

Sinteza i karakterizacija harmicina karbamatnog tipa

Klarić, Karmela

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:128070>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Karmela Klarić

**Sinteza i karakterizacija harmicina karbamatnog
tipa**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Zrinki Rajić na pruženoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Hvala svim zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na ugodnoj atmosferi i druženju, a posebno hvala Marini Marinović i Goranu Poje na strpljenju i pomoći prilikom rada u laboratoriju.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na neizmjerljivoj podršci i ljubavi koju su mi pružili tijekom studiranja.

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



KRATICE

A549	humana stanična linija adenokarcinoma alveolarnih bazalnih epitelnih stanica
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije (engl. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
ADMP	2-azido-1,3-dimetilimidazolinheksafluorofosfat
ATP	adenozin trifosfat
CAD	derivati cimetine kiseline (engl. <i>cinnamic acid derivatives</i>)
CDI	1,1'-karbonilimidazol
CDK	kinaze ovisne o ciklinima (engl. <i>cyclin-dependent kinases</i>)
CuAAC	bakrom (I) katalizirana azid-alkin cikloadicija (engl. <i>Copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>)
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undeka-7-en
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DU-145	humana stanična linija karcinoma prostate
DYRK1A	dvojno specifična serin/treonin i tirozin kinaza 1A
HATU	(1-[<i>Bis</i> (dimetilamino)methilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridin-3-oksidi)heksafluorofosfat
HCT 116	humana stanična linija karcinoma kolona
HDAC	histon-deacetilaza (engl. <i>histone-deacetylase</i>)
HEK 293T	stabilan klonski derivat humanih embrionalnih stanica bubrega
HeLa	humana stanična linija karcinoma grlića maternice
HepG2	humana stanična linija hepatocelularnog karcinoma
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)

HL-60	humana linija nezrelih stanica granulocitne leukemije
Hsp90	protein toplinskog šoka 90 (engl. <i>heat shock protein 90</i>)
HT-29	humana stanična linija karcinoma kolona
Huh7	humana stanična linija hepatocelularnog karcinoma
K562	humana stanična linija kronične mijeloične leukemije
LOVO	humana stanična linija karcinoma kolona
MAO	monoaminooksidaza
MCF-7	humana stanična linija adenokarcinoma dojke
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
<i>PfHsp90</i>	protein toplinskog šoka 90 vrste <i>Plasmodium falciparum</i>
SAR	odnos strukture i djelovanja (engl. <i>structure-activity relationship</i>)
SARCOMA-180	stanična linija sarkoma miša
SW480	humana stanična linija karcinoma kolona
SW620	humana stanična linija karcinoma kolona
QSAR	kvantitativan odnos strukture i djelovanja (engl. <i>quantitative structure-activity relationship</i>)
TEA	trietilamin
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin layer chromatography</i>)
TMS	tetrametilsilan
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)

SADRŽAJ

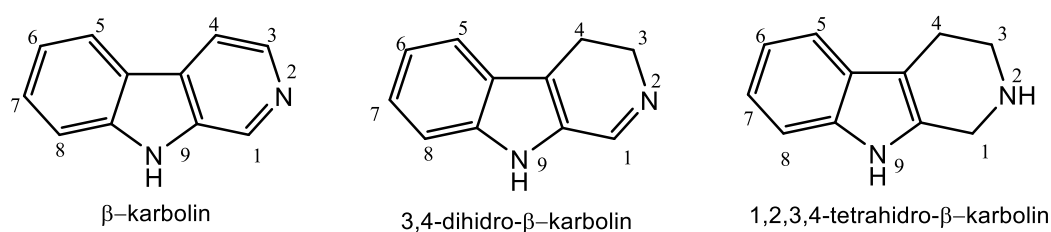
1. UVOD.....	1
1.1. Harmin kao polazna molekula.....	2
1.1.1. Alkaloidi β -karbolinskog tipa.....	2
1.1.2. Harmin i njegova fizikalno-kemijska svojstva	3
1.1.3. Farmakološka djelovanja harmina	4
1.1.4. Protutumorsko djelovanje derivata harmina.....	6
1.2. Cimetna kiselina	8
1.3. Hibridni lijekovi i važnost u liječenju malarije	10
1.3.1. Harmicini	13
1.3.2. Harmicini triazolskog tipa	13
1.3.3. Harmicini amidnog tipa.....	16
1.3.4. Sinteza novih harmicina triazolskog i amidnog tipa	17
1.4. Karbamati.....	19
2. OBRAZLOŽENJE TEME	21
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. Sinteza 2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)etan-1-amina (2).....	24
3.2. Sinteza (<i>E</i>)-3-(4-propoksifenil)-prop-2-en-1-ola (5).....	25
3.3. Sinteza harmicina karbamatnog tipa 6 i 7	27
3.3.1. Sinteza cinamil (2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)etil)karbamata (6).....	27
3.3.2. Sinteza (<i>E</i>)-3-(4-propoksifenil)-alil (2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)etil)karbamata (7).....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
5. ZAKLJUČAK	37
6. LITERATURA	39
7. SAŽETAK (SUMMARY)	44
8. PRILOZI	47
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Harmin kao polazna molekula

1.1.1. Alkaloidi β -karbolinskog tipa

Alkaloidi β -karbolinskog tipa čine veliku skupinu prirodnih i sintetskih spojeva koji u svojoj strukturi sadrže triciklički pirido[3,4-*b*]indolski prsten (Cao i sur, 2007). Na temelju stupnja nezasićenosti piridinskog prstena dijelimo ih u tri skupine (Slika 1). Derivati kod kojih je piridinski prsten u potpunosti nezasićen nazivaju se β -karbolini. Derivati kod kojih je piridinski prsten djelomično zasićen se nazivaju 3,4-dihidro- β -karbolini, a derivati kod kojih je piridinski prsten u potpunosti zasićen nazivaju se 1,2,3,4-tetrahidro- β -karbolini (Kamboj i sur, 2021).

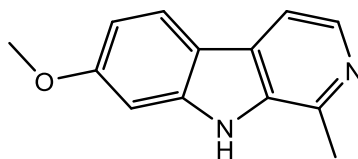


Slika 1. Strukture β -karbolina

Alkaloidi β -karbolinskog tipa izvorno su izolirani iz biljne vrste *Peganum harmala*, Nitrariaceae (sirijska rutvica) (Cao i sur, 2007). Sirijska rutvica je višegodišnja, samonikla zeljasta biljka koja raste u stepskim i pustinjским područjima, a porijeklom je iz regija istočnog Mediterana. Biljka je dobro poznata u Iranu te se njeno korijenje, kora i sjemenke naširoko koriste u medicinske svrhe na Bliskom istoku, u sjevernoj Africi i centralnoj Aziji. Alkaloidi β -karbolinske strukture prisutni u ovoj biljci nazivaju se *harmala* alkaloidi te uključuju harmin, harmalin, harman i harmalol (Moloudizargari i sur, 2012). Sirijska rutvica pokazuje antipiretsko i halucinogeno djelovanje, a djeluje i kao abortiv, emenagog i laktagog. Ekstrakt sjemenki sirijske rutvice se tradicionalno koristio u sjeverozapadnoj Kini za liječenje malarije i karcinoma probavnog trakta (Javeed i sur., 2018). Srodni alkaloidi prisutni su i u drugim biljnim vrstama kao što je *Banisteriopsis caapi*, Malphigiaceae (dušna loza) koja se koristi za izradu halucinogenog napitka Ayahuasca, a koriste ga amazonska plemena pri obredima (Moloudizargari i sur., 2012). Određeni jednostavniji β -karbolini mogu se dobiti i sintetski iz triptofana ili triptamina i aldehida Pictet-Spenglerovom reakcijom (Cao i sur., 2007).

1.1.2. Harmin i njegova fizikalno-kemijska svojstva

Harmin (7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol), poznat pod nazivima banisterin i telepantin, prirodni je produkt β -karbolinskog tipa. U svojoj strukturi sadrži metilnu skupinu na položaju 1 piridinskog prstena te metoksi skupinu na položaju 7 benzenskog prstena (Slika 2). Harmin je najvažniji aktivni sastojak sirijske rutvice (Cao i sur., 2012), a pronađen je i u drugim vrstama roda *Peganum* kao što su *P. nigellastrum* i *P. multisectum*. Nadalje, harmin je izoliran iz korijenja i lišća biljne vrste *Andrographis paniculata*, Acanthaceae (zelena kireta), koja se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini kao sredstvo protiv ugriza zmijske, za liječenje dizenterije, dispepsije, malarije, gripe i drugih respiratornih bolesti. Od svih alkaloida β -karbolinskog tipa, harmin i njegovi derivati pokazuju najveću farmakološku aktivnost (Javeed i sur., 2018).



Slika 2. Kemijska struktura harmina

Neka od osnovnih fizikalno-kemijskih svojstava harmina prikazana su u Tablici 1 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva harmina

Kemijska formula	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O
Relativna molekulska masa	212,25
Talište	264-265 °C
Vrelište	421,40 °C
log <i>P</i>	3,56

1.1.3. Farmakološka djelovanja harmina

Harmin pokazuje antitumorsko, antivirusno, antiparazitsko, halucinogeno i neuroprotektivno djelovanje. Postoji više mogućih mehanizama antitumorskog djelovanja harmina i njegovih derivata. Neki od njih su: interkaliranje unutar DNA, inhibicija topoizomeraze I i II, inhibicija DYRK1A (dvojno specifična serin/treonin i tirozin kinaza 1A), inhibicija kinaza ovisnih o ciklinima (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDK), inhibicija mitoze stanica i utjecaj na različite signalne putove (Cao i sur., 2012; Kumar i sur., 2017).

Harmin pokazuje antimalarijsko djelovanje, moguće zbog inhibicije proteina toplinskog šoka 90 (engl. *heat shock protein 90*, Hsp90) vrste *Plasmodium falciparum* (*PfHsp90*) koji uzrokuje najteži oblik malarije te je odgovoran za gotovo 90 % smrti koje su povezane s malarijom (Eagon i sur., 2020). Hsp90 ubrajamo u skupinu proteina koje nazivamo šaperonima. Šaperoni su proteini koji stupaju u interakcije s drugim proteinima, tzv. proteinima klijentima, te imaju ulogu u pravilnom smatanju novosintetiziranih proteina i održavanju njihove funkcije. Organizmi se nalaze u stanju homeostaze koja se mora održavati unatoč stalnim promjenama uvjeta okoliša. To je posebno važno u stresnim situacijama, kao što je naglo povišenje temperature (toplinski šok) (Schopf i sur., 2017). Parazit malarije se prenosi s hladnokrvnog insektnog vektora na toplokrvnog čovjeka i povišenje temperature za nekoliko stupnjeva povećava transkripciju gena za *PfHsp90* u svrhu preživljenja parazita te se zato ovi proteini nazivaju proteinima toplinskog šoka (Eagon i sur., 2020). Hsp90 u svojoj strukturi sadrži ATPaznu domenu na N-terminalnom kraju, središnju domenu i domenu na C-terminalnom kraju na koju se vežu supstrati. Harmin se selektivno veže na ATPaznu domenu *PfHsp90* čime je onemogućen daljnji razvoj parazita. Nadalje, harmin pokazuje sinergistički učinak s već poznatim antimalaricima kao što su klorokin i artemisinin. Kombinacija ovih lijekova mogla bi dovesti do povećanja njihove učinkovitosti i smanjenja rezistencije plazmodija na postojeću terapiju (Shahinas i sur., 2012).

Zbog prisutnosti β -karbolinskog planarnog prstena u strukturi, harmin i njegovi derivati mogu interkalirati između parova baza DNA čime se ispoljava protutumorsko djelovanje. Prisustvo kratkog alkilnog lanca na položaju 9 β -karbolinskog prstena povećava interkaliranje unutar DNA. Ista modifikacija povećava inhibiciju enzima topoizomeraze I, čime je onemogućena replikacija DNA te dolazi do smrti stanice (Cao i sur., 2005).

Harmin je selektivni inhibitor DYRK1A enzima zbog čega može ispoljiti protutumorsko djelovanje, ali i djelovanje na tijek Alzheimerove bolesti i patologije Downovog sindroma. Apoptoza je programirana stanična smrt te predstavlja prirodni način rješavanja starih i oštećenih stanica iz organizma. Svi agensi koji djeluju protiv tumora potiču apoptozu kako bi se defektne stanice uklonile i kako ne bi došlo do širenja tumora. Povećana ekspresija DYRK1A enzima povezana je s nekontroliranom proliferacijom stanica i razvojem tumora. Inhibicija DYRK1A enzima harminom dovodi do apoptoze stanica humanog oligodendroglioma (Hs683) (Javeed i sur., 2018).

Gen za DYRK1A enzim nalazi se na kromosomu 21, unutar kritične regije za Downov sindrom. Autofosforilacijom tirozinskih ostataka u enzimu dolazi do njegove aktivacije te enzim fosforilira serinske i treoninske ostatke drugih proteina, poput tau proteina, koji je odgovoran za održavanje stabilnosti mikrotubula u središnjem živčanom sustavu. Fosforilacija tau proteina je povezana s patologijom Downovog sindroma i Alzheimerove bolesti te primjena inhibitora DYRK1A enzima potencijalno može dovesti do smanjenja daljnje progresije ovih bolesti (Frost i sur, 2011).

Kinaze ovisne o ciklinima su skupina serin/treonin kinaza koje imaju ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i apoptozi. Reguliraju prelazak staničnog ciklusa iz jedne faze u drugu. Harmin selektivno inhibira Cdk1, Cdk2 i Cdk5 natječući se s ATP-om za vezanje na njegovo vezno mjesto unutar CDK. Time se inhibira proliferacija humanih staničnih linija HeLa (karcinom grlića maternice), MCF-7 (adenokarcinom dojke) i SW480 (karcinom kolona) (Song i sur., 2004).

Monoaminoooksidaza (MAO) je mitohondrijski enzim koji katalizira oksidativnu deaminaciju biogenih amina. U mozgu, MAO je odgovoran za metaboličku inaktivaciju dopamina, noradrenalina i serotonina. Kod sisavaca postoje dvije izoforme ovog enzima: MAO-A i MAO-B. MAO-A preferira serotonin i noradrenalin kao supstrate dok MAO-B preferira feniletilamin. Dopamin je supstrat oba enzima. Inhibitori MAO-A koriste se u liječenju depresije, dok se inhibitori MAO-B koriste u liječenju neurodegenerativnih bolesti kao što je Parkinsonova bolest. Harmin je kompetitivni reverzibilni inhibitor MAO-A enzima, stoga može poslužiti kao početni spoj u sintezi novih antidepresiva (Ginovart i sur., 2005).

1.1.4. Protutumorsko djelovanje derivata harmina

Odnos strukture i djelovanja (engl. *structure-activity relationship*, SAR) i kvantitativan odnos strukture i djelovanja (engl. *quantitative structure-activity relationship*, QSAR) predstavljaju teorijske modele koji se mogu koristiti za predviđanje biološke aktivnosti neke molekule na temelju njene strukture. Temeljni postulat (Q)SAR-a je da slične strukture imaju slično djelovanje. (Q)SAR pristup pretpostavlja da struktura molekule sadrži značajke odgovorne za njena fizikalna, kemijska i biološka svojstva. Ovaj pristup je koristan prilikom razvoja novih lijekova jer se njegovom primjenom mogu odrediti kemijske skupine u molekuli lijeka odgovorne za izazivanje ciljanog učinka u organizmu, a modifikacijom strukture možemo utjecati na njeno djelovanje (<https://www.oecd.org/>).

Karcinom predstavlja jedan od vodećih javnozdravstvenih problema suvremenog svijeta te je drugi uzrok smrti u svijetu (<https://www.who.int/>). Kao što je prethodno navedeno, β -karbolinski alkaloidi ispoljavaju protutumorsko djelovanje različitim mehanizmima te mogu poslužiti za razvoj novih kemoterapeutika. U ovom poglavlju bit će prikazani neki od do sada sintetiziranih derivata harmina s protutumorskom aktivnošću (Slika 3) te utjecaj promjene strukture na protutumorsku aktivnost derivata.

