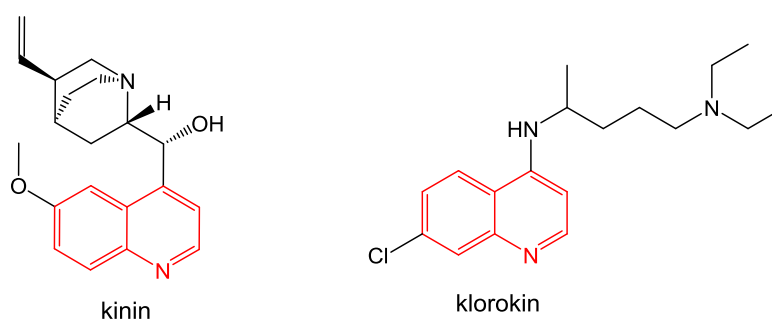


**Slika 3.** „Preklopljeni“ hibridni lijek citostatika psorospermina i akronicina

U odnosu na kombinaciju dva ili više pojedinačnih lijekova, prednost primjene metabolički stabilnih hibridnih lijekova je jednostavnija i samim time predvidljivija farmakokinetika, odnosno farmakodinamika. Također, veća je suradljivost pacijenata kada se primjenjuje jedan lijek. No, takve molekule imaju povećanu molekulsku masu, te im je stoga smanjena oralna bioraspoloživost (Walsh i sur., 2009).

## 1.2. 4-Aminokinolini

Kinin je dio porodice *cinchona* alkaloida te je jedan od najstarijih antimalarika. U svojoj strukturi sadrži kinolinski prsten koji je važan za biološko djelovanje. Modifikacijom njegove strukture sintetizirane su dvije velike skupine antimalarijskih lijekova: 8-aminokinolini i 4-aminokinolini. Najvažniji predstavnik 4-aminokinolina je klorokin, lijek izrazite potentnosti i efikasnosti. U odnosu na druge 4-aminokinoline, klorokin je manje toksičan za ljude. Drugi važni 4-aminokinolini su hidroksiklorokin, meflokin i amodiakin (O' Neil i sur., 2006).

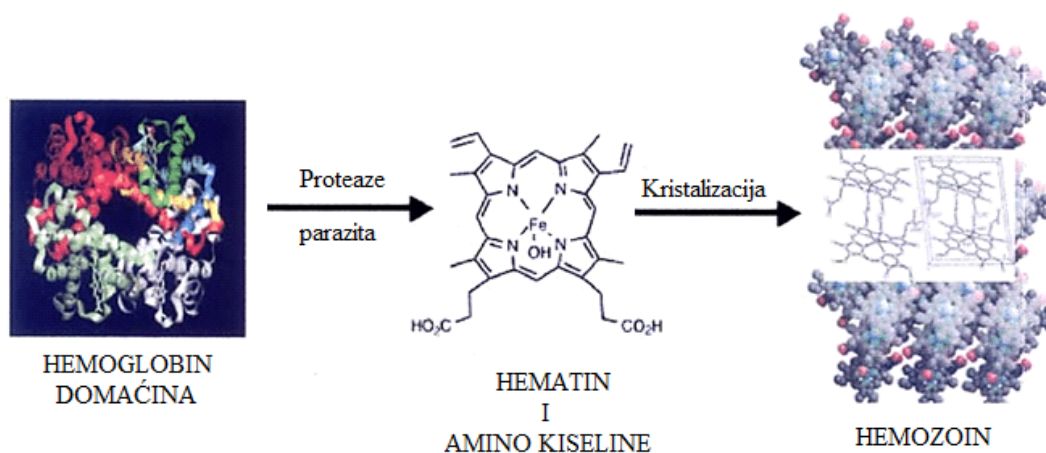


**Slika 4.** Strukture antimalarijskih lijekova kinina i klorokina (kinolinski prsten označen je crvenom bojom)

### 1.2.1. Mehanizam antimalarijskog djelovanja

Malarija je zarazna bolest uzrokovana protozom iz roda *Plasmodium*. Za plazmodij je karakteristična izmjena spolne i nespodne generacije. Iako mehanizam 4-aminokinolina nije u potpunosti razjašnjen, utvrđeno je da djeluju na nespodnu eritrocitnu fazu. Kako bi osigurao nutrijente neophodne za rast i razvoj, parazit pomoću vlastitih proteaza razgrađuje hemoglobin domaćina. Razgradnja se odvija unutar eritrocita, u hranidbenim vakuolama

plazmodija. Parazit koristi samo proteinski dio hemoglobina, dok toksični hem uklanja procesom polimerizacije. Pritom nastaje netopljiv i netoksičan hemozoin (Slika 5). 4-aminokinolini sprječavaju polimerizaciju hema i nastanak hemozoina. Isto tako, s hemom tvore toksičan kompleks koji uzrokuje lizu stanica (Zorc, 2021).



**Slika 5.** Mehanizam nastanka toksičnog hematina i detoksifikacija do hemozoina (preuzeto i modificirano s O'Neil i sur., 2013)

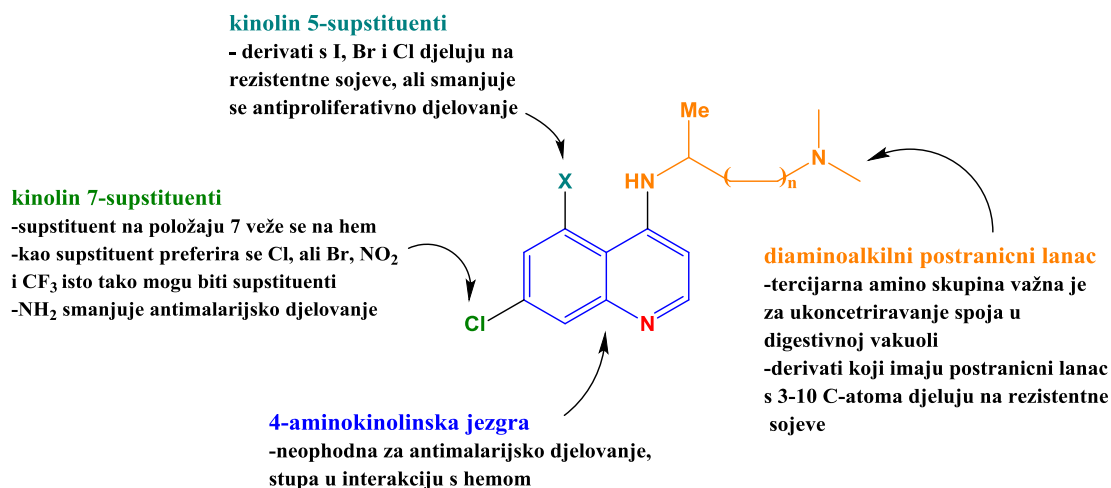
Na potentnost klorokina i drugih 4-aminokinolina utječu njihova fizikalno-kemijska svojstva. Spojevi djeluju kao slabe baze i koncentriraju se u zaraženim eritrocitima. U krvi su prisutni u neprotoniranom obliku pa mogu pasivnim transportom prijeći staničnu membranu. Kada naiđu na zaraženi eritrocit, prolaze membranu eritrocita i parazita te ulaze u hranidbene vakuole. Budući da su u vakuoli kiseli uvjeti, 4-aminokinolini se protoniraju i akumuliraju u njoj. Koncentracija klorokina u digestivnoj vakuoli 10 000 puta je veća od one u eritrocitima.

*In vitro* studijama je utvrđeno da 4-aminokinolini inhibiraju sintezu proteina te neke proteaze i lipaze parazita. Također, negativno utječu na sintezu nukleinskih kiselina. Budući da se navedeni dodatni mehanizmi odvijaju pri visokim koncentracijama lijeka, nisu potvrđeni u *in vivo* ispitivanjima (O'Neil i sur., 2013).

## 1.2.2. Problem rezistencije i sinteza novih derivata aminokinolina

Danas velik problem predstavlja rezistencija na 4-aminokinoline, prije svega klorokin. Rezistentni oblik plazmodija sintetizira transmembranski protein koji izbacuje klorokin iz hranidbene vakuole. Ekspresiju efluksnog transportera na sojevima *Plasmodium falciparum* rezistentnim na klorokin (*PfCRT*) kontrolira gen *pfcr*t. Lijekovi poput verapamila, klorfenamina i imatiniba djeluju na rezistentne sojeve i povećavaju osjetljivost na klorokin. U područjima rezistencije umjesto klorokina koriste se meflokin, amodiakin te se kombiniraju s artemisininima (O'Neil i sur., 2013; Zorc, 2021).

Kako bi se nadvladao problem rezistencije, sintetizirani su novi 4-aminokinolini. Proučavanjem odnosa strukture i djelovanja (SAR, *eng.* structure-activity relationship) utvrđeno je da na aktivnost novosintetiziranih derivata 4-aminokinolina utječe duljina postraničnog lanca. Na rezistentne sojeve vrste *P. falciparum* djeluju derivati koji imaju postranični lanac s 3–10 ugljikovih atoma. Ako je lanac kraći, spoj podliježe *N*-dealkilaciji te nastaje metabolit smanjene lipofilnosti i posljedično smanjene aktivnosti. Sažeti prikaz SAR-a novosintetiziranih derivata nalazi se na Slici 4 (Angello i sur., 2019).

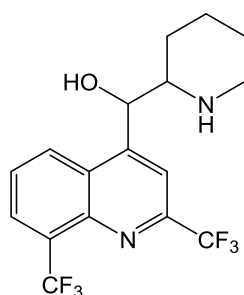


**Slika 6.** SAR novih derivata 4-aminokinolina  
(preuzeto i modificirano s Angello i sur., 2019)

### 1.2.3. Meflokin

Meflokin (Slika 7) se koristi u profilaksi i liječenju malarije uzrokovane rezistentnim sojevima *P. falciparum*. Pokazao se djelotvornim i kod bolesti uzrokovane *P. vivax*. Djeluje kao shizontocid na eritrocitni stadij plazmodija. Tvori toksičan kompleks s feriprotoporfirinom IX što rezultira otpuštanjem slobodnih radikala i lizom zaražene stanice. Budući da je u *in vitro* studijama utvrđena križna rezistencija na klorokin, meflokin se, osim kao monoterapija, primjenjuje i u kombinaciji s artesunatom. No, unatoč tome pojavljuju se slučajevi rezistencije na meflokin (Palmer i sur., 1993; Price i sur., 2004).

Nedostatak meflokina je prolazak krvno-moždane barijere i neurotoksično djelovanje. Neuropsihijatrijski simptomi poput insomnije, ataksije i konvulzija javljaju se zbog djelovanja meflokina na acetilkolinergički i GABAergički sustav. Češći su kod osoba manje tjelesne mase i žena (Toovey, 2009).

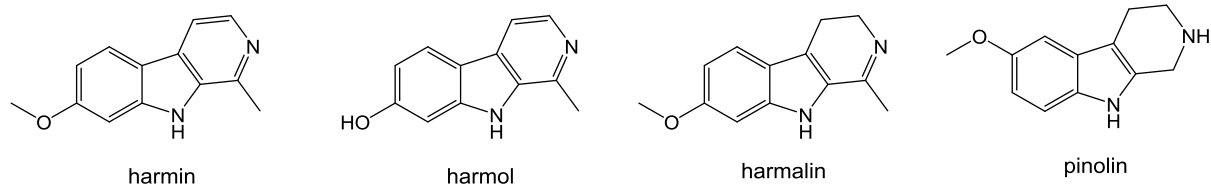


**Slika 7.** Struktura meflokina

### 1.3. $\beta$ -Karbolini

$\beta$ -Karbolini su velika skupina indolskih alkaloida prirodnog i sintetskog podrijetla. Svi spojevi u svojoj strukturi sadrže triciklički pirido[3,4-*b*]indolski prsten te se dijele s obzirom na zasićenost šesteročlanog prstena s dušikovim atomom. Tako razlikujemo potpuno aromatizirane  $\beta$ -karboline, dihidro- $\beta$ -karboline i tetrahidro- $\beta$ -karboline. Prvi puta su izolirani iz biljke *Peganum harmala* (sirijska rutvica). Osim u biljkama, nalaze se u insektima, morskim organizmima i sisavcima. Također, dio su humanih tjelesnih tekućina i tkiva.  $\beta$ -Karbolini od velikog su značaja zbog djelovanja na brojne biološke mete – mogu se interkalirati u deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK), inhibicijom topoizomeraze spriječiti popravak DNK ili inhibirati kinazu ovisnu o ciklinima (CDK). Vežu se na receptore za

benzodiazepine i djeluju kao inverzni agonisti, odnosno uzrokuju anksioznost i depresiju.  $\beta$ -Karbolini utječu i na monoaminergički put inhibirajući enzim monoaminooksidazu (MAO) A i B te direktno aktivirajući monoaminske receptore. Isto tako mogu se vezati na serotoninске receptore. Harmin i harmol (Slika 8) najviše su proučavani  $\beta$ -karbolini (Xu i sur., 2007).



**Slika 8.** Primjeri  $\beta$ -karbolina

### 1.3.1. Harmin

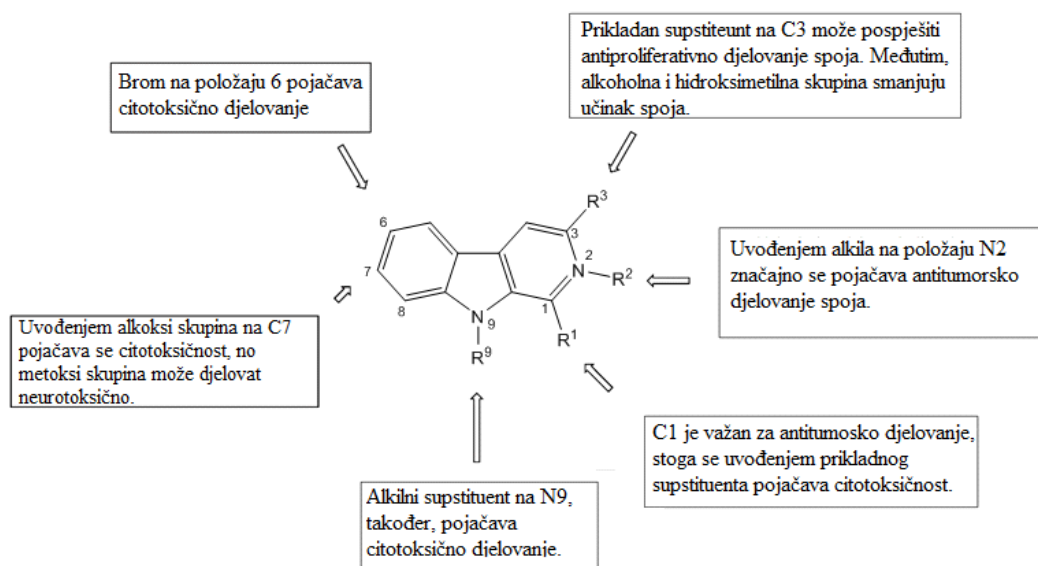
Harmin je triciklički  $\beta$ -karbolin izoliran iz sjemenki sirijske rutvice (*Paganum hamala*). Tradicionalno se koristio u ritualima zbog halucinogenog djelovanja. Osim kao halucinogen, ima antimalarijsko, antioksidativno, citostatsko i antivirotsko djelovanje. Također, u novim studijama pokazao je antimikrobno, antifungalno, antidijabetsko i protuupalno djelovanje. Kao i svi drugi  $\beta$ -karbolini, harmin stimulira centralni živčani sustav, inhibira metabolizam neurotransmitera te direktno djeluje na receptore. Budući da inhibira enzime MAO, ima i antidepresivan učinak. Isto tako, harmin stimulira otpuštanje dopamina pa se ispituje njegova primjena kod određenih poremećaja središnjeg živčanog sustava (SŽS) (Patel i sur., 2012).

Brojnim biološkim istraživanjima potvrđeno je antimalarijsko djelovanje harmina. Djeluje na *P. falciparum*, točnije na protein toplinskog šoka 90 (eng. *heat shock protein*, Hsp 90), protein šaperon neophodan za eritrocitnu fazu životnog ciklusa plazmodija. Veže se na vezno mjesto za adenzin-trifosfat (ATP) i inhibira funkciju proteina. Harmin djeluje selektivno te se ne veže za humane šaperone, već djeluje samo na šaperone plazmodija (Shahinas i sur., 2012).

Citostatsko djelovanje temelji se na indukciji jednolančanih i dvolančanih lomova DNK. Harmin aktivira apoptozu, inhibira angiogenezu te regulira ekspresiju transkripcijskih faktora i proupalnih citokina. Antiproliferativno djelovanje ispitivano je na humanim staničnim linijama fibroblasta pluća CC 18Lu, karcinoma vrata maternice HeLa, karcinoma epitelnih stanica maternice C33A i adenokarcinoma kolona SW480 (Patel i sur., 2012). Proučavanjem



SAR-a harmina i njegovih derivata, utvrđeno je da se citostatsko djelovanje pojačava uvođenjem supstituenata na položaj 1, 3 i 9  $\beta$ -karbolinskog prstena (Khodair i sur., 2017). Detaljna analiza SAR-a harminskih derivata s citostatskim djelovanjem prikazana je na Slici 9.



**Slika 9.** SAR derivata harmina s djelovanjem na tumorske stanice (preuzeto i modificirano s Khodair i sur., 2017)

U istraživanju, kojeg su 2007. god. proveli Waki i suradnici, ustanovljeno je da harmin djeluje kao antidiijabetik, odnosno selektivno regulira ekspresiju receptora PPAR- $\gamma$ . Također, ne uzrokuje akumulaciju lipida u jetri ni porast tjelesne mase. Harmin i harmol smanjuju lučenje proupalnih citokina IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , te stoga djeluju protuupalno (Liu i sur., 2017).

#### 1.4. Prenamjena postojećih lijekova

U istraživanju i razvoju novih lijekova sve se češće poseže za prenamjenom postojećih lijekova (Pavić, 2017). Ispituje se djelovanje već poznatih lijekova u novim indikacijama. Za samu prenamjenu se uglavnom koriste dobro poznati lijekovi s dugom primjenom i dobrim profilom nuspojava. Stoga nije nužna prva faza kliničkih ispitivanja, već se može odmah krenuti s drugom fazom, gdje se ispituje učinkovitost lijeka na bolesnicima. Ovaj pristup

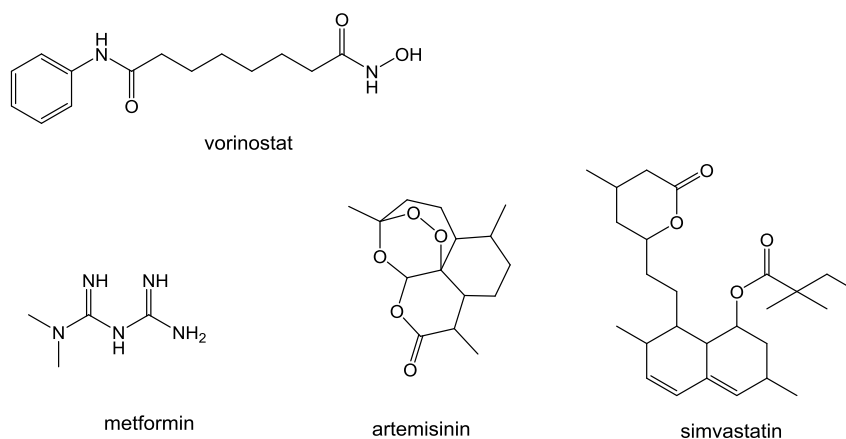
omogućio je smanjenje trajanja i troškova pri razvoju lijeka. Prenamjena lijekova može se s relativnom sigurnošću izvršiti kada su doza i put primjene za novu indikaciju slični staroj.

Ako se mijenjaju ti parametri, lijek ponovno mora proći prvu fazu kliničkih ispitivanja (Kozlina i sur., 2018).

Antidijabetik metformin i hipolipemik simvastatin (Slika 10) primjeri su lijekova s dugom primjenom i dobro poznatim profilom nuspojava. Kombinacija ovih lijekova pokazala se djelotvornom na karcinom mokraćnog mjehura te se nalazi u kliničkim ispitivanjima (Chea i sur., 2016).

Prenamjena starih lijekova značajna je za siromašne tropske zemlje gdje parazitske bolesti poput malarije predstavljaju velik javnozdravstveni problem. Vorinostat (Slika 10) i njegovi derivati upotrebljavaju se kao citostatici. Inhibiraju humanu histonsku deacetilazu i zaustavljaju progresiju malignih bolesti. Istraživanjima je utvrđeno da inhibiraju i histonsku deacetilazu plazmodija, te se stoga potencijalno mogu primjenjivati kao antimalarici (Kozlina i sur., 2018).

Antimalarici poput artemisinina (Slika 10), artemetera, klorokina i kinina su u biološkim ispitivanjima pokazali i citostatsko djelovanje. Mehanizam citostatskog djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, no uočeno je povećanje osjetljivosti stanica karcinoma na lijek i inhibicija razvoja rezistencije stanica. Isto tako, pojačavaju učinak drugih citostatika. Primjerice, dokazano je da klorokin inhibira autofagiju te pojačava antiproliferativno djelovanje 5-fluorouracila na kolorektalni adenokarcinom. No, kako klorokin neselektivno inhibira autofagiju, djeluje toksično i na okolno netumorsko tkivo.

