

Sinteza i karakterizacija novih N-triazolskih derivata beta-karbolina i cimetne kiseline

Tomašić, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:390865>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



Luka Tomašić

**Sinteza i karakterizacija novih
N-triazolskih derivata β -karbolina
i cimetne kiseline**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom
fakultetu

Zagreb 2019.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Ivani Perković na vremenu, strpljenju i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se obitelji i prijateljima na pruženoj podršci tijekom studiranja.

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



KRATICE

17-AAG – 17-*N*-alilamino-17-demetoksigeldanamicin

ACN – acetonitril

ACT – kombinirana terapija koja uključuje artemizinin (*artemisinin-based combination therapy*)

ADMA – acetaldehid dimetil acetal

ADMP – 2-azido-1,3-dimetilimidazolinium heksafluorofosfat

AHA1 – aktivator Hsp90 ATPaznog homologa 1

ATP – adenzin trifosfat

CuAAC - azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom

DBU – 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en

DCE – 1,2-dikloretan

DDQ – 2,3-dikloro-5,6-dicijano-1,4-benzokinon

DMF – *N,N*-dimetilformamid

EtOAc – etilacetat

GI apsorpcija – gastrointestinalna apsorpcija

Grp94 – glukozom-reguliran protein 94 (*glucose-regulated protein 94*)

HCl – klorovodična kiselina

HOP – HSC70/HSP90-organizacijski protein

*Hs*Hsp90 – ljudski Heat shock protein 90

Hsp90 – Heat shock protein 90

HSPs – Heat shock proteini

IBX – 2-jodobeznojeva kiselina

IR – infracrveno magnetsko zračenje

KM-barijera – krvno moždana barijera

KMnO₄ – kalijev permanganat

LiAlH₄ – litijev aluminijev hidrid

MS – masena spektroskopija

MW – mikrovalni reaktor

M_w – molekularna masa

Na₂SO₄ – natrijev sulfat

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

Pd/C – paladij na ugljiku

PfHsp90 – *Plasmodium falciparum* Heat shock protein 90

P-gp – P glikoprotein

PPiase – peptidil-prolil cis-trans izomeraze

s.t. – sobna temperatura

TFA – trifluoroctena kiselina

THF – tetrahidrofuran

TLC – tankoslojna kromatografija

TMS – tetrametilsilan

TNF – faktor nekroze tumora (*tumor necrosis factor*)

TRAP1 – protein povezan s TNF receptorom (*TNF receptor-associated protein*)

TPSA – ukupna polarna površina (*topological polar surface area*)

t_i – temperatura tališta

WHO – Svjetska Zdravstvena Organizacija (*World Health Organization*)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Malaria.....	2
1.2. Porast rezistencije na antimalarike.....	3
1.3. Heat shock protein 90 (Hsp90).....	5
1.4. <i>Plasmodium falciparum</i> Hsp90.....	9
1.5. Inhibitori Heat shock proteina 90.....	10
1.6. Prirodni spojevi s antimalarijskim djelovanjem - alkaloidi <i>Guiera senegalensis</i> i <i>Peganum harmala</i>	12
1.7. Harmin kao Hsp90 inhibitor.....	14
1.8. Pictet-Spenglerova reakcija.....	16
1.9. Mikrovalno-potpomognuta sinteza tetrahidro- β -karbolina i β -karbolina.....	17
1.10. Sintaza 1,2,3-triazola azid-alkin cikloadicijom kataliziranom bakrom (CuAAC).....	19
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Sintaza [(1 <i>E</i>)-3-azidoprop-1-en-1-il]benzena (1).....	25
3.2. Sintaza etil (2 <i>E</i>)-3-(4-metoksifenil)prop-2-enoata (2)	25
3.3. Sintaza (2 <i>E</i>)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-ola (3)	26
3.4. Sintaza 1-[(1 <i>E</i>)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-metoksibenzena (4).....	26
3.5. Sintaza metil 3-(metoksikarbonil)-1-metil-1 <i>H</i> ,2 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,4 <i>H</i> ,9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2-ium klorida (5).....	27
3.6. Sintaza metil 1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3-karboksilata (6).....	27
3.7. Sintaza {1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3-il}metanola (7).....	28
3.8. Sintaza [1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3-il]metanola (8).....	29
3.9. Sintaza <i>N</i> -triazolskih derivata β -karbolina i cimetine kiseline (9,10).....	30
3.9.1. Sintaza [1-metil-9-({1-[(2 <i>E</i>)-3-fenilprop-2-en-1-il]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il}metil)- 9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3-il]metanola (9).....	30
3.9.2. Sintaza [9-({1-[(2 <i>E</i>)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- il}metil)-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-3-il]metanola (10).....	31
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	32
5. ZAKLJUČAK.....	48

6. LITERATURA.....	50
7. SAŽETAK.....	54
8. PRILOZI.....	57

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

1. UVOD

1.1 Malarija

Malarija je smrtonosna bolest od koje umire oko pola milijuna ljudi godišnje, najviše u zemljama u razvoju koje nisu uspjele istrijebiti komarce roda *Anopheles*, koji imaju ulogu vektora. 2017. godine od malarije je umrlo oko 435 000 ljudi, a zabilježeno je oko 219 milijuna slučajeva zaraze širom svijeta, uključujući osjetljive skupine kao što su trudnice i djeca mlađa od pet godina. Za najteže oblike malarije odgovoran je protozoanski parazit *Plasmodium falciparum*. Ostale vrste koje uzrokuju malariju kod ljudi uključuju *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* i *P. knowlesi*. Simptomi se javljaju 10-15 dana nakon ugriza komarca i uključuju visoku temperaturu, trnce, glavobolju i povraćanje. Ako se na ove simptome ne reagira terapijom lijekovima, bolest može napredovati i uzrokovati teže simptome, uključujući anemiju (World Malaria Report, 2018; Shahinas i sur., 2013).

Životni ciklus malarije počinje ubodom komarca koji otpušta antikoagulanse u krv domaćina, nakon čega slijedi injekcija sporozoita malarije, koji putem krvi dolaze do hepatocita. U ovom okruženju sporozoiti rastu i repliciraju DNA te prelaze u stadij merozoita. Kada su merozoiti otpušteni iz hepatocita u krvotok počinje intra-eritrocitni ciklus parazita, koji je odgovoran za kliničke simptome malarije. Unutar eritrocita parazit prvo poprima oblik prstena, u kojem se hrani hemoglobinom i nutrijetima plazme, nakon čega prelazi u fazu trofozoita u kojoj se hrani, raste te modificira membranu eritrocita. Kako se parazit hrani hemoglobinom, nastaju toksični produkti hema koje parazit polimerizira u netoksični hemozoin. Trofozoiti nakon replikacije DNA prelaze u fazu shizonta u kojoj slijedi maturacija te se razvijaju novi merozoiti, koji se otpuštaju u krvotok nakon pucanja eritrocita inficiranih shizontima (Shahinas i sur., 2013).

Tijekom prošlog desetljeća, incidencija i smrtnost malarije se smanjila zahvaljujući mjerama prevencije te uspješnim tretiranjem bolesnika zaraženih plazmodijem. Međutim, novi problem u suzbijanju malarije predstavlja pojava sojeva parazita rezistentnih postojećim antimalaricima. (Murillo-Solano i sur., 2017).

1.2 Porast rezistencije na antimalarike

Većina trenutno dostupnih antimalarika dobiveni su na temelju prirodnih spojeva koji su pokazali antimalarijsku aktivnost. Identifikacija antimalarika kao što su kinin i artemizinin bila je slučajna i nije uključivala racionalnu identifikaciju molekularnih meta. Ostali antimalarici kao što su klorokin, artesunat, antifolati i tetraciklini identificirani su prema njihovoj kemijskoj povezanosti s prirodnim spojevima ili aktivnosti protiv drugih infektivnih patogena (Shahinas i sur., 2013).

Većina postojećih antimalarika ima sličan način djelovanja. 4-aminokinolini i aril amino alkoholi interferiraju s formacijom hemozoina, antifolati ometaju metabolizam folata, artemizinin i njegovi derivati su endoperoksidi koji stupaju u interakcije s reduciranim hemom te modificiraju enzime i lipide parazita, antibiotici interferiraju s RNA parazita i inhibiraju sintezu proteina. Antifolati su među rijetkim antimalaricima koji imaju dobro definirane mete i mehanizam djelovanja u biosintetskom putu folata, ali rezistencija na ove inhibitore, uključujući pirimetamin i ciklogvanil, pojavila se ubrzo nakon što su uvedeni kao antimalarici. Mutacija u dihidrofolat reduktazi zbog koje se javlja rezistencija prvo se pojavila u Aziji i proširila se u Afriku. (Shahinas i sur., 2013).

Uporaba klorokina započela je širom svijeta u 1940-tim godinama, te je klorokin predstavljao zlatni standard za prevenciju i liječenje malarije bez komplikacija kroz nekoliko desetljeća (Shahinas i sur. 2013). *P. falciparum* postao je visoko rezistentan na klorokin u većini područja na kojima je prisutna malarija. Rezistencija na sulfadoksin-pirimetamin također je proširena i razvila se mnogo brže. Rezistencija na meflokin je prisutna samo na područjima gdje je široko korišten, kao što su Tajland, Kambodža i Vijetnam (White, 2004). Kombinirana terapija koja uključuje artemizinin (ACT) uvedena je tijekom 1990-tih godina, kada je u Jugoistočnoj Aziji postojala prijetnja od neizlječive malarije zbog razvoja rezistencije na sve dostupne lijekove. 2005. godine Svjetska Zdravstvena Organizacija (WHO) preporučila je korištenje kombinirane terapije koja uključuje artemizinin (ACT) kao prvu liniju liječenja malarije uzrokovane *P. falciparum* u svim državama gdje je malarija endemska, što je uz ostale mjere prevencije rezultiralo smanjenjem morbiditeta i mortaliteta malarije (Ashley i sur., 2014). Iako se ACT pokazala vrlo djelotvornom protiv rezistentnih *P. falciparum* sojeva, pojavila se sve rastuća rezistencija na artemizinin i njegove derivate (Corey i sur., 2016).

Rezistencija plazmodija na više od tri lijeka (eng. *multidrug resistance*), također je česta. Uzroci rezistencije na antimalarika mogu biti netočno doziranje, neadherencija pacijenata, primjena lijekova loše kvalitete ili lažnih lijekova, te netočna dijagnoza (Shahinas i sur., 2013).

Rezistencija se razvija kad paraziti podliježu točkastim mutacijama ili amplifikaciji gena, pogotovo kod visoke izloženosti lijekovima (Shahinas i sur., 2013). To su mutacije u genima povezanim s metama antimalarika ili influks i efluks pumpama koje utječu na koncentraciju lijeka unutar parazita. *P. falciparum* paraziti iz Jugoistočne Azije pokazali su povećanu sklonost prema razvoju rezistencije na antimalarika. (White, 2004).

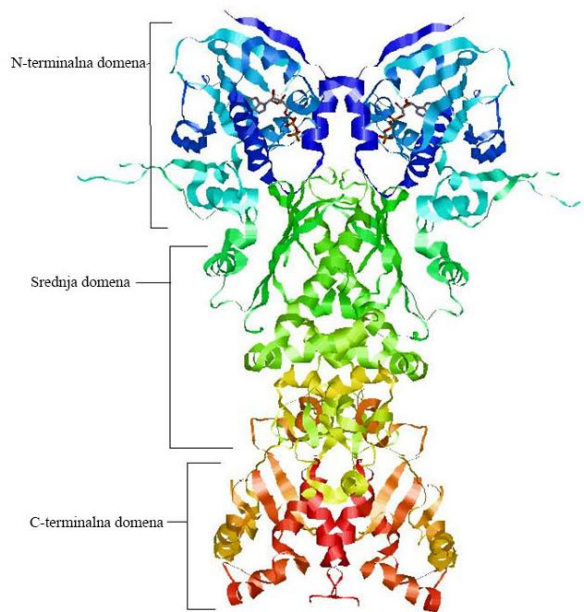
Rezistencija na klorokin kod *P. falciparum* prisutna je širom svijeta, a uključuje višestruke mutacije u *P. falciparum* transporteru za rezistenciju na klorokin, *PfCRT* (Biamonte i sur., 2013). Rezistencija na meflokin i ostale strukturno slične arilaminoalkohole kod *P. falciparum* rezultat je amplifikacija u *Pfmdr* genu, koji kodira za p-glikoproteinsku pumpu (Pgh). Za *P. falciparum* i *P. vivax*, rezistencija na antifolate (pirimetamin i ciklogvanil) rezultat je sekvencijalnog stjecanja mutacija gena koji kodira za dihidrofolat reduktazu (White, 2004). Rezistencija na artemizinin povezana je s točkastom mutacijom u „propelerskoj“ regiji *P. falciparum* kelch proteina (Ashley i sur., 2014).

Zbog razvoja antimalarijske rezistencije povećao se morbiditet i mortalitet malarije. Gubitak jeftinih i efektivnih antimalarika zbog rezistencije predstavlja jednu od najvećih opasnosti za zdravlje stanovnika tropskih područja. Zbog rezistencije na klorokin i sulfadoksin-pirimetamin, dva najjeftinija antimalarika, jasno je da je potreban razvoj novih terapijskih pristupa s novim mehanizmom djelovanja, naročito u današnje vrijeme kada poznavanje biokemije i genoma malarije može pomoći u identifikaciji novih mehanizama antimalarijskog djelovanja. Također, klorokin bi se zbog svojih povoljnih osobina i dalje mogao koristiti u liječenju malarije uzrokovane rezistentnim sojevima parazita u kombinaciji s lijekovima koji bi sprečavali ili smanjili rezistenciju. Idealni antimalarik trebao bi biti jeftin, siguran, moći ubiti parazita u kratkom vremenu te biti otporan na rezistenciju. (Shahinas i sur., 2013).

1.3 Heat shock protein 90 (Hsp90)

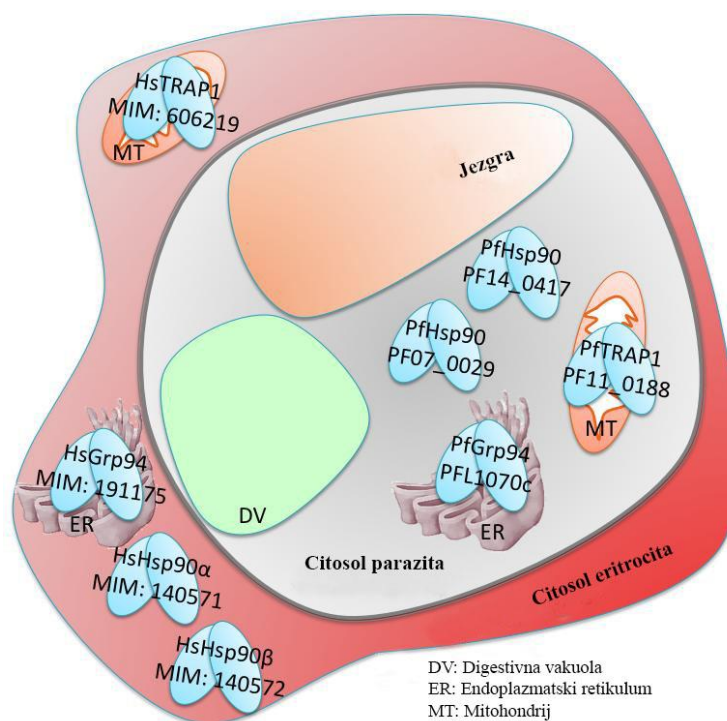
Heat shock proteini (HSPs) su klasa visoko konzerviranih molekularnih šaperona koji potpomažu smatanje proteina. Oni sudjeluju u pretvorbi svojih proteinskih supstrata u funkcionalnu konformaciju. Njihova uloga je da prosljeđuju proteinske supstrate dijelomično smotane od strane jedne grupe HSP, drugoj grupi šaperona. (Shahinas i sur., 2013).

Heat shock protein 90 (Slika 1) je esencijalni molekularni šaperon kod eukariota te predstavlja jednu od potencijalnih meta lijekova protiv protozoa. Hsp90 je homodimer. Svaki Hsp90 monomer građen je od *N*-terminalne domene preko koje se veže ATP, srednje domene koja je bitna za hidrolizu ATP-a i vezanje supstrata, te *C*-terminalne domene (dimerizacijske domene) preko koje su monomeri povezani. Njegova supstrat-vezujuća domena sudjeluje u završnom koraku smatanja nascentnih proteina (Murillo-Solano i sur., 2017; Schopf i sur., 2017). Hsp 90 je jedan od najbolje istraženih članova HSP obitelji, te ima važnu ulogu u normalnom eukariotskom rastu i razvoju. Citosolni Hsp90 je postojan u obliku multišaperonskog kompleksa te zajedno s Hsp70 i Hsp60 pomaže novo sintetiziranim proteinima u smatanju i modulaciji aktivnosti transkripcijskih faktora i protein kinaza. (Shahinas i sur., 2013).



Slika 1. Struktura Hsp90 (preuzeto i prilagođeno iz <https://www.ucl.ac.uk/~zcbtfi4/structure.html>)

Ljudski i malarijski genomi kodiraju četiri paraloga Hsp90. Hsp90 α je ljudski inducibilni homolog prekomjerno izražen u stanicama raka, a induciran je toplinskim šokom. Hsp90 β je konstitutivni homolog. Postoje dodatna dva paraloga, ali za razliku od Hsp90 α i Hsp90 β koji se nalaze u citosolu, Hsp90 paralog znan kao TNF receptor-associated protein (TRAP1) nalazi se u mitohondriju, a Grp94 u endoplazmatskom retikulumu. Svaki od Hsp90 paraloga sudjeluje u smatanju određene grupe proteina klijenata (Schopf i sur., 2017; Shahinas i sur., 2013) U ljudskom domaćinu, Hsp90 α i Hsp90 β sadrže EEVD interakcijski motiv, ali kod malarije, samo jedan od citosolnih Hsp90 paraloga PF07_0029 (Slika 2) sadrži EEVD motiv. PF07_0029 je induciran stresom i vrlo je izražen u eritrocitnom životnom ciklusu parazita (Shahinas i sur., 2013).

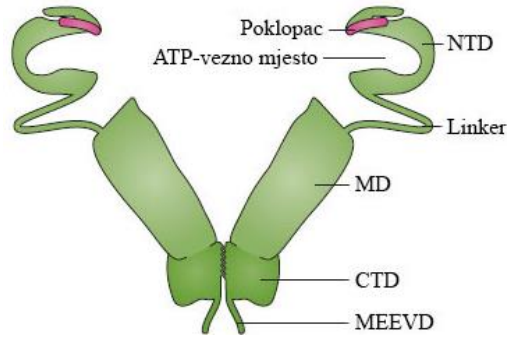


Slika 2. Prikaz lokalizacije ljudskih i malarijskih Hsp90 paraloga unutar eritrocita inficiranim s *P. falciparum*. Fokus ovog pregleda je na PfHsp90 (PF07_0029), koji je citosolna izoforma s konzerviranim EEVD motivom (preuzeto i prilagođeno iz Shahinas i sur., 2013).

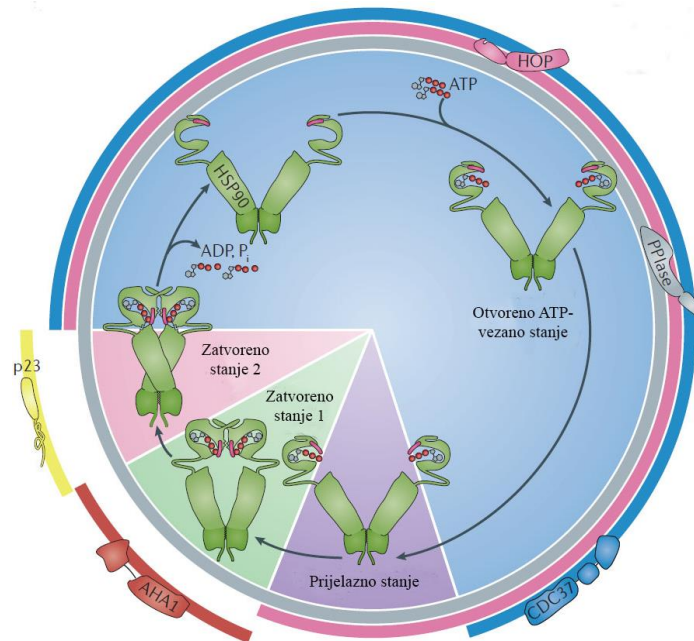
Ljudski citosolni Hsp90 odgovoran je za pravilno smatanje više od 300 supstrata, koji se nazivaju klijenti, uključujući protein kinaze, transkripcijske faktore i receptore ključne za održavanje proteinske homeostaze i regulaciju vitalnih staničnih procesa (Posfai i sur., 2018). Mnogi Hsp90 klijenti su esencijalni proteini uključeni u stanične regulatorne procese i potrebni su za preživljavanje stanice, a zahtjevaju šaperonsku asistenciju da poprime svoj aktivni oblik. Ove ključne funkcije Hsp90 objašnjavaju njegovu važnost kod eukariota (Murillo-Solano i sur., 2017).

Energiju potrebnu za smatanje proteina klijenata pruža ATP. Serija strukturnih preraspodjela povezuje vezanje proteina klijenata s hidrolizom fosfonukleotida. Nukleotid-vezujuća domena nalazi se na N-terminalnoj domeni Hsp90 (Slika 3), ali za ATP-aznu aktivnost potreban je katalitički aktivan ostatak koji se nalazi na srednjoj domeni. Skup konformacijskih promjena (Slika 4) koje povezuju ATP-aznu i šaperonsku aktivnost naziva se Hsp90 konformacijski ciklus (Murillo-Solano i sur., 2017). ATP-azna aktivnost Hsp90 esencijalna je za provođenje šaperonskog ciklusa te za direktno vezanje, indukciju aktivne konformacije te otpuštanje proteina klijenata. Inhibicijom ATP-azne aktivnosti na ATP-vezujućoj domeni na N-terminalnom kraju moguće je inhibirati funkcije Hsp90 i njegovih interakcija s proteinima klijentima (Shahinas i sur., 2013).

Hsp90 se već pokazao kao uspješna meta u terapiji raka, neurodegenerativnih bolesti, te virusnih i gljivičnih infekcija zbog svoje aktivacije i posredovanja u stresom induciranim interakcijama u abnormalnim stanicama. Hsp90 na svojoj N-terminalnoj domeni ima unikatni *Bergerat* nabor gdje se nalazi ATP-vezno mjesto s otvorenim „poklopcem“, gdje je moguće kompetitivno i selektivno inhibirati njegovu aktivnost s malim molekulama. Kako Hsp90 regulira stanični ciklus i potencira rezistenciju na lijekove, mnogi klijenti Hsp90 su esencijalni stanični proteini s patogenom funkcijom koji čine inhibiciju Hsp90 smrtonosnom za stanice pod stresom, ali ne i za normalne stanice (Shahinas i sur., 2013). Također, zbog razlike u strukturi ATP-vezujuće domene ljudskog i parazitskog Hsp90 te njegove uloge u važnim staničnim funkcijama, Hsp90 je obećavajuća meta lijekova protiv parazitskih infekcija (Bayih i sur., 2016).



Slika 3. Shematski prikaz strukture Hsp90 i rasporeda njegovih domena. NTD označava N-terminalnu domenu, MD srednju domenu, CTD C-terminalnu domenu, a MEEVD označava Met-Glu-Glu-Val-Asp motiv prisutan na C-terminalnom kraju molekule (preuzeto i prilagođeno iz Schopf i sur., 2017).

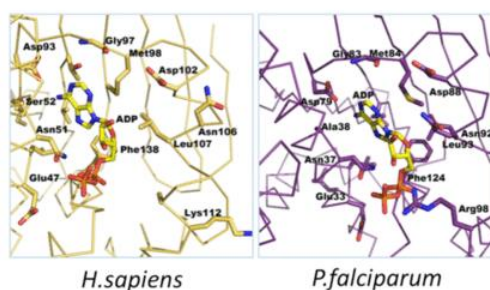


Slika 4. Shematski prikaz Hsp90 konformacijskog ciklusa i vezanja košaperona. Nakon vezanja ATP-a, Hsp90 prelazi iz otvorenog ATP-vezanog stanja u prijelazno stanje kada dolazi do zatvaranja „poklopca“. Zatim N-terminalni krajevi monomera stupaju u interakciju (zatvoreno stanje 1), te dolazi do uvijanja monomera (zatvoreno stanje 2). Različiti košaperoni se vežu na određene konformacije Hsp90: HOP stabilizira otvorenu konformaciju i tako inhibira ATP-aznu aktivnost, PPIase se vežu na sva konformacijska stanja Hsp90, CDC37 se veže rano u ciklusu i važan je za vezanje klijenata kinaza, AHA1 posreduje formaciju zatvorenog stanja 1, a p23 stabilizira zatvoreno stanje 2 (preuzeto i prilagođeno iz Schopf i sur., 2017).

1.4 Plasmodium falciparum Hsp90

Kod *P. falciparum*, jedan citosolni Hsp90 (PF07_0029, *PfHsp90*) induciran je stresom i vrlo je izražen u eritrocitnom životnom ciklusu (Shahinas i sur., 2013). Plazmodiju je Hsp90 potreban za preživljavanje stresnih uvjeta okoliša u ljudskom domaćinu, uključujući pH i povišenu temperaturu kod pacijenta (Hoter i sur., 2018). Porast temperature aktivira *PfHsp90* posredovan odgovor na stres i može olakšati pojavu novih fenotipova tako da djeluje kao šaperon za mutantne proteine koji imaju ulogu u razvoju rezistencije na lijekove te pojačavaju virulenciju ili citoadherencijska svojstva (Shahinas i sur., 2013).

Razlike u aminokiselinskoj strukturi ljudskog Hsp90 i *PfHsp90* otvaraju mogućnosti za specifično vezanje lijekova (Slika 5). Npr., Val186 ljudskog Hsp90 zamijenjen je s izoleucinom (Ile173) kod plazmodija, *PfHsp90* sadrži Ala38 umjesto Ser52 ljudskog Hsp90, i na poziciji Lys112 kod *HsHsp90*, *PfHsp90* sadrži Arg98 (Shahinas i sur., 2012). U pravilu, *PfHsp90* ima suženiji, bazičniji i hidrofobniji džep na ATP-veznoj domeni u odnosu na ljudski Hsp90. Moguće je da *PfHsp90* ima ulogu u razvoju rezistencije plazmodija na antimalarike zbog svoje interakcije s Cg4 proteinom vezanim uz rezistenciju na klorokin. Stoga, *PfHsp90* bi mogao predstavljati metu novih antimalarika ali i imati ulogu u sprječavanju rezistencije na konvencionalne antimalarike kroz sinergiju s drugim lijekovima (Shahinas i sur., 2013).