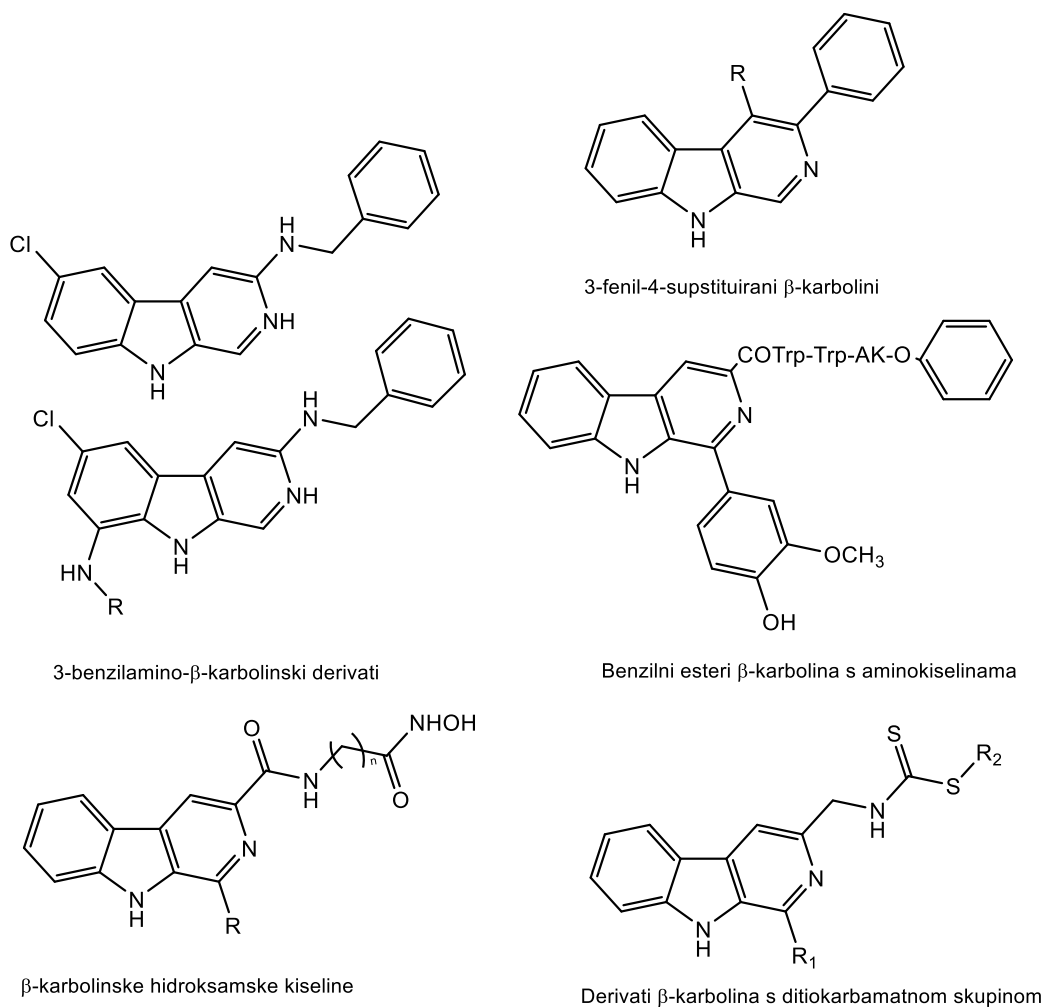
Konokahara i suradnici sintetizirali su 6-, 8- ili 6,8-supstituirane 3-benzilamino- β -karbolinske derivate te su ispitali njihovu protutumorsku aktivnost na humanim staničnim linijama HeLa, Sarcoma-180 (sarkom miša) i HEK 293T (stabilan klonski derivat humanih embrionalnih stanica bubrega). Uvođenje piridinskog prstena kao supstituenta na položaj 8 dovelo je do smanjivanja protutumorskog djelovanja na sve tri stanične linije, dok je uvođenje alkilnog supstituenta povećalo hidrofobnost molekule, prodiranje u tumorsku stanicu, a time i porast protutumorske aktivnosti. Nadalje, sintetizirani su i 8-amino- β -karbolini s poboljšanom protutumorskom aktivnošću na istim staničnim linijama. I kod ovih derivata je uvođenje alkilnog supstituenta na položaj 8 povećalo protutumorsku aktivnost, dok je uvođenje aril ili hetero aril supstituenta imalo suprotan učinak (Kumar i sur., 2017).

Xu i suradnici sintetizirali su 3-fenil-4-supstituirane β -karboline. Derivati s elektron odvlačecim supstituentima na fenilnom prstenu na položaju 4 imali su jako slabu protutumorsku aktivnost na humanim staničnim linijama HeLa i MCF-7. Uvođenje elektron donorskih supstituenta na isti položaj značajno je povećao citotoksičnu aktivnost derivata (Kumar i sur., 2017).

Zhang i suradnici priredili su tripeptidne benzilne estere β -karbolina s različitim aminokiselinama te je njihova aktivnost ispitana na humanim staničnim linijama HT-29 (karcinom kolona), A549 (adenokarcinom pluća), K562 (kronična mijeloična leukemija) i HL-60 (granulocitna leukemija). Tako dobiveni derivati pokazali su umjerenu citotoksičnu aktivnost. Na protutumorsku aktivnost utjecali su oblik i veličina postraničnog aminokiselinskog lanca povezanog na β -karbolinski prsten na položaju 3 (Kumar i sur., 2017).

Ling i suradnici priredili su niz β -karbolinskih hidroksamskih kiselina koje su pokazale značajan antiproliferativni učinak na humanim staničnim linijama karcinoma kolona (HCT116, SW620, SW480 i LOVO). Derivati koji su pokazali jače djelovanje u odnosu na harmin u strukturi su sadržavali tri do četiri metilenske jedinice u postraničnom lancu na položaju 3. Uvođenje supstituenta na β -karbolinski dio molekule imalo je utjecaj na aktivnost. Zamjena amidne skupine ureom na položaju 3 β -karbolinskog prstena dovela je do povećanja protutumorske aktivnosti. Nadalje, ovi derivati su pokazali učinak na inhibiciju histonske deacetilaze (engl. *histone-deacetylase*, HDAC), enzima koji katalizira uklanjanje acetilne skupine s lizinskih ostataka histona, čime se suprimira transkripcija gena. Za ispitivanje je korišten nuklearni ekstrakt stanične linije HeLa, budući da sadrži veliku količinu enzima. Derivati s jednom ili dvije metilenske jedinice u postraničnom lancu na položaju 3 pokazali su slabi učinak na inhibiciju HDAC. Povećanje broja metilenskih jedinica u strukturi značajno povećava inhibitornu aktivnost derivata (Song i sur., 2021; Kumar i sur., 2017).

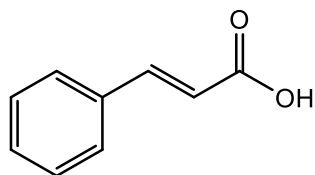
Kamal i suradnici sintetizirali su derivate harmina s ditiokarbamatnom skupinom koji pokazuju protutumorsko djelovanje inhibicijom topoizomerase II, interkaliranjem unutar DNA i indukcijom apoptoze. Citotoksičnost je ispitana na humanim staničnim linijama A549, MCF-7, DU-145 (karcinom prostate) i HeLa. Istraživanje je pokazalo da ditiokarbamatna skupina doprinosi citotoksičnom učinku budući da amin na položaju 3 β -karbolinskog prstena, iz kojeg su nastali ovakvi derivati, nije pokazao citotoksičnu aktivnost. Nadalje, uvođenje metilne skupine na položaj N-9 značajno povećava citotoksičnu aktivnost (Soni i sur., 2021; Kumar i sur., 2017).



Slika 3. Derivati harmina s protutumorskom aktivnošću

1.2. Cimetna kiselina

Cimetna kiselina (3-fenil-prop-2-enska kiselina) je aromatska nezasićena kiselina koja se nalazi u biljnim vrstama kao što su *Cinnamomum cassia*, Lauraceae (kineski cimet) i *Panax ginseng*, Araliaceae (ginseng), a može se naći i u voću, povrću, cjelovitim žitaricama i medu. Zbog dvostruke veze u strukturi može postojati kao *cis* i *trans* stereoizomer, a u prirodi je zastupljenija *trans*-cimetna kiselina (Slika 4). Koristi se kao miris u detergentima, parfemima i kozmetici. Također je i intermedijer u sintezi biološki važnih spojeva kao što su stilben i stiren (Ruwizhi i Aderibigbe, 2020). Prikaz nekih fizikalno-kemijskih svojstava cimetne kiseline dan je u Tablici 2.



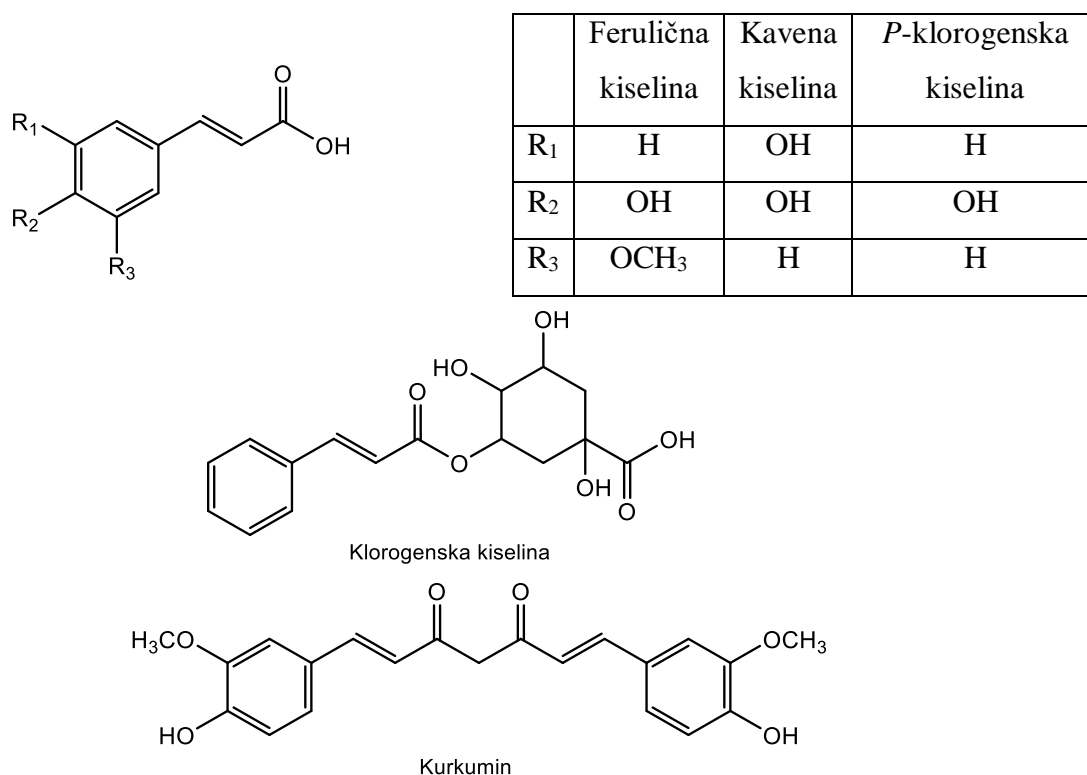
Slika 4. Kemijska struktura cimetine kiseline

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva cimetine kiseline (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Kemijska formula	C ₉ H ₈ O ₂
Relativna molekulska masa	148,16
Talište	133 °C
Vrelište	300 °C
log P	2,13

Modifikacijom strukture cimetine kiseline moguće je dobiti različite derivate cimetine kiseline (engl. *cinnamic acid derivatives*, CAD). CAD pokazuju potencijal u liječenju Alzheimerove bolesti i drugih bolesti živčanog sustava, akutne boli, upale, dijabetesa, virusnih infekcija, tuberkuloze i malarije. Biološka aktivnost različitih derivata cimetine kiseline ovisi o prirodi i položaju supstituenta u molekuli. Poznati derivati cimetine kiseline (Slika 5) su ferulična kiselina, kavena kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kurkumin i klorogenska kiselina. Ovi derivati sadrže hidroksilne skupine na benzenskoj jezgri ili analogne etere (Ruwizi i Aderibigbe, 2020).

Za daljne potrebe ovog rada važno je antimalarijsko djelovanje CAD. CAD inhibiraju transport laktata, glicina, glukoze i sorbitola u eritrocite inficirane vrstama roda *Plasmodium* čime dolazi do smanjenja rasta parazita. Također, smanjuju produkciju ATP-a u parazitu te smanjuju propusnost eritrocita induciranu plazmodijem, koju omogućava translokacija aminokiselina i ugljikohidrata bitnih za preživljavanje plazmodija (Silva i sur, 2020).



Slika 5. Poznati derivati cimetne kiseline

1.3. Hibridni lijekovi i važnost u liječenju malarije

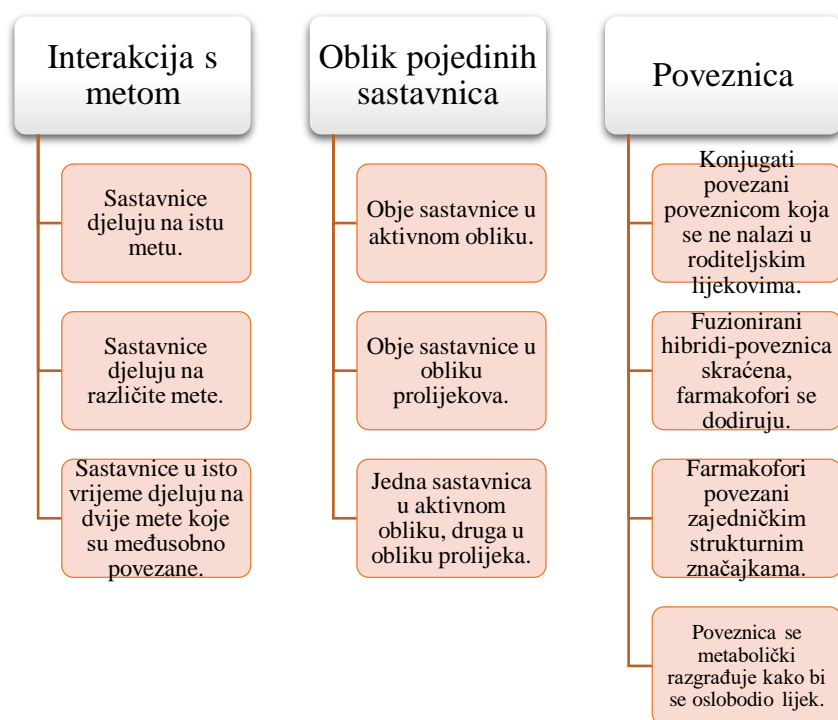
Unatoč značajnim naporima uloženim u razvoj učinkovitog cjepiva protiv malarije i novih antimalarika, malarija je i dalje bolest povezana s velikim brojem smrtnih slučajeva. U 2020. godini zabilježen je 241 milijun slučajeva malarije od kojih je 627 000 završilo smrtnim ishodom. U usporedbi s prethodnom godinom, broj smrtnih slučajeva se povećao za 69 000. Najveći problem predstavlja činjenica da je među preminulim osobama 80 % djece mlađe od 5 godina. Iako postoji učinkovito cjepivo protiv malarije i razvijaju se nova, dolazi do pojave sojeva *P. falciparum* koji pokazuju rezistenciju na kombiniranu terapiju baziranu na artemisininu, koja se danas smatra „zlatnim standardom“ (<https://www.who.int/>).

Novi pristup razvoju antimalarika predstavlja koncept hibridizacije dva ili više aktivna farmakofora u jedan kemijski entitet kako bi se dobili „antimalarijski hibridi“. Dakle, kovalentnim povezivanjem dviju molekula, od kojih svaka zadržava svoje antimalarijsko djelovanje, dobiva se hibridna molekula s dvostrukim djelovanjem. Koncept je poznat i pod nazivima „kovalentna biterapija“ i „dvostruki lijekovi“. Ovaj pristup je već korišten u svrhu razvoja molekula za liječenje bolesti kao što su AIDS (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*, sindrom stečene imunodeficijencije), rak i tuberkuloza. Primjena ovog pristupa u

sintezi antimalarika mogla bi dovesti do sinteze novih i potencijalno boljih antimalarika. (Agarwal i sur., 2017.).

Hibridne molekule se mogu klasificirati na temelju (Slika 6):

1. načina interakcije pojedinih farmakofora s metom
2. obliku pojedinih sastavnica
3. prirodi poveznice korištene za povezivanje dva farmakofora ili dviju molekula.