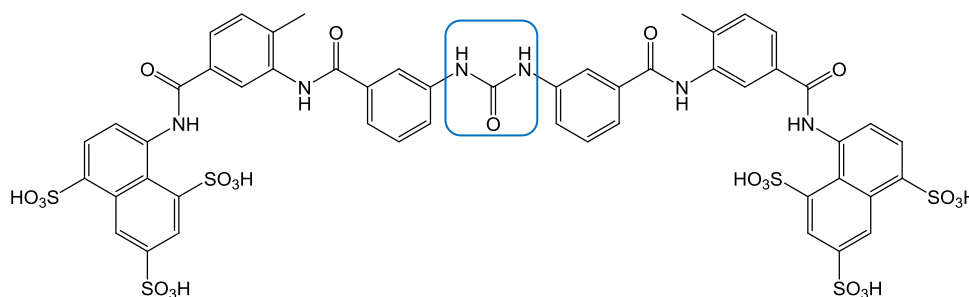


**Slika 10.** Primjeri lijekova prenamijenjenih za druge indikacije

Klorokin i hidroksiklorokin su lijekovi koji modificiraju tijek bolesti. Zbog imunomodulatornog djelovanja primjenjuju se u liječenju autoimunih bolesti kao što su reumatoidni artritis, sistemski eritemski lupus i Sjörgenov sindrom (Zorc, 2021). Također, klorokin i hidroksiklorokin razmatrani su kao dio terapije kod pacijenata s teškim oblikom koronavirusne bolesti 2019 (COVID-19). Sprječavaju replikaciju virusa te smanjuju upalu inhibicijom lučenja proupalnih citokina (Quiros Roldan i sur., 2020).

## 1.5. Uree

Uree su bioaktivne komponente prirodnog ili sintetskog podrijetla, od velikog su značaja u farmaceutskoj industriji te se koriste kao lijekovi. Prvi derivat uree korišten kao lijek je suramin (Slika 11). Primjenjuje se u liječenju bolesti spavanja uzrokovane parazitom iz roda *Trypanosoma*. Zbog povoljnog utjecaja na farmakokinetiku i farmakodinamiku, derivati uree sve se češće proučavaju kao potencijalni lijekovi (Wang i sur., 2017; Ghosh i Brindisi, 2019).



**Slika 11.** Strukturna formula suramina

### 1.5.1. Utjecaj na farmakokinetiku i farmakodinamiku

Prisustvo uree u strukturi molekule pridonosi topljivosti u vodi i permeabilnosti. Urea ima dualnu prirodu te djeluje kao donor i akceptor vodikovih veza. Stoga, molekule mogu stvarati vodikove veze s vodom i tako biti topljivije. Nifedipin je primjer lijeka kojem se povećala topljivost uvođenjem uree u strukturu. Naime, sam nifedipin slabo je topljiv u vodi, ali njegovi metil-, etil- i butilurea analozi dobro su topljivi. Derivati uree često su umjereno lipofilni te stoga mogu pasivnom difuzijom proći krvno-moždanu barijeru. S druge strane,

lijekovi koji sadrže ureu ponekad imaju problema s topljivošću te pokazuju loša farmakokinetička svojstva. Zbog stvaranja vodikovih veza između više molekula spoja, nastaje agregat koji se taloži. Vodikove veze utječu i na farmakodinamiku spoja stabilizirajući kompleks lijek-receptor (Ghosh i Brindisi, 2019).

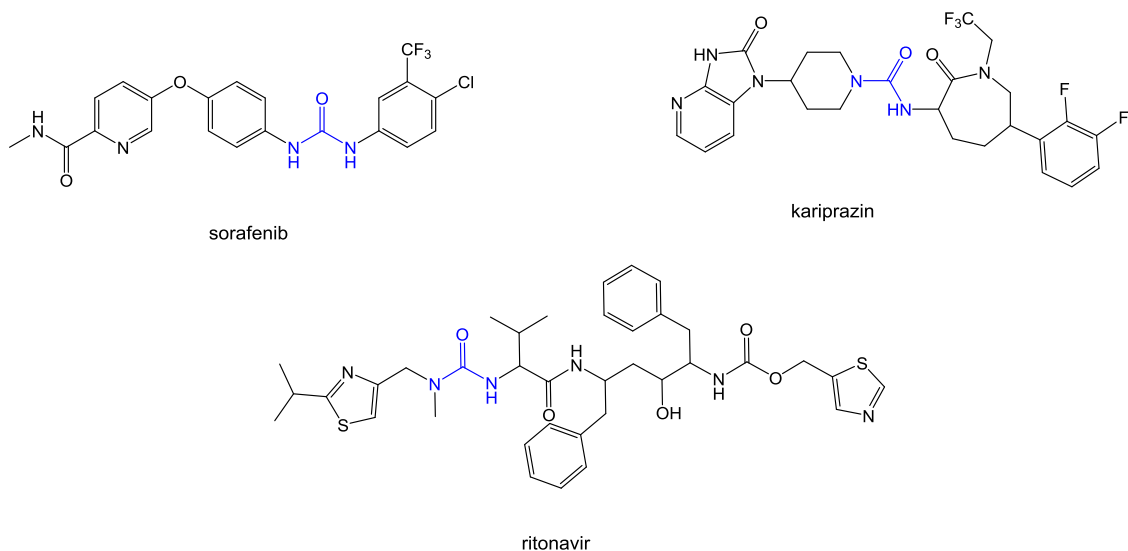
### 1.5.2. Derivati uree kao lijekovi

Skupinu antiproliferativnih lijekova čine aril-uree koje djeluju kao inhibitori kinaza neophodnih za rast tumora. Najznačajniji predstavnik je sorafenib (Slika 12). Veže se na receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) te inhibira daljnju signalizaciju i sintezu proteina. Koristi se u liječenju uznapredovanog karcinoma bubrega. Aril-uree inhibiraju i ljudski gen koji kodira protein B-Raf (*braf*), ekson V600E na genu *braf* (*braf* V600E) te receptor za vaskularni endotelni faktor rasta tipa 2 (VEGFR-2). Zbog slične strukture kinaza uree mogu inhibirati više enzima istovremeno. Osim na kinaze, mogu djelovati i na polimerizaciju mikrotubula i na histonske deacetilaze te tako spriječiti daljnji razvoj tumora (Ghosh i Brindisi, 2019).

Derivati uree primjenjuju se u liječenju poremećaja SŽS-a. Ghiron i suradnici sintetizirali su potencijalne lijekove za shizofreniju i Alzheimerovu bolest (Ghiron i sur., 2009). Molekule su u svojoj strukturi sadržavale ureu te su djelovale kao selektivni agonisti  $\alpha 7$  acetilkolinških receptora. Proučavani su i kinazolinski derivati uree koji sprječavaju stvaranje  $\beta$ -amiloidnog proteina važnog u patogenezi Alzheimerove bolesti (Elkhamhawy, 2009). Kariprazin (Slika 12) djeluje kao parcijalni agonist D3/D2 dopaminskih receptora. Upotrebljava se kao atipični antipsihotik u terapiji shizofrenije i bipolarnog poremećaja (Ghosh i Brindisi, 2019).

Uree se primjenjuju kao antiviroci, antiparazitski i antibakterijski lijekovi. Brojni anti-HIV lijekovi su derivati uree. Duan i suradnici su razvili potentne antagoniste CCR5 receptora (Duan i sur., 2011). Spojevi su sadržavali cikličke uree te je uočeno da su spojevi s peteročlanim i šesteročlanim cikličkim ureama najstabilniji i najpotentniji. Ritonavir (Slika 12) je inhibitor proteaze virusa humane imunodeficijencije (HIV-a), enzima neophodnog za inserciju virusne DNK, te je također derivat uree. Charifson i njegov tim znanstvenika analizirali su benzimidazolske derivate urea (Charifson i sur., 2008). Molekule su pokazale antibakterijsko djelovanje inhibirajući ATP-aznu funkciju topoizomerase IV i giraze. S druge strane, u biološkim ispitivanjima je utvrđeno da alkilirane poliaminske *bis*-uree djeluju kao

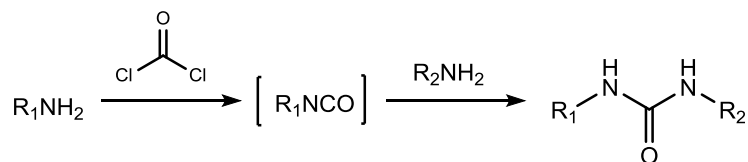
antimalarici, no točan mehanizam djelovanja je nepoznat. Suramin i njegovi derivati selektivno inhibiraju metionil-tRNA sintetazu, enzim neophodan za život *Trypanosoma brucei* (Ghosh i Brindisi, 2019).



**Slika 12.** Lijekovi različitih farmakoterapijskih skupina s ureom u svojoj strukturi

## 1.6. Sinteza urea

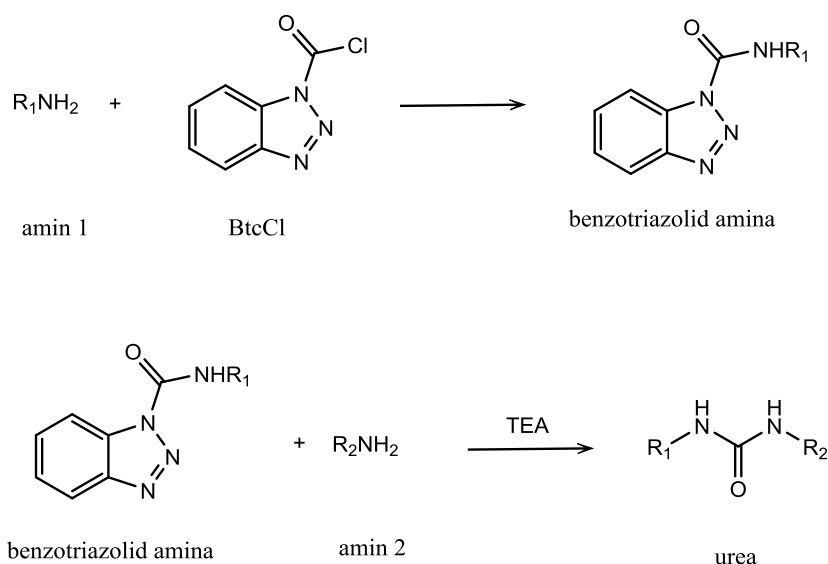
Uree imaju široku primjenu te se nalaze u lijekovima, pesticidima, bojama i antioksidansima. Posljedica sveprisutnosti urea su brojni putevi sinteze. Tradicionalno su sintetizirane pomoću fozgena ili izocijanata i amina (Kim i Hong, 2022). Priprema uree pomoću fozgena ili njegova derivata trifozgena odvija se u dva koraka te uključuje nastanak izocijanatnog intermedijera. Nukleofilnim napadom dušika u aminu na ugljik izocijanata nastaje urea (Shema 1).



**Shema 1.** Tradicionalni put sinteze uree pomoću fozgena i izocijanata

Međutim, zbog toksičnog djelovanja reagensa na okoliš, ove metode sinteze se napuštaju te se koriste alternativni putevi sinteze. Jedan od načina suvremene sinteze je upotreba amina i ugljikova dioksida. Djelovanjem katalizatora kao što su paladij, nikal i rutenij dolazi do nukleofilne supstitucije. No, smanjena iskorištenja reakcija veliki su nedostatak ove metode. Danas najveći značaj u sintezi urea imaju benzotriazol i *N,N*-karbonildiimidazol (CDI) (Ghosh i Bindisi, 2019).

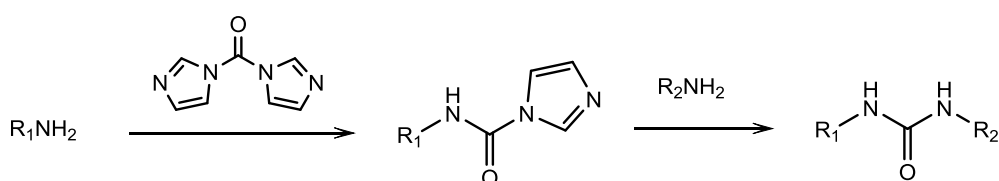
Na Zavodu za farmaceutsku kemiju benzotriazolskom metodom u sklopu istraživanja derivata primakina kao potencijalnih citostatika sintetizirane su brojne uree primakina. Sama sinteza odvija se u dva reakcijska koraka. Najprije je potrebno pripremiti početni spoj benzotriazolid amina, tzv. aktivnu ureu (Shema 2). Benzotriazolid primakina (BtcPQ) dobiven je nukleofilnom supstitucijom klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl) i primakina te je korišten u idućem koraku u reakciji s aminom. Amino skupina je nukleofil te supstituira benzotriazol, dobru izlaznu skupinu u molekuli BtcPQ. Također, benzotriazolska metoda primijenjena je u sintezi *bis*-urea, odnosno karbamoilsemikarbazida (Šimunović i sur, 2009; Pavić, 2017).



**Shema 2.** Sintaza urea benzotriazolskom metodom

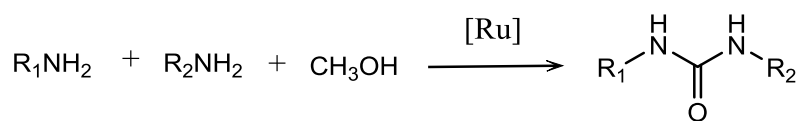
CDI je komercijalno dostupna kristalinična, bijela krutina i koristi se kao zamjena za fozgen u sintezi nesimetričnih urea. Kako ne nastaju izocijanati, odnosno klorirani (među)produkti, ova

metoda sinteze smatra se ekološki najprihvatljivijom, te se stoga uvelike koristi. Nedostatak je osjetljivost CDI-ja na vlagu što zahtjeva primjenu suhih organskih otapala poput suhog diklormetana (DCM), tetrahidrofurana (THF) i dimetil sulfoksida (DMSO). Sintaza se odvija u dva koraka preko *N*-supstituiranog karbonilimidazolidnog intermedijera (Shema 3). Najprije amino skupina supstituira jedan imidazolski prsten, dobru izlaznu skupinu. Nastaje karbonildiimidazolidni međuprodukt koji u idućem koraku ponovno stupa u nukleofilnu supstituciju gdje se druga imidazolska skupina odcjepljuje te nastaje urea (Dube i sur, 2009; Padiya i sur, 2012).



**Shema 3.** Sintaza urea pomoću CDI-a

Zbog već spomenutog značaja urea u industriji razvijaju se nove metode sinteze. Znanstvenici u Južnoj Koreji su, koristeći metanol i rutenij, pripremili nesimetrične uree. Reakcija se odvija u dva koraka preko karbamatnog intermedijera (Shema 4). Metanol služi kao donor karbonilne skupine, dok je rutenij katalizator (Kim i Hong, 2016).



**Shema 4.** Sintaza urea pomoću metanola i rutenija

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**



Rak obuhvaća veliku grupu bolesti koju karakterizira nekontrolirani rast abnormalnih stanica. Maligno transformirane stanice najčešće nastaju uslijed mutacija. One mogu nastati u bilo kojem tkivu te mogu prelaziti barijere i širiti se u druga tkiva i organe. Proces se zove metastaziranje te je glavni uzrok smrti kod oboljelih od raka. Najčešće se dijagnosticiraju rak prostate, pluća i debelog crijeva kod muškaraca. S druge strane, kod žena je najveća incidencija karcinoma dojke, debelog crijeva i vrata maternice.

Rak je drugi uzročnik smrti u ljudi. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije 2018. godine svaka šesta osoba u svijetu umrla je od raka ([www.who.int](http://www.who.int)). U Hrvatskoj je 2020. godine dijagnosticiran 25 001 novi slučaj raka, dok je broj preminulih iznosio 14 216. Prema incidenciji karcinoma Hrvatska se nalazi u prosjeku Europske unije, ali prema smrtnosti od raka u samom je vrhu ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr)).

U liječenju raka važnu ulogu ima rana dijagnostika. Naime, što se karcinom ranije otkrije, to je veća vjerojatnost uspješnog djelovanja terapije. Samo liječenje uključuje kirurško odstranjivanje malignog tkiva, kemoterapiju i radioterapiju. Ove metode mogu se koristiti zasebno ili u kombinaciji, ovisno o tipu tumora i stadiju bolesti te ovisno o kliničkim parametrima ([www.who.int](http://www.who.int)).

Iako je došlo do velikog napretka u terapiji karcinoma, velik problem predstavlja neselektivno i toksično djelovanje citostatika. Također, neki tumori razvili su rezistenciju na postojeće lijekove. Stoga i dalje postoji potreba za dizajniranjem i sintezom novih citostatika (Zugazagoitia i sur., 2016). Taj proces je izrazito skup i dugotrajan pa se često poseže za prenamjenom postojećih lijekova. Najčešće se za nove indikacije koriste dobro proučavani lijekovi koji su dugo u primjeni. Prenamjena lijekova omogućuje preskakanje pretkliničkih i prve faze kliničkih ispitivanja te tako smanjuje trajanje i troškove razvoja lijeka (Kozlina i sur., 2018).

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija novih hibridnih spojeva harmina i meflokina kao potencijalnih citostatika. Za sintezu ciljnih spojeva korištena je molekulska hibridizacija, odnosno dvije molekule željenog djelovanja spojene su u jednu. Kao poveznica je korištena urea.

U daljnjim istraživanjima koja prelaze okvire ovog rada novosintetiziranim spojevima bit će ispitano antimalarijsko i citostatsko djelovanje.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Tališta ( $t_i$ ) sintetiziranih spojeva određena su pomoću Stuart Melting Point instrumenta (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. FTIR-ATR spektri snimljeni su na PerkinElmer Spectrum Two spektrofotometru (PerkinElmer, SAD) metodom FTIR-ATR spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FT) i ATR tehnikom snimanja, pri čemu se koristio UATR instrumentalni dodatak s dijamantom kao internim refleksijskim elementom.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker Avance III HD (Bruker, SAD). Frekvencije na kojima su snimljeni spektri iznosile su 600 MHz za  $^1\text{H}$  spektar, odnosno 151 MHz za  $^{13}\text{C}$  spektar. Uzorci su mjereni u otopinama DMSO- $d_6$  na temperaturi od 20 °C u NMR cjevčici od 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm (*parts per milion*) u odnosu na unutarnji standard tetrametilsilan (TMS) u  $^1\text{H}$  spektru, dok je u  $^{13}\text{C}$  spektru kao standard korišten rezidualni pik DMSO-a (39,52 ppm). Konstante sprežanja ( $J$ ) izražene su u Hz. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS instrumentu (HPLC, Agilent Technologies 1200 Series; MS, Agilent Technologies 6410 Triple Quad, SAD). Kao tehnika ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom i negativnom modu. Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u mikrovalnom reaktoru CEM Discover (CEM, SAD) te CEM Discover 2 (CEM, SAD) u staklenim kivetama.

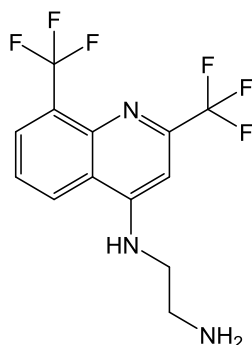
Tijek kemijskih reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC). Kao stacionarna faza korištene su silikagel staklene ploče 60 F<sub>254</sub> (Merck, Njemačka), dok je kao mobilna faza korištena smjesa cikloheksan/etil-acetat/metanol u omjeru 3:1:0,5 i 1:1:0,5, odnosno smjesa DCM/metanol u omjeru 7,5:2,5 i 8:1. Za pročišćavanje spojeva korištena je normalno-fazna kromatografija na koloni gdje je silikagel veličine 0,063–0,200 mm (Sigma-Aldrich, SAD) bio stacionarna faza, a smjesa DCM/metanol (7,5:2,5, 8:1, 8:2) mobilna faza. Analizirani spojevi vizualizirani su UV svjetlom ( $\lambda = 254$  i 360 nm) te parama joda.

Sve korištene kemikalije i otapala bila su *p. a.* čistoće. Harmin, litijev karbonat, 10 % paladij na ugljenu (Pd/C), glacijalna octena kiselina, acetaldehid dimetil acetal (ADMA), Celite<sup>®</sup>, tetrabutilamonijev hidrogensulfat (TBAHS) i CDI nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD); 5-metoksitriptamin, cezijev karbonat, trifluorocetna (TFA) i 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)etil bromid (2-(Boc-amino)etil bromid) nabavljeni su od tvrtke Tokyo Chemical Industry (TCI, Japan), dok je bromovodična kiselina nabavljena od tvrtke Merck (Njemačka). Natrijev klorid i bezvodni natrijev sulfat nabavljeni su od tvrtke Gram-Mol (Hrvatska), natrijev hidroksid od tvrtke Kemika (Hrvatska), a trietilamin (TEA) od tvrtke Alfa Aldrich (SAD). Apsolutni etanol nabavljen je od tvrtke Acros Organics (SAD), etil-acetat i

metanol od tvrtke Honeywell (SAD), DCM od tvrtke Fischer Scientific (UK), dietil-eter od tvrtke ITW Reagents (Njemačka), dok je acetonitril nabavljen od tvrtke CARLO ERBA Reagents (Francuska).