<i>HsHsp90</i>	<i>PfHsp90</i>
Lys112	Arg98
Ser52	Ala38
Asn106	Asn92

Slika 5. Usporedba ljudskog Hsp90 (*HsHsp90*) i *P. falciparum* Hsp90 (*PfHsp90*) (preuzeto i prilagođeno iz https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-ATP-binding-pocket-differences-A-Molecular-model-of-adenosine_fig5_276126381)

1.5 Inhibitori Heat shock proteina 90

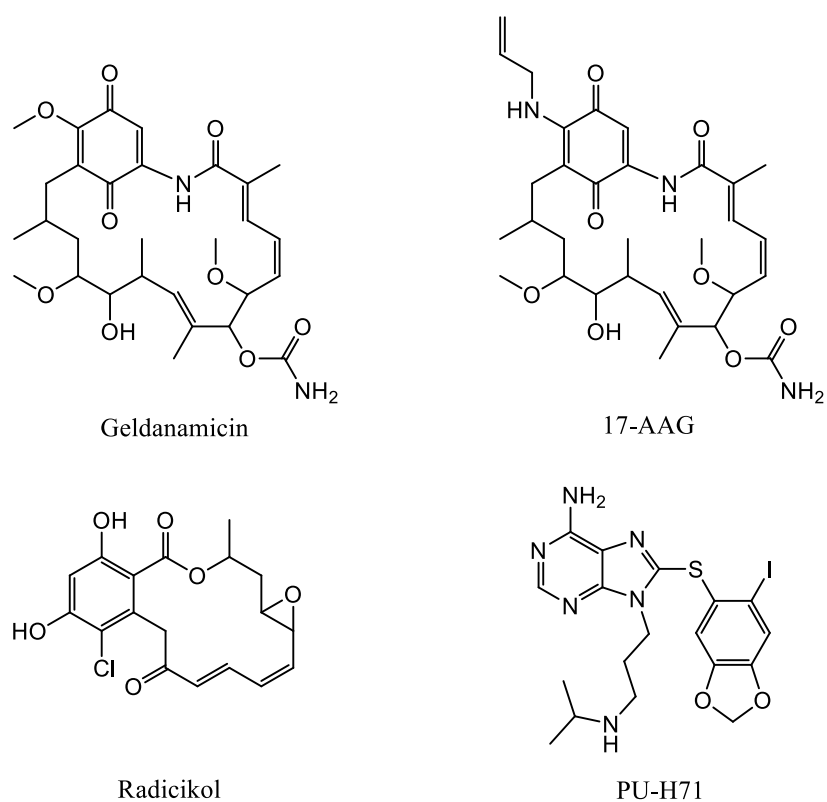
Inhibicijom Hsp90 onemogućeno je pravilno smatanje proteina te Hsp90 klijenti ne mogu poprimiti svoju aktivnu konformaciju i razgrađuje ih proteasom. Degradacija ovih proteina vodi do zaustavljanja rasta i apoptoze u stanicama raka (Shahinas i sur., 2013). Zbog ovih saznanja, provodi se sve više istraživanja kojima je cilj proširiti spektar djelovanja Hsp90 inhibitora na druge bolesti, uključujući malariju, Afričku bolest spavanja, autoimune bolesti i razne neurodegenerativne poremećaje (Dolgin i Motluk, 2011).

Inhibitori Hsp90 posjeduju nekoliko karakteristika koje ih čine obećavajućim molekulama s djelovanjem protiv *P. falciparum*. Ovi inhibitori su već pokazali da ograničavaju rast parazita u *in vitro* uvjetima kao i na mišjem modelu malarije. Kako su neki inhibitori Hsp90 već u kliničkom fazi razvoja za terapiju karcinoma, mogli bi se prenamjeniti u antimalarike ukoliko se ne bi pokazali kao djelotvorni antitumorski lijekovi. Osim toga, inhibicija Hsp90 kod gljivica rezistentnih na antifungalne lijekove dovela je do prelaska rezistentnog u osjetljiv fenotip, što potvrđuje šaperonsku ulogu Hsp90 u razvoju rezistencije. Ovo je značajno opažanje s obzirom na to da je rezistencija na artemizinin povezana s pojačanim odgovorom na stres. Ova saznanja čine Hsp90 obećavajućom metom protiv *P. falciparum* (Murillo-Solano i sur., 2017).

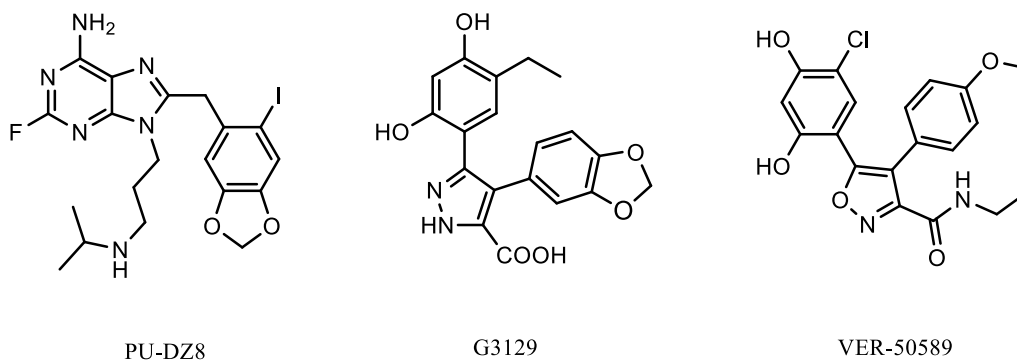
Geldanamicin (Slika 6) je prvi Hsp90 inhibitor, otkriven prije više od 40 godina. Taj prirodni antibiotik proizvode bakterije tla na području Kalamazooa u Michiganu. Dodatna ispitivanja su pokazala da posjeduje i antitumorsko djelovanje (Dolgin i Motluk, 2011). Otkriće geldanamicina otvorilo je novi put u razvoju lijekova koji djeluju na Hsp90. Geldamicin je u *in vitro* uvjetima pokazao snažno antitumorsko i antimalarijsko djelovanje (Bayih i sur., 2016). Međutim, njegova klinička primjena nikada nije zaživjela zbog slabe topljivosti i visoke hepatotoksičnosti, te *in vivo* nestabilnosti (Angel i sur., 2013). Radicikol (Slika 6) je makrociklički laktan s anti-Hsp90 aktivnosti u staničnoj kulturi, ali nije stabilan u serumu, zbog čega nije aktivan *in vivo* (Shahinas i sur., 2013).

Kao rezultati istraživanja, razvijeni su različiti derivati geldanamicina s prihvatljivom razinom hepatotoksičnosti, od kojih su se neki, uključujući 17-AAG (Slika 6), pokazali kao obećavajući antimalarijski spojevi koji djeluju na PfHsp90 (Bayih i sur., 2016).

Pri identifikaciji lijekova koji inhibiraju Hsp90, otkriveni su brojni inhibitori različitih struktura, a koji oponašaju specifični oblik kakav ATP poprima kad se veže na Hsp90 preko ATP-vezne domene (Shahinas i sur., 2013). Osim geldanamicina i njegovih derivata, druge male molekule kao što su analozi purina pokazale su djelotvornost u inhibiciji Hsp90 u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Jedna od takvih molekula je PU-H71 (Slika 6), koja je testirana kao antitumorski lijek. PU-H71 je pokazao i antimalarijsko djelovanje (Bayih i sur., 2016). Neki sintetski inhibitori Hsp90, kao što su derivati purina, pirazola i izoksazola (Slika 7), ciljaju N-terminalnu domenu Hsp90 (Shahinas i sur., 2013). Derivati aminoalkohol-karbazola pokazali su selektivnu inhibiciju *Pf*Hsp90 zbog specifičnosti strukture ATP-veznog džepa Hsp90 plazmodija (Wang i sur., 2016).



Slika 6. Strukturne formule prirodnih i sintetskih inhibitora Hsp90 (Taldone i sur., 2009)



Slika 7. Primjeri strukturnih formula purinskih, pirazolskih i izoksazolskih inhibitora Hsp90
(Taldone i sur., 2009)

1.6 Prirodni spojevi s antimalarijskim djelovanjem - alkaloidi *Guiera senegalensis* i *Peganum Harmala*

U Africi većina populacije nema pristup terapiji lijekovima, ali im je dostupna tradicionalna medicina. *Guiera senegalensis* (Slika 8) je grm koji raste u savani u Zapadnoj i Centralnoj Africi. Njegovi listovi koriste se u tradicionalnoj medicini za liječenje gastrointestinalnih poremećaja, respiratornih infekcija, reume i malarije pripremom febrifugalnih dekokta. Pokazalo se da alkaloidi ekstrahirani iz lišća *G. senegalensis* imaju antimalarijsko djelovanje. Harman je identificiran kao aktivni agent, a daljne studije su pokazale potentno *in vitro* antimalarijsko djelovanje čistih supstanci ili metanolnih frakcija izoliranih iz sličnih biljaka iz Zapadne Afrike. Čisti prirodni spojevi u odnosu na suhe ekstrakte imaju manje nuspojava i potencijalnih toksičnih metabolita. Aktivne tvari izolirane iz biljaka koje se koriste u tradicionalnoj medicini, mogu poslužiti kao spojevi uzori za otkriće novih terapijskih mehanizama (Shahinas i sur., 2012).



Slika 8. *Guiera senegalensis* (preuzeto iz https://live.staticflickr.com/8497/8285954638_5b1f5bcbc3_b.jpg)

Peganum harmala L. (Slika 9), poznata kao harmal, je perenijalna biljka koja raste na području Indije, Kine, Mongolije i Bliskog Istoka. Ova biljka sadrži β -karbolinske alkaloidne kao bioaktivne sastojke, uključujući harmin, harmalin, harmol i harmalol, koji se uglavnom nalaze u korijenu i sjemenkama. *P. harmala* pokazala je raznolika djelovanja, uključujući antioksidativnu, antimutagenu i citotoksičnu aktivnost. Ekstrakti sjemenki pokazali su *in vivo* i *in vitro* aktivnost protiv različitih linija tumorskih stanica (Ayoob i sur., 2017). Ova biljka se koristi u tradicionalnoj medicini na području Bliskog Istoka, Indije, Kine i Afrike kao emenagog, halucinogen, abortifacijent, antidepresiv, antiinflamatorik, antimikrobik te protiv infekcija lišmanijom (Ibraheem i sur., 2015).



Slika 9. *Peganum harmala*
(preuzeto iz https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Peganum_harmala1.jpg)

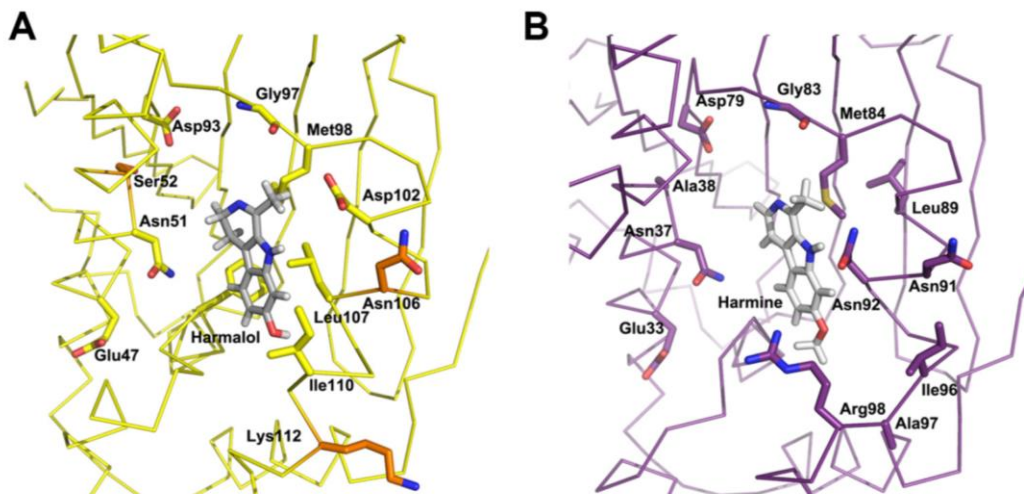
Harmin se pokazao kao najaktivniji sastojak *P. harmala*. Harmin ima antiviralnu, antitumorsku, halucinogenu i antiparazitsku aktivnost. Harmin inhibira aktivnost topoizomeraze te pokazuje interkalaciju u DNA, inhibira monoamino-oksidadzu A (MAO-A) i kinazu ovisnu o ciklinu (CDK) (Ayoob i sur., 2017).

1.7 Harmin kao Hsp90 inhibitor

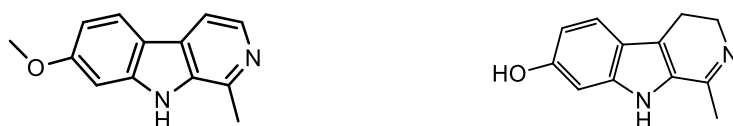
Harmin, β -karbolinski alkaloid iz prirodnih izvora može se selektivno vezati na *PfHsp90* u većoj mjeri nego na ljudski Hsp90 (*HsHsp90*). Harmin je pokazao da ima specifično visok afinitet za interakcije s ATP-vezujućom domenom *PfHsp90* uz snažnu inhibiciju *P. falciparum* u staničnim kulturama (Bayih i sur., 2016).

Docking studije u kojima su korištene kristalne strukture *PfHsp90* i *HsHsp90* ATP-veznih domena predlažu da metoksi skupina harmina posreduje interakcije s gvanidinskom skupinom arginina 98 (Arg98). Ova grupa ima potencijal za tvorbu snažne interakcije s ATP-veznim džepom *PfHsp90*. Iako se pretpostavlja da Arg98 nema značajnu ulogu u ATP-aznoj aktivnosti domene, ovaj ostatak lociran je unutar ATP-veznog džepa te je konzerviran među parazitskim Hsp90 ortolozima. Prirodne mutacije na toj poziciji nisu uočene među globalnim kliničkim izolatima *P. falciparum*. Stoga, rezistencija „divljeg tipa“ nije očekivana.

Za razliku od harmina, harmalol koji umjesto metoksi skupine ima hidroksilnu skupinu (slika 11), uspješno se vezao na ljudski Hsp90 ATP-vezni džep, što predlaže da Lys112 posreduje polarne interakcije s hidroksilnom grupom. Planarna konformacija ove dvije molekule dobro se uklapa u hidrofobnu i bazičnu prirodu Hsp90 ATP-veznog džepa. Zbog nedostatka polarne hidroksilne skupine, harmin stupa u specifičnije interakcije s užim i hidrofobnijim ATP-veznim džepom *PfHsp90* u odnosu na ljudski Hsp90 (Slika 10) (Shahinas i sur., 2012).



Slika 10. A) Harmalol vezan na ATP-vezno mjesto ljudskog Hsp90; B) Harmin vezan na ATP vezno mjesto *Pf*Hsp90 (Shahinas i sur., 2012)

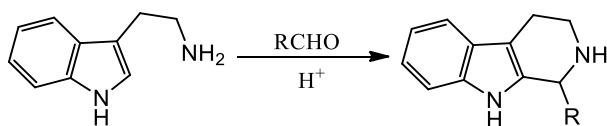


Slika 11. Strukturne formule harmina (lijevo) i harmalola (desno) (Shahinas i sur. 2012)

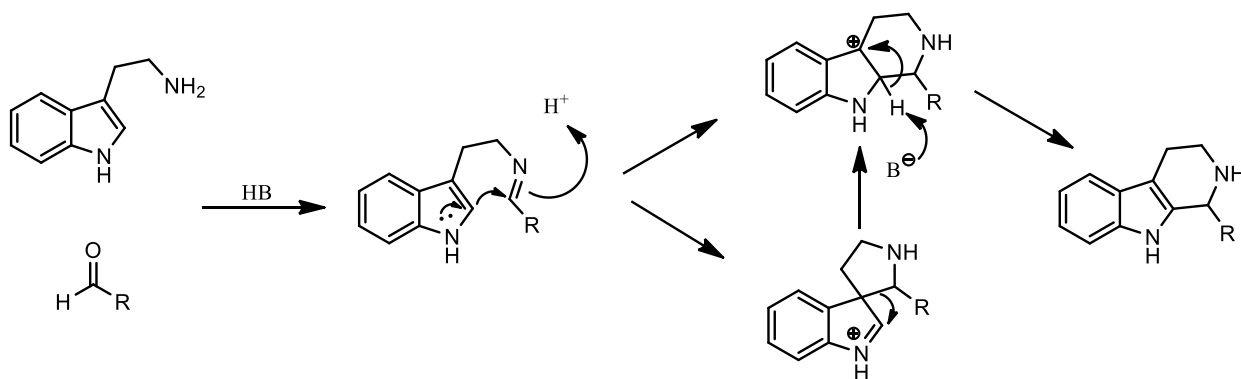
Harmin također pokazuje sinergističku aktivnost s postojećim antimalaricima u *in vitro* uvjetima, kao što su klorokin i artemizinin. Na mišjem modelu malarije, pokazalo se da harmin potencira djelovanje klorokina bez značajne toksičnosti. Iako je mišji model pokazao znatno smanjenje parazitemije, ipak nije došlo do značajnog poboljšanja preživljavanja (Shahinas i sur., 2012).

1.8 Pictet-Spenglerova reakcija

Alkaloidi su spojevi iz prirodnih izvora koji imaju široki spektar bioloških djelovanja. Danas imaju široku primjenu u medicini, zbog čega su metode dobivanja sintetskih alkaloida od velikog značaja. Jedna od takvih metoda je Pictet-Spenglerova reakcija (Slika 12, Slika 13), otkrivena 1911. godine, koja je kroz više od 100 godina od svog otkrića prošla razne modifikacije i postala jedna od najznačajnijih metoda dobivanja sintetskih izokinolinskih i indolskih alkaloidnih prstenova. U reakciji derivata triptamina i aldehida, ovom reakcijom mogu se sintetizirati β -karbolinski spojevi (Heravi i sur., 2018; Stöckigt i sur., 2011). β -karbolinska struktura prisutna je u raznim prirodnim i bioaktivnim spojevima. Brojne molekule koje sadrže β -karbolinsku jezgru aktivne su supstance s djelovanjem na HIV, tumore, razne enzime uključujući kolinesteraze i kinaze. Stoga su razvijene brojne metode za sintezu ovih spojeva, a u najčešće načine sinteze ovih spojeva spadaju one koje uključuju Pictet-Spenglerovu reakciju putem koje se mogu dobiti tetrahidro- β -karbolinski spojevi, koji se zatim oksidacijom prevode u β -karboline. S ciljem razvoja novih antimalarika, ova reakcija se može koristiti u svrhu sinteze harmina i njegovih derivata (Eagon i Anderson, 2014).



Slika 12. Pictet-Spenglerova reakcija (Stöckigt i sur., 2011)



Slika 13. Mehanizam Pictet-Spenglerove reakcije (Stöckigt i sur., 2011)

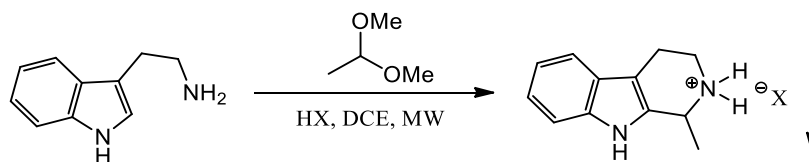
1.9 Mikrovalno-potpomognuta sinteza tetrahidro- β -karbolina i β -karbolina

Većina varijacija Pictet-Spenglerove reakcije opisanih u literaturi uključuje reakciju derivata triptamina i aldehida u prisutnosti jake kiseline. S obzirom na to da je Picket-Spenglerova reakcija uglavnom dugotrajan proces i odvija se u otapalu uz refluks, razvijena je metoda sinteze u mikrovalnom reaktoru koja znatno ubrzava tijek reakcije (Eagon i Anderson, 2014).

Reakcije uz mikrovalove često pokazuju nedostatke, uključujući ograničen izbor supstrata, egzotične kiseline, slabo iskorištenje i potrebu za opsežnim postupkom pročišćavanja produkta. Stoga je potrebno optimizirati uvjete kako bi reakcija bila što efikasnija. Za sintezu tetrahidro- β -karbolina i β -karbolina uz mikrovalove, optimalnom se pokazala reakcija triptamina i acetaldehid dimetil acetala (ADMA) u 1,2-dikloretanu (DCE) kao otapalu uz trifluorocetenu kiselinu (TFA) (Slika 14) (Eagon i Anderson, 2014).

Protonska otapala kao što su metanol, etanol i voda dovode do nastanka smjese nusprodukta koje je zatim potrebno pročititi kolonskom kromatografijom da bi se izolirao produkt zadovoljavajuće čistoće. Međutim, ako kao otapalo upotrijebimo DCE, produkt se spontano taloži nakon samo nekoliko minuta zagrijavanja (Eagon i Anderson, 2014).

Prema rezultatima istraživanja (Eagon i Anderson, 2014), optimalne rezultate daje reakcija uz 2 ekvivalenta TFA i ADMA na 110 °C. Povišenje temperature na 150 °C ili više dovelo je do raspada reaktanata, a reakcija uz 1 ekvivalent kiseline ili ADMA značajno je produžila vrijeme reakcije ili reakcija nije niti započela. Zamjena TFA octenom ili mravljom kiselinom, dovela je do produženja vremena trajanja reakcije i smanjenja iskorištenja. Bezvodna klorovodična i p-toluensulfonska kiselina također su se pokazale neučinkovitima, rezultirajući odsutnosti reakcije i raspadom reaktanata.

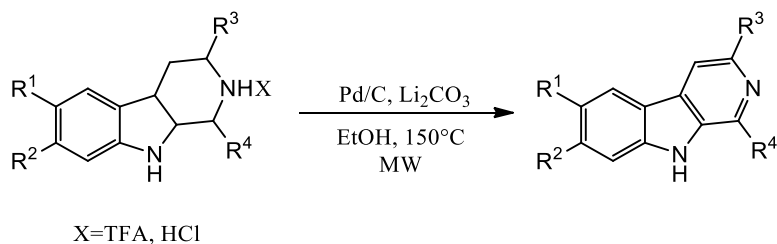


Slika 14. Mikrovalno potpomognuta Pictet-Spenglerova reakcija (Eagon i Anderson, 2014)

Uz mikrovalno-potpomognutu Pictet-Spenglerovu reakciju u navedenim uvjetima reakcije su gotove za 20 minuta ili manje uz široki spektar mogućih supstrata, a produkt se taloži uz visoko iskorištenje i čistoću. Velika prednost ove metode je lakoća izolacije produkta reakcije. S obzirom na to da nema potrebe za pročišćavanjem produkta ekstrakcijom ili kolonskom kromatografijom nakon reakcije, čisti kristalični produkti mogu se dobiti u samo nekoliko minuta. Produkti koji se ne istalože direktno iz otopine kao sol s TFA mogu se istaložiti uz dodatak jednog ekvivalenta bezvodne klorovodične kiseline (1M HCl u EtOAc). U slučaju da reaktanti nisu topljivi u DCE, acetonitril (ACN) se pokazao kao prikladna zamjena. Iako je ova metoda visoko tolerantna na veliki raspon supstrata, reakcija s nekoliko supstrata uključujući 2-furfural, pirol-2-karbaldehid i tiofen-2-karbaldehid pokazala se neuspješnom (Eagon i Anderson, 2014).

Da bi se dobio β -karbolinski spoj, nakon uspješne sinteze tetrahidro- β -karbolina produkt je potrebno oksidirati. Prema literaturi (Eagon i Anderson, 2014), ispitan je veliki broj oksidirajućih reagensa za koje je poznato da mogu oksidirati tetrahidro- β -karbolinske spojeve uključujući IBX, elementarni sumpor, KMnO_4 , kromnu kiselinu i DDQ. Najboljim se pokazao Pd/C. Reakcija oksidacije s Pd/C (Slika 15) pokazala se uspješnom u ACN, metanolu, etanolu i vodi, a najbolje iskorištenje i vrijeme reakcije dobiveno je u etanolu na 150 °C, također u mikrovalnom reaktoru (Eagon i Anderson, 2014).

Izbor baze također utječe na vrijeme reakcije. NaOH i K_2CO_3 ga produljuju, a Li_2CO_3 značajno skraćuje. Obrada reakcije je jednostavna i nastali produkt moguće je izolirati u visokom iskorištenju (Eagon i Anderson, 2014).



Slika 15. Oksidacija tetrahidro- β -karbolinskih soli uz Pd/C u etanolu uz mikrovalno zračenje (Eagon i Anderson, 2014)

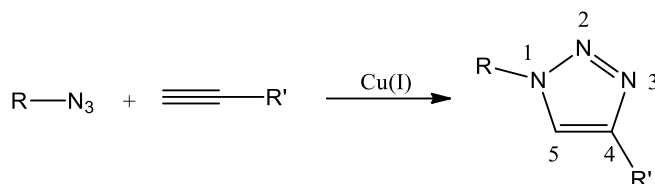
1.10 Sinteza 1,2,3-triazola azid-alkin cikloadicijom kataliziranom bakrom (CuAAC)

Klik kemija predstavlja set brzih, „gotovo savršenih“ selektivnih i robustnih reakcija koje daju skoro potpuno iskorištenje u vodenim otopinama. Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (CuAAC, Slika 16) predstavlja izvrstan primjer klik kemije i može se koristiti za efikasnu i regioselektivnu generaciju 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola. Nakon njihovog otkrića, 1,2,3-triazoli postali su značajni za jednostavno i robustno vezanje molekula te za stvaranje stabilnih polimernih struktura (Tireli i sur., 2017; Zheng i sur., 2012).

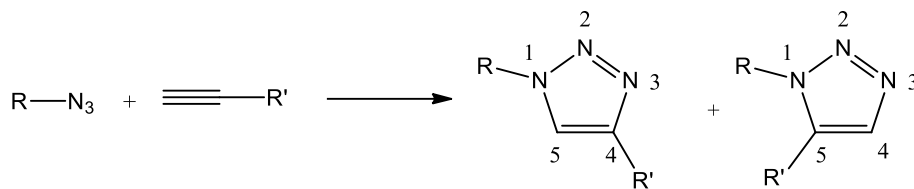
1,2,3-triazoli postali su heterocikli izbora u istraživanju lijekova zbog svoje pogodne farmakokinetike, sigurnosnog profila, sposobnosti za stvaranje vodikovih veza, rigidnosti i stabilnosti u *in vivo* uvjetima (Tireli i sur., 2017). Spojevi koji sadrže 1,2,3-triazol u svojoj strukturi pokazali su se kao korisni kemoterapeutski agenti koji posjeduju antibakterijsku, antifungalnu, antihelmintičku i antitumorsku aktivnost (Shankaraiah i sur. 2016). Također, zbog mogućnosti da 1,2,3-triazoli dijeluju kao bioizosteri za amidnu vezu, ova klik reakcija može se iskoristiti kao metoda za konjugaciju bioaktivnih molekula s ciljem unaprijeđenja njihove biološke aktivnosti (Tireli i sur., 2017). Uz sve prednosti CuAAC, treba obratiti pažnju i na njena ograničenja kao što su korištenje organskih azida koji su mogu biti nestabilni te ih je teško pročistiti, kontaminacija klik produkta s bakrenim katalizatorom, te nestabilnost Cu (I) oksidacijskog stanja zbog čega je potrebno koristiti inertnu atmosferu ili druge metode kao što je *in situ* generacija katalizatora (Mandoli, 2016).