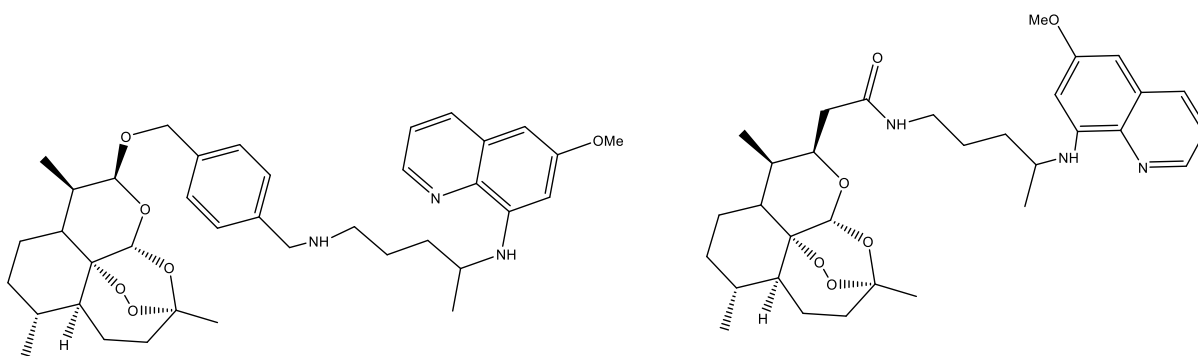
Slika 6. Hibridne molekule razvrstane prema načinu interakcije pojedinih sastavnica s pojedinom metom, obliku pojedine sastavnice i prirodi poveznice.

Razvoj hibridnih molekula ima niz prednosti.

1. Razvoj hibridnih lijekova može dovesti do smanjenja razvoja rezistencije na lijekove uzajamnom zaštitom svake farmakoforne skupine. Na ovaj način bi se mogla smanjiti rezistencija na klorokin na kojeg se rezistencija javlja zbog nemogućnosti ulaska u vakuole parazita gdje ispoljava djelovanje (Agarwal i sur., 2017).
2. Kod fiksnih kombinacija lijekova moguća je razlika u apsorpciji lijekova, tj. da se jedan lijek apsorbira prije drugog. Ukoliko je topljivost jedne sastavnice hibridnog lijeka veća od druge, njena apsorpcija u krvotok može doprinjeti bioraspoloživosti druge sastavnice. (Agarwal i sur., 2017). Nadalje, poveznica između sastavnica može utjecati na topljivost cijele molekule. Primjerice, Pretorius i suradnici su sintetizirali hibridne antimalarike povezujući klorokin i piridin poveznicom koja je sadržavala dvije jedinice etilenoksida.

- Etilenoksid stvara vodikove veze s vodom zbog čega ovako sintetizirani hibridni spojevi imaju dobru topljivost u vodi pri kiselom i neutralnom pH medija (Pretorius i sur., 2013).
- Ukoliko su sastavnice hibridnog lijeka povezane prikladnom poveznicom te se nalaze na prikladnom razmaku, mogu djelovati sinergistički i pokazati veći učinak. Beniot-Vical i suradnici su hibridizirali trioksan i klorokin te su dobili trioksakin koji je pokazao jače antimalarijsko djelovanje u odnosu na pojedinačne početne spojeve te je inhibirao polimerizaciju β -hematina, što je svojstvo klorokina (Dechy-Cabaret i sur., 2003).
 - Molekula može biti toksična, ali njen farmakofor ne mora nužno biti nositelj toksičnih učinaka. Ukoliko toksikofor nije farmakofor, moguće je redizajnirati molekulu kako bi se smanjili toksični učinci (Agarwal i sur., 2017).

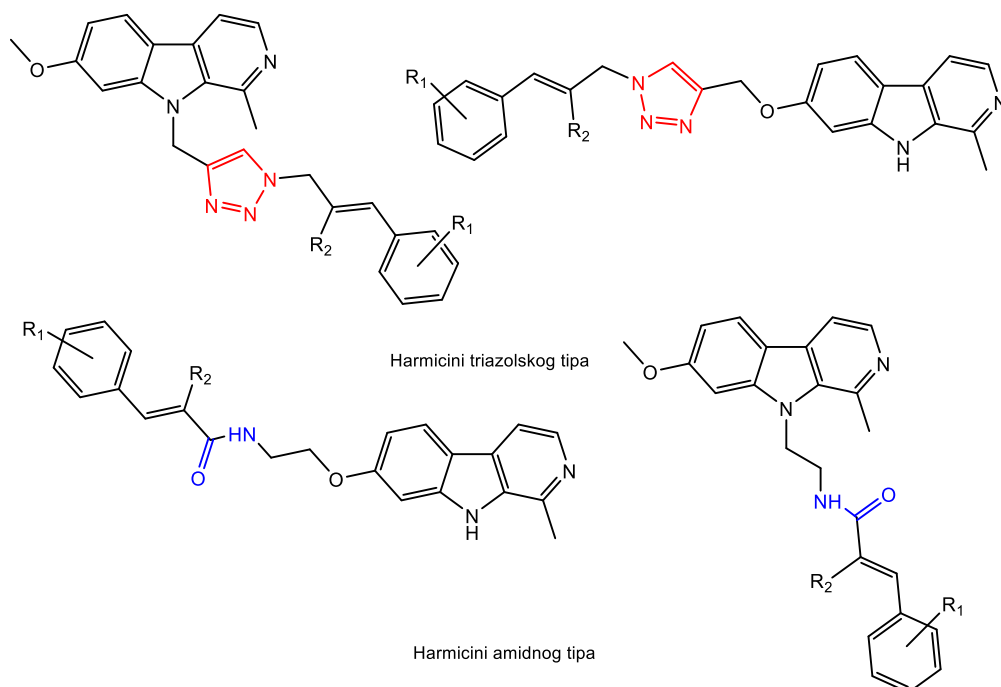
Prilikom razvoja novih hibridnih molekula za liječenje malarije treba uzeti u obzir činjenicu da većina postojećih lijekova djeluje samo na eritrocitnu fazu životnog ciklusa parazita malarije. Za potpunu eradikaciju malarije potrebno je razviti molekulu koja bi smanjila prijenos parazita s vektora komarca na domaćina čovjeka te djelovati na različite faze životnog ciklusa parazita. Capela i suradnici su proveli prvu studiju koja se temeljila na kovalentnoj modifikaciji lijekova koji djeluju na različite faze životnog ciklusa plazmodija. U radu je opisana sinteza dviju hibridnih molekula nastalih kovalentnim povezivanjem farmakofora primakina i artemisinina te njihov učinak na hepatocitnu i eritrocitnu fazu plazmodija *in vitro* i na animalnim modelima (Slika 7). Primakin djeluje na hepatocitnu fazu parazita malarije dok je artemisinin aktivan protiv eritrocitne faze parazita malarije. Oba hibrida su pokazala povećanu *in vitro* aktivnost na hepatocitnu fazu *P. berghei* u odnosu na aktivnost ishodišnih lijekova. Također, hibridi su pokazali jednaku aktivnost kao i artemisinin protiv laboratorijskog soja *P. falciparum* (Agarwal i sur., 2017; Capela i sur., 2011).



Slika 7. Hibridi nastali kovalentnim povezivanjem farmakofora artemisinina i primakina.

1.3.1. Harmicini

Harmicini su hibridne molekule nastale povezivanjem β -karbolinskog alkaloida harmina i CAD. Obje sastavnice harmicina pokazuju antimalarijsko djelovanje pa bi ovakve molekule mogle biti korisni antimalarici s poboljšanim svojstvima. Istraživačka skupina Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu sintetizirala je dva tipa harmicina (Slika 8). Prva skupina su harmicini triazolskog tipa kod kojih su harmin i CAD povezani 1*H*-1,2,3-triazolskim prstenom (Perković i sur., 2019). Zamjenom triazolskog prstena amidnom vezom, koja je bioizoster triazolskog prstena, dobiveni su harmicini amidnog tipa (Marinović i sur., 2020).



Slika 8. Harmicini triazolskog i amidnog tipa

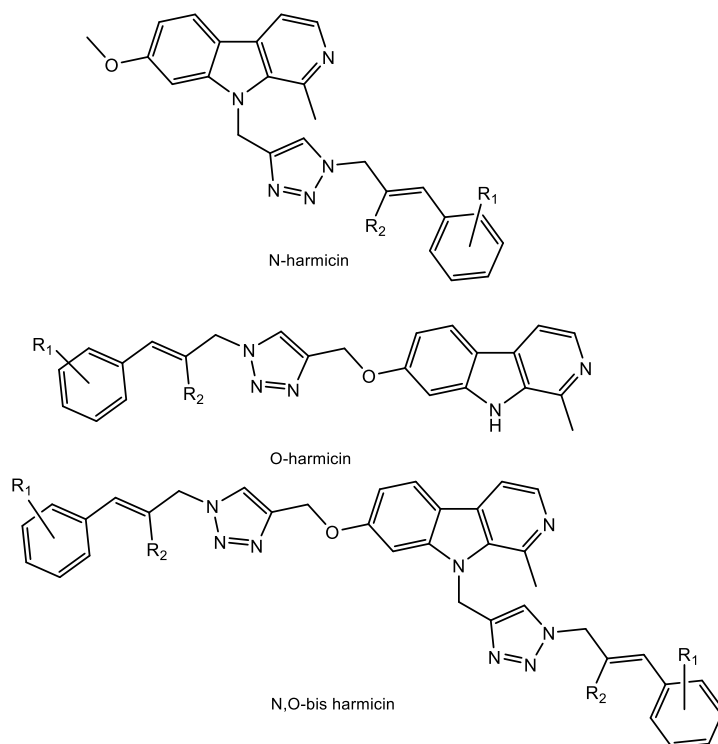
1.3.2. Harmicini triazolskog tipa

Harmicini triazolskog tipa nastaju povezivanjem harmina i CAD 1*H*-1,2,3-triazolskim prstenom. Za sintezu ovih spojeva, Perković i suradnici koristili su bakrom(I) kataliziranu azid-alkin cikloadiciju (engl. *copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition*; CuAAC), poznatu pod nazivom „click“ kemija, kojom nastaje 1,2,3-triazolski prsten (Perković i sur., 2019). „Click“ kemija je pojam koji se odnosi na reakcije u kojima produkti

nastaju kovalentnim vezanjem najmanje dviju manjih molekulskih jedinica. Takve reakcije trebaju davati visoke prinose, moraju biti stereospecifične, ali ne nužno enantioselektivne, te trebaju generirati bezopasne međuprodukte koji se lako uklanjaju nekromatografskim metodama. Reakcijski uvjeti trebali bi biti jednostavni (u idealnom slučaju, proces bi trebao biti neosjetljiv na vodu i kisik), a kemikalije i reagensi trebali bi biti lako dostupni. Reakcije se trebaju odvijati bez otapala, u otapalu koje je bezopasno, kao što je voda, ili u otapalu koje se lako uklanja. Izolacija produkta treba biti jednostavna. Ukoliko je potrebno dodatno pročišćavanje produkta, to se vrši nekromatografskim metodama (prekristalizacija ili destilacija), a produkt treba biti stabilan pri fiziološkim uvjetima (Kolb i sur., 2001).

Za sintezu harmicina trazolskog tipa, Perković i suradnici koristili su cimetni azid i alkin na bazi harmina. Sinteza cimetnog azida uključivala je četiri koraka. U prvom koraku su CAD prevedeni u estere, nakon čega je slijedila redukcija u alkohole. Kako ne bi došlo do redukcije dvostruke veze unutar CAD, reakcijski uvjeti bili su blagi, a kao reducens korišten je litijev aluminijev hidrid (LiAlH_4). Zatim su alkoholi prevedeni u azide korištenjem 2-azido-1,3-dimetilimidazolinheksafluorofosfata (ADMP-a) u prisutnosti 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undeka-7-ena (DBU-a). Za alkilaciju harmina ili harmola korišten je propargil-bromid u prisustvu natrijevog hidrida ili cezijeveg karbonata. Nakon provedene CuAAC, dobivena su tri tipa hibridnih spojeva triazolskog tipa: N-harmicini, O-harmicini i N,O-bis-harmicini (Slika 9).

Dobivenim spojevima je ispitana biološka aktivnost. Aktivnost dobivenih spojeva na eritrocitnu fazu životnog ciklusa plazmodija proučavana je korištenjem dva soja *P. falciparum*: klorokin-osjetljivi (3D7) i klorokin-rezistentni soj (Dd2). Harmicini su pokazali iznimnu aktivost protiv oba soja *P. falciparum* te je njihova učinkovitost bila veća od polaznih spojeva. Najveću aktivnost pokazali su O-supstituirani harmicini. Aktivnost je padala u nizu: O-harmicini > N,O-bis-harmicini > N-harmicini. Međutim, N,O-bis-harmicini s *m*-fluoro, *m,p*-difluoro i α -metilnim supstituentima imali su najslabiju aktivnost. Uvođenje supstituenta na cimetni dio molekule imalo je mali značaj na učinkovitost N-harmicina i N,O-bis-harmicina. Zamjena vodika s metilnom skupinom na α -položaju cimetnog dijela molekule dovela je do smanjenja aktivnosti O-harmicina i N,O-bis-harmicina.



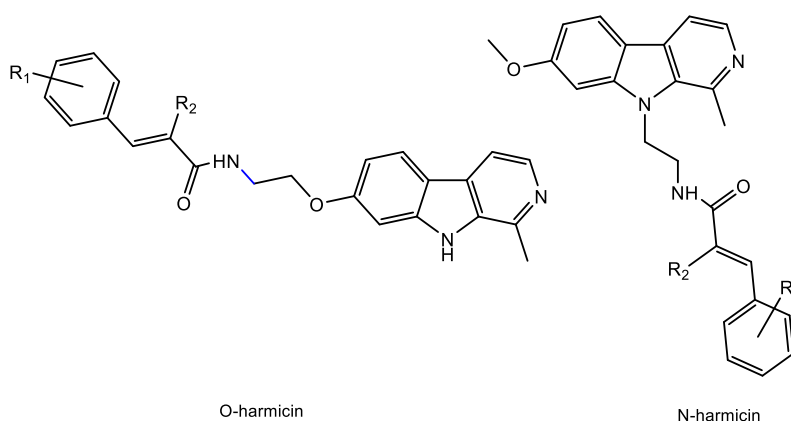
Slika 9. Strukturne formule N-harmicina, O-harmicina i N,O-bis-harmicina triazolskog tipa

Aktivnost spojeva na hepatocitnu fazu *P. berghei* ispitana je korištenjem Huh7 stanica (stanice humanog hepatocelularnog karcinoma) inficiranih istim sojem. Dobiveni spojevi su korišteni u koncentracijama od 1 i 10 μM . Kao pozitivna kontrola korišten je harmin, a kao negativna kontrola dimetil-sulfoksid (DMSO). Rezultati su pokazali da su harmicini učinkoviti protiv hepatocitnog stadija životnog ciklusa plazmodija te su, u većini slučajeva, bili veće učinkovitosti od harmina. Aktivnost je opadala u nizu: N,O-bis-harmicini > N-harmicini > O-harmicini. Većina testiranih spojeva pokazala je umjerenu toksičnost prema Huh7 stanicama pri primjeni u obje koncentracije. Citotoksičnost dobivenih spojeva ispitana je na HepG2 staničnoj liniji (stanice humanog hepatocelularnog karcinoma). Najmanje toksični su bili N,O-bis-harmicini dok su O-harmicini pokazali najveću citotoksičnost.

Važnost ovog istraživanja leži u činjenici što su Perković i suradnici prvi put pokazali djelovanje hibridnih spojeva harmina i CAD na eritrocitni i hepatocitni stadij parazita malarije što čini harmicine dobrim spojevima uzorima za razvoj novih i učinkovitijih antimalarika (Perković i sur., 2019).

1.3.3. Harmicini amidnog tipa

Harmicini amidnog tipa nastaju povezivanjem harmina i CAD-a amidnom vezom. Marinović i suradnici su sintetizirali ovakve hibride u tri koraka. Harmin i harmol su alkilirani korištenjem 2-(Boc-amino)etil bromida kako bi dobili N- i O-alkilirane derivate. U kiselim uvjetima je uklonjena Boc zaštitna skupina te su dobiveni primarni amini. Za povezivanje CAD-a i amina korišteni su (1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin 3-oksidi) heksafluorofosfat (HATU) i *N,N*-diizopropiletilamin (DIEA) u diklormetanu (Slika 10) (Marinović i sur., 2020).