Bezvodni *N,N*-dimetilformamid (DMF) nabavljen od TCI čuvan je nad aktiviranim molekulskim sitima.

### 3.1. Sinteza $N^1$ -(2,8 bis(trifluormetil)kinolin-4-il)etan-1,2-diamina (1)



Suspencija 0,4 g (1,335 mmol) 4-klor-2,8-bis(trifluormetil)kinolina i 0,895 ml (13,35 mmol) etilen-1,2-diamina grijana je 60 minuta na 95 °C u mikrovalnom reaktoru uz snagu mikrovalova 150 W. Idući dan u reakcijsku smjesu dodano je 70 mL DCM-a te je ekstrahirano 3 × 50 mL otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ). Organski sloj je osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Zatim je organsko otapalo upareno pod sniženim tlakom. Talog je dva put rastrljan u eteru i odsisan.

Iskorištenje reakcije: 0,309 g (80 %).

Talište: 148,5 °C.

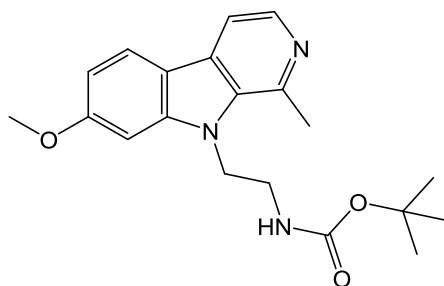
ESI-MS ( $m/z$ ) 324,0 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 8,65 (dd,  $J = 8,6, 1,3$  Hz, 1H), 8,15 (dd,  $J = 7,3, 1,2$  Hz, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,68 (t,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 6,92 (s, 1H), 3,39 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 2,85 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 1,63 (s, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 152,60, 148,21-147,55 (q,  $J = 32,8$  Hz), 143,85, 129,00-128,89 (q,  $J = 5,5$  Hz), 127,04, 126,61-126,04 (q,  $J = 28,7$  Hz), 126,74-121,31 (q,  $J = 275$  Hz), 124,43-118,95 (q,  $J = 276$  Hz), 124,39, 119,39, 94,24-94,19 (q,  $J = 2,6$  Hz), 46,18, 40,00.

IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3228, 1599, 1439, 1358, 1331, 1310, 1278, 1222, 1178, 1159, 1118, 1048, 1008, 967, 913, 899, 864, 819, 761, 745, 719, 618, 592, 560, 504  $\text{cm}^{-1}$ .

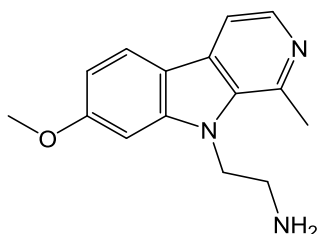
### 3.2. Sinteza *tert*-butil(2-(1-metil-7-metoksi-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamata (2)



Sinteza je rađena prema prethodno opisanom postupku (Marinović i sur., 2021). U epruveti je suspendirano 0,300 g (1,413 mmol) harmina u 3,5 mL suhog DMF-a. Reakcijska smjesa zagrijana je na 90 °C. Nakon 10 minuta dodano je 2,072 g (6,360 mmol) cezijeva karbonata, temperatura je spuštена na 70 °C i propuhano je dušikom. U reakcijsku smjesu dodano je 1,267 g (5,652 mmol) 2-(Boc-amino)etil bromida te je miješano u atmosferi dušika na 70 °C 24 sata. Idući dan dodano je 50 mL destilirane vode i ekstrahirano etil-acetatom (3 × 50 mL). Organski sloj ispran je destiliranom vodom, osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom. Dobiveni talog pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu DCM/metanol (8:1). Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom, a talog je rastrljan u eteru i odsisan. Spoj **2** korišten je u sljedećem reakcijskom koraku.

Iskorištenje: 0,241 g (48 %).

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

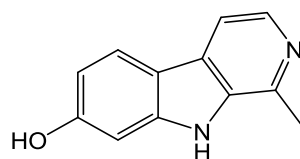


Sinteza je rađena prema ranije opisanom postupku (Marinović i sur., 2021). Spoj **2** mase 0,241 g (0,679 mmol) otopljen je u 5 mL suhog metanola, zatim je u otopinu dodano 1,698 mL (6,79 mmol) 4 M klorovodične kiseline. Reakcijska smjesa zagrijana je na 50 °C i miješana preko noći. Zatim je etanol uparen pod sniženim tlakom, talog je otopljen u 20 mL

destilirane vode, a pH je podešen otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) do 12. Zalužena otopina ekstrahirana je etil-acetatom ( $5 \times 25\text{ mL}$ ). Organski sloj ispran je destiliranom vodom, osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Etil-acetat uparen je pod sniženim tlakom, talog rastrljan u eteru i odsisan te je dobiven amin **3**.

Iskorištenje: 0,101 g (62 %).

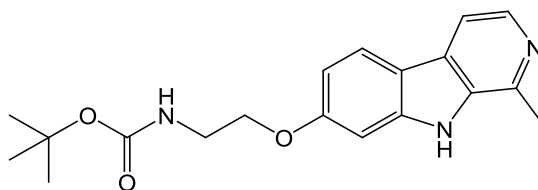
### 3.4. Sinteza 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ola (harmola, **4**)



Sinteza harmola napravljena je prema prethodno opisanom postupku (Marinović i sur., 2021). Harminu mase 0,075 g (0,353 mmol) dodano je 1,5 mL glacijalne octene kiseline i 0,75 mL bromovodične kiseline ( $w = 47\%$ ). Suspenzija je grijana 25 minuta na  $140\text{ }^\circ\text{C}$  u mikrovalnom reaktoru snage mikrovalova 75W. Postupak je ponovljen tri puta s istim količinama reaktanata. Reakcijske smjese svih kiveta prebačene su u tikvicu, dodano je 20 mL destilirane vode te je otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) zaluženo do pH 9–10. Zatim je spoj ekstrahiran etil-acetatom ( $3 \times 120\text{ mL}$ ), organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Organsko otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a dobiveni talog je rastrljan eterom i odsisan.

Iskorištenje: 0,281 g (100 %).

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

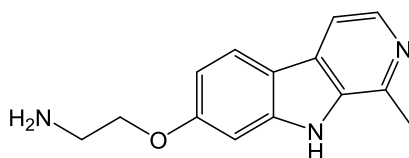


Sinteza je rađena prema ranije opisanom postupku (Marinović i sur., 2021). Prethodno sintetizirani harmol mase 0,281 g (1,559 mmol) suspendiran je zajedno s 0,711 g (2,183

mmol) cezijeva karbonata u 3,5 mL suhog DMF-a. Suspenzija je propuhana dušikom. Nakon 10 minuta reakcijskoj smjesi dodano je 0,838 g (3,741 mmol) 2-(Boc-amino)etil bromida te je miješano u atmosferi dušika na 70 °C 24 sata. Idući dan dodano je 40 mL destilirane vode i ekstrahirano etil-acetatom (3 × 40 mL). Organski sloj ispran je destiliranom vodom, osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran, a organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom. Produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu DCM/metanol (8:1). Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom, a talog je rastrljan u eteru i odsisan.

Iskorištenje: 0,216 g (41 %).

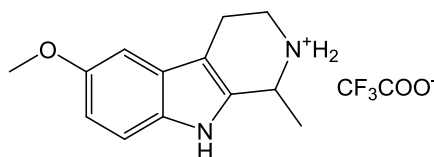
### 3.6. Sinteza 2-(1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)etan-1-amina (6)



Spoj **6** sintetiziran je prema već opisanom postupku (Marinović i sur., 2021). Karbamat **5** mase 0,216 g (0,633 mmol) otopljen je u 2 mL suhog metanola te mu je dodano 1,583 mL 4 M klorovodične kiseline. Nakon 2 sata reakcija je prekinuta dodatkom 15 mL destilirane vode. Zatim je smjesa zaluzena otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) do pH 11–12 te je ekstrahirana etil-acetatom (7 × 30 mL). Organski sloj sušen je bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran te je uparen pod sniženim tlakom. Talog je rastrljan eterom i odsisan. Dobiveni spoj je amin **6**.

Iskorištenje: 0,116 g (76 %).

### 3.7. Sinteza 1-metil-6-metoksi-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2-ovog trifluoracetata (7)



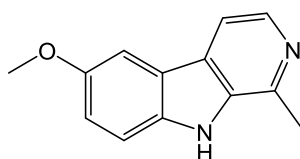
Sinteza je rađena prema prethodno opisanom postupku (Marinović i sur., 2021). U kiveri za mikrovalnu sintezu suspendirana su 0,2 g (1,05 mmol) 5-metoksitriptamina u 0,156 mL (2,10



mmol) TFA, 0,222 mL (2.10 mmol) ADMA i 3,5 mL acetonitrila. Reakcijska smjesa grijana je 10 minuta u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 110 °C i pri snazi mikrovalova od 75 W. Postupak je ponovljen s istom količinom u još sedam kiveta. Sadržaj svih osam kiveta sjedinjen je te mu je dodano 50 mL etera. Talog je idući dan usitnjen na ultrazvučnoj kupelji i odsisan.

Iskorištenje: 1,619 g (58 %).

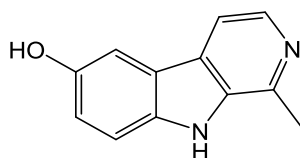
### 3.8. Sinteza 1-metil-6-metoksi-9H-pirido[3,4-b]indola (8)



Marinović i suradnici (2021. g.) opisali su sintezu spoja **8**. Prethodno sintetizirana sol **7** mase 0,200 g (0,602 mmol) pomiješana je s 0,089g (1,204 mmol) litijeveg karbonata i 0,023 g 10 % Pd/C te je smjesa suspendirana u 3,5 mL apsolutnog etanola. Nakon toga reakcijska smjesa grijana je u mikrovalnom reaktoru 25 minuta na temperaturi od 150 °C i pri snazi mikrovalova od 75 W. Postupak je ponovljen još dva puta s istom količinom reaktanata. Katalizator je odsisan preko dijatomejske zemlje (Celite<sup>®</sup>), a zatim je matičnica uparena pod sniženim tlakom. Talog je rastrljan u otopini natrijevog klorida ( $w = 20\%$ ) i odsisan, a nakon toga je rastrljan u eteru i odsisan. Dobiveni spoj **8** korišten je u sljedećem reakcijskom koraku.

Iskorištenje: 0,383 g (78 %).

### 3.9. Sinteza 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indola (9)

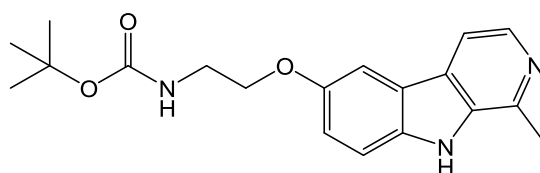


Sinteza je rađena prema ranije opisanom postupku (Marinović i sur., 2021). Spoj **8** (0,100 g, 1,885 mmol) otopljen je u 1 mL glacijalne octene kiseline i 1,25 mL bromovodične kiseline ( $w = 47\%$ ). Reakcija je provedena u mikrovalnom reaktoru (75 W, 150 °C, 30 min) te je

ponovljena s istom količinom rektanata još dva puta. Sadržaj svih kiveta je spojen te je pH podešen do 8 otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ). Dobiveni spoj ekstrahiran je etil-acetatom ( $4 \times 100$  mL). Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Fenol **9** pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu DCM/metanol (7,5:2,5) te je korišten u daljnjoj sintezi.

Iskorištenje: 0,105 g (55 %).

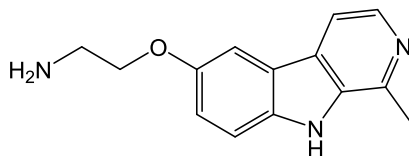
### 3.10. Sinteza *tert*-butil(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)karbamata (**10**)



Sinteza spoja **10** rađena je prema već objavljenom postupku (Marinović i sur., 2021). Fenol **9** mase 0,105 g (0,529 mmol) suspendiran je u 4 mL suhog DMF-a te mu je dodano 0,966 g (2,966 mmol) cezijeva karbonata i 0,144 g (0,423 mmol) TBAHS-a. Suspenzija je propuhana dušikom. Nakon 10 minuta reakcijskoj smjesi dodano je 0,948 g (4,232 mmol) 2-(Boc-amino)etil bromida te je miješano u atmosferi dušika na sobnoj temperaturi 24 sata. Idući dan dodano je 20 mL destilirane vode i ekstrahirano etil-acetatom ( $3 \times 30$  mL). Organski sloj ispran je destiliranom vodom, osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran, a organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom. Produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu DCM/metanol (8:1). Smjesa organskih otapala uparena je pod sniženim tlakom, a talog je rastrljan u eteru i odsisan.

Iskorištenje: 0,105 g (100 %).

### 3.11. Sinteza 2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etan-1-amina (**11**)

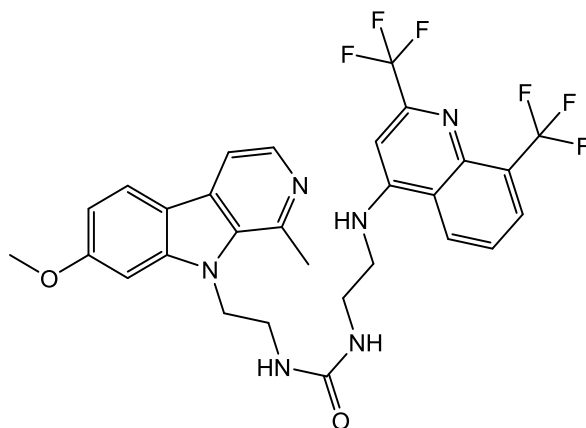


Amin **11** sintetiziran je po prethodno objavljenom postupku (Marinović i sur., 2021). Karbamat **10** mase 0,105 g (0,308 mmol) otopljen je u 4 mL suhog metanola te mu je dodano 1,54 mL 4 M klorovodične kiselina. Nakon 2,5 sata reakcija je prekinuta, otapalo je upareno te su dodana 3 mL destilirane vode. Potom je smjesa zaluzena otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) do pH 11–12 te je stavljen na ultrazvučnu kupelj. Talog je odsisan i otopljen u metanolu. Zatim je metanol uparen pod sniženim tlakom, a talog je rasturljan u eteru i odsisan. Dobiveni spoj je amin **11**.

Iskorištenje: 0,057 g (77 %).

### 3.12. Sinteza derivata harmina i kinolina **12a-c**

#### 3.12.1. Sinteza 1-(2-((2,8-bis(trifluorometil)kinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-(1-metil-7-metoksi-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)uree (**12a**)



CDI (0,033 g, 0,204 mmol) je otopljen u 1 mL suhog DMF-a. U ohlađenu otopinu CDI-a (0 °C) polako je dokapavana otopina amina **3** (0,029 g, 0,119 mmol) u suhom DMF-u (1 mL).

Nakon 90 minuta dodan je kruti amin **1** (0,046 g, 0,142 mmol) te je reakcijska smjesa ostavljena na sobnoj temperaturi. Idući dan reakcija je prekinuta dodatkom 15 mL destilirane

vode. Talog je odsisan i pročišćen kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu DCM/metanol (8:2). Novosintetizirana urea **12a** potom je rastrljena u eteru i odsisana.

Iskorištenje: 0,042 g (58 %).

Talište: 236,5–246,0 °C (raspad).

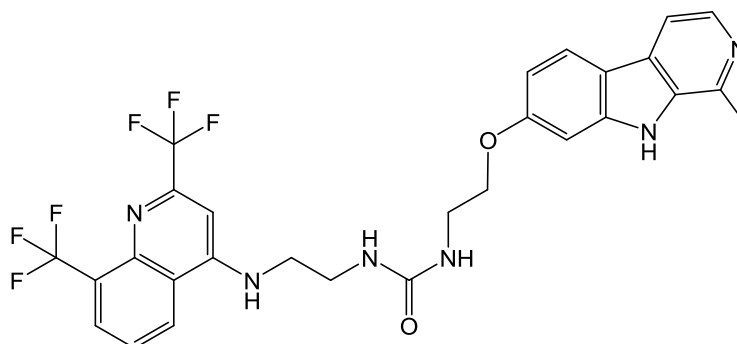
ESI-MS ( $m/z$ ) 605,1 (M+1)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 8,54 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1H), 8,22 (t,  $J$  = 5,1 Hz, 1H), 8,15 (d,  $J$  = 5,1 Hz, 1H), 8,14 (s, 1H), 8,06 (d,  $J$  = 8,6 Hz, 1H), 7,85 (d,  $J$  = 5,2 Hz, 1H), 7,65 (t,  $J$  = 7,9 Hz, 1H), 7,27 (d,  $J$  = 2,2 Hz, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,86 (dd,  $J$  = 8,6, 2,1 Hz, 1H), 6,39 (dt,  $J$  = 12,3, 5,9 Hz, 2H), 4,55 (t,  $J$  = 7,1 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,44-3,36 (m, 6H), 2,97 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 159,92, 158,36, 151,87, 147,71-147,05 (q,  $J_2$  = 33,0 Hz), 143,22, 142,33, 140,05, 137,00, 134,08, 128,43-128,33 (q,  $J_3$  = 6 Hz), 127,78, 126,07, 126,13-120,70 (q,  $J_1$  = 273 Hz), 125,88-125,50 (q,  $J_2$  = 28 Hz), 123,91, 123,83-118,35 (q,  $J_1$  = 273 Hz), 121,71, 118,73, 113,66, 111,61, 108,53, 93,67-93,62 (q,  $J_3$  = 2 Hz), 93,17, 54,84, 43,72, 43,10, 39,20, 37,39, 22,40.

IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3332, 1624, 1601, 1579, 1556, 1500, 1440, 1409, 1317, 1292, 1253, 1202, 1175, 1118, 971, 946, 816, 762, 727, 620 cm<sup>-1</sup>.

### 3.12.2. Sinteza 1-(2-((2,8-bis(trifluorometil)kinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)uree (12b)



Otopina CDI (0,023 g, 0,1422 mmol) u suhom DMF-u (1 mL) ohlađena je na 0 °C. Potom joj je polagano dokapana otopina amina **6** (0,029 g, 0,119 mmol) u suhom DMF-u (1 mL).

Nakon 60 minuta u reakcijsku smjesu dodan je kruti amin **1** (0,046 g, 0,142 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 24 sata. Idući dan reakcija je prekinuta dodatkom 15 mL destilirane vode. Nastali talog je odsisan, reakcijska smjesa je zaljučena otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) do pH 11 i ekstrahirana etil-acetatom ( $8 \times 50$  mL). Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom, a talog je rastrijan u eteru i odsisan. Ovim postupkom sintetizirana je urea **12b**.

Iskorištenje: 0,044 g (63 %).

Talište: 196,2–215,1 °C (raspad).

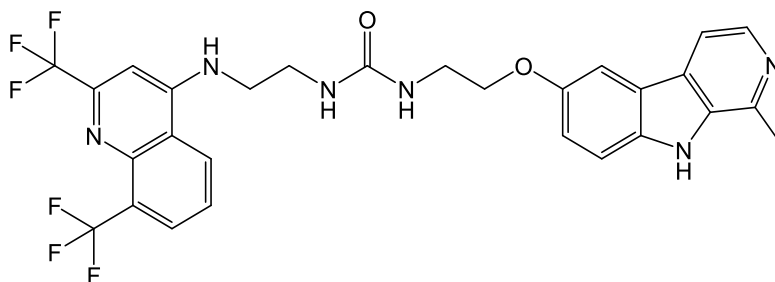
ESI-MS ( $m/z$ ) 591,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 11,40 (s, 1H), 8,55 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 8,23 (t,  $J = 5,2$  Hz, 1H), 8,15 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 8,13 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 8,03 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,80 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 7,69-7,64 (m, 1H), 7,01 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,83 (dd,  $J = 8,6, 2,2$  Hz, 1H), 6,40 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 6,36 (t,  $J = 5,9$  Hz, 1H), 4,08 (t,  $J = 5,6$  Hz, 2H), 3,48 (q,  $J = 5,6$  Hz, 2H), 3,45 (q,  $J = 5,9$  Hz, 2H), 3,37 (dt,  $J = 12,4, 6,0$  Hz, 2H), 2,72 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 159,11, 158,73, 152,40, 148,20-147,55 (q,  $J_2 = 33$  Hz), 143,71, 141,80, 141,14, 137,54, 134,45, 128,91-128,81 (q,  $J_3 = 5$  Hz), 127,13, 126,58, 126,63-121,19 (q,  $J_1 = 273$  Hz), 126,63-126,00 (q,  $J_2 = 36$  Hz), 124,47, 124,31-118,83 (q,  $J_1 = 278$  Hz), 122,53, 119,22, 114,86, 111,84, 109,19, 95,25, 94,19-94,14 (q,  $J_3 = 2$  Hz), 67,37, 43,64, 39,01, 37,91, 20,19.

IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3376, 3323, 1633, 1599, 1578, 1544, 1474, 1443, 1399, 1319, 1291, 1235, 1180, 1124, 1064, 971, 931, 821, 802, 771, 729, 567 cm<sup>-1</sup>

### 3.12.3. Sinteza 1-(2-((2,8-bis(trifluorometil)kinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-il)oksi)etil)uree (12c)



CDI (0,023g, 0,142 mmol) otopljen je u 1 mL suhog DMF-a i ohlađen na 0 °C. Amin **11** (0,029 g, 0,142 mmol) također je otopljen u 1 mL suhog DMF-a te je polagano dokapan ohlađenoj otopini CDI-a.

Nakon 150 minuta dodan je kruti amin **1** mase 0,046 g (0,142 mmol) te je reakcija miješana na sobnoj temperaturi. Nakon 48 sati reakcija je prekinuta te je dodano 20 mL vode. Nastali talog je odsisan i ispran eterom, zatim je rastrljan u eteru i ponovno odsisan. Novosintetizirana urea **12c** adsorbirana je na silikagel, pročišćena kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu DCM/metanol (7,5:2,5) te rastrljena u eteru i odsisana.

Iskorištenje: 0,049 g (70 %).

Talište: 254,5–256,5 °C (raspad).

ESI-MS ( $m/z$ ) 591,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 11,43 (s, 1H), 8,59 (dd,  $J = 8,7, 1,3$  Hz, 1H), 8,31 (t,  $J = 5,2$  Hz, 1H), 8,15 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 8,12 (dd,  $J = 7,3, 1,2$  Hz, 1H), 7,87 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 7,75 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 7,66 (dd,  $J = 8,5, 7,3$  Hz, 1H), 7,49 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 7,16 (dd,  $J = 8,8, 2,5$  Hz, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,47–6,43 (m, 2H), 4,06 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H), 3,49–3,43 (m, 3H), 3,39–3,37 (m,  $J = 5,8$  Hz, 2H), 2,74 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 158,92, 152,51, 152,35, 148,30–147,64 (q,  $J_2 = 33,0$  Hz), 143,81, 142,14, 136,74, 135,34, 135,05, 128,99–128,89 (q,  $J_3 = 5$  Hz), 126,80, 126,74, 126,74–121,30 (q,  $J_1 = 272,0$  Hz), 126,63–126,06 (q,  $J_2 = 28,7$  Hz), 124,53, 124,42–118,94 (q,  $J_1 = 276,0$  Hz), 121,36 119,33, 118,22, 112,72, 112,68, 104,57, 94,25–94,20 (q,  $J_3 = 2$  Hz), 67,89, 43,79, 39,66, 37,97, 20,34.

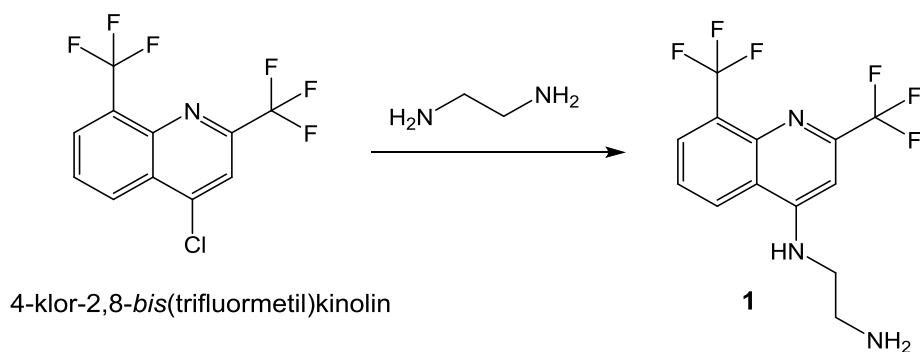
IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3356, 1605, 1603, 1581, 1546, 1504, 1460, 1439, 1371, 1293, 1211, 1128, 1073, 973, 844, 808, 765, 621  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4. REZULTATI I RASPRAVA**



Ciljni spojevi opisani u ovom radu hibridni su spojevi harmina i kinolina, strukturnog motiva prisustnog u antimalarijskom lijeku meflokinu, koji sadrže ureu kao poveznicu. Harmin je predstavnik  $\beta$ -karbolina koji pokazuje, među ostalim biološkim učincima, i antimalarijsko djelovanje. Studije su pokazale da se harmin veže na vezno mjesto za ATP proteina Hsp90 vrste *Plasmodium falciparum* te sprječava njen daljnji razvoj. U kombinaciji s antimalaricima, djeluje sinergistički i smanjuje pojavu rezistencije (Shahinas i sur., 2012). Harmin je, osim antimalarijskog, pokazao i antiproliferativno, antiinflamatorno te antivirusno djelovanje (Pavić i sur., 2021). S druge strane, meflokin se koristi u profilaksi i liječenju malarije uzrokovane vrstom *Plasmodium falciparum*. Također, derivati meflokina djeluju antiproliferativno i antimikrobno (Beus i sur., 2019).

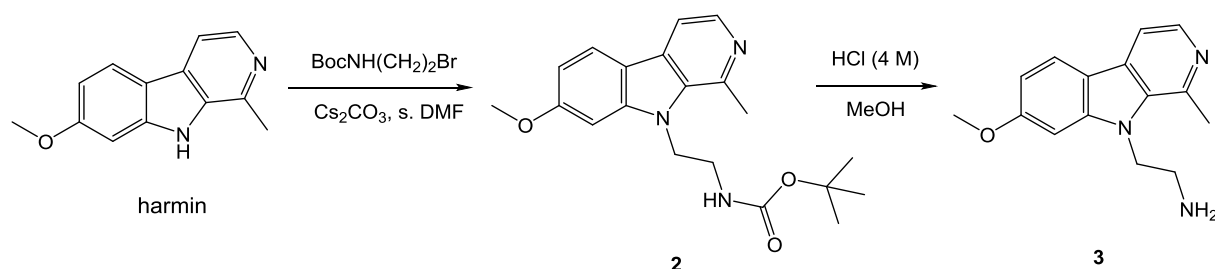
Za sintezu ciljnih urea prije svega potrebno je sintetizirati građevne blokove, odnosno pripremiti aminske derivate harmina i pojednostavljeni derivat meflokina. Sinteza derivata meflokina odvija se u jednom reakcijskom koraku (Shema 5). Klorirani derivat meflokina 4-klor-2,8-bis(trifluormetil)kinolin mehanizmom nukleofilne supstitucije uz dodatak etan-1,2-diamina prevodi se u  $N^1$ -(2,8-bis(trifluormetil)kinolin-4-il)etan-1,2-diamin. Reakcija se odvija u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 95 °C. Amin **1** pročišćen je ekstrakcijom te rastrljavanjem u eteru.



**Shema 5.** Sinteza meflokinskog amina **1**

Nakon sinteze amina **1** sintetizirani su derivati harmina s primarnom amino skupinom na alkilnom lancu vezanom na položaj N9, O7 ili O6  $\beta$ -karbolinskog prstena. Harminski amini predstavljaju drugi građevni element u sintezi urea, a pripremljeni su prema prethodno objavljenom postupku (Marinović i sur., 2021).

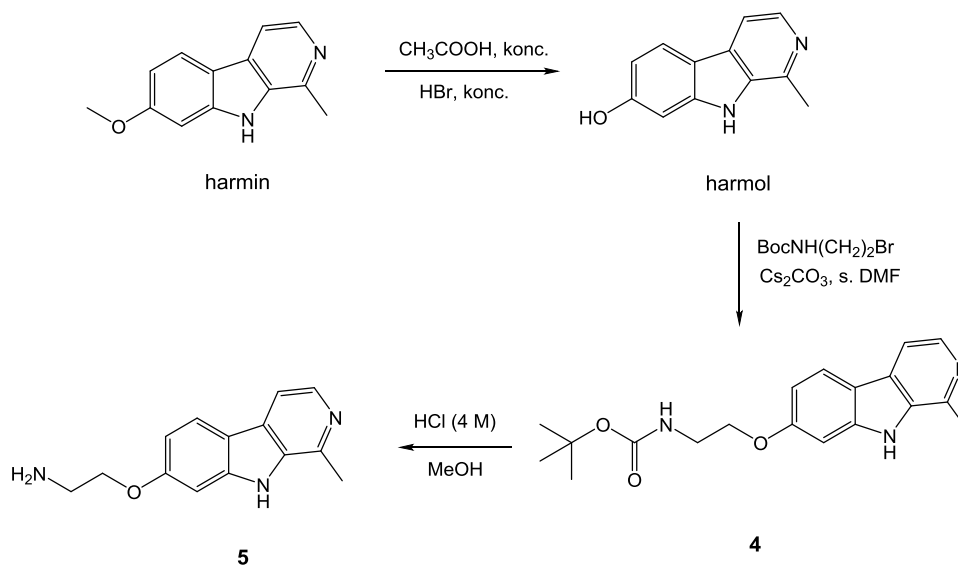
Amin na položaju N9  $\beta$ -karbolinskog prstena **3** sintetiziran je u dva reakcijska koraka iz harmina (Shema 6). U prvom koraku dolazi do alkilacije harmina 2-(Boc-amino)etil bromidom na položaju N9  $\beta$ -karbolinskog prstena te nastaje karbamat **2** u kojem je amino skupina zaštićena *tert*-butoksikarbonilnom (Boc) skupinom. Reakcija se odvija u inertnoj atmosferi dušika, u suhom DMF-u uz cezijev karbonat. Naime, cezijev karbonat djeluje kao baza i deprotonira amino skupinu harmina pri čemu nastaje nukleofil koji zatim reagira s 2-(Boc-amino)etil bromidom. U idućem koraku dolazi do uklanjanja zaštitne skupine u prisustvu klorovodične kiseline u metanolu te nastaje amin **3**. Dobiveni spoj je u obliku soli pa je zalužen otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) kako bi prešao u oblik baze koji je dobro topljiv u organskom otapalu. Amin **3** je pročišćen ekstrakcijom te je rastrljan eterom.



**Shema 6.** Sinteza amina **3**

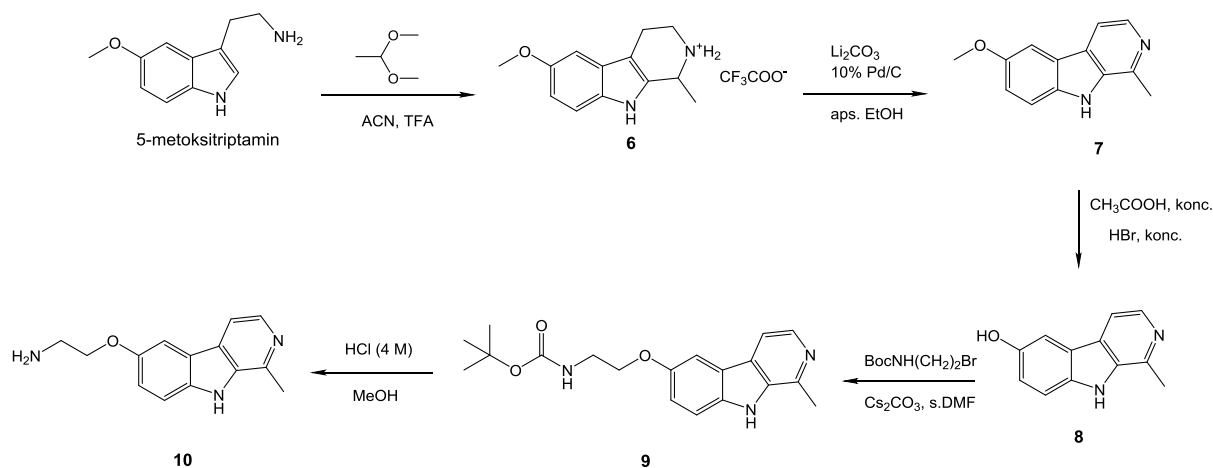
Sinteza amin na položaju O7  $\beta$ -karbolinskog prstena **5** odvija se u tri reakcijska koraka (Shema 7). Najprije je harmin preveden u harmol *O*-demetilacijom. Reakcija se odvija u kiselom mediju uz koncentriranu bromovodičnu i octenu kiselinu u mikrovalnom reaktoru na 140 °C. Kiseli uvjeti omogućuju protonaciju eterskog kisika u harminu pa se reakcija odvija  $S_N2$  reakcijskim mehanizmom. Nukleofilnom supstitucijom dolazi do cijepanja eterske veze. Halogenid djeluje kao nukleofil i napada protonirani kisik, zatim se izlazna metilna skupina veže na halogenid i nastaje fenol. U kiselom mediju harmol je u obliku soli, pa je potrebno zalužiti pH do 9–10 kako bi harmol prešao u oblik baze koja je dobro topljiva u organskom otapalu. Spoj je izoliran ekstrakcijom. Zatim je harmol alkiliran 2-(Boc-amino)etil bromidom u inertnoj atmosferi dušika u suhom DMF-u uz bazu cezijev karbonat. Ovom reakcijom nastaje karbamat **4** gdje je amino skupina zaštićena Boc-skupinom. U zadnjem koraku dolazi do uklanjanja Boc-skupine u prisustvu klorovodične kiseline u metanolu te nastaje amin **5**.

Produkt je preveden u bazu pomoću otopine NaOH ( $w = 5\%$ ) te je pročišćen ekstrakcijom i rastrljavanjem u eteru.



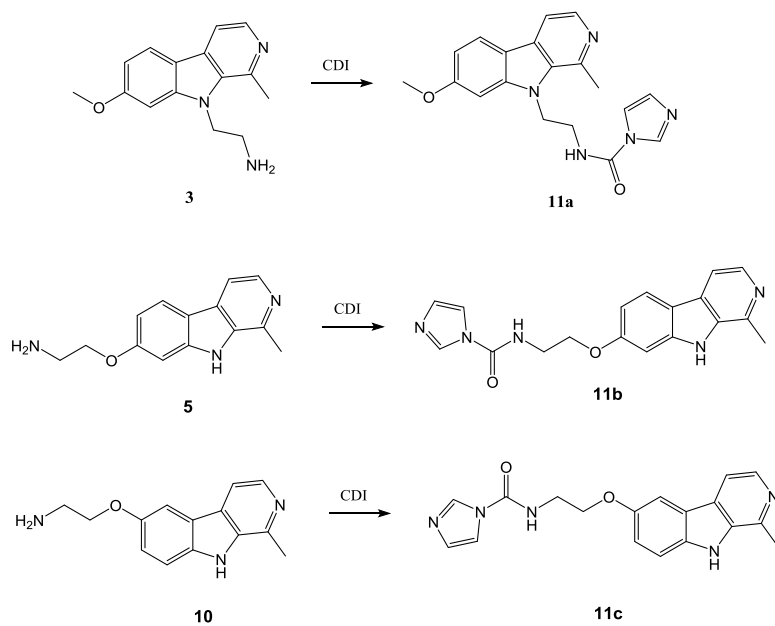
**Shema 7.** Sinteza amina **5**

Harminski derivat supstituiran na položaju O6 (amin **10**) sintetiziran je u pet koraka (Shema 8). Najprije je Pictet-Spenglerovom reakcijom sintetiziran tetrahidroksi- $\beta$ -karbolin **6** iz 5-metoksitriptamina i ADMA. U drugom koraku sinteze dolazi do aromatizacije spoja **6** te nastaje  $\beta$ -karbolin **7** s metoksi skupinom na položaju O6. Reakcija se odvija u mikrovalnom reaktoru na  $150\text{ }^\circ\text{C}$  uz katalizator  $10\%$  Pd/C. Također, za reakciju je važan litijev karbonat koji djeluje kao baza i prevodi reaktant **6** iz oblika soli u oblik baze. Dobiveni  $\beta$ -karbolin **7** je preveden u fenol **8** uz koncentriranu bromovodičnu i octenu kiselinu. Reakcija *O*-demetilacije je provedena u mikrovalnom reaktoru na  $140\text{ }^\circ\text{C}$ . Kiseli uvjeti neophodni su za nukleofilnu supstituciju kojom dolazi do cijepanja eterske veze i nastanka fenola **7**. Zaluživanjem se fenol **7** prevodi u oblik baze koji se može izolirati ekstrakcijom. U idućem koraku novosintetizirani fenol **8** alkiliran je 2-(Boc-amino)etil bromidom pri čemu je nastao karbamat **9** u kojem je amino skupina zaštićena Boc-skupinom. Reakcija se odvija u inertnoj atmosferi dušika u suhom DMF-u. Na kraju je pomoću klorovodične kiseline u metanolu uklonjena zaštitna skupina te je nastala sol koja zaluživanjem prelazi u amin **10**. Dobiveni spoj pročišćen je ekstrakcijom i rastrljavanjem u eteru.

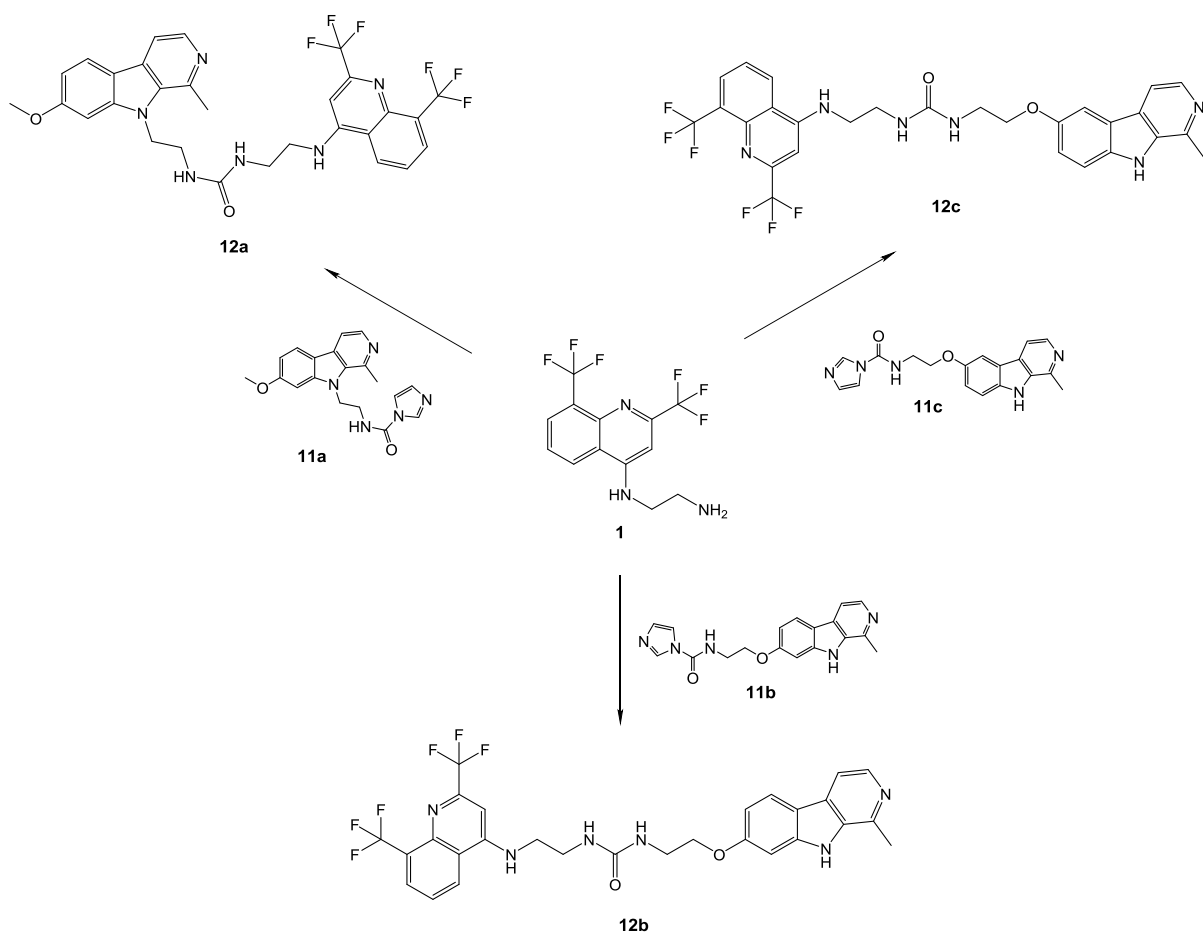


**Shema 8. Sintaza amina 10**

Amini **3**, **5** i **10** korišteni su u sintezi urea koja se odvija u dva koraka. U prvom koraku (Shema 9) koriste se *coupling* reagens CDI i prethodno sintetizirani odgovarajući  $\beta$ -karbolinski amin. Dušik iz amino skupine djeluje kao nukleofil i napada karbonilni ugljikov atom CDI-a, zatim se odcjepljuje izlazna imidazolska skupina te nastaje imidazolski međuprodukt **11a-c**.  $\beta$ -Karbolski amin je polagano dokapavan otopini CDI-a kako bi CDI stalno bio u suvišku. Time je spriječena supstitucija drugog imidazola i nastanak simetrične uree. Budući da je CDI osjetljiv na vlagu, reakcija se odvija u suhom DMF-u. Također, reakcijska smjesa je ohlađena na 0 °C. U drugom reakcijskom koraku (Shema 10) ponovno dolazi do nukleofilne supstitucije. Dušik iz amino skupine derivata meflokinia **1** napada karbonilni ugljikov atom spoja **11a-c** koji je u ovom koraku korišten bez izolacije. Imidazol je izlazna skupina te nastaju uree **12a-c**. Drugi korak sinteze odvija se na sobnoj temperaturi u suhom DMF-u. Dobiveni spojevi pročišćeni su na koloni i rastrljavanjem u eteru.