Otkriće bakrovog (I) iona kao katalizatora u azid-alkin cikloadicijama bilo je ključno za primjenu ove reakcije s obzirom na to da povećava brzinu reakcije, poboljšava iskorištenje i usmjerava azid-alkin cikloadiciju prema 1,4-disupstituiranom regiomerima. Nekatalizirana reakcija (Slika 17) daje smjesu 1,4- i 1,5-regiomera (Tireli i sur., 2017). Najčešći izvor bakra za CuAAC su bakrove (II) soli, iz kojih se redukcijom *in situ* dobiva Cu (I) potreban za reakciju. Glavna prednost formiranja Cu (I) redukcijom Cu (II) *in situ* je široka primjena ove metode te kompatibilnost s kisikom i vodom, što znači da reakciju nije potrebno izvoditi u atmosferi inertnog plina. Kod reakcije izvedene na ovaj način zadovoljeni su uvjeti klik kemije - visoko iskorištenje i vrlo malo nusprodukta uz nekomplikiran postupak (Berg i Straub, 2013.).

Osim bakrovih (II) soli, može se koristiti Cu (0) prekatalizator iz kojeg se *in situ* oksidacijom dobiva Cu (I). Ovakva reakcija je spora, ali se može ubrzati mikrovalovima. Također se mogu izravno koristiti Cu (I) soli, ali je u tom slučaju potrebno reakciju izvoditi u inertnoj atmosferi u bezvodnom otapalu (Berg i Straub, 2013.).



Slika 16. Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (CuAAC)



Slika 17. Azid-alkin cikloadicija bez katalizatora

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Iako je tijekom prošlog desetljeća došlo do smanjenja incidencije i smrtnosti malarije, novi problem u suzbijanju malarije predstavlja pojava sojeva plazmodija rezistentnih na trenutno dostupne antimalarike. Također, u posljednje dvije godine nije došlo do značajnog pomaka u rješavanju problema malarije. Zbog ovih činjenica, jasna je potreba za identifikacijom novih potencijalnih meta i za istraživanjem molekula s ciljem razvoja novih antimalarika.

Pregled literature o prirodnim spojevima koji posjeduju antimalarijsko djelovanje pokazao je da harmin, β -karbolinski alkaloid ima potvrđeno *in vivo* i *in vitro* antimalarijsko djelovanje. Mogući mehanizam djelovanja harmina je inhibicija *P. falciparum* Hsp90, koji ima važnu ulogu u razvoju rezistencije.

Cimetna kiselina i njezini derivati su prirodni spojevi koji se nalaze u brojnim biljkama. Imaju širok spektar farmakoloških djelovanja. Osim toga, kada se cimetna kiselina vezala na poznate antimalarike došlo je do pojačanja njihovog antimalarijskog djelovanja.

Hibridni spojevi predstavljaju kombinaciju dva farmakofora koji su kovalentno povezani u jednu molekulu. Uzevši u obzir pogodnu farmakokinetiku, sigurnosni profil i stabilnost *in vivo* spojeva koji sadrže 1,2,3-triazol u svojoj strukturi, cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija novih *N*-triazolskih derivata β -karbolina koji u strukturi sadrže derivate cimetne kiseline.

Za sintezu β -karbolinskog dijela molekula korištena je Pictet-Spenglerova reakcija u mikrovalnom reaktoru, a za sintezu *N*-triazolskih derivata korištena je klik reakcija azid-alkin cikloadicije katalizirane bakrom (CuAAC), koja se pokazala kao jednostavna i efikasna metoda sinteze.

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija dva nova derivata β -karbolina i cimetne kiseline povezanih 1,2,3-triazolskim prstenom. Sintetizirani spojevi karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (t_r , MS, IR, ^1H i ^{13}C NMR). U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, tim spojevima će biti ispitano biološko djelovanje.

3. MATERIJALI I METODE

Tališta (t_r) su određena na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. CEM Discover mikrovalni reaktor (CEM Corporation, SAD) korišten je u mikrovalnoj sintezi ($P=300W$).

Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka), te cikloheksan/etilacetat/metanol (3:1:0,5) i cikloheksan/etilacetat/metanol (1:1:0,5) kao pokretne faze. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Sigma-Aldrich, SAD), a kao pokretna faza cikloheksan/etilacetat (2:1), cikloheksan/etilacetat (9:1) i cikloheksan/etilacetat/metanol (3:1:0,5). Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ($\lambda = 254$ nm) i parama joda.

IR spektri snimljeni su na Paragon FT-IR spektrometru (Perkin Elmer, UK). ¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance III HD 400 MHz/54mm Ascend (Bruker, SAD) kod 400 MHz za ¹H i kod 101 MHz za ¹³C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO-*d*₆ otopinama na 20 °C u NMR cijevicama od 5 mm. Kemijski pomaci dani su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420).

Metilni ester triptofana nabavljen je od tvrtke TCI (Japan). Tionil klorid, DBU, ADMP, ADMA, Pd/C, Li₂CO₃, LiAlH₄, Cs₂CO₃, propargil-bromid, cinamil alkohol i *p*-metoksicimetna kiselina nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Trietilamin (TEA) i bakrov (II) acetat nabavljeni su od tvrtke Alfa-Aesar (SAD). Trifluoroctena kiselina nabavljena je od tvrtke Merck (Njemačka). HCl/EtOAc nabavljena je od tvrtke Acros Organics (SAD).

Bezvodna otapala dobivena su sljedećim postupcima. Bezvodni toluen: toluen je ekstrahiran vodom, zatim je osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destilirana i čuvana nad natrijem. Bezvodni *N,N*-dimetilformamid (DMF): smjesa 1 L DMF-a i 100 mL bezvodnog toluena destilirana je, pri čemu prvo destilira azeotropna smjesa toluena i vode, a zatim čisti DMF. Čuvana je nad aktiviranim molekulskim sitima. Bezvodni diklormetan: diklormetan je ekstrahiran vodom, sušen iznad kalcijeva klorida i predestilirana. Sve ostale kemikalije bile su p. a. čistoće.

3.1. Sinteza [(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]benzena (1)

Otopina 0,067 g (0,5 mmol) cinamil alkohola u 4 mL suhog THF-a je ohlađena na 0 °C. Otopini je na 0 °C dodano je 0,171 g (0,6 mmol) ADMP-a i 0,097 mL (0,099g, 0,65 mmol) DBU. Reakcijska smjesa miješana je 10 minuta na 0 °C. Reakcijskoj smjesi dodana je zasićena otopina NH₄Cl (20 mL) i smjesa je ekstrahirana diklormetanom (2 × 20 mL). Organski slojevi su sakupljeni i ekstrahirani zasićenom otopinom NaCl (2 × 20 mL), osušeni nad bezvodnim Na₂SO₄, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat (9:1), dobiven je spoj **1** kao uljasti produkt.

Iskorištenje: 0,054 g (68 %).

IR (KBr) ν_{\max} 3027, 2926, 2100, 1493, 1448, 1351, 1236, 967, 883, 746, 693 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,51-7,28 (m, 5H, 5, 6, 7, 8, 9), 6,71 (d, 1H, *J* = 15,8 Hz, 3), 6,39 (dt, 1H, *J* = 15,8, 6,5 Hz, 2), 4,04 (d, 2H, *J* = 6,5 Hz, 1)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 136,31 (4), 134,24 (3), 129,16 (6, 8), 128,53 (5, 9), 127,00 (7), 123,56 (2), 52,60 (1).

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

Otopini 0,535 g (0,3 mmol) *p*-metoksicimetne kiseline u 10 mL suhog toluena dodano je 3 kapi suhog DMF-a i 1,1 mL (1,78 g, 0,015 mol) tionil klorida na s.t. Nakon 1 h tionil klorid je uparen pod sniženim tlakom te je reakcijska smjesa naparena dva puta suhim toluenom koji je zatim uparen do suha pod sniženim tlakom. Dobiveni klorid *p*-metoksicimetne kiseline korišten je u slijedećem reakcijskom koraku bez pročišćavanja.

Otopina klorida *p*-metoksicimetne kiseline u suhom diklormetanu dokapana je otopini 0,419 mL TEA (0,304 g, 0,3 mmol) u 5 mL apsolutnog etanola na s.t. Nakon 1 h reakcijska smjesa je uparena do suha pod sniženim tlakom te je ekstrahirana vodom (2 × 20 mL) iz etilacetata (20 mL). Organski sloj je osušen nad bezvodnim Na₂SO₄, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni etilni ester *p*-metoksicimetne kiseline **2** (0,605g, narančasta smola) korišten je u slijedećem reakcijskom koraku bez pročišćavanja.

3.3. Sinteza (2E)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-ola (3)

Otopina 0,605 g (2,9 mmol) etilnog estera *p*-metoksicimetne kiseline **2** u suhom THF-u je ohlađena na -5 °C i propuhana argonom. Otopini je na -5 °C je dodano 0,111 g (0,29 mmol) LiAlH₄. Nakon 1 h na -5 °C reakcija je prekinuta dodatkom vode (20 mL) te je zakiseljena s nekoliko kapi 20% klorovodične kiseline do prestanka taloženja. Smjesa je ekstrahirana eterom (2 × 20 mL). Organski slojevi su sakupljeni i ekstrahirani vodom (2 × 20 mL), osušeni nad bezvodnim Na₂SO₄, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat (2:1), dobiveno je 0,381 g (80 %) spoja **3**.

3.4. Sinteza 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-metoksibenzena (4)

Otopina 0,381 g (2,3 mmol) alkohola **3** u 4 mL suhog THF-a je ohlađena na 0 °C. Otopini je na 0 °C dodano 0,794 g (2,76 mmol) ADMP-a i 0,449 mL (0,457 g, 3,0 mmol) DBU. Reakcijska smjesa miješana je 10 minuta na 0 °C. Reakcijskoj smjesi dodana je zasićena otopina NH₄Cl (20 mL) i smjesa je ekstrahirana diklormetanom (2 × 20 mL). Organski slojevi su sakupljeni i ekstrahirani zasićenom otopinom NaCl (2 × 20 mL), osušeni nad bezvodnim Na₂SO₄, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat (9:1), dobiven je spoj **4** kao uljasti produkt.

Iskorištenje: 0,181 g (32 %)

IR (KBr) ν_{\max} 3035, 3004, 2953, 2935, 2837, 2101, 1652, 1607, 1512, 1464, 1250, 1175, 1034, 970, 841, 803 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,42 (d, 2H, 5, 9), 6,92 (d, 2H, 6, 8), 6,65 (d, 1H, *J* = 15,8 Hz, 3), 6,17-6,27 (dt, 1H, *J* = 15,8, 6,7 Hz, 2), 3,99 (d, 2H, *J* = 6,7 Hz, 1), 3,76 (s, 3H, 10).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,23 (7), 133,69 (3); 128,44 (4), 127,89 (5, 9), 120,42 (2), 114,11 (6, 8), 55,13 (10), 52,36 (1).

3.5. Sinteza metil-3-(metoksikarbonil)-1-metil-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*,9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-ium klorida (5)

Otopina 0,04 g metilnog estera triptofana (0,158 mmol), 33,4 μ L ADMA (0,028 g, 0,316 mmol) i 24,3 μ L TFA (0,316 mmol) u 3,5 mL acetonitrila miješana je 5 minuta na s.t. Reakcijska smjesa je zatim miješana u mikrovalnom reaktoru 10 minuta (110 °C, 150W). Nakon završetka reakcije dodano je 0,328 mL (0,158 mmol) 1M HCl u etilacetatu. Smjesa je miješana 2 minute na ultrazvučnoj kupelji nakon čega joj je dodano 4 mL etera. Miješanjem se taloži produkt **5** koji je odsisan.

Iskorištenje: 0,029 g (66 %).

t_r 230–234 (raspad).

IR (KBr) ν_{\max} 3584, 3386, 3230, 3118, 2946, 2786, 2732, 2626, 2474, 2116, 1872, 1752, 1602, 1442, 1360, 1316, 1274, 1226, 1190, 1168, 1086, 1016, 960, 934, 882, 806, 734, 702, 662, 622 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,42 (s, 1H, 1); 10,50 (s, 1H, 11); 10,08 (s, 1H, 11); 7,48 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 6); 7,38 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, 3); 7,10-7,15 (m, 1H, 7); 7,01-7,05 (m, 1H, 5); 4,76 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, 12); 4,67–4,59 (m, 1H, 10); 3,86 (s, 3H, 16); 3,26-3,32 (m, 1H, 9), 3,03-3,11 (m, 1H, 9), 1,75 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, 14).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 169,29 (15), 136,40 (2), 130,89 (13), 125,59 (7), 121,83 (4), 119,18 (5), 118,08 (6), 111,45 (3), 104,26 (8), 54,56 (10), 53,07 (16), 49,68 (12), 22,31 (9), 16,46 (14).

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

Suspenzija 0,07 g (0,249 mmol) spoja **5**, 0,037 g (0,498 mmol) Li_2CO_3 i 0,013 g (0,1 mmol) Pd/C u 3,5 mL etanola miješana je 10 minuta na s.t. Reakcijska smjesa je zatim miješana u mikrovalnom reaktoru 20 minuta (150 °C, 200W). Nakon završetka reakcije produkt je filtriran preko Celita i filtrat je uparen. Dobiveni bijelo-žuti talog rastrljan je s 20 %-tnom otopinom NaCl i odsisan.*

*zbog transesterifikacije s otapalom etanolom dobivena je smjesa metilnog i etilnog estera

Iskorištenje (računano prema etilnom esteru): 0,03 g (48 %)

t_f 212–216 °C (smjesa estera)

MS (m/z) 241,103 (M+1)⁺; 255,118 (M+1)⁺.

IR (KBr) ν_{\max} 3328, 3092, 3044, 2982, 2950, 2620, 1806, 1714, 1626, 1598, 1568, 1500, 1436, 1348, 1308, 1256, 1146, 1116, 1032, 984, 900, 848, 784, 742, 644 cm^{-1} .

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,06 (s, 1H, 1); 8,77 (d, $J = 5,1$ Hz, 1H, 9); 8,36 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 6); 7,67 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, 3); 7,59 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, 4); 7,31 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, 5); 4,35-4,41 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H, 15''); 3,91 (s, 1H, 15); 2,83 (s, 3H, 13); 1,38 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, 16'').

¹³C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166,15 (14''); 165,66 (14); 142,15 (10); 140,74 (2); 136,14, 136,20 (11); 135,91 (12); 128,33 (4); 126,75 (8); 122,09 (6); 121,34 (7); 120,12 (5); 115,87-115,95 (9); 112,31 (3); 60,43 (15''); 51,83 (15); 20,39 (13); 14,41 (16'').

3.7. Sinteza {1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il}metanola (7)

Otopina 0,1 g (0,39 mmol) spoja **6** u suhom THF-u je ohlađena na -5 °C i propuhana argonom. Otopini je na -5 °C je dodano 0,06 g (1,58 mmol) LiAlH₄. Nakon 1 h na -5 °C reakcija je prekinuta dodatkom vode (20 mL) te je zakiseljena s nekoliko kapi 20% klorovodične kiseline do prestanka taloženja (pH oko 9-10). Smjesa je ekstrahirana etilacetatom (4 × 20 mL). Organski slojevi su sakupljeni i ekstrahirani vodom (2 × 50 mL), osušeni nad bezvodnim Na₂SO₄, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Nakon rastrljavanja eterom, odsisan je bijeli talog **7**.

Iskorištenje: 0,043 g (51 %).

t_f 195–196 °C (raspad).

MS (m/z) 213,2 (M+1)⁺.

IR (KBr) ν_{\max} 3246, 3130, 3102, 2830, 2364, 1628, 1566, 1498, 1454, 1364, 1330, 1246, 1144, 1076, 990, 906, 872, 834, 748, 630 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,46 (s, 1H, 1), 8,19 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 6), 7,96 (s, 1H, 9), 7,56-7,59 (dt, $J = 8,3, 1,0$ Hz, 1H, 3), 7,49-7,53 (m, 1H, 4), 7,19-7,23 (m, 1H, 5); 5,30 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, 15); 4,69 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, 14); 2,75 (s, 3H, 13).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 149,84 (2), 140,78 (11), 140,70 (10), 133,41 (12), 127,70 (8), 127,66 (4), 121,62 (6), 121,21 (7), 119,03 (5), 111,87 (3), 108,77 (9), 64,60 (14), 20,29 (13).

3.8. Sinteza [1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il]metanola (8)

Suspenciji 0,03 g spoja **7** (0,14 mmol) i 0,064 g (0,197 mmol) Cs_2CO_3 u suhom DMF-u dodano je na s.t. u atmosferi argona 0,017 mL (0,023 g, 0,155 mmol) 80 %-tne otopine propargil bromida u toluenu. Reakcijska smjesa miješana je 2 h na s.t. Zatim joj je dodano 20 mL vode te je ekstrahirana diklormetanom (2×20 mL). Organski slojevi su sakupljeni i isprani vodom (2×20 mL). Zatim su osušeni nad bezvodnim Na_2SO_4 , filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Nakon rastrljavanja eterom, odsisan je bijeli talog **8**.

t_f 225–230 °C (raspad).

MS (m/z) 251,1 ($M+1$) $^+$.

IR (KBr) ν_{max} 3160, 2928, 2108, 1622, 1562, 1458, 1334, 1206, 1040, 964, 878, 746 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,25 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 5), 8,03 (s, 1H, 8), 7,78 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, 2), 7,59-7,63 (m, 1H, 3), 7,29 (t, 1H, 4), 5,45 (d, 2H, 13), 5,35 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, 14), 4,68 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, 1'), 3,35 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H, 3'), 3,04 (s, 3H, 12).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 150,83 (1), 141,27 (10), 140,52 (9), 133,22 (11), 129,53 (6), 128,23 (3), 121,52 (5), 121,05 (7), 120,04 (4), 110,36 (2), 109,11 (8), 75,50 (2'), 64,33 (13), 34,19 (1'), 22,45 (12).

3.9. Sinteza *N*-triazolnih derivata β -karbolina i cimetne kiseline (9, 10)

U otopinu 0,04 g (0,159 mmol) spoja **8** i 0,002 g (0,008 mmol) bakrovog (II) acetata u metanolu dokapana je otopina 0,176 mmol odgovarajućeg azida u metanolu. Reakcijska smjesa je miješana preko noći na s.t. nakon čega je uparena do suha. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz dodatak Al₂O₃ i pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat/metanol (3:1:0,5) te rastrljavanja u smjesi eter/petroleter, odsisan je bijeli talog.

3.9.1. Sinteza [1-metil-9-({1-[(2E)-3-fenilprop-2-en-1-il]-1H-1,2,3-triazol-4-il}metil)-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il]metanola (9)

Količina azida **1**: 0,028g (0,176 mmol).

Iskorištenje: 0,032 g (49 %).

*t*_f 197–201 °C (raspad).

MS (*m/z*) 410,3 (M+1)⁺

IR (KBr) ν_{\max} 3188, 3118, 3066, 2924, 2868, 2358, 1622, 1562, 1462, 1364, 1334, 1032, 1254, 1204, 1122, 1066, 1038, 1004, 968, 858, 746, 694, 636 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,23 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5), 8,02 (s, 1H, 8), 7,98 (s, 1H, 3'), 7,82 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 2), 7,55-7,59 (m, 1H, 3), 7.41 – 7.22 (m, 6H, 4, 8'-12'); 6,51 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, 6'), 6,41 (dt, *J* = 15,9; 6,1 Hz, 1H, 5'), 5,90 (s, 2H, 1'); 5,33 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, 14), 5,07 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, 13), 4,67 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H, 4'), 3,05 (s, 3H, 12).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 150,27 (1), 144,17 (10), 141,35 (9), 140,56 (11), 135,64 (7'), 133,46 (2'), 133,41 (5'), 129,10 (6), 128,66 (3), 128,10 (9', 11'), 128,06 (8', 12'), 126,51 (10'), 123,66 (3'), 122,72 (6'), 121,41 (5), 120,99 (7), 119,71 (4), 110,61 (2), 109,07 (8), 64,35 (13), 51,27 (1'), 39,73 (4'), 23,15 (12).

3.9.2. Sinteza [9-({1-[(2E)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-1H-1,2,3-triazol-4-il}metil)-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il]metanola (10)

Količina azida **4**: 0,033g (0,176 mmol).

Iskorištenje: 0,03 g (43 %).

t_f 202–205 °C (raspad).

MS (m/z) 440,3 (M+1)⁺.

IR (KBr) ν_{\max} 3986, 3114, 3062, 2842, 1654, 1606, 1560, 1512, 1460, 1342, 1288, 1252, 1178, 1126, 1044, 966, 816, 750, 638. cm^{-1} .

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,23 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 5), 8,02 (s, 1H, 8), 7,96 (s, 1H, 3'), 7,82 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, 2), 7,61 – 7,52 (m, 1H, 3), 7,32 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, 8', 12'), 7,26 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, 4), 6,87 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, 9', 11'), 6,47 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, 6'), 6,25 (dt, $J = 15,8$; 6,5 Hz, 1H, 5'), 5,90 (s, 2H, 1'), 5,33 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, 14), 5,03 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, 13), 4,67 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H, 4'), 3,74 (s, 3H, 13'), 3,05 (s, 3H, 12).

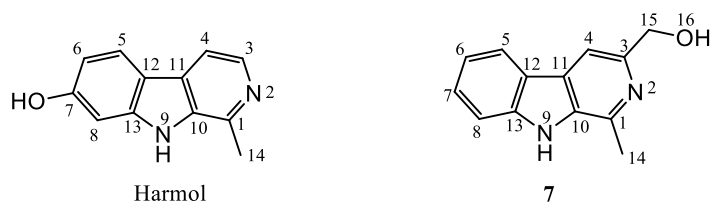
¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 159,20 (10'), 150,26 (1), 144,14 (10), 141,35 (9), 140,56 (11), 133,45 (2'), 133,19 (5'), 129,09 (7'), 128,24 (6), 128,05 (8', 12'), 127,86 (7), 122,61 (3'), 121,40 (6'), 121,05 (5), 120,98 (7), 119,71 (4), 114,06 (9', 11'), 110,60 (2), 109,07 (8), 64,35 (13), 55,11 (13'), 51,41 (1'), 39,73 (4'), 23,15 (12).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Harmin, prirodni spoj β -karbolinske strukture, predstavlja spoj uzor za nove antimalarike na temelju kojih je dizajnirana serija njegovih derivata koji su triazolskom poveznicom povezani s cimetnim ostatkom.

Na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta prethodno je sintetizirana serija derivata harmina koji su preko triazolske poveznice povezani s cimetnim ostatkom. Ti derivati su pokazali antimalarijsko djelovanje.

Kako bi proširili knjižnicu spojeva s derivatima koji imaju drugačiji β -karbolinski prsten, sintetizirana su dva nova derivata β -karbolina (**9** i **10**) koji u položaju 3 β -karbolinskog prstena imaju hidroksimetilensku skupinu a cimetni ostatak je vezan preko triazolske poveznice na atomu dušika β -karbolinskog prstena na položaju 9 (Slika 18).



Slika 18 Strukturne formule harmola i spoja **7**

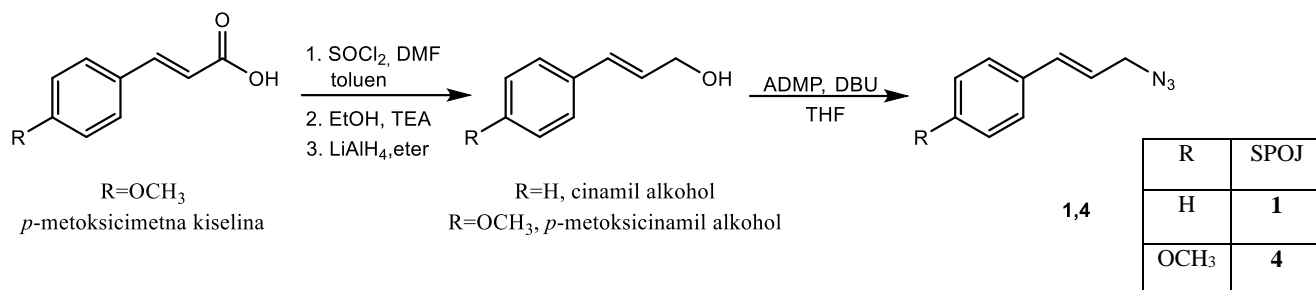
Početni spoj u sintezi β -karbolina bio je metilni ester triptofana, iz kojeg je Pictet-Spenglerovom reakcijom u mikrovalnom reaktoru, uz acetaldehid dimetil acetal (ADMA) i trifluoroacetnu kiselinu (TFA), dobiven tetrahidro- β -karbolinski spoj (**5**). Produkt je istaložen u obliku kloridne soli. Daljnjom oksidacijom spoja **5** uz Pd/C i Li₂CO₃ u mikrovalnom reaktoru dobiven je β -karbolinski ester (**6**). Zbog transesterifikacije s etanolom koji je korišten kao otapalo dobivena je smjesa metilnog (**6a**) i etilnog (**6b**) estera. Kako je idući korak redukcija kojom nastaje alkohol, smjesa produkata nije predstavljala problem. Redukcijom smjese estera **6** uz LiAlH₄ u atmosferi argona, dobiven je β -karbolinski alkohol **7**.

U sljedećem koraku alkohol **7** je preveden u *N*-propargilni derivat **8**. Prvotni cilj bio je sintetizirati *O*-propargilirani derivat (supstitucija na položaju 3 β -karbolinskog prstena), međutim u korištenim uvjetima (Cs_2CO_3 je korišten kao baza) je gotovo u potpunosti favorizirana supstitucija na dušiku umjesto na kisiku. Unatoč tome, dobiveni *N*-propargilirani derivat **8** upotrebljen je idućem koraku sinteze.