Slika 10. Strukturne formule O- i N-harmicina amidnog tipa

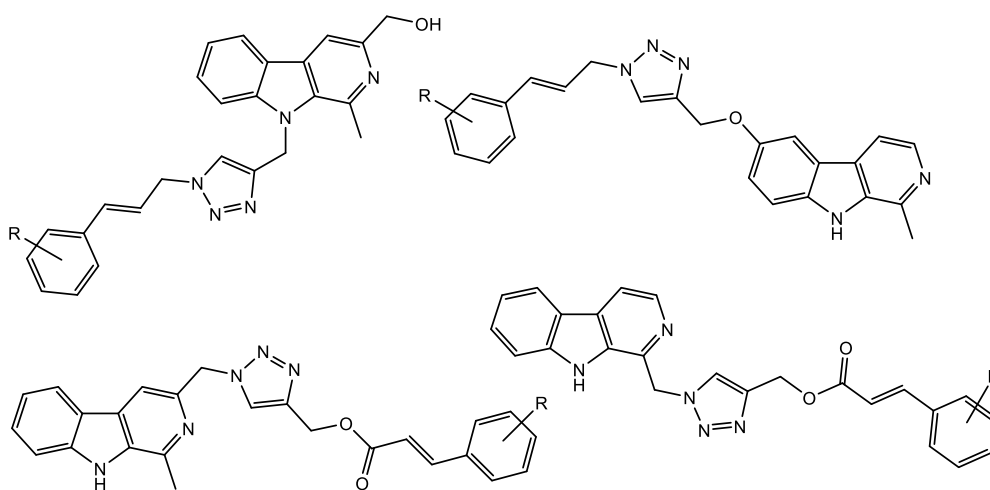
Dobivenim spojevima ispitano je biološko djelovanje. Aktivnost dobivenih spojeva na eritrocitnu fazu životnog ciklusa plazmodija proučavana je korištenjem 3D7 i Dd2 soja *P. falciparum*. Harmicini su pokazali jače djelovanje protiv oba soja *P. falciparum* u usporedbi s harminom. Nadalje, ovako priređeni harmicini imali su jače djelovanje na eritrocitnu fazu plazmodija u usporedbi s triazolskim harmicinima. U većini slučajeva su N-harmicini amidnog tipa imali jači učinak u odnosu na O-harmicine istog tipa. Kod N-harmicina, supstitucija benzenskog prstena s halogenom u *m*- ili *p*-položaju dovela je do povećanja antiplazmodijske aktivnosti. Kod O-harmicina, preferirana je supstitucija u *p*-položaju, neovisno o tipu supstituenta. Zamjenom vodika s izosterom fluorom nastaje spoj koji ima najjače djelovanje među svim O-harmicinima amidnog tipa.

Aktivnost spojeva na hepatocitnu fazu *P. berghei* ispitana je na ranije opisan način na Huh7 stanicama inficiranim istim sojem. Rezultati su pokazali da harmicini amidnog tipa nemaju značajan učinak na hepatocitni stadij parazita malarije u odnosu na harmin i prethodno sintetizirane triazolske harmicine. Citotoksičnost dobivenih spojeva ispitana je na

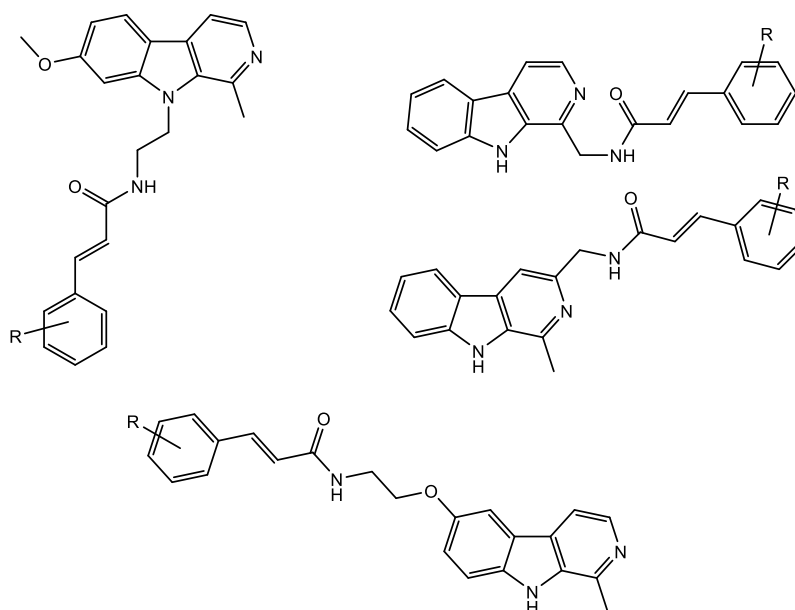
HepG2 staničnoj liniji te se rezultati slažu s prethodnim istraživanjem da su N-harmicini manje citotoksični od O-harmicina (Marinović i sur., 2020).

1.3.4. Sinteza novih harmicina triazolskog i amidnog tipa

Istraživačka skupina Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu provela je novo istraživanje u kojem su sintetizirani novi harmicini triazolskog i amidnog tipa. U ovom istraživanju pripremljeni su različiti harmicini uvođenjem supstituenata na položaje C-1, C-3, O-6 i N-9 β -karbolinskog prstena. Dobivenim derivatima (Slika 11) su ispitana biološka djelovanja te su međusobno uspoređena.



Novi harmicini triazolskog tipa

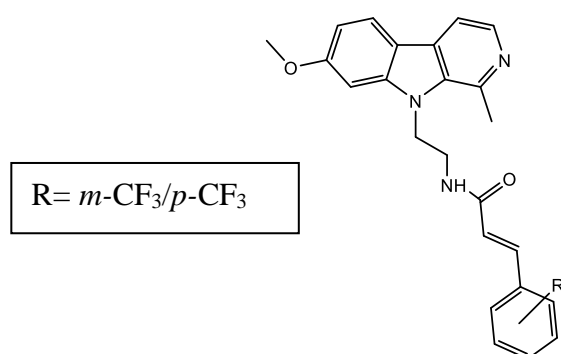


Novi harmicini amidnog tipa

Slika 11. Novi harmicini

Harmicini triazolskog tipa sintetizirani su korištenjem CuAAC. Za sintezu harmicina u položajima C-1 i C-3 β -karbolinskog prstena kao građevne jedinice korišteni su azidi na bazi harmina i alkini na bazi CAD. U sintezi harmicina triazolskog tipa u položajima O-6 i N-9 korišteni su cimetni azidi i alkin na bazi harmina. Sinteza harmicina amidnog tipa uključivala je prevođenje derivata harmina u primarne amine te reakciju povezivanja s različitim CAD.

Djelovanje novih harmicina na eritrocitnu fazu parazita malarije ispitana je na sojevima *P. falciparum* 3D7 i Dd2, dok je aktivnost novosintetiziranih spojeva prema hepatocitnoj fazi parazita malarije ispitana na *P. berghei*. Rezultati ispitivanja *in vitro* djelovanja harmicina na eritrocitnu fazu parazita malarije pokazali su da najsnažnije djelovanje imaju harmicini u kojima je β -karbolinski prsten supstituiran u položaju N-9, te da se aktivnost spojeva smanjivala u nizu: N-9 > O-6 > C-3 > C>1, uz iznimku triazolskih derivata na položaju N-9 i hidroksimetilenskim supstituentom u položaju C-3, koji su pokazali najslabije djelovanje. Među novosintetiziranim harmicinima, najsnažnije djelovanje pokazali su harmicini priređeni iz harminskog amina na položaju N-9 i *m*- ili *p*- (trifluorometil)cimetne kiseline (Slika 12). Triazolski hibridi koji su nastali supstitucijom u položaju N-9 su pokazali su slabiju aktivnost od harmina ukoliko je na položaju C-3 bila hidroksimetilenska skupina. Harmicini pripremljeni u položaju O-6 pokazivali su jednaku aktivnost, bez obzira na poveznicu, dok je supstitucija na položaju C-3 dovela do smanjenja antimalarijskog djelovanja. Hibridi priređeni u položaju C-1 β -karbolinskog prstena bili su u potpunosti inaktivni prema eritrocitnom stadiju parazita malarije.



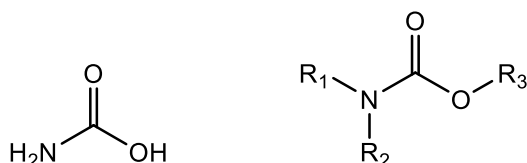
Slika 12. Strukture novih harmicina amidnog tipa s najjačim djelovanjem na eritrocitnu fazu životnog ciklusa plazmodija

Rezultati ispitivanja učinkovitosti novih harmicina na hepatocitni stadij parazita malarije pokazali su da harmicini priređeni u položaju N-9 β -karbolinskog prstena imaju

najjaču aktivnost. Aktivnost je opadala u nizu: N-9 > O-6 > C-3 > C-1. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti novih spojeva na HepG2 stanicama pokazali su da su amidni harnicini manje citotoksični od triazolskih harnicina (Marinović i sur., 2021).

1.4. Karbamati

Karbamati su derivati karbaminske kiseline kod kojih su amino i karboksilna skupina supstituirane različitim alkilnim, arilnim ili alkil-arilnim supstituentima. Uvođenje različitih supstituenata na amino ili karboksi kraj karbamatne skupine može utjecati na njihova biološka i farmakokinetička svojstva te stabilnost. Karakterizira ih prisutnost –O–CO–NH– poveznice u strukturi (Slika 13).



Slika 13. Kemijska struktura karbaminske kiseline i strukturalna formula karbamata

Kemijska svojstva karbamata, konformacijska i metabolička stabilnost, mogućnost prolaska kroz stanične membrane, a kod nekih i mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, čini ih poželjnim strukturnim elementima lijekova. Otkrićem fizostigmina, metilnog karbamatnog estera, započinje primjena karbamatnih spojeva u medicinske svrhe. Fizostigmin je izoliran iz biljne vrste *Physostigma venenosum*, Fabaceae (Calabar grah). U početku se koristio za liječenje povišenog krvnog tlaka i glaukoma, dok se danas koristi u liječenju odgođenog želučanog pražnjenja i miastenije gravis. Danas postoji čitav niz lijekova koji u svojoj strukturi sadrže karbamatnu skupinu te se naširoko koriste. Neki od njih su inhibitori HIV proteaze (engl. *human immunodeficiency virus*, virus humane imunodeficijencije; ritonavir, darunavir i slično), antikonvulzivi (felbamat, retigabin), antihelmintici (febendazol, albendazol), citostatici (irinotekan, mitomicin C) (Matošević i Bosak, 2020).

Peptidni lijekovi danas se naširoko razvijaju, posebice kao inhibitori različitih enzima zbog visokog afiniteta i specifičnosti učinka. Loša *in vivo* stabilnost, farmakokinetička svojstva i biodostupnost ograničavaju njihovu primjenu. Ovi nedostaci mogu se prevladati zamjenom peptidne skupine nekom drugom, kao što je karbamatna skupina, urea ili

heterociklički prstenovi. Tako dobiveni peptidomimetici postaju stabilni prema aminopeptidazama, enzimima koji razgrađuju peptidne lijekove, čime se produljuje njihov učinak. Također, prisustvo karbamatne skupine u strukturi lijeka može dovesti do povećanja permeacije kroz biološke membrane (Ghosh i Brindisi, 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Malarija je životno ugrožavajuća bolest uzrokovana parazitima roda *Plasmodium*, a najteži oblik bolesti uzrokuju *P. falciparum* i *P. vivax*. Parazit se prenosi na ljude ubodom inficiranih ženki komarca roda *Anopheles*. Veliki problem predstavlja pojava novih sojeva roda *Plasmodium* koji pokazuju rezistenciju na postojeće lijekove te postoji potreba za modifikacijom postojećih lijekova, ali i za razvojem lijekova s potpuno drugačijim mehanizmima djelovanja.

Noviji pristup u sintezi novih antimalarika naziva se „kovalentna biterapija“ i podrazumijeva kovalentno povezivanje dva ili više farmakofora u jednu molekulu kako bi se dobili produkti s dvojnim djelovanjem. Vodeći se tim pristupom, istraživačka skupina Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu dizajnirala je i sintetizirala dvije serije harmicina, hibridnih spojeva harmina i CAD povezanih triazolom ili amidnom vezom, te je ispitano njihovo biološko djelovanje na eritrocitnu i hepatocitnu fazu plazmodija. Oba tipa harmicina pokazala su jače djelovanje na eritrocitnu fazu životnog ciklusa vrste *P. falciparum* u odnosu na harmin. Također, triazolski derivati pokazali su i učinak na hepatocitnu fazu životnog ciklusa plazmodija što je ujedno prvi dokaz djelovanja harmina i njegovih derivata na hepatocitu fazu. Daljnjim istraživanjem priređeni su harmicini na različitim položajima β -karbolinskog prstena te je dokazano da amidni hibridi priređeni u položaju N-9 β -karbolinskog prstena imaju najjače djelovanje na plazmodij.

Cilj ovog diplomskog rada je sinteza harmicina karbamatnog tipa. Karbamatna skupina je bioizoster amidne veze te se postavlja pitanje kako će zamjena amidne skupine karbamatnom utjecati na antimalarijsko djelovanje tako priređenih harmicina. U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija dva harmicina karbamatnog tipa kojima će se, u daljnjem istraživanju, ispitati antimalarijsko djelovanje te usporediti aktivnost u odnosu na harmin i prethodno sintetizirane harmicine amidnog i triazolskog tipa.

3. MATERIJALI I METODE

Tijek kemijskih reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC). Kao stacionarna faza korištene su staklene silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka). Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063-0,20 mm (Sigma-Aldrich, SAD). Analizirani spojevi detektirani su pod ultraljubičastim svjetlom ($\lambda = 254$ nm) i parama joda. Mobilne faze korištene u tankoslojnoj kromatografiji i kromatografiji na koloni bile su sljedeće: diklormetan/metanol (9:1 i 8:1) i cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5 i 1:1:0,5).

Tališta (t_r) sintetiziranih spojeva određena su na Stuart Melting Point instrumentu (Barloworld Scientific, Uk) i nisu korigirana. IR spektri snimljeni su na FT-IR Spectrum Two spektrometru (Perkin Elmer, SAD). ¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na spektrofotometru Bruker Avance III HD Ascend (Bruker, SAD) pri 600 MHz za ¹H te pri 151 MHz za ¹³C jezgru. Uzorci su mjereni u otopinama DMSO-*d*₆ na temperaturi od 20 °C u NMR cjevčicama od 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na unutarnji standard tetrametilsilan (TMS) u ¹H spektrima te u odnosu na rezidualni pik DMSO-a pri 39,52 ppm u ¹³C spektrima, a konstante sprezanja (J) izražene su u Hz. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420, SAD). Kao tehnika ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom modu.

Sve kemikalije nabavljene su iz komercijalnih izvora i bile su *p.a.* stupnja čistoće. Harmin, cimetni alkohol i natrijev hidrid su nabavljeni od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD). Cezijev karbonat, *p*-propoksicimetna kiselina, 2-(Boc-amino)etil bromid, *N,N*-dimetilformamid (DMF) i 1,1'-karbonildiimidazol (CDI) su nabavljeni od proizvođača TCI Chemicals (Japan). Bezvodni natrijev sulfat nabavljen je od proizvođača Gram-Mol (Hrvatska), trietilamin (TEA) od proizvođača Alfa Aesar (SAD), litij aluminij hidrid od proizvođača Merck (Njemačka), a bezvodni dietil-eter od proizvođača J.T.Baker (SAD). Apsolutni etanol je nabavljen od proizvođača Acros Organics (Belgija). Tionil klorid, toluen, klorovodična kiselina i metanol su nabavljeni od proizvođača Honeywell Fluka (Njemačka).

Suha otapala dobivena su sljedećim postupcima. Suhi toluen dobiven je destilacijom toluena i sušenjem nad natrijem. Suhi DMF dobiven je destilacijom DMF-a i sušenjem nad aktiviranim molekulskim sitima.

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

U otopinu harmina (0,800 g, 3,769 mmol) u suhom DMF-u (6 mL) u inertnoj atmosferi dušika dodan je cezijev karbonat (5,280 g, 16,207 mmol) i 2-(Boc-amino)etil bromid (3,379 g,

15,076 mmol) pri 95 °C te je reakcijska smjesa miješana pri istim uvjetima preko noći. Potom je dodano 5 mL vode te je reakcijska smjesa ekstrahirana etil-acetatom (3 × 70 mL). Organski slojevi su sakupljeni i isprani vodom (2 × 30 mL), sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu diklormetan/metanol (8:1) i rastrljavanja u smjesi eter/petroleter, dobiveno je 0,645 g *terc*-butil (2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamata (**1**). Zatim je u otopinu spoja **1** u metanolu (4 mL) dodana klorovodična kiselina u metanolu (1,816 mL, 4 M) te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon završetka reakcije, metanol je uparen pod sniženim tlakom, a zaostali talog otopljen u 10 mL vode i zalužen s 5 % otopinom natrijeva hidroksida do pH 12. Novonastali talog je odsisan i rastrljan u eteru te je dobiven spoj **2**.

Iskorištenje: 0,368 g (38 %).

t_f : 143,7-144,6 °C.

ESI-MS: m/z 256,3 (M+1)⁺.