**Shema 9.** Prvi korak sinteze urea uz *coupling* reagens CDI



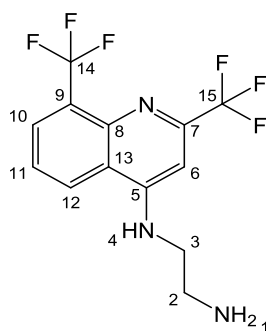
**Shema 10.** Drugi korak sinteze urea

Analitički i spektroskopski podatci spojeva koji su sintetizirani u okviru ovog rada prikazani su u Tablicama 1-6, a spektri svih spojeva nalaze se u poglavlju Prilozi.

**Tablica 1.** Analitički, MS i IR podatci za amin **1**

Spoj	Iskorištenje (%)	$t_t$ (°C)	Molekulska formula	Molekulska masa	MS (m/z)	IR (v/cm <sup>-1</sup> )
<b>1</b>	80	148,6	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub>	323,24	324,0 (M+1) <sup>+</sup>	3228, 1599, 1439, 1358, 1331, 1310, 1278, 1222, 1178, 1159, 1118, 1048, 1008, 967, 913, 899, 864, 819, 761, 745, 719, 618, 592, 560, 504

**Tablica 2.** <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR podatci za amin **1**

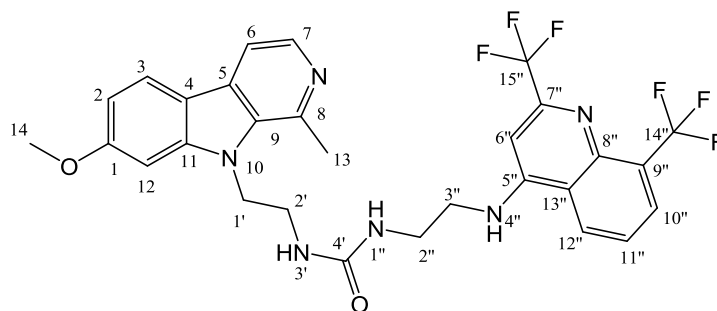


Spoj	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ/ppm, J/Hz)	(151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ/ppm, J/Hz)
<b>1</b>	8,65 (dd, $J = 8,6, 1,3$ Hz, 1H, 10), 8,15 (dd, $J = 7,3, 1,2$ Hz, 1H, 12), 7,93 (s, 1H, 4), 7,68 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, 11), 6,92 (s, 1H, 6), 3,39 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, 3), 2,85 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, 2), 1,63 (s, 2H, 1)	152,60 (5), 148,21–147,55 (q, $J = 32,8$ Hz, 7), 143,85 (8), 129,00–128,89 (q, $J$ $= 5,5$ Hz, 10), 127,04 (12), 126,61– 126,04 (q, $J = 28,7$ Hz, 9), 126,74– 121,31 (q, $J = 275$ Hz, 14), 124,43– 118,95 (q, $J = 276$ Hz, 15), 124,39 (11), 119,39 (13), 94,24–94,19 (q, $J =$ 2,6 Hz, 6), 46,18 (3), 40,00 (2)

**Tablica 3.** Analitički, MS i IR podatci za uree **12a-c**

Spoj	Iskorištenje (%)	$t_f$ (°C)	Molekulska formula	Molekulska masa	MS (m/z)	IR ( $\nu/\text{cm}^{-1}$ )
<b>12a</b>	58	236,4–246,1 (raspad)	$\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_2$	604,56	605,1 (M+1) <sup>+</sup>	3332, 1624, 1601, 1579, 1556, 1500, 1440, 1409, 1317, 1292, 1253, 1202, 1175, 1118, 971, 946, 816, 762, 727, 620
<b>12b</b>	63	196,2–215,1 (raspad)	$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_2$	590,53	591,1 (M+1) <sup>+</sup>	3376, 3323, 1633, 1599, 1578, 1544, 1474, 1443, 1399, 1319, 1291, 1235, 1180, 1124, 1064, 971, 931, 821, 802, 771, 729, 567
<b>12c</b>	70	254,5–256,5 (raspad)	$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_2$	590,53	591,1 (M+1) <sup>+</sup>	3356, 1605, 1603, 1581, 1546, 1504, 1460, 1439, 1371, 1293, 1211, 1128, 1073, 973, 844, 808, 765, 621

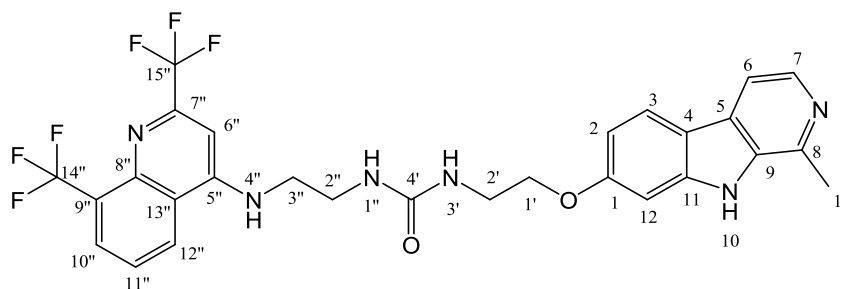
**Tablica 4.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podatci za ureu **12a**



Spoj	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ , $J/\text{Hz}$ )	(151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ , $J/\text{Hz}$ )
<b>12a</b>	8,54 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, 10''), 8,22 (t, $J = 5,1$ Hz, 1H, 4''), 8,15 (d, $J = 5,1$ Hz, 1H, 7), 8,14 (s, 1H, 12''), 8,06 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 3), 7,85 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 6), 7,65 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, 11''), 7,27 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 12), 6,98 (s, 1H, 6''), 6,86 (dd, $J = 8,6, 2,1$ Hz, 1H, 2), 6,39 (dt, $J = 12,3, 5,9$ Hz, 2H, 3', 1''), 4,55 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, 1'), 3,89 (s, 3H, 14), 3,44-3,36 (m, 6H, 2', 2'', 3''), 2,97 (s, 3H, 13)	159,92 (1), 158,36 (4'), 151,87 (5''), 147,71-147,05 (q, $J_2 = 33,0$ Hz, 7''), 143,22 (8''), 142,33 (8), 140,05 (11), 137,00 (7), 134,08 (9), 128,43-128,33 (q, $J_3 = 6$ Hz, 10''), 127,78 (4), 126,07 (12''), 126,13-120,70 (q, $J_1 = 273$ Hz, 14''), 125,88-125,50 (q, $J_2 = 28$ Hz, 9''), 123,91 (11''), 123,83-118,35 (q, $J_1 = 273$ Hz, 15''), 121,71 (3), 118,73 (13''), 113,66 (5), 111,61 (6), 108,53 (2), 93,67-93,62 (q, $J_3 = 2$ Hz, 6''), 93,17 (12), 54,84 (14), 43,72 (1'), 43,10 (3''), 39,20 (2''), 37,39 (2'), 22,40 (13)

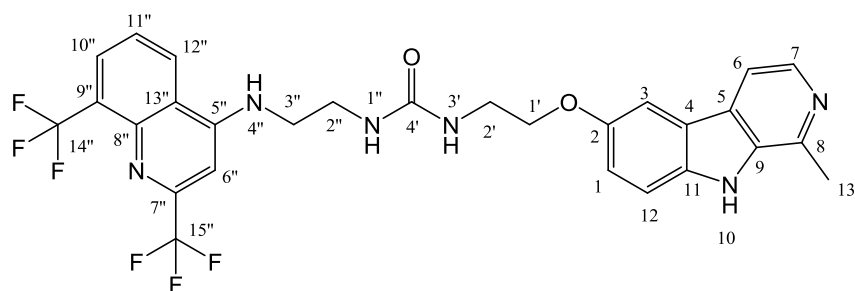


**Tablica 5.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podatci za ureu **12b**



Spoj	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	(600 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm, J/Hz)	(151 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm, J/Hz)
<b>12b</b>	11,40 (s, 1H, 10), 8,55 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, 10''), 8,23 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, 4''), 8,15 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 7), 8,13 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, 12''), 8,03 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 3), 7,80 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 6), 7,69-7,64 (m, 1H, 11''), 7,01 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 12), 6,98 (s, 1H, 6''), 6,83 (dd, $J = 8,6, 2,2$ Hz, 1H, 2), 6,40 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, 1''), 6,36 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H, 3'), 4,08 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, 1'), 3,48 (q, $J = 5,6$ Hz, 2H, 2'), 3,45 (q, $J = 5,9$ Hz, 2H, 3''), 3,37 (dt, $J = 12,4, 6,0$ Hz, 2H, 2''), 2,72 (s, 3H, 13)	159,11 (1), 158,73 (4'), 152,40 (5''), 148,20-147,55 (q, $J_2 = 33$ Hz, 7''), 143,71 (8''), 141,80 (8), 141,14 (11), 137,54 (7), 134,45 (9), 128,91-128,81 (q, $J_3 = 5$ Hz, 10''), 127,13 (4), 126,58 (12''), 126,63-121,19 (q, $J_1 = 273$ Hz, 14''), 126,63-126,00 (q, $J_2 = 36$ Hz, 9''), 124,47 (11''), 124,31-118,83 (q, $J_1 = 278$ Hz, 15''), 122,53 (3), 119,22 (13''), 114,86 (5), 111,84 (6), 109,19 (2), 95,25 (12), 94,19-94,14 (q, $J_3 = 2$ Hz, 6''), 67,37 (1'), 43,64 (3''), 39,01 (2''), 37,91 (2'), 20,19 (13)

**Tablica 6.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podatci za ureu **12c**



Spoj	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	(600 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm, $J$ /Hz)	(151 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm, $J$ /Hz)
<b>12c</b>	11,43 (s, 1H, 10), 8,59 (dd, $J = 8,7, 1,3$ Hz, 1H, 10''), 8,31 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, 4''), 8,15 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 7), 8,12 (dd, $J = 7,3, 1,2$ Hz, 1H, 12''), 7,87 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 6), 7,75 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, 3), 7,66 (dd, $J = 8,5, 7,3$ Hz, 1H, 11''), 7,49 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, 12), 7,16 (dd, $J = 8,8, 2,5$ Hz, 1H, 1), 6,98 (s, 1H, 6''), 6,47–6,43 (m, 2H, 3', 1''), 4,06 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, 1'), 3,49–3,43 (m, 3H, 2', 3''), 3,39–3,37 (m, $J = 5,8$ Hz, 2H, 2''), 2,74 (s, 3H, 13)	158,92 (4'), 152,51 (5''), 152,35 (2), 148,30–147,64 (q, $J_2 = 33,0$ Hz, 7''), 143,81 (8''), 142,14 (8), 136,74 (7), 135,34 (11), 135,05 (9), 128,99–128,89 (q, $J_3 = 5$ Hz, 10''), 126,80 (12''), 126,74 (4), 126,74–121,30 (q, $J_1 = 272,0$ Hz, 14''), 126,63–126,06 (q, $J_2 = 28,7$ Hz, 9''), 124,53 (11''), 124,42–118,94 (q, $J_1 = 276,0$ Hz, 15''), 121,36 (5), 119,33 (13''), 118,22 (1), 112,72, 112,68 (6, 12), 104,57 (3), 94,25–94,20 (q, $J_3 = 2$ Hz, 6''), 67,89 (1'), 43,79 (3''), 39,66 (2''), 37,97 (2'), 20,34 (13)

Fizičko-kemijski deskriptori sintetiziranih molekula i njihov utjecaj na farmakokinetiku određeni su pomoću besplatnog web alata SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch)). Bioraspoloživost obuhvaća brzinu i obim apsorpcije primijenjene doze lijeka koja dopijeva u sistemsku cirkulaciju te će biti na raspolaganju organizmu na određenom mjestu biološkog učinka. Promjena bioraspoloživosti lijeka utječe na promjenu njegove farmakodinamike i toksičnosti. Poželjno je da novosintetizirani spojevi imaju dobru oralnu bioraspoloživost. Postoji više različitih modela kojima se može odrediti oralna bioraspoloživost na temelju fizičko-kemijskih parametara. Najznačajniji su modeli koje su predložili Lipinski i Veber, takozvana Lipinskijeva i Veberova pravila. Prema Lipinskom molekula koja ima dobru bioraspoloživost mora zadovoljiti četiri pravila. Naime, mora imati relativnu molekulsku masu manju od 500, broj donora vodikovih veza mora biti manji od 6, dok broj akceptora vodikovih veza ne smije biti veći od 10 te logaritam koeficijenta raspodjele ( $\log P$ ) mora biti manji od 5 (Lipinski i sur., 1997). S druge strane, Veberova pravila nadopuna su Lipinskijevih pravila te u obzir uzimaju i fleksibilnost, odnosno polarnost molekule. Stoga, broj rotirajućih veza ne smije biti veći od 10, zbroj donora i akceptora vodikovih veza ne smije biti veći od 12 te topološka ploština zone polarne površine (TPSA) mora biti manje od  $120 \text{ \AA}^2$  (Veber i sur., 2002). U Tablici 7. prikazani su izračunati parametri za spojeve **12a-c**.

**Tablica 7.** Pregled fizičko-kemijskih parametara izračunatih pomoću web alata SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch))

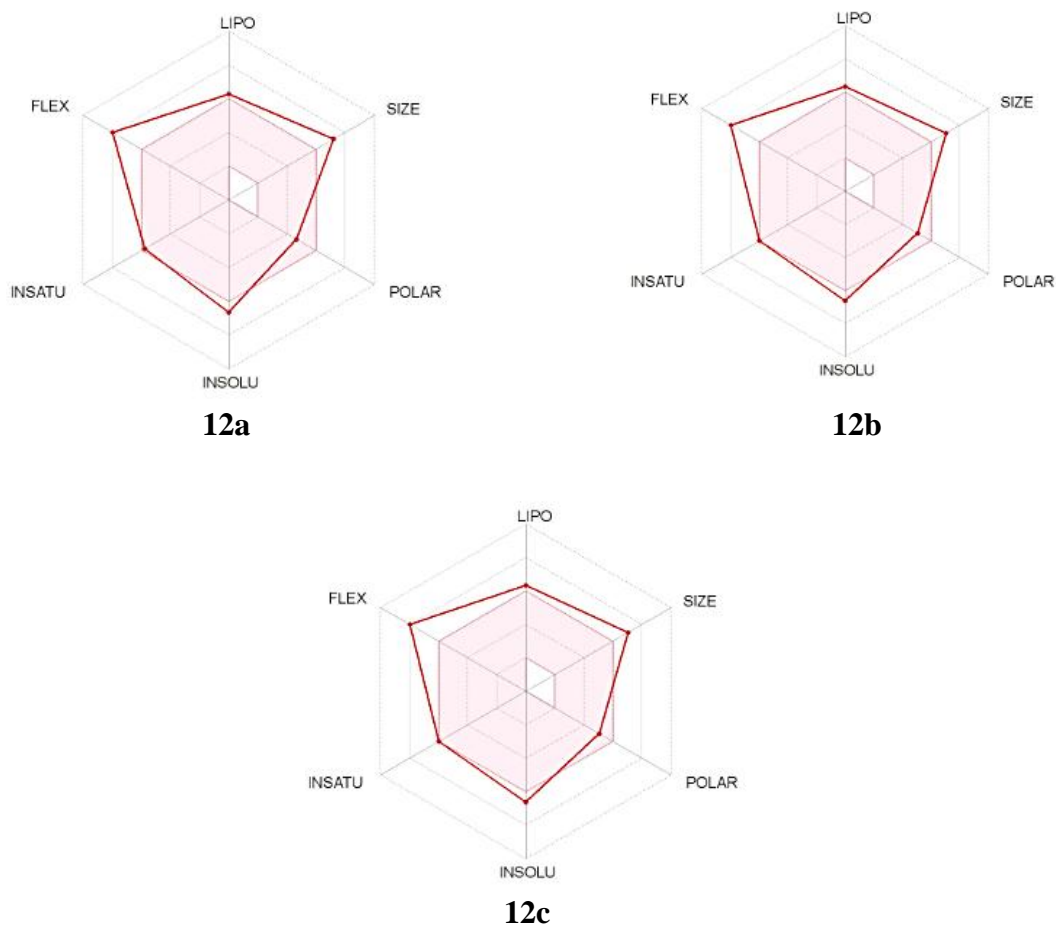
Spoj	12a	12b	12c
Molekulska formula	$C_{29}H_{26}F_6N_6O_2$	$C_{28}H_{24}F_6N_6O_2$	$C_{28}H_{24}F_6N_6O_2$
$M$ (g/mol)	604,56	590,53	590,53
$\log P$	5,47	5,58	5,58
Broj donora vodikove veze	3	4	4
Broj akceptora vodikove veze	10	10	10
Zbroj donora i akceptora vodikove veze	13	14	14
Broj rotirajućih veza	12	12	12
TPSA ( $\text{\AA}^2$ )	93,10	103,96	103,96
Lipinskijeva pravila	2/4	2/4	2/4
Veberova pravila	1/3	1/3	1/3

Prema izračunatim podacima svi novosintetizirani spojevi djelomično zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila te im se stoga predviđa smanjena oralna bioraspoloživost. Spojevi imaju preveliku relativnu molekulsku masu, dok im  $\log P$  malo premašuje dozvoljenu vrijednost. Broj akceptora i donora vodikove veze je u dozvoljenom rasponu, no zbroj donora i akceptora vodikovih veza je prevelik. Također, imaju prevelik broj rotirajućih veza.

*Bioavailability radar* (Slika 13) grafički prikazuje utjecaj šest fizičko-kemijskih svojstava na oralnu bioraspoloživost. Sam dijagram je šesterokutnog oblika. Svaki kut šesterokuta predstavlja jedno svojstvo, a ružičasto polje predstavlja optimalni raspon tog svojstva. Na oralnu bioraspoloživost utječu lipofilnost, veličina molekule, polarnost, netopljivost, nezasićenost te fleksibilnost spoja. Lipofilnost (LIPO) je izražena logaritmom koeficijenta razdjeljenja ( $\log P$ ) koji je izračunat programom XLOGP 3.2.2., a optimalna vrijednost nalazi se između  $-0,7$  i  $+5,0$ . Veličina molekule (SIZE) kvantificirana je molarnom masom ( $M$ ) te joj vrijednost mora biti između 150 i 500 g/mol. Polarnost molekule (POLAR) izražena je ploštinom zone polarne površine (TPSA) čija vrijednost mora biti između 20 i 130 Å<sup>2</sup>. Netopljivost (INSOLU) je izražena kao negativni logaritam molarne topljivosti ( $\log S$ ) koji ne smije biti manji od  $-6$ . S druge strane, nezasićenost (INSATU) izražena je kao udio ugljika u  $sp^3$  hibridizaciji u odnosu na ukupan broj ugljika, a on mora biti veći od 0,25. Fleksibilnost (FLEX) kvantificirana je brojem rotirajućih veza kojii ne smije biti veći od 9 (Daina i sur., 2017). Web alat SwissADME crvenom bojom iscrtava šesterokut za analizirani spoj ovisno o njegovim vrijednostima fizičko-kemijskih svojstava. U Tablici 8 prikazane su vrijednosti fizičko-kemijskih parametra za novosintetizirane spojeve.

**Tablica 8.** Pregled fizičko-kemijskih svojstava koja utječu na oralnu bioraspoloživost izračunatih pomoću web alata SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch))

Spoj	12a	12b	12c
$\log P$	5,47	5,58	5,58
$M$ (g/mol)	604,56	590,53	590,53
TPSA (Å <sup>2</sup> )	93,10	103,96	103,96
$\log S$	-6,64	-6,63	-6,63
Udio $C_{sp^3}$	0,28	0,25	0,25
Broj rotirajućih veza	12	12	12



**Slika 13.** *Bioavailability radar* novosintetiziranih spojeva **12a-c**  
(preuzeto sa <http://www.swissadme.ch/>)

Iz podataka prikazanih na Slici 13 vidljivo je da novosintetizirane uree **12a-c** zadovoljavaju samo dva od šest parametara – polarnost i nezasićenost. Na smanjenu oralnu bioraspoloživost izrazito utječe molekulska masa spojeva veća od 500 g/mol, zbog koje je povećana lipofilnost spojeva i smanjena topljivost. Također, prevelik broj rotirajućih veza uzrokuje preveliku fleksibilnost spojeva.

