

# Sinteza i karakterizacija novih hibridnih urea harmina i klorokina

---

**Pezo, Ankica**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:163:650508>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



Ankica Pezo

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

*DIPLOMSKI RAD*

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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 doc. dr. sc. Kristine Pavić.

*Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Pavić na velikoj pomoći, susretljivosti i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada.*

*Hvala djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na nesebičnoj pomoći u laboratoriju te ugodnoj i prijateljskoj atmosferi.*

*Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom najtežih trenutaka.*

*Hvala mojem dečku Franu koji je bio uz mene na svakom koraku ovoga puta.*

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



# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Rak.....	2
1.2. Antimalarici kao potencijalni citostatici: prenamjena postojećih lijekova kao strategija u razvoju novih lijekova.....	3
1.3. Klorokin.....	4
1.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva i sinteza klorokina.....	4
1.3.2. Upotreba klorokina.....	6
1.3.3. Biološko djelovanje klorokina.....	7
1.3.4. Nuspojave klorokina.....	11
1.3.5. Farmakokinetika klorokina.....	11
1.3.6. Derivati klorokina kao potencijalni citostatici.....	12
1.4. $\beta$ -Karbolini.....	16
1.5. Hibridni lijekovi.....	19
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Sinteza $N^1$ -(7-klorkinolin-4-il)etan-1,2-diamina ( <b>1</b> ).....	26
3.2. Sinteza <i>tert</i> -butil(2-(1-metil-7-metoksi-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etil)karbamata ( <b>2</b> ) 27	
3.3. Sinteza 2-(1-metil-7-metoksi-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etan-1-amina ( <b>3</b> ).....	27
3.4. Sinteza 1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,2,3]triazol-1-karbonil klorida (BtcCl, <b>4</b> ).....	28
3.5. Sinteza <i>N</i> -(2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etil)-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,2,3]triazol-1-karboksamida ( <b>5</b> ).....	28
3.6. Sinteza 1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-ola (harmola, <b>6</b> ).....	29
3.7. Sinteza <i>tert</i> -butil(2-(1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)etil)karbamata ( <b>7</b> ).....	29
3.8. Sinteza 2-(1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)etan-1-amina ( <b>8</b> ).....	30

3.9.	Sinteza	1-metil-6-metoksi-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-2-ovog trifluoracetata ( <b>9</b> ) .....	31
3.10.	Sinteza	1-metil-6-metoksi-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola ( <b>10</b> ).....	31
3.11.	Sinteza	1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola ( <b>11</b> ) .....	32
3.12.	Sinteza	<i>tert</i> -butil(2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-6-il)oksi)etil)karbamata ( <b>12</b> ) 32	
3.13.	Sinteza	2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-6-il)oksi)etan-1-amina ( <b>13</b> ).....	33
3.14.	Sinteza	metil 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-3-karboksilata ( <b>14</b> ) 33	
3.15.	Sinteza	metil 1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-3-karboksilata ( <b>15</b> ) .....	34
3.16.	Sinteza	(1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-3-il)metanola ( <b>16</b> ).....	34
3.17.	Sinteza	3-(azidometil)-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola ( <b>17</b> ).....	35
3.18.	Sinteza	(1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-3-il)metanamina ( <b>18</b> ).....	35
3.19.	Sinteza	hibrida harmina i klorokina.....	36
3.19.1.	Sinteza	1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-(1-metil-7-metoksi-9 <i>H</i> -pirido [3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etil)uree ( <b>19</b> ).....	36
3.19.2.	Sinteza	1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)oksi)etil)uree ( <b>20</b> ).....	37
3.19.3.	Sinteza	1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-6-il)oksi)etil)uree ( <b>21</b> ).....	38
3.19.4.	Sinteza	1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-3-il)metil)uree ( <b>22</b> ).....	39
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....		41
4.1.	Sinteza	amino derivata klorokina i harmina.....	42
4.2.	Sinteza	hibrida harmina i klorokina <b>19–22</b> .....	47
4.3.	Predviđanje	fizikalno-kemijskih svojstava poželjnih za ljekovite tvari za oralnu primjenu .....	57
5.	ZAKLJUČAK.....		63
6.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....		65

7. LITERATURA .....	69
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	76
9. PRILOZI.....	79
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD .....	91

## **1. UVOD**



## 1.1. Rak

Rak je složena skupina bolesti koja uključuje poremećaje signalizacije i metabolizma, što rezultira nekontroliranom proliferacijom i migracijom transformiranih stanica. Takve stanice karakterizira uspješno izbjegavanje endogenih kontrolnih mehanizama. Tipovi onkogenih bolesti se grupiraju prema organu ili tkivu odakle potječu, ali sve više i na temelju molekularnih karakteristika odgovarajućih stanica raka. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), rak je vodeći uzrok smrti diljem svijeta te je odgovoran za gotovo 10 milijuna smrtnih ishoda u 2020. godini. Najčešći tipovi raka su rak dojke, pluća, kolona i rektuma. Iako rak dojke vodi po broju novih slučajeva, rak pluća prednjači prema broju ukupnih smrtnih slučajeva povezanih s rakom ([www.who.int](http://www.who.int)).

Prema procjenama SZO u 2020. godini dijagnosticirano je 2,7 milijuna novih slučajeva raka, dok je od raka umrlo 1,3 milijuna ljudi. Procjene pokazuju da rak nešto više pogađa muškarce nego žene (54% novih slučajeva i 56% smrti). Od raka nešto češće obolijevaju muškarci nego žene, a najpogođenije su osobe starije od 65 godina ([www.who.int](http://www.who.int)).

U Hrvatskoj je 2020. godine dijagnosticirano 23.230 novih slučajeva raka (12.326 muškaraca i 10.904 žena), dok je od raka umrlo 13.138 osoba (7.557 muškaraca i 5.581 žena). Najčešći tipovi raka u muškaraca su rak prostate (19%), traheja, bronha i pluća (16%), kolona, rektuma i rektosigme (16%), mokraćnog mjehura (5%) te želuca (4%), što čini ukupno 60% novodijagnosticiranih slučajeva raka kod muškaraca. U žena su najčešći tipovi raka rak dojke (26%), kolona, rektuma i rektosigme (13%), traheja, bronha i pluća (10%), tijela maternice (6%) i štitnjače (5%), što također čini 60% novih slučajeva kod žena. U usporedbi s drugim zemljama Hrvatska je po ukupnoj incidenciji raka na razini prosjeka EU-27, ali se po smrtnosti od raka nalazi na petom mjestu ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr), Šekerija i sur. 2020).

Učestalost pojave karcinoma dramatično raste s dobi, što je najvjerojatnije posljedica nakupljanja rizičnih čimbenika koji su sve mnogobrojniji s godinama. Također, učinkovitost mehanizama popravka stanica smanjuje se s godinama. Čimbenici rizika koji pridonose razvoju raka uključuju upotrebu duhana, nezdravu prehranu, tjelesnu neaktivnost i izloženost karcinogenima na radnom mjestu. Međutim, promjenom načina života, programima probira na rak i ranom dijagnostikom moguće je spriječiti 30–50% slučajeva raka.

Liječenje raka varira ovisno o vrsti, stadiju i individualnim čimbenicima. Uobičajene metode liječenja uključuju kirurški pristup, kemoterapiju, radioterapiju i ciljanu terapiju. Cilj kirurškog liječenja je odstranjivanje zloćudnih stanica raka, dok se kemoterapija i radioterapija koriste za njihovo sistemsko uništavanje. Ciljana terapija posebno je usmjerena na stanice raka ili njihov okoliš (Roy i sur., 2016).

Rješavanje izazova koje postavlja rak zahtijeva suradnju u istraživanju, prevenciji i liječenju. Razumijevanjem različitih vrsta raka, dostupnih mogućnosti liječenja i statističkih utjecaja moguće je raditi na smanjenju globalnog opterećenja i poboljšanju ishoda liječenja pacijenata diljem svijeta.

## **1.2. Antimalarici kao potencijalni citostatici: prenamjena postojećih lijekova kao strategija u razvoju novih lijekova**

S porastom incidencije malignih bolesti u svijetu, raste i potreba za otkrivanjem novih načina liječenja. Tradicionalni pristup otkrivanju i razvoju novih lijekova uključuje nekoliko faza koje zahtijevaju dugotrajna istraživanja kako bi se osigurala sigurnost i učinkovitost nove molekule, što je često financijski vrlo zahtjevan proces. Sukladno tome, potrebno je otkriti nove strategije kako bi se smanjio vremenski i financijski okvir za otkrivanje novih lijekova.

Prenamjena lijekova, u odnosu na sintezu lijekova *de novo*, ima značajne prednosti. Prvo, i možda najvažnije, rizik od neuspjeha je manji budući da se lijek koji se prenamjenjuje već pokazao sigurnim u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima te je manja vjerojatnost da će lijek s aspekta sigurnosti podbaciti u kasnijim fazama razvoja za novu indikaciju. Drugo, vrijeme potrebno za razvoj lijeka bitno je skraćeno jer su većina pretkliničkih ispitivanja, utvrđivanje farmakokinetičkog i farmakodinamičkog profila lijeka, procjena sigurnosti i, u nekim slučajevima, razvoj formulacije već završeni. Treće, potrebna je manja investicija, iako to može varirati ovisno u kojoj je fazi razvoja lijek. Regulatorni troškovi i troškovi treće faze ispitivanja neće se značajno razlikovati za prenamijenjeni lijek i novosintetizirani lijek u istoj indikaciji, ali postoji mogućnost značajne uštede na troškovima pretkliničkih te prve i druge faze kliničkih ispitivanja. Stoga je prenamjena postojećih lijekova postala značajna strategija u istraživanju i razvoju novih lijekova jer nam omogućuje identificiranje novih terapijskih indikacija već

dostupnih lijekova te je kao takva postala fokus istraživanja farmaceutskih tvrtki (Parvathaneni i sur., 2019; Pushpakom i sur., 2018).

Prenamjena antimalarijskih lijekova za liječenje malignih bolesti je strategija koja se sve češće primjenjuje u razvoju novih citostatika. Prema bazi podataka Nacionalne medicinske knjižnice Nacionalnog instituta za zdravlje Sjedinjenih Američkih Država trenutno postoji više od 200 kliničkih studija koje povezuju antimalarike i rak. Brojna su istraživanja već završena i objavljena s obećavajućim rezultatima. Najčešći lijekovi koji su korišteni u ove svrhe su artemisinin i njegovi derivati (artemeter i artesunat), derivati kinina (klorokin i hidroksiklorokin) te doksiciklin ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Mehanizam njihovog citostatskog djelovanja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, ali je uočeno da antimalarici, osim što imaju intrinzično antitumorsko djelovanje, također djeluju i kemosenzitizirajuće i/ili radiosenzitizirajuće, odnosno pojačavaju osjetljivost malignih stanica na citostatike ili zračenje aditivnim ili sinergističkim učincima te posjeduju i sposobnost resenzitizacije rezistentnih stanica raka. Mogući razlozi su indukcija apoptoze, inhibicija mehanizama otpornosti tumorskih stanica, primjerice autofagije ili P-glikoproteina, proliferacije malignih stanica ili angiogeneze (Duarte i Vale, 2020). Rezultati kliničkih studija pokazuju da se kombinacijom antimalarika i postojećih citostatika povećava učinkovitost terapije, smanjuje toksičnost citostatika te rizik od razvoja rezistencije što dovodi do boljih ishoda liječenja onkoloških pacijenata (Mancuso i sur., 2020).

## **1.3. Klorokin**

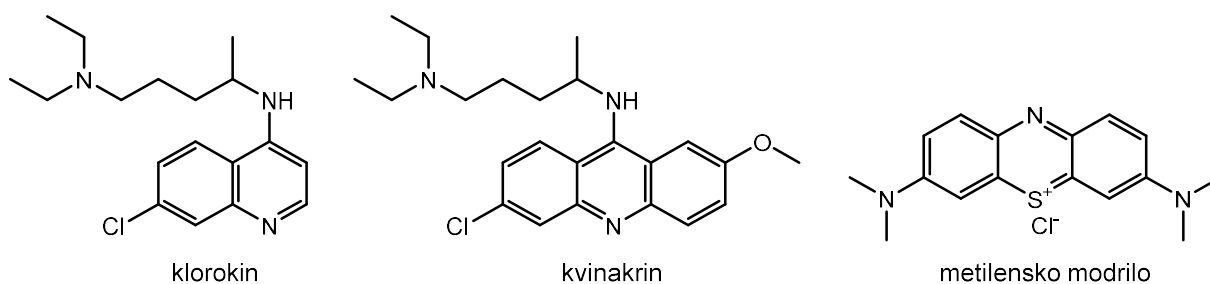
### **1.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva i sinteza klorokina**

Klorokin, odnosno  $N^4$ -(7-klorokinolin-4-il)- $N^1, N^1$ -dietilpentan-1,4-diamin, sintetski je derivat kinina koji pripada skupini 4-aminokinolina kod kojih je amino skupina vezana na kinolinski prsten u položaju 4 (Browning, 2014).

Klorokin je bijeli ili blago žuti kristalinični prah bez mirisa i gorkog okusa. Kemijska formula mu je  $C_{18}H_{26}ClN_3$ , a molekulska masa 319,88. Talište mu je između 87 °C i 97 °C. Slabo je topljiv u vodi, ali se lako otapa u razrijeđenim kiselinama, kloroformu i eteru. Amfifilna je molekula koja se sastoji od ioniziranog dijela te dijela lipofilnih svojstava koja se temelje na dva fuzionirana aromatska prstena koja formiraju sustav konjugiranih dvostrukih veza

(kinolinska jezgra). Klorokin posjeduje dvije bazične skupine: dušik kinolinskog prstena te tercijarni dušik postraničnog lanca. Konstante disocijacije, odnosno  $pK_a$  vrijednosti tih skupina su 8,1 i 10,2, redom. U obliku otopine je stabilan pri visokim temperaturama, no osjetljiv je na svjetlost (Tariq i sur., 2008).

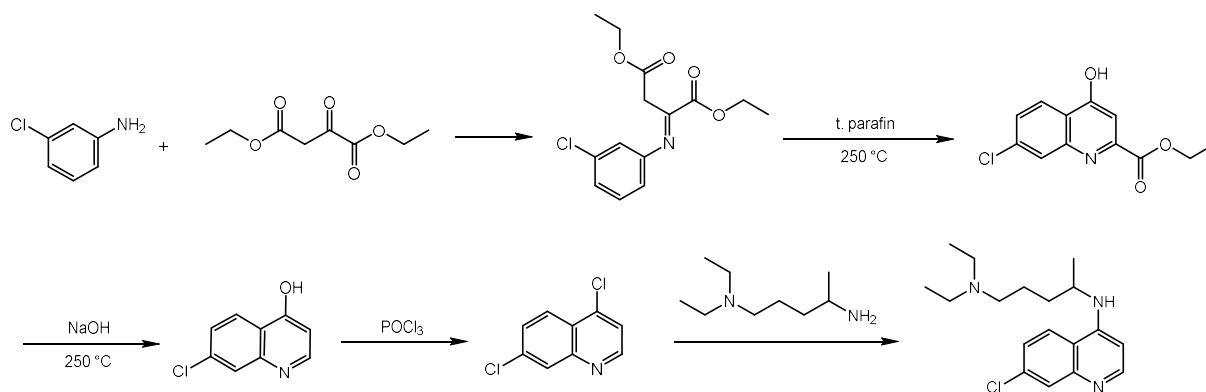
Klorokin je prvi puta sintetizirao Hans Andersag 1934. godine u I. G. Farbenindustrie AG (današnji Bayer AG) strukurnom modifikacijom kvinakrina, čime je dobio lijek izrazitog antimalarijskog učinka koji nije uzrokovao diskoloraciju kože i očiju, za razliku od kvinakrina i metilenskog modrila (Slika 1.) (Krafts i sur., 2012).



**Slika 1.** Kemijske strukture klorokina, kvinakrina i metilenskog modrila

Andersagova sinteza klorokina odvija se u pet koraka (Shema 1.):

1. kondenzacija *m*-kloranilina s dietilnim esterom oksaloctene kiseline,
2. ciklizacija u etilni ester 4-hidroksi-7-klorokinolin-2-karboksilne kiseline uz zagrijavanje u tekućem parafinu,
3. saponifikacija i termalna dekarboksilacija,
4. kloriranje uz fosforov(V) oksiklorid ( $\text{POCl}_3$ ) te
5. alkilacija nastalog 4,7-diklorokinolina (Krafts i sur., 2012).



**Shema 1.** Andersagova sinteza klorokina (Krafts i sur., 2012)

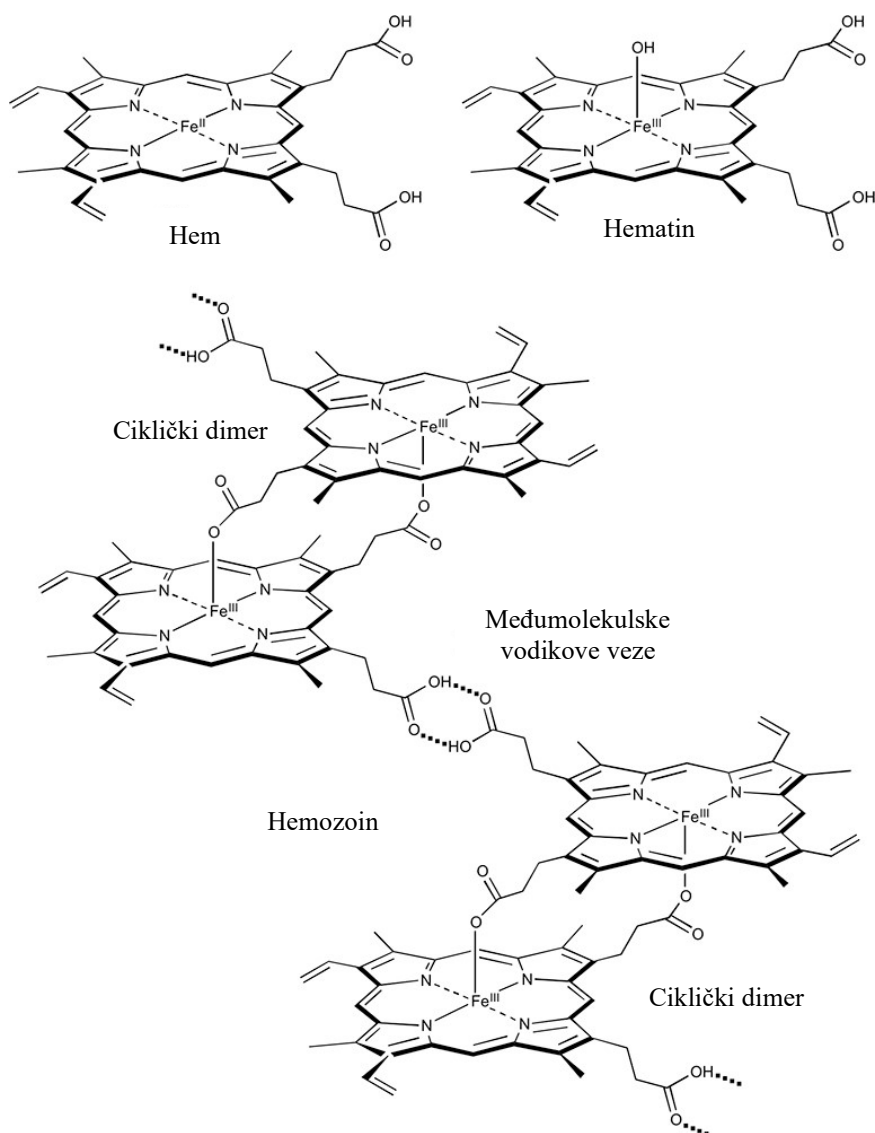
### 1.3.2. Upotreba klorokina

Klorokin je indiciran za profilaksu i liječenje nekomplicirane malarije u područjima gdje su prisutni sojevi plazmodija osjetljivi na klorokin (određeni sojevi *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* i *P. malariae*), odnosno oni koji još uvijek nisu razvili rezistenciju na klorokin. To su Meksiko i druga područja Srednje Amerike zapadno od Panamskog kanala, Karibi te neke zemlje Bliskog i Dalekog istoka. Klorokin je indiciran i za liječenje ekstraintestinalne amebijaze. Zbog svog imunosupresivnog djelovanja, klorokin i njegov derivat hidroksiklorokin koriste se za liječenje autoimunih bolesti, kao što su reumatoidni artritis (RA) i sistemski eritemski lupus (SLE). Također, klorokin ima i citostatsko djelovanje, te djeluje kemosenzitizirajuće i radiosenzitizirajuće te se pokazao korisnim u kombiniranoj terapiji sa standardnim citostaticima i zračenjem za liječenje karcinoma. Klorokin je 2014. godine uvršten u skupinu lijekova za rijetke bolesti, tzv. „lijekove siročad“ (engl. *orphan drugs*) za liječenje glioma, tumora mozga koji zahvaća glija stanice (Plantone i Koudriavtseva, 2018; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

### 1.3.3. Biološko djelovanje klorokina

#### 1.3.3.1. *Mehanizam antimalarijskog djelovanja klorokina*

Klorokin djeluje isključivo na eritrocitnu fazu životnog ciklusa plazmodija, krvne shizonte, inhibirajući polimerizaciju hemozoina u plazmodiju, odnosno remeteći probavu hemoglobina. Plazmodij napada eritrocite domaćina gdje se hrani hemoglobinom. Tijekom ovog procesa proteinska struktura hemoglobina se u probavnoj vakuoli plazmodija razgrađuje na aminokiseline kojima se plazmodij hrani, a topljivi i toksični hem, koji nastaje kao nusprodukt, polimerizira se u netopljivi i netoksični kristalni hemozoin. Hemozoin je spoj crno-smeđe boje poznat kao malarični pigment koji se koristi za dijagnozu bolesti jer se može pronaći u razmazu krvi pacijenata. Strukturno, hemozoin je kristalni dimer u kojemu su jedinice hematina međusobno povezane kompleksacijom bočne karboksilne skupine jednog porfirinskog prstena sa željezom u središtu drugoga. Kristalna struktura nastala povezivanjem dimera je stabilizirana vodikovim vezama između preostalih karboksilnih skupina (Slika 2.). Klorokin, koji je pri fiziološkom pH lipofilna slaba baza, pasivnom difuzijom ulazi u sve kisele intracelularne odjeljke, pa tako i u probavnu vakuolu plazmodija. Unutar vakuole se protonira, postaje hidrofilan te biva zarobljen. Stoga dolazi do akumulacije klorokina u probavnoj vakuoli gdje veže toksični monomerni hematin koji nastaje oksidacijom željeza u hemu nakon razgradnje hemoglobina. Još uvijek nije poznato točan način vezanja klorokina na hematin, ali poznato je da je time spriječena njegova detoksikacija u hemozoin. Pretpostavlja se da slobodni hematin uzrokuje stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) pri čemu dolazi do oštećenja membrana plazmodija mehanizmom lipidne peroksidacije (Rawe i McDonnell, 2020; Thomé i sur., 2013).



**Slika 2.** Kemijska struktura hema, hematina i hemozoina (preuzeto iz Vanderesse i sur., (2016) uz dopuštenje izdavača, licenca: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

Klorokin posjeduje, osim antimalarijskog, i antivirusno, antibakterijsko i antimikotičko djelovanje. Kao što je već spomenuto, ima sposobnost nakupljanja unutar probavnih vakuola plazmodija. Analogno tome, kao dibazična molekula nakuplja se i unutar drugih kiselih organela mikroorganizama, poput lizosoma, pri čemu dolazi do njihove alkalizacije što posljedično inhibira rast i razvoj intracelularnih patogena (Plantone i Koudriavtseva, 2018).

### 1.3.3.2. *Mehanizam imunomodulatornog i antitumorskog djelovanja klorokina*

Mehanizmi protuupalnog i antitumorskog djelovanja klorokina vrlo su kompleksni te još uvijek nepotpuno istraženi. Neki od učinaka koje klorokin pokazuje na staničnoj razini uključuju inhibiciju aktivnosti lizosoma, inhibiciju autofagije, indukciju apoptoze te modulaciju stanične signalizacije (Plantone i Koudriavtseva, 2018; Thomé i sur., 2013).

Autofagija je katabolički proces unutar stanica kojim se razgrađuju stari i nefunkcionalni organeli ili nakupine proteina na gradivne elemente (aminokiseline, nukleotide i masne kiseline) koji predstavljaju nutrijente za preživljenje stanica u stresnim uvjetima. Autofagija u kasnim stadijima karcinogeneze stoga ima protumorski učinak, dok je u ranim stadijima učinak autofagije antitumorski. Autofagija funkcionira putem jedinstvene strukture zvane autofagosom, vezikule s dvostrukom membranom. Autofagosomi potječu od membranskih struktura zvanih fagofori te u sebi sadrže supstrat namijenjen razgradnji. Nakon što se zatvore, dolazi do fuzije autofagosoma s lizosomima te zakiseljavanja unutrašnjosti lizosoma i aktivacije lizosomalnih enzima za razgradnju. Nastali razgradni produkti transportiraju se natrag u citosol kroz lizosomalne efluksne permeaze za ponovnu upotrebu u metaboličkim procesima (Murati i sur., 2022).

Analogno nakupljanju u probavnoj vakuoli plazmodija i drugih intracelularnih patogena, klorokin se akumulira i u kiselim intracelularnim odjeljcima kao što su lizosomi ljudskih makrofaga. Vezanjem protona klorokin uzrokuje povišenje pH vrijednosti u lizosomu što ometa djelovanje većine enzima unutar lizosoma (Plantone i Koudriavtseva, 2018). Upravo zbog inhibicije lizosomskih enzima, klorokin inhibira proces autofagije što omogućava antiproliferativno djelovanje klorokina jer se stanice raka uvelike oslanjaju na autofagiju za svoj rast i preživljavanje.