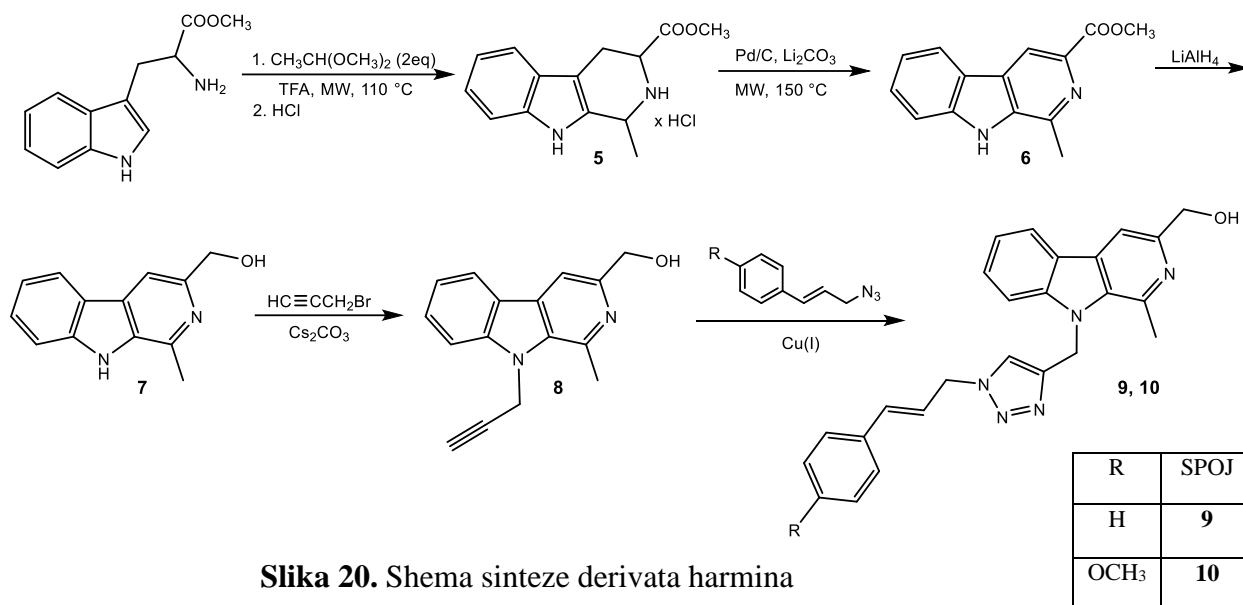
Za sintezu konačnih produkata **9** i **10**, korištena je azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (CuAAC).

Za sintezu azida cimetne kiseline **1** kao početni spoj korišten je cinamil alkohol koji je u jednom reakcijskom koraku preveden u odgovarajuću azid dok je sinteza azida *p*-metoksicimetne kiseline **4** započela iz *p*-metoksicimetne kiseline koja je u odgovarajućem azid prevedena u 4 sintetska koraka. Ključni korak u sintezi azida iz odgovarajuće cimetne kiseline je redukcija etilnog estera u alkohol. Kako je dvostruka veza u alifatskom dijelu molekule također osjetljiva na LiAlH_4 postojala je mogućnost da se i ona reducira. Međutim, hlađenje reakcijske smjese na $-5\text{ }^\circ\text{C}$ omogućilo je selektivnu redukciju estera (Slika 19).

N-propargilirani derivat harmina **8** reagirao je s odgovarajućim azidima **1** i **4** u klik reakciji uz bakar (I) kao katalizator. Dobiveni produkti (**9** i **10**) dosad nisu opisani u literaturi. U daljnim istraživanjima na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta biti će im ispitano antimalarijsko djelovanje.



Slika 19. Shema sinteze azida cimetne i *p*-metoksicimetne kiseline

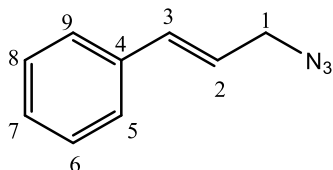


Slika 20. Shema sinteze derivata harmina

Konačne produkte reakcije bilo je potrebno pročistiti, za što se najboljom pokazala kromatografija na koloni i u nekim slučajevima rastrljavanje u smjesi etera i petroletera. Kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm. Na vrh kolone dodan je sloj aluminijevog oksida u svrhu pročišćavanja spoja od ostataka bakrenog katalizatora. Za konačne produkte najboljom se pokretnom fazom pokazala smjesa sastava cikloheksan/etilacetat/metanol (3:1:0,5), uz adsorpciju uzorka na silikagel prije dodatka na kolonu. Prilikom korištenja pokretne faze sastava diklormetan/metanol (95:5), kroz kolonu su prošli i ostaci katalizatora.

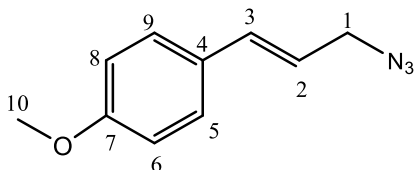
Strukture sintetiziranih spojeva (**1**, **4-10**) određene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (MS, IR, ¹H i ¹³C NMR.). Krutim produktima određene su i temperature tališta. Analitički i spektroskopski podaci prikazani su u Tablicama 1-8.

Tablica 1. Analitički podaci za[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]benzen (1)



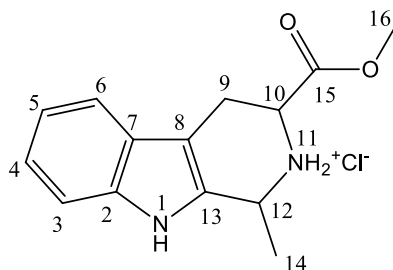
Molekulska formula	C ₉ H ₉ N ₃
Mr	159,19
IR (KBr) ν_{\max} (cm ⁻¹)	3027, 2926, 2100, 1493, 1448, 1351, 1236, 967, 883, 746, 693
¹ H NMR	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 7,51-7,28 (m, 5H, 5, 6, 7, 8, 9), 6,71 (d, 1H, <i>J</i> = 15,8 Hz, 3), 6,39 (dt, 1H, <i>J</i> = 15,8, 6,5 Hz, 2), 4,04 (d, 2H, <i>J</i> = 6,5 Hz, 1)
¹³ C NMR	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 136,31 (4), 134,24 (3), 129,16 (6, 8), 128,53 (5, 9), 127,00 (7), 123,56 (2), 52,60 (1).

Tablica 2. Analitički podaci za 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-metoksibenzen (4)



Molekulska formula	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O
Mr	189,21
IR (KBr) ν_{\max} (cm ⁻¹)	3035, 3004, 2953, 2935, 2837, 2101, 1652, 1607, 1512, 1464, 1250, 1175, 1034, 970, 841, 803
¹ H NMR	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 7,42 (d, 2H, 5 , 9), 6,92 (d, 2H, 6 , 8), 6,65 (d, 1H, <i>J</i> = 15,8 Hz, 3), 6,17-6,27 (dt, 1H, <i>J</i> = 15,8, 6,7 Hz, 2), 3,99 (d, 2H, <i>J</i> = 6,7 Hz, 1), 3,76 (s, 3H, 10).
¹³ C NMR	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 159,23 (7), 133,69 (3); 128,44 (4), 127,89 (5 , 9), 120,42 (2), 114,11 (6 , 8), 55,13 (10), 52,36 (1).

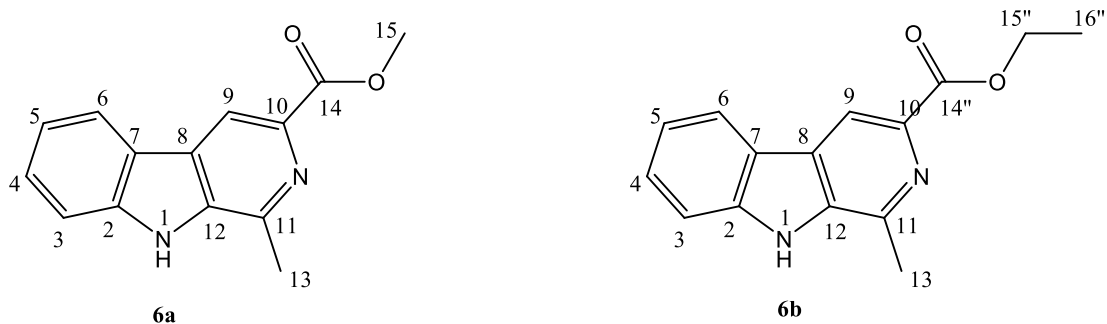
Tablica 3. Analitički podaci za metil-3-(metoksikarbonil)-1-metil-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*,9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-ium klorid (5)



t_f (°C)	230-234 (raspad)
Molekulska formula	$C_{14}H_{17}ClN_2O_2$
Mr	280,75
MS (m/z)	*spoj se raspada pri mjerenju
IR (KBr) ν_{max} (cm ⁻¹)	3584, 3386, 3230, 3118, 2946, 2786, 2732, 2626, 2474, 2116, 1872, 1752, 1602, 1442, 1360, 1316, 1274, 1226, 1190, 1168, 1086, 1016, 960, 934, 882, 806, 734, 702, 662, 622
¹ H NMR	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11,42 (s, 1H, 1); 10,50 (s, 1H, 11); 10,08 (s, 1H, 11); 7,48 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H, 6); 7,38 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H, 3); 7,10-7,15 (m, 1H, 7); 7,01-7,05 (m, 1H, 5); 4,76 (d, <i>J</i> = 7,4 Hz, 1H, 12); 4,67-4,59 (m, 1H, 10); 3,86 (s, 3H, 16); 3,26-3,32 (m, 1H, 9), 3,03-3,11 (m, 1H, 9), 1,75 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3H, 14).
¹³ C NMR	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 169,29 (15), 136,40 (2), 130,89 (13), 125,59 (7), 121,83 (4), 119,18 (5), 118,08 (6), 111,45 (3), 104,26 (8), 54,56 (10), 53,07 (16), 49,68 (12), 22,31 (9), 16,46 (14).

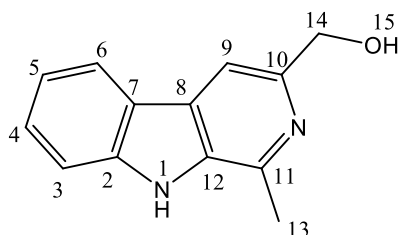
Tablica 4. Analitički podaci za smjesu metil 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-karboksilat (6a) i etil 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-karboksilat (6b)

*zbog transesterifikacije s otapalom etanolom dobivena je smjesa metilnog i etilnog estera



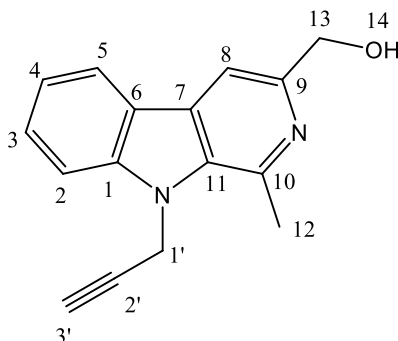
t_f (°C)	212-216 (smjesa estera)
Molekulska formula	$C_{14}H_{12}N_2O_2$ (6a), $C_{15}H_{14}N_2O_2$ (6b)
Mr	240,26 (M+1) ⁺ (6a); 254,28 (M+1) ⁺ (6b)
MS (m/z)	241,103 (6a); 255,118 (6b)
IR (KBr) ν_{max} (cm ⁻¹)	3328, 3092, 3044, 2982, 2950, 2620, 1806, 1714, 1626, 1598, 1568, 1500, 1436, 1348, 1308, 1256, 1146, 1116, 1032, 984, 900, 848, 784, 742, 644
¹ H NMR	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12,06 (s, 1H, 1); 8,77 (d, $J = 5,1$ Hz, 1H, 9); 8,36 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 6); 7,67 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, 3); 7,59 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, 4); 7,31 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, 5); 4,35-4,41 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H, 15''); 3,91 (s, 1H, 15); 2,83 (s, 3H, 13); 1,38 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, 16'').
¹³ C NMR	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 166,15 (14''); 165,66 (14); 142,15 (10); 140,74 (2); 136,14, 136,20 (11); 135,91 (12); 128,33 (4); 126,75 (8); 122,09 (6); 121,34 (7); 120,12 (5); 115,87-115,95 (9); 112,31 (3); 60,43 (15''); 51,83 (15); 20,39 (13); 14,41 (16'').

Tablica 5. Analitički podaci za {1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il}metanol (7)



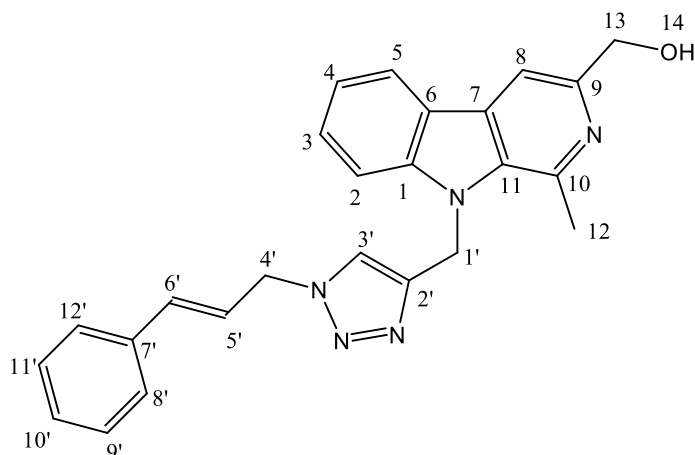
t_f (°C)	195-196 (raspad)
Molekulska formula	$C_{13}H_{12}N_2O$
Mr	212,25
MS (m/z)	213,2 (M+1) ⁺
IR (KBr) ν_{max} (cm ⁻¹)	3246, 3130, 3102, 2830, 2364, 1628, 1566, 1498, 1454, 1364, 1330, 1246, 1144, 1076, 990, 906, 872, 834, 748, 630
¹ H NMR	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11,46 (s, 1H, 1), 8,19 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H, 6), 7,96 (s, 1H, 9), 7,56-7,59 (dt, <i>J</i> = 8,3, 1,0 Hz, 1H, 3), 7,49-7,53 (m, 1H, 4), 7,19-7,23 (m, 1H, 5); 5,30 (t, <i>J</i> = 5,8 Hz, 1H, 15); 4,69 (d, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, 14); 2,75 (s, 3H, 13).
¹³ C NMR	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO) δ 149,84 (2), 140,78 (11), 140,70 (10), 133,41 (12), 127,70 (8), 127,66 (4), 121,62 (6), 121,21 (7), 119,03 (5), 111,87 (3), 108,77 (9), 64,60 (14), 20,29 (13).

Tablica 6. Analitički podaci za [1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il]metanol (8)



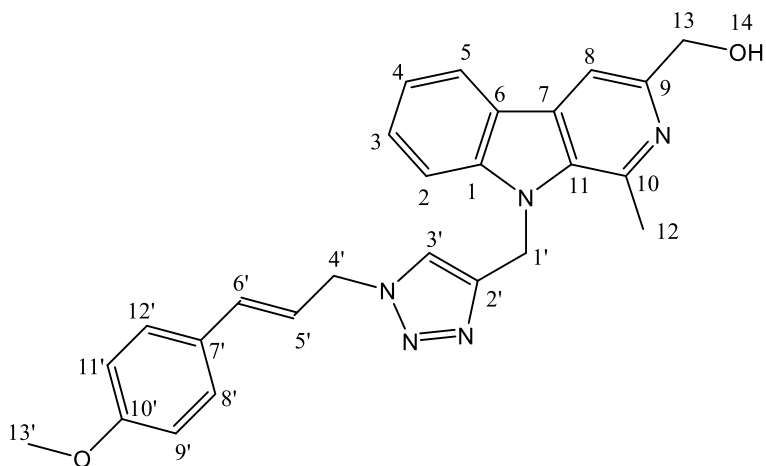
t_f (°C)	225-230 (raspad)
Molekulska formula	$C_{16}H_{14}N_2O$
Mr	250,30
MS (m/z)	251,1 (M+1) ⁺
IR (KBr) ν_{max} (cm ⁻¹)	3160, 2928, 2108, 1622, 1562, 1458, 1334, 1206, 1040, 964, 878, 746, 578
¹ H NMR	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,25 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 5), 8,03 (s, 1H, 8), 7,78 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, 2), 7,59-7,63 (m, 1H, 3), 7,29 (t, 1H, 4), 5,45 (d, 2H, 13), 5,35 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, 14), 4,68 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, 1'), 3,35 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H, 3'), 3,04 (s, 3H, 12).
¹³ C NMR	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 150,83 (1), 141,27 (10), 140,52 (9), 133,22 (11), 129,53 (6), 128,23 (3), 121,52 (5), 121,05 (7), 120,04 (4), 110,36 (2), 109,11 (8), 75,50 (2'), 64,33 (13), 34,19 (1'), 22,45 (12).

Tablica 7. Analitički podaci za [1-metil-9-({1-[(2E)-3-fenilprop-2-en-1-il]-1H-1,2,3-triazol-4-il}metil)-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il]metanol (**9**)



t_f (°C)	197-201 (raspad)
Molekulska formula	$C_{25}H_{23}N_5O$
Mr	409,48
MS (m/z)	410,3 (M+1) ⁺
IR (KBr) ν_{max} (cm ⁻¹)	3188, 3118, 3066, 2924, 2868, 2358, 1622, 1562, 1462, 1364, 1334, 1032, 1254, 1204, 1122, 1066, 1038, 1004, 968, 858, 746, 694, 636
¹ H NMR	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,23 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H, 5), 8,02 (s, 1H, 8), 7,98 (s, 1H, 3'), 7,82 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H, 2), 7,55-7,59 (m, 1H, 3), 7,41 – 7,22 (m, 6H, 4 , 8' - 12'); 6,51 (d, <i>J</i> = 15,9 Hz, 1H, 6'), 6,41 (dt, <i>J</i> = 15,9; 6,1 Hz, 1H, 5'), 5,90 (s, 2H, 1'); 5,33 (t, <i>J</i> = 5,7 Hz, 1H, 14), 5,07 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 2H, 13), 4,67 (d, <i>J</i> = 5,7 Hz, 2H, 4'), 3,05 (s, 3H, 12).
¹³ C NMR	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 150,27 (1), 144,17 (10), 141,35 (9), 140,56 (11), 135,64 (7'), 133,46 (2'), 133,41 (5'), 129,10 (6), 128,66 (3), 128,10 (9' , 11'), 128,06 (8' , 12'), 126,51 (10'), 123,66 (3'), 122,72 (6'), 121,41 (5), 120,99 (7), 119,71 (4), 110,61 (2), 109,07 (8), 64,35 (13), 51,27 (1'), 39,73 (4'), 23,15 (12).

Tablica 8. Analitički podaci za [9-({1-[(2E)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-1H-1,2,3-triazol-4-il}metil)-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-3-il]metanol (10)



t_f (°C)	202-205 (raspad)
Molekulska formula	$C_{26}H_{25}N_5O_2$
Mr	439,51
MS (m/z)	440,3 (M+1) ⁺
IR (KBr) ν_{max} (cm ⁻¹)	3986, 3114, 3062, 2842, 1654, 1606, 1560, 1512, 1460, 1342, 1288, 1252, 1178, 1126, 1044, 966, 816, 750, 638, 578, 530
¹ H NMR	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,23 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H, 5), 8,02 (s, 1H, 8), 7,96 (s, 1H, 3'), 7,82 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H, 2), 7,61 – 7,52 (m, 1H, 3), 7,32 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H, 8' , 12'), 7,26 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1H, 4), 6,87 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H, 9' , 11'), 6,47 (d, <i>J</i> = 15,8 Hz, 1H, 6'), 6,25 (dt, <i>J</i> = 15,8; 6,5 Hz, 1H, 5'), 5,90 (s, 2H, 1'), 5,33 (t, <i>J</i> = 5,7 Hz, 1H, 14), 5,03 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2H, 13), 4,67 (d, <i>J</i> = 5,7 Hz, 2H, 4'), 3,74 (s, 3H, 13'), 3,05 (s, 3H, 12).
¹³ C NMR	¹³ C NMR (101 MHz, DMSO) δ 159,20 (10'), 150,26 (1), 144,14 (10), 141,35 (9), 140,56 (11), 133,45 (2'), 133,19 (5'), 129,09 (7'), 128,24 (6), 128,05 (8' , 12'), 127,86 (7), 122,61 (3'), 121,40 (6'), 121,05 (5), 120,98 (7), 119,71 (4), 114,06 (9' , 11'), 110,60 (2), 109,07 (8), 64,35 (13), 55,11 (13'), 51,41 (1'), 39,73 (4'), 23,15 (12).

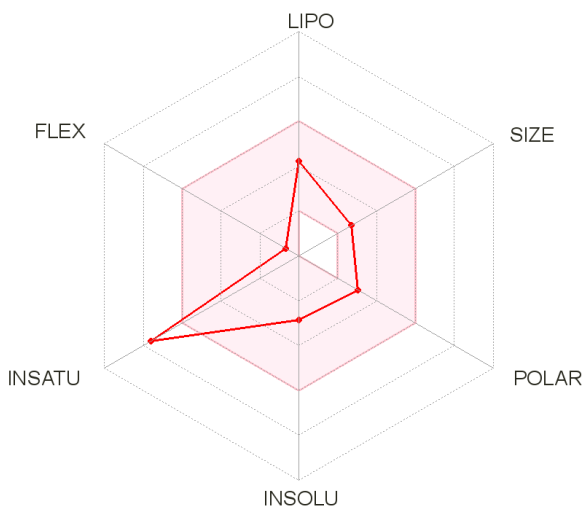
Tablica 9. Procjena strukturnih svojstva molekula 7-10 izračunatih na web stranici**Chemicalize** (<https://chemicalize.com/#/calculation>)

Spoj	7	8	9	10
Broj atoma	28	33	54	58
Broj rotirajućih veza	1	2	6	7
Broj donora vodikovih atoma	2	1	1	1
Broj akceptora vodikovih atoma	2	2	4	5
logP	1,32	1,77	3,73	3,57
TPSA (Å ²)	48,91	38,05	68,76	77,99
Polarizabilnost (Å ³)	26,47	30,90	48,68	51,17
Molarna refraktivnost (cm ³ /mol)	62,20	74,68	133,38	139,84
Lipinskijeva pravila	4	4	4	4

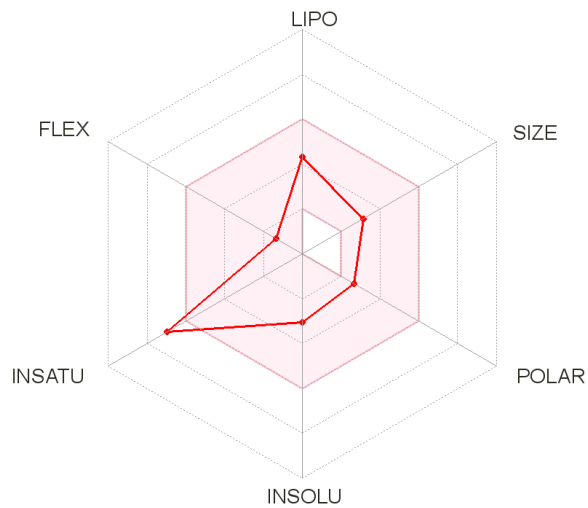
Prema procjeni strukturnih svojstva molekula **7-10** dobivenih na web stranici Chemicalize, svi spojevi zadovoljavaju sva Lipinskijeva pravila i prema tome se za ove molekule može očekivati dobra oralna bioraspoloživost.

Tablica 10. Procjena farmakokinetičkih parametara molekula 7-10 izračunatih na web**stranici SwissADME** (<http://www.swissadme.ch/index.php>)

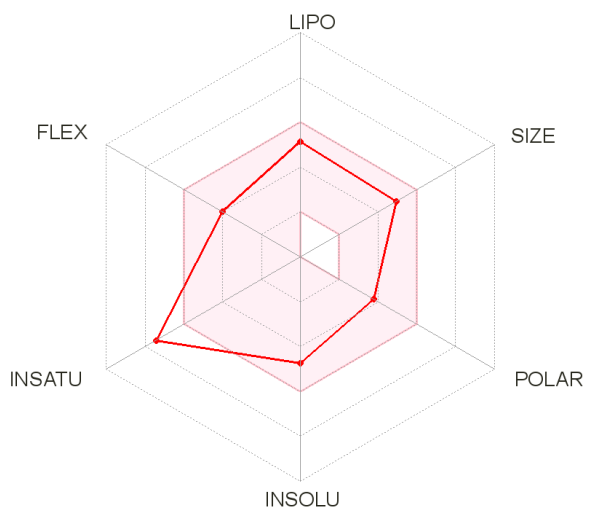
Spoj	7	8	9	10
GI apsorpcija	Visoka	Visoka	Visoka	Visoka
Prolazi KM-barijeru	Da	Da	Da	Ne
P-gp substrat	Da	Da	Da	Da
CYP 1A2 inhibitor	Da	Da	Da	Ne
CYP 2C19 inhibitor	Ne	Ne	Da	Da
CYP 2C9 inhibitor	Ne	Ne	Da	Da
CYP 2D6 inhibitor	Da	Da	Da	Da
CYP 3A4 inhibitor	Da	Ne	Ne	Da



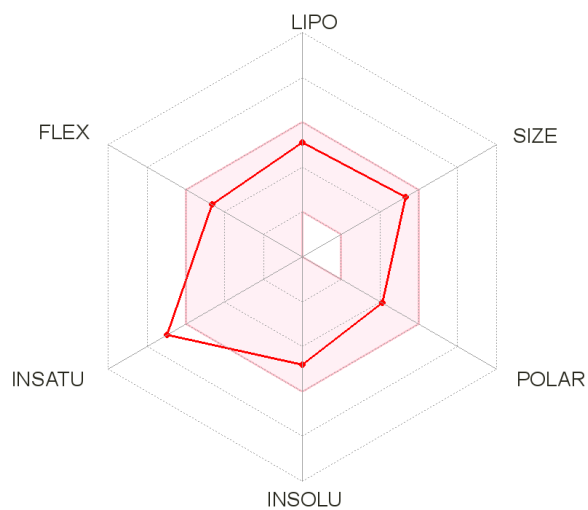
7



8



9



10

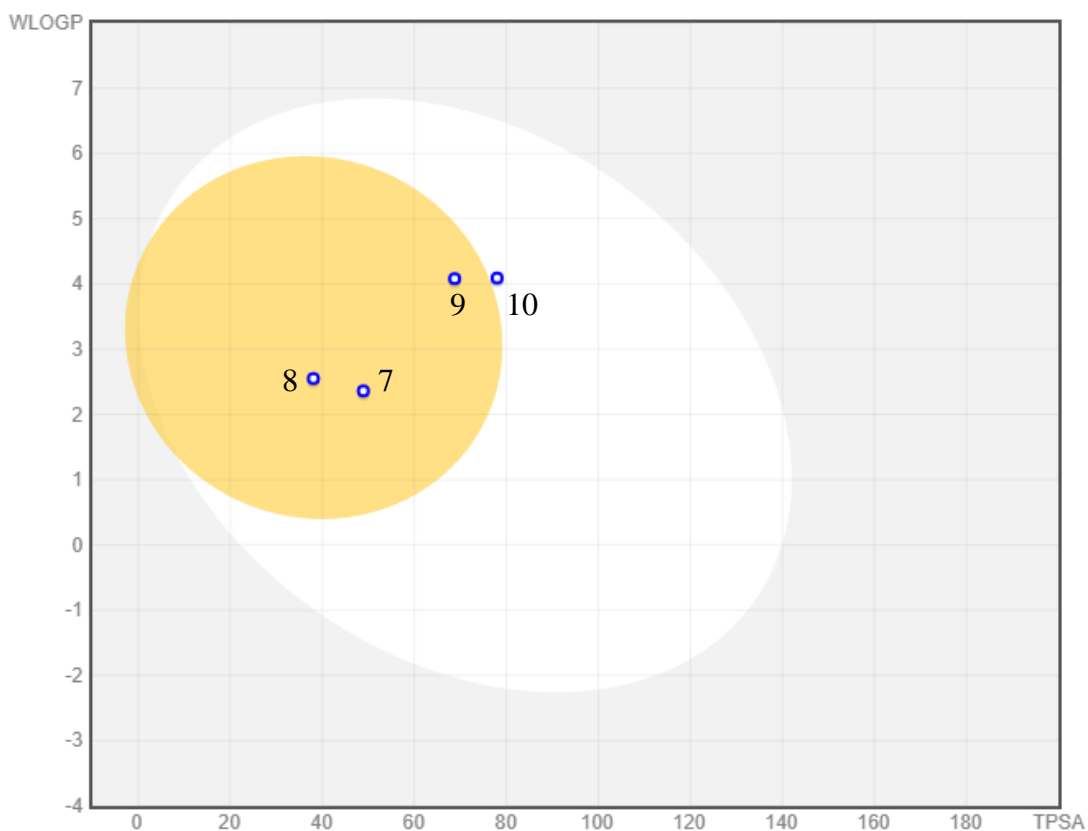
Slika 21. Bioavailability radar za molekule 7-10 - grafički prikaz procjene parametara koji utječu na oralnu biorasploživost molekula dobiven na web stranici SwissADME.