U farmakokinetičkim ispitivanjima proučava se prelazak lijeka preko različitih barijera i njegova distribucija u tkiva. Mogućnost prelaska gastrointestinalne membrane, odnosno permeabilnost lijeka zajedno s njegovom topljivošću predstavljaju biofarmaceutska svojstva djelatne tvari izravno povezana s oralnom bioraspoloživošću. Lijek, koji pasivno prolazi

gastrointestinalnu membranu, dobro se apsorbira i uglavnom ima dobru oralnu bioraspoloživost. Lijek koji slabo prolazi gastrointestinalnu membranu, ima smanjenu i oralnu bioraspoloživost. Osim prelaska gastrointestinalne membrane i topljivosti, na oralnu bioraspoloživost mogu utjecati i efluksni sustavi. Najznačajniji efluksni protein u gastrointestinalnom sustavu je P-glikoprotein. On se također nalazi i u krvno-moždanoj barijeri. Distribucija lijeka u mozak i neželjeno djelovanje na središnji živčani sustav uvjetovani su mogućnošću prolaska krvno moždane barijere.

Kod ranog ispitivanja farmakokinetike važno je predvidjeti kojim metaboličkim reakcijama podliježe sintetizirana molekula. Isto tako, važno je predvidjeti utjecaj na citokrom P450 (CYP), najvažniju skupinu enzima u metabolizmu brojnih lijekova. Novosintetizirana molekula može djelovati kao induktor nekog od enzima CYP te na taj način smanjiti djelovanje drugog lijeka koji se metabolizira do inaktivnih metabolita preko tog enzima. S druge strane, ako molekula djeluje kao inhibitor određenog enzima CYP, povećava se slobodna frakcija lijeka koji se metabolički inaktivira preko tog enzima CYP i on djeluje toksično.

Podatci o distribuciji i metabolizmu sintetiziranih urea prikazani su u Tablici 9.

**Tablica 9.** Predviđena farmakokinetička svojstva novosintetiziranih urea **12a-c** izračunatih pomoću web alata SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch))

Spoj	12a	12b	12c
<b>GIT apsorpcija</b>	Slaba	Slaba	Slaba
<b>Prolazak KMB</b>	Ne	Ne	Ne
<b>Supstrat P-gp</b>	Ne	Ne	Ne
<b>Inhibitor CYP1A2</b>	Da	Da	Da
<b>Inhibitor CYP2C19</b>	Da	Da	Da
<b>Inhibitor CYP2C9</b>	Da	Da	Da
<b>Inhibitor CYP2D6</b>	Da	Da	Da
<b>Inhibitor CYP3A4</b>	Da	Da	Da

Prema podacima iz Tablice 9 za spojeve **12a-c** predviđena je slaba apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta pa nisu pogodni za oralnu primjenu. Također, predviđeno je da niti

jedan spoj ne prolazi krvno-moždanu barijeru, stoga je vjerojatnost za neželjeno djelovanje na središnji živčani sustav minimalna. Budući da harmin djeluje halucinogeno i meflokin neurotoksično, nemogućnost prolaska krvno-moždane barijere iznimno je važna. Također, alat SwissADME predviđa da niti jedan spoj nije supstrat P-glikoproteina. No, predviđeno je da su svi novosintetizirani spojevi inhibitori najvažnijih enzima CYP koji sudjeluju u metabolizmu većine ksenobiotika i endobiotika te bi se stoga trebali primjenjivati kao monoterapija.

## **5. ZAKLJUČAK**



U ovom radu opisana je sinteza novih hibridnih urea harmina i meflokina. Sama sinteza i karakterizacija provedene su u okviru istraživanja derivata harmina kao potencijalnih antimalarijskih i citostatskih lijekova koje se provodi na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

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

- $N^1$ -(2,8-*bis*(trifluormetil)kinolin-4-il)etan-1,2-diamin (**1**)
- 1-(2-((2,8-*bis*(trifluormetil)kinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)urea (**12a**)
- 1-(2-((2,8-*bis*(trifluormetil)kinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)urea (**12b**)
- 1-(2-((2,8-*bis*(trifluormetil)kinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)urea (**12c**)

Opisana je i sinteza prekursora – harmola, fenola **8** te aaminskih derivata harmina **3**, **5** i **10**. Ovi spojevi prethodno su opisani u literaturi.

Novosintetiziranim spojevima **1** i **12a-c** struktura je potvrđena analitičkim (MS) i spektroskopskim metodama (IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR) te im je određena temperatura tališta.

Na temelju strukture ureama **12a-c** predviđeni su fizičko-kemijski parametri koji utječu na oralnu biorasploživost te mogućnost prolaska krvno-moždane barijere. Ciljnim spojevima **12a-c** određena je i vjerojatnost da budu supstrati P-glikoproteina te njihov utjecaj na enzime CYP. Farmakokinetička svojstva predviđena su računski pomoću web alata SwissADME.

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, novosintetiziranim ureama ispitat će se antimalarijsko i citostatsko djelovanje.

## **6. LITERATURA**

- Angello S, Brand M, Chella M, Gazzola S, Riedl R. A structural view on medicinal chemistry strategies against drug resistance. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58, 3300-3345.
- Allen J, Holmstedt B. The simple  $\beta$ -carboline alkaloids. *Phytochemistry*, 1980, 19, 1573-1582.
- Ang K, Holmes M, Higa T, Hamann M, Kara U. In vivo antimalarial activity of the beta-carboline alkaloid manzamine A. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44, 1645-1649.
- Beus M, Persoons L, Daelemans D, Schols D, Savijoki K, Varmanen P, Yli-Kauhaluoma J, Pavić K, Zorc B. Anthranilamides with quinoline and  $\beta$ -carboline scaffolds: design, synthesis, and biological activity. *Mol Divers*, 2022, <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10347-8>, pristupljeno 7.4.2022.
- Beus M, Fonthina D, Held J, Rajić Z, Prudencio N, Zorc B. Synthesis and antiplasmodial evaluation of novel mefloquine-based fumaridamides. *Acta Pharm*, 2019, 69, 233-248.
- Brierley D, Davidson C. Developments in harmine pharmacology – implications for ayahuasca use and drug-dependance treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2012, 39, 263-272.
- Brown J, North E, Hurdle J, Morisseau C, Scarborough J, Sun D, Kordulakova J, Scherman M, Jones V, Grzegorzewicz A, Crew R, Jackson M, McNeil M, Lee R. The structure-activity relationship of urea derivatives as anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 5585-5595.
- Cao R, Peng W, Wang Z, Xu A.  $\beta$ -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Curr Med Chem*, 2007, 14, 479-500.
- Christiaans J, Timmerham H. Cardiovascular hybrid drugs: combination of more than one pharmacological property in one single molecule. *Eur J Pharm Sci*, 1996, 4, 1-22.
- Chu XM, Wang C, Wang WL, Liang LL, Liu W, Gong KK, Sun KL. Triazole derivatives and their antiplasmodial and antimalarial activities. *Eur J Med Chem*, 2019, 166, 206-223.
- 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*, 7, 42717, 1-13.
- Dube P, Fine Nathel N, Vetelino M, Couturier M, Aboussafy C, Pichette S, Jorgensen M, Hardnik M. Carbonyldiimidazole-mediated lossen rearrangement. *Org Lett*, 2009, 11, 5622-5625.
- Fortin S, Berube G. Advance in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov*, 2013, 8, 1029-1047.

- Gasco A, Boschi D, Chegaev K, Cena C, Di Stilo A, Fruttero R, Lazzarato L, Rolando B, Tosco P. Multitarget drugs: focus on the NO-donor hybrid drugs. *Pure Appl Chem*, 2008, 80, 1693-1701.
- Grediya L, Njar V. Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov*, 2009, 4, 1099-1111.
- Ghosh A, Brindisi M. Urea derivatives in modern drug discovery and medicinal chemistry. *J Med Chem*, 2020, 63, 2751-2788.
- Herraiz T, Guillen H, Gonzalez-Pena D, Aran V. Antimalarial quinoline drugs inhibit  $\beta$ -hematin and increase free harmine catalyzing peroxidative reactions and inhibition of cysteine proteases. *Sci Rep*, 2019, 9, 1-16.
- Hulsman N, Medema J, Bos C, Jongejan A, Leurs R, Smit M, De Esch I, Richel D, Wijtmans M. Chemical insights in the concept of hybrid drugs: the antitumor effect of nitric oxide-donating aspirin involves a quinone methide but not nitric oxide nor aspirin. *J Med Chem*, 2007, 50, 2424-2431.
- HZJZ. Bilten Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. godine | Hrvatski zavod za javno zdravstvo, <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/bilten-incidencija-raka-u-hrvatskoj-2015-godine>, pristupljeno 11.5.2022.
- Kim S, Hong S. Ruthenium-catalyzed urea synthesis using methanol as the C1 source. *Org Lett*, 2016, 18, 212-215.
- Kozlina F, Mlinarić Z, Rajić Z. Prenamjena lijekova kao strategija u razvoju novih lijekova. *Farm Glas*, 2018, 74, 201-208
- Khodair R, Da I. Synthesis of novel compounds from harmine ( $\beta$ -carboline derivatives) isolated from Syrian *Peganum harmala* L. seeds. *Int J Acad Sci Res*, 2017, 5, 57-76.
- Lanzillotto M, Konnert L, Lamaty F, Martinez J, Colacino E. Mechanochemical 1,1'-carbonyldiimidazole-mediated synthesis of carbamates. *ACS Sustain Chem Eng*, 2015, 3, 2882-2889.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23, 3-25.
- Liu X, Li M, Tan S, Wang C, Fan S, Huang C. Harmine is an inflammatory inhibitor through the suppression of NF- $\kappa$ B signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 489, 332-338.

- Marinović M, Perković I, Fontinha D, Prudêncio M, Held J, Pessanha de Carvalho L, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić Z. Novel harmicines with improved potency against *Plasmodium*. *Molecules*, 2020, 25, 4376.
- Marinović M, Poje G, Perković I, Fontinha D, Prudencio M, Held J, Pessanha de Carvalho L, Tandarić T, Vianello R, Rajić Z. Further investigation of harmicines as novel antiplasmodial agents: synthesis, structure-activity relationship and insight into the mechanism of action. *Eur J Med Chem*, 2021, 224, 113687.
- McChensey E, Fitch C. 4-Aminoquinolines. U: Antimalarial drug II. Handbook of Experimental Pharmacology. Peters W, Richards W, urednici, Heidelberg, Springer-Verlag Berlin, 1984.
- O'Neil P, Bray P, Hawley S, Ward S, Kevin Park B. Aminoquinolines – past, present, and future: a chemical perspective. *Pharmacol Ther*, 1998, 77, 29-58.
- O'Neil P, Ward S, Berry N, Jeyadevan J, Biagini G, Asadollaly E, Park B, Bray P. A medicinal chemistry perspective on 4-aminoquinoline antimalarial drugs. *Curr Top Med Chem*, 2006, 6, 479-507.
- O'Neil P, Barton V, Ward S, Chadwick J. 4-Aminoquinolines: chloroquine, amodiaquine and next-generation analogues. U: Treatment and prevention of malaria: antimalarial drug chemistry, action and use. Staines H, Krishna S, urednici, Basel, Springer Basel, 2012, str. 19-44,
- Padiya K, Gavade S, Kardile B, Tiwari M, Bajare S, Mane M, Gaware V, Varghese S, Harel D, Kurhade S. Unprecedented "in water" imidazole carbonylation: paradigm shift for preparation of urea and carbamate. *Org Lett*, 2012, 14, 2814-2817.
- Patel K, Gadewar M, Tripathi R, Prased S, Patel D. A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid "harmine". *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 2, 660-664.
- Pavić, K. Sinteza, karakterizacija i biološko djelovanje semikarbazida, urea i ureidoamida primakina. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017.
- Perković I, Antunović M, Marijanović I, Pavić K, Ester K, Kralj M, Vlainić J, Kosalec I, Schlos D, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E, Zorc B. Novel urea and bis-urea primaquine derivatives with hydroxyphenyl or halogenphenyl substituents: synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem*, 2016, 124, 622-636.
- Price R, Uhlemann A, Brockman A, Mcgready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White N, Nosten F, Krishna S. Mefloquine resistance in

- Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*, 2004, 364, 438-447.
- Quiros Roldan E, Biasiotto G, Margo P, Zanella I. The possible mechanisms of action of 4-aminoquinolines (chloroquine/hydroxychloroquine) against Sars-Cov-2 infection (COVID-19): a role for iron homeostasis. *Pharm Res*, 2020, 158, 104904.
- 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.
- Sureshababu VV, Basavaprabhu. *N, N'*-Carbonyldiimidazole-mediated DBU-catalyzed one-pot synthesis of urea-tethered glycosyl amino acids and glycoconjugates, *Synlett*, 2011, 8, 1160-1164.
- Šimunović M, Perković I, Zorc B, Ester K, Kralj M, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E. Urea and carbamate derivatives of primaquine: synthesis, cytostatic and antioxidant activities. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17, 5605-5613.
- SwissADME, 2021., <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 13.4.2022.
- Toovey S. Mefloquine neurotoxicity: a literature review. *Travel Med Infect Dis*, 2009, 7, 2-6.
- 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.
- Waki H, Park K, Mitro N, Pei L, Damoiseaux R, Wilpitz D, Reue K, Saez E, Tontonz P. The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPAR $\gamma$  expression. *Cell Metab*, 2007, 5, 375-370.
- Walsh J, Bell A. Hybrid drugs for malaria. *Curr Pharm Des*, 2009, 15, 2970-2985
- Wang H, Xin Z, Li Y. Synthesis of ureas from CO<sub>2</sub>. *Top Curr Chem*, 2017, 375, 177-202.
- World Health Organisation. Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/>, pristupljeno 11.5.2022.
- Zorc B. Primjena klorokina i hidroksiklorokina u suvremenoj terapiji. *Farm Glas*, 2021, 77, 465-478.

## **7. SAŽETAK / SUMMARY**

## **Sinteza i karakterizacija novih hibridnih urea harmina i meflokina**

Ovaj rad dio je istraživanja provedenog na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje obuhvaća dizajn, sintezu i biološku evaluaciju derivata harmina s potencijalnim antimalarijskim djelovanjem. Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija novih hibridnih urea harmina i meflokina. Sinteza je započeta prevođenjem derivata meflokina do odgovarajućeg amina **1**. Harmol **2** je dobiven iz harmina, dok je fenol **7** dobiven iz 5-metoksitriptamina. Harmin, harmol i fenol **7** su pomoću 2-(Boc-amino)etil bromida i klorovodične kiseline prevedeni u odgovarajuće amine **3**, **5** i **10**. Nukleofilnom supstitucijom uz CDI iz amina **3**, **5** i **10** te amina **1** sintetizirani su konačni produkti – uree **12a-c**.

Strukture svih novosintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, MS) te im je određena temperatura tališta. Sva tri konačna spoja djelomično zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila koja se koriste za predviđanje oralne biorasploživosti lijekova. Također, web alat SwissADME predviđa slabu oralnu biorasploživost urea **12a-c**. Antimalarijsko i citostatsko djelovanje novosintetiziranih derivata bit će ispitano u daljnjim istraživanjima koja prelaze okvire ovog rada.

Ključne riječi: harmin, meflokin, urea, CDI



## Synthesis and characterization of novel harmine and mefloquine hybrid ureas

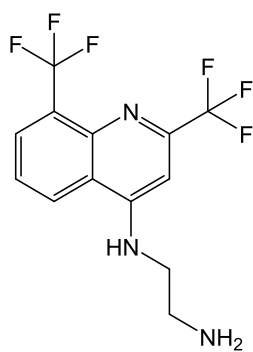
This paper is part of ongoing research at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb. The research includes the design, synthesis and biological evaluation of novel harmine derivatives as potential antimalarial drugs. The aim of this diploma thesis was the synthesis and characterization of novel harmine urea derivatives comprising mefloquine moiety in their structure. The synthesis began with the transformation of the mefloquine derivative to amine **1**. Harmol **2** was generated from harmine, while phenol **7** was generated from 5-methoxytryptamine. Then, harmine, harmol and phenol **7** were converted into amines **3**, **5** and **10** using 2-(Boc-amino)ethyl bromide and subsequently, hydrochloric acid. The final products, ureas **12a-c**, were synthesized by nucleophilic substitution from amines **3**, **5**, **10** and amine **1**. CDI was used as a coupling reagent.

The structures of newly synthesized compounds were confirmed using analytical and spectroscopic methods (IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, MS). In addition, melting points were determined for solid compounds. Novel derivatives fulfil some of Lipinski's and Veber's criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME web tool predicts poor oral bioavailability as well. The antimalarial and cytostatic activity of the newly synthesized compounds will be examined in further studies.

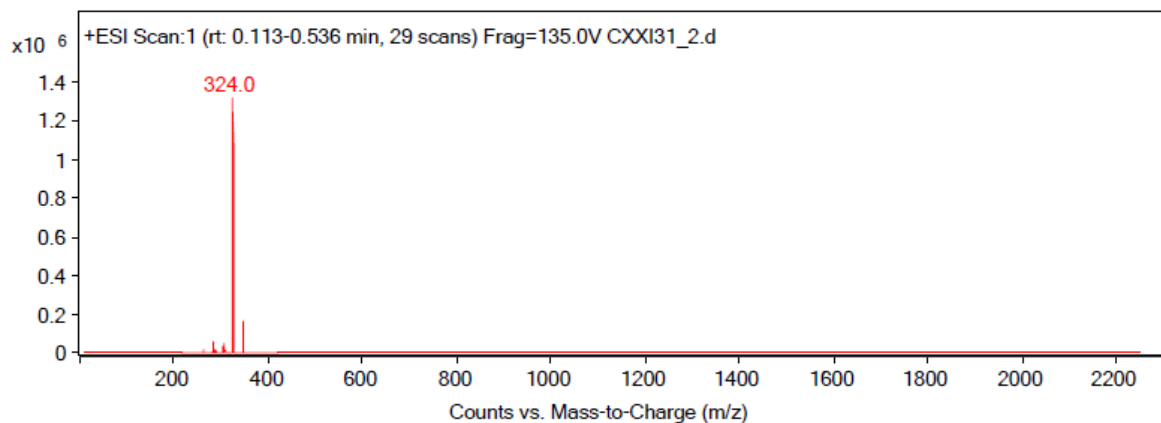
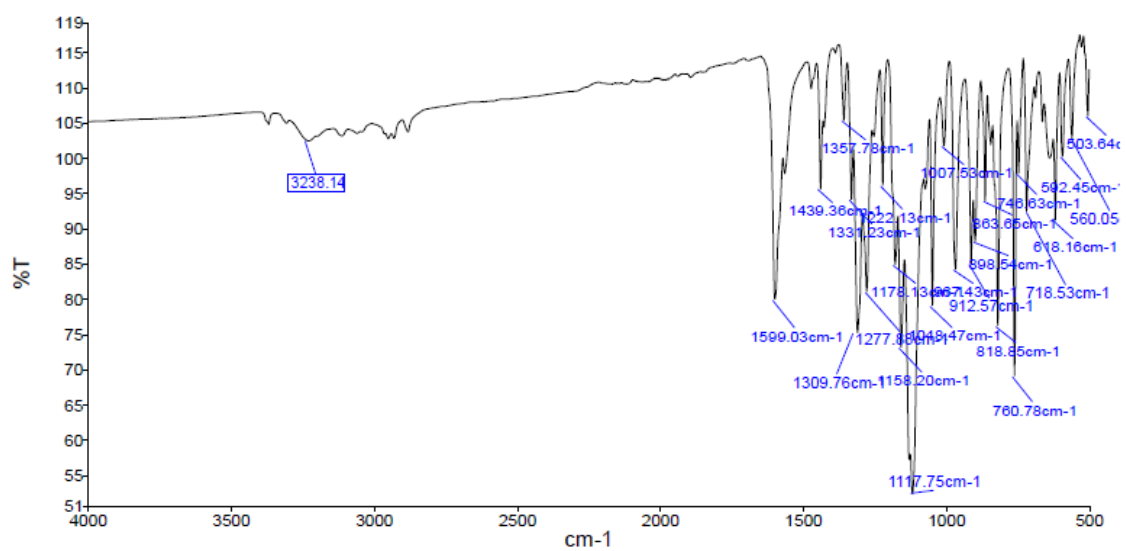
Keywords: harmine, mefloquine, urea, CDI