IR (ATR) ν_{\max} cm⁻¹ 3354,88, 3276,53, 2972,95, 2933,43, 1620,22, 1562,36, 1445,11, 1404,98, 1342,77, 1302,74, 1236,92, 1220,97, 1149,66, 1136,57, 1038,95, 939,40, 815,67, 799,91, 641,12, 599,73, 551,79.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm) 8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,07 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,86 (d, 1H, 6, $J = 5,1$ Hz), 7,24 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz), 6,87 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 4,54 (t, 2H, 1', $J = 7,3$ Hz), 3,91 (s, 3H, 14), 2,97 (s, 3H, 13), 2,93 (t, 2H, 2', $J = 7,3$ Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm) 160,50 (1), 142,92 (8), 140,64 (11), 137,66 (7), 134,76 (9), 128,23 (4), 122,30 (3), 114,18 (5), 112,18 (6), 109,12 (2), 93,80 (12), 55,61 (14), 46,87 (1'), 41,94 (2'), 23,28 (13).

3.2. Sinteza (*E*)-3-(4-propoksifenil)-prop-2-en-1-ola (**5**)

U otopinu *p*-propokscimetine kiseline (0,500 g, 2,424 mmol) u suhom toluenu (10 mL) dodan je suhi DMF (5 kapi) i tionil klorid (0,879 mL, 1,44 g i 12,12 mmol) pri 0 °C te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi 45 minuta. Zatim je otapalo upareno pod sniženim tlakom te napareno suhim toluenom (2 × 6 mL). Otopini sirovog produkta (kiselinskog klorida) **3** u suhom diklormetanu (10 mL) dokapana je otopina TEA (0,259 g, 2,568 mmol) u apsolutnom etanolu (10 mL). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Sljedeći dan su otapala uparena pod sniženim tlakom, a ostatak je otopljen u 50 mL diklormetana. Organski sloj je ekstrahiran 10 % otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (1 × 20 mL), ispran vodom (2 × 40 mL), sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen. Dobiveno ulje pročišćeno je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5) te je dobiveno 0,419 g odgovarajućeg estera **4**.

U otopinu estera **4** (0,419 g, 2,032 mmol) u suhom dietil-eteru (5 mL) pri inertnoj atmosferi dušika dodan je litijev aluminijev hidrid (0,084 g, 2,235 mmol) pri 0 °C. Reakcijska smjesa je miješana 35 minuta na 0 °C, nakon čega je dodano 20 mL vode, a dobivena smjesa zakiseljena 10 % otopinom HCl do prestanka pjenjenja i ekstrahirana 1 % otopinom HCl-a (2 × 40 mL). Organski slojevi su sakupljeni i isprani vodom (2 × 40 mL), sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom i upareni pod sniženim tlakom. Dobiveni talog je rastrljan u cikloheksanu te je dobiven alkohol **5**.

Iskorištenje: 0,247 g (63 %).

t_f : 78,3-79,5°C.

ESI-MS: m/z 133,0 (M+1)⁺.

IR (ATR) ν_{\max} cm⁻¹ 3355,76, 3036,60, 2963,10, 2932,93, 2876,70, 1604,83, 1574,67, 1510,19, 1466,47, 1393,44, 1305,55, 1268,30, 1174,02, 1131,86, 1084,98, 1023,50, 1005,07, 918,34, 833,66, 805,77, 778,48, 636,45, 543,09, 519,31, 498,56.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm) 7,33 (d, 2H, 6, 10, $J = 8,2$ Hz), 6,87 (d, 2H, 7, 9, $J = 8,1$ Hz), 6,47 (d, 1H, 4, $J = 15,9$ Hz), 6,20 (dt, 1H, 3, $J = 16,1, 5,3$ Hz), 4,78 (t, 1H, 1, $J = 5,5$ Hz), 4,08 (t, 2H, 2, $J = 5,4$ Hz), 3,91 (t, 2H, 1', $J = 6,5$ Hz), 1,71 (h, 2H, 2', $J = 7,0$ Hz), 0,97 (t, 3H, 3', $J = 7,4$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) 158,02 (8), 129,36 (5), 128,24 (4), 128,19 (3), 127,32 (6, 10), 114,49 (7, 9), 68,88 (1'), 61,65 (2), 22,04 (2'), 10,40 (3').

3.3. Sinteza harmicina karbamatnog tipa 6 i 7

Opći postupak:

Otopina CDI-a (0,038 g, 0,235 mmol) u suhom DMF-u (800 μL) miješana je 30 minuta pri 0 °C. Zatim je u otopinu postepeno (tijekom 30 minuta) dokapavana suspenzija amina **2** (0,050 g, 0,196 mmol) u suhom DMF-u (800 μL). Suspenzija odgovarajućeg cimetnog alkohola (0,235 mmol) i natrijevog hidrida (0,0094 g, 0,235 mmol, 60%-tna uljna suspenzija) u suhom DMF-u (800 μL) miješana je na sobnoj temperaturi 1 h, a nakon toga je postepeno dokapavana u smjesu CDI-a i amina **2** u suhom DMF-u. Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi tijekom 18 h, a zatim je u reakcijsku smjesu dodano 40 mL vode te je dobivena otopina ekstrahirana etil-acetatom (2 \times 40 mL). Organski slojevi su sakupljeni, isprani s 30 mL vode, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani i upareni do suha pod sniženim tlakom. Dobiveni talog pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu diklormetan/metanol, a nakon rastrljavanja u smjesi eter/petroleter dobiven je odgovarajući karbamat.

3.3.1. Sinteza cinamil (2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)etil)karbamata (6)

Alkohol: 0,038 g cimetnog alkohola.

Mobilna faza: diklormetan/metanol (8:1).

Iskorištenje: 0,025 g (31 %).

t_r : 147,7-148,8 °C.

ESI-MS: m/z 416,1 ($M+1$)⁺.

IR (ATR) ν_{\max} cm^{-1} 3193,29, 2970,50, 2931,33, 1713,19, 1623,12, 1565,60, 1496,43, 1447,14, 1404,79, 1344,52, 1257,54, 1220,59, 1196,99, 1178,04, 1138,46, 1121,75, 1091,90, 1043,74, 1019,86, 947,57, 814,34, 732,86, 690,24, 597,51, 551,34, 529,06, 500,01.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) 8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,47 (d, 1H, 3', $J = 5,9$ Hz), 7,44 (d, 2H, 9', 13', $J = 7,5$ Hz), 7,35 (t, 2H, 10', 12', $J = 7,7$ Hz), 7,27 (t, 1H, 11', $J = 7,3$ Hz), 7,21 (d, 1H, 12, $J = 2,3$ Hz), 6,88 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,1$ Hz), 6,62 (d, 1H, 7', $J = 15,9$ Hz), 6,30 (dt, 1H, 6', $J = 15,9, 6,1$ Hz), 4,62 – 4,60 (m, 4H, 1', 5'), 3,90 (s, 3H, 14), 3,41 (q, 2H, 2', $J = 6,6$ Hz), 2,96 (s, 3H, 13).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) 160,50 (1), 156,30 (4'), 142,89 (8), 140,54 (11), 137,78 (7), 136,06 (9), 134,69 (8'), 132,40 (7'), 128,67 (10', 12'), 128,48 (4), 127,90 (11'), 126,42 (9', 13'), 124,68 (6'), 122,39 (3), 114,35 (5), 112,26 (6), 109,19 (2), 93,55 (12), 64,35 (5'), 55,48 (14), 43,74 (1'), 40,40 (2'), 23,05 (13).

3.3.2. Sinteza (*E*)-3-(4-propoksifenil)-alil (2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamata (7)

Alkohol: 0,045 g spoja 5.

Mobilna faza: diklormetan/metanol (9:1).

Iskorištenje: 0,026 g (28 %).

t_r : 154,5-155,3 °C.

ESI-MS: m/z 474,2 ($M+1$)⁺.

IR (ATR) ν_{\max} cm^{-1} 3198,19, 2965,60, 2934,11, 1714,12, 1623,53, 1510,55, 1446,03, 1404,74, 1344,32, 1306,67, 1254,12, 1221,47, 1197,37, 1176,56, 1138,14, 1122,86, 1020,60, 963,71, 813,92, 597,49, 565,41, 529,14.

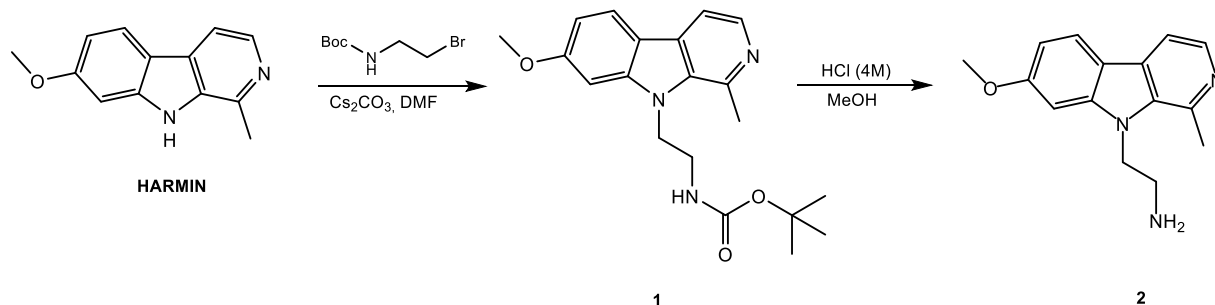
^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) 8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,43 (t, 1H, 3', $J = 6,0$ Hz), 7,37 – 7,35 (m, 2H, 9', 13'), 7,21 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz), 6,91 – 6,87 (m, 3H, 2', 10', 12'), 6,55 (d, 1H, 7', $J = 15,9$ Hz), 6,12 (dt, 1H, 6', $J = 15,9, 6,3$ Hz), 4,61 (t, 2H, 1', $J = 6,9$ Hz), 4,57 (d, 2H, 5', $J = 6,2$ Hz), 3,92 (t, 2H, 14', $J = 6,5$ Hz), 3,90 (s, 3H, 14), 3,40 (q, 2H, 2', $J = 6,6$ Hz), 2,96 (s, 3H, 13), 1,72 (h, 2H, 15', $J = 7,1$ Hz), 0,97 (t, 3H, 16', $J = 7,4$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) 160,52 (1), 158,55 (11'), 156,36 (4'), 142,91 (8), 140,52 (11), 137,74 (7), 134,68 (9), 132,49 (7'), 128,52 (8'), 128,51 (4), 127,75 (9', 13'), 122,40 (6'), 121,95 (3), 114,55 (10', 12'), 114,34 (5), 112,27 (6), 109,22 (2), 93,55 (12), 68,93 (14'), 64,64 (5'), 55,49 (14), 43,75 (1'), 40,39 (2'), 23,02 (13), 22,02 (15'), 10,39 (16').

4. REZULTATI I RASPRAVA

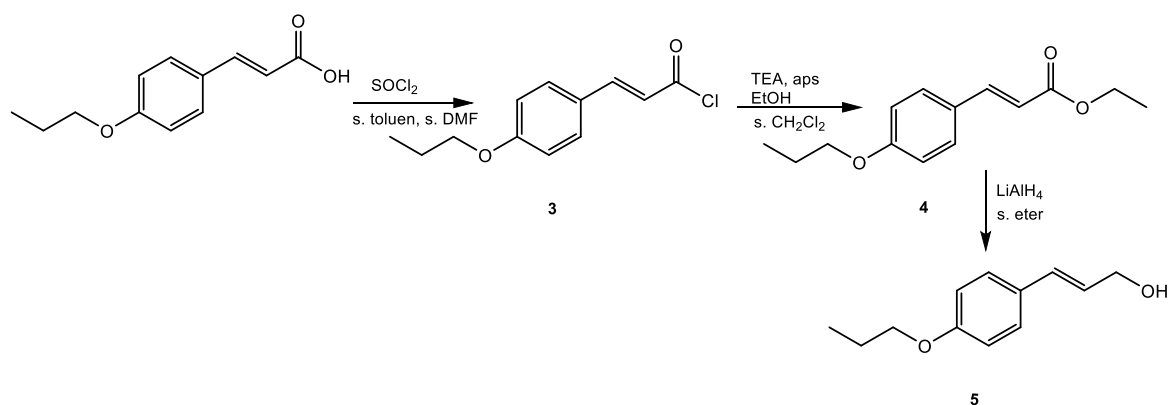
Harmin je β -karbolinski alkaloid koji pokazuje širok spektar farmakološkog djelovanja, uključujući i antimalarijsko djelovanje. Mogući mehanizam antimalarijskog djelovanja harmina je inhibicija proteina toplinskog šoka 90 vrste *Plasmodium falciparum* (Eagon i sur., 2012). Cimetna kiselina i njeni derivati također pokazuju antimalarijsko djelovanje te njihovim kovalentnim povezivanjem s harminom nastaju hibridni spojevi harmicini, koji su pokazali jače antimalarijsko djelovanje u odnosu na početne spojeve. Najsnažnije antimalarijsko djelovanje ispoljili su harmicini amidnog tipa u položaju N-9 β -karbolinskog prstena. Cilj ovog rada je sinteza hibrida harmina i CAD karbamatnog tipa u položaju N-9 β -karbolinskog prstena, koji predstavljaju novu generaciju harmicina.

Kao početni spojevi u sintezi karbamata korišteni su harmin i odgovarajući cimetni alkohol. Harmin je preveden u amin **2** (Shema 1), na način da je u prvom koraku alkiliran u položaju 9 korištenjem 2-(Boc-aminoetil)bromida, u prisutnosti cezijeveg karbonata i suhog DMF-a kao otapala. Zatim je zaštitna karbamatna skupina uklonjena u kiselim uvjetima pri čemu je dobiven primarni amin **2**. Budući da je amin **2** u kiselom mediju u obliku soli, potrebno je zalužiti reakcijsku smjesu kako bi oslobodili amin iz oblika soli i preveli ga u oblik topljiv u organskim otapalima.



Shema 1. Sinteza amina **2**

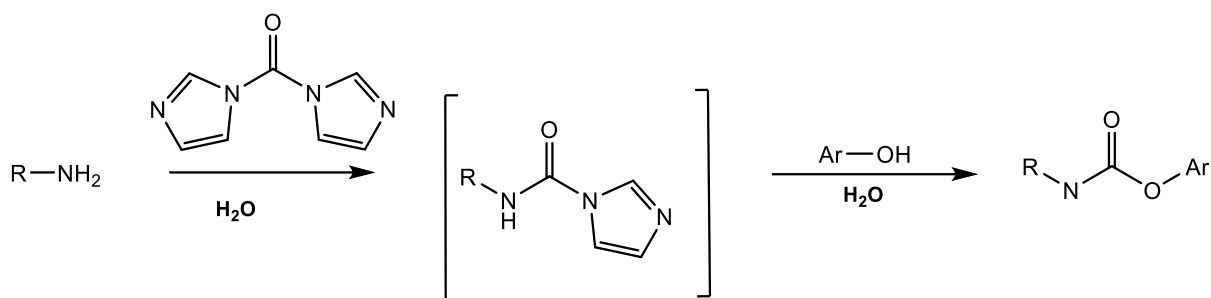
U sintezi harmicina karbamatnog tipa korišteni su odgovarajući cimetni alkoholi. Cimetni alkohol komercijalno je dostupan, dok je alkohol **5** pripremljen prema Shemi 2.