Svaki kut šesterokuta na grafičkom prikazu predstavlja jedno svojstvo koje utječe na oralnu bioraspoloživost molekula (Daiana i sur., 2017; <http://www.swissadme.ch/index.php>).

- LIPO – lipofilnost prikazana XLOGP3 vrijednošću (particijski koeficijent između n-oktanola i vode $\log P_{o/w}$ izračunat u XLOGP3 programu, verzija 3.2.2)
- SIZE – veličina molekula prikazana molarnom masom
- POLAR – polarnost molekule prikazana vrijednošću TPSA izračunatoj prema Ertl P. i sur. 2000 J. Med. Chem.
- INSOLU – netopljivost prikazana vrijednošću logS izračunatoj topološkom metodom ESOL implementiranom iz Delaney JS. 2004 J. Chem. Inf. Model.
- INSATU – insaturacija prikazana omjerom sp^3 hibridiziranih ugljikovih atoma i ukupnim brojem ugljikovih atoma u molekuli (frakcija C_{sp^3})
- FLEX – fleksibilnost molekule prikazana brojem rotirajućih veza

Obojeno područje unutar šesterokuta predstavlja područje vrijednosti navedenih svojstva povoljnih za oralnu bioraspoloživost molekula (LIPO $-0,7 < XLOGP3 < +5,0$; SIZE $150 \text{ g/mol} < Mw < 500 \text{ g/mol}$; POLAR $20 \text{ \AA}^2 < TPSA < 130 \text{ \AA}^2$; INSOLU $0 < \text{LogS (ESOL)} < 6$; INSATU $0,25 < \text{frakcija } C_{sp^3} < 1$; FLEX $0 < \text{broj rotirajućih veza} < 9$).

Prema podacima dobivenih iz *bioavailability radara* molekula **7-10** (Slika 21), sve četiri molekule se nalaze u optimalnom području oralne bioraspoloživosti prema svim parametrima osim insaturacije zbog niske frakcije sp^3 hibridiziranih ugljikovih atoma ($<0,25$). Također je vidljiva veća razlika u fleksibilnosti između molekula **9** i **10** u odnosu na molekule **7** i **8** zbog većeg broja rotirajućih veza u molekulama **9** i **10**. Prema podacima iz Tablice 8. i *bioavailability radara* (Slika 21), sve navedene molekule bi trebale imati zadovoljavajuću oralnu bioraspoloživost.



Slika 22. *Boiled EGG* model za spojeve **7-8** generiran na web stranici SwissADME.

Boiled EGG model (Slika 22) je grafički prikaz generiran na web stranici SwissADME koji na temelju strukture molekula predviđa njihove farmakokinetičke parametre. Molekule su označene plavim ili crvenim točkama. Za molekule označene plavim točkama program predviđa da jesu supstrati P-glikoproteina, a za one označene crvenim točkama da nisu. Podatak o tome da li je molekula supstrat P-glikoproteina bitan je za procjenu efluksa te molekule kroz biološke membrane - npr. da li će molekula biti izbačena iz gastrointestinalne stijenke u lumen, ili da li će biti izbačena iz mozga. Za molekule koje se na grafičkom prikazu nalaze unutar bijelo obojenog područja predviđena je pasivna apsorpcija u gastrointestinalnom traktu, a za one koje se nalaze unutar žuto obojenog područja predviđeno je da bi mogli prelaziti kroz krvno moždanu barijeru (Daiana i sur., 2017).

Prema podacima iz *Boiled EGG* modela na Slici 22 predviđeno je da će se spojevi **7-10** pasivno apsorbirati iz gastrointestinalnog trakta te da su sve navedene molekule supstrati P-glikoproteina. Također je predviđeno da spojevi **7-9** prolaze prolaze krvno moždanu barijeru, a spoj **10** ne.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu opisana je sinteza novih *N*-triazolskih derivata β -karbolina i cimetnog ostatka.

Sintetizirani su i karakterizirani sljedeći spojevi:

- [(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]benzen (**1**)
- 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-metoksibenzen (**4**)
- 3-(metoksikarbonil)-1-metil-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*,9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-ium klorid (**5**)
- Smjesa metil 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-karboksilata (**6a**) i etil 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-karboksilata (**6b**)
- {1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il}metanol (**7**)
- [1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il]metanol (**8**)
- [1-metil-9-({1-[(2E)-3-fenilprop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}metil)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il]metanol (**9**)
- [9-({1-[(2E)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}metil)-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-3-il]metanol (**10**)

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

U daljnim ispitivanjima, koja prelaze okvire ovog rada, sintetiziranim derivatima β -karbolina (**9**, **10**), koji dosada nisu opisani u literaturi, će biti ispitano antimalarijsko djelovanje.

6. LITERATURA

Angel SO, Matrajt M, Echeverria PC. A Review of Recent Patents on the Protozoan Parasite HSP90 as a Drug Target. *Recent Pat Biotechnol*, 2013, 7, 2–8.

Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Sivanna M, Sam B, Sopha C, Chuor CM. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med*, 2014, 371, 411–423.

Ayoob I, Hazari YM, Lone SH, Shakeel-u-Rehman, Khuroo MA, Fazili KM, Bhat KA. Phytochemical and Cytotoxic Evaluation of Peganum Harmala: Structure Activity Relationship Studies of Harmine. *ChemistrySelect*, 2017, 2, 2965–2968.

Bayih AG, Folefoc A, Mohon AN, Eagon S, Anderson M, Pillai DR. In vitro and in vivo anti-malarial activity of novel harmine-analog heat shock protein 90 inhibitors: a possible partner for artemisinin, *Malar J*, 2016, 15, 579.

Berg R, Straub BF. Advancements in the mechanistic understanding of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Beilstein J Org Chem*, 2013, 9, 2715–2750.

Biamonte M, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23, 2829–2843.

Corey VC, Lukens AK, Istvan ES, Lee MCS, Franco V, Magistrado P, Coburn-Flynn O, Sakata-Kato T, Fuchs O, Gnädig NF, Goldgof G, Linares M, Gomez-Lorenzo MG, De Cózar C, Lafuente-Monasterio MJ, Prats S, Meister S, Tanaseichuk O, Wree M, Zhou Y, Willis PA, Gamo FJ, Goldberg DE, Fidock DA, Wirth DF, Winzeler EA. A broad analysis of resistance development in the malaria parasite. *Nat Commun*, 2016, 7, 11901.

Chemicalize <https://chemicalize.com/#/calculation>, pristupljeno 14.6.2019.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *SciRep*, 2017, 7, 42717.

Dolgin E, Motluk A. Heat Shock and Awe, *Nat Med*, 2011, 6, 646–649.

Eagon S, Anderson MO. Microwave-Assisted Synthesis of Tetrahydro- β -carbolines and β -Carbolines. *Eur. J. Org. Chem*, 2014, 1653–1665.

Heravi MM, Zadsirjan V, Malmir M. Application of the Asymmetric Pictet–Spengler Reaction in the Total Synthesis of Natural Products and Relevant Biologically Active Compounds. *Molecules*, 2018, 23, 943.

Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, 2018, 19, 2560.

Ibraheem ZO, Majid RA, Noor SM, Sidek HM, BR. The Potential of β Carbolin Alkaloids to Hinder Growth and Reverse Chloroquine Resistance in Plasmodium falciparum. *Iran J Parasitol*, 2015, 10, 577–583.

Mandoli A. Recent Advances in Recoverable Systems for the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction (CuAAC). *Molecules*, 2016, 21, 1174.

Murillo-Solano C, Dong C, Sanchez CG, Pizarro JC. Identification and characterization of the antiplasmodial activity of Hsp90 inhibitors. *Malar J*, 2017, 16, 292.

Posfai D, Eubanks AL, Keim AI, Lu KY, Wang GZ, Hughes PF, Kato N, Haystead TA, Derbyshire ER. Identification of Hsp90 Inhibitors with Anti-Plasmodium Activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62, e01799–17.

Schopf FH, Beibl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18, 345–360.

Shahinas D, Folefoc A, Pillai DR. Targeting Plasmodium falciparum Hsp90: Towards Reversing Antimalarial Resistance. *Pathogens*, 2013, 2, 33–54.

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

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

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

SwissADME <http://www.swissadme.ch/index.php>, pristupljeno 14.6.2019.

Taldone T, Sun W, Chiosis G. Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17, 2225–2235.

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

Wang T, Mäser P, Picard D. Inhibition of Plasmodium falciparum Hsp90 Contributes to the Antimalarial Activities of Aminoalcohol-carbazoles. *J Med Chem*, 2016, 59, 6344–6352.

White NJ. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*, 2004, 113, 1084–1092.

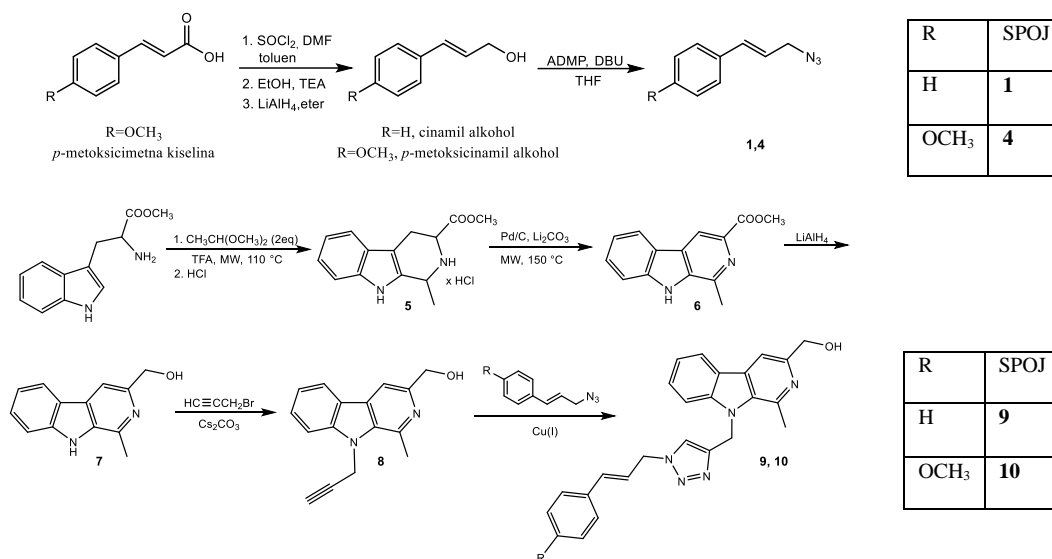
World Malaria report 2018, World Health Organization

Zheng T, Rouhanifard SH, Jalloh AS, Wu P. Click Triazoles for Bioconjugation. *Top Heterocycl Chem*, 2012, 28, 163–183.

7. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

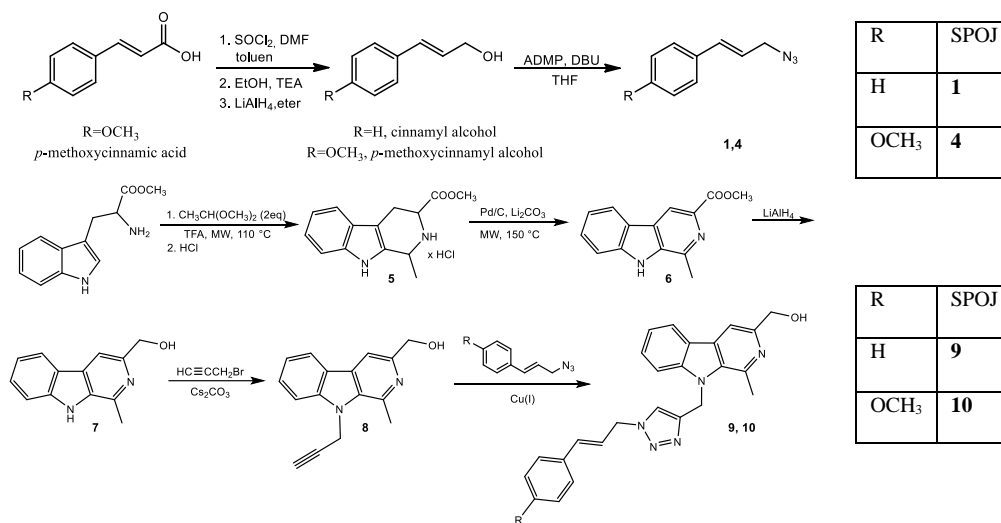
Pregled literature o prirodnim spojevima koji posjeduju antimalarijsko djelovanje pokazao je da harmin, β -karbolinski alkaloid ima potvrđeno *in vivo* i *in vitro* antimalarijsko djelovanje. Mogući mehanizam djelovanja harmina je inhibicija *P. falciparum* Hsp90, koji ima važnu ulogu u razvoju rezistencije na liječenje. U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija novih derivata β -karbolina i cimetne kiseline povezanih 1,2,3-triazolskim mostom s ciljem optimizacije β -karbolinske strukture dobivanja derivata poboljšanog djelovanja. Kao početni spoj u sintezi korišten je metilni ester triptofana, koji je Pictet-Spenglerovom reakcijom u mikrovalnom reaktoru preveden u tetrahydro- β -karbolinski spoj **5**. Njegovom oksidacijom uz Pd/C i Li₂CO₃ dobiven je ester **6** koji je redukcijom s LiAlH₄ preveden u odgovarajući alkohol (**7**). Dobiveni β -karbolinski alkohol je u reakciji s propargil bromidom preveden u *N*-propargilirani derivat **8**. U klik reakciji azid-alkin cikloadicije katalizirane bakrom *N*-propargiliranog derivata **8** i prethodno sintetiziranih azida cimetne **1**, odnosno *p*-metoksicimetne kiseline **4** dobivena su dva 1,2,3-triazolska derivata (**9, 10**).



Strukture sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (*t*_r, MS, IR, ¹H i ¹³C NMR). Sintetiziranim derivatima β -karbolina **9, 10** će u daljnim istraživanjima biti ispitano biološko djelovanje.

SUMMARY

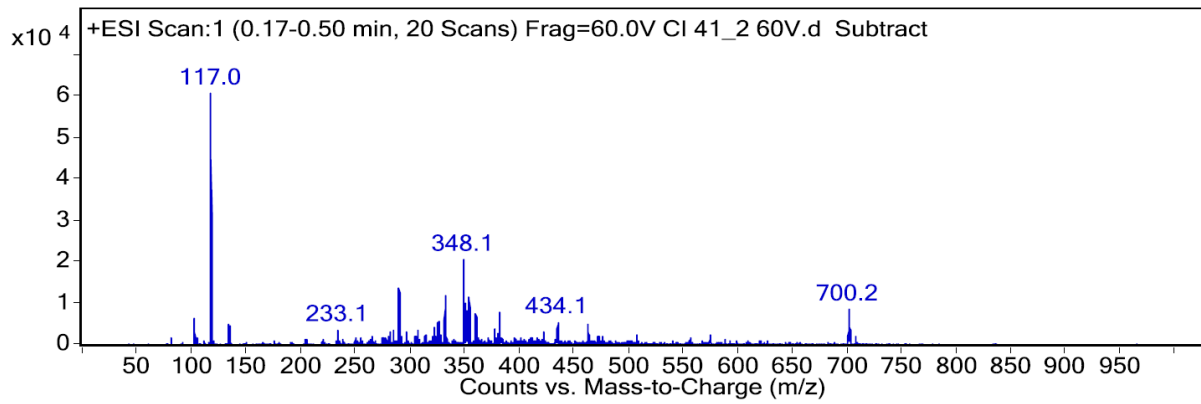
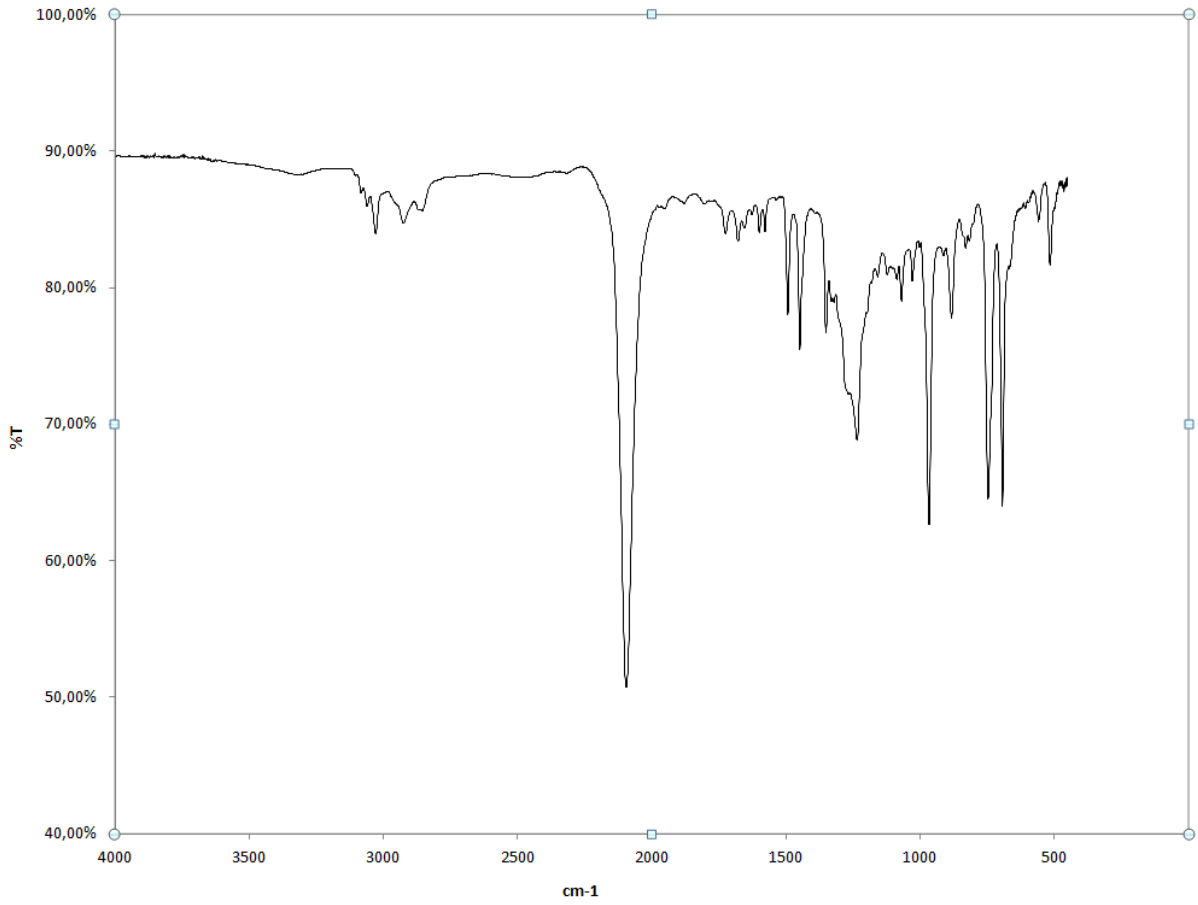
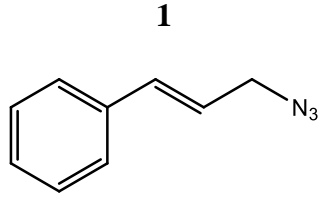
The literature survey revealed a natural product found in several plants, β -carboline alkaloid harmine, to possess *in vivo* and *in vitro* antimalarial activity. Assumed mechanism of action is inhibition of *P. falciparum* Hsp90, which has an important role in the development of antimalarial resistance. This research describes synthesis and characterization of two new derivatives of β -carboline and cinnamic acid linked with 1,2,3-triazole bridge, with the aim of optimizing β -carboline structure in order to achieve increased and more selective antimalarial activity. The initial compound in the synthesis sequence was tryptophan methyl ester, which was converted into tetrahydro- β -carboline **5** compound in Pictet-Spengler reaction. Further oxydation with Pd/C and Li_2CO_3 gave the appropriate ester **6**, which was reduced to corresponding alcohol **7**. The β -carboline alcohol **7** was then converted into *N*-propargylated derivate **8** in the reaction with propargyl bromide. Cooper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition click reaction of the *N*-propargylated derivate **8** and previously synthesized azides of cinnamic (**1**) and *p*-methoxy cinnamic acid (**4**) gave the final compounds 1,2,3-triazole derivatives (**9**, **10**).

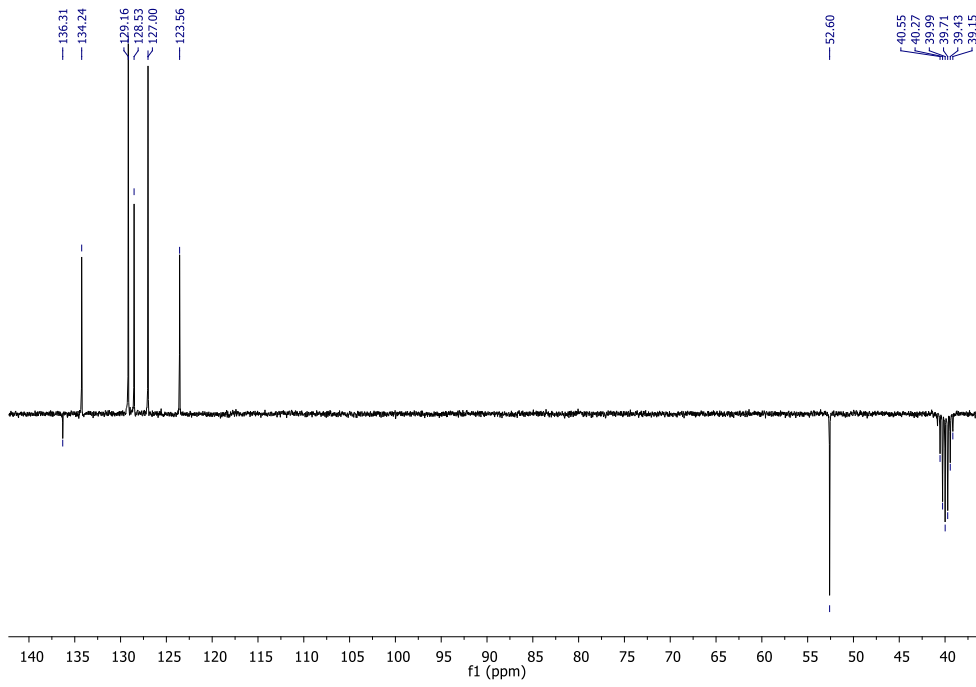
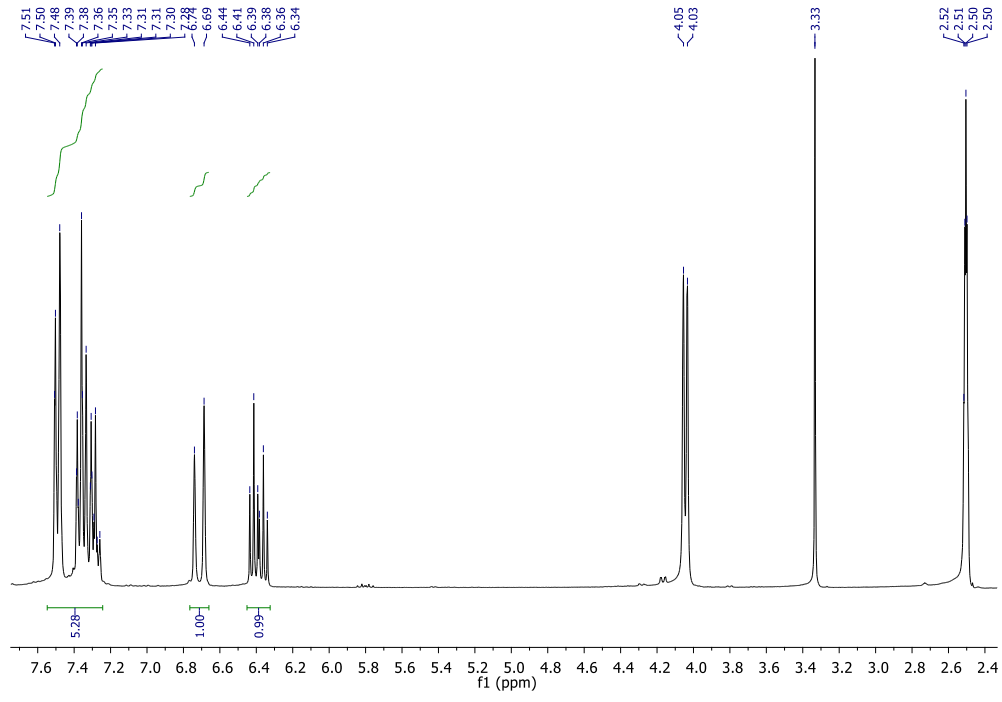


Structures of synthesized compounds were confirmed the usual analytical and spectroscopic methods (m_p , MS, IR, ^1H and ^{13}C NMR). Antimalarial activity of synthesized harmine derivatives **9** and **10** will be tested.