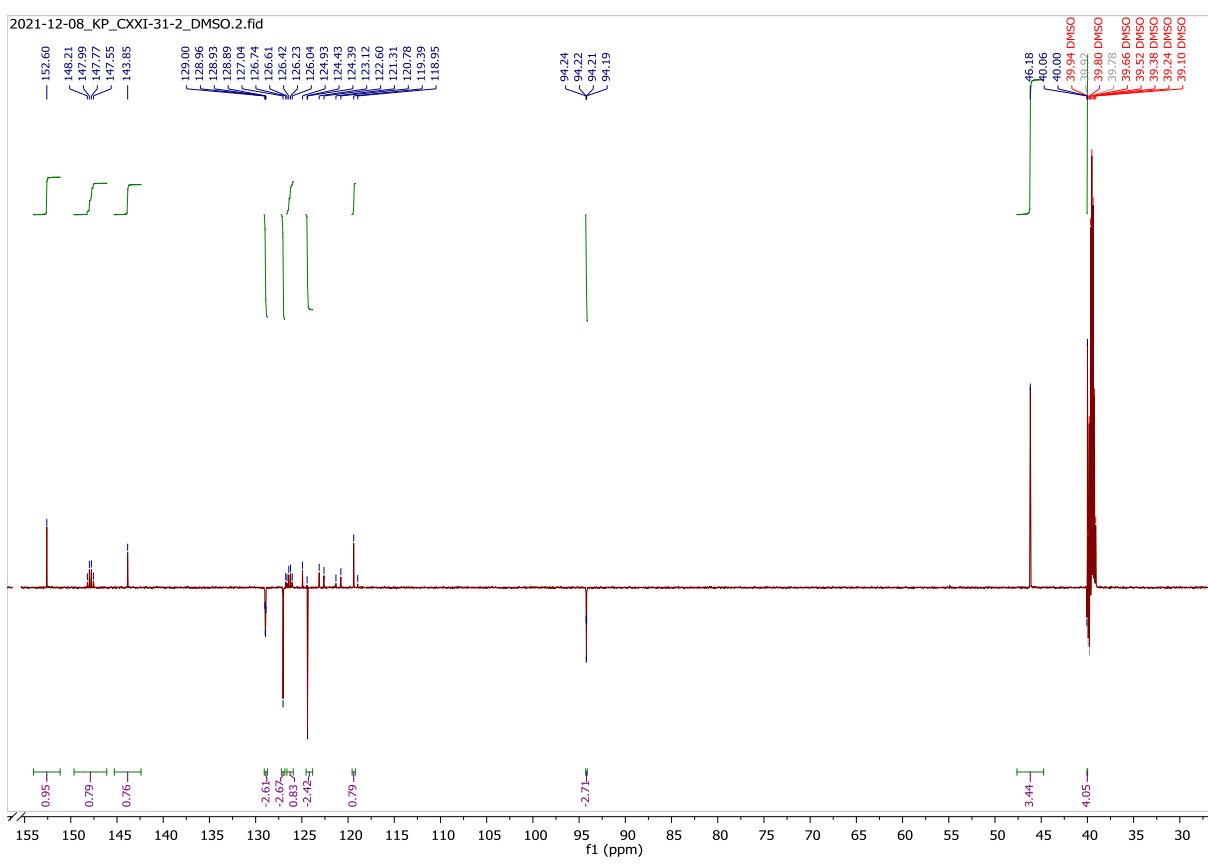
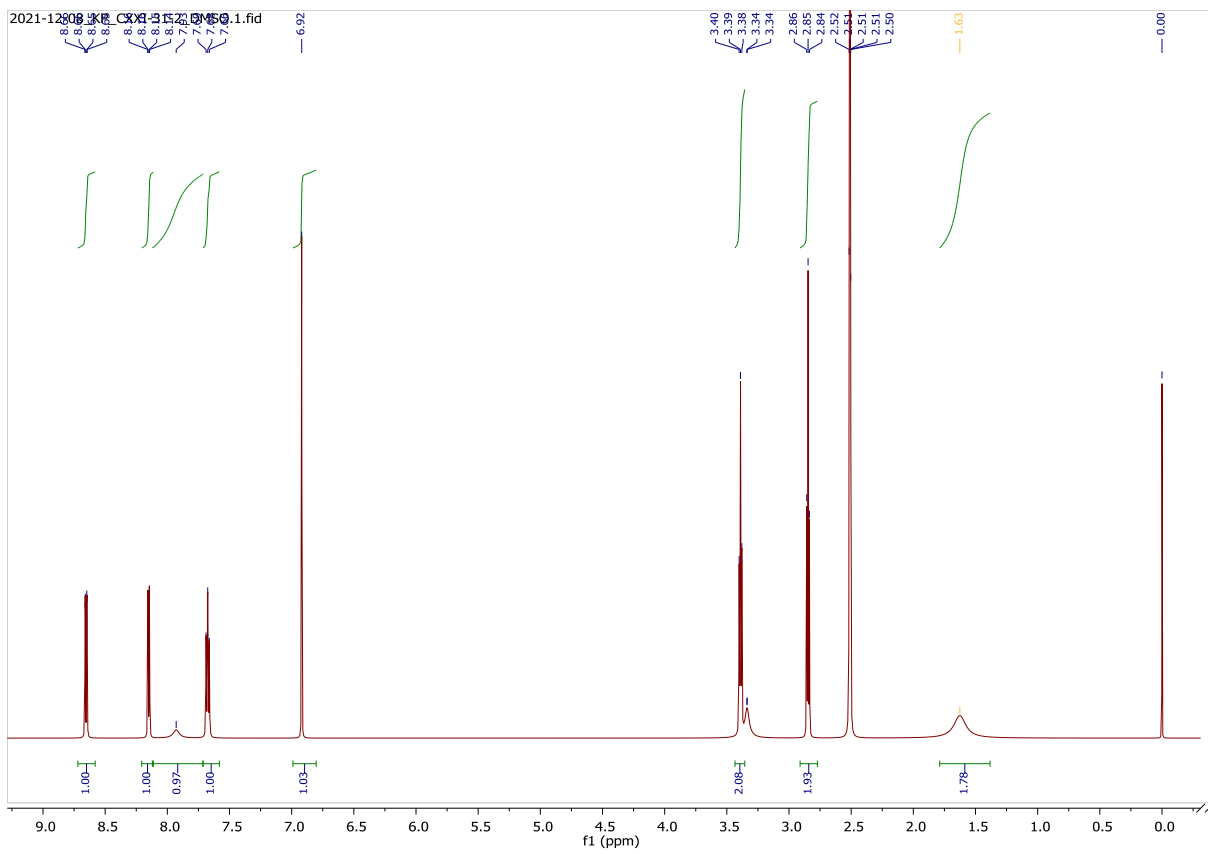
## **8. PRILOZI**

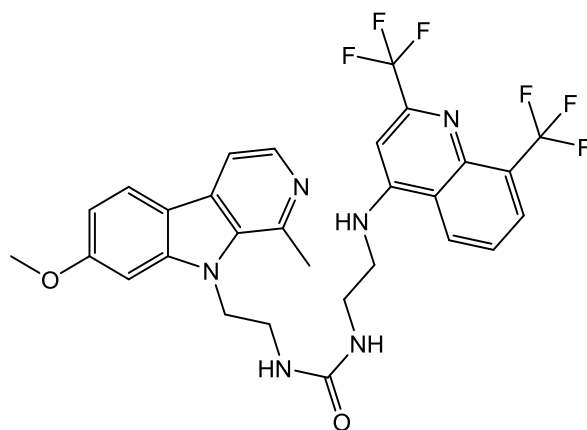
U prilogama su prikazani snimljeni IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri nekih prekursora i krajnjih produkata.



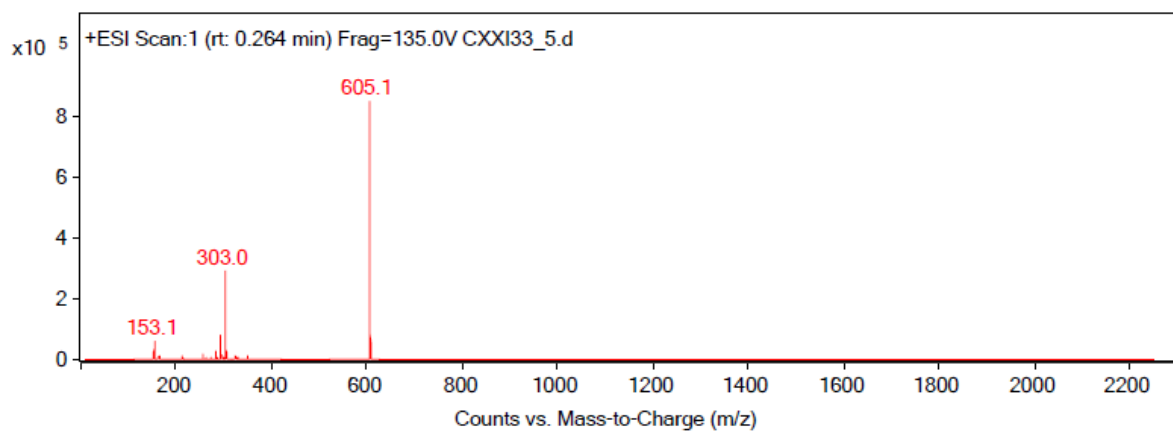
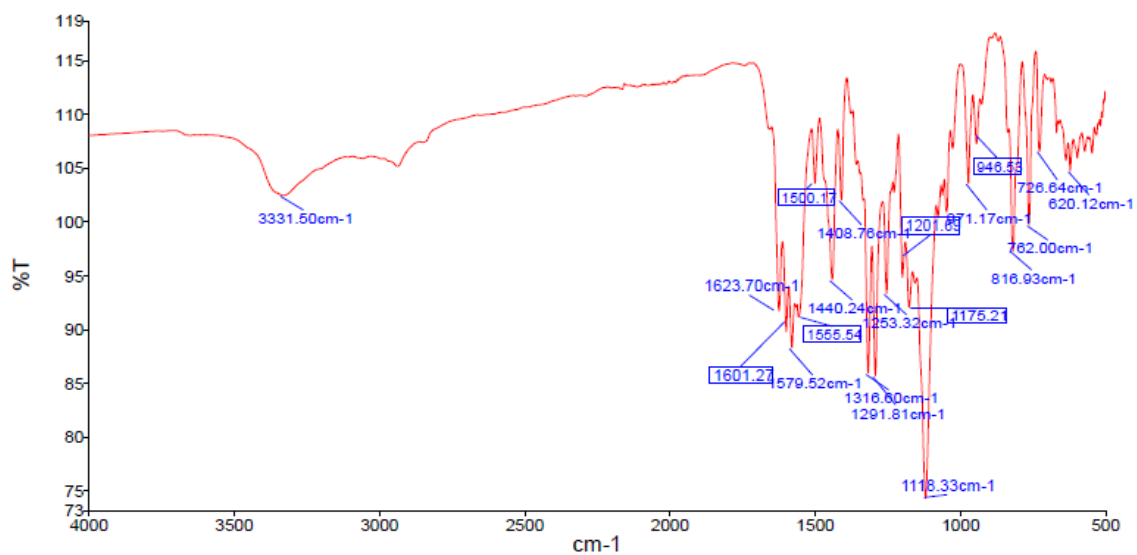
**1**

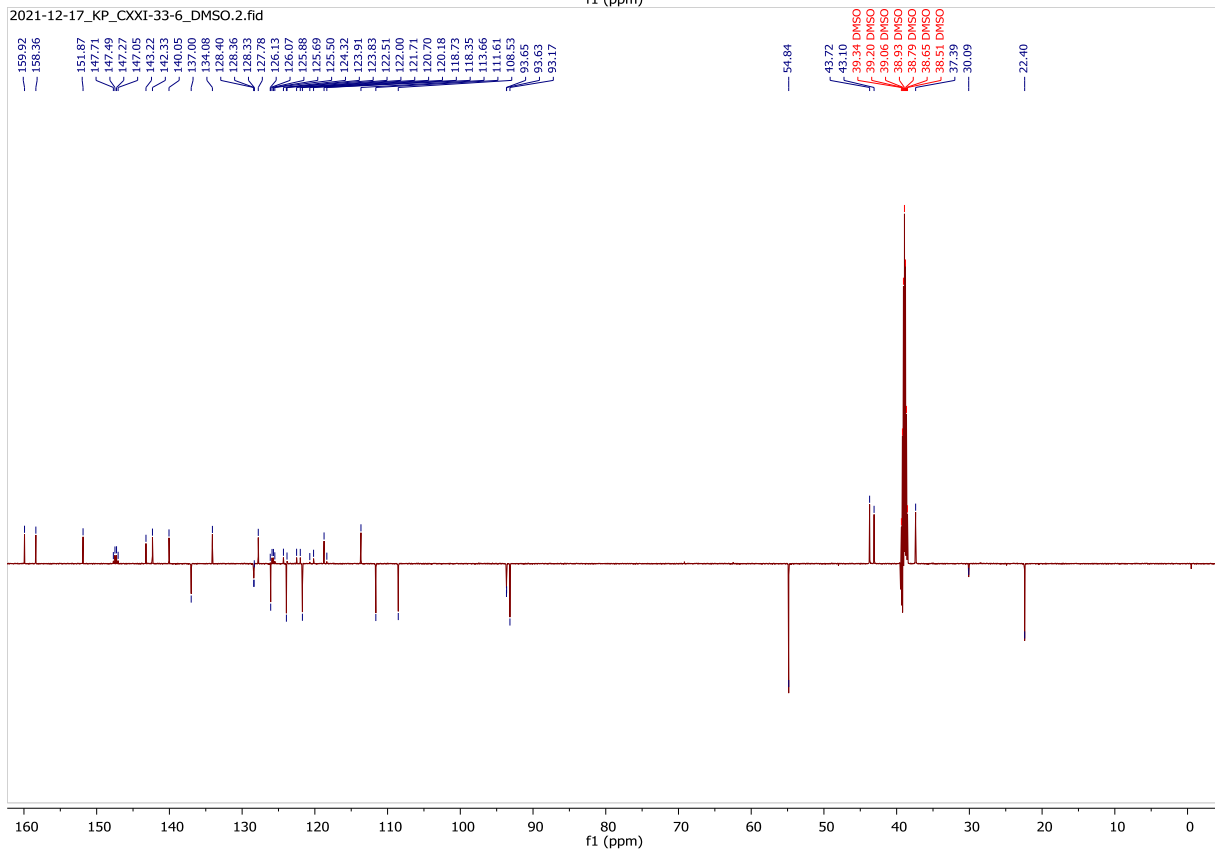
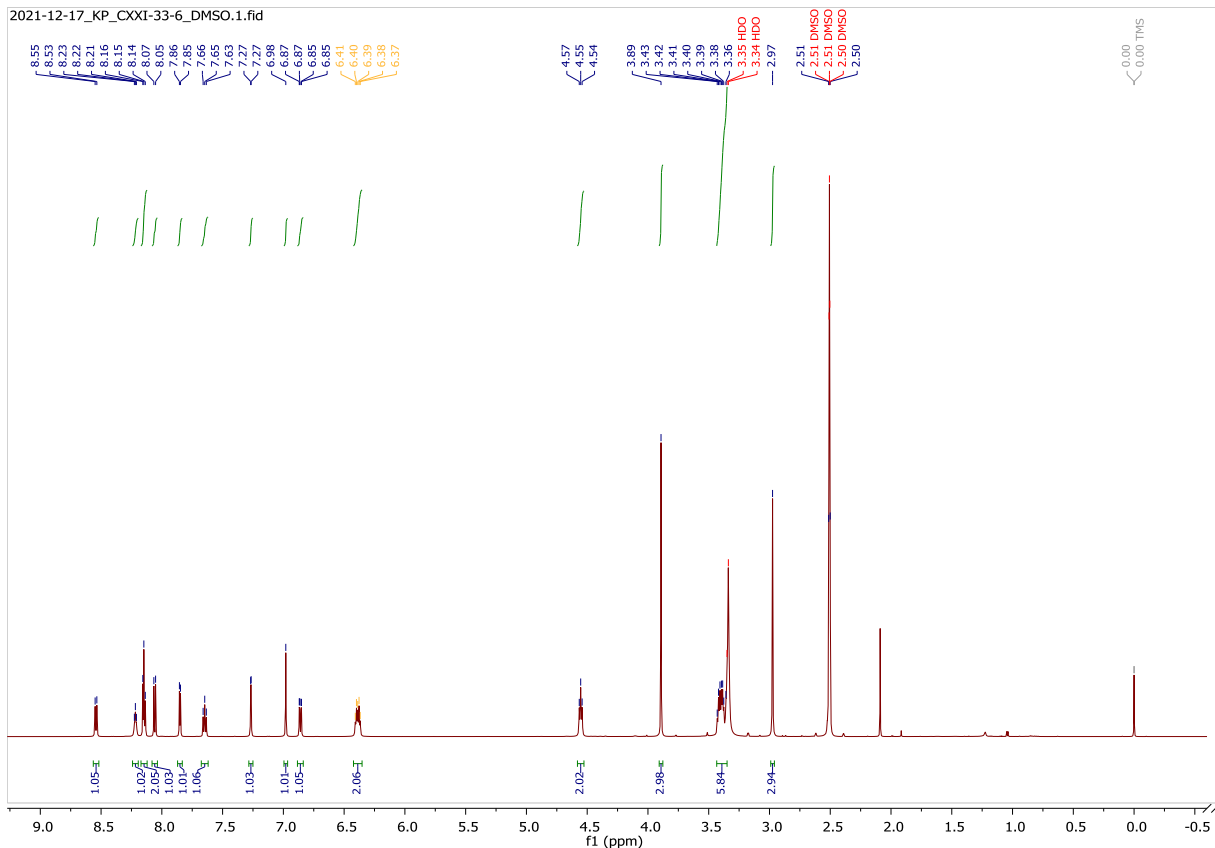


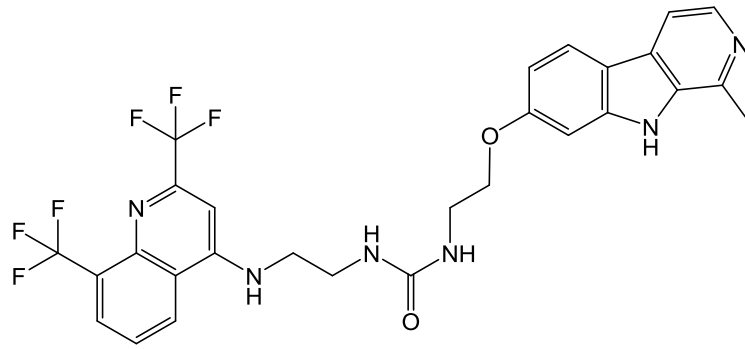




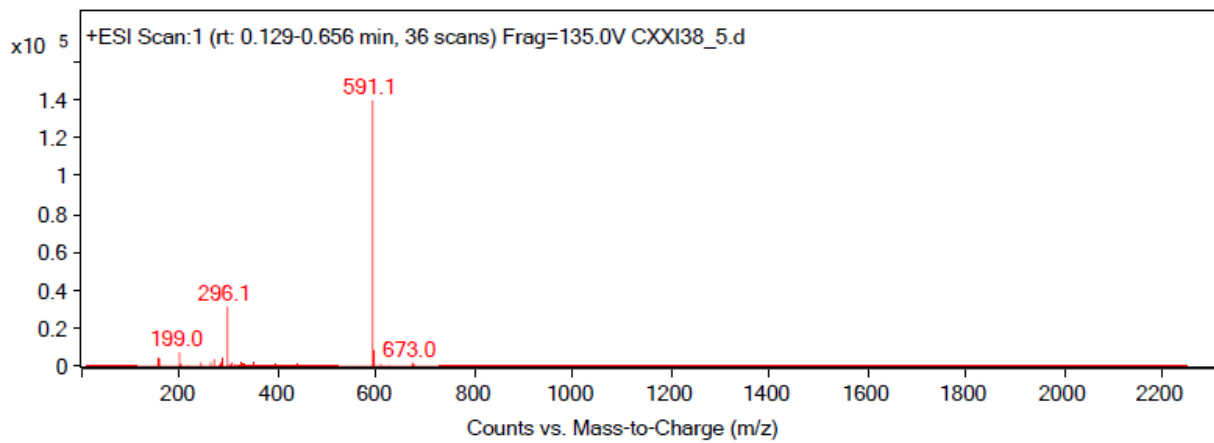
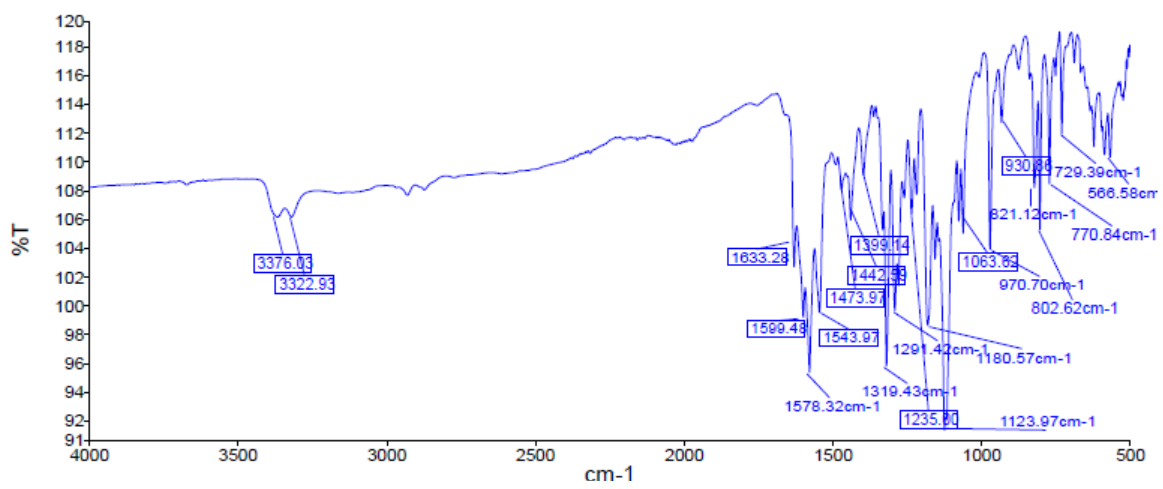
**12a**