Shema 2. Sinteza *p*-propoksicimetnog alkohola **5**

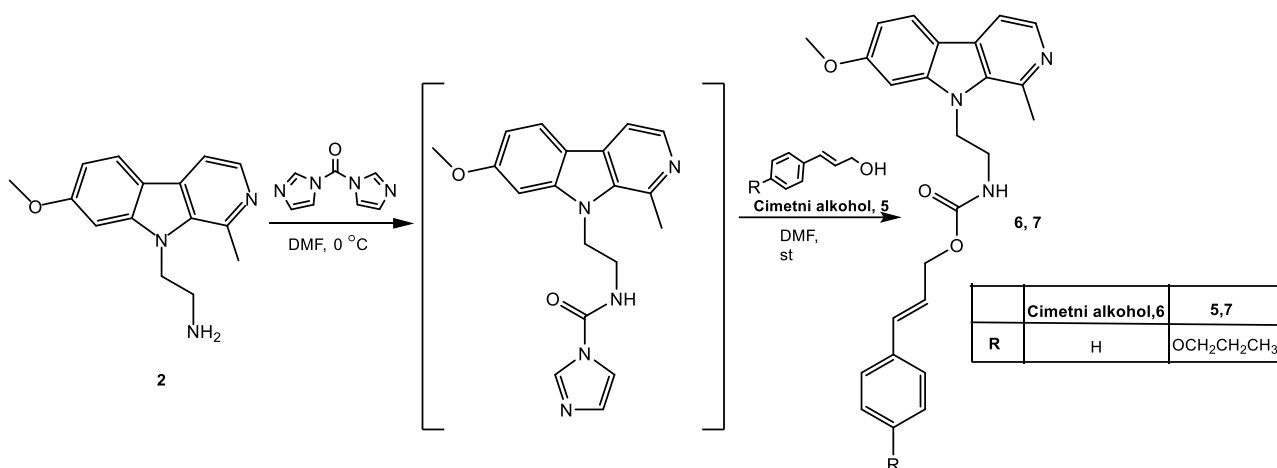
Željeni *p*-propoksicimetni alkohol pripravljen je u tri reakcijska koraka. U prvom reakcijskom koraku je *p*-propoksicimetna kiselina prevedena u kiselinski klorid **3**, reaktivniji međuprodukt. Sinteza kiselinskog klorida **3** provedena je uz pomoć tionil-klorida u suhim uvjetima, korištenjem suhog toluena kao otpala te suhog DMF-a, koji služi kao katalizator. U drugom reakcijskom koraku kiselinski klorid je nukleofilnom supstitucijom preveden u ester **4**. U ovom koraku korišten je TEA kao baza za deprotoniranje etanola kako bi se povećala njegova reaktivnost. U zadnjem reakcijskom koraku pripravljeni ester **4** je reduciran u odgovarajući alkohol **5** uz litijev aluminijev hidrid. Reakcija redukcije provedena je na $0\text{ }^\circ\text{C}$ kako bi se izbjegla redukcija dvostruke veze u alifatskom dijelu CAD-a.

Konačni spojevi **6** i **7** sintetizirani su korištenjem CDI-a prema metodi koju su razvili Padiya i suradnici. CDI je organski spoj koji se koristi kao *coupling* reagens u sintezi različitih peptida (<https://www.sigmaaldrich.com/>). Za reakciju su potrebni CDI, prikladno otapalo i nukleofil. Prednost ovih reakcija je u tome što se ne moraju odvijati pod atmosferom inertnog plina i ne zahtijevaju korištenje bezvodnih otapala, već se reakcije provode u diklormetanu, acetonitrilu i tetrahidrofuranu. Iako je CDI nestabilan u vodi, reakcija se može provesti koristeći i vodu kao otapalo pri čemu nastaju odgovarajući imidazol-N-karboksamidi (N-supstituirani karbonilimidazolidi). Karbonilimidazolidi dobiveni iz primarnih amina reagiraju s nukleofilima, kao što su fenoli, tiofenoli i amini, pri čemu nastaju odgovarajući karbamati, tiokarbamati i uree (Shema 3) (Padiya i sur., 2012).



Shema 3. Sinteza karbamata

Postupak sinteze novih harmicina karbamatnog tipa prikazan je na Shemi 4. Primarni amin **2** preveden je u karbonilimidazolid nukleofilnim napadom amino skupine amina **2** na elektrofilni karbonilni ugljik CDI-a. Reakcija je provedena u DMF-u pri 0 °C. Cimetni alkohol ili alkohol **5** deprotonirani su uz pomoć natrijevog hidrida kako bi im se povećala nukleofilnost. Dodatkom odgovarajućeg alkohola u smjesu amina i CDI-a nastaju harmicini karbamatnog tipa **6** i **7**.

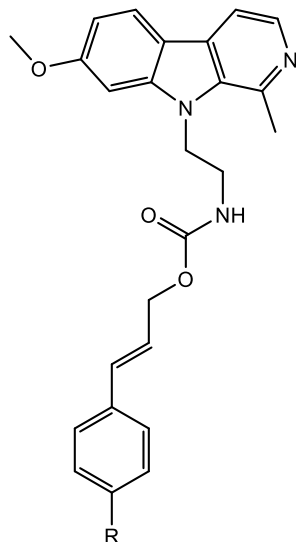


Shema 4. Sinteza harmicina karbamatnog tipa **6** i **7**.

Tijek reakcija i čistoća spojeva kontrolirani su TLC-om. Po završetku reakcija, produkti **6** i **7** pročišćeni su kromatografijom na koloni uz različite pokretne faze ovisno o svojstvima konačnih produkata. Produkti su dodatno pročišćeni rastavljanjem u dietil-eteru i petroleteru. Sintetizirani karbamati novi su spojevi te je provedena njihova strukturna karakterizacija. Ona obuhvaća spektroskopske i analitičke metode: IR, ¹H-, ¹³C- NMR, MS te

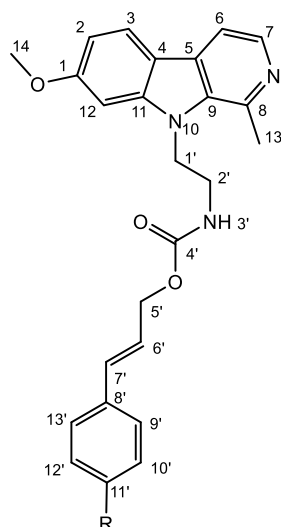
određivanje temperature tališta. Analitički i spektroskopski podaci prikazani su u Tablicama 3 i 4, a spektri su priloženi u Prilozima.

Tablica 3. Analitički, MS i IR spektroskopski podaci harmicina karbamatnog tipa **6** i **7**.



Spoj	R	$t_f/^\circ\text{C}$	Molekulska formula	Mr	MS (m/z)	IR (ATR, ν/cm^{-1})
6	H	147,7-148,8	$\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$	415,49	416,1	3193,29, 2970,50, 2931,33, 1713,19, 1623,12, 1565,60, 1496,43, 1447,14, 1404,79, 1344,52, 1257,54, 1220,59, 1196,99, 1178,04, 1138,46, 1121,75, 1091,90, 1043,74, 1019,86, 947,57, 814,34, 732,86, 690,24, 597,51, 551,34, 529,06, 500,01
7	OPr	154,5-155,3	$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$	473,58	474,2	3198,19, 2965,60, 2934,11, 1714,12, 1623,53, 1510,55, 1446,03, 1404,74, 1344,32, 1306,67, 1254,12, 1221,47, 1197,37, 1176,56, 1138,14, 1122,86, 1020,60, 963,71, 813,92, 597,49, 565,41, 529,14

Tablica 4. ^1H i ^{13}C NMR spektroskopski podaci karbamatnih harmicina **6** i **7**



Spoj	R	^1H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ /ppm)	^{13}C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ /ppm)	
6	H	8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,47 (d, 1H, 3', $J = 5,9$ Hz), 7,44 (d, 2H, 9', 13', $J = 7,5$ Hz), 7,35 (t, 2H, 10', 12', $J = 7,7$ Hz), 7,27 (t, 1H, 11', $J = 7,3$ Hz), 7,21 (d, 1H, 12, $J = 2,3$ Hz), 6,88 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,1$ Hz), 6,62 (d, 1H, 7', $J = 15,9$ Hz), 6,30 (dt, 1H, 6', $J = 15,9, 6,1$ Hz), 4,62 – 4,60 (m, 4H, 1', 5'), 3,90 (s, 3H, 14), 3,41 (q, 2H, 2', $J = 6,6$ Hz), 2,96 (s, 3H, 13).	160,50 (1), 156,30 (4'), 142,89 (8), 140,54 (11), 137,78 (7), 136,06 (9), 134,69 (8'), 132,40 (7'), 128,67 (10', 12'), 128,48 (4), 127,90 (11'), 126,42 (9', 13'), 124,68 (6'), 122,39 (3), 114,35 (5), 112,26 (6), 109,19 (2), 93,55 (12), 64,35 (5'), 55,48 (14), 43,74 (1'), 40,40 (2'), 23,05 (13).	
		8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,43 (t, 1H, 3', $J = 6,0$ Hz), 7,37 – 7,35 (m, 2H, 9', 13'), 7,21 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz), 6,91 – 6,87 (m, 3H, 2', 10', 12'), 6,55 (d, 1H, 7', $J = 15,9$ Hz), 6,12 (dt, 1H, 6', $J = 15,9, 6,3$ Hz), 4,61 (t, 2H, 1', $J = 6,9$ Hz), 4,57 (d, 2H, 5', $J = 6,2$ Hz), 3,92 (t, 2H, 14', $J = 6,5$ Hz), 3,90 (s, 3H,	160,52 (1), 158,55 (11'), 156,36 (4'), 142,91 (8), 140,52 (11), 137,74 (7), 134,68 (9), 132,49 (7'), 128,52 (8'), 128,51 (4), 127,75 (9', 13'), 122,40 (6'), 121,95 (3), 114,55 (10', 12'), 114,34 (5), 112,27 (6), 109,22 (2), 93,55 (12), 68,93 (14'), 64,64 (5'), 55,49 (14), 43,75 (1'), 40,39 (2'), 23,02	

14), 3,40 (q, 2H, 2', $J = 6,6$ Hz), (13), 22,02 (15'), 10,39 (16').
2,96 (s, 3H, 13), 1,72 (h, 2H, 15',
 $J = 7,1$ Hz), 0,97 (t, 3H, 16', $J =$
7,4 Hz).

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija dva nova harmicina karbamatnog tipa, hibrida harmina i derivata cimetine kiseline na položaju 9 β -karbolinskog prstena:

- cinamil (2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamat (**6**)
- (*E*)-3-(4-propoksifenil)-alil(2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamat (**7**)

Također su sintetizirani polazni spojevi, amin **2** i alkohol **5**.

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

U daljnjim ispitivanjima, koja nadilaze okvir ovog rada, sintetiziranim derivatima ispitat će se antimalarijsko djelovanje.

6. LITERATURA

Agarwal D, Gupta RD, Awasthi SK. Antimalarial hybrid molecules: a close reality or a distant dream. *Antimicrob Agents Chemoter*, 2017, 61, e00249-17.

Cao R, Fan W, Guo L, Ma Q, Zhang G, Li J, Chen X, Ren Z, Qiu L. Synthesis and structure-activity relationships of harmine derivatives as potential antitumor agents. *Eur J Med Chem*, 2012, 60, 135-136.

Cao R, Peng W, Chen H, Ma Y, Liu X, Hou X, Guan H, Xu A. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochem Biophys Res Comm*, 2005, 338, 1557-1558, 1561-1562.

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

Capela R, Cabal GG, Rosenthal PJ, Gut J, Mota MM, Moreira R, Lopes F, Prudencio M. Design and Evaluation of Primaquine-Artemisinin Hybrids as a Multistage Antimalarial Strategy. *Antimicrob Agents Chemoter*, 2011, 55, 4698, 4705.

CDI, 2021, <https://www.sigmaaldrich.com/>, pristupljeno 19.2.2022.

Cinnamic acid, 2004, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 24.1.2022.

Dechy-Cabaret O, Benoit-Vical F, Robert A, Magnaval JF, Séguéla JP, Meunier B. Synthesis and biological evaluation of a new trioxaquine containing a trioxane moiety obtained by halogenocyclisation of a hemiperoxyacetal. *C R Chim*, 2003, 6, 153–160.

Eagon S, Hammill JT, Bach J, Everson N, Sisley TA, Walls MJ, Durham S, Pillai DR, Falade MO, Rice AL, Kimball JJ, Lazaro H, DiBernardo C, Kiplin Guy R. Antimalarial activity of tetrahydro- β -carboline targeting the ATP binding pocket of Plasmodium falciparum heat shock 90 protein. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30, 127502.

Frost D, Meechoovet B, Wang T, Gately S, Giorgetti M, Shcherbakova I, Dunckley T. β -carboline compounds, including harmine, inhibit DYRK1A and tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS One*, 2011, 6, e19264.

Ghosh AK i Brindisi M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *J Med Chem*, 2005, 58, 2095.

Ginovart N, Meyer JH, Boovariwala A, Hussey D, Rabiner E, Houle S, Wilson AA. Positron emission tomography quantification of [¹¹C]-harmine binding to monoamine oxidase-A in the human brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 16, 330-331.

Harmine, 2004, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 24.1. 2022.

Introduction to (Quantitative) Structure Activity Relationships, 2007, <https://www.oec.org/>, pristupljeno 19.2.2022.

Javeed M, Rasul A, Hussain G, Jabeen F, Rasool B, Riaz A, Kaukab G, Ali M. Harmine and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in human diseases. *Bangladesh J of Pharmacol*, 2018, 13, 203-206.

Kamboj A, Sihag B, Brar DS, Kair A, Salunke DB. Structure Activity Relationship in β -Carboline Derived Anti-malarial Agents. *Eur J Med Chem*, 2021, 221, 5.

Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem – Int Ed*, 2001, 40, 2004–2008.

Kumar S, Singh A, Kumar K, Kumar V. Recent insights into synthetic β -carbolines with anti-cancer activities. *Eur J Med Chem*, 2017, 142, 4-14.

Li Y, Zhao C, Zhang J, Zhai S, Wei B, Wang L. HybridMolDB: A Manually Curated Database Dedicated to Hybrid Molecules for Chemical Biology and Drug Discovery. *J Chem Inf Model*, 2019, 59, 4063–4069.

Marinović M, Perković I, Fontinha D, Prudencio M, Held J, Pessanha de Carvalho L, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić Z. Novel Harmicines with Improved Potency against Plasmodium. *Molecules*, 2020, 25, 4376.

Marinović M, Poje G, Perković I, Fontinha D, Prudencio M, Held J, Pessanha de Carvalho L, Tandarić T, Vianello R, Rajić Z. Further investigation of harmicines as novel antiplasmodial agents: Synthesis, structure-activity relationship and insight into the mechanism of action. *Eur J Med Chem*, 2021, 224, 113687.

Matošević A i Bosak A. Carbamate group as structural motif in drugs: a review of carbamate derivatives used as therapeutic agents. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2020 , 71, 285-287.

Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, Asghari M, Shayegh J. Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. *Phcog Rev*, 2013, 7, 199, 204.

Padiya KJ, Gavade S, Kardile B, Tiwari M, Bajare S, Mane M, Gaware V, Varghese Sm Harel D, Kurhade S. Unprecedented „In Water“ Imidazole Carbonylation: Paradigm Shift for Preparation of Urea and Carbamate. *Org Lett*, 2012, 14, 2814-2817.

Perković I, Raić-Malić S, Fontinha D, Prudencio M, Pessanha de Carvalho L, Held J, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić Z. Harmicines – harmine and cinnamic acid hybrids as novel antiplasmodial hits. *Eur J Med Chem*, 2019, 187, 111927.

Pretorius SI, Breytenbach WJ, deKock C, Smith PJ, N'Da DP. Synthesis, characterization and antimalarial activity of quinoline-pyrimidine hybrids. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21, 269-277.

Ruwizhi N i Aderibigbe BA. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. *I J Mol Sci*, 2020, 21, 5712.

Silva AT, Bento CM, Pena AC, Figueiredo LM, Prudencio C, Aguiar L, Silva T, Ferraz R, Gomes MS, Teixeira C, Gomes P. Cinnamic Acid Conjugates in the Rescuing and Repurposing of Classical Antimalarial Drugs. *Molecules*, 2020, 25, 66.

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

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, 4207–4212.