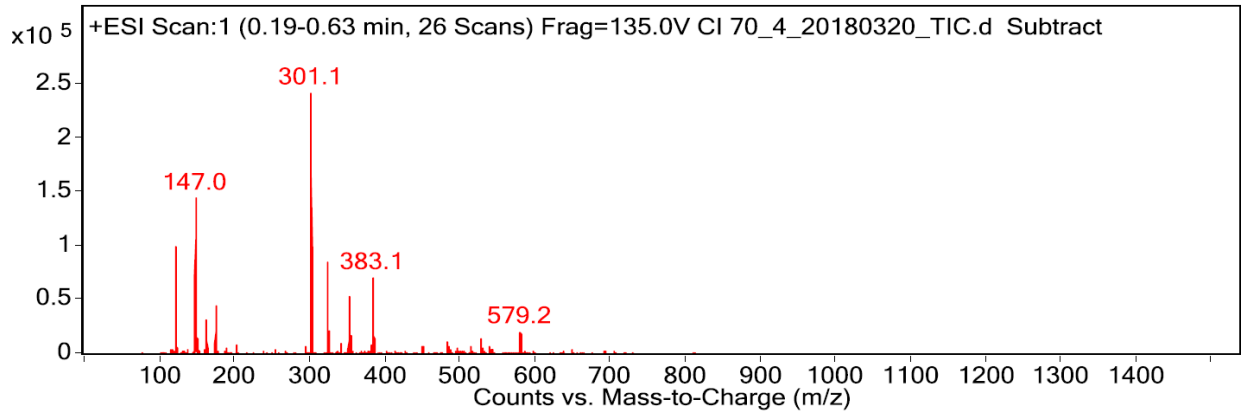
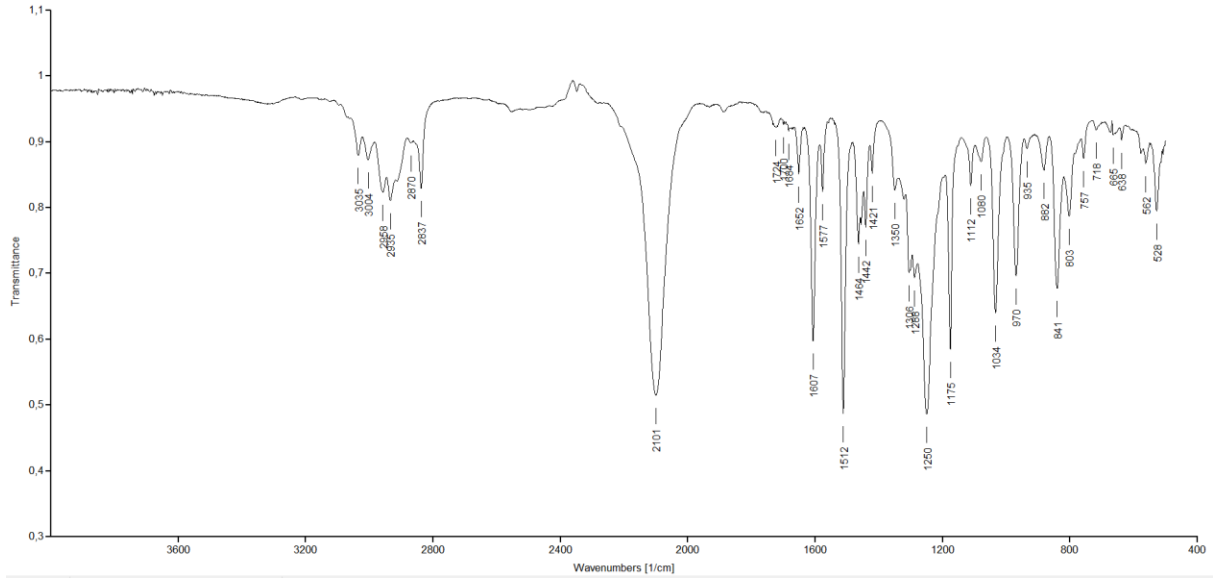
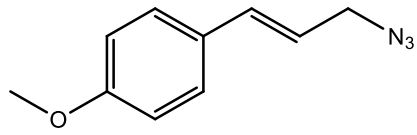
8. PRILOZI

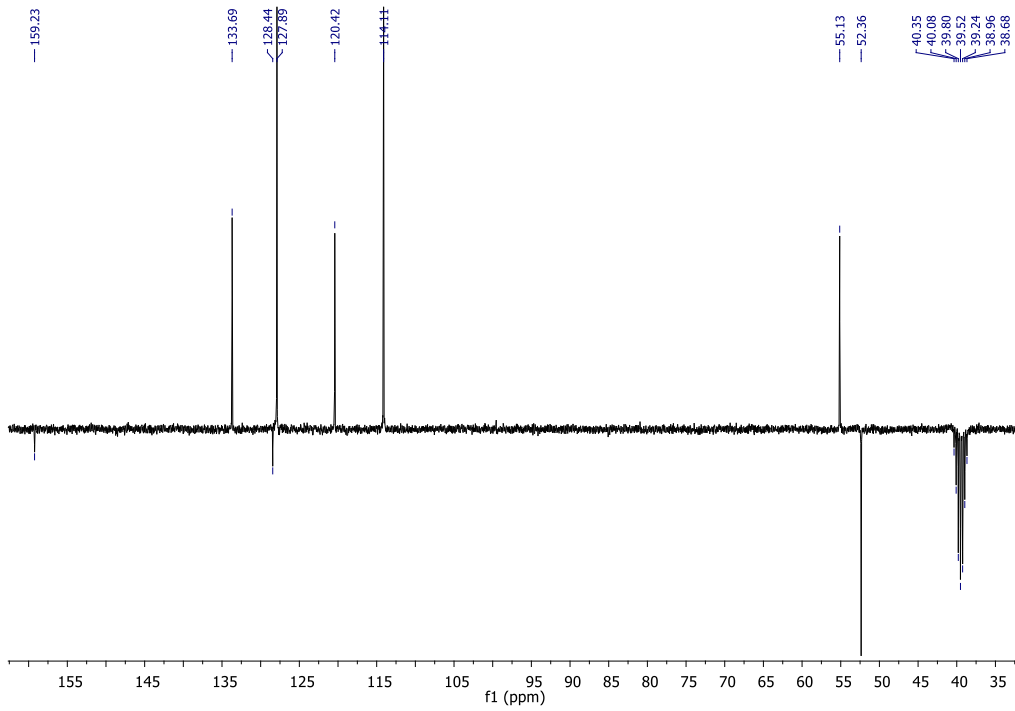
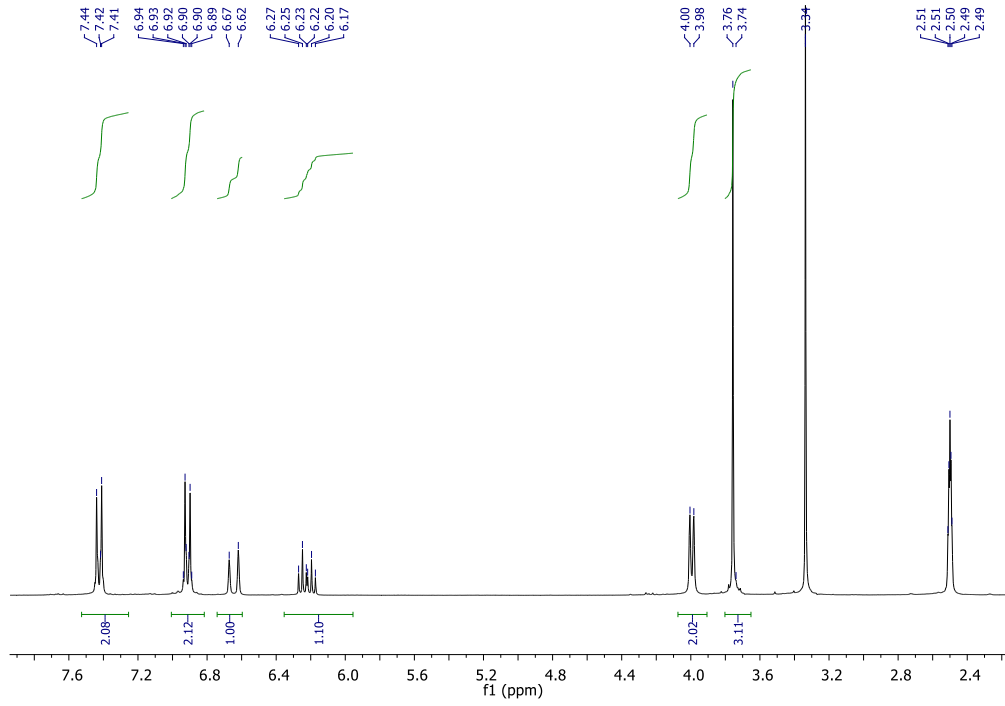
Prilozi sadrže IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR spektre sintetiziranih spojeva



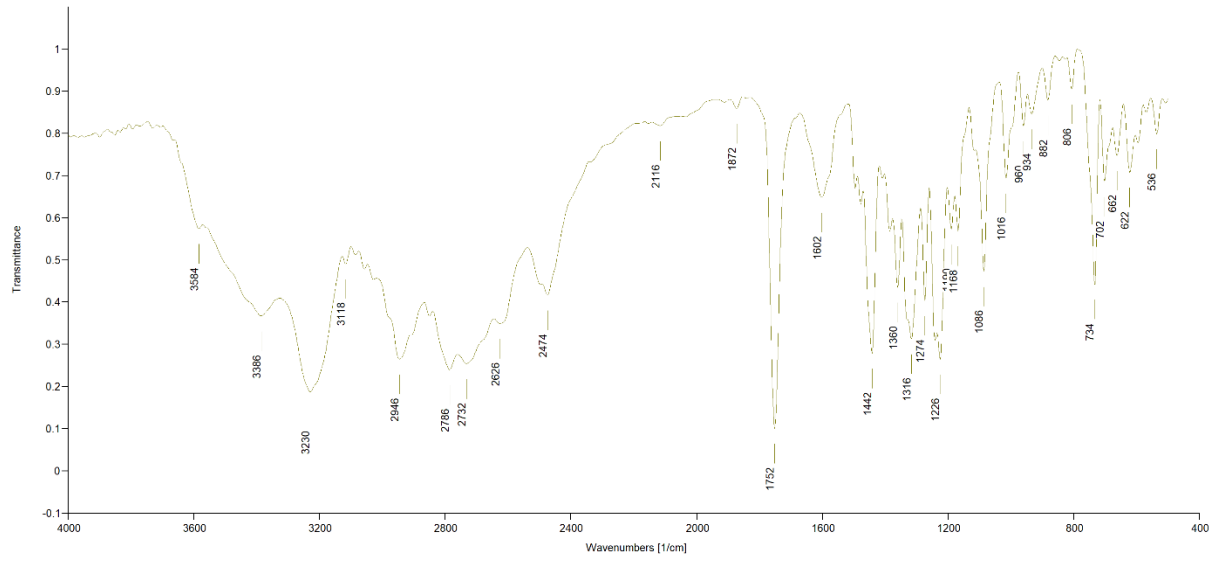
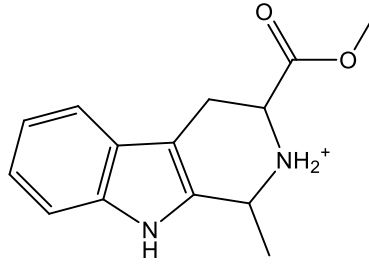


4





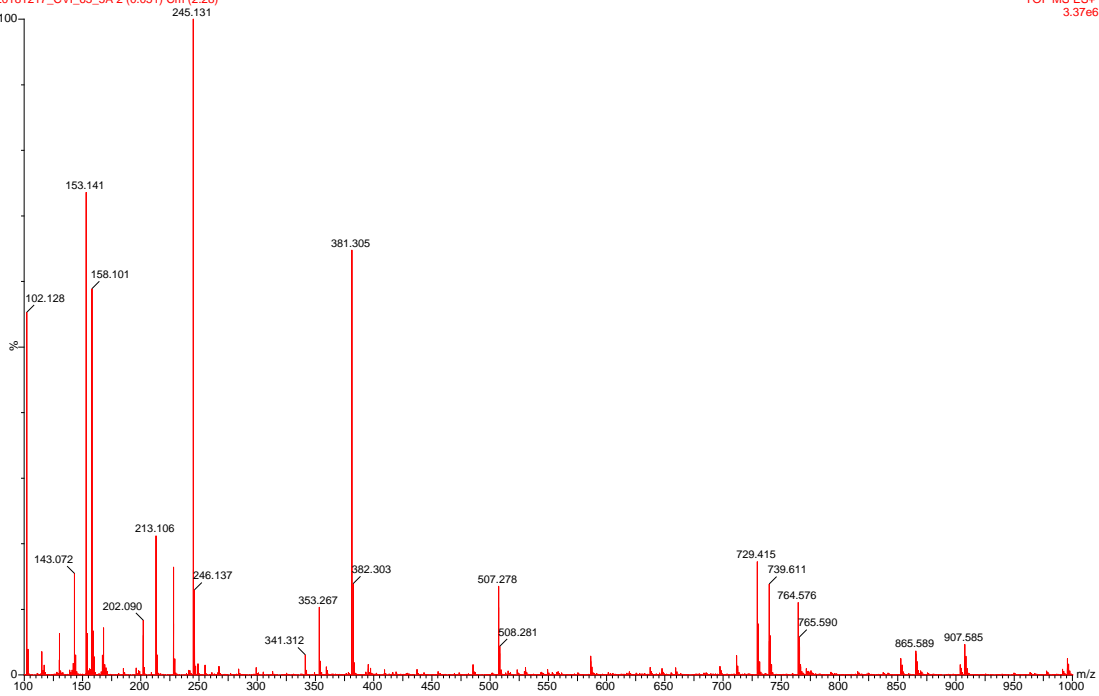
5

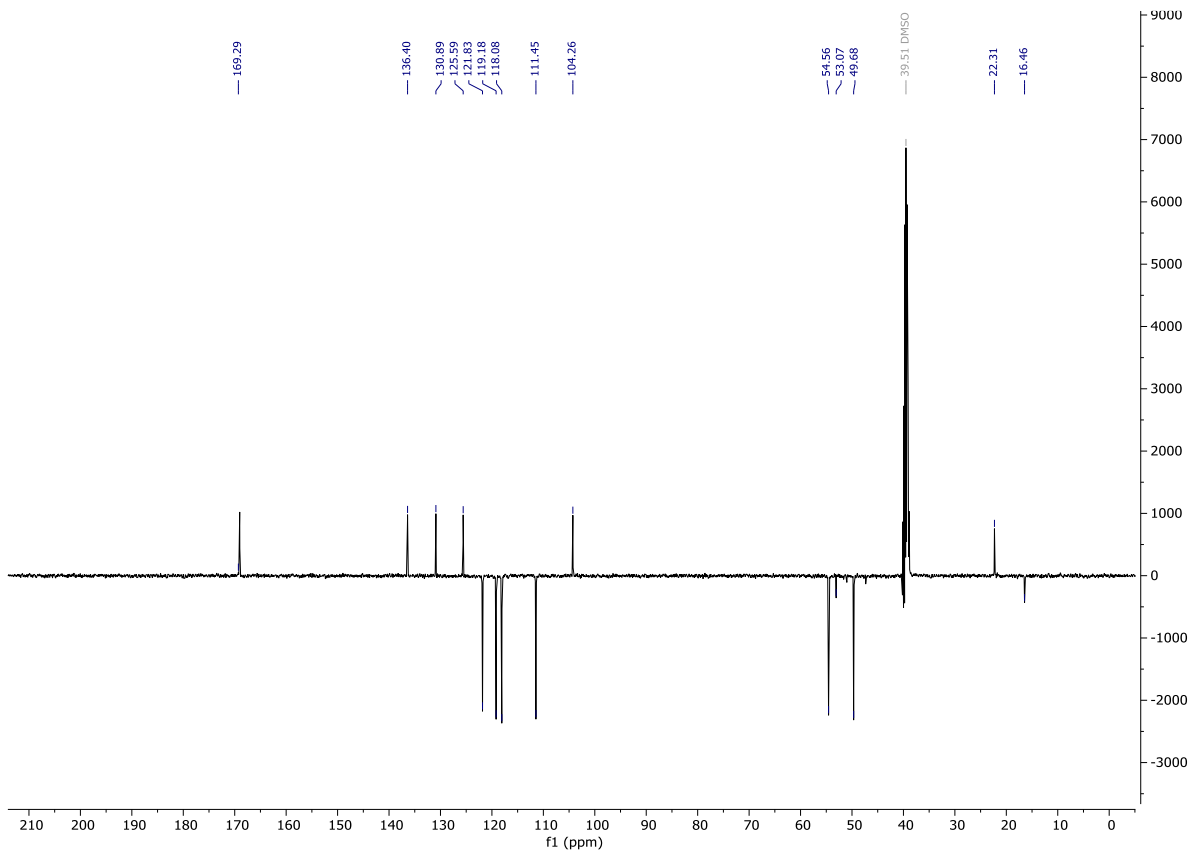
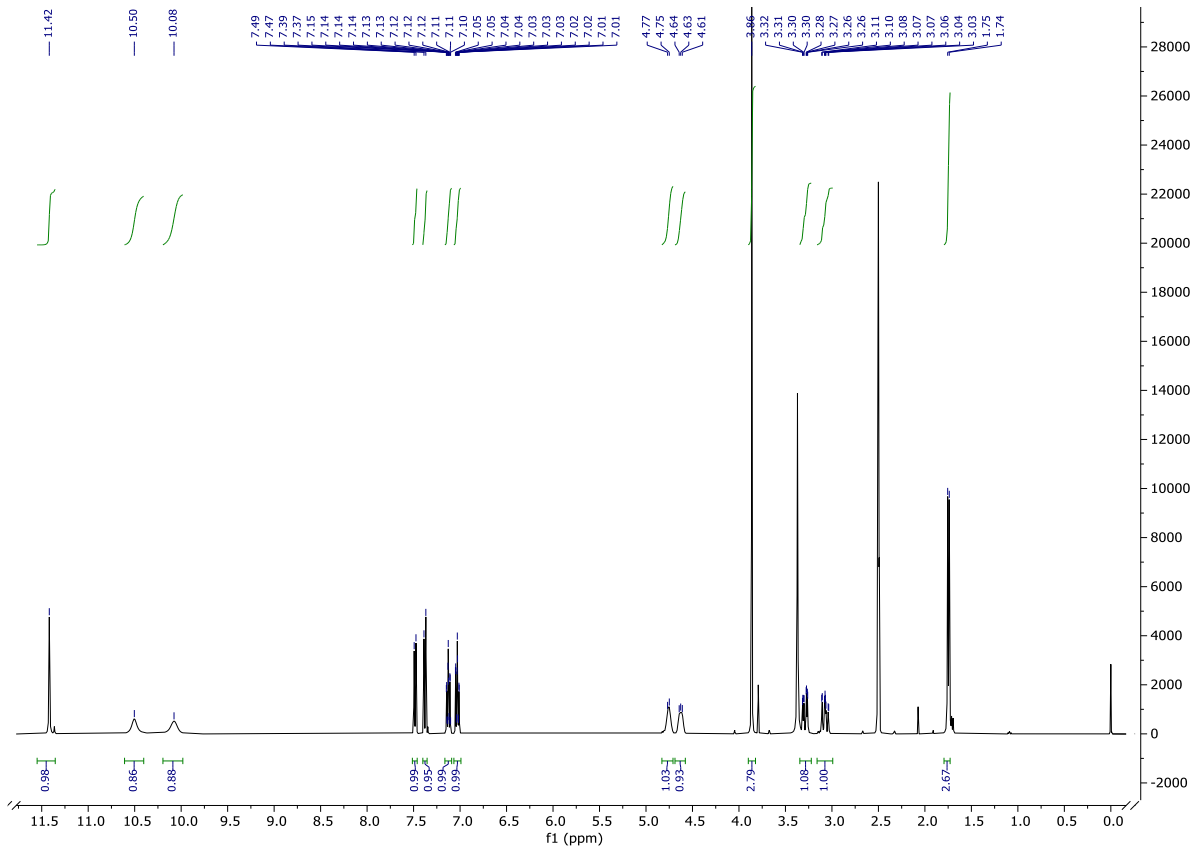


20181217_CVI_63_5A 2 (0.051) Cm (2:28)

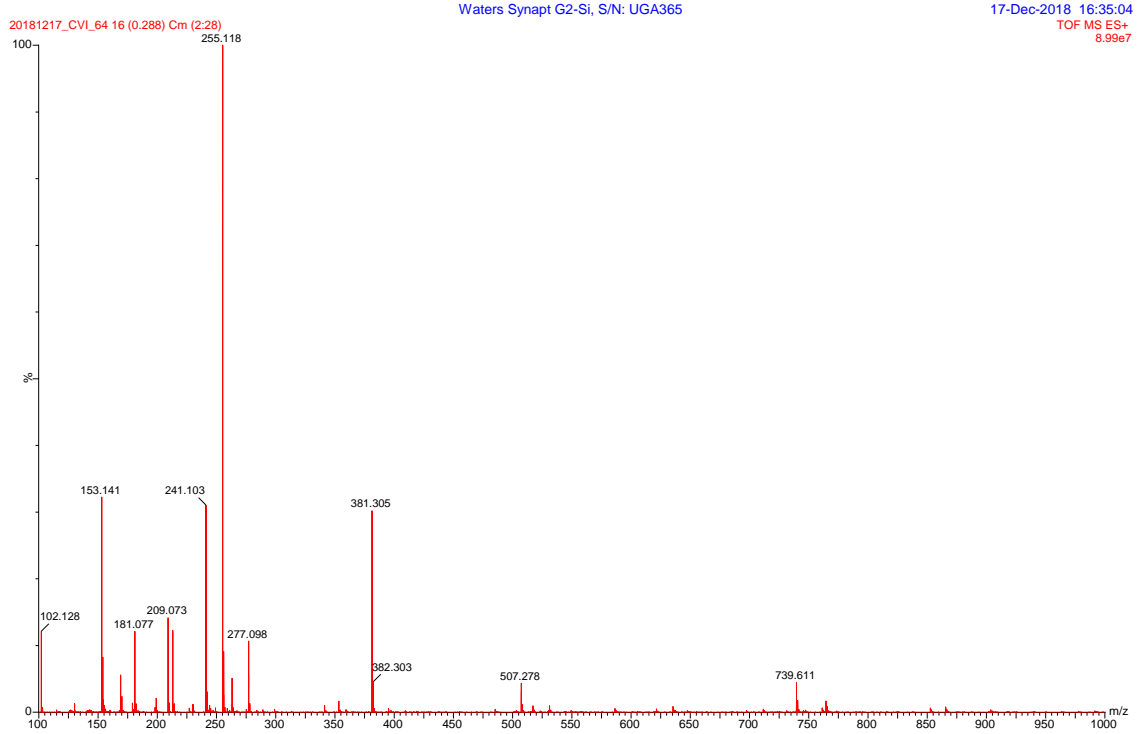
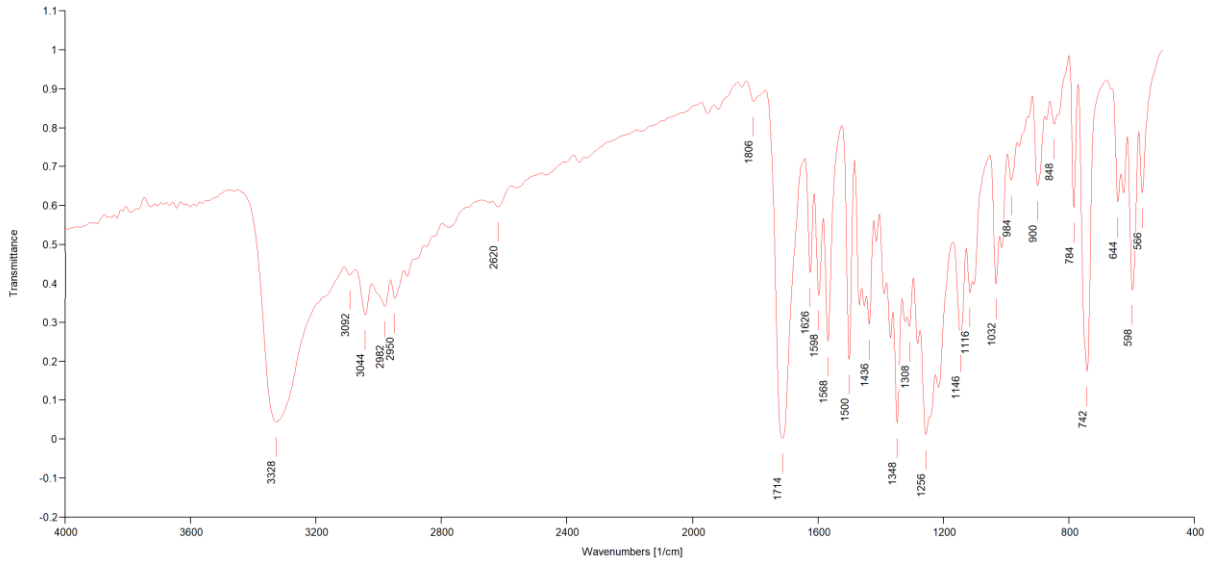
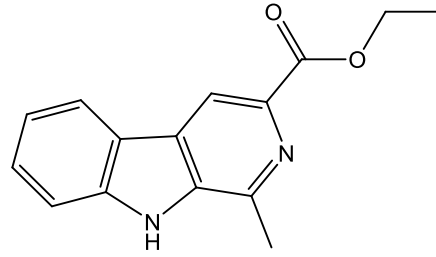
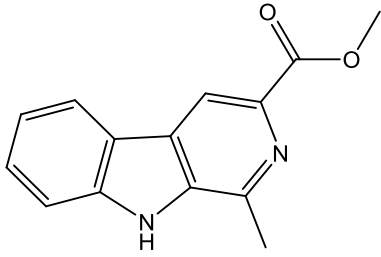
Waters Synapt G2-Si, S/N: UGA365