Dodatno, ometanje autofagije utječe na obradu antigena, čime se posredno, putem molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC), modulira aktivnost T limfocita klastera diferencijacije 4+ i 8+ (CD4+ i CD8+). Na taj način se aktiviraju antigen-specifičan (posredovan CD4+ T limfocitima) i citotoksičan antitumorski i antivirusni imunski odgovor (posredovan CD8+ T limfocitima) čime se ispoljava imunomodulatorna i antikancerogena aktivnost klorokina. Osim toga, snižavanjem pH citoplazme stanice klorokin ima i sposobnost indukcije apoptoze u T limfocitima (Thomé i sur., 2013).



Imunomodulatorna djelovanja klorokina uključuju i antiproliferativan učinak na T limfocite, inhibiciju stanične signalizacije, smanjenje proizvodnje i izlučivanja proupalnih citokina interferona- $\gamma$ , faktora nekroze tumora (TNF), interleukina (IL)-1, IL-6 i IL-2. Na staničnoj liniji humanog adenokarcinoma dojke MCF10A utvrđeno je da klorokin zaustavlja stanični ciklus u G1 fazi te da modulira IGF-1/PI3K/Akt/mTOR i p53 signalne puteve što doprinosi potencijalnim antikancerogenim učincima (Thomé i sur., 2013). Osim toga, pronađeno je i da klorokin stimulira proizvodnju dušikova monoksida u endotelnim stanicama što također može objasniti antiproliferativan učinak klorokina (Woźniacka, 2021; Plantone i Koudriavtseva, 2018).

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razumjeli molekularni mehanizmi koji leže u pozadini ovih učinaka i njihovih implikacija na imunomodulatornu i antitumorsku terapiju.

#### **1.3.3.3. *Ostala biološka djelovanja klorokina***

Istraživanja su pokazala da klorokin ima i određene antitrombotske i metaboličke učinke. Utvrđeno je da smanjuje otpuštanje arahidonske kiseline iz aktiviranih trombocita te da inhibira agregaciju trombocita ovisno o dozi. Klorokin također pozitivno utječe na izlučivanje inzulina i perifernu osjetljivost na inzulin, u tolikoj mjeri da je hipoglikemija prijavljena kao nuspojava ovog lijeka. Nadalje, klorokin doprinosi poboljšanju lipidnog profila smanjenjem razine triglicerida i ukupnog kolesterola u serumu, a posebice smanjenjem razine lipoproteina niske gustoće. Metabolički učinci ovih lijekova na glikemiju i lipidni profil posebno su značajni s obzirom na njihovu uobičajenu istodobnu primjenu s kortikosteroidima u bolesnika s reumatološkim i autoimunim bolestima (Wong, 2021; Plantone i Koudriavtseva 2018).

#### **1.3.4. Nuspojave klorokina**

Iako se općenito smatra sigurnim, klorokin može dovesti do određenih nuspojava, koje se dijele na ne-ozbiljne i ozbiljne. Prva skupina uključuje gastrointestinalne i kožne manifestacije, kao što su mučnina, povraćanje, bol u trbuhu, proljev, osip na koži, svrbež i gubitak kose, dok retinalna, neuromuskularna i srčana toksičnost pripadaju skupini ozbiljnih nuspojava.

Toksična retinopatija je značajna, ozbiljna i ireverzibilna nuspojava klorokina i hidroksiklorokina, s rizikom koji se povećava nakon produljene primjene. Vezanje lijekova na melanin, osobito u pigmentiranim stanicama oka, povezano je s retinopatijom.

Kardiotoksičnost, iako rijetka, može biti opasna po život, uzrokujući probleme poput kongestivnog zatajenja srca, poremećaja provođenja srčanog impulsa i kardiomiopatije. U teškim slučajevima može biti potrebna transplantacija srca. Kardiotoksičnost može biti izazovna za dijagnosticiranje zbog preklapanja simptoma s osnovnim bolestima kao što su SLE i RA.

Miopatija, rijetka nuspojava, može se pojaviti kod dugotrajne primjene i obično zahvaća proksimalne mišiće. Ovo stanje moglo bi biti povezano sa srčanom miotoksičnošću, s faktorima rizika koji uključuju pripadnost bijeloj rasi i zatajenjem bubrega. Dijagnoza se obično potvrđuje elektromiografijom i biopsijom mišića (Muller, 2021; Plantone i Koudriavtseva 2018).

#### **1.3.5. Farmakokinetika klorokina**

Klorokin se brzo i potpuno apsorbira uslijed peroralne primjene te se distribuira po svim tkivima. Djelomično se veže na proteine plazme (55%), a metabolizira se u jetri putem enzimskog sustava citokroma P450 (CYP). U jetri se *N*-dealkilacijom transformira u aktivne metabolite desetilklorokin i bisdesetilklorokin. Eliminacija se odvija uglavnom putem bubrega i jetre, proces koji bi mogao biti ugrožen u bolesnika s oštećenom funkcijom bubrega ili jetre, čime se povećava rizik od retinopatije zbog nakupljanja lijeka. Klorokin može prijeći krvno-moždanu barijeru (KMB), što ga čini potencijalno vrijednim za liječenje neuroloških bolesti. Vrijeme polueliminacije je otprilike 1–2 mjeseca (41 dan  $\pm$  11 dana) i primarno se izlučuje u urinu. Nakuplja se u različitim tkivima, uključujući mozak, mišiće, kožu, srce i jetru.

Pretpostavlja se da bi se, umjesto koncentracije klorokina u plazmi, koncentracija u tim tkivima trebala korelirati s učinkovitosti klorokina (Zorc, 2021; Plantone i Koudriavtseva, 2018).

Klorokin se smatra sigurnim u trudnoći te se može preporučiti trudnicama koje boluju od malarije i autoimunih bolesti. Lijek se također pokazao sigurnim za primjenu kod djece (Zorc, 2021; Plantone i Koudriavtseva, 2018).

### **1.3.6. Derivati klorokina kao potencijalni citostatici**

Klorokin se smatra obećavajućim lijekom za liječenje tumora, ali je obično nužna primjena visoke doze lijeka, što može uzrokovati opsežne i ozbiljne nuspojave. Iz tog razloga su novi derivati klorokina i/ili njihove formulacije u fokusu brojnih istraživanja kako bi se poboljšala fizikalno-kemijska svojstva i biološko djelovanje (Fong i sur., 2021).

Montenegro i suradnici su 2011. godine pripravili seriju 4-hidrazon-7-klorkinolina te ispitali njihovo antiproliferativno djelovanje *in vitro* na četiri humane maligne stanične linije. Osam spojeva pokazalo je značajnu inhibiciju rasta svih ispitanih stanica, a od tih spojeva je šest pokazalo citotoksično djelovanje na najmanje tri ispitane stanične linije što ukazuje na obećavajuću antitumorsku aktivnost ovih spojeva (Montenegro i sur., 2011).

Li i suradnici 2022. godine sintetizirali su seriju hibrida 7-klor-2-metilkinolina i metilkarbazola koji potencijalno ciljaju melanom s mutacijom BRAF. Utvrđeno je da najaktivniji derivat može uzrokovati oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (DNK) stvaranjem veće količine ROS, što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u fazi G2/M i apoptoze u stanicama melanoma te posljedične inhibicije rasta melanoma *in vivo* i *in vitro* (Li i sur., 2022).

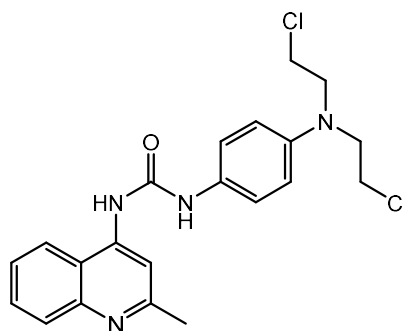
Klorokin, kada se koristi kao monoterapija, nije tako učinkovit kao drugi poznati citostatici. Međutim, često pokazuje sinergističke učinke kada se kombinira s drugim citostaticima, a pritom ne uzrokuje značajne nuspojave. Kao što je prethodno spomenuto, klorokin u kombinaciji s drugim citostaticima ili radioterapijom pojačava njihov učinak. Pokazalo se da primjena 4-aminokinolina zajedno s inhibitorom AKT kinaze povećava učinkovitost citostatika i njegovu selektivnost prema stanicama raka (Hu i sur., 2010).

U preglednom članku iz 2015. godine razmotreno je šest različitih serija sintetiziranih hibridnih molekula nastalih molekulskom hibridizacijom klorokina, odnosno 4-aminokinolina s drugim

farmakološki aktivnim tvarima kako bi se pojačalo antitumorsko djelovanje. Farmakološki aktivne komponente navedenih hibrida, uz klorokin, su: artemisinin, alkilirajući agensi, organometalni kompleksi, sulfonamidi, različiti heterociklički i drugi spojevi (Srivastava i Lee, 2015).

Pokazalo se da se hibridizacijom 4-aminokinolin-artemisininiskih hibrida s još jednom molekulom artemisinina dobilo spojeve koji pokazuju do 30 puta jače citostatsko djelovanje od etopozida na humane stanične linije karcinoma bubrega TK-10, melanoma UACC62 i dojke MCF-7 (Lombard i sur., 2012).

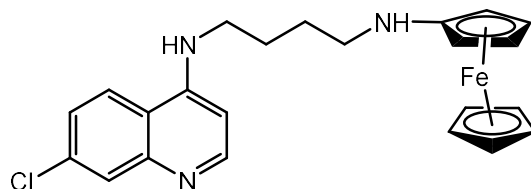
Kakadiya i suradnici 2010. godine su sintetizirali hibride 4-aminokinolina s derivatima dušikova iperita koji su pokazali izraženo citostatsko djelovanje na stanične linije raka pluća ne-malih stanica H1299, adenokarcinoma pluća CL1-0 i CL1-5, raka prostate PC-3, raka dojke MCF-7 i MX-1, karcinoma debelog crijeva HCT-116 te leukemije CCRF-CEM, s tim da su četiri spoja uzrokovala potpunu remisiju karcinoma dojke u miševa. Jedan od tih spojeva, derivat uree (Slika 3.), pokazao je bolju citotoksičnost *in vivo* na atimičnim golim miševima s ksenograftom multirezistentnog karcinoma dojke MCF-7/Adr od ciklofosfamida i paklitaksela, a usporedivu s gemcitabinom. Također bio je manje toksičan i imao je dugo vrijeme poluživota (Kakadiya i sur., 2010).



**Slika 3.** Hibrid 4-aminokinolina i derivata dušikova iperita

Ferocen, organometalni spoj iz skupine metalocena, pokazao je potencijal za sintezu novih spojeva zbog različitih bioloških djelovanja, uključujući i antitumorsko. U istraživanju iz 2014. godine sintetizirani su hibridi 4-aminokinolina i ferocena povezani različitim poveznicama. Četiri spoja su inhibirala rast svih ispitanih tumorskih staničnih linija, dok se jedan od spojeva (Slika 4.) pokazao višestruko potentnijim od etopozida (N'Da i sur., 2014). Dodatno, u

istraživanju iz 2012. pokazalo se da su ferocetil-4-aminokinolin-karboksamidni hibridi aktivniji od svojih prekursora i cisplatina (Esparza-Ruiz i sur., 2012).

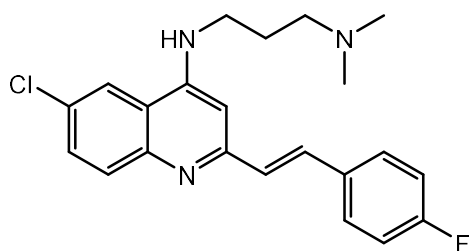


**Slika 4.** Hibrid 4-aminokinolina i ferocena

Chibale i suradnici su 2001. godine hibridizirali aromatske sulfonamide s 4-aminokinolinom i primakinom. Dobivenim hibridnim spojevima ispitana je aktivnost protiv tumorskih staničnih linija osjetljivih na paklitaksel te rezistentnih na paklitaksel, odnosno njihova sposobnost resezitizacije rezistentnih staničnih linija. Najpotentniji od spojeva pokazao je 99% resezitizacije u prisutnosti paklitaksela (1  $\mu$ M) (Chibale i sur., 2001).

Hibridi 4-aminokinolina i triazina povezani alkilnim poveznicama različite duljine pokazali su se učinkoviti u vrlo niskim koncentracijama na većinu tumorskih staničnih linija panela-60 Nacionalnog instituta za tumore (engl. *National Cancer Institute*, NCI-60). Najveći učinak pokazali su na stanične linije karcinoma bubrega A498 te leukemije CCRF-CEM (Manohar i sur., 2014).

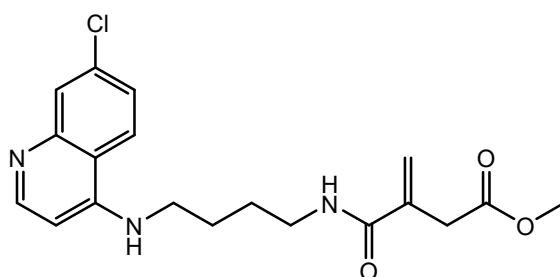
Tijekom istraživanja o hibridima klorokina sa spojevima različite strukture, u jednoj od studija sintetizirana je serija 2-arylvinil-4-aminokinolinskih hibrida koji su pokazali djelotvornost protiv stanične linije raka pluća ne-malih stanica H460, kolorektalnog karcinoma HT-29, raka jetre HepG2 i raka želuca SGC-7901, koja je bila 5–112 puta jača od gefitiniba. Jedan od najpotentnijih sintetiziranih hibrida prikazan je na Slici 5 (Jiang i sur., 2012).



**Slika 5.** 2-arilvinil-4-aminokinolinski hibrid

Istraživačka skupina prof. Zorc sa Zavoda za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta 2018. godine pripravila je hibridne uree klorokina te im ispitala antiproliferativno djelovanje na četiri humane maligne stanične linije. Uree s aromatskim supstituentima pokazale su najjače djelovanje usporedivo s referentnim lijekom etopozidom (Pavić i sur., 2018).

Ista istraživačka skupina 2020. godine sintetizirala je niz hibrida s itakonskom kiselinom te im je u suradnji s Rega institutom za medicinska ispitivanja u Leuvenu, Belgija, ispitano antiproliferativno djelovanje. U usporedbi s referentnim lijekovima docetakselom i staurosporinom, dokazano je antiproliferativno djelovanje klorokinskog hibrida s itakonskom kiselinom (Slika 6.). Navedeni derivat pokazao se aktivnijim u usporedbi s analognim hibridima meflokina ili primakina i itakonske kiseline, a njegovo djelovanje bilo je izraženo na svih devet tumorskih staničnih linija (Perković i sur., 2022).

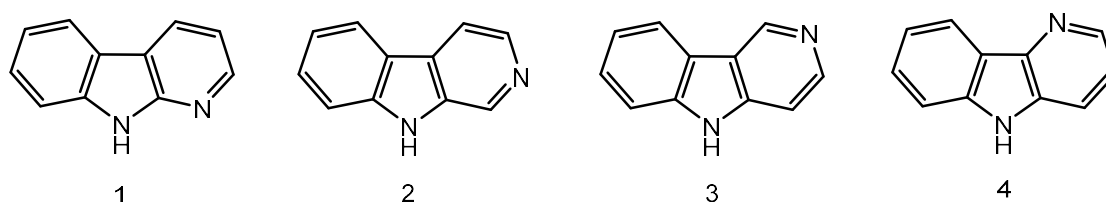


**Slika 6.** Kemijska struktura klorokinskog hibrida s itakonskom kiselinom

Ovakav pristup sintezi novih spojeva obećavajuć je za razvoj učinkovitih i sigurnih lijekova protiv raka, posebice za tumore rezistentne na postojeće lijekove. Štoviše, hibridni spojevi koji kombiniraju klorokin ili 4-aminokinolin pokazuju potencijal u smanjenju nuspojava, vrlo tražene osobine u lijekovima protiv raka, budući da je učinkovitost mnogih takvih lijekova često ograničena njihovom toksičnošću. Ovo predstavlja optimističan smjer za razvoj novih, učinkovitih i sigurnih citostatika.

## 1.4. $\beta$ -Karbolini

$\beta$ -Karbolini pripadaju skupini indolskih alkaloida koji u svojoj strukturi sadrže triciklički pirido[3,4-*b*]indolski prsten. Karbolini se dijele na  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ili  $\delta$ -karboline prema poziciji dušika u prstenima (Slika 7.).



**Slika 7.** Kemijska struktura  $\alpha$ -karbolina (1),  $\beta$ -karbolina (2),  $\gamma$ -karbolina (3) i  $\delta$ -karbolina (4)

Mogu biti potpuno aromatizirani, djelomično zasićeni (dihidrokarbolini) ili potpuno zasićeni (tetrahidrokarbolini). Veliki broj spojeva koji pripadaju ovoj skupini strukturno se razlikuju prema supstituentima na piridinskom ili indolskom prstenu. Općenito,  $\beta$ -karbolini se mogu izolirati iz prirodnih izvora, primjerice biljaka iz porodica Rutaceae, Simaroubaceae, Amaranthaceae, Caryophyllaceae, Rubiaceae i Zygophyllaceae, morskih organizama kao što su žarnjaci, mahovnjaci, meki koralji i spužve, također iz raznih mikroorganizama i kukaca, a pronađeni su i u nekim prehrambenim proizvodima, alkoholnim pićima, duhanskom dimu te ljudskim tkivima i tjelesnim tekućinama. Najznačajniji predstavnik  $\beta$ -karbolinskih alkaloida je harmin koji je prvi put izoliran iz sjemenki biljne vrste *Peganum harmala*, a u narodnoj medicini se koristio kao abortiv i halucinogen.  $\beta$ -Karbolini posjeduju širok raspon bioloških

aktivnosti uključujući sedativno, anksiolitičko, hipnotičko, antikonvulzivno, neuroprotektivno, antitumorsko, antivirusno, antiparazitsko, antimikrobno, protuupalno, antidijabetičko i dr. (Aaghaz i sur., 2021; Zhang i sur., 2020). Najčešće se ispituje primjena  $\beta$ -karbolina u terapiji karcinoma probavnog trakta i malarije, zbog čega se vrlo često koriste kao spojevi uzori u razvoju novih citostatika (Aaghaz i sur., 2021).

Harmin pokazuje značajno antiproliferativno djelovanje na nekoliko humanih malignih staničnih linija. Istraživanja mehanizma djelovanja *in vitro* pokazuju da se harmin interkalira u DNK, dok ekstrakt sjemenki *P. harmala* inhibira humanu DNK topoizomerazu I. Harmin također inhibira protein rezistencije tumora dojke (BCRP) u stanicama raka dojke koje prekomjerno eksprimiraju BCRP te ih potencijalno ponovno senzitivizira na citostatike (Aaghaz i sur., 2021). Dodatni mehanizmi citotoksičnog učinka uključuju inhibiciju kinaza ovisnih o ciklinima (CDK), koje su ključan dio molekularne mašinerije staničnog ciklusa, inhibiciju dvojno specifičnih kinaza (DYRK), koje imaju različit učinak na karcinogenezu, supresiju tumorske angiogeneze i drugo (Zhang i sur., 2020).

Harmin djeluje i protuupalno inhibicijom signalnog puta nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) te smanjenjem lučenja proupalnih citokina IL-6, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ . Kao posljedica protuupalnog djelovanja, odnosno smanjenja izlučivanja IL-18 i TNF- $\alpha$ , harmin posjeduje i neuroprotektivno djelovanje. Također, harmin povećava aktivnost superoksid dizmutaze i katalaze što smanjuje oksidativni stres i upalu. Nadalje, mogući mehanizmi neuroprotektivnog djelovanja harmina su poticanje proliferacije humanih neuralnih progenitorskih stanica te stimulacija rasta i razvoja aksona. Harmin također smanjuje propadanje živčanih stanica uzrokovano nakupljanjem  $\alpha$ -sinukleina u Parkinsonovoj bolesti (Liu i sur., 2017).

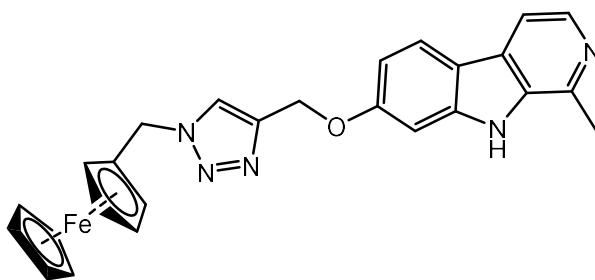
Antidijabetičko djelovanje harmina očituje se u promociji proliferacije  $\beta$  stanica gušterače, poboljšanja kontrole glikemije, smanjenju inzulinske rezistencije povezane s pretilošću te inhibiciji kognitivne disfunkcije povezane s dijabetesom (Liu i sur., 2020; Dirice i sur., 2016; Waki i sur., 2007).

Harmin je pokazao antiparazitsko djelovanje na *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas gallinae* i *P. falciparum*, antivirusno na humani *Citomegalovirus* i virus *Herpes simplex* te antibiotsko na vrste *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* i *Candida albicans* (Zhang i sur., 2020).



S obzirom na nisku bioraspoloživost i nuspojave koje ozbiljno ograničavaju kliničku upotrebu harmina, sintetiziran je veliki broj derivata harmina koji pokazuju jače antiproliferativno djelovanje uz smanjenu neurotoksičnost. Otkriveno je da se smanjena toksičnost prema središnjem živčanom sustavu te jače antiproliferativno djelovanje postiže sinergističkim učinkom variranja supstituenata na položajima 1, 2, 3, 7 i 9  $\beta$ -karbolinskog prstena: supstituenti na poziciji 7 imaju malen utjecaj na biološku aktivnost, ali je supstitucija na tom položaju jako povezana s neurotoksičnošću, supstituenti na položajima 2 i 9 moraju biti sterički mali, a višestruka supstitucija je korisna za pojačanje biološkog djelovanja (Zhang i sur., 2020).

Jedni od derivata harmina koji su pokazali značajan potencijal za daljnji razvoj antitumorskih lijekova su harmiceni, hibridni spojevi nastali kovalentnim vezanjem harmina i ferocena. U istraživanju provedenom 2022. godine pripravljeno je 37 hibrida koji su podijeljeni u dvije serije ovisno o poveznici između harmina i ferocena. Ispitana je njihova antiproliferativna aktivnost na pet humanih tumorskih staničnih linija i jednoj ne-tumorskoj liniji. Svi sintetizirani spojevi pokazali su značajnu antiproliferativnu aktivnost, osobitno na staničnim linijama kolorektalnog karcinoma HCT116 i karcinoma dojke MCF-7, s tim da im je aktivnost protiv ne-tumorske stanične linije Hek293T bila značajno manja. Najpotentniji spoj pokazao je antiproliferativno djelovanje usporedivo s referentnim citostatikom 5-fluorouracilom, uz značajno izraženiju selektivnost prema tumorskim stanicama (Slika 8.) (Poje i sur., 2022).



**Slika 8.** Kemijska struktura najselektivnijeg harmicena

## 1.5. Hibridni lijekovi

Kombiniranje lijekova različitih mehanizama djelovanja pokazalo se kao obećavajuća strategija u modernoj medicini. Ovaj pristup posebno je značajan u kontekstu složenih bolesti poput raka i malarije, gdje terapije usmjerene na pojedinačne mete često imaju određena ograničenja. Liječenje ovakvih multifaktorijalnih bolesti najčešće zahtjeva djelovanje na nekoliko meta istovremeno jer molekulska pozadina same bolesti uključuje više različitih signalnih puteva, odnosno meta na koju je potrebno djelovati kako bismo suzbili uzročnika bolesti. Osim toga, monoterapija se pokazala neučinkovitom i zbog potencijala za razvoj rezistencije. Kako se standardna skrb usmjerava prema terapijama s više meta djelovanja, razvoj hibridnih lijekova za liječenje raka i malarije ubrzano napreduje.

U liječenju raka, osobito uznapredovalih stadija, kombinirana terapija preferirana je u odnosu na monoterapiju. Također, u liječenju malarije, umjesto monoterapije u kliničkoj je praksi već dugi niz godina kombinirana terapija temeljena na artemisininu (engl. *artemisinin-based combination therapies*, ACTs) koja koristi kombinaciju lijekova različitih mehanizama djelovanja kako bi se povećala učinkovitost terapije i odgodila pojava rezistencije. Istovremena primjena različitih lijekova povlači za sobom određena pitanja u vidu farmakokinetike i farmakodinamike. Vrlo je izazovno uskladiti istovremenu primjenu lijekova čiji se farmakokinetički parametri apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije međusobno razlikuju, a da pritom ne dođe do interakcije ili toksičnih učinaka. Također, primjena više lijekova odjednom potencijalan je problem u vidu adherencije, a formuliranje nekoliko lijekova u jednom farmaceutskom obliku izrazito je zahtjevno.

Umjesto kombinirane terapije noviji pristup u istraživanju i razvoju lijekova su tzv. hibridni lijekovi koji kombiniraju najmanje dvije različite farmakoforne jedinice u jednu molekulu s više mehanizama djelovanja ili potencijalno potpuno novim mehanizmom djelovanja. Ovakvim pristupom otvara se mogućnost za veću selektivnost prema oboljelim tkivima, dok je rizik od razvoja rezistencije smanjen. Hibridni lijekovi također pokazuju sinergistički učinak dvaju farmakofora jer su vrlo često mehanizmi antitumorskog djelovanja dva lijeka koja su povezana u hibridnu molekulu komplementarni, čime se povećava vjerojatnost kontrole bolesti. Hibridni lijekovi se obično dizajniraju prema mehanizmu djelovanja, što uključuje kombiniranje lijekova s istim mehanizmom, različitim mehanizmima ili s komplementarnim mehanizmima kojima se ciljaju specifična tkiva (Fortin i Bérubé, 2013). Alternativno,

dizajniranje se može zasnivati na strukturi molekula pri čemu se spajaju strukturni motivi različitih lijekova ili čitave molekule lijekova koje mogu biti povezane direktno ili putem poveznica stabilnih pri fiziološkim uvjetima ili enzimski/kemijski razgradivih, što također omogućuje kombinirani terapijski učinak (Shaveta i sur., 2016; Gediya i Njar, 2009).