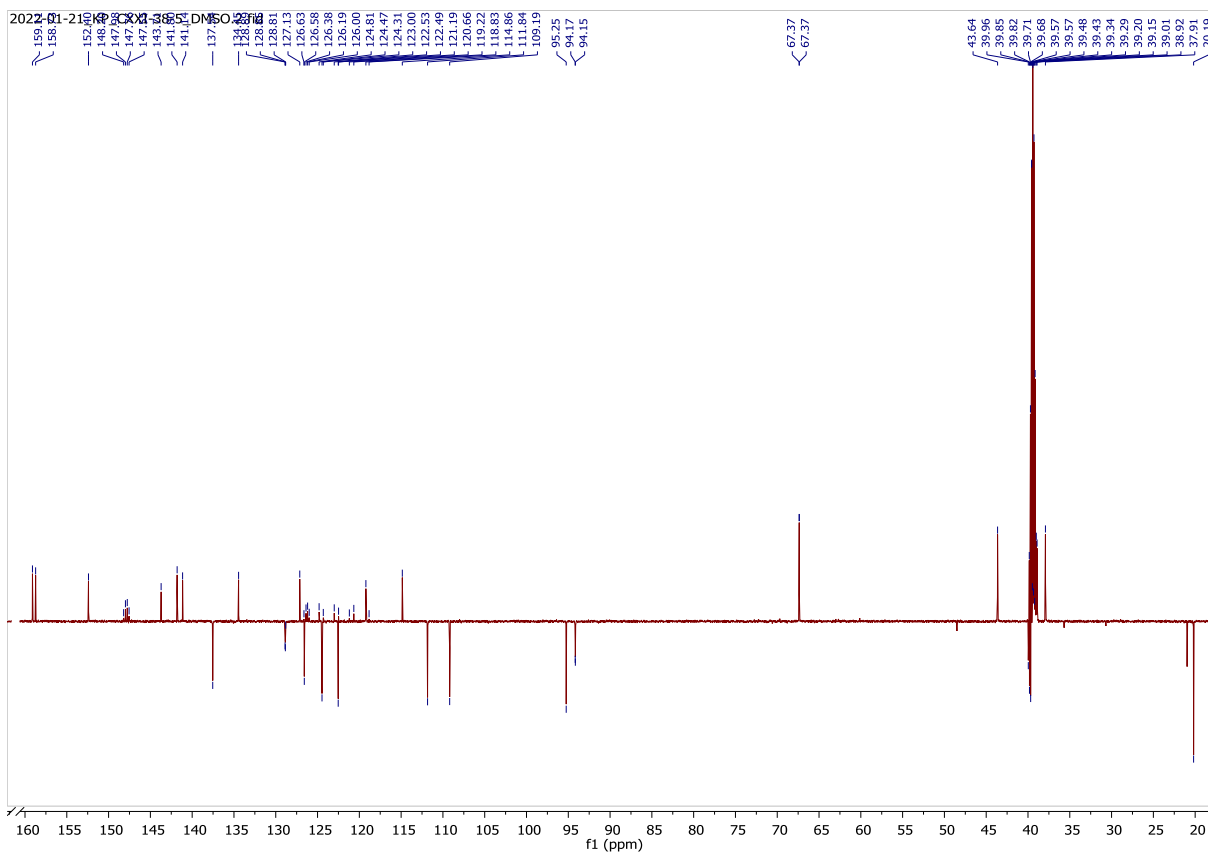
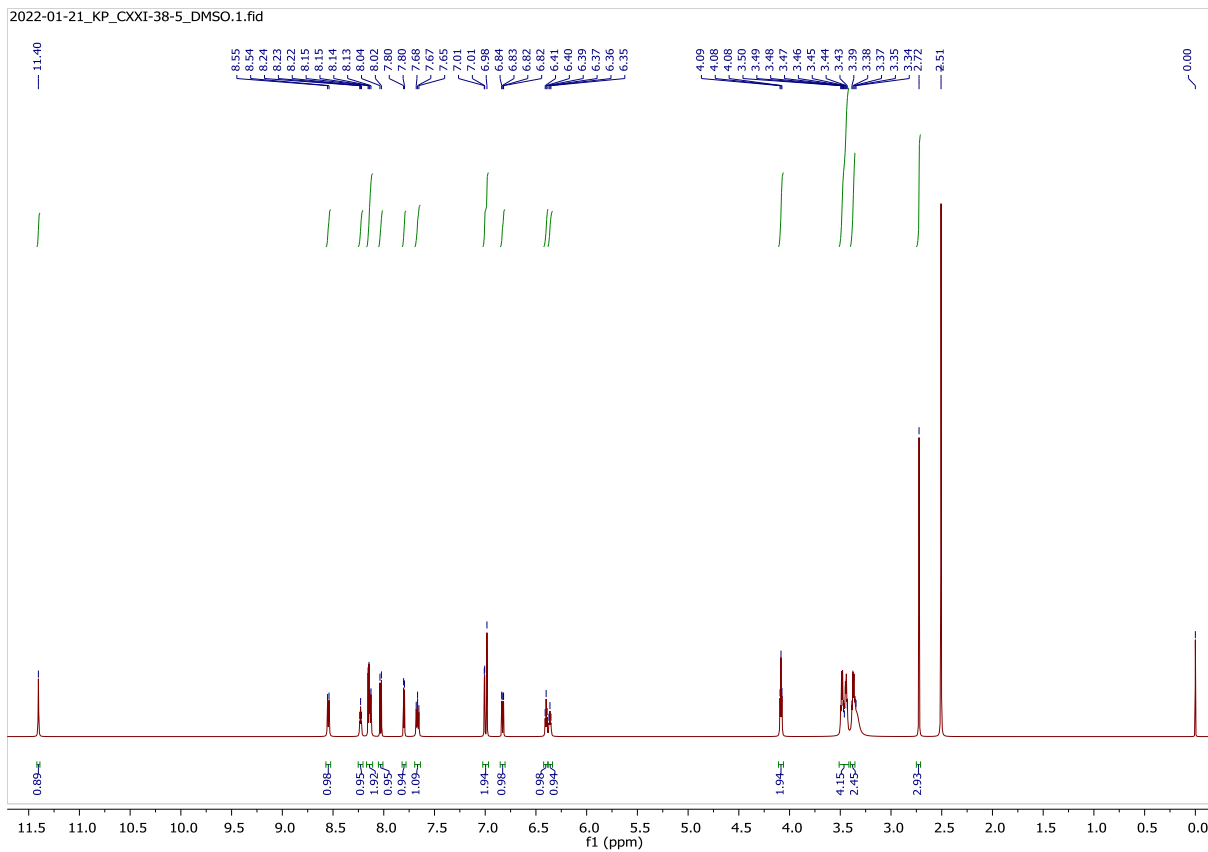


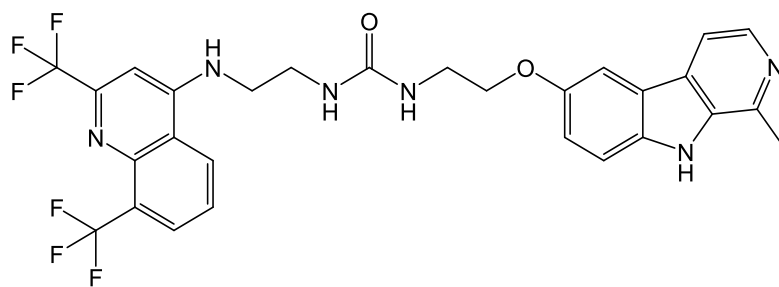


**12b**

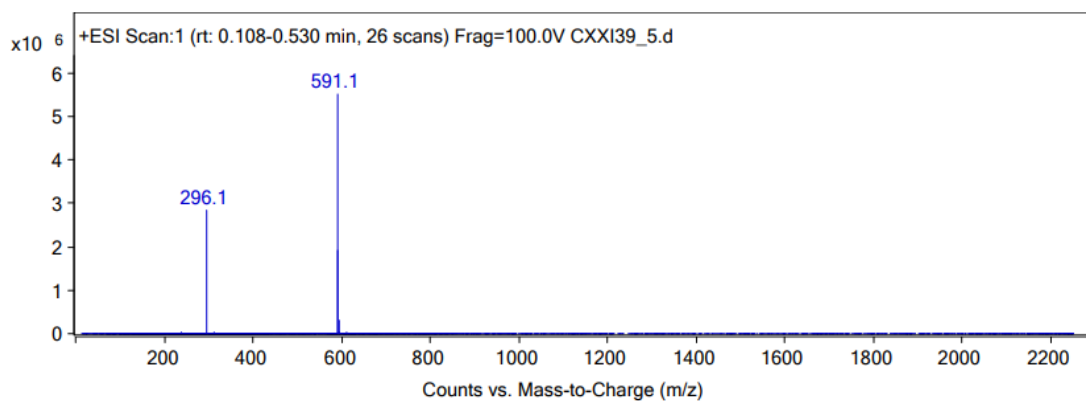
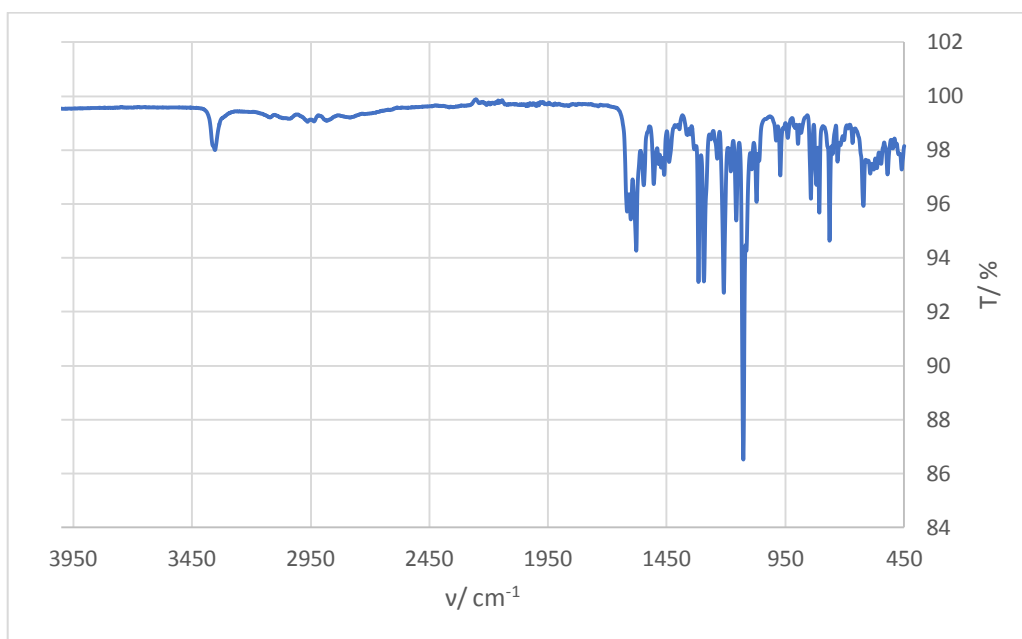


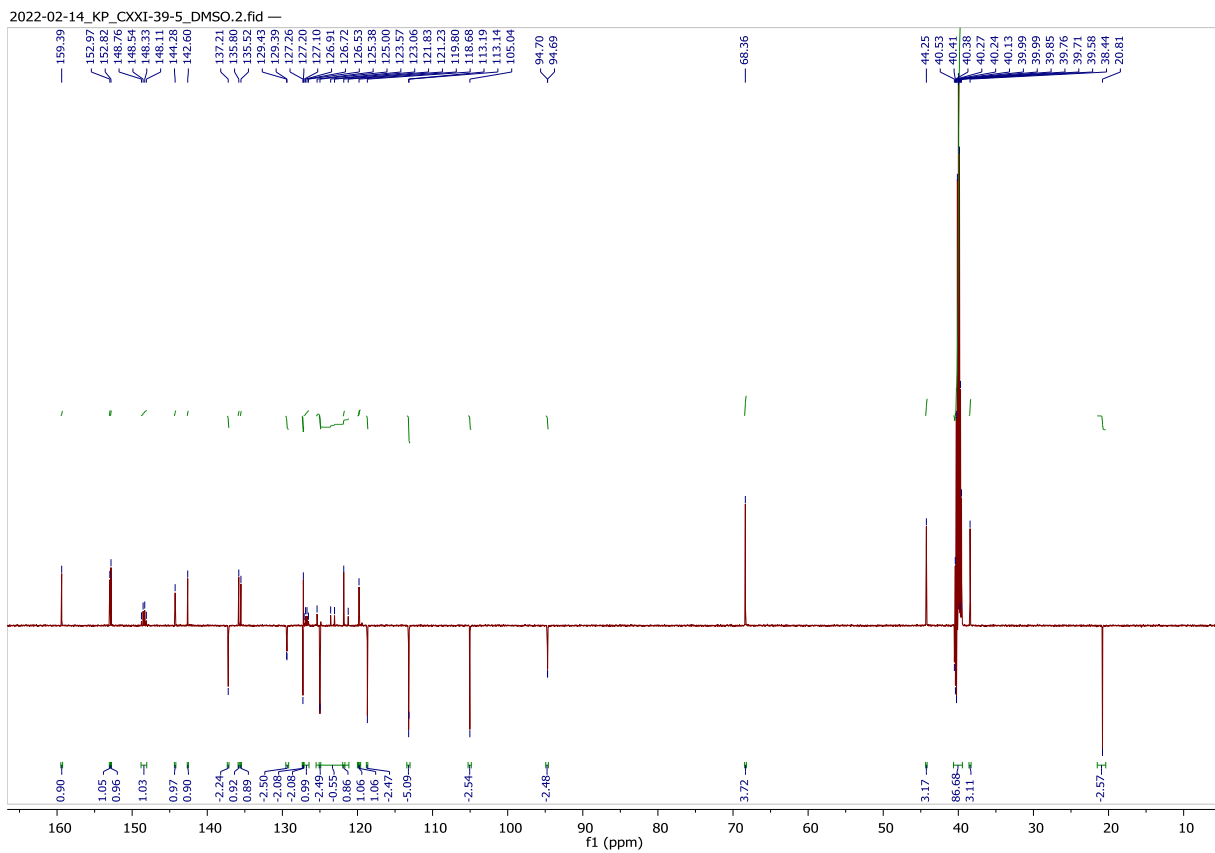
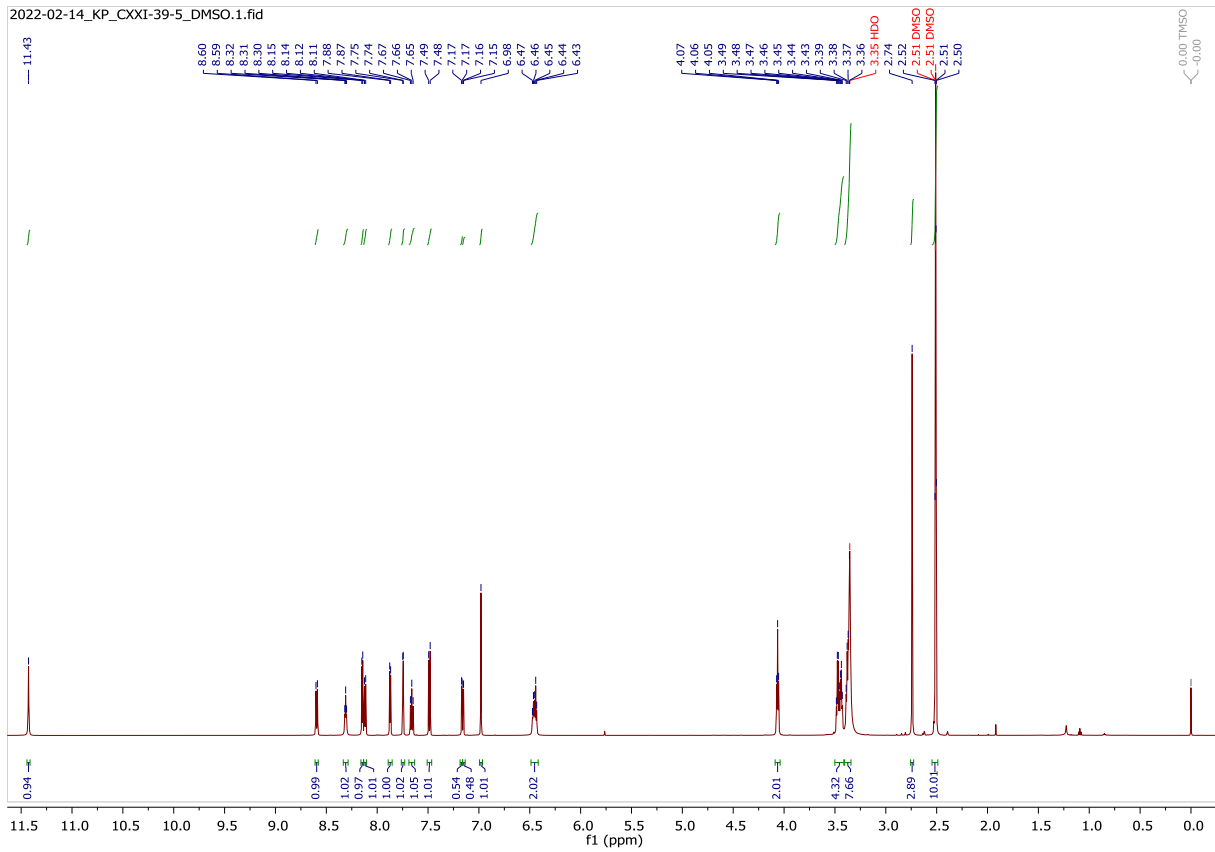






12c





## 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 NOVIH HIBRIDNIH UREA HARMINA I MEFLOKINA

Sara Tušek

#### SAŽETAK

Ovaj rad dio je istraživanja provedenog na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje obuhvaća dizajn, sintezu i biološku evaluaciju derivata harmina s potencijalnim antimalarijskim djelovanjem. Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija novih hibridnih urea harmina i meflokina. Sinteza je započeta prevođenjem derivata meflokina do odgovarajućeg amina **1**. Harmol **2** je dobiven iz harmina, dok je fenol **7** dobiven iz 5-metoksitriptamina. Harmin, harmol i fenol **7** su pomoću 2-(Boc-amino)etil bromida i klorovodične kiseline prevedeni u odgovarajuće amine **3**, **5** i **10**. Nukleofilnom supstitucijom uz CDI iz amina **3**, **5** i **10** te amina **1** sintetizirani su konačni produkti – uree **12a-c**.

Strukture svih novosintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta. Sva tri konačna spoja djelomično zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila koja se koriste za predviđanje oralne biorasploživosti lijekova. Također, web alat SwissADME predviđa slabu oralnu biorasploživost urea **12a-c**. Antimalarijsko i citostatsko djelovanje novosintetiziranih derivata bit će ispitano u daljnjim istraživanjima koja prelaze okvire ovog rada.

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

Rad sadrži: 78 stranica, 13 grafičkih prikaza, 9 tablica i 48 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: harmin, meflokin, urea, CDI

Mentor: **Dr. sc. Kristina Pavić**, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Kristina Pavić**, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Doc. dr. sc. Hrvoje Rimac**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marijan Marijan**, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of (name of the department)  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NOVEL HARMINE AND MEFLOQUINE HYBRID UREAS

Sara Tušek

#### SUMMARY

This paper is part of ongoing research at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb. The research includes the design, synthesis and biological evaluation of novel harmine derivatives as potential antimalarial drugs. The aim of this diploma thesis was the synthesis and characterization of novel harmine urea derivatives comprising mefloquine moiety in their structure. The synthesis began with the transformation of the mefloquine derivative to amine **1**. Harmol **2** was generated from harmine, while phenol **7** was generated from 5-methoxytryptamine. Then, harmine, harmol and phenol **7** were converted into amines **3**, **5** and **10** using 2-(Boc-amino)ethyl bromide and subsequently, hydrochloric acid. The final products, ureas **12a-c**, were synthesized by nucleophilic substitution from amines **3**, **5**, **10** and amine **1**. CDI was used as a coupling reagent.

The structures of newly synthesized compounds were confirmed using analytical and spectroscopic methods (IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, MS). In addition, melting points were determined for solid compounds. Novel derivatives fulfil some of Lipinski's and Veber's criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME web tool predicts poor oral bioavailability as well. The antimalarial and cytostatic activity of the newly synthesized compounds will be examined in further studies.

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

Thesis includes: 78 pages, 13 figures, 9 tables and 48 references. Original is in Croatian language.

Keywords: harmine, mefloquine, urea, CDI

Mentor: **Kristina Pavić, Ph.D. Postdoctoral Associate**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Kristina Pavić, Ph.D. Postdoctoral Associate**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Hrvoje Rimac, Ph.D. Assistant Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marijan Marijan, Ph.D. Postdoctoral Associate**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.