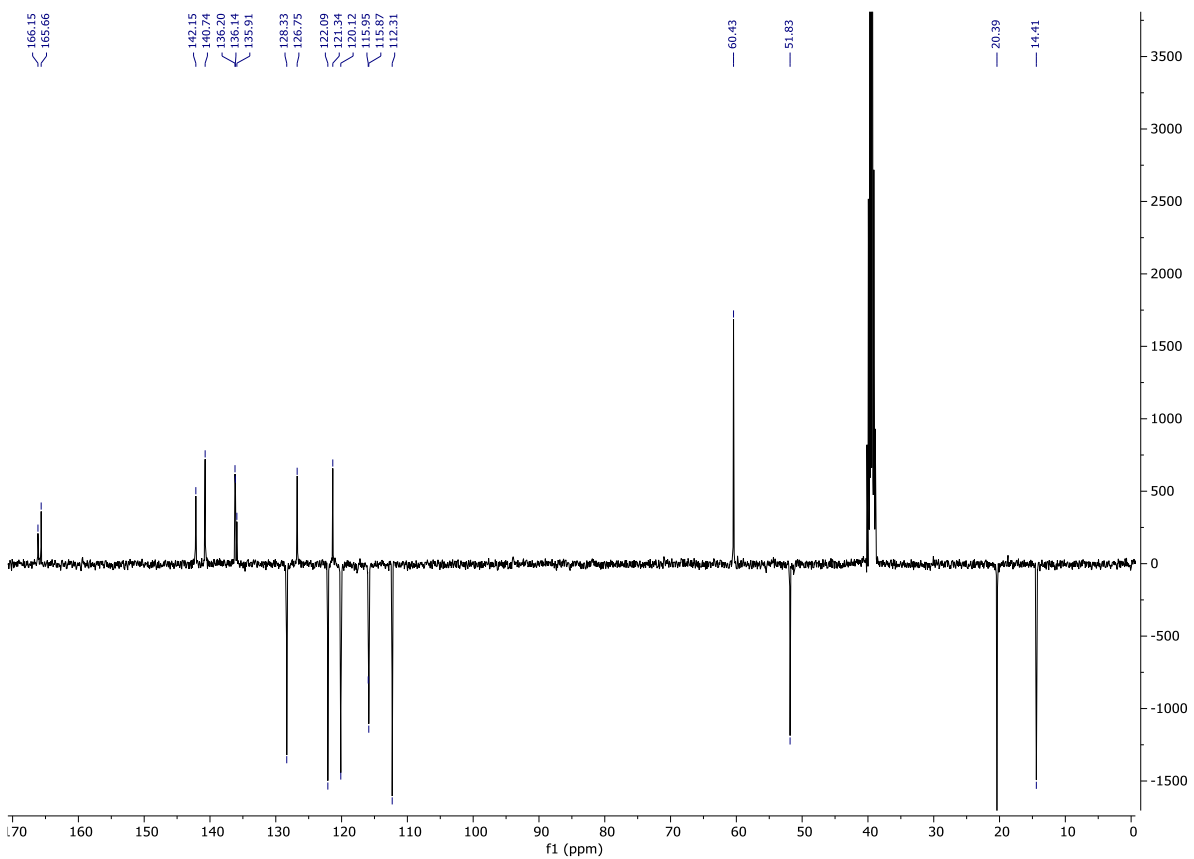
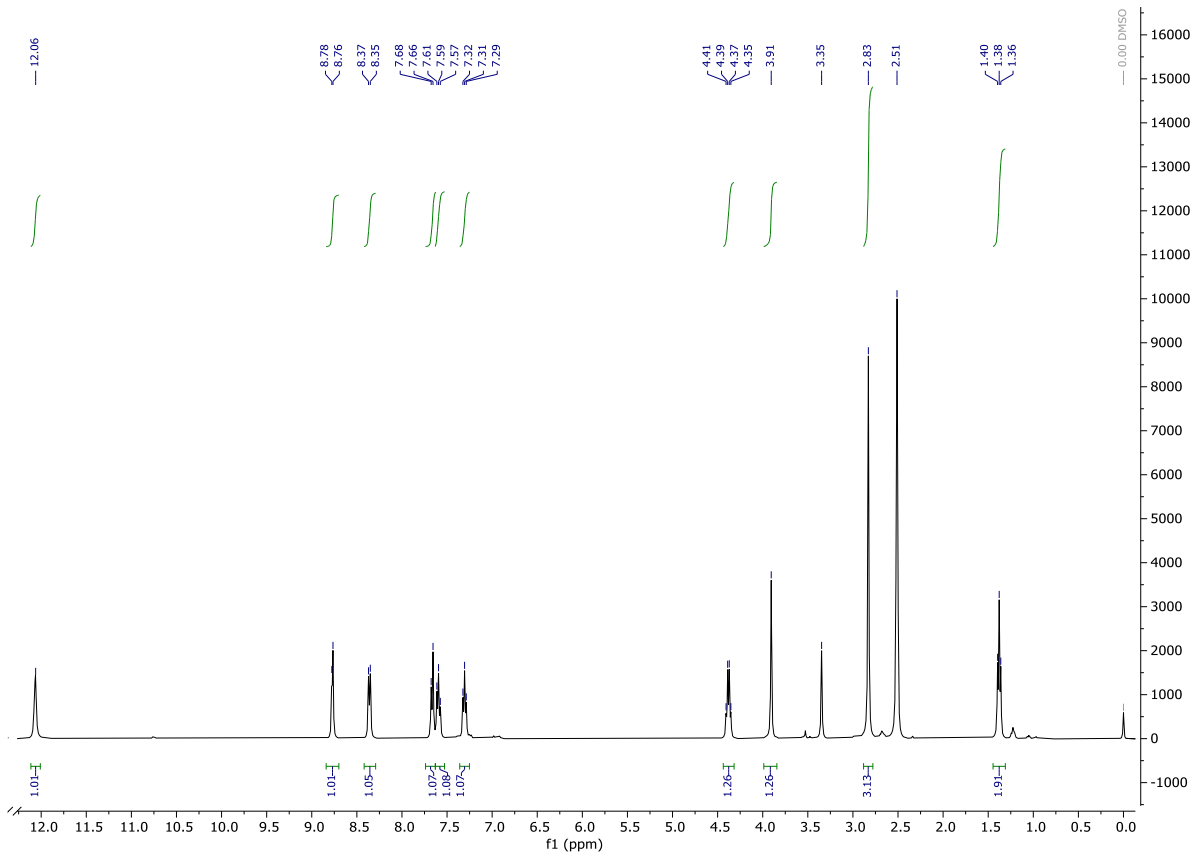
17-Dec-2018 16:40:24
TOF MS ES+
3.37e6



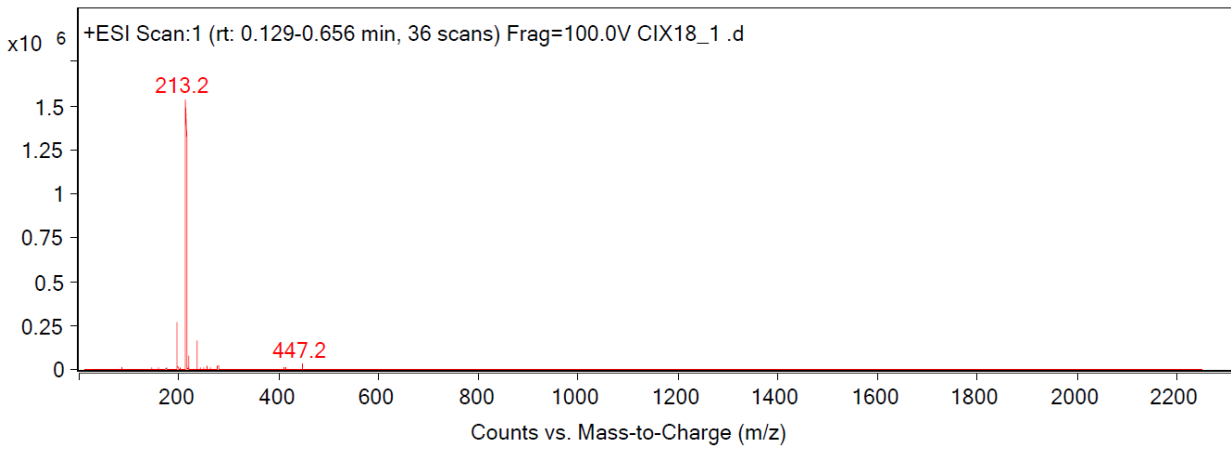
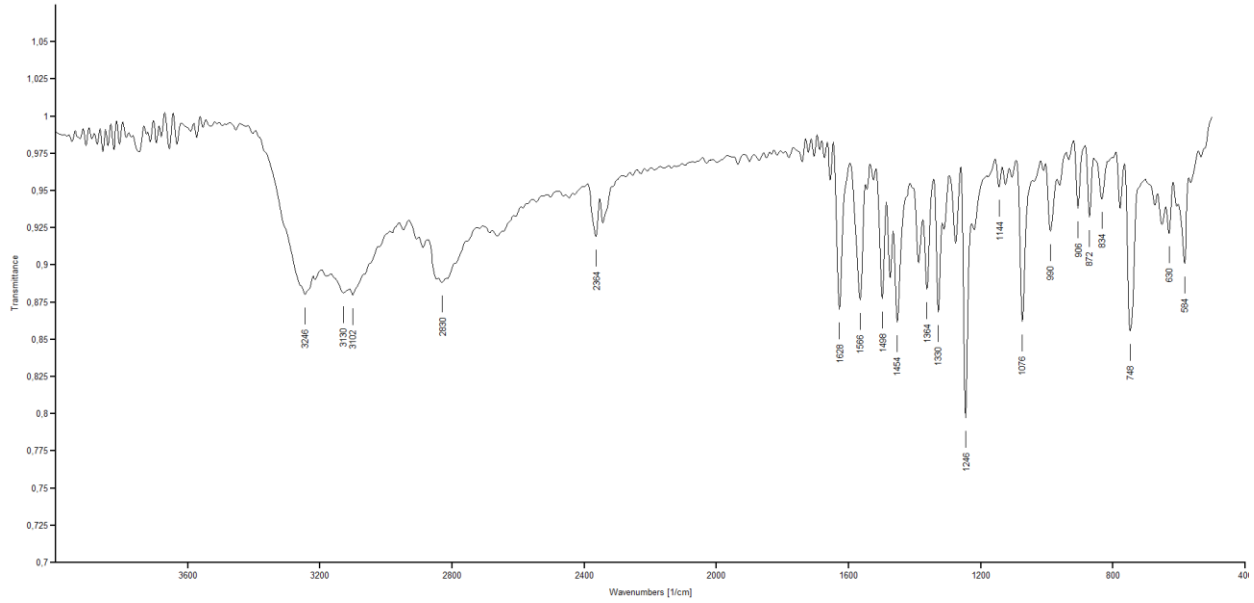
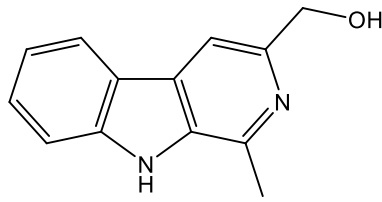


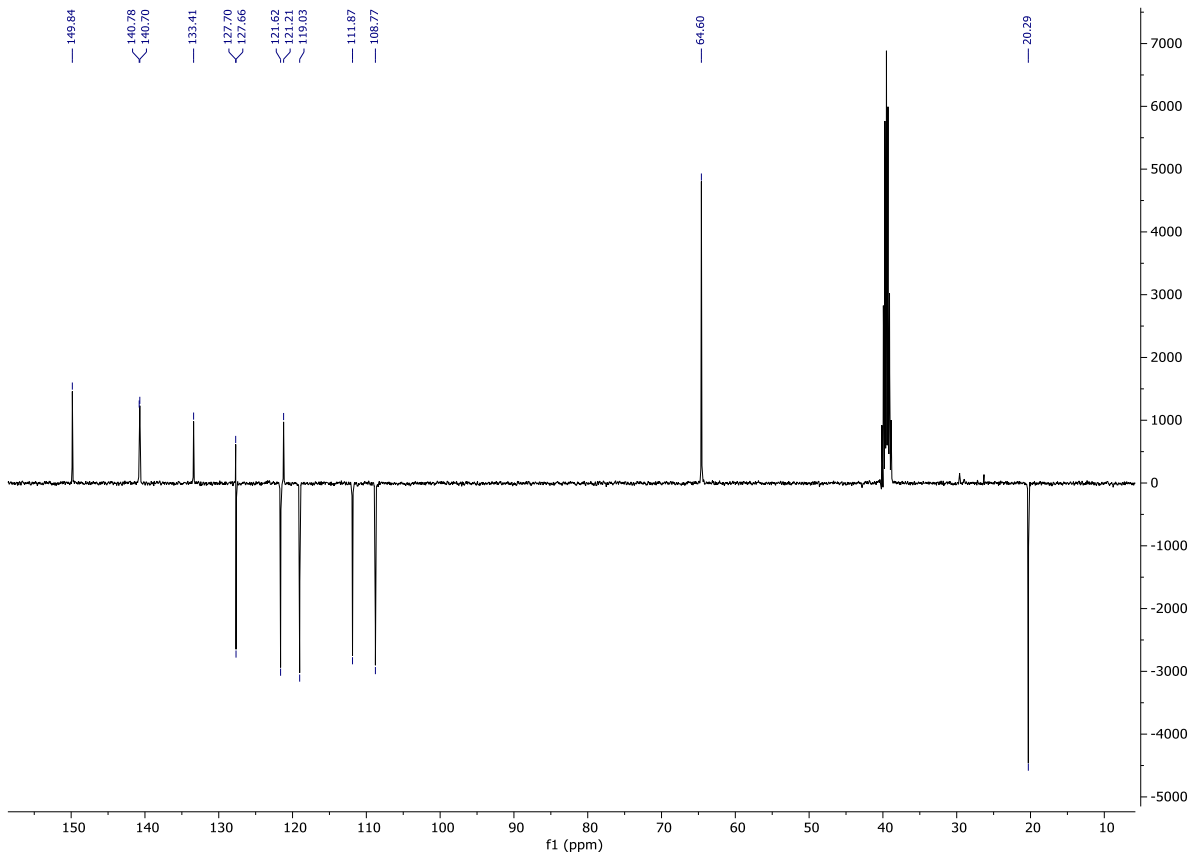
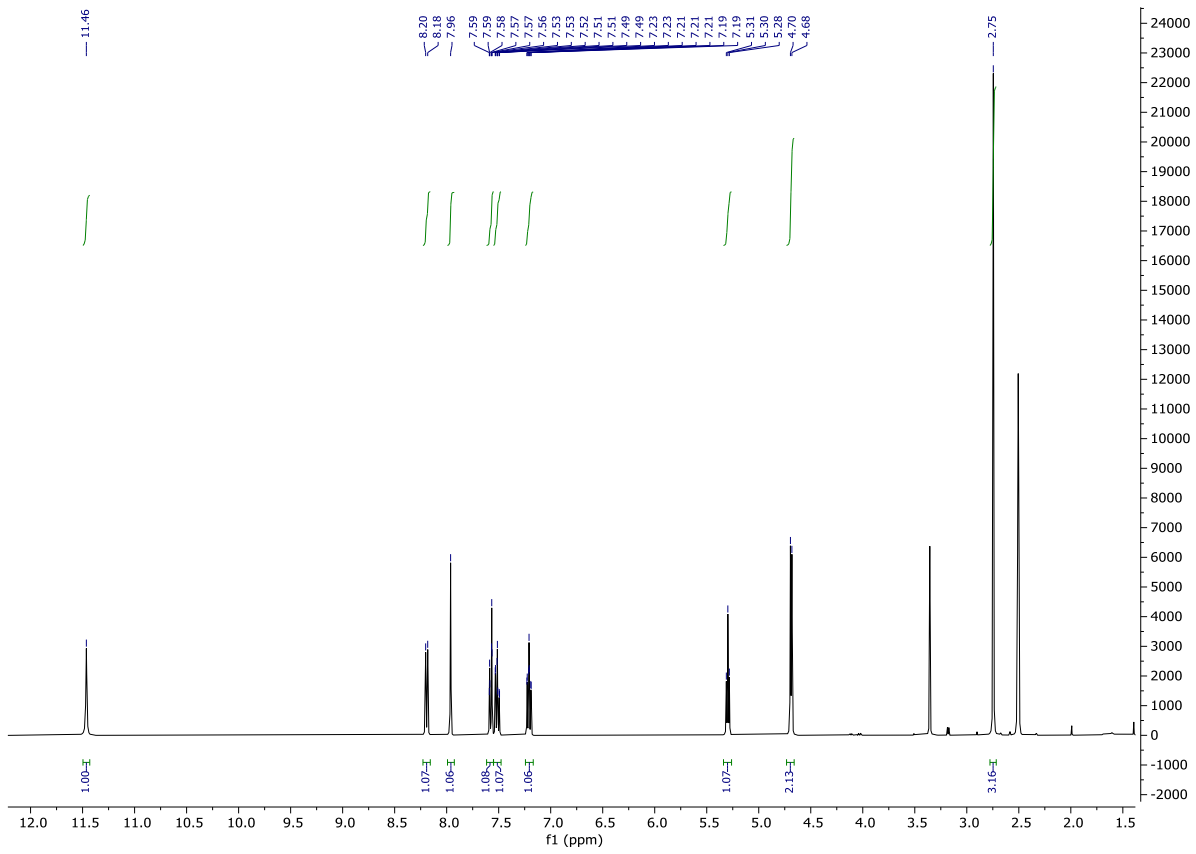
6 (a, b)



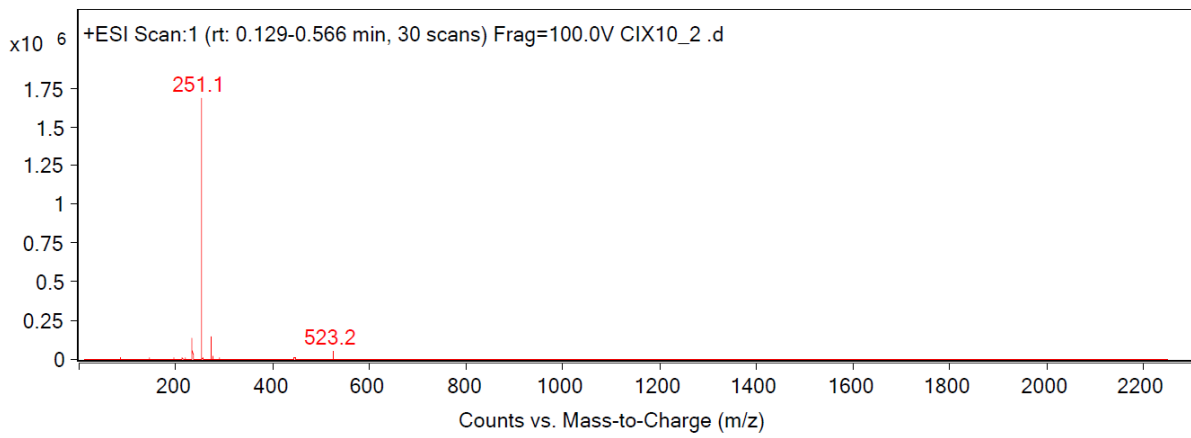
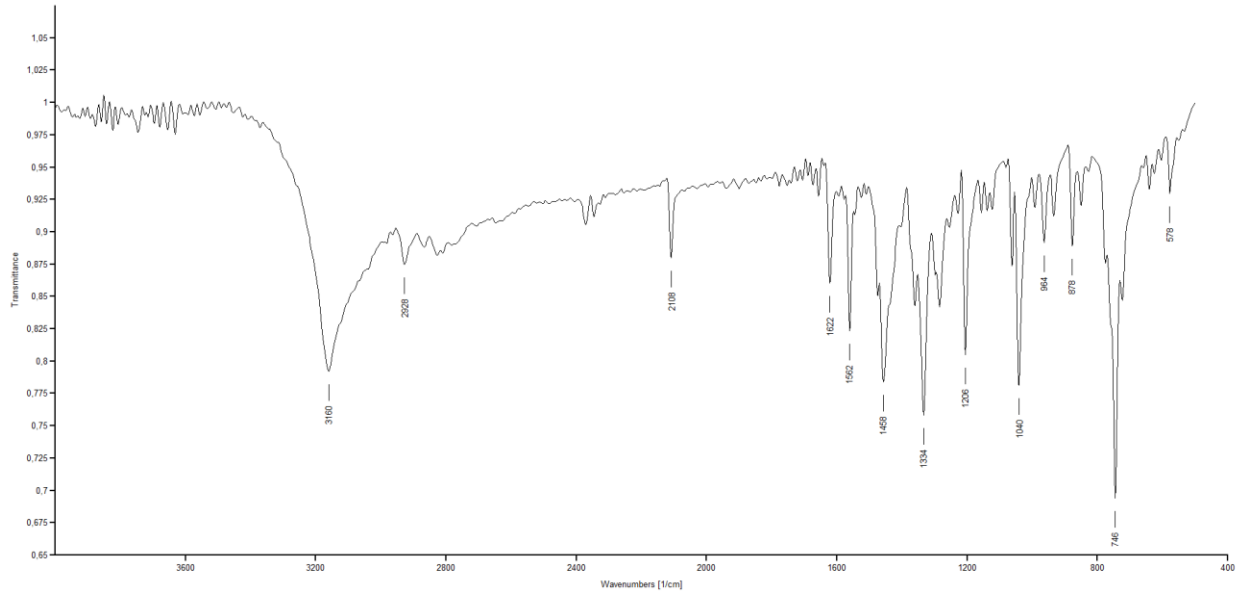
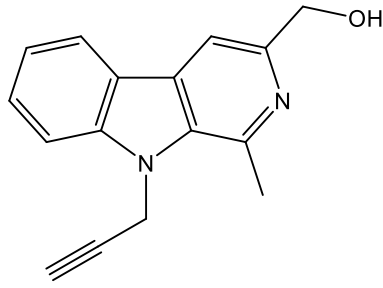


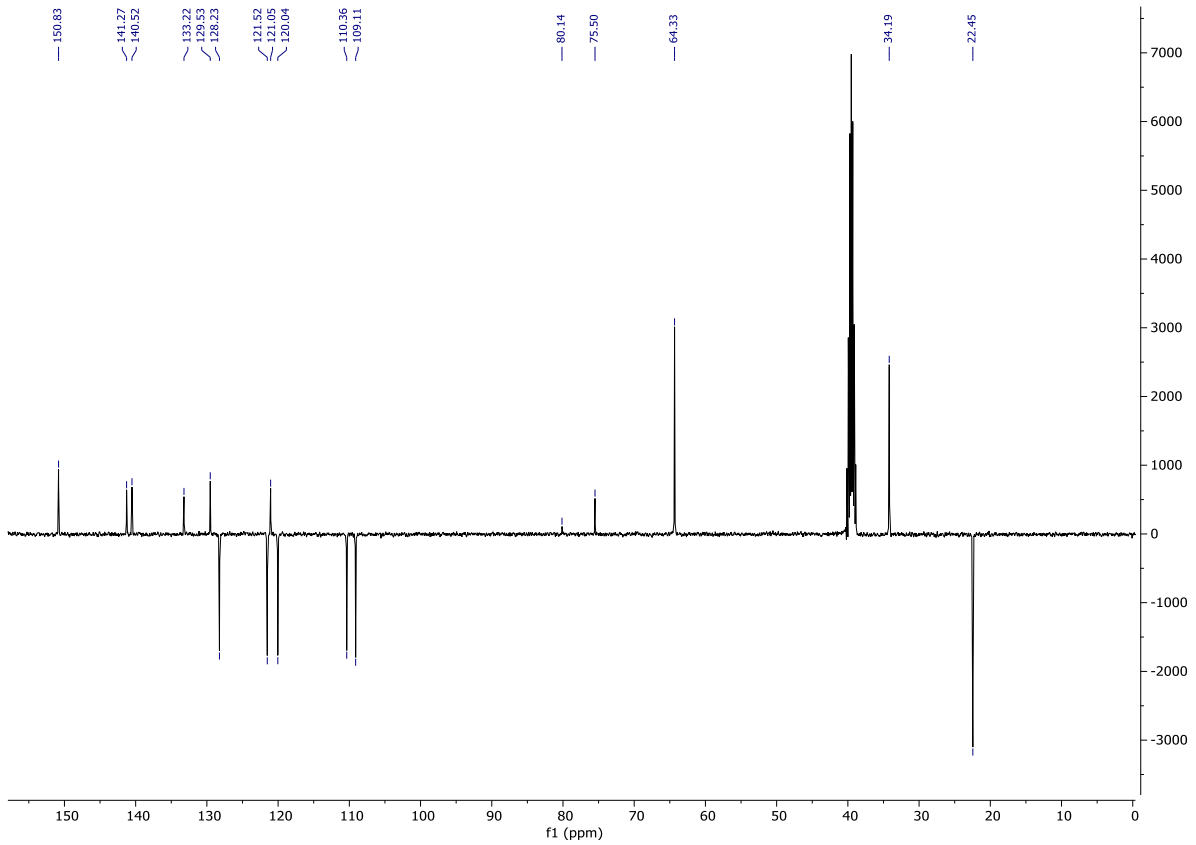
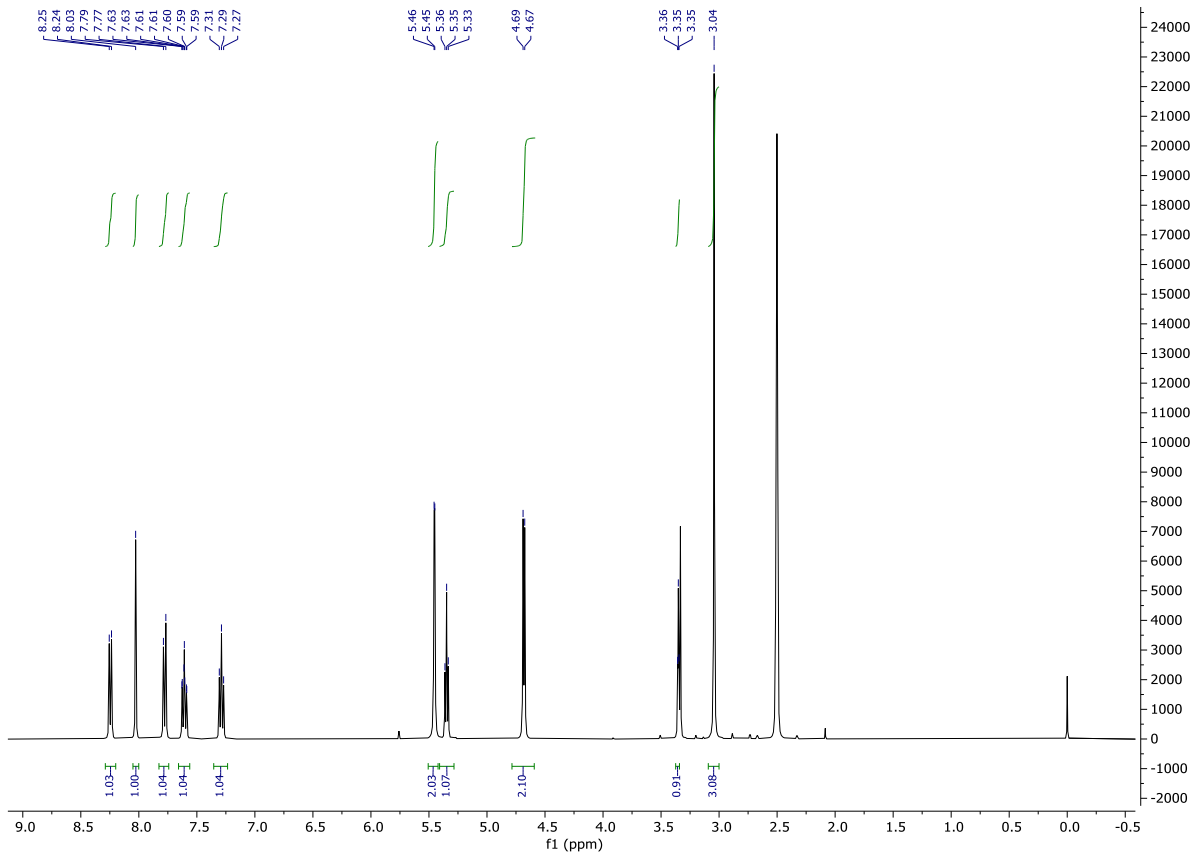
7