Hibridni lijekovi nude nekoliko prednosti za pacijente. Povećavaju selektivnost i potentnost lijekova, potencijalno omogućujući primjenu nižih doza i manje toksičnih nuspojava. Postizanjem sinergizma različitih citotoksičnih mehanizama, hibridni lijekovi mogu, primjerice, učinkovito izazvati apoptozu malignih stanica. Osim toga, ovi lijekovi smanjuju razvoj rezistencije unutar stanica raka, zbog čega se povećavaju izgledi za uspješno liječenje (Fortin i Be'ube, 2013).

Unatoč njihovom potencijalu, s hibridnim lijekovima dolaze i brojni izazovi. Fizikalno-kemijska svojstva mogu ograničiti njihovu oralnu ili topikalnu primjenu. Većina hibridnih lijekova ima veliku molekulsku masu te su vrlo lipofilni. Time krše Lipinskijeva pravila što predstavlja značajan izazov u vidu oralne bioraspoloživosti. Zbog velike lipofilnosti također je otežan razvoj intravenskih formulacija. Također, sama proizvodnja hibridnih lijekova može predstavljati financijski izazov zbog složenosti sinteze i broja sintetskih koraka. Nadalje, dvostruki mehanizmi djelovanja hibridnih lijekova predstavljaju i znanstvene i regulatorne izazove. Procjena kemijske i metaboličke stabilnosti postaje kompleksna zbog njihove složene strukture. Razumijevanje i predviđanje interakcija lijekova također je zahtjevnije. Kako bi ovi lijekovi došli do kliničkih ispitivanja, ključno je dokazati da su sinergistički učinci znanstveno opravdani ili da su takvi lijekovi učinkoviti protiv rezistentnih stanica raka, odnosno, u kontekstu malarije, rezistentnih sojeva plazmodija, tj. da hibridni lijekovi imaju prednost u odnosu na već registrirane lijekove (Gediya i Njar, 2009).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija hibridnih urea harmina i klorokina s krajnjim ciljem pronalaska novih sigurnih i učinkovitih lijekova za liječenje raka. Liječenje raka predstavlja kompleksan javnozdravstveni izazov zbog heterogenosti bolesti i izazova povezanih s konvencionalnim terapijama. Rak obuhvaća širok spektar oboljenja, svaki s jedinstvenom molekulskom pozadinom i genetskim mutacijama, što čini personalizirane strategije liječenja ključnima. Osim toga, otpornost na standardne kemoterapeutike predstavlja značajnu prepreku u postizanju konačnog izlječenja. S ciljem pronalaska rješenja za ove probleme, istraživači primjenjuju različite pristupe, uključujući prenamjenu postojećih lijekova i razvoj hibridnih lijekova. Prenamjena postojećih lijekova uključuje istraživanje već registriranih lijekova ili lijekova u krajnjim fazama razvoja za nove terapijske indikacije, potencijalno zaobilazeći dugotrajan proces razvoja lijekova *de novo*. Ovaj pristup može ubrzati dostupnost tretmana i smanjiti troškove. Nadalje, hibridni lijekovi, koji kombiniraju dvije ili više molekula povezujući ih u jednu bioaktivnu molekulu, nude novi pristup poboljšanju učinkovitosti lijekova putem prevladavanja rezistencije i istovremenog kombiniranja više mehanizama djelovanja. Ovi inovativni pristupi vrlo su aktualni u istraživanju kemoterapeutika, obećavajući učinkovitije i potencijalno personalizirane terapije za pacijente.

Sinteza ciljnih spojeva u ovom diplomskom radu temeljila se na molekularnoj hibridizaciji kojom su dvije molekule željenog djelovanja, harmin i klorokin, povezane u jednu hibridnu molekulu pri čemu je kao poveznica korištena urea. Sintetizirani spojevi su karakterizirani standardnim analitičkim i spektroskopskim metodama: određivanjem temperature tališta ( $t_f$ ), infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR), spektrometrijom masa (MS) te  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR), a online platformom SwissADME predviđeni su fizikalno-kemijski parametri koji utječu na farmakokinetička svojstva novosintetiziranih spojeva.

Ovim spojevima naknadno će biti ispitano citostatsko i antimalarijsko djelovanje *in vitro* te će rezultati ispitivanja odnosa strukture i djelovanja biti korišteni za daljnje dizajniranje i optimizaciju strukture hibridnih molekula harmina i klorokina.

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

Tališta ( $t_r$ ) sintetiziranih spojeva određena su koristeći Stuart Melting Point instrument (Barloworld Scientific, UK) i nisu bila korigirana.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance III HD spektrometru (Bruker, SAD). Frekvencije pri kojima su snimljeni spektri bile su 600 MHz za  $^1\text{H}$  spektar i 151 MHz za  $^{13}\text{C}$  spektar. Uzorci su bili otopljeni u DMSO- $d_6$  pri temperaturi od 20 °C i smješteni u NMR cijevčici od 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na unutarnji standard tetrametilsilan (TMS) u  $^1\text{H}$  spektru, dok je u  $^{13}\text{C}$  spektru korišten ostatni pik DMSO-a (39,52 ppm) kao standard. Konstante sprege ( $J$ ) izražene su u Hz. FTIR-ATR spektri su zabilježeni pomoću spektrofotometra PerkinElmer Spectrum Two (PerkinElmer, SAD) koristeći ATR-FTIR metodu s Fourierovom transformacijom (FT) i tehnikom snimanja atenuirane totalne refleksije (ATR), uz upotrebu UATR (Universal Attenuated Total Reflectance) instrumentalnog dodatka s dijamentom kao unutarnjim refleksijskim elementom. Spektri masa snimljeni su na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti spregnutim s tandemnom masenom spektrometrijom (HPLC-MS/MS) (HPLC, Agilent Technologies 1200 Series; MS, Agilent Technologies 6410 Triple Quad, SAD). Elektrospršenje (ESI) u pozitivnom modu korišteno je kao tehnika ionizacije. Reakcije potpomognute mikrovalovima provedene su u mikrovalnom reaktoru CEM Discover (CEM, SAD) te CEM Discover 2 (CEM, SAD) u staklenim kivetama.

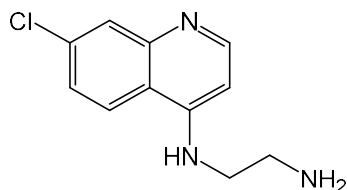
Tankoslojna kromatografija (TLC) se koristila za praćenje tijeka kemijskih reakcija. Silikagel staklene ploče 60 F254 (Merck, Njemačka) korištene su kao nepokretna faza, dok je smjesa cikloheksan/etil-acetat/metanol u omjeru 3:1:0,5 i 1:1:0,5, odnosno smjesa DCM/metanol u omjeru 7,5:2,5, 8:1 i 1:1 korištena kao pokretna faza. Za pročišćavanje spojeva primijenjena je normalno-fazna kromatografija na koloni, za koju se za nepokretnu fazu koristio silikagel veličine 0,063–0,200 mm (Sigma-Aldrich, SAD), dok je smjesa DCM/metanol (7,5:2,5 i 8:1) ili cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) korištena kao pokretna faza. Analizirani spojevi vizualizirani su pomoću ultraljubičastog svjetla ( $\lambda = 254$  i 360 nm) te jodnih para.

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bile 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), 1,8-diazabiciklo(5.4.0)undek-7-en (DBU) i 1,1'-karbonildiimidazol (CDI) kupljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD); 5-metoksitriptamin, cezijev karbonat, trifluorocetna (TFA), 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)etil bromid (2-(Boc-amino)etil bromid) i 2-azido-1,3-dimetilimidazolinijev heksafluorofosfat (ADMP) kupljeni su od tvrtke Tokyo Chemical Industry (TCI, Japan), dok su bromovodična

kiselina i  $\text{LiAlH}_4$  kupljeni od tvrtke Merck (Njemačka). Natrijev klorid i bezvodni natrijev sulfat kupljeni su od tvrtke Gram-Mol (Hrvatska), natrijev hidroksid od tvrtke Kemika (Hrvatska), a trietilamin (TEA) od tvrtke Alfa Aldrich (SAD). Apsolutni etanol kupljen 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 kupljen od tvrtke CARLO ERBA Reagents (Francuska). Bezvodni *N,N*-dimetilformamid (DMF) kupljen od TCI čuvan je nad aktiviranim molekulskim sitima.



### 3.1. Sinteza *N*<sup>1</sup>-(7-klorkinolin-4-il)etan-1,2-diamina (1)



Sinteza je rađena prema prethodno opisanom postupku (Poje i sur., 2022; Pavić i sur., 2018). Suspenzija 0,6 g (3,030 mmol) 4,7-diklorkinolina i 2,030 mL (30,30 mmol) etilen-1,2-diamina grijana je 60 minuta na 95 °C u mikrovalnom reaktoru uz snagu mikrovalova 150 W. Nakon završetka reakcije, u smjesu je dodano 50 mL DCM-a te je ekstrahirano 3 × 50 mL otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) te je isprano vodom (50 mL). Organski sloj je osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Zatim je organsko otapalo upareno pod sniženim tlakom. Talog je rastrljan u eteru i odsisan.

Iskorištenje reakcije: 0,505 g (73%).

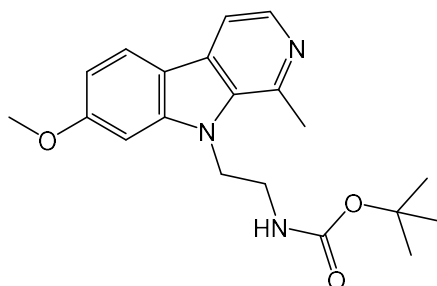
Talište: 139–140,5 °C.

ATR-FTIR:  $\nu_{\max}$  3358, 3251, 2934, 2896, 2853, 1601, 1580, 1543, 1488, 1449, 1428, 1358, 1329, 1283, 1242, 1142, 1119, 1075, 1016, 951, 901, 871, 860, 830, 801, 758, 633, 619, 476  $\text{cm}^{-1}$ .

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm) 8,39 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 8,29 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H), 7,78 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H), 7,44 (dd,  $J = 9,0, 2,3$  Hz, 1H), 7,24 (s, 1H), 6,50 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 3,26 (q,  $J = 6,3$  Hz, 2H), 2,82 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm) 151,95, 150,30, 149,12, 133,37, 127,51, 124,17, 124,00, 117,48, 98,72, 46,16, 40,13.

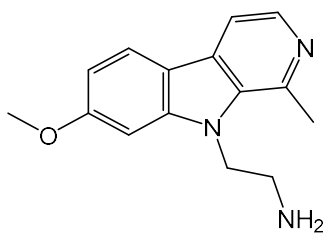
### 3.2. Sinteza *tert*-butil(2-(1-metil-7-metoksi-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamata (**2**)



Sinteza je rađena prema prethodno opisanom postupku (Marinović i sur., 2020). Harmin (0,5 g, 2,355 mmol) je suspendiran u 5 mL suhog DMF-a. Reakcijska smjesa zagrijana je na 90 °C dok se harmin nije otopio. Nakon toga dodano je 3,453 g (10,598 mmol) cezijeve karbonata te je temperatura spuštena na 70 °C, a reakcijska smjesa propuhana dušikom, Nakon 10 minuta u reakcijsku smjesu dodano je 2,111 g (9,420 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 dvaput destiliranom vodom (2 × 50 mL), 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 te odsisan. Spoj **2** korišten je u sljedećem reakcijskom koraku.

Iskorištenje: 0,367 g (44 %).

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

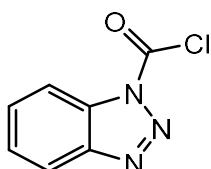


Sinteza je rađena prema ranije opisanom postupku (Marinović i sur., 2020). Spoj **2** mase 0,360 g (1,014 mmol) otopljen je u 3 mL suhog metanola, zatim je u otopinu dodano 2,535 mL (10,14

mmol) 4 M klorovodične kiseline. Reakcijska smjesa miješana 3,5 sata na 50 °C. Zatim je metanol uparen pod sniženim tlakom, talog otopljen u 20 mL destilirane vode, a pH podešen otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) na 12. Zalužena otopina ekstrahirana je etil-acetatom ( $5 \times 25$  mL). Organski sloj ispran je dva puta zasićenom otopinom natrijeva klorida ( $2 \times 25$  mL), osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Etil-acetat uparen je pod sniženim tlakom te je dobiven amin **3**.

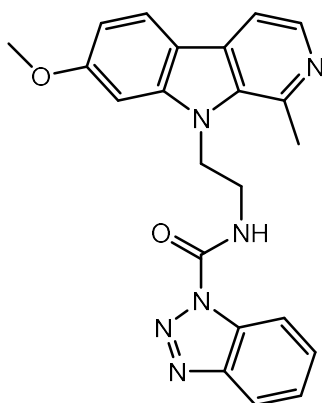
Iskorištenje: 0,206 g (80 %).

### 3.4. Sinteza 1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-karbonil klorida (BtcCl, **4**)



Spoj **4** sintetiziran je prema već opisanom postupku (Butula i sur., 1977). 0,052 g (0,439 mmol) benzotriazola i 0,074 g (0,249 mmol) trifozgena suspendirano je u 5 mL suhog toluena. Reakcijska smjesa je refluksirana 3 sata na temperaturi od 118 °C, uparena na vakuumu i naparena dva puta suhim toluenom. Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt korišten je u sljedećoj reakciji bez pročišćavanja.

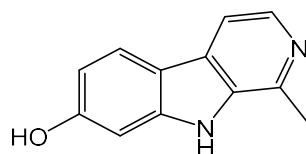
### 3.5. Sinteza *N*-(2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)-1*H*-benzo[*d*] [1,2,3]triazol-1-karboksamida (**5**)



Sinteza je napravljena prema već opisanom postupku (Marinović i sur., 2023). BtcCl (0,079 g, 0,439 mmol) otopljen je u 2,59 mL suhog DCM-a pri temperaturi od 0 °C. Polako mu je dokapana suspenzija 0,080 g (0,314 mmol) amina **3** i 0,061 mL (0,439 mmol) TEA u 3 mL suhog DCM-a. Reakcijska smjesa je miješana 1 sat pri sobnoj temperaturi. Dobiveni talog je odsisan, rastrljan u metanolu te ponovno odsisan.

Iskorištenje: 0,075 g (60%).

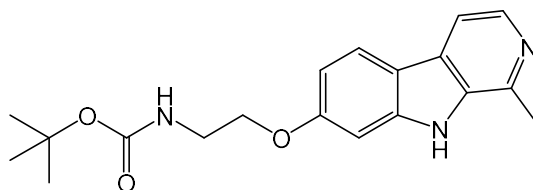
### 3.6. Sinteza 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ola (harmola, **6**)



Sinteza harmola provedena je prema modificiranom prethodno opisanom postupku (Frédéric i sur., 2012). 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 °C u mikrovalnom reaktoru ( $P = 75\text{ W}$ ). Postupak je ponovljen s istom količinom u ukupno četiri kivete. Reakcijske smjese svih kiveta prebačene su u tikvicu, dodano je 20 mL destilirane vode te je otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) zalučeno 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: 0,258 g (92 %).

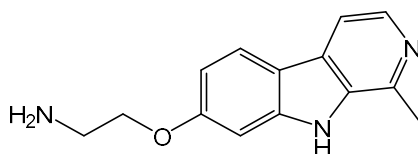
### 3.7. Sinteza *tert*-butil(2-(1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)etil)karbamata (**7**)



Sinteza je rađena prema ranije opisanom postupku (Marinović i sur., 2020). Prethodno sintetizirani harmol **6** mase 0,258 g (1,301 mmol) otopljen je u 2,5 mL suhog DMF-a te mu je dodano 0,593 g (1,822 mmol) cezijeva karbonata. Suspenzija je propuhana dušikom. Nakon 10 minuta reakcijskoj smjesi dodano je 0,700 g (3,122 mmol) 2-(Boc-amino)etil bromida te je miješano u atmosferi dušika na 95 °C 2 sata, a na sobnoj temperaturi preko noći. Sljedeći dan reakcija je zaustavljena dodatkom 40 mL destilirane vode pa je ekstrahirano etil-acetatom (3 × 40 mL). Organski sloj ispran je destiliranom vodom (2 × 40 mL), 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: 0,227 g (51 %).

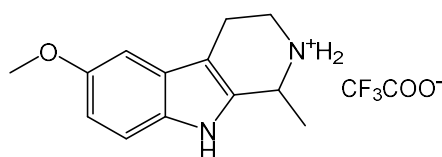
### 3.8. Sinteza 2-(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)etan-1-amina (**8**)



Amin **8** sintetiziran je prema već opisanom postupku (Marinović i sur., 2020). Karbamat **7** mase 0,227 g (0,633 mmol) suspendiran je u 2 mL suhog metanola te mu je dodano 1,663 mL 4 M klorovodične kiseline. Nakon 2 sata miješanja na 50 °C reakcija je prekinuta te je metanol uparen pod sniženim tlakom. Talog je otopljen dodatkom 15 mL destilirane vode. Smjesa je zaljučena otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) do pH 11–12 te je ekstrahirana etil-acetatom (4 × 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 **8**.

Iskorištenje: 0,132 g (83 %).

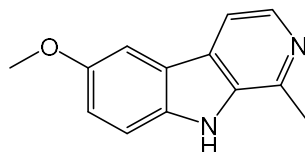
### 3.9. Sinteza 1-metil-6-metoksi-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-ovog trifluoracetata (9)



Sinteza je rađena prema prethodno opisanom postupku (Eagon i Anderson, 2014). U kiveti za mikrovalnu sintezu suspendirana su 0,200 g (1,05 mmol) 5-metoksitriptamina u 3,5 mL acetonitrila te je dodano 0,156 mL (2,10 mmol) TFA i 0,222 mL (2,10 mmol) ADMA. 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, ispran acetonitrilom te mu je dodano 50 mL etera. Talog je idući dan usitnjen na ultrazvučnoj kupelji i odsisan.

Iskorištenje: 1,619 g (58 %).

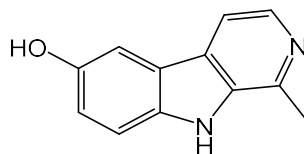
### 3.10. Sinteza 1-metil-6-metoksi-9*H*-pirido[3,4-*b*]indola (10)



Spoj **10** sintetiziran je prema prethodno objavljenom postupku (Eagon i Anderson, 2014). Prethodno sintetizirana sol **9** mase 0,200 g (0,605 mmol) pomiješana je s 0,089 g (1,204 mmol) litijevog karbonata i 0,023 g 10 % Pd/C te je smjesa suspendirana u 3,5 mL apsolutnog etanola. 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 sedam 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 **10** korišten je u sljedećem reakcijskom koraku.

Iskorištenje: 0,400 g (39 %).

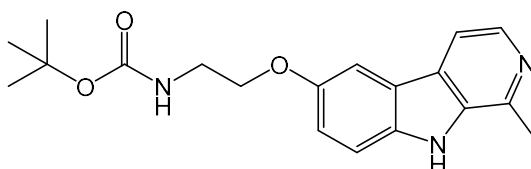
### 3.11. Sinteza 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indola (11)



Sinteza je rađena prema ranije opisanom postupku (Marinović i sur., 2021). Spoj **10** (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 minuta) te je ponovljena s istom količinom reaktanata još tri 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 **11** pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu DCM/metanol (7,5:2,5) te je korišten u daljnjoj sintezi.

Iskorištenje: 0,257 g (69 %).

### 3.12. Sinteza *tert*-butil(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-il)oksi)etil)karbamata (**12**)

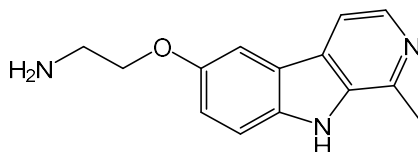


Sinteza spoja **12** rađena je prema već objavljenom postupku (Marinović i sur., 2021). Fenol **11** mase 0,276 g (1,392 mmol) suspendiran je u 5 mL suhog DMF-a te mu je dodano 1,270 g (3,898 mmol) cezijeva karbonata i 0,378 g (1,114 mmol) TBAHS-a. Suspenzija je propuhana dušikom. Nakon 10 minuta miješanja reakcijskoj smjesi dodano je 1,248 g (5,568 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 ( $2 \times 30$  mL), 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. Dobiveni produkt je žuto ulje.

Iskorištenje: 0,309 g (65 %).

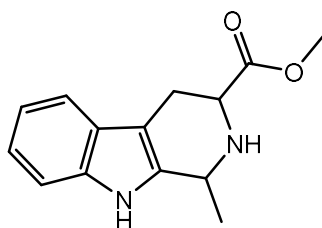
### 3.13. Sinteza 2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-il)oksi)etan-1-amina (13)



Amin **13** sintetiziran je po prethodno objavljenom postupku (Marinović i sur., 2021). Karbamat **12** mase 0,309 g (0,905 mmol) otopljen je u 5 mL suhog metanola te mu je dodano 2,26 mL 4 M klorovodične kiseline. Smjesa je grijana na 50 °C. Nakon 2,5 sata reakcija je prekinuta, otapalo je upareno te je dodano 6 mL destilirane vode. Potom je smjesa zaljučena otopinom NaOH ( $w = 5\%$ ) do pH 11–12 te je stavljena na ultrazvučnu kupelj. Talog je odsisan i otopljen u metanolu. Zatim je metanol uparen pod sniženim tlakom, a talog je rastrljan u eteru i odsisan. Dobiveni spoj je amin **13**.

Iskorištenje: 0,044 g (20 %).

### 3.14. Sinteza metil 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-3-karboksilata (14)



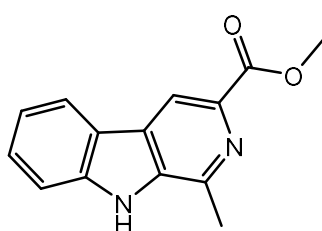
Sinteza je rađena prema prethodno opisanom postupku (Eagon i Anderson, 2014). U epruveti je suspendirano 1,0 g (4,582 mmol) metil-triptofanata u 5 mL DCM-a pa je, uz miješanje, dodano 0,525 mL (4,963 mmol) ADMA. Nakon 10 minuta dodana je otopina 0,583 mL (7,849



mL) TFA u 2 mL destilirane vode. Idući dan je reakcijska smjesa, uz miješanje, prebačena u 50 mL otopine NaHCO<sub>3</sub> (*w* =10%) te joj je pH podešen klorovodičnom kiselinom (*w* =10%) na 7,5. Dobiveni spoj je ekstrahiran diklormetanom (3 × 100 mL), sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom.

Iskorištenje: 1,027 g (92%)

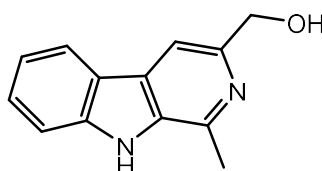
### 3.15. Sinteza metil 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-karboksilata (15)



Eagon i Anderson su 2014. godine opisali sintezu spoja **15** (Eagon i Anderson, 2014). Spoj **14** mase 1,027 g (4,204 mmol) otopljen je u 14 mL apsolutnog etanola te ravnomjerno raspoređen u 7 kiveta. U svaku od kiveta dodano je 0,030 g 10% Pd/C. Reakcija je grijana 40 minuta na 150 °C u mikrovalnom reaktoru uz snagu mikrovalova 150 W. Sve reakcijske otopine su sjedinjene. Katalizator je odsisan preko dijatomejske zemlje (Celite<sup>®</sup>) uz ispiranje diklormetanom i metanolom. Filtrat je uparen pod sniženim tlakom, rastarljan u eteru i odsisan. Dobiveni spoj **15** korišten je u sljedećem reakcijskom koraku.

Iskorištenje: 0,643 g (64%)

### 3.16. Sinteza (1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il)metanola (16)

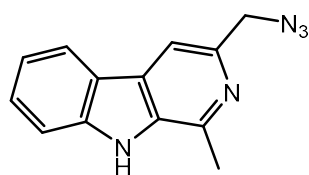


Sinteza je rađena prema ranije opisanom postupku (Marinović i sur., 2021). Prethodno sintetizirani ester **15** mase 0,641 g (2,521 mmol) suspendiran je u 10 mL suhog THF pa mu je,

uz miješanje, polagano dodano 0,239 g (6,298 mmol) LiAlH<sub>4</sub>. Nakon 45 minuta u reakcijsku smjesu dodano je 10 mL destilirane vode pa je pH podešen otopinom NaOH (*w* = 5 %) na 10. Dobiveni spoj ekstrahiran je etil-acetatom (4 × 150 mL) i filtriran, a organsko otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Dobiveni talog je rastrljan u eteru i odsisan.

Iskorištenje: 0,467 g (87 %)

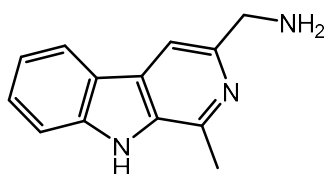
### 3.17. Sinteza 3-(azidometil)-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indola (17)



Sinteza azida **17** rađena je prema već objavljenom postupku (Marinović i sur., 2021). Alkohol **16** mase 0,467 g (2,202 mmol) suspendiran je u suhom THF. Pri temperaturi od 0 °C dodano je 1,256 g (4,404 mmol) ADMP i 0,801 mL (5,285 mmol) DBU te je miješano na 0 °C 40 minuta. Reakcija je prekinuta dodatkom 30 mL zasićene otopine amonijeva klorida. Dobiveni spoj ekstrahiran je DCM-om (3 × 30 mL). Organski sloj ispran je destiliranom vodom (2 × 30 mL), osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom. Dobiveni talog pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5), a zatim je organsko otapalo upareno pod sniženim tlakom. Dobiveni azid **17** korišten je u daljnjoj sintezi.

Iskorištenje: 0,201 g (39%)

### 3.18. Sinteza (1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il)metanamina (18)

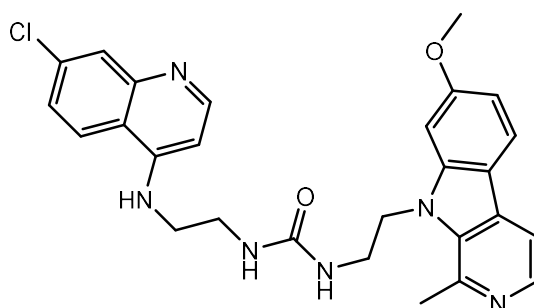


Amin **18** sintetiziran je po prethodno objavljenom postupku (Marinović i sur., 2021). Prethodno sintetizirani spoj mase 0,201 g (0,847 mmol) suspendiran je u 5 mL metanola te mu je dodano 0,040 g 10% Pd/C. Suspenzija je propuhana vodikom i miješana 3 sata pri sobnoj temperaturi. Katalizator je odsisan preko dijatomejske zemlje (Celite<sup>®</sup>), a matičnica je uparena pod sniženim tlakom. Talog je rastrljan u eteru i odsisan. Dobiveni spoj je amin **18**.