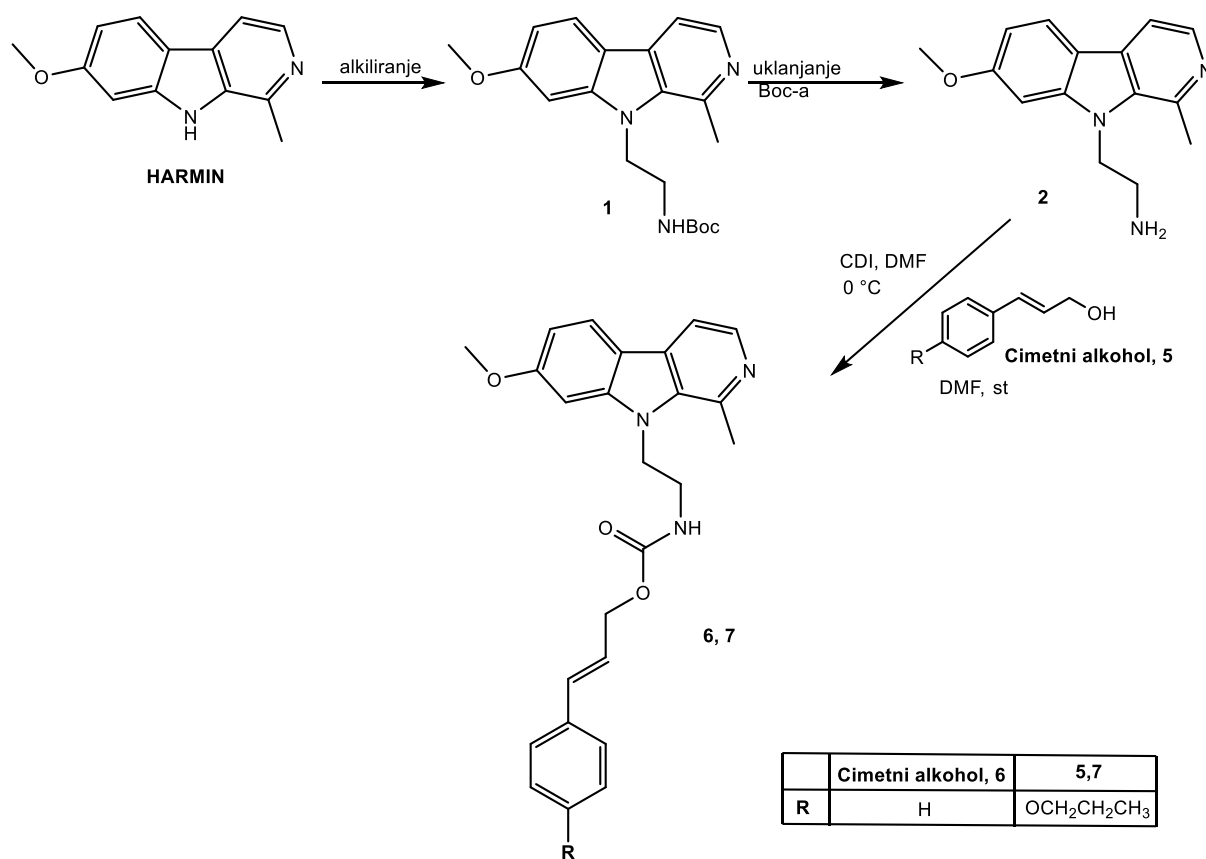
Song Y, Kesuma D, Wang J, Deng Y, Duan J, Wang JH, Qi RZ. Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. *Biochem Biophys Res Comm*, 2004, 317, 128-131.

Soni JP, Yeole Y, Shankaraiah N. β -Carboline-based molecular hybrids as anticancer agents: a brief sketch. *RSC Med Chem*, 2021, 12, 730-750.

7. SAŽETAK (SUMMARY)

Sinteza i karakterizacija harmicina karbamatnog tipa

Harmin i derivati cimetne kiseline pokazuju širok spektar farmakološkog djelovanja, među kojima je i antimalarijsko djelovanje. Njihovim povezivanjem nastaju harmicini te je cilj ovog rada bila sinteza i karakterizacija dva nova hibrida harmina i derivata cimetne kiseline povezana karbamatnom skupinom. Sintetski put uključivao je alkiliranje harmina i uklanjanje zaštitne skupine kako bi se dobio željeni amin **2**, sintezu odgovarajućeg alkohola **5** te sintezu harmicina **6** i **7** pomoću CDI-a (Shema).



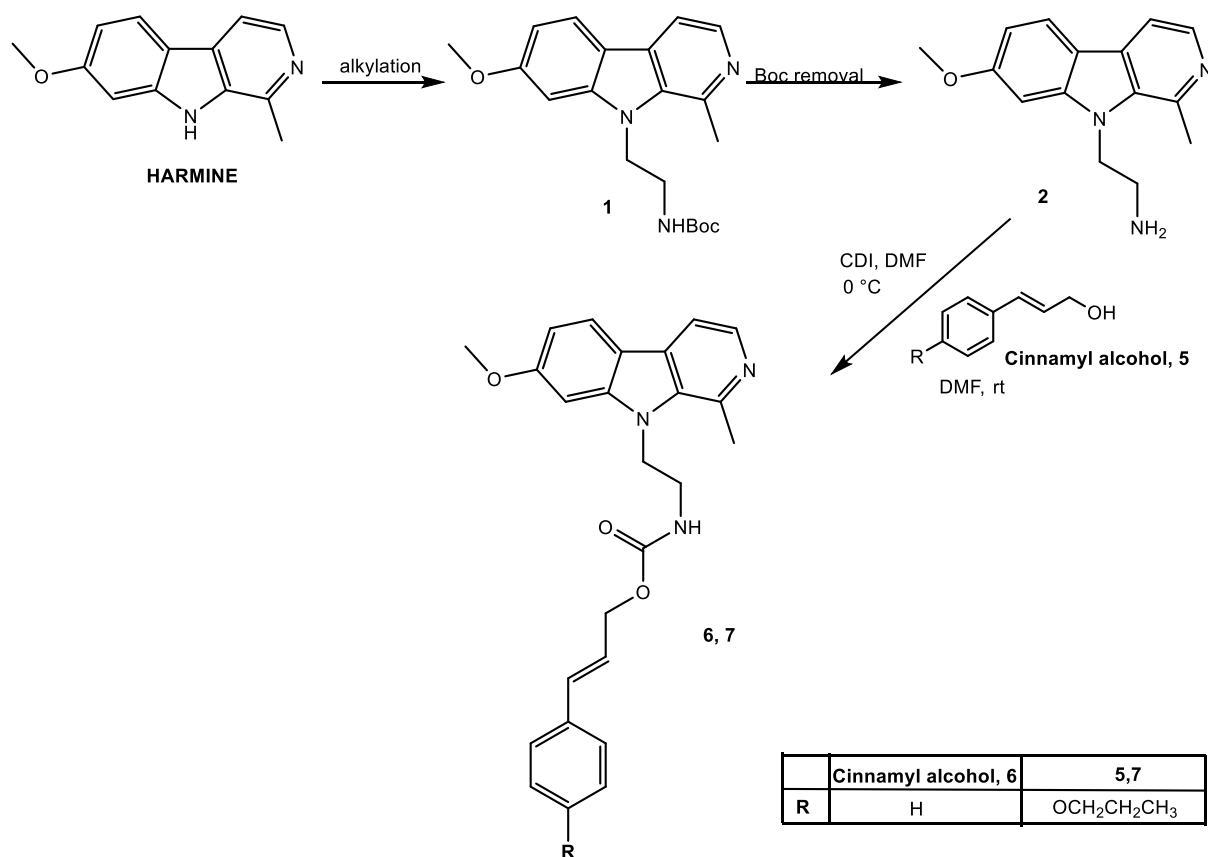
Shema. Sinteza harmicina karbamatnog tipa.

Svim novosintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta. U daljnjim ispitivanjima, koja nadilaze okvir ovog rada, sintetiziranim derivatima ispitat će se antimalarijsko djelovanje.

Ključne riječi: harmin, harmicini, derivati cimetne kiseline, karbamati, antimalarici

Synthesis and characterization of carbamate-type harmicines

Harmine and cinnamic acid derivatives (CAD) show a wide range of pharmacological activities, including antimalarial activity. Harmicines represent hybrids composed of harmine and CAD moieties and the aim of this thesis was the synthesis and characterization of two new carbamate-type harmicines. The synthetic pathway included alkylation of harmine and removal of the Boc-protecting group to obtain the desired amine **2**, synthesis of the alcohol **5** and finally, synthesis of harmicines in the presence of CDI.



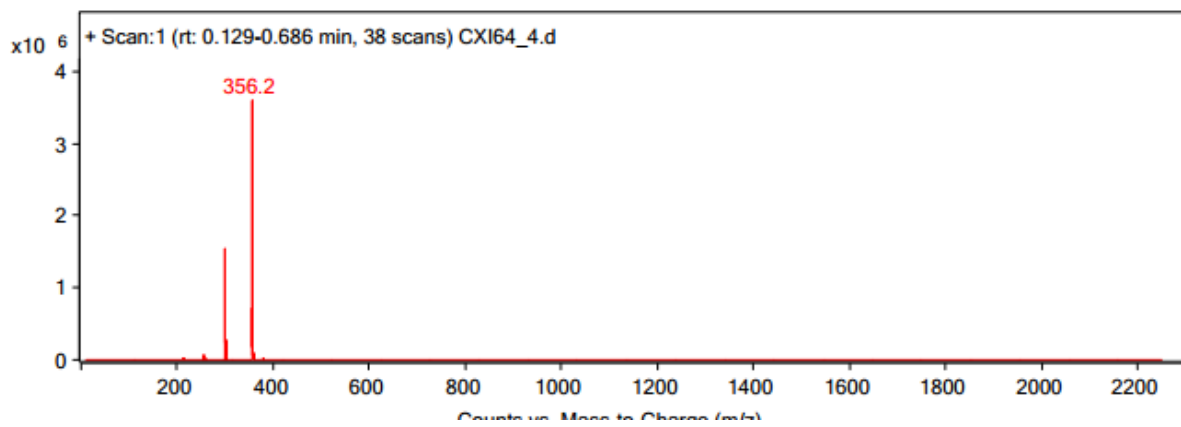
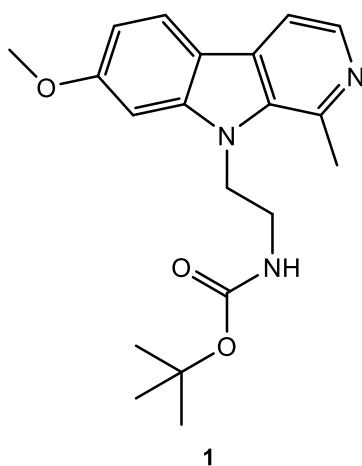
Scheme. Synthesis of carbamate-type harmicines.

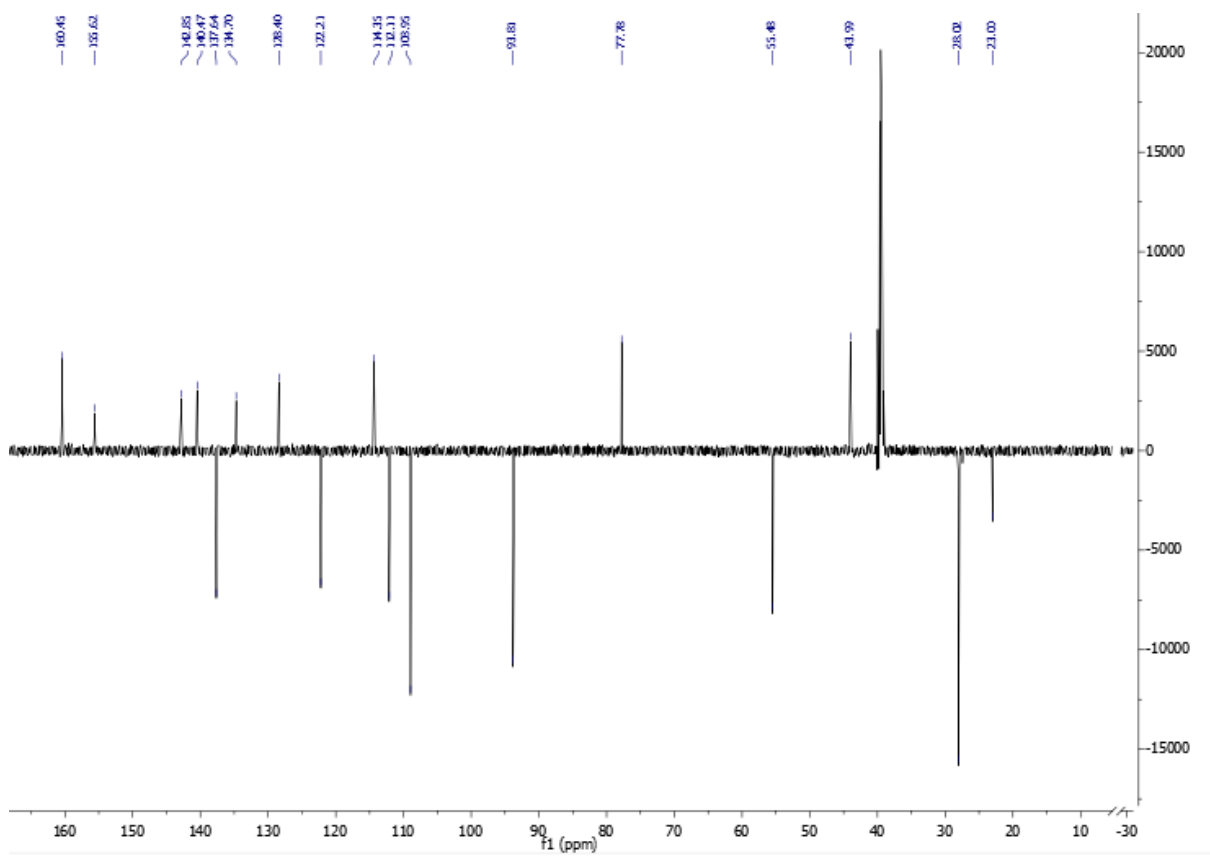
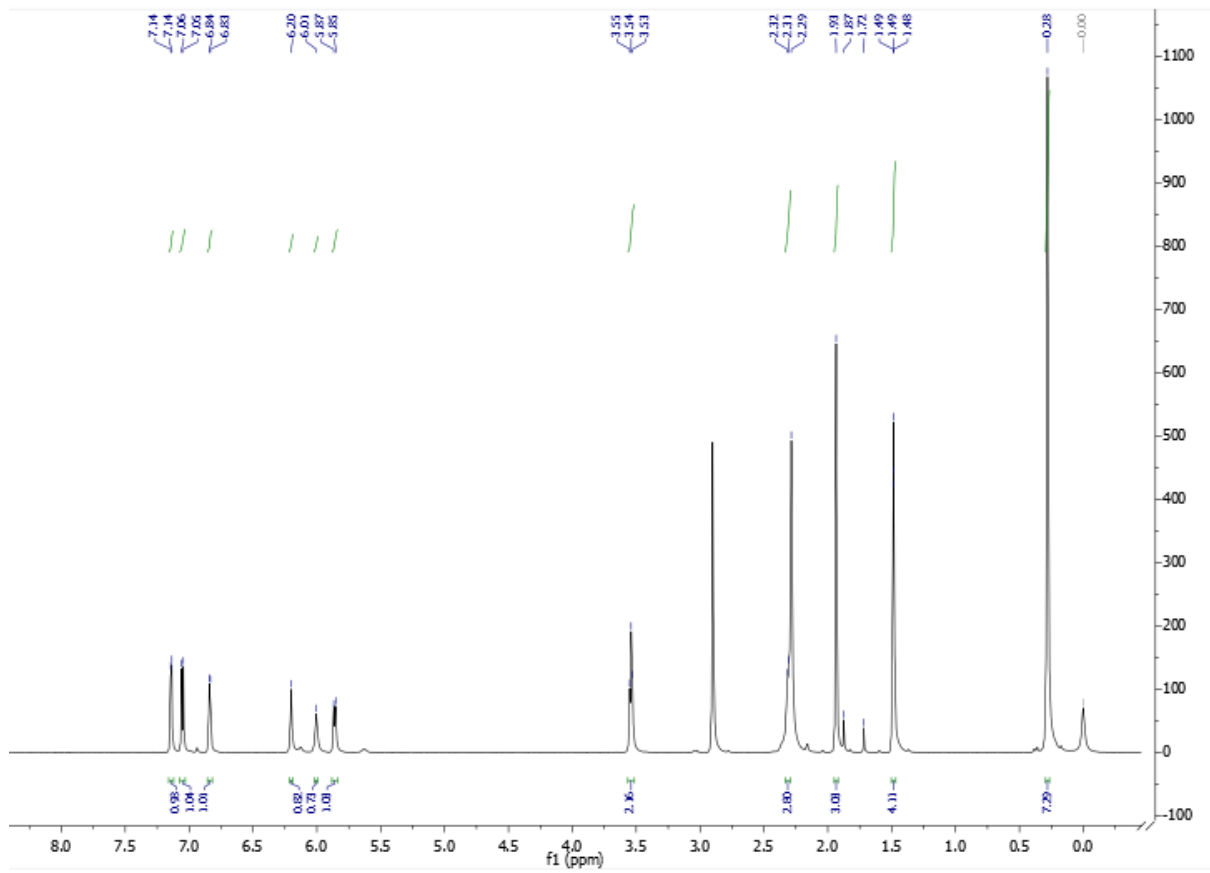
The structures of the newly synthesized compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS) and their melting points were determined. Subsequent studies, which surpass this thesis, will determine antimalarial activity of the synthesized derivatives.

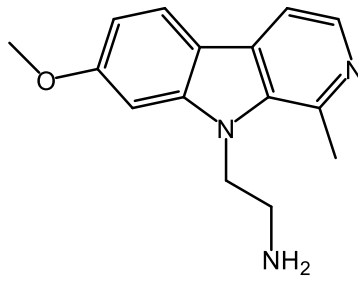
Key words: harmine, harmicines, cinnamic acid derivatives, carbamates, antimalarials.