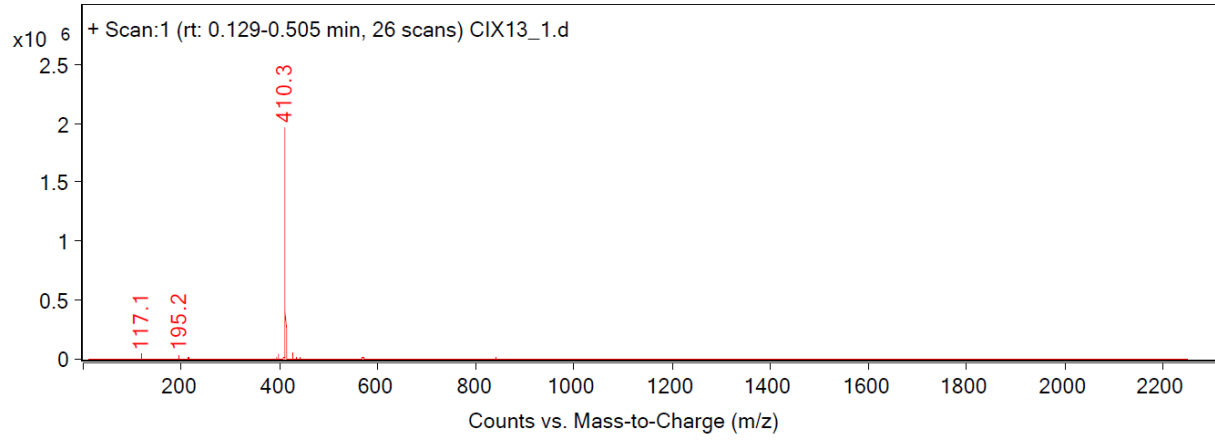
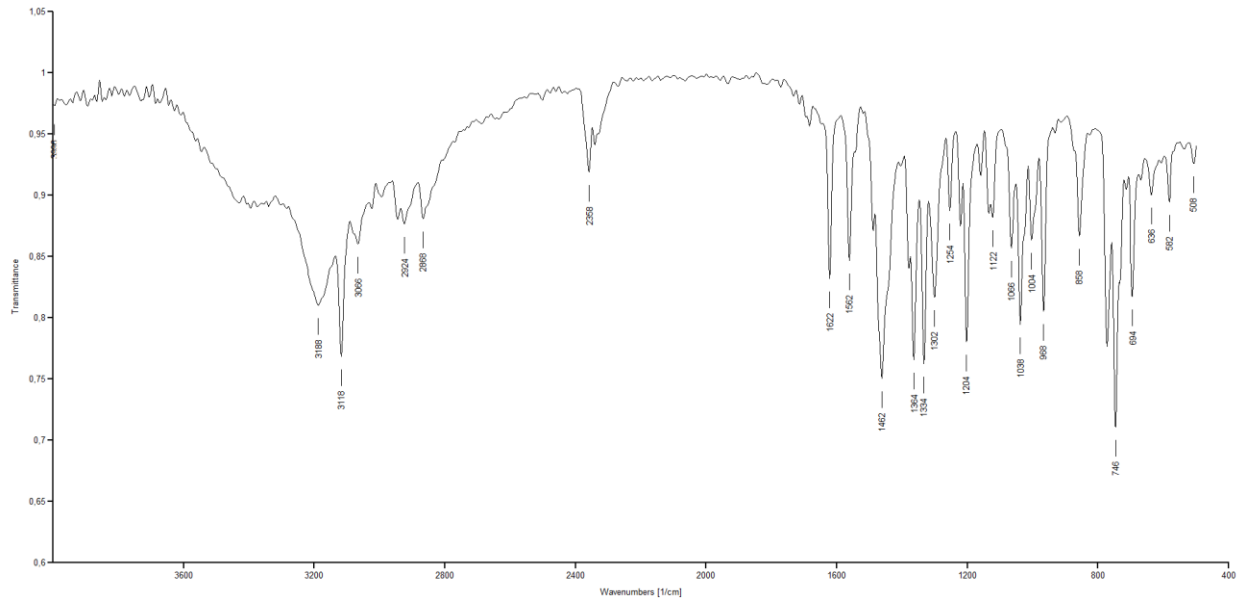
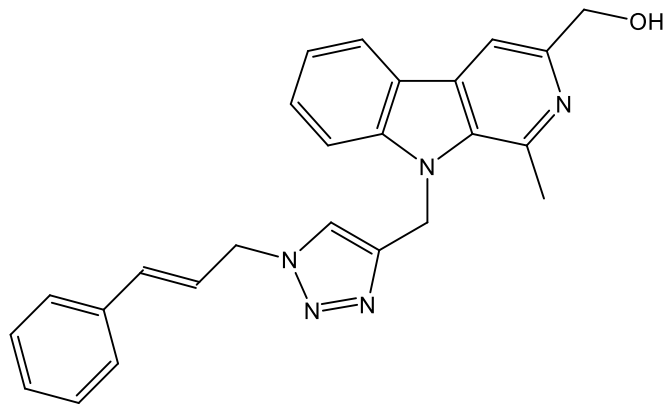


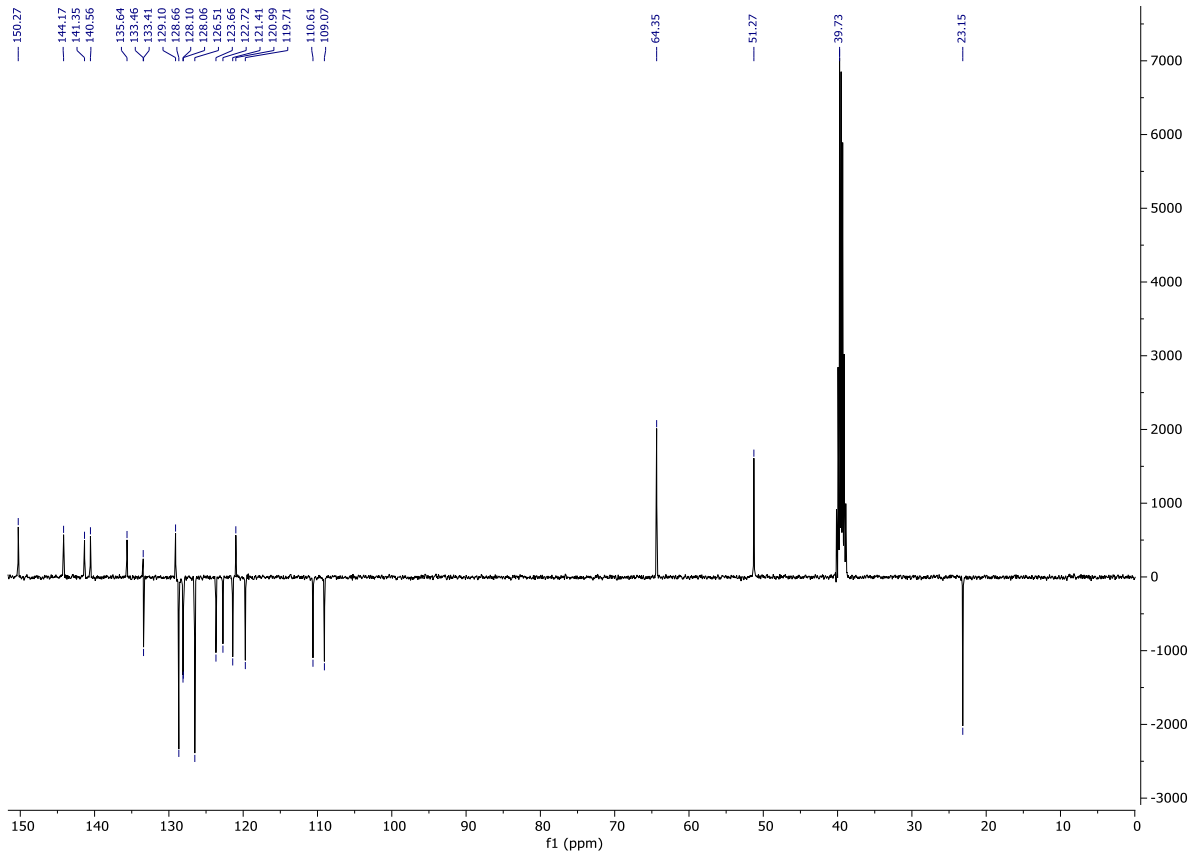
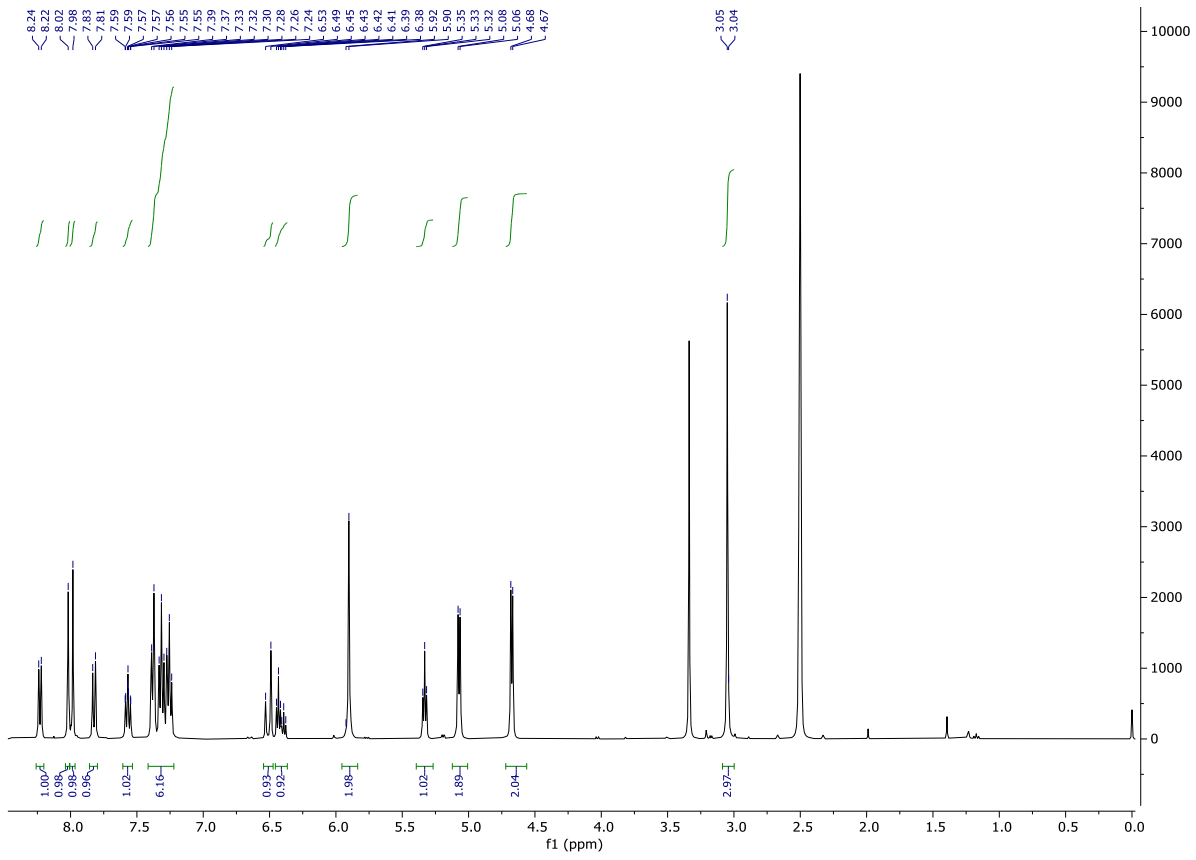
8



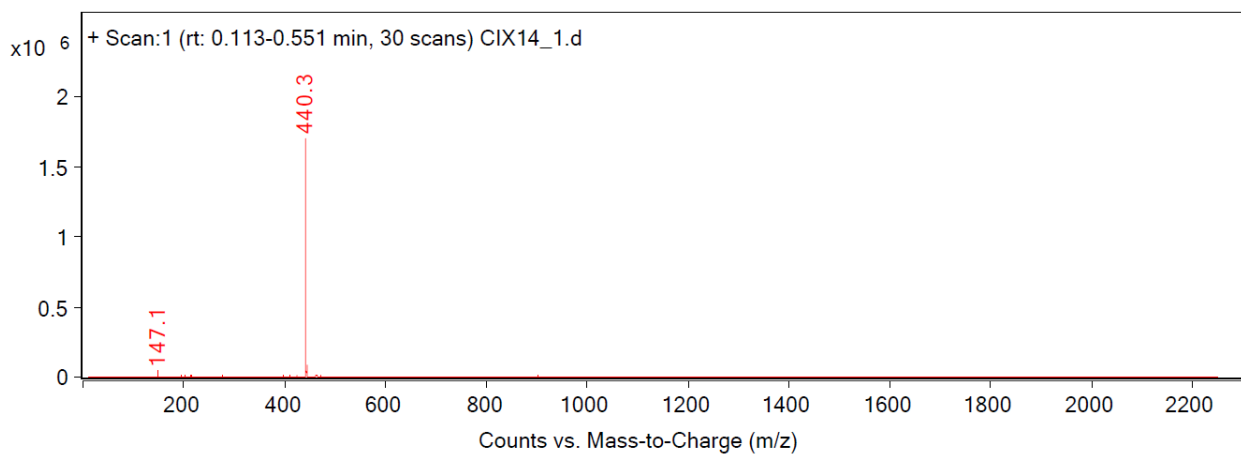
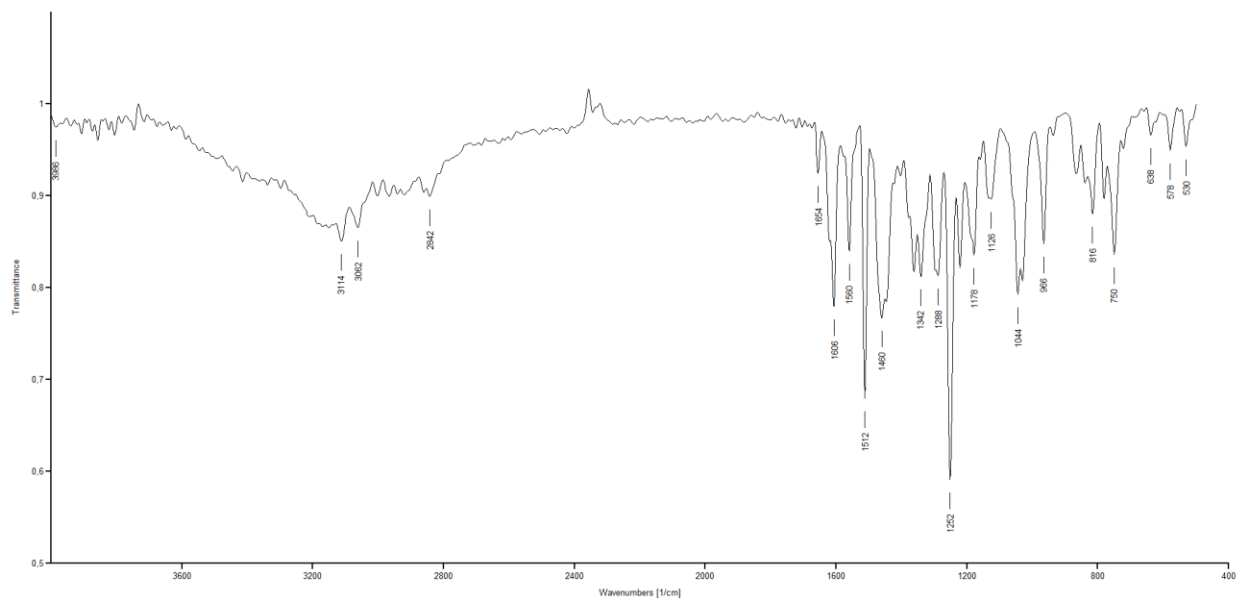
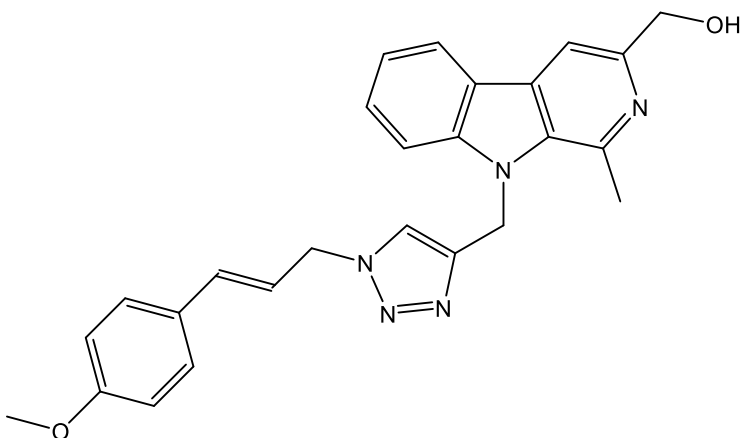


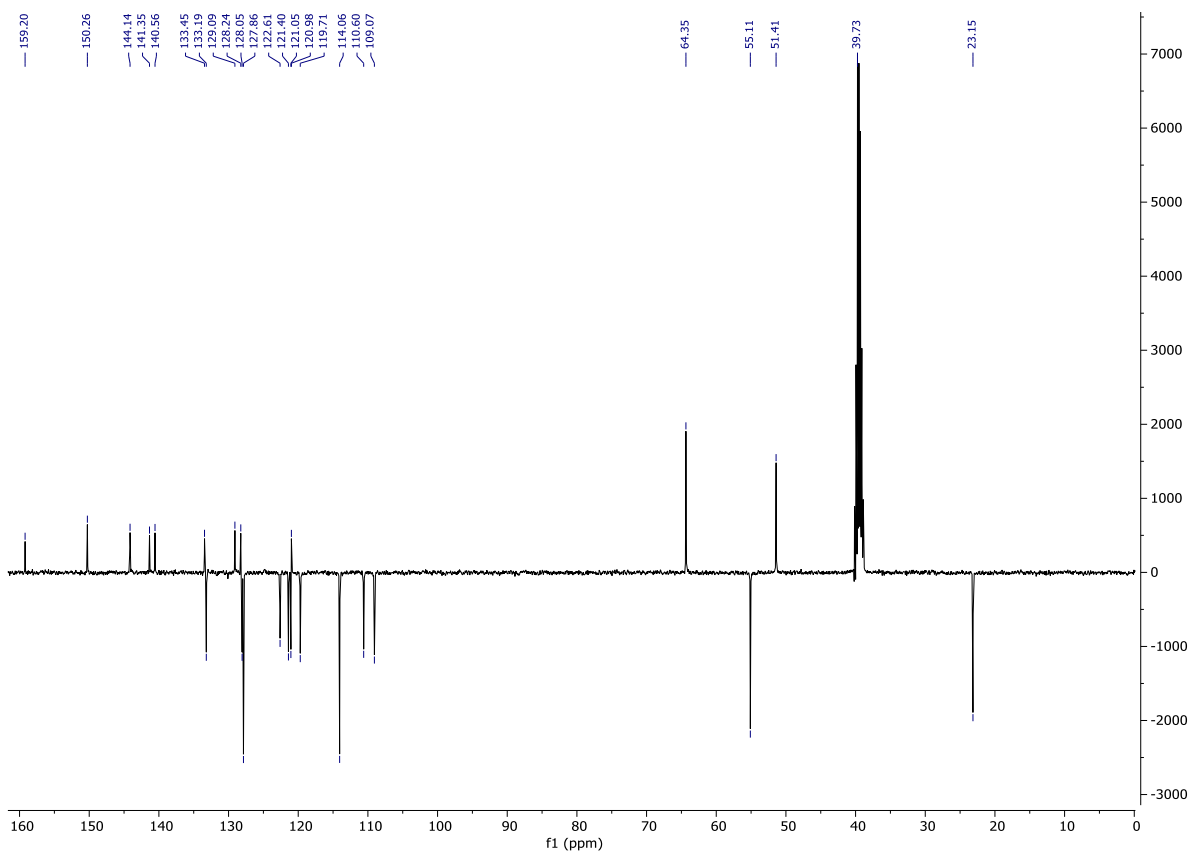
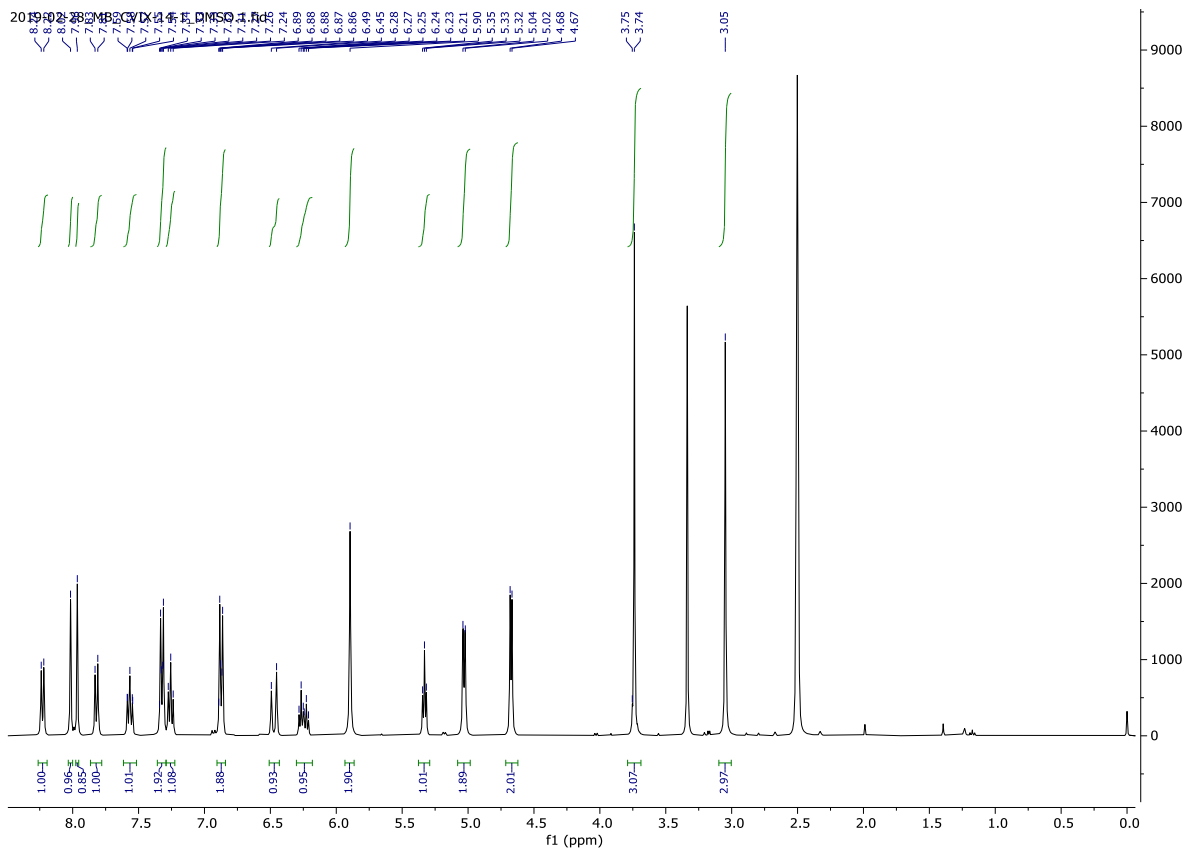
9





10





9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/
BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA NOVIH *N*-TRIAZOLSKIH DERIVATA β -KARBOLINA I CIMETNE KISELINE

Luka Tomašić

SAŽETAK

Pregled literature o prirodnim spojevima koji posjeduju antimalarijsko djelovanje pokazao je da harmin, β -karbolinski alkaloid ima potvrđeno *in vivo* i *in vitro* antimalarijsko djelovanje. Mogući mehanizam djelovanja harmina je inhibicija *P. falciparum* Hsp90, koji ima važnu ulogu u razvoju rezistencije na liječenje. U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija novih derivata β -karbolina i cimetne kiseline povezanih 1,2,3-triazolskim mostom s ciljem optimizacije β -karbolinske strukture dobivanja derivata poboljšanog djelovanja. Kao početni spoj u sintezi korišten je metilni ester triptofana, koji je Pictet-Spenglerovom reakcijom u mikrovalnom reaktoru preveden u tetrahidro- β -karbolinski spoj **5**. Njegovom oksidacijom uz Pd/C i Li₂CO₃ dobiven je ester **6** koji je redukcijom s LiAlH₄ preveden u odgovarajući alkohol (**7**). Dobiveni β -karbolinski alkohol je u reakciji s propargil bromidom preveden u *N*-propargilirani derivat **8**. U klik reakciji azid-alkin cikloadicije katalizirane bakrom *N*-propargiliranog derivata **8** i prethodno sintetiziranih azida cimetne **1**, odnosno *p*-metoksicimetne kiseline **4** dobivena su dva 1,2,3-triazolska derivata (**9**, **10**). Strukture sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (*t*_r, MS, IR, ¹H i ¹³C NMR). Sintetiziranim derivatima β -karbolina **9**, **10** će u daljnim istraživanjima biti ispitano biološko djelovanje.

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

Rad sadrži: 74 stranica, 22 grafičkih prikaza, 10 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: β -karbolin, cimetna kiselina, Hsp90, cikloadicija, 1,2,3-triazol

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

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

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

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

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

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 *N*-TRIAZOLE DERIVATES OF β -CARBOLINE AND CINNAMIC ACID

Luka Tomašić

SUMMARY

The literature survey revealed a natural product found in several plants, β -carboline alkaloid harmine, to possess *in vivo* and *in vitro* antimalarial activity. Assumed mechanism of action is inhibition of *P. falciparum* Hsp90, which has an important role in the development of antimalarial resistance. This research describes synthesis and characterization of two new derivatives of β -carboline and cinnamic acid linked with 1,2,3-triazole bridge, with the aim of optimizing β -carboline structure in order to achieve increased and more selective antimalarial activity. The initial compound in the synthesis sequence was tryptophan methyl ester, which was converted into tetrahydro- β -carboline **5** compound in Pictet-Spengler reaction. Further oxidation with Pd/C and Li₂CO₃ gave the appropriate ester **6**, which was reduced to corresponding alcohol **7**. The β -carboline alcohol **7** was then converted into *N*-propargilated derivative **8** in the reaction with propargyl bromide. Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition click reaction of the *N*-propargilated derivative **8** and previously synthesized azides of cinnamic (**1**) and *p*-methoxy cinnamic acid (**4**) gave the final compounds 1,2,3-triazole derivatives (**9**, **10**). Structures of synthesized compounds were confirmed the usual analytical and spectroscopic methods (m_p, MS, IR, ¹H and ¹³C NMR). Antimalarial activity of synthesized harmine derivatives **9** and **10** will be tested.

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

Thesis includes: 74 pages, 22 figures, 10 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: β -carboline, cinnamic acid, Hsp90, cycloaddition, 1,2,3-triazole

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

Reviewers: **Ivana Perković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Zrinka Rajić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.