Iskorištenje: 0,147 g (82%)

### 3.19. Sinteza hibrida harmina i klorokina

#### 3.19.1. Sinteza 1-(2-((7-klorokinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-(1-metil-7-metoksi-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)uree (**19**)



Suspenzija 0,064 g (0,290 mmol) amina **1**, 0,058 g (0,145 mmol) benzotriazolida **5** i 0,040 mL (0,290 mmol) TEA u 2 mL DCM-a grijana je 30 minuta na 65 °C u mikrovalnom reaktoru uz snagu mikrovalova 150 W. Dobiveni talog je odsisan, rastrljan u eteru i DCM-u i ponovno odsisan. Talog je potom prekrizaliziran iz etanola i odsisan. Ovim postupkom dobiven je bijeli talog uree **19**.

Iskorištenje: 0,039 g (53 %).

Talište: 216 °C (raspad).

ESI-MS (*m/z*) 503,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

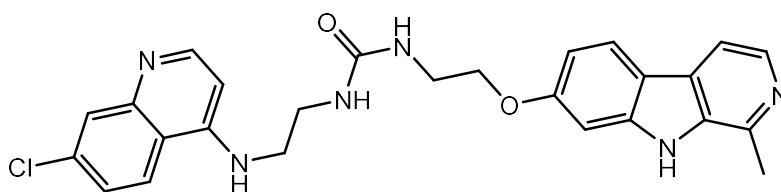
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 8,41 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 8,18 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 8,16 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,07 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,86 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,50 (t, *J* =

4,9 Hz, 1H), 7,42 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,87 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 6,53 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 6,37 – 6,33 (m, 2H), 4,57 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,44 (h,  $J = 6,7$  Hz, 4H), 3,25 (q,  $J = 6,1$  Hz, 2H), 2,97 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): 160,49, 158,92, 151,94, 150,11, 149,00, 142,92, 140,70, 137,71, 134,72, 133,37, 128,32, 127,53, 124,11, 123,76, 122,31, 117,38, 114,28, 112,21, 109,11, 98,60, 93,81, 55,46, 44,37, 43,66, 39,62, 37,99, 23,11.

ATR-FTIR:  $\nu_{\text{max}}$  3296, 1622, 1568, 1500, 1449, 1409, 1367, 1345, 1280, 1251, 1200, 1173, 1140, 1080, 1048, 1025, 978, 948, 906, 870, 805, 764, 599, 545, 496  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.19.2. Sinteza 1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)uree (20)



0,026 g (0,159 mmol) CDI otopljeno je u 1 mL suhog DMF-a i ohlađeno na temperaturu od 0 °C. U pripremljenu otopinu polagano je dokapana otopina 0,032 g (0,133 mmol) amina **8** u 1 mL suhog DMF-a te je reakcijska smjesa miješana na temperaturi od 0 °C 60 minuta. Reakcijskoj je smjesi dodano 0,035 g (0,160 mmol) amina **1** te miješana na sobnoj temperaturi 24 sata. Nastali talog je odsisan te ispran vodom, etil-acetatom i etanolom. Dobiven je bijeli talog uree **20**.

Iskorištenje: 0,028 g (43%).

Talište: 257,5 °C (raspad).

ESI-MS ( $m/z$ ) 489,1 ( $\text{M}+1$ )<sup>+</sup>.

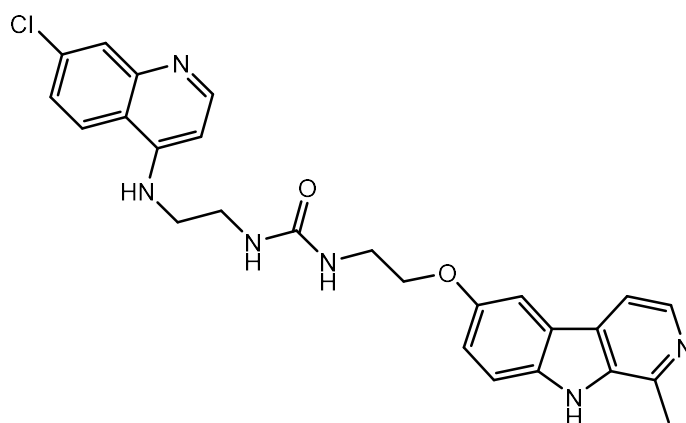
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): 11,40 (s, 1H), 8,39 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 8,19 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 8,15 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 8,03 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,80 – 7,78 (m, 2H), 7,50 (t,  $J = 4,9$  Hz, 1H), 7,44 (dd,  $J = 9,0, 2,0$  Hz, 1H), 7,02 (d,  $J = 3$  Hz, 1H), 6,84 (dd,  $J = 8,0, 2,0$  Hz,

1H), 6,55 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 6,39 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 6,32 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 4,09 (t,  $J = 5,4$  Hz, 2H), 3,48 (q,  $J = 5,6$  Hz, 2H), 3,38 – 3,31 (m, 4H), 2,72 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): 159,18, 158,75, 151,97, 150,12, 149,03, 141,85, 141,29, 137,75, 134,56, 133,36, 127,56, 127,16, 124,13, 123,79, 122,61, 117,38, 114,97, 111,91, 109,25, 98,62, 95,36, 67,49, 43,68, 39,03, 38,00, 20,35.

ATR-FTIR:  $\nu_{\text{max}}$  3336, 3074, 2942, 2866, 1612, 1578, 1568, 1543, 1511, 1487, 1473, 1450, 1433, 1401, 1370, 1336, 1322, 1296, 1279, 1258, 1235, 1211, 1183, 1172, 1148, 1128, 1101, 1079, 1058, 972, 924, 902, 871, 845, 812, 798, 792, 766, 741, 633, 584, 568, 557, 516, 496  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.19.3. Sinteza 1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)uree (21)



Pripremljena je otopina 0,033 g (0,205 mmol) CDI u 1 mL suhog DMF-a i ohlađena na temperaturu od 0 °C. U pripravljenu otopinu polagano je dokapana otopina 0,042 g (0,172 mmol) amina **13** u 1 mL suhog DMF-a. Reakcijska smjesa miješana je na temperaturi od 0 °C 2 sata, nakon čega je u reakcijskoj smjesi dodano 0,032 g (0,143 mmol) amina **1** te je miješana na sobnoj temperaturi 72 sata. Reakcija je prekinuta dodatkom 20 mL destilirane vode te je reakcijska smjesa ostavljena u hladnjaku preko noći. Dobiveni talog je odsisan pa je uzastopno rastavljan u metanolu, DMF-u, destiliranoj vodi i eteru te odsisan. Dobiven je svijetlo žuti talog uree **21**.

Iskorištenje: 0,029 g (41%).

Talište: 259,5 °C (raspad).

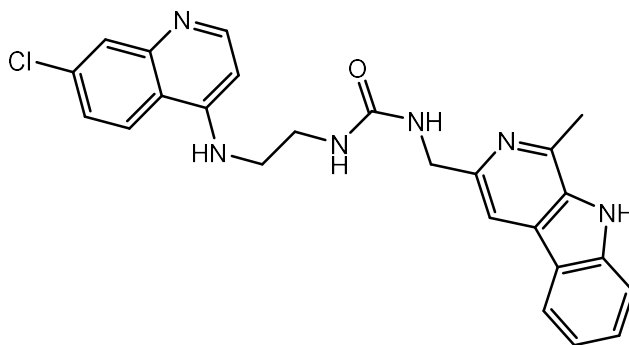
ESI-MS ( $m/z$ ) 489,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 11,35 (s, 1H), 8,39 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 8,18 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 8,15 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 7,88 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,52 (t,  $J = 5,1$  Hz, 1H), 7,48 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 7,44 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H), 7,16 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 6,54 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 6,40 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 6,35 (t,  $J = 5,9$  Hz, 1H), 4,07 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H), 3,47 (q,  $J = 5,8$  Hz, 2H), 3,36–3,33 (m,  $J = 8,8$  Hz, 4H), 2,74 (s, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 159,30, 152,83, 152,45, 150,59, 149,51, 142,65, 137,40, 135,75, 135,54, 133,84, 128,04, 127,16, 124,61, 124,24, 121,88, 118,62, 117,85, 113,17, 113,14, 105,06, 99,08, 68,42, 44,25, 39,64, 38,47, 20,88.

ATR-FTIR:  $\nu_{\max}$  3322, 1615, 1574, 1539, 1500, 1448, 1409, 1370, 1335, 1290, 1250, 1197, 1173, 1143, 1069, 1048, 979, 947, 905, 871, 805, 760, 600, 580, 546, 500  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.19.4. Sinteza 1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il)metil)uree (22)



U otopinu 0,036 g (0,220 mmol) CDI u 1 mL suhog DMF-a, ohlađenu na temperaturu od 0 °C, dokapana je otopina 0,036 g (0,170 mmol) amina **18** u 1 mL suhog DMF-a. Reakcijska smjesa miješana je 2 sata na temperaturi od 0 °C, nakog čega je dodano 0,034 g (0,153 mmol) amina **1** te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi 72 sata. Reakcija je prekinuta dodatkom 20 mL destilirane vode te je ostavljena u hladnjaku preko noći. Idući dan talog je odsisan te dva puta prekrystaliziran iz etanola. Dobiven je svijetloljubičasti talog je uree **22**.

Iskorištenje: 0,023 g (33%).

Talište: >240 °C.

ESI-MS ( $m/z$ ) 459,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 11,46 (s, 1H), 8,37 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H), 8,14 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H), 8,00 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,58–7,52 (m, 2H), 7,50 (t,  $J = 7,7$  Hz, 1H), 7,39 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 7,16 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 6,69 (t,  $J = 6$  Hz, 1H), 6,53 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 6,44 (s, 1H), 4,44 (d,  $J = 5,9$  Hz, 2H), 3,45–3,35 (m, 4H), 2,73 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 158,96, 151,95, 150,12, 149,00, 147,31, 141,13, 140,71, 133,43, 133,35, 127,75, 127,69, 127,51, 124,12, 123,70, 121,45, 120,96, 119,05, 117,34, 111,89, 109,51, 98,56, 45,30, 43,99, 38,06, 20,32.

ATR-FTIR:  $\nu_{\max}$  3367, 3321, 1744, 1614, 1585, 1534, 1451, 1436, 1424, 1362, 1336, 1268, 1248, 1200, 1143, 1081, 905, 881, 871, 856, 811, 765, 736, 667, 630, 583, 556, 474 cm<sup>-1</sup>.

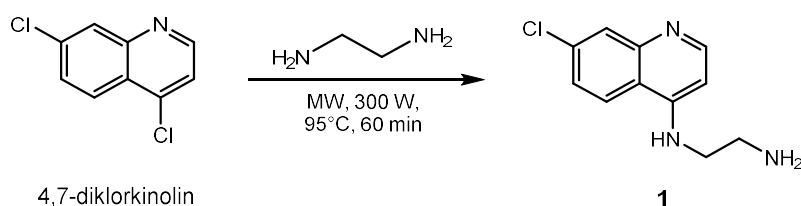
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



## 4.1. Sinteza amino derivata klorokina i harmina

U ovom diplomskom radu opisana je sinteza novih hibridnih urea 4-aminokinolinskog antimalarika klorokina i  $\beta$ -karbolinskog alkaloida harmina. Za sintezu ciljnih molekula prethodno je bilo potrebno sintetizirati gradivne blokove – pojednostavljeni derivat klorokina **1** i amino derivate harmina **3**, **8**, **13** i **18**. Sinteze navedenih građevnih blokova su prethodno opisane (Poje i sur., 2022; Marinović i sur., 2021; Marinović i sur., 2020; Pavić i sur., 2018).

Amino derivat 4-aminokinolin **1** sintetiziran je u jednom reakcijskom koraku prema prethodno opisanom postupku iz komercijalno dostupnih 4,7-diklorokinolina i etan-1,2-diamina mehanizmom nukleofilne aromatske supstitucije (Poje i sur., 2022; Pavić i sur., 2018). Amin **1** dobiven je u dobrom iskorištenju ( $\eta = 70\%$ ) u reakciji potpomognutoj mikrovalovima na temperaturi od 95 °C i trajanju 1 h (Shema 2.). Sirovi produkt, amin **1**, pročišćen je ekstrakcijom i rastrljavanjem u eteru.

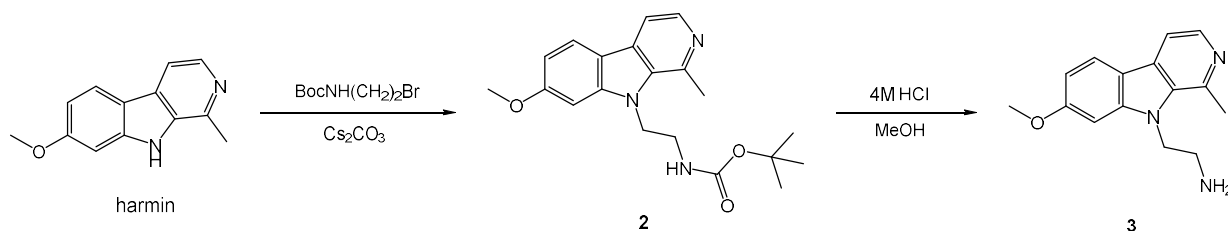


Shema 2. Sinteza klorokinskog amina **1**

Derivati harmina koji sadrže primarnu amino skupinu vezanu na alkilni lanac na položajima N9, O7, O6 ili O3  $\beta$ -karbolinskog prstena čine drugi građevni blok u sintezi urea, a sintetizirani su u nekoliko reakcijskih koraka prema prethodno objavljenim postupcima (Poje i sur., 2022; Marinović i sur., 2021; Marinović i sur., 2020).

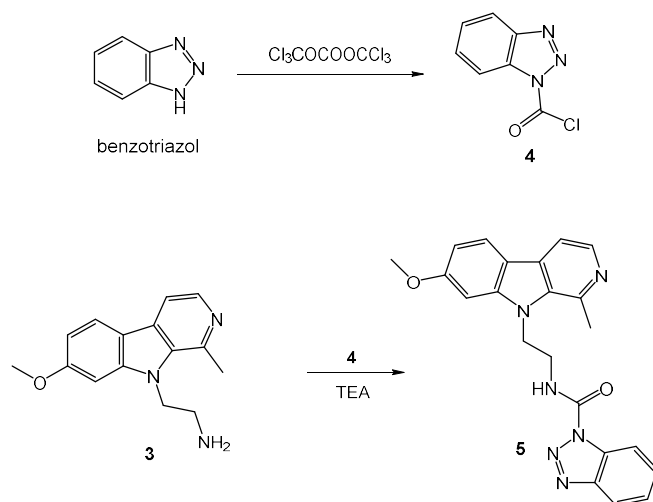
Amin **3** supstituiran na položaju N9  $\beta$ -karbolinskog prstena dobiven je u dva reakcijska koraka iz harmina (Shema 3). U prvom koraku harmin je *N*-alkiliran 2-(Boc-amino)etil bromidom na položaju 9  $\beta$ -karbolinskog prstena pri čemu nastaje karbamat **2** s *tert*-butoksikarbonilnom (Boc) skupinom kao zaštitom amino skupine. Reakcija se odvija u inertnoj atmosferi, u suhom DMF-u uz cezijev karbonat kao bazu koja deprotonira sekundarnu amino skupinu harmina i

povećava joj nukleofilnost za reakciju s 2-(Boc-amino)etil bromidom pri čemu nastaje međuprodukt sa zaštićenom primarnom amino skupinom. U idućem koraku uklanja se Boc zaštitna skupina u kiselom mediju te nastaje sol amina **3**. Sol se zalučivanjem otopinom NaOH do pH 12 prevodi u oblik slobodne baze koji je dobro topljiv u organskom otapalu. Amin **3** je zatim pročišćen ekstrakcijom i rastrljan u eteru (Marinović i sur., 2020).



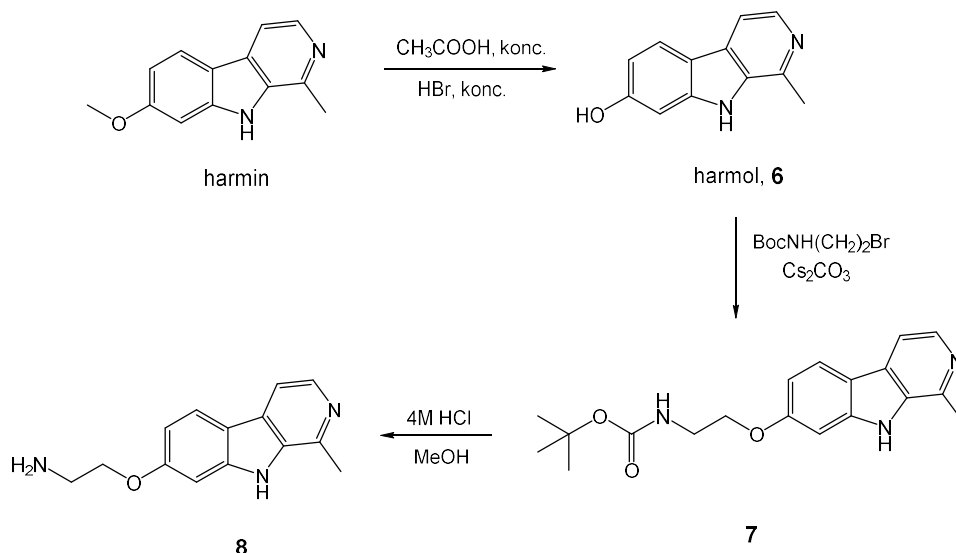
**Shema 3.** Sinteza amina **3** supstituiranog na položaju N9 β-karbolinskog prstena

Za pripremu benzotriazolida harmina **5** supstituiranog na položaju N9 β-karbolinskog prstena bilo je potrebno prvo pripremiti klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, **4**) iz benzotriazola i trifozgena (Butula i sur., 1977). BtcCl je u sljedećem koraku poslužio za aktivaciju amina **3** do benzotriazolida **5** (Shema 4) (Marinović i sur., 2023). Benzotriazol je dobra izlazna skupina te su benzotriazolidi, odnosno tzv. aktivne uree, vrlo reaktivni spojevi koji spremno reagiraju s nukleofilima (npr. amin i alkohol) dajući uree i karbamate što je iskorišteno i u sintezi uree **19**.



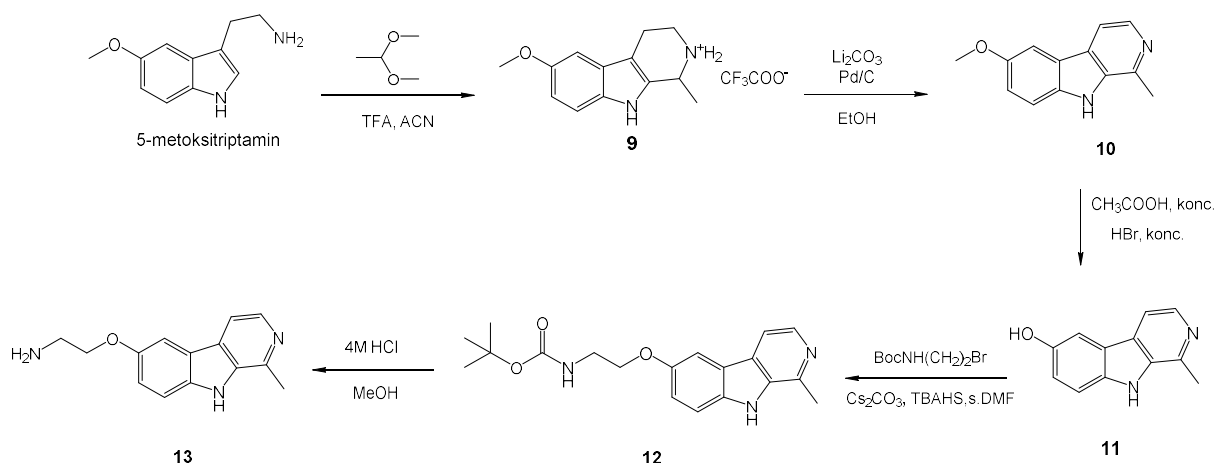
**Shema 4.** Sinteza benzotriazolida harmina **5**

Sinteza amina **8** supstituiranog na poziciji O7  $\beta$ -karbolinskog prstena provedena je u tri reakcijska koraka, kako je prikazano na Shemi 5. Prvo se metilni eter harmina na položaju 7  $\beta$ -karbolinskog prstena kiselom hidrolizom prevodi do harmola (Frédéric i sur., 2012). Ova reakcija se provodi uz smjesu koncentrirane bromovodične i octene kiseline u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 140 °C. Kiseli uvjeti omogućuju protoniranje kisika etera koji postaje bolja izlazna skupina. te u prisustvu nukleofila ( $\text{Br}^-$ ) dolazi do nukleofilne supstitucije i hidrolize eterske veze  $\text{S}_{\text{N}}2$  mehanizmom pri čemu nastaje fenol (harmol **6**) i metil bromid. Budući da je harmol u kiselom mediju protoniran, potrebno ga je zaluživanjem do pH 9–10 prevesti u oblik slobodne baze koji se može ekstrahirati organskim otapalom. Nakon izolacije fenolna skupina harmola alkilirana je 2-(Boc-amino)etil bromidom u suhom DMF-u i inertnoj atmosferi uz cezijev karbonat kao bazu, čime je dobiven karbamat **7** sa zaštićenom amino skupinom. U posljednjem koraku, Boc skupina je uklonjena u kiselim uvjetima pri čemu nastaje protonirani amin **8**. Konačni produkt u obliku slobodne baze dobiven je ekstrakcijom nakon podešavanja pH na 11–12 i rastrljavanjem u eteru (Marinović i sur., 2020).



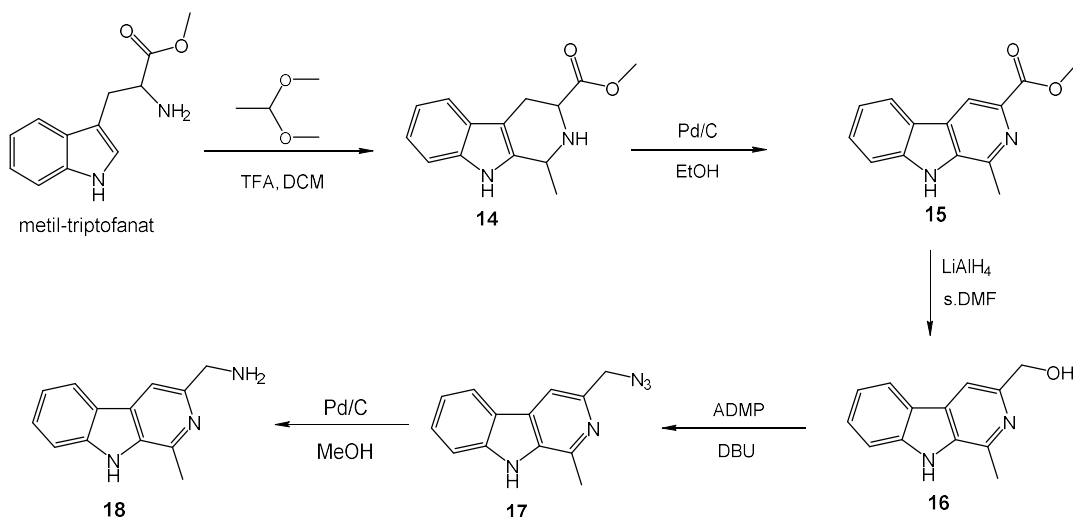
**Shema 5.** Sinteza amina **8** supstituiranog na položaju O7 β-karbolinskog prstena

Amin **13** supstituiran na položaju O6 β-karbolinskog prstena sintetiziran je u pet reakcijskih koraka prema Shemi 6. Prvo je Pictet-Spenglerovom kondenzacijom iz 5-metoksitriptamina i ADMA u kiselim uvjetima dobiven tetrahidro-β-karbolin **9**. Oksidacijom spoja **9** uz katalizator 10 % Pd/C nastao je β-karbolin **10** s metoksi skupinom na poziciji O6. Ova reakcija se provodi u mikrovalnom reaktoru na 150 °C. Litijev karbonat je u ovoj reakciji služio kao baza koja prevodi spoj **9** u oblik slobodne baze (Eagon i Anderson, 2014). Fenol **11** dobiven je iz β-karbolina **10** kiselom hidrolizom metilnog etera analogno prethodno opisanoj sintezi harmola **6**. U sljedećem koraku, hidroksilna skupina fenola **11** alkilirana je 2-(Boc-amino)etil bromidom, rezultirajući karbamatom **12** u kojem je amino skupina zaštićena Boc skupinom. Ova reakcija se provodi u suhom DMF-u u inertnoj atmosferi uz prisustvo cezijeveg karbonata kao baze i TBAHS kao katalizatora faznog prijelaza. Na kraju, zaštitna skupina se uklanja kiselom hidrolizom pri čemu je nastala sol koja je zaluživanjem do pH 11–12 prevedena u amin **13**. Dobiveni spoj pročišćavan je ekstrakcijom i rastljavaњem u eteru (Marinović i sur., 2021).