8. PRILOZI

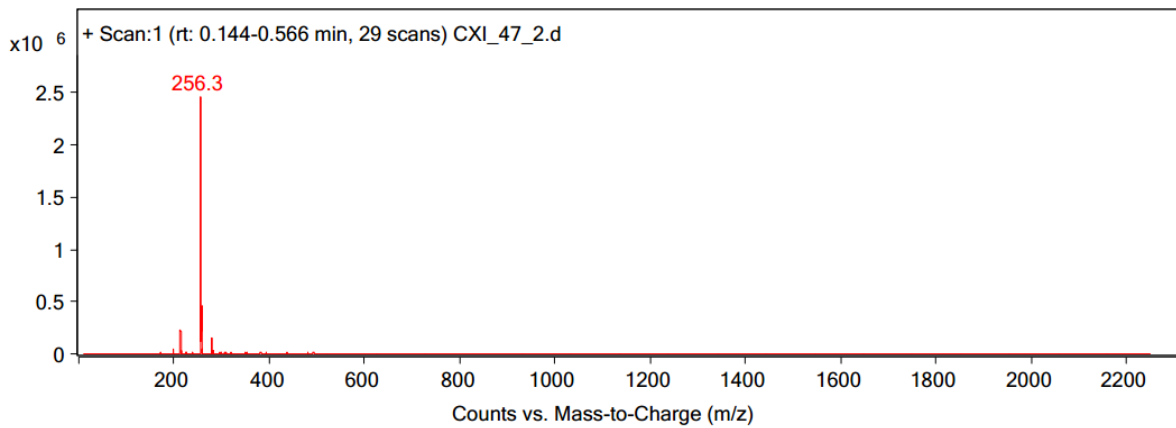
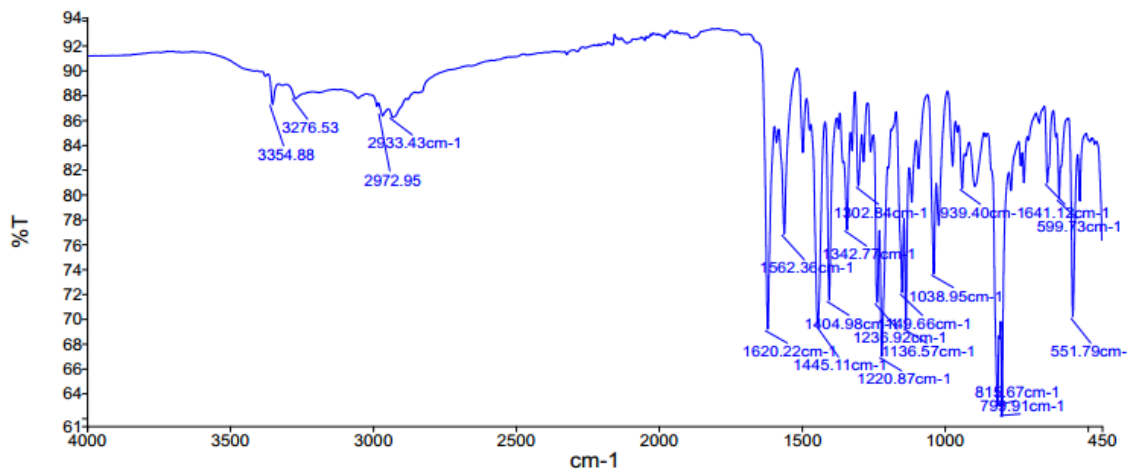
Prilozi sadrže IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR spektre sintetiziranih spojeva.

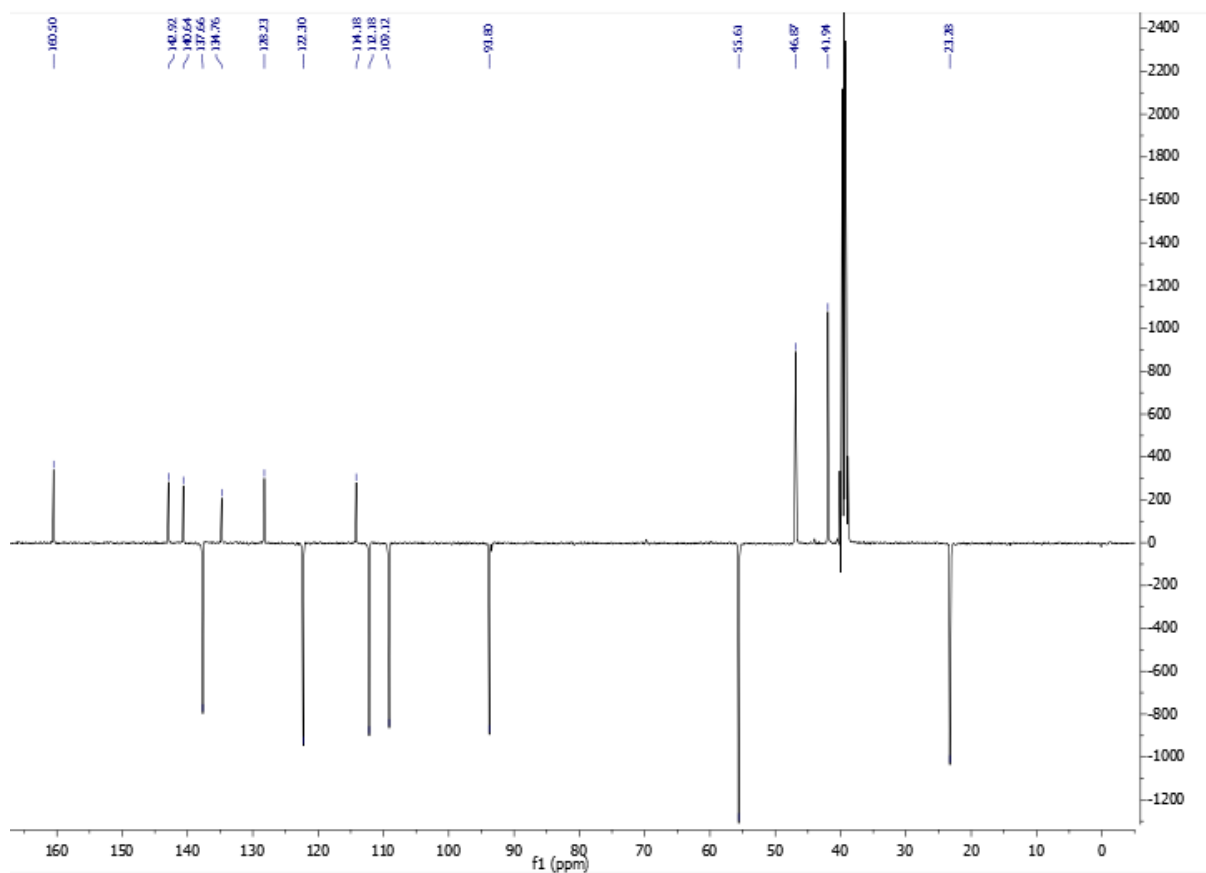
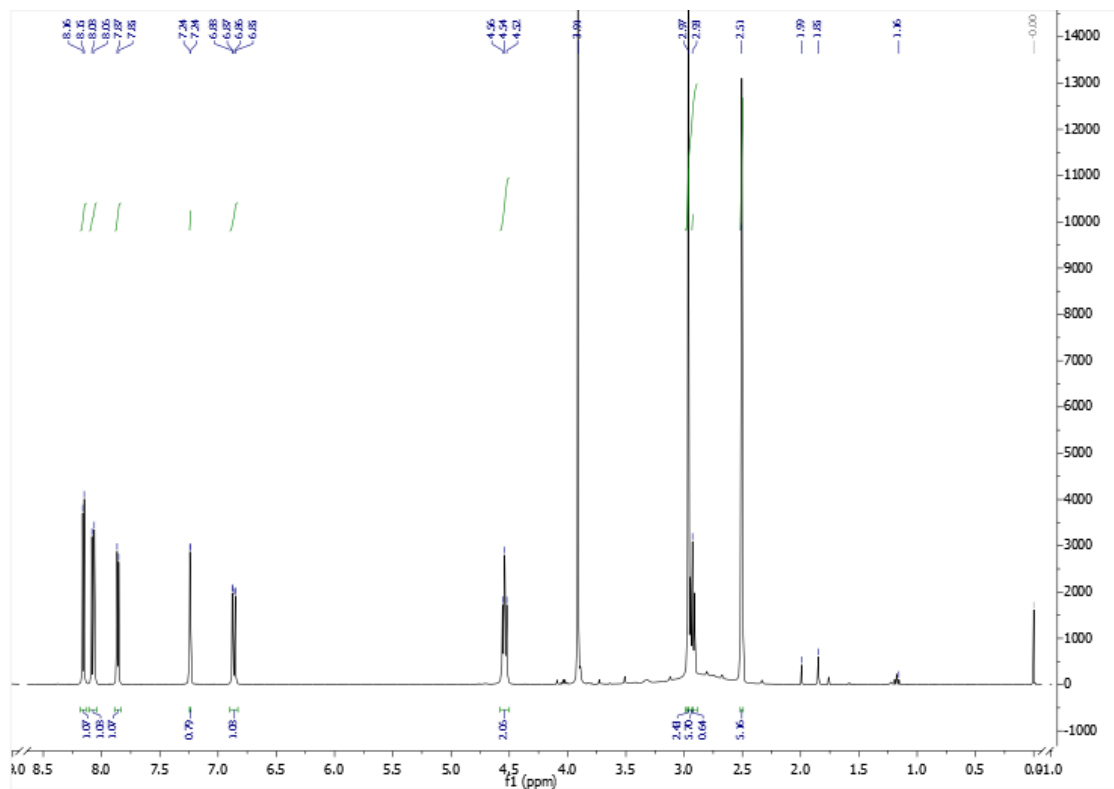


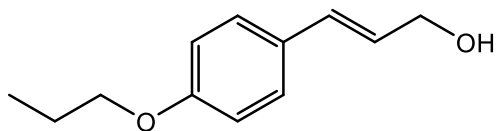




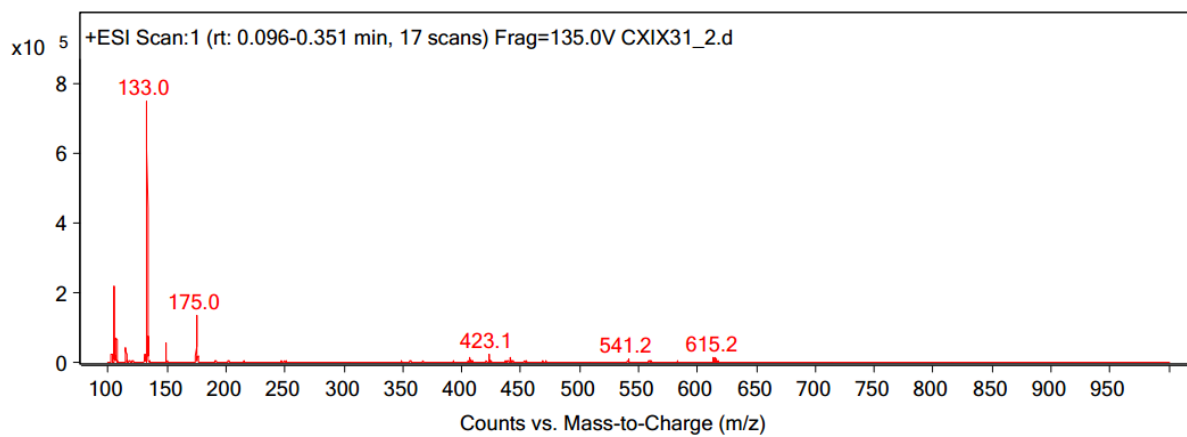
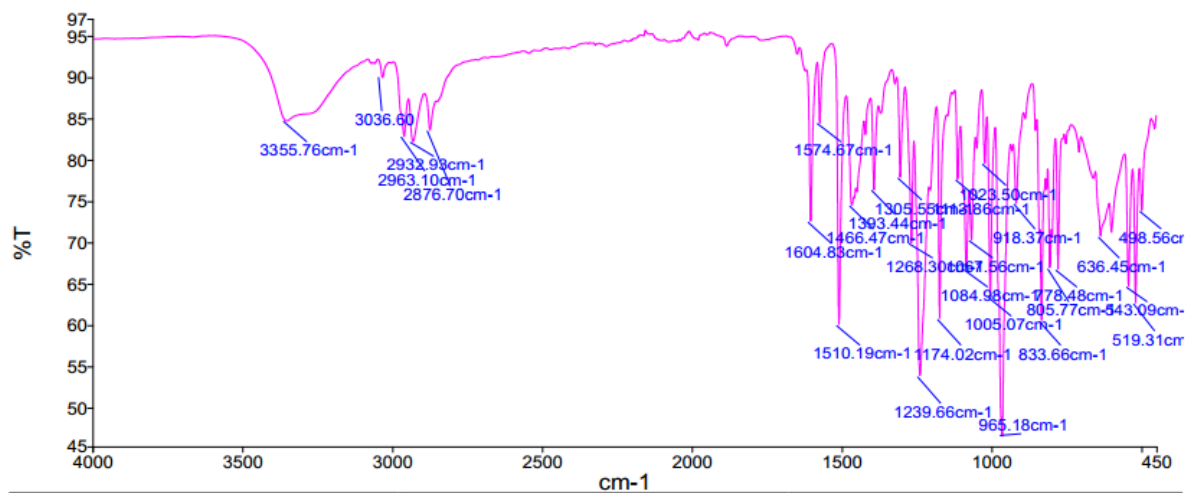
2

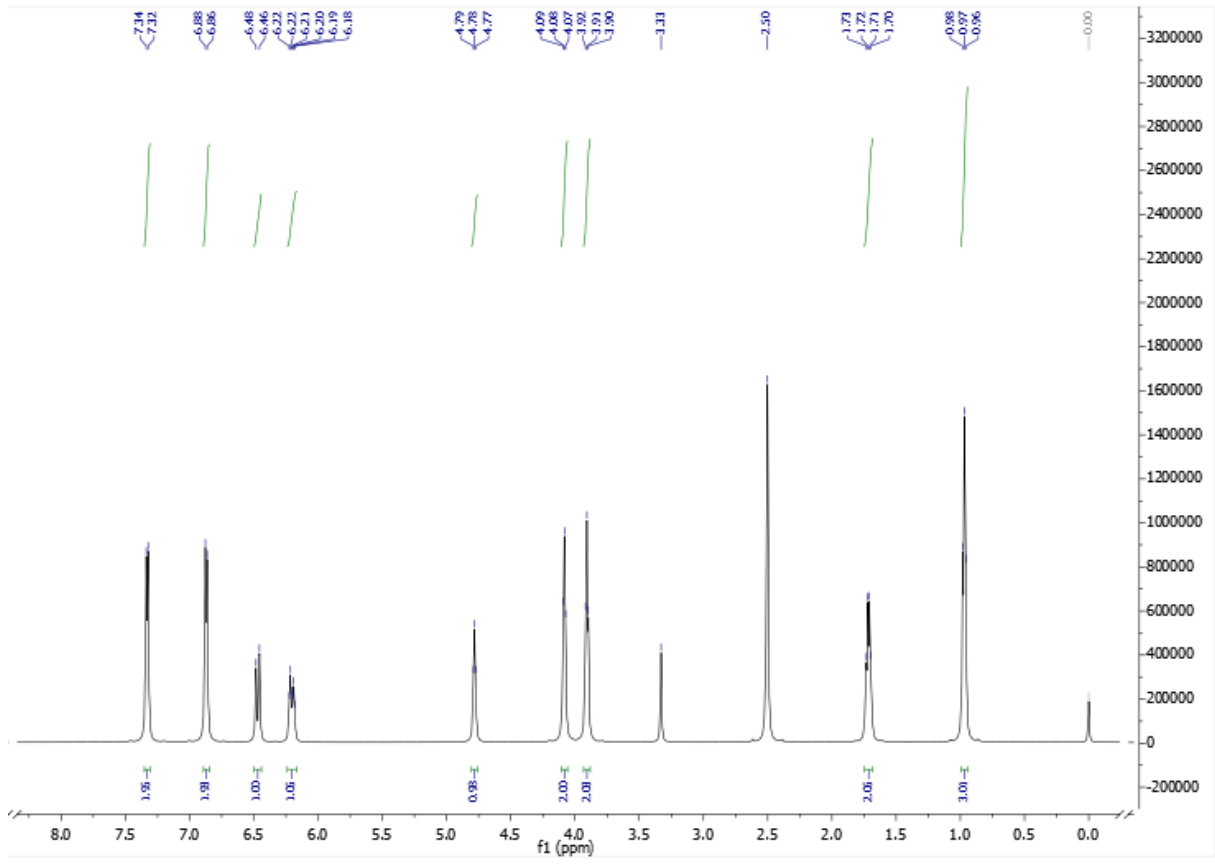