**Shema 6.** Sinteza amina **13** supstituiranog na položaju O6 β-karbolinskog prstena

Sinteza amina **18** supstituiranog na položaju C3 β-karbolinskog prstena provedena je u pet reakcijskih koraka (Shema 7.). Prvo je Pictet-Spenglerovom reakcijom između metil-triptofanata i ADMA u kiselom došlo do zatvaranja šesteročlanog prstena i formiranja tetrahidro-β-karbolina **14** supstituiranog na položaju C3. Kako bismo preveli spoj **14** iz oblika soli u oblik baze, otopina je zalužena otopinom  $\text{NaHCO}_3$  te je pH podešen na 7,5. Dobiveni spoj je pročišćen ekstrakcijom. U sljedećem koraku spoj **14** je aromatiziran oksidacijom potpomognutom mikrovalima na temperaturi od  $150\text{ }^\circ\text{C}$  uz katalizator Pd/C (Eagon i Anderson, 2014). U trećem reakcijskom koraku primjenom jakog reducensa  $\text{LiAlH}_4$  dolazi do redukcije esterske skupine u primarni alkohol. U četvrtom i petom koraku sinteze prevodi se primarni alkohol u primarni amin: prvo se sintetizira azid **17** primjenom ADMP/DBU pri  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , a zatim se nastali azid **17**, koji je prethodno pročišćen kromatografijom na koloni, reducira u atmosferi vodika uz katalizator 10% Pd/C. Dobiveni krajnji produkt, amin **18**, pročišćen je rastrljavanjem eteru (Marinović i sur., 2021).

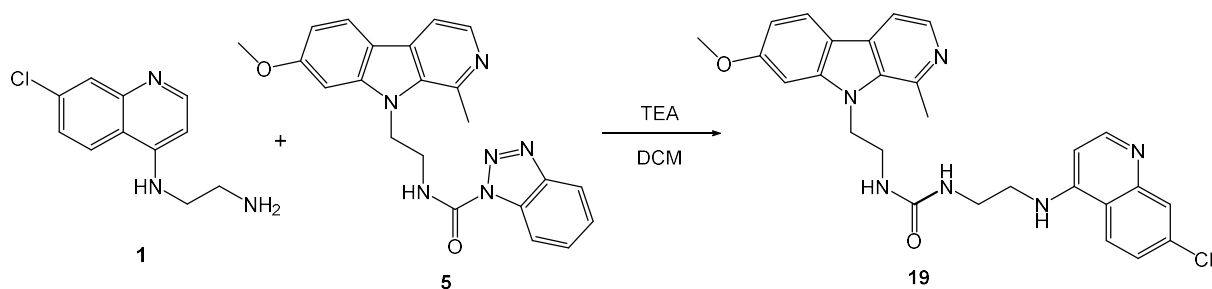


**Shema 7.** Sinteza amina **18** supstituiranog na položaju 3  $\beta$ -karbolinskog prstena

#### 4.2. Sinteza hibrida harmina i klorokina 19–22

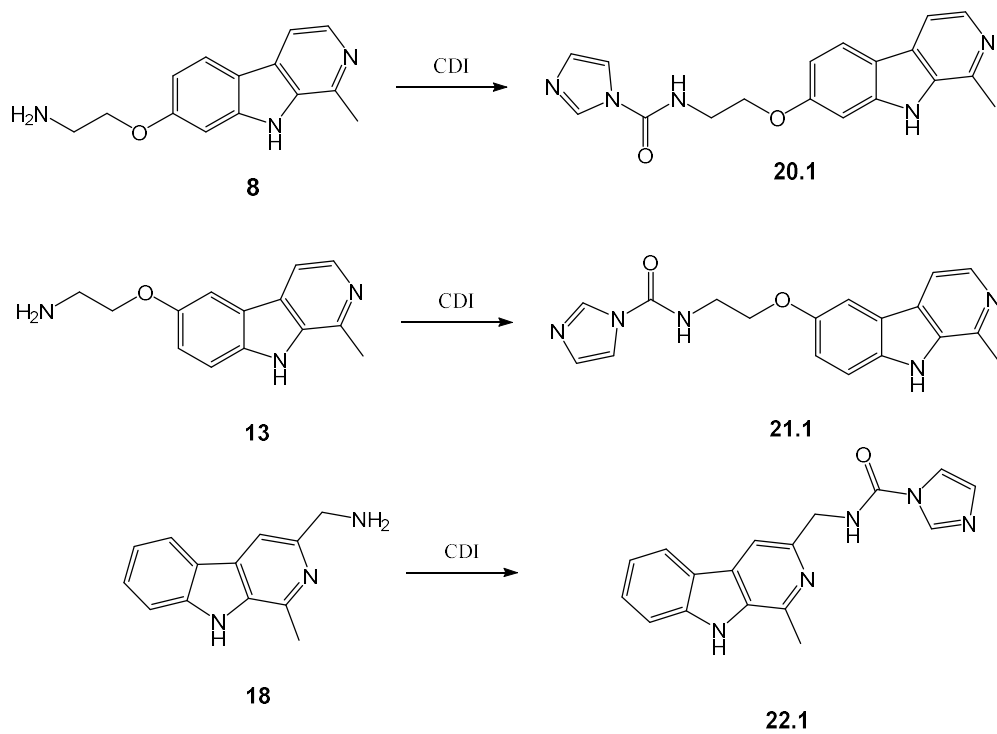
Sintetizirani benzotriazolid **5** te amini **8**, **13** i **18** korišteni su u daljnjim reakcijama sinteze urea. Molekulska hibridizacija provedena je pomoću *coupling* reagensa 1,1'-karbonildiimidazola (CDI metoda) ili benotriazolskom (BtH) metodom.

Sinteza uree **19**, supstituirane na položaju N9  $\beta$ -karbolinskog prstena, provedena je BtH metodom (Shema 8). Uz prisustvo TEA kao baze, primarna amino skupina amina **1** nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom aktivne uree **5** pri čemu dolazi do aminolize, odnosno supstitucije benzotriazola te nastaje urea **19**. Reakcija je provedena u DCM-u u mikrovalnom reaktoru pri 65 °C. Dobivena urea **19** pročišćena je uzastopnim rastrljavanjem u eteru i prekrizacijom iz etanola.



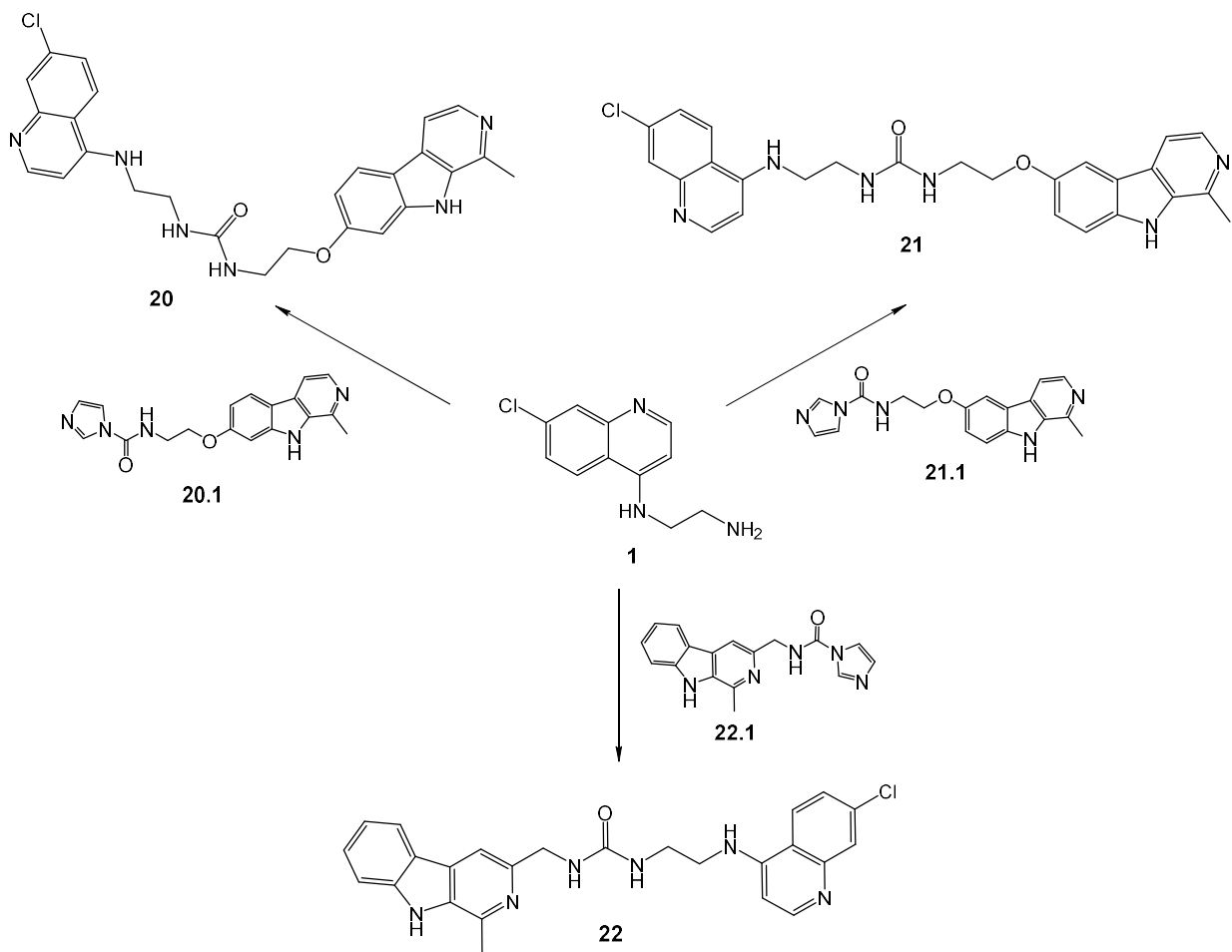
**Shema 8.** Sinteza uree **19** supstituirane na položaju N9  $\beta$ -karbolinskog prstena BtH metodom

Uree **20–22** dobivene su CDI metodom u kojoj je prvo *in situ* formiran *N*-supstituirani karbonilimidazol iz odgovarajućeg  $\beta$ -karbolinskog amina **8**, **13** ili **18** i *coupling* reagensa CDI-a. Primarna amino skupina  $\beta$ -karbolinskih amina djeluje kao nukleofil koji napada elektrofilni karbonilni ugljikov atom CDI-a, pri čemu dolazi do odcjepljivanja imidazolske skupine. Ovom nukleofilnom supstitucijom nastaju međuprodukti **20.1**, **21.1** te **22.1**. (Shema 9) Reakcija se odvija u suhom DMF-u pri 0 °C. Otopina  $\beta$ -karbolinskog amina je polagano dokapana u smjesu CDI-a kako bi CDI uvijek bio u suvišku. Na taj način je izbjegnuta supstitucija drugog imidazola i sinteza simetrične uree. U sljedećem reakcijskom koraku (Shema 10) nukleofilna amino skupina amina **1** napada karbonilni ugljikov atom karbonilimidazolskog međuprodukta uz ponovnu eliminaciju imidazolske skupine pri čemu nastaju hibridne uree **20–22**. Međuprodukti prethodne reakcije korišteni su bez pročišćavanja u drugom koraku koji je izveden u suhom DMF-u na sobnoj temperaturi. Uree **20** i **22** pročišćene su prekrizacijom.



**Shema 9.** Prvi korak sinteze urea CDI metodom – sinteza karbonilimidazolskih međuprodukata





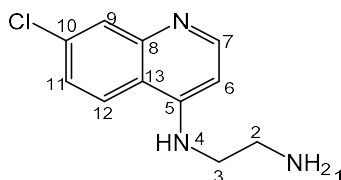
**Shema 10.** Drugi korak sinteze urea CDI metodom – aminoliza karbonilimidazolskih međuprodukata

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 FTIR podatci za amin **1**

Spoj	Iskorištenje (%)	$t_f$ (°C)	Molekulska formula	Molekulska masa	MS ( $m/z$ )	ATR-FTIR ( $\nu/\text{cm}^{-1}$ )
<b>1</b>	70	139–140,5	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClN}_3$	221,69	222,1	3358, 3251, 2934, 2896, 2853, 1601, 1580, 1543, 1488, 1449, 1428, 1358, 1329, 1283, 1242, 1142, 1119, 1075, 1016, 951, 901, 871, 860, 830, 801, 758, 633, 619, 476

**Tablica 2.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podatci za amin **1**

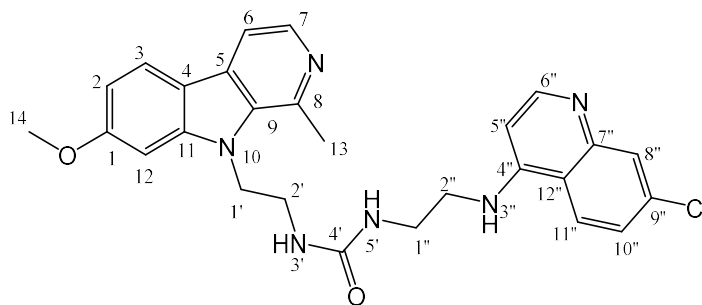


Spoj	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ )	(151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ )
<b>1</b>	8,39 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 7), 8,29 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 12), 7,78 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, 9), 7,44 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, 1H, 11), 7,24 (s, 1H, 4), 6,50 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 6), 3,26 (q, $J = 6,3$ Hz, 2H, 3), 2,82 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, 2), 1,58 (s, 2H, 1)	151,95 (7), 150,30 (5), 149,12 (8), 133,37 (10), 127,51 (11), 124,17 (9), 124,00 (12), 117,48 (13), 98,72 (6), 46,16 (2"), 40,13 (3")

**Tablica 3.** Analitički, MS i IR podatci za uree **19–22**

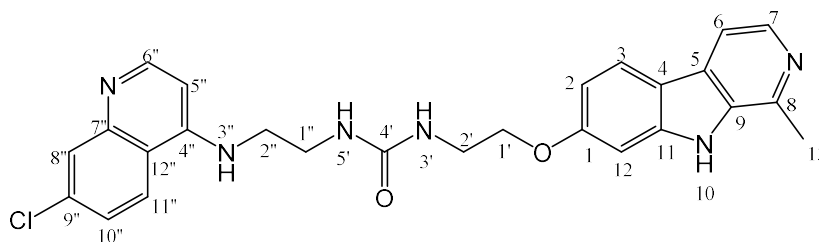
Spoj	Iskorištenje (%)	$t_r$ (°C)	Molekulska formula	Molekulska masa	MS ( $m/z$ )	IR ( $\nu/\text{cm}^{-1}$ )
19	42	216 (raspad)	$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{ClN}_6\text{O}_2$	503,0 (502,19)	503,1 (M+1) <sup>+</sup>	3253, 3159, 1684, 1616, 1603, 1561, 1485, 1458, 1431, 1359, 1325, 1265, 1229, 1194, 1146, 1112, 1058, 939, 895, 818, 738, 596, 532
20	43	257.5 (raspad)	$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{ClN}_6\text{O}_2$	488,98 (488,17)	489,1 (M+1) <sup>+</sup>	3253, 3159, 1684, 1616, 1603, 1561, 1485, 1458, 1431, 1359, 1325, 1265, 1229, 1194, 1146, 1112, 1058, 939, 895, 818, 738, 596, 532
21	41	259.5 (raspad)	$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{ClN}_6\text{O}_2$	488,98 (488,17)	489,1 (M+1) <sup>+</sup>	3253, 3159, 1684, 1616, 1603, 1561, 1485, 1458, 1431, 1359, 1325, 1265, 1229, 1194, 1146, 1112, 1058, 939, 895, 818, 738, 596, 532
22	33	>240	$\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{ClN}_6\text{O}$	458,95 (458,16)	459,1 (M+1) <sup>+</sup>	3367, 3321, 1744, 1614, 1585, 1534, 1451, 1436, 1424, 1362, 1336, 1268, 1248, 1200, 1143, 1081, 905, 881, 871, 856, 811, 765, 736, 667, 630, 583, 556, 474

**Tablica 4.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podatci za ureu **19**



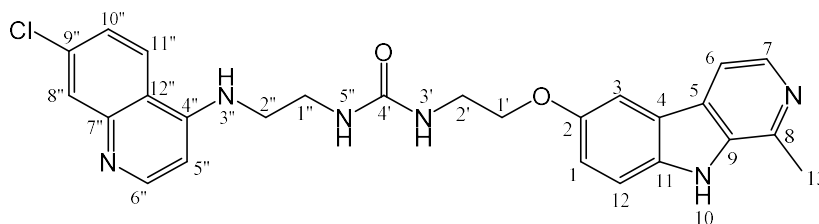
Spoj	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	(600 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm)	(151 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm)
<b>19</b>	8,41 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 6"), 8,18 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 11"), 8,16 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 7), 8,07 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 3), 7,86 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 6), 7,79 (s, 1H, 8"), 7,50 (t, $J = 4,9$ Hz, 1H, 3"), 7,42 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, 10"), 7,30 (s, 1H, 12), 6,87 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, 2), 6,53 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 5"), 6,37 – 6,33 (m, 2H, 3', 5'), 4,57 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 3,44 (h, $J = 6,7$ Hz, 4H, 2', 2"), 3,25 (q, $J = 6,1$ Hz, 2H, 1"), 2,97 (s, 3H, 13)	160,49 (1), 158,92 (4'), 151,94 (6"), 150,11 (4"), 149,00 (7"), 142,92 (8), 140,70 (11), 137,71 (7), 134,72 (9), 133,37 (9"), 128,32 (4), 127,53 (10"), 124,11 (8"), 123,76 (11"), 122,31 (3), 117,38 (12"), 114,28 (5), 112,21 (6), 109,11 (2), 98,60 (5"), 93,81 (12), 55,46 (14), 44,37 (1'), 43,66 (2"), 39,62 (1"), 37,99 (2'), 23,11 (13)

**Tablica 5.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podatci za ureu **20**



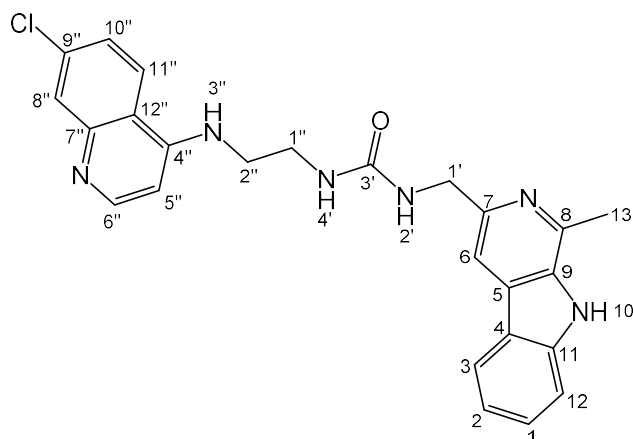
Spoj	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ , $J/\text{Hz}$ )	(151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ , $J/\text{Hz}$ )
<b>20</b>	11,40 (s, 1H, 10), 8,39 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 6''), 8,19 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, 11''), 8,15 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 7), 8,03 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, 3), 7,80 – 7,78 (m, 2H, 6, 8''), 7,50 (t, $J = 4,9$ Hz, 1H, 3''), 7,44 (dd, $J = 9,0, 2,0$ Hz, 1H, 10''), 7,02 (d, $J = 3$ Hz, 1H, 12), 6,84 (dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz, 1H, 2), 6,55 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 5''), 6,39 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, 5'), 6,32 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, 3'), 4,09 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H, 1'), 3,48 (q, $J = 5,6$ Hz, 2H, 2'), 3,38 – 3,31 (m, 4H, 1'', 2''), 2,72 (s, 3H, 13)	159,18 (4'), 158,75 (1), 151,97 (6''), 150,12 (4''), 149,03 (7''), 141,85 (8), 141,29 (11), 137,75 (7), 134,56 (9), 133,36 (9''), 127,56 (10''), 127,16 (4), 124,13 (8''), 123,79 (11''), 122,61 (3), 117,38 (12''), 114,97 (5), 111,91 (6), 109,25 (2), 98,62 (5''), 95,36 (12), 67,49 (1'), 43,68 (2''), 39,03 (1''), 38,00 (2), 20,35 (13)

**Tablica 6.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podatci za ureu **21**



Spoj	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	(600 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm)	(151 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm)
21	11,35 (s, 1H, 10), 8,39 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 6''), 8,18 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, 11''), 8,15 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 7), 7,88 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 6), 7,78 (s, 1H, 8''), 7,75 (s, 1H, 3), 7,52 (t, $J = 5,1$ Hz, 1H, 3''), 7,48 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, 12), 7,44 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 10''), 7,16 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, 1), 6,54 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 5''), 6,40 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, 3'), 6,35 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H, 5'), 4,07 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, 1'), 3,47 (q, $J = 5,8$ Hz, 2H, 2'), 3,36–3,33 (m, $J = 8,8$ Hz, 4H, 1'', 2''), 2,74 (s, 4H, 13)	159,30 (4'), 152,83 (2), 152,45 (6''), 150,59 (4''), 149,51 (7''), 142,65 (8), 137,40 (7), 135,75, 135,54 (9, 11), 133,84 (9''), 128,04 (10''), 127,16 (4), 124,61 (8''), 124,24 (11''), 121,88 (5), 118,62 (1), 117,85 (12''), 113,17, 113,14 (6, 12), 105,06 (3), 99,08 (5''), 68,42 (1'), 44,25 (2''), 39,64 (1''), 38,47 (2'), 20,88 (13)

**Tablica 7.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podatci za ureu **22**



Spoj	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	(600 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm)	(151 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm)
22	11,46 (s, 1H, 10), 8,37 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 6''), 8,14 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 11''), 8,00 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 3), 7,78 (s, 1H, 8''), 7,76 (s, 1H, 6), 7,58–7,52 (m, 2H, 12, 3''), 7,50 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, 1), 7,39 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, 10''), 7,16 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, 2), 6,69 (t, $J = 6$ Hz, 1H, 2'), 6,53 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 5''), 6,44 (s, 1H, 4'), 4,44 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H, 1'), 3,45–3,35 (m, 4H, 1'', 2''), 2,73 (s, 3H, 13)	158,96 (3'), 151,95 (6''), 150,12 (4''), 149,00 (7''), 147,31 (7), 141,13 (8), 140,71 (11), 133,43 (9), 133,35 (9''), 127,75 (10''), 127,69 (4), 127,51 (3), 124,12 (8''), 123,70 (11''), 121,45 (1), 120,96 (5), 119,05 (2), 117,34 (12''), 111,89 (12), 109,51 (6), 98,56 (5''), 45,30 (1'), 43,99 (2''), 38,06 (1''), 20,32 (2)

### 4.3. Predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava poželjnih za lijekovite tvari za oralnu primjenu

Predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava poželjnih za lijekove (engl. *drug-like properties*) obično se odnosi na oralnu bioraspoloživost lijekovitih tvari. Ovaj koncept koristi se kako bi se osigurala odgovarajuća učinkovitost spojeva u procesu dizajniranja lijeka. S ciljem razvoja novih lijekova u što kraćem vremenskom periodu i uz što manje troškove, prvi standard predviđanja fizikalno-kemijskih svojstava poželjnih za lijekove predložio je 1997. godine C. A. Lipinski, poznat pod imenom „Lipinskijeva pravila“ ili „Pravilo 5“ (engl. *Rule of 5*, Ro5). Lipinskijeva pravila nalažu da oralno bioraspoložive molekule moraju imati relativnu molekulsku masu ( $M_r$ )  $\leq 500$ , logaritam koeficijenta raspodjele ( $\log P$ )  $\leq 5$ , broj donora vodikovih veza  $\leq 5$  i broj akceptora vodikovih veza  $\leq 10$  (Lipinski i sur., 1997). Osim klasičnog istraživanja Ro5, druge fizikalno-kemijske osobine analizirao je D. F. Veber, te je uključio i fleksibilnost, odnosno polarnost molekule. Veberova pravila nadopunjuju Lipinskijeva na način da je broj rotirajućih veza manji od 10, zbroj donora i akceptora vodikovih veza manji od 12 i topološka ploština zone polarne površine (TPSA) manja od  $120 \text{ \AA}^2$  (Veber i sur., 2002). Ovi deskriptori povezani su sa sposobnošću lijeka da prijeđe stanične membrane gastrointestinalnog trakta, budući da su membrane manje permeabilne za vrlo fleksibilne i polarne molekule. Ti parametri trenutno se mogu izračunati na nekoliko online platformi poput SwissADME-a, koja koristi opći računalni model za predviđanje pasivne intestinalne apsorpcije kod ljudi usporedbom fizikalno-kemijskih svojstava lijeka. Parametri koji su potrebni za Lipinskijeva i Veberova pravila, računati su pomoću online platforme SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) i navedena su u Tablici 8.

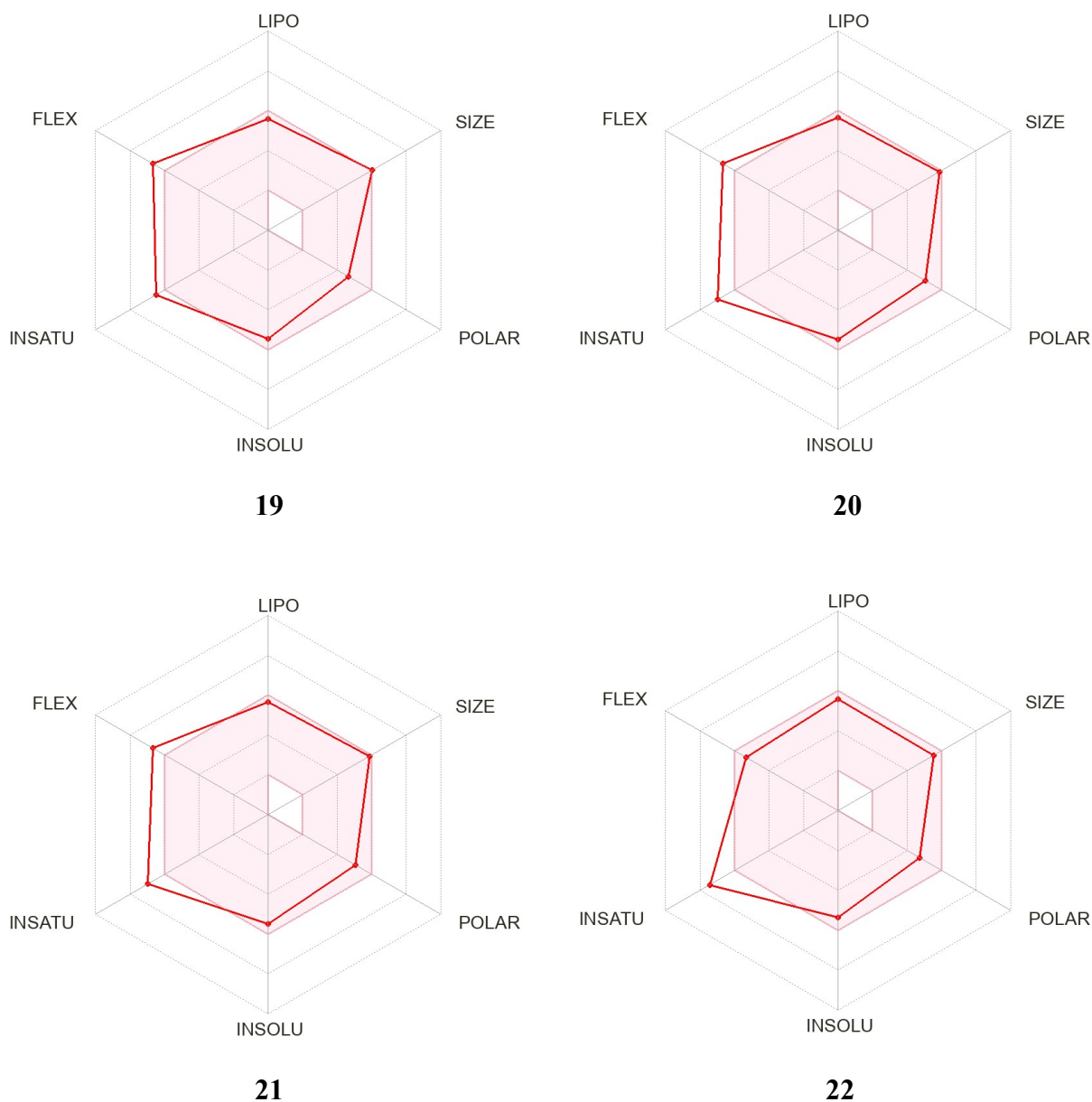


**Tablica 8.** Pregled fizikalno-kemijskih svojstava novosintetiziranih spojeva **19–22** koji utječu na oralnu bioraspoloživost izračunatih pomoću online platforme SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch))

<b>Spoj</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>
<b>Molekulska formula</b>	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> C <sub>1</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> C <sub>1</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> C <sub>1</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> C <sub>1</sub> N <sub>6</sub> O
<b><i>M<sub>r</sub></i></b>	503.00	488.97	488.97	458.94
<b>log <i>P</i></b>	4.29	4.41	4.41	4.27
<b>Broj donora vodikove veze</b>	3	4	4	3
<b>Broj akceptora vodikove veze</b>	4	4	4	4
<b>Zbroj donora i akceptora vodikove veze</b>	7	8	8	7
<b>Broj rotirajućih veza</b>	10	10	10	8
<b>TPSA (Å<sup>2</sup>)</b>	93.10	103.96	103.96	94.73
<b>log <i>S</i></b>	-5.47	-5.48	-5.48	-5.36
<b>Udio <i>C<sub>sp</sub></i><sup>3</sup></b>	0.22	0.19	0.19	0.16
<b>Lipinskijeva pravila</b>	3/4	4/4	4/4	4/4
<b>Veberova pravila</b>	3/3	3/3	3/3	3/3

Prema izračunatim podacima svi novosintetizirani spojevi osim uree **19** zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila te im se predviđa dobra oralna bioraspoloživost. Urea **19** minimalno odstupa od Lipinskijevog pravila s obzirom na relativnu molekulsku masu.

*Bioavailability radar*, alat programa SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), grafički prikazuje utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava na oralnu bioraspoloživost. Svaki kut šesterokuta predstavlja jedno od svojstava (lipofilnost, veličinu molekule, polarnost, netopljivost, nezasićenost te fleksibilnost), a optimalan raspon za svako od svojstava prikazan je pojedinačnim kutovima ružičastog šesterokuta. Optimalan raspon lipofilnosti (LIPO) izražen je logaritmom koeficijenta razdjeljena ( $\log P$ ) (XLOGP3 u vrijednosti između  $-0,7$  do  $5,0$ ); veličina molekule (SIZE) računa se pomoću molarne mase ( $M$  u vrijednosti između  $150$  i  $500$  g/mol); polarnost (POLAR) izražena je ploštinom zone polarne površine (TPSA  $20-130 \text{ \AA}^2$ ); netopljivost (INSOLU) je predstavljena kao negativni logaritam molarne topljivosti ( $\log S \geq -6$ ); nezasićenost (INSATU) izražena je kao udio ugljika u  $sp^3$  hibridizaciji u odnosu na ukupan broj ugljika (Udio  $C_{sp^3} \geq 0,25$ ), dok je fleksibilnost (FLEX) kvantificirana brojem rotirajućih veza koji ne smije prijeći  $9$  (Daina i sur., 2017).



**Slika 9.** *Bioavailability radar* novosintetiziranih urea **19–22** (preuzeto sa <http://www.swissadme.ch/>)

Iz podataka prikazanih na Slici 9. i u Tablici 8. može se iščitati da novosintetizirane uree **19–21** zadovoljavaju parametre lipofilnosti, polarnosti i netopljivosti. Jedini spoj čija je fleksibilnost u optimalnom rasponu je urea **22**, međutim isti spoj pokazuje znatno veće odstupanje od optimalnog raspona u vidu nezasićenosti. Isto tako, odstupanje parametra nezasićenosti pokazuju i ostale tri uree, ali u nešto manjoj mjeri. Također, povećana molekulska masa spoja **19** može neznatno utjecati na smanjenje oralne bioraspodjelivosti.

Tijekom farmakokinetičkih istraživanja analizira se, među ostalim, prolazak lijeka kroz različite membrane te njegova distribucija u tkivima. Biološka svojstva djelatne tvari, poput sposobnosti prolaska kroz membranu gastrointestinalnog trakta, odnosno njezina permeabilnost i topljivost, usko su povezana s oralnom bioraspoloživošću. Lijek koji se uspješno apsorbira kroz gastrointestinalnu membranu obično ima visoku oralnu bioraspoloživost, dok onaj koji teško prolazi kroz nju ima smanjenu bioraspoloživost kada se uzima oralno. Osim prelaska kroz membranu i topljivosti, na oralnu bioraspoloživost može utjecati i prisutnost efluksnih sustava. Primjer značajnog efluksnog proteina u gastrointestinalnom traktu je P-glikoprotein, koji također igra ulogu i u KMB. Može utjecati na distribuciju lijeka u mozak i njegove potencijalne štetne učinke na središnji živčani sustav putem regulacije prijelaza KMB.

Nadalje, tijekom rane faze farmakokinetičkih ispitivanja bitno je predvidjeti koje metaboličke reakcije mogu utjecati na sintetiziranu molekulu. Također, važno je procijeniti utjecaj na enzime CYP P450, ključnu skupinu enzima u metabolizmu mnogih lijekova. Novosintetizirana molekula može djelovati kao induktor određenog enzima CYP, što može smanjiti djelovanje drugog lijeka koji se metabolizira putem istog enzima. S druge strane, ako molekula djeluje kao inhibitor određenog enzima CYP, može se povećati količina lijeka koji ostaje nepromijenjen, što može rezultirati produljenim zadržavanjem lijeka u organizmu i toksičnim učincima. Podatci o distribuciji i metabolizmu sintetiziranih urea predviđeni alatom SwissADME prikazani su u Tablici 9.

**Tablica 9.** Predviđena farmakokinetička svojstva novosintetiziranih urea **19–22** izračunatih pomoću web alata SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch))

<b>Spoj</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>
<b>GIT apsorpcija</b>	Visoka	Visoka	Visoka	Visoka
<b>Prolazak KMB</b>	Ne	Ne	Ne	Ne
<b>Supstrat P-gp</b>	Da	Da	Da	Da
<b>Inhibitor CYP1A2</b>	Da	Da	Da	Da
<b>Inhibitor CYP2C19</b>	Da	Da	Da	Da
<b>Inhibitor CYP2C9</b>	Da	Da	Da	Ne
<b>Inhibitor CYP2D6</b>	Da	Da	Da	Da
<b>Inhibitor CYP3A4</b>	Da	Da	Da	Da

Iz Tablice 9 za spojeve **19–22** predviđa se jaka apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta što ih čini pogodnima za oralnu primjenu. Također, predviđeno je da niti jedan spoj ne prolazi KMB, stoga je vjerojatnost za neželjeno djelovanje na središnji živčani sustav minimalna. Nemogućnost prelaska KMB od važnosti je u vidu smanjenja nastanka nuspojava s obzirom da harmin posjeduje halucinogeno djelovanje. Također, alat SwissADME predviđa da su svi novosintetizirani spojevi supstrati P-glikoproteina što može ograničiti njihov unos iz lumena crijeva u epitel i cirkulaciju te iz cirkulacije u mozak. To svojstvo može negativno utjecati na oralnu biorasploživost, no inhibicijom prelaska KMB dodatno se može spriječiti nastanak neuroloških nuspojava. Nadalje, predviđa se da su sve novosintetizirane uree inhibitori većine najvažnijih CYP enzima te kao takvi nisu pogodni za istovremenu primjenu s lijekovima koji podliježu hepatskom metabolizmu putem CYP enzima.

U svrhu unaprjeđenja farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava urea poželjno bi bilo strukturno ih optimizirati. Potencijal inhibicije CYP enzima, koji posjeduju sve novosintetizirane uree, nepoželjno je svojstvo koje smanjuje njihov terapijski potencijal i povećava vjerojatnost neželjenih interakcija s drugim lijekovima. Također, uree su supstrati P-glikoproteina što može uzrokovati smanjenje biorasploživosti, kompleksnu farmakokinetiku te razvoj rezistencije prema terapiji. Uvođenjem strukturnih modifikacija može se doskočiti tim problemima. Jedna od strategija kojom se može izbjeći inhibicija CYP enzima je uvođenje novih skupina koje sterički onemogućuju interakciju elektronima bogatih aromatskih prstenova hibridnih urea sa kationom u aktivnom središtu enzima (Zaragoza Dorwald, 2012). Strateškim uvođenjem novih skupina također se može onemogućiti vezanje uree za P-glikoprotein. Daljnjom optimizacijom strukture može se postići povećanje sigurnosti primjene, predvidljiva farmakokinetička svojstva i kompatibilnost s drugim lijekovima, što je osobito važno u složenim terapijskim protokolima gdje pacijenti moraju istovremeno uzimati više lijekova kao što je slučaj s onkološkim bolesnicima.

## **5. ZAKLJUČAK**

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija novih hibridnih urea harmina i klorokina koje do sada nisu opisane u literaturi. Sinteza i karakterizacija provedene su na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu unutar uspostavnog istraživačkog projekta prof. Rajić Derivati harmina kao potencijalni antimalarici.

Sintetizirani i karakterizirani su sljedeći spojevi:

- $N^1$ -(7-klorkinolin-4-il)etan-1,2-diamin (**1**)
- 1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-(1-metil-7-metoksi-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)urea (**19**)
- 1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)urea (**20**)
- 1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)urea (**21**)
- 1-(2-((7-klorkinolin-4-il)amino)etil)-3-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il)metil)urea (**22**)

Novosintetiziranim spojevima **1** i **19–22** potvrđena je struktura standardnim analitičkim i spektroskopskim tehnikama (temperature tališta, FTIR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR).

Korištenjem alata programa SwissADME, na temelju strukture urea **19–22** predviđeni su fizikalno-kemijski parametri svojstava poželjnih za lijekove, s naglaskom na oralnu bioraspoloživost. Prema rezultatima programa *Bioavailability radar*, novosintetizirane uree pokazuju potencijalno visoku oralnu bioraspoloživost, uz mogućnost da budu supstrati P-glikoproteina i inhibitori enzima CYP zbog čega je novosintetiziranim ureama potrebno optimirati strukture kako bi potencijalno mogle postati potentni i sigurni lijekovi za liječenje još uvijek kompleksnih i izazovnih bolesti poput raka i malarije.

U daljnjim istraživanjima koja su u tijeku ispituje se citostatsko i antimalarijsko djelovanje novosintetiziranih spojeva, no ista prelaze okvire ovoga rada.

## **6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA**



A498	humana stanična linija renalnog tumora
ACT	kombinirana terapija temeljena na artemisininu
ADMA	acetaldehid dimetil acetal
ADMP	2-azido-1,3-dimetilimidazolinijev heksafluorofosfat
BCRP	protein rezistencije tumora dojke
Boc	<i>tert</i> -butoksikarbonil
BRAF	mutacija na ljudskom genu <i>braf</i> koji kodira protein B-Raf
BtH	benzotriazol
CCRF-CEM	humana stanična linija leukemije
CD	klaster diferencijacije
CDI	1,1'-karbonildiimidazol
CDK	kinaza ovisnih o ciklinima
CL1-0 i CL1-5	humana stanična linija adenokarcinoma pluća
CYP	enzimski sustav citokroma P450
DBU	1,8-diazabiciklo(5.4.0)undek-7-en
DCM	diklormetan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DYRK	dvojno specifična kinaza
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
H1299	humana stanična linija raka pluća s ne-malih stanica
H460	humana stanična linija raka pluća s ne-malih stanica
HCT116	humana stanična linija kolorektalnog karcinoma

Hek293T	humana ne-tumorska stanična linija bubrega
HepG2	humana stanična linija raka jetre
HPLC-MS/MS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s tandemnom masenom spektrometrijom
HT-29	humana stanična linija kolorektalnog karcinoma
IL	interleukin
KMB	krvno-moždana barijera
MCF10A	humana stanična linija adenokarcinoma dojke
MCF-7	humana stanična linija adenokarcinoma dojke
MDR	višestruka rezistencija na lijekove
MHC	glavni kompleks histokompatibilnosti
MS	masena spektrometrija
MX-1	humana stanična linija raka dojke
NFκB	nuklearni faktor κB
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PC-3	humana stanična linija raka prostate
RA	reumatoidni artritis
Ro5	pravilo 5, engl. <i>rule of five</i>
ROS	reaktivne kisikove vrste
SGC-7901	humana stanična linija raka želuca
SLE	sistemska eritemski lupus
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TBAHS	tetrabutilamonijev hidrogensulfat
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctena kiselina

TK10	humana stanična linija renalnog tumora
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TNF	faktor nekroze tumora
$t_i$	temperatura tališta
UACC62	humana stanična linija melanoma

## **7. LITERATURA**

- Aaghaz S, Sharma K, Jain R, Kamal A.  $\beta$ -Carbolines as potential anticancer agents. *Eur J Med Chem*, 2021, 216, 113321.
- Browning DJ. Pharmacology of chloroquine and hydroxychloroquine. U: Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy. New York, Springer, 2014, str. 35-63.
- Butula I, Proštenik MV, Vela V. Reactions with 1-benzotriazolecarboxylic acid chloride. I. Synthesis of the 2,6-bis(hydroxymethyl)pyridinedicarbamates. *Croat Chem Acta*, 1977, 49, 837–842.
- Chibale K, Ojima I, Haupt H, Geng X, Pera P, Bernacki RJ. Modulation of human mammary cell sensitivity to paclitaxel by new quinoline sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11, 2457-2460.
- Dirice E, Walpita D, Vetere A, Meier BC, Kahraman S, Hu J, Dančik V, Burns SM, Gilbert TJ, Olson DE, Clemons PA, Kulkarni RN, Wagner BK. Inhibition of DYRK1A Stimulates Human  $\beta$ -Cell Proliferation. *Diabetes*, 2016, 65,1660-71.
- Duarte D, Vale N. New trends for antimalarial drugs: synergism between antineoplastics and antimalarials on breast cancer cells. *Biomolecules*, 2020, 10, 1623.
- Eagon, S, Anderson MO. Microwave-assisted synthesis of tetrahydro- $\beta$ -carbolines and  $\beta$ -carbolines. *Eur J Org Chem*, 2014, 1653-1665.
- Esparza-Ruiz A, Herrmann C, Chen J, Patrick BO, Polishchuk E, Orvig C. Synthesis and in vitro anticancer activity of ferrocenyl-aminoquinoline-carboxamide conjugates. *Inorganica Chimica Acta*, 2012, 393, 276-283.
- European Medicines Agency, EU/3/14/1377: Orphan designation for the treatment of glioma, 2014., <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu3141377>, pristupljeno 13.08.2023.
- Fong W, To KKW. Repurposing chloroquine analogs as an adjuvant cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2021, 16, 204-221.
- Fortin S, Bérubé G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov*, 2013, 8, 1029-47.

- Frédéric R., Bruyère C, Vancraeynest C, Reniers J, Meinguet C, Pochet L, Backlund A, Masereel B, Kiss R, Wouters J. Novel trisubstituted harmine derivatives with original *in vitro* anticancer activity. *J Med Chem*, 2012, 55, 6489–6501.
- Gediya LK, Njar VCO. Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov*, 2009, 4, 1099-1111.
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Incidencija raka u Hrvatskoj 2020., Bilten 45, 2022., <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2022/11/Bilten-Incidencija-raka-u-Hrvatskoj-2020.-godine.pdf>
- Hu C, Solomon VR, Cano P, Lee H. A 4-aminoquinoline derivative that markedly sensitizes tumor cell killing by Akt inhibitors with a minimum cytotoxicity to non-cancer cells. *Eur J Med Chem*, 2010, 45, 705-709.
- Jiang N, Zhai X, Chen Z, Liang C, Sun C, Han J, Gong P. Design, synthesis and cytotoxicity of novel 2-arylvinyl-4-aminoquinoline derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2012, 60, 659-664.
- Kakadiya R, Dong H, Kumar A, Narsinh D, Zhang X, Chou TC, Lee TC, Shah A, Su TL. Potent DNA-directed alkylating agents: Synthesis and biological activity of phenyl N-mustard-quinoline conjugates having a urea or hydrazinecarboxamide linker. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18, 2285-2299.
- Krafts K, Hempelmann E, Skórska-Stania A. From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitol Res*, 2012, 111, 1-6.
- Li J, Long J, Zhang J, Liu N, Yan B, Tang L, Chen X, Peng C. Novel chloroquine derivative suppresses melanoma cell growth by DNA damage through increasing ROS levels. *J Cell Mol Med*, 2022, 26, 2579-2593.
- Liu P, Li H, Wang Y, Su X, Li Y, Yan M, Ma L, Che H. Harmine Ameliorates Cognitive Impairment by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Enhancing the BDNF/TrkB Signaling Pathway in STZ-Induced Diabetic Rats. *Front Pharmacol*. 2020, 11, 535.
- 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*, 2017, 489, 332-338.

- 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.
- Lombard MC, N'Da DD, Breytenbach JC, Kolesnikova NI, Tran Van Ba C, Wein S, Norman J, Denti P, Vial H, Wiesner H. Antimalarial and anticancer activities of artemisinin–quinoline hybrid-dimers and pharmacokinetic properties in mice. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47, 834-841.
- Mancuso RI, Foglio MA, Olalla Saad ST. Artemisinin-type drugs for the treatment of hematological malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2021, 87, 1-22.
- Manohar S, Pepe A, Vélez Gerena CE, Zayas B, Malhotra SV, Rawat DS. Anticancer activity of 4-aminoquinoline-triazine based molecular hybrids. *RSC Advances*, 2014, 4, 7062-7067.
- Marinović M, Perković I, Fontinha D, Prudêncio M, Held J, Pessanha de Carvalho L, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić Z. Novel harmicines with improved potency against *Plasmodium*. *Molecules*, 2020, 25, 4376.
- Marinović M, Poje G, Perković I, Fontinha D, Prudêncio M, Held J, Pessanha de Carvalho L, Tandarić T, Vianello R, Rajić Z. Further investigation of harmicines as novel antiplasmodial agents: Synthesis, structure-activity relationship and insight into the mechanism of action. *Eur J Med Chem*, 2021, 224, 113687.
- Marinović M, Rimac H, de Carvalho LP, Rôla C, Santana S, Pavić K, Held J, Prudêncio M, Rajić Z. Design, synthesis and antiplasmodial evaluation of new amide-, carbamate-, and ureido-type harmicines. *Bioorg Med Chem*, 2023, 94, 117468.
- Montenegro RC, Lotufo LV, de Moraes MO, Pessoa Cdo Ó, Rodrigues FA, Bispo Mde L, Cardoso LN, Kaiser CR, de Souza MV. Synthesis and antitumoral evaluation of 7-chloro-4-quinolinylhydrazones derivatives. *Med Chem*, 2011, 7, 599-604.
- Muller R. Systemic toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine: prevalence, mechanisms, risk factors, prognostic and screening possibilities. *Rheumatol Int*, 2021, 41, 1189-1202.

- Murati T, Drenški M, Miletić M, Kmetič I. Molekularni mehanizmi i morfološka obilježja autofagije. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 2022, 17, 65-71.
- N'Da DD, Smith PJ. Synthesis, in vitro antiplasmodial and antiproliferative activities of a series of quinoline–ferrocene hybrids. *Med Chem Res*, 2014, 23, 1214–1224.
- National Library of Medicine, ClinicalTrials.gov, 2023., <https://www.clinicaltrials.gov/>, pristupljeno 02.08.2023.
- Parvathaneni V, Kulkarni NS, Muth A, Gupta V. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug Discov Today*, 2019, 24, 2076-2085.
- Pavić K, Rajić Z, Mlinarić Z, Uzelac L, Kralj M, Zorc B. Chloroquine urea derivatives: synthesis and antitumor activity *in vitro*. *Acta Pharm*, 2018, 68, 471-483.
- Perković I, Beus M, Schols D, Persoons L, Zorc B. Itaconic acid hybrids as potential anticancer agents. *Mol Divers*, 2022, 26, 1–14.
- Plantone D, Koudriavtseva T. Current and future use of chloroquine and hydroxychloroquine in infectious, immune, neoplastic, and neurological diseases: A mini-review. *Clin Drug Investig*, 2018, 38, 653-671.
- Poje G, Marinović M, Pavić K, Mioč M, Kralj M, de Carvalho LP, Held J, Perković I, Rajić Z. Harmicens, novel harmine and ferrocene hybrids: Design, synthesis and biological activity. *Int. J. Mol. Sci*, 2022, 23, 9315.
- Poje G, Pessanha de Carvalho L, Held J, Moita D, Prudêncio M, Perković I, Tandarić T, Vianello R, Rajić Z. Design and synthesis of harmiquins, harmine and chloroquine hybrids as potent antiplasmodial agents. *Eur J Med Chem*, 2022, 238, 114408.
- Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Guilliams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18, 41-58.
- Rawe SL, McDonnell C. Chapter 3 – The cinchona alkaloids and the aminoquinolines. U: *Antimalarial Agents*, Patrick GL, urednik, Edinburgh, Škotska, Elsevier, 2020, 65-98.
- Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*, 2016, 53, 441-442.



- Shaveta, Mishra S, Singh P. Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals. *Eur J Med Chem*, 2016, 124, 500-536.
- Srivastava V, Lee H. Chloroquine-based hybrid molecules as promising novel chemotherapeutic agents. *Eur J Pharmacol*, 2015, 762, 472-486.
- SwissADME, 2023., <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 17.9.2023.
- Tariq M, Al-Badr AA. Chloroquine. U: Analytical profiles of drug substances, Volume 13. Florey K, urednik, New Jersey, Academic Press, 1984, 95-125.
- Thomé R, Lopes SC, Costa FT, Verinaud L. Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. *Immunol Lett*, 2013, 153, 50-7.
- Vanderesse R, Colombeau L, Frochot C, Acherar S. Inactivation of malaria parasites in blood: pdt vs inhibition of hemozoin formation. U: Current topics in malaria. Rodriguez-Morales AJ, urednik, Ujedinjeno Kraljevstvo, InTech, 2016. uz dopuštenje izdavača prema CC BY 3.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.
- 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 KW, Mitro N, Pei L, Damoiseaux R, Wilpitz DC, Reue K, Saez E, Tontonoz P. The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPARgamma expression. *Cell Metab*, 2007, 5, 357-70.
- Wong SK. Repurposing new use for old drug chloroquine against metabolic syndrome: A review on animal and human evidence. *Int J Med Sci*, 2021, 18, 2673-2688.
- World Health Organisation, Cancer, 2022., <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>, pristupljeno 23.08.2023.
- Woźniacka A. Antimalarials – old drugs are new again. *Postepy Dermatol Alergol*, 2022, 39, 239-244.
- Zaragoza Dorwald F. Lead optimization for medicinal chemists. Weinheim, Njemačka, Wiley-VCH, 2012, str. 16-17.

Zhang L, Li D, Yu S. Pharmacological effects of harmine and its derivatives: a review. *Arch Pharm Res*, 2020, 43, 1259-1275.

Zorc B. Klorokin i hidrosiklorokin u terapiji karcinoma. *Farm Glas*, 2021, 77, 553-580.

## **8. SAŽETAK/SUMMARY**

Ovaj diplomski rad nastavak je istraživanja na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje obuhvaća dizajniranje, sintezu i ispitivanje biološkog djelovanja derivata harmina s mogućim antimalarijskim i/ili citostatskim učinkom. Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija novih hibrida klorokina i harmina, spajanjem klorokinskog amina **1** s primarnim aminima (**3**, **8**, **13** i **18**) temeljenim na  $\beta$ -karbolinskom alkaloidu harminu pomoću uree kao poveznice. Sinteza je započeta sintezom pojednostavljenog derivata klorokina, amina **1**. Harminski derivati, amini **3** i **8** dobiveni su iz harmina, amin **13** iz 5-metoksitriptamina, a amin **18** iz metil-triptofanata. Sinteza urea provedena je korištenjem dviju metoda: korištenjem benotriazolida **5** (BtH metoda) ili *coupling* reagensa 1,1'-karbonildiimidazola (CDI metoda). Benzotriazolid harmina **5**, tzv. aktivna urea, dobivena je iz amina **3** i klorida 1-benzotriazol karboksilne kiseline (BtcCl, **4**), a aminolizom aktivne uree **5** pomoću amina **1** u bazičnim uvjetima dobivena je urea **19**. CDI metodom iz amina **8**, **13** ili **18** te amina **1** mehanizmom nukleofilne supstitucije sintetizirane su uree **20–22**.

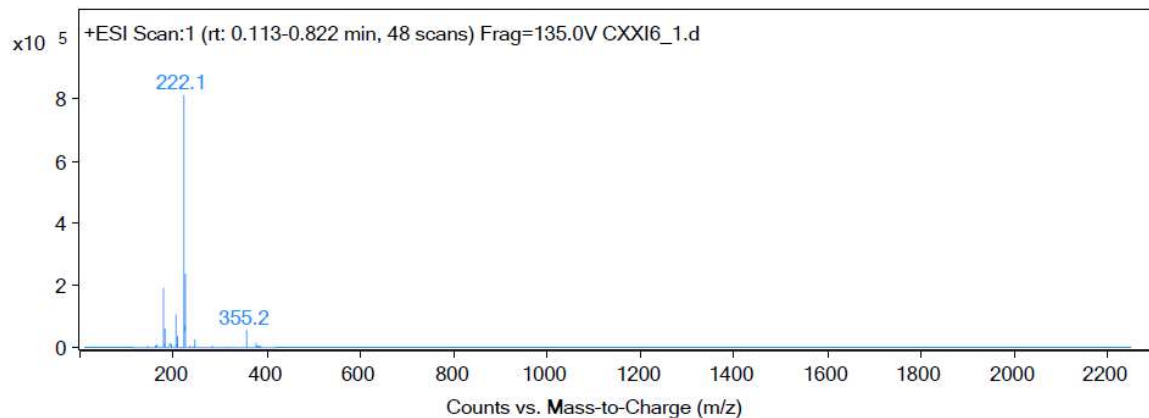
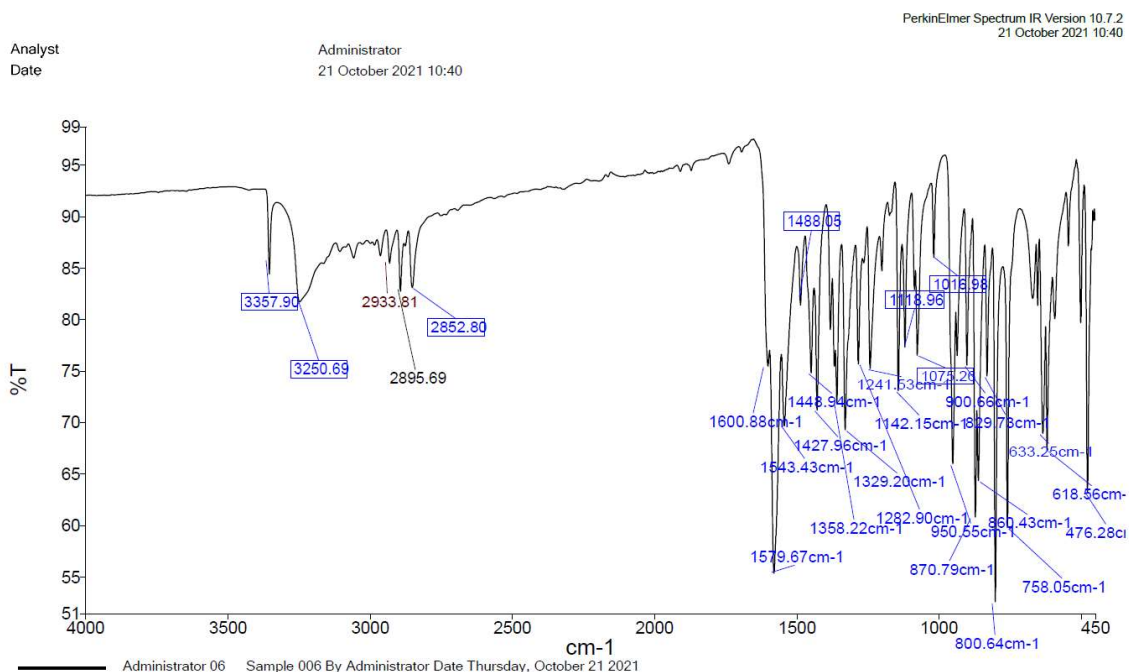
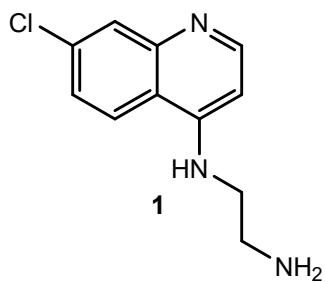
Novosintetizirani spojevi karakterizirani su standardnim analitičkim i spektroskopskim metodama: IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR i MS te im je određena temperatura tališta, a online platformom SwissADME predviđeni su fizikalno-kemijski parametri koji utječu na farmakokinetiku novosintetiziranih spojeva. Sva četiri konačna spoja gotovo potpuno zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila te im web alat SwissADME predviđa dobru oralnu bioraspoloživost. Međutim, uree **19–22** pokazale su se kao inhibitori CYP enzima te supstrati P-glikoproteina zbog čega je potrebna daljnja optimizacija strukture spojeva. U daljnjim istraživanjima koja su u tijeku ispituje se citostatsko i antimalarijsko djelovanje novosintetiziranih spojeva, no ista prelaze okvire ovoga rada.

This master's thesis is a continuation of research at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb. The research covers the design, synthesis, and evaluation of the biological activity of harmine derivatives with potential antimalarial and/or cytostatic activity. The aim of this master's thesis was the synthesis and characterization of novel chloroquine-harmine hybrids prepared by linking chloroquine amine **1** with primary amines (**3**, **8**, **13**, and **18**) based on the  $\beta$ -carboline alkaloid harmine using urea as a linker. The synthesis began with the preparation of a simplified chloroquine derivative, amine **1**. Harmine derivatives, amines **3** and **8**, were obtained from harmine, amine **13** from 5-methoxytryptamine, and amine **18** from methyl tryptophanate. Title ureas were obtained using either benzotriazole **5** (BtH method) or a coupling reagent 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI method). The harmine benzotriazolide **5** (active urea) was synthesized from amine **3** and 1-benzotriazole carboxylic acid chloride (BtcCl, **4**). Urea **19** was obtained by aminolysis of the active urea **5** with amine **1** under basic conditions. Ureas **20–22** were synthesized using the CDI method from amines **8**, **13**, or **18** and amine **1** through a mechanism of nucleophilic substitution.

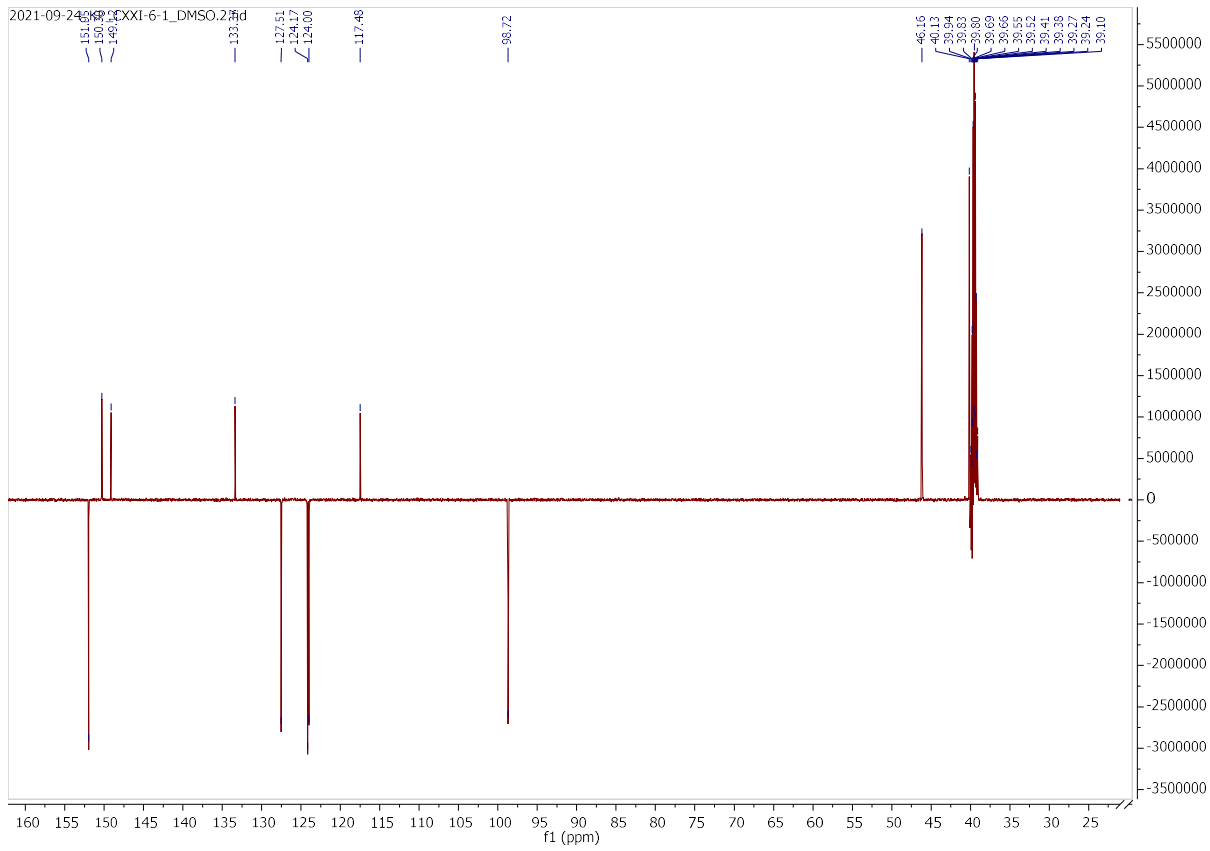
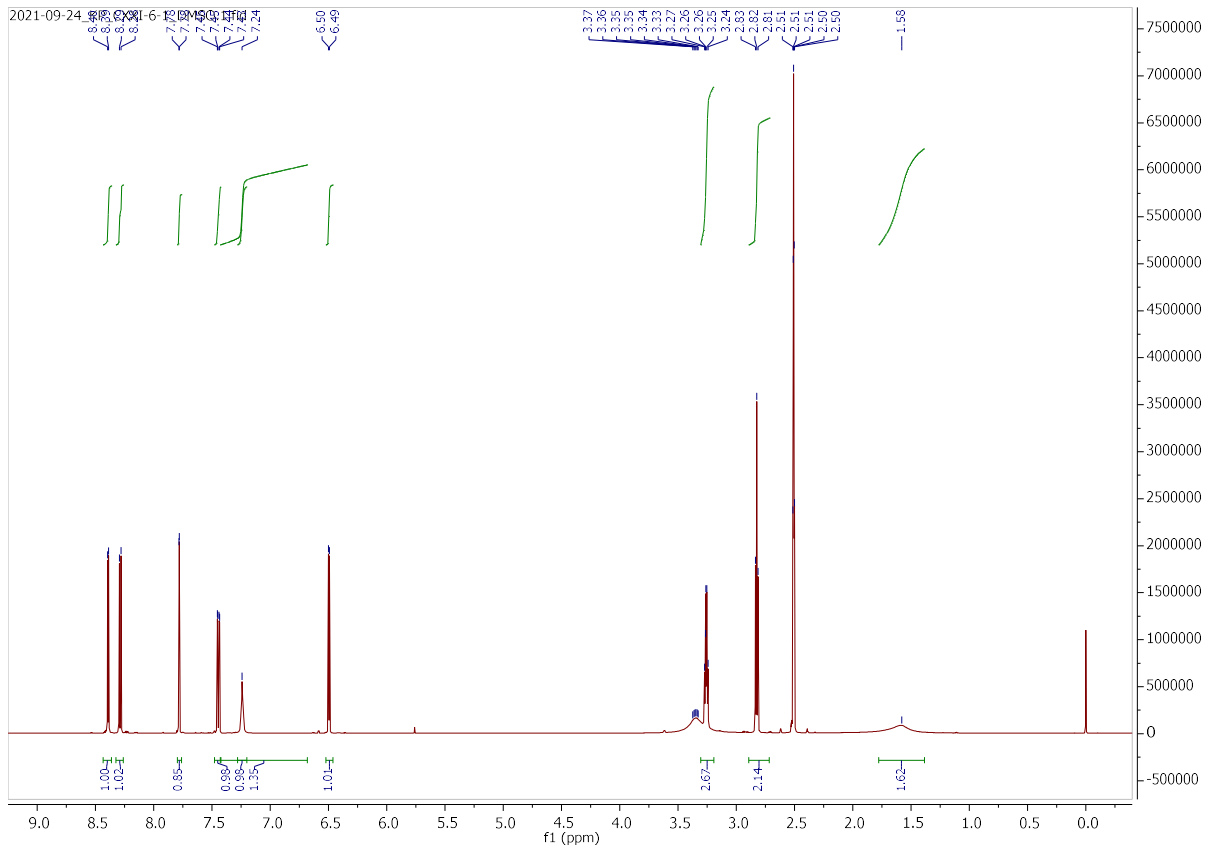
The newly synthesized compounds were characterized using standard analytical and spectroscopic methods: IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS. Their melting points were determined, and physicochemical parameters that could impact the pharmacokinetics of the newly synthesized compounds were predicted using the SwissADME online platform. All four final compounds mostly comply with Lipinski's and Veber's rules, and the SwissADME tool predicts good oral bioavailability. However, further optimization of the compounds' structures is necessary as ureas **19–22** have been found to inhibit CYP enzymes and act as P-glycoprotein substrates. Evaluation of the cytostatic and antimalarial activities of novel ureas is in progress, however, this is beyond the scope of this thesis.

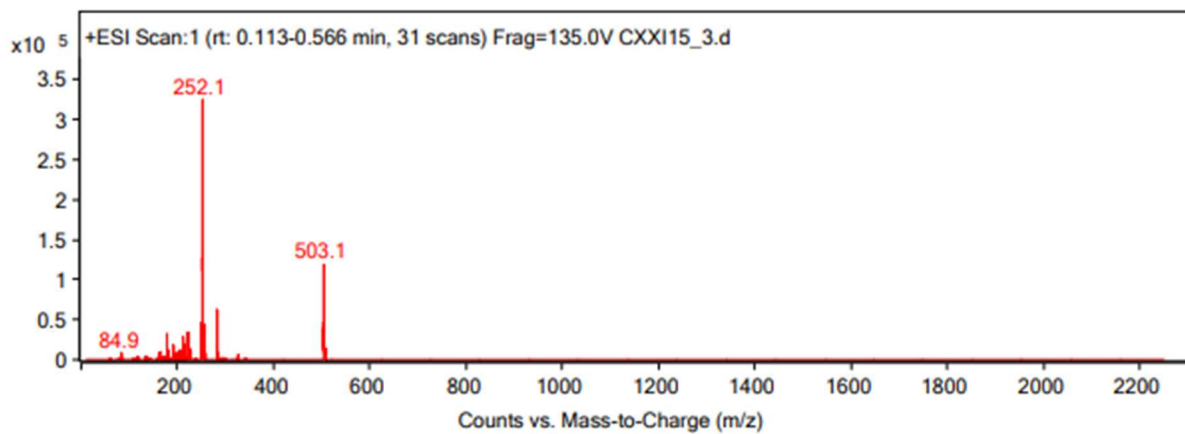
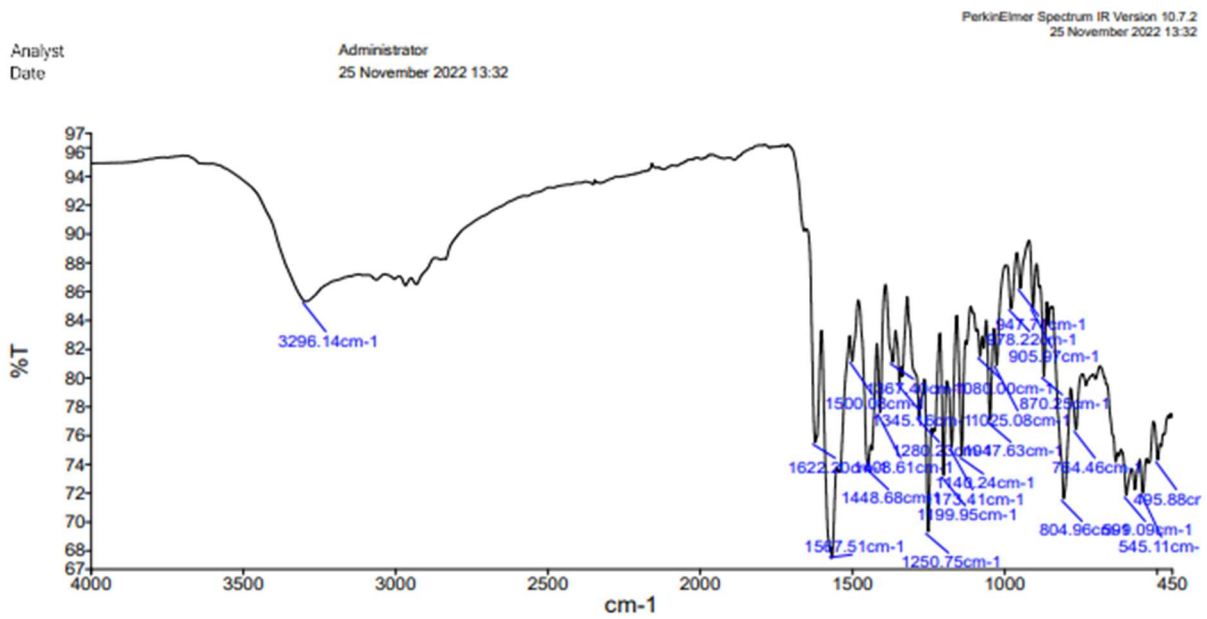
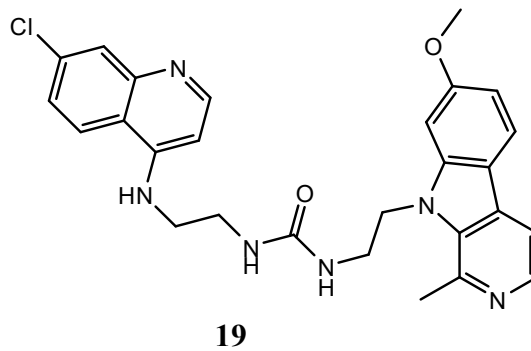
## **9. PRILOZI**

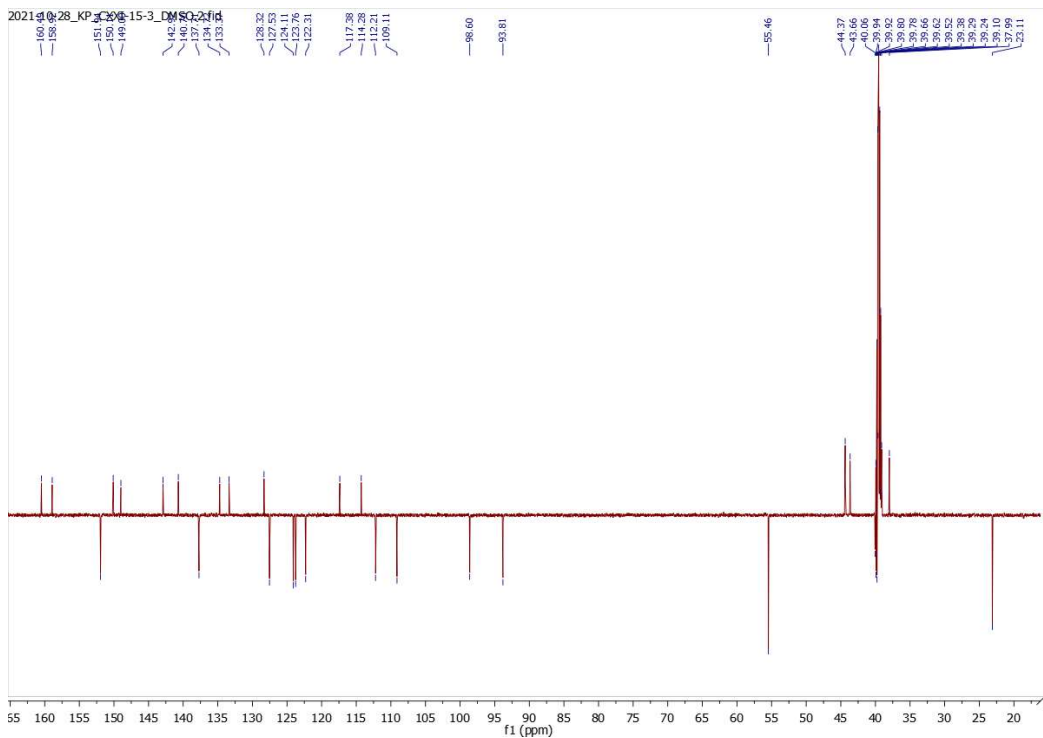
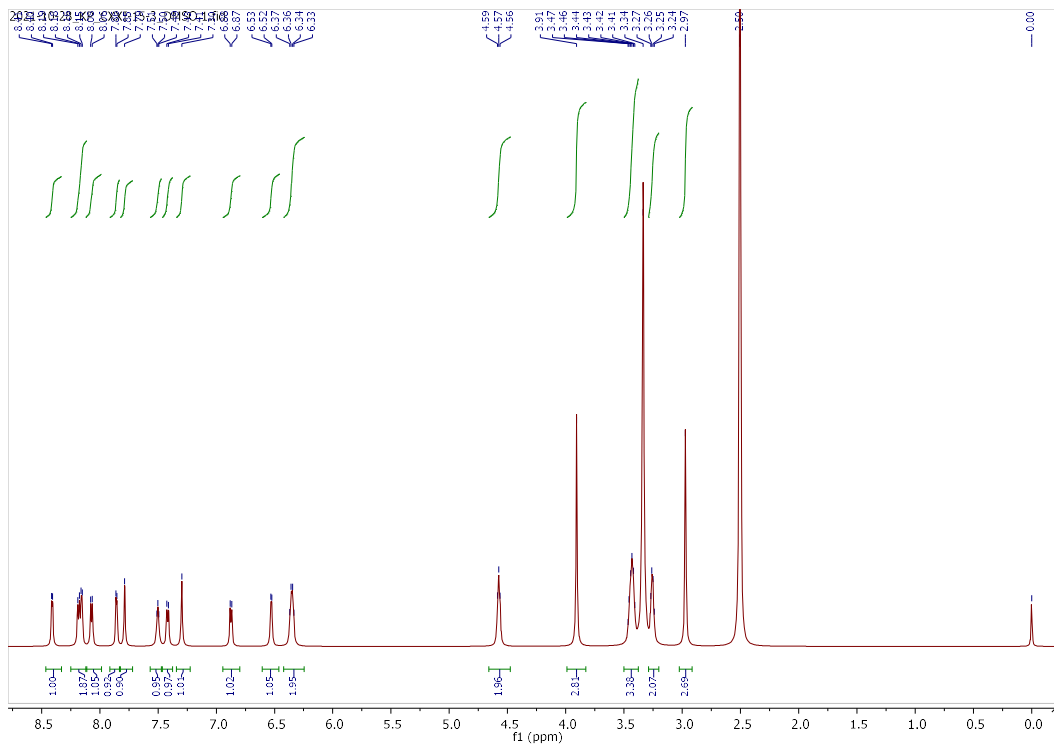
U prilogima su prikazani snimljeni IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jednog prekursora i krajnjih produkata.

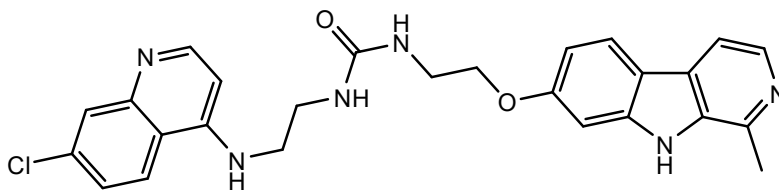








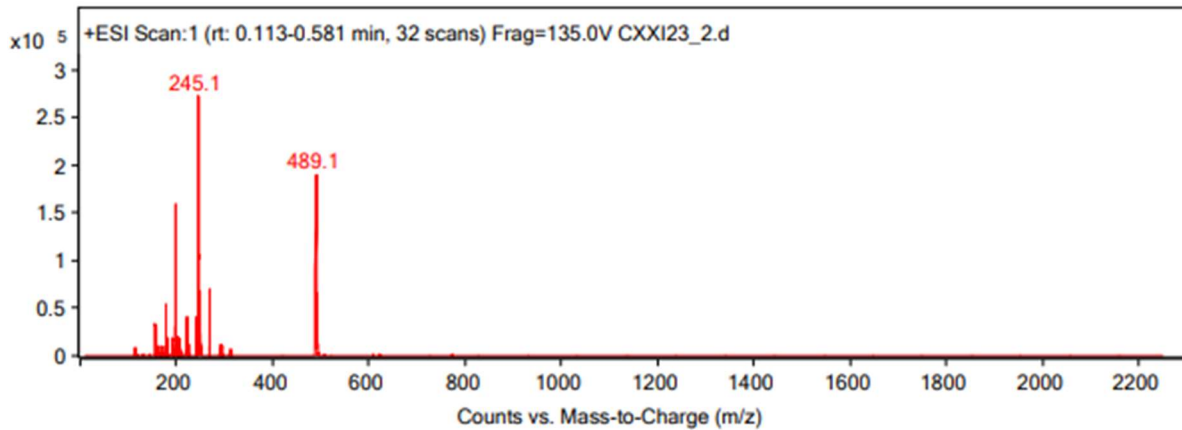
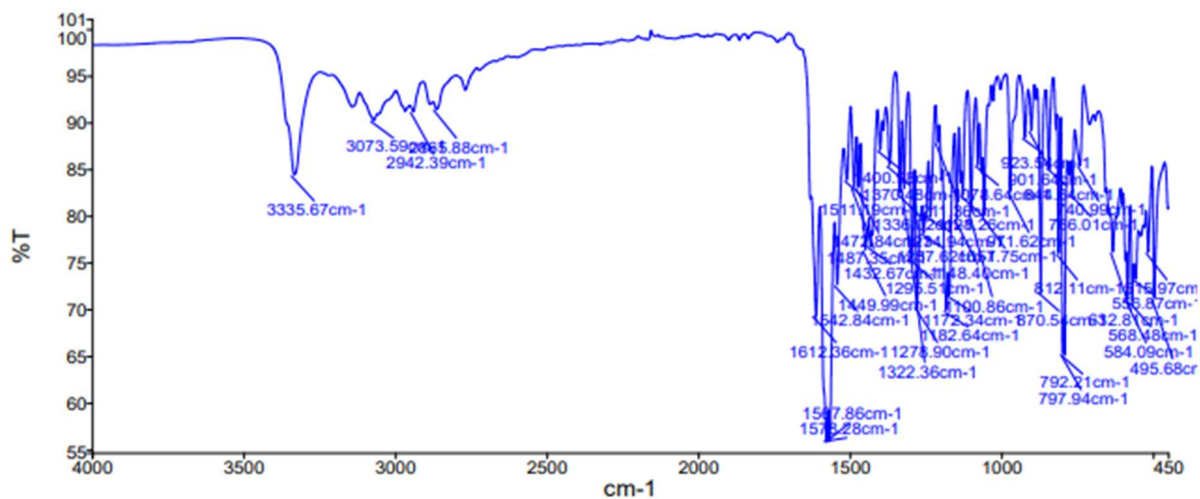




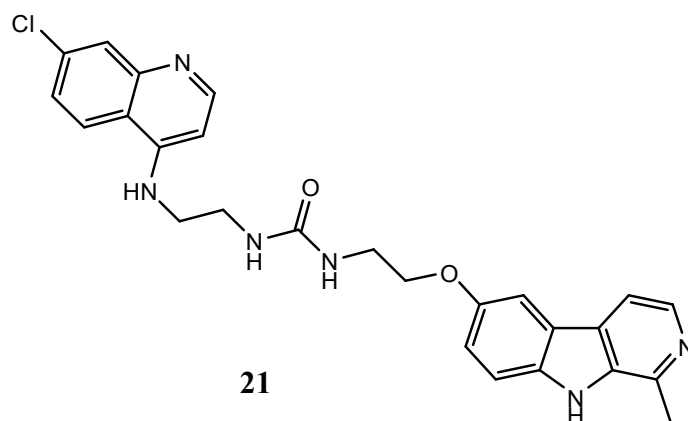
20

PerkinElmer Spectrum IR Version 10.7.2  
25 November 2022 13:41

Analyst Date Administrator  
25 November 2022 13:41

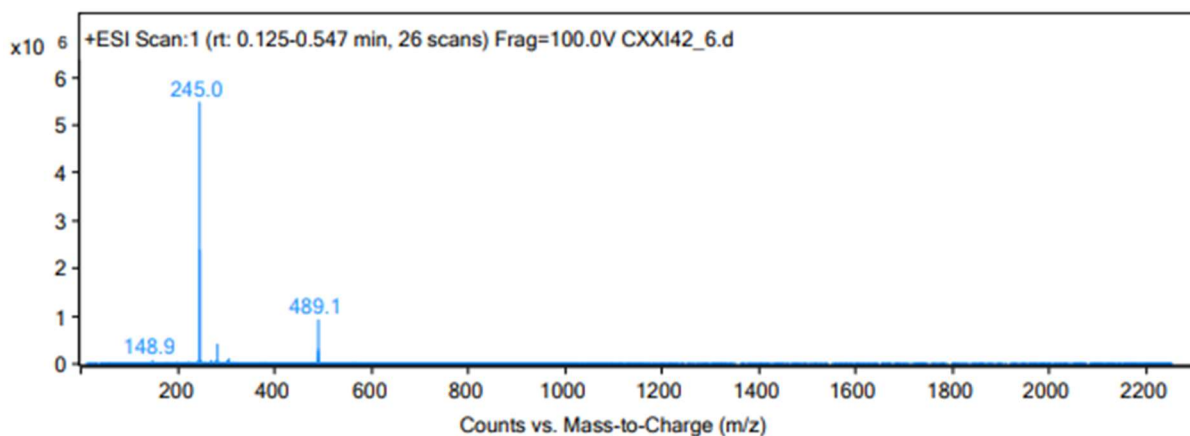
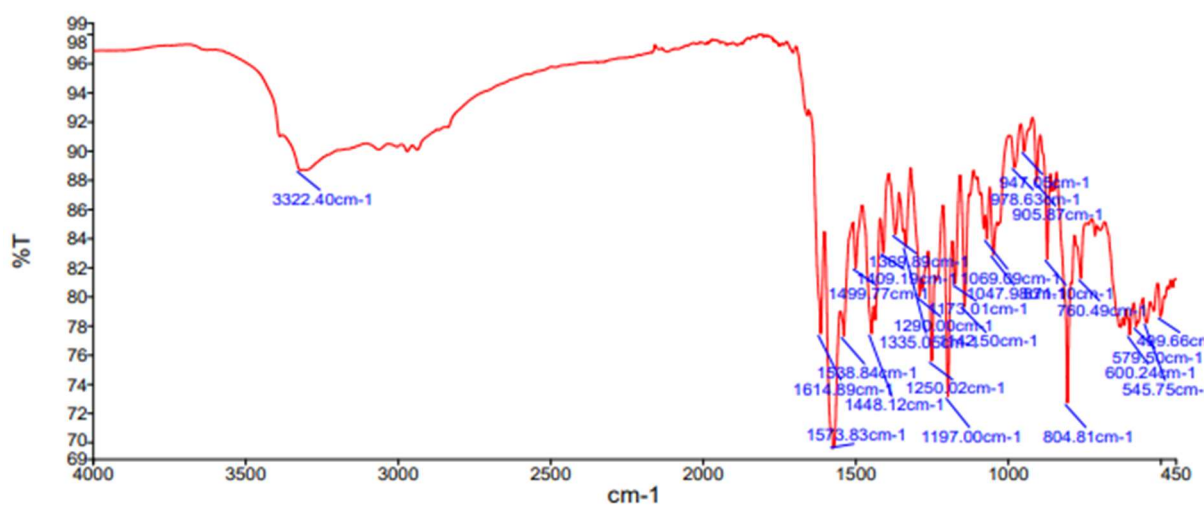


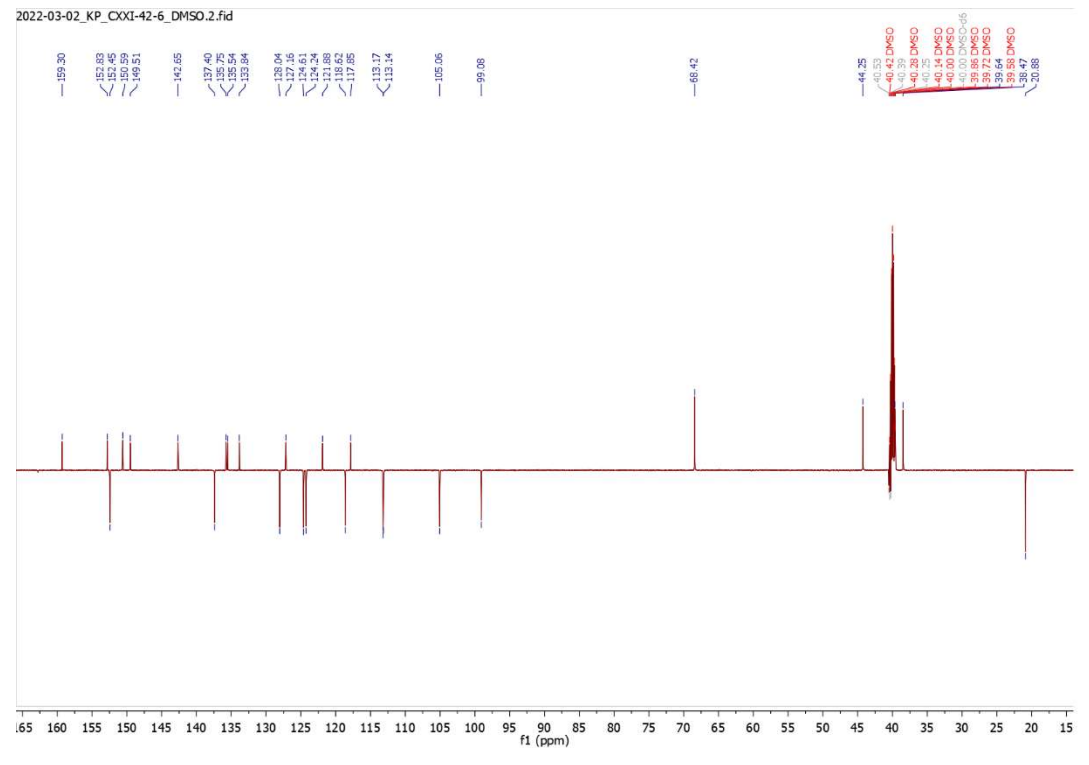
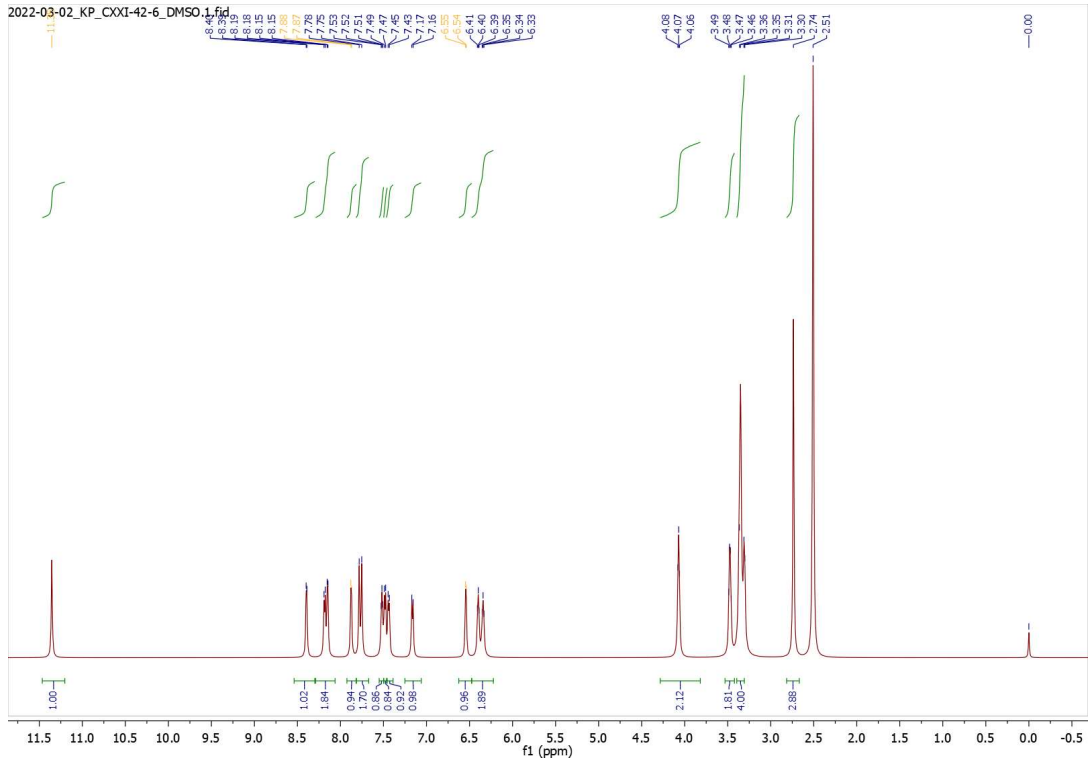


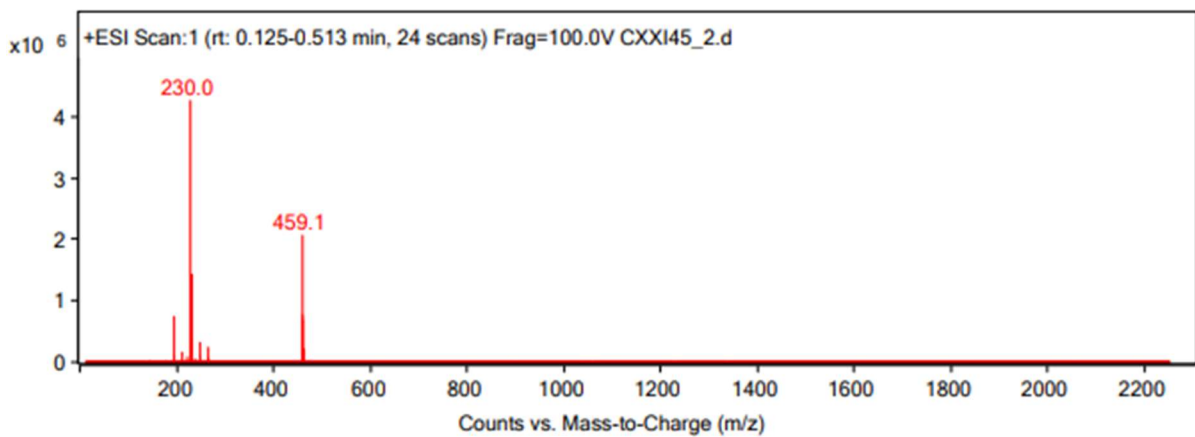
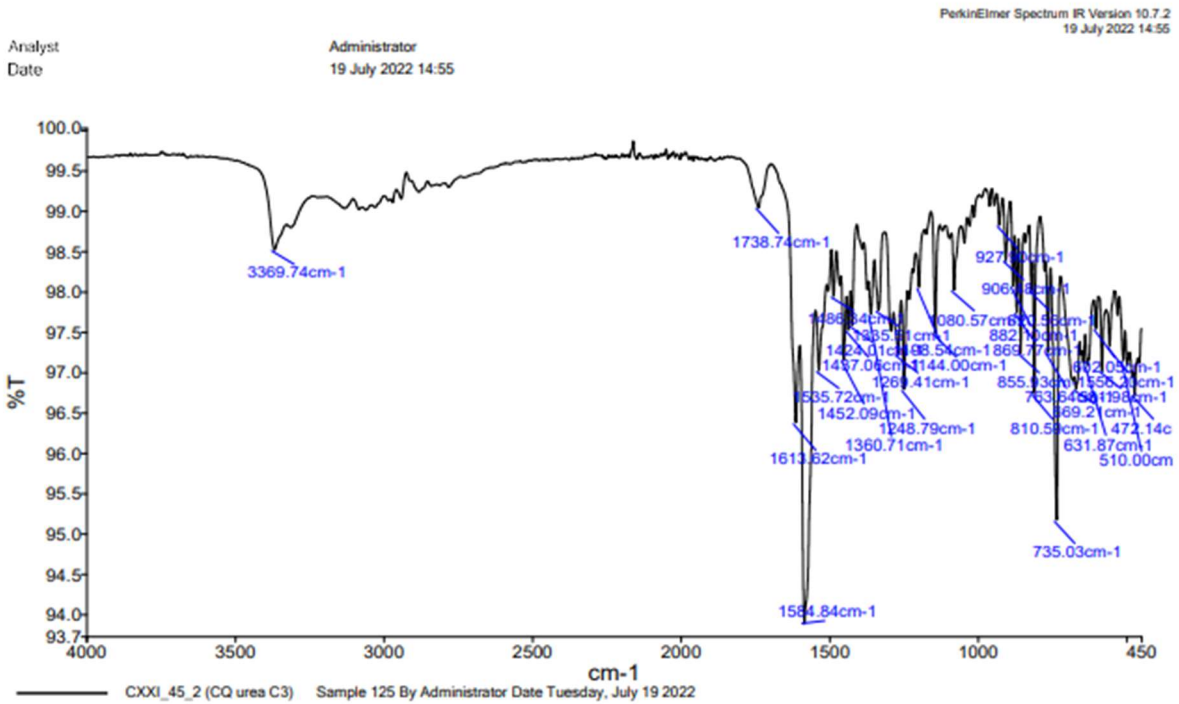
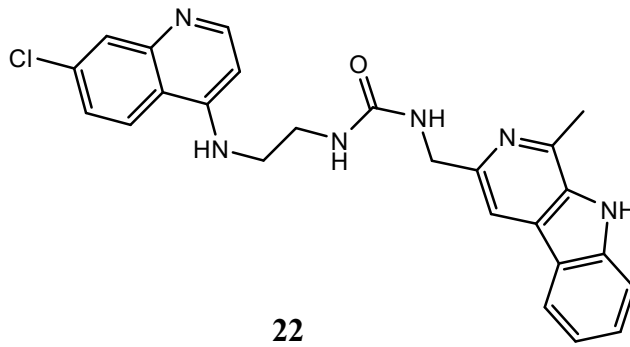


PerkinElmer Spectrum IR Version 10.7.2  
25 November 2022 13:36

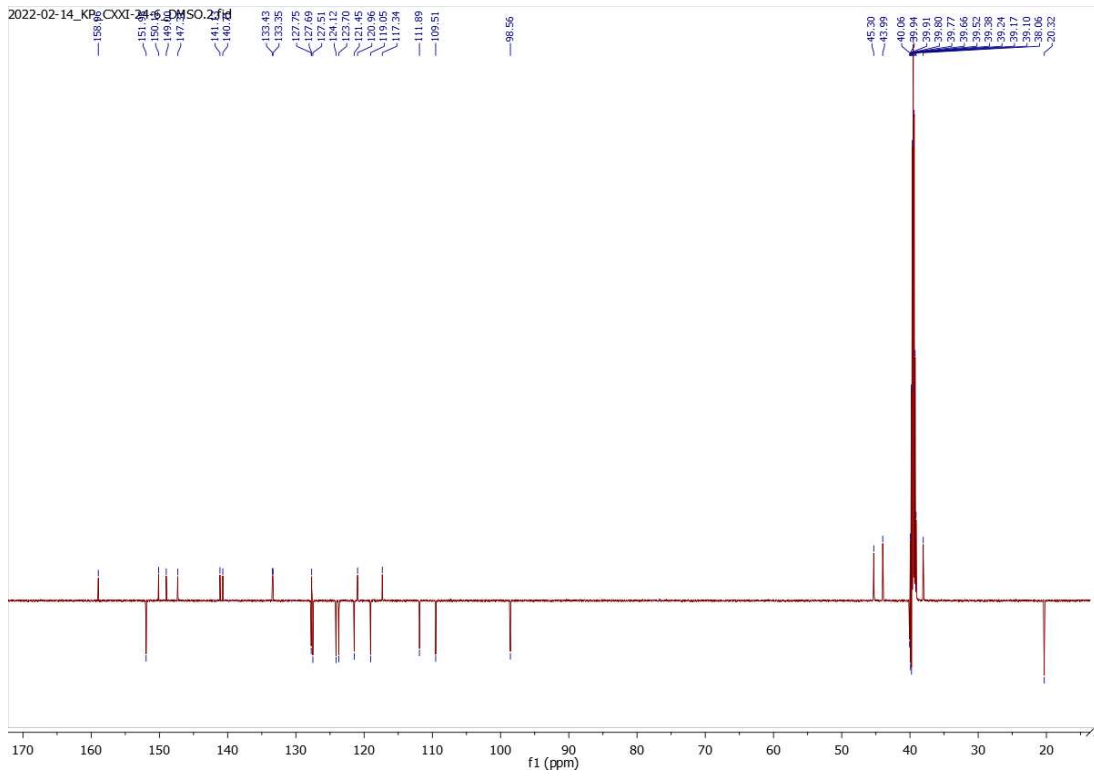
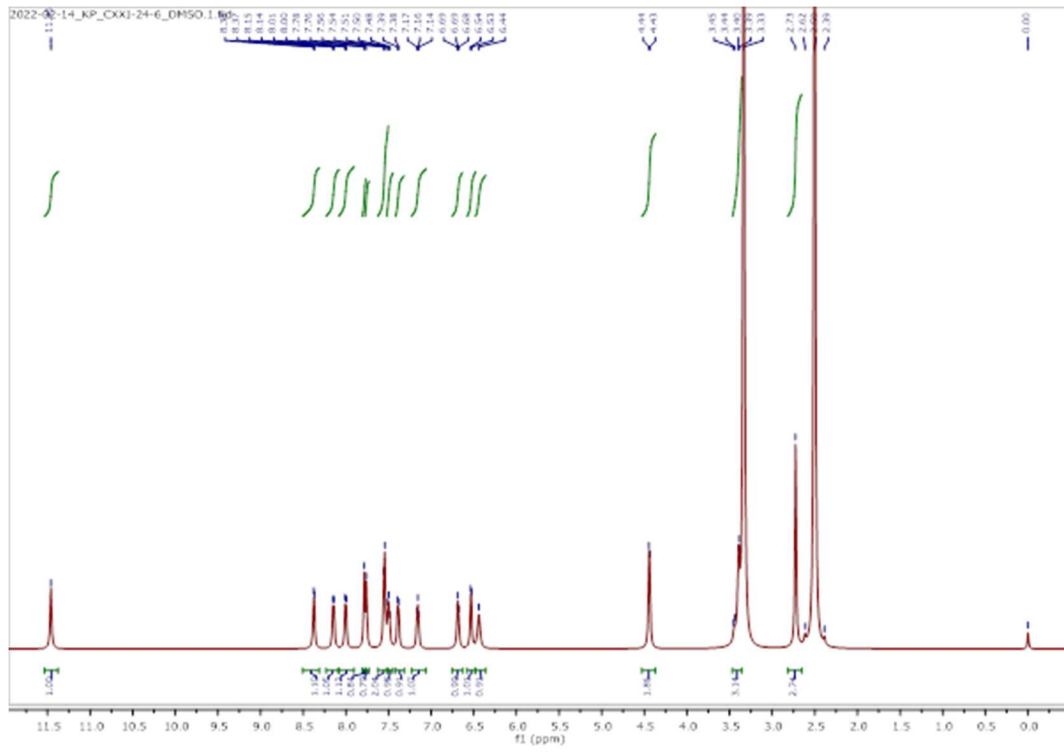
Analyst Date Administrator  
25 November 2022 13:36











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

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### SINTEZA I KARAKTERIZACIJA NOVIH HIBRIDNIH UREA HARMINA I KLOROKINA

Ankica Pezo

#### SAŽETAK

Ovaj diplomski rad nastavak je istraživanja na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje obuhvaća dizajniranje, sintezu i ispitivanje biološkog djelovanja derivata harmina s mogućim antimalarijskim i/ili citostatskim učinkom. Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija novih hibrida klorokina i harmina, spajanjem klorokinskog amina **1** s primarnim aminima (**3**, **8**, **13** i **18**) temeljenim na  $\beta$ -karbolinskom alkaloidu harminu pomoću uree kao poveznice. Sinteza je započeta sintezom pojednostavljenog derivata klorokina, amina **1**. Harminski derivati, amini **3** i **8** dobiveni su iz harmina, amin **13** iz 5-metoksitriptamina, a amin **18** iz metil-triptofanata. Sinteza urea provedena je korištenjem dviju metoda: korištenjem benotriazolida **5** (BtH metoda) ili *coupling* reagensa 1,1'-karbonildiimidazola (CDI metoda). Benotriazolid harmina **5**, tzv. aktivna urea, dobivena je iz amina **3** i klorida 1-benzotriazol karboksilne kiseline (BtcCl, **4**), a aminolizom aktivne uree **5** pomoću amina **1** u bazičnim uvjetima dobivena je urea **19**. CDI metodom iz amina **8**, **13** ili **18** te amina **1** mehanizmom nukleofilne supstitucije sintetizirane su uree **20–22**.

Novosintetizirani spojevi karakterizirani su standardnim analitičkim i spektroskopskim metodama: IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR i MS te im je određena temperatura tališta, a online platformom SwissADME predviđeni su fizikalno-kemijski parametri koji utječu na farmakokinetiku novosintetiziranih spojeva. Sva četiri konačna spoja gotovo potpuno zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila te im web alat SwissADME predviđa dobru oralnu bioraspoloživost. Međutim, uree **19–22** pokazale su se kao inhibitori CYP enzima te supstrati P-glikoproteina zbog čega je potrebna daljnja optimizacija strukture spojeva. U daljnjim istraživanjima koja su u tijeku ispituje se citostatsko i antimalarijsko djelovanje novosintetiziranih spojeva, no ista prelaze okvire ovog rada.

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

Rad sadrži: 90 stranica, 19 grafičkih prikaza, 9 tablica i 56 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Harmin, klorokin, molekulska hibridizacija, urea, citostatsko djelovanje

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

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

**Dr. sc. Marina Marinović**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Davor Šakić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2023.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NOVEL UREIDO-TYPE HARMINE-CHLOROQUINE HYBRIDS

Ankica Pezo

#### SUMMARY

This master's thesis is a continuation of research at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb. The research covers the design, synthesis, and evaluation of the biological activity of harmine derivatives with potential antimalarial and/or cytostatic activity. The aim of this master's thesis was the synthesis and characterization of novel chloroquine-harmine hybrids prepared by linking chloroquine amine **1** with primary amines (**3**, **8**, **13**, and **18**) based on the  $\beta$ -carboline alkaloid harmine using urea as a linker. The synthesis began with the preparation of a simplified chloroquine derivative, amine **1**. Harmine derivatives, amines **3** and **8**, were obtained from harmine, amine **13** from 5-methoxytryptamine, and amine **18** from methyl tryptophanate. Title ureas were obtained using either benzotriazole **5** (BtH method) or a coupling reagent 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI method). The harmine benzotriazolide **5** (active urea) was synthesized from amine **3** and 1-benzotriazole carboxylic acid chloride (BtcCl, **4**). Urea **19** was obtained by aminolysis of the active urea **5** with amine **1** under basic conditions. Ureas **20–22** were synthesized using the CDI method from amines **8**, **13**, or **18** and amine **1** through a mechanism of nucleophilic substitution.

The newly synthesized compounds were characterized using standard analytical and spectroscopic methods: IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS. Their melting points were determined, and physicochemical parameters that could impact the pharmacokinetics of the newly synthesized compounds were predicted using the SwissADME online platform. All four final compounds mostly comply with Lipinski's and Veber's rules, and the SwissADME tool predicts good oral bioavailability. However, further optimization of the compounds' structures is necessary as ureas **19–22** have been found to inhibit CYP enzymes and act as P-glycoprotein substrates. Evaluation of the cytostatic and antimalarial activities of novel ureas is in progress, however, this is beyond the scope of this thesis.

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

Thesis includes: 90 pages, 19 figures, 9 tables and 56 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Harmine, chloroquine, molecular hybridization, urea, cytostatic activity

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

Reviewers: **Kristina Pavić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marina Marinović, Ph.D.**, *Postdoctoral Associate*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Davor Šakić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2023.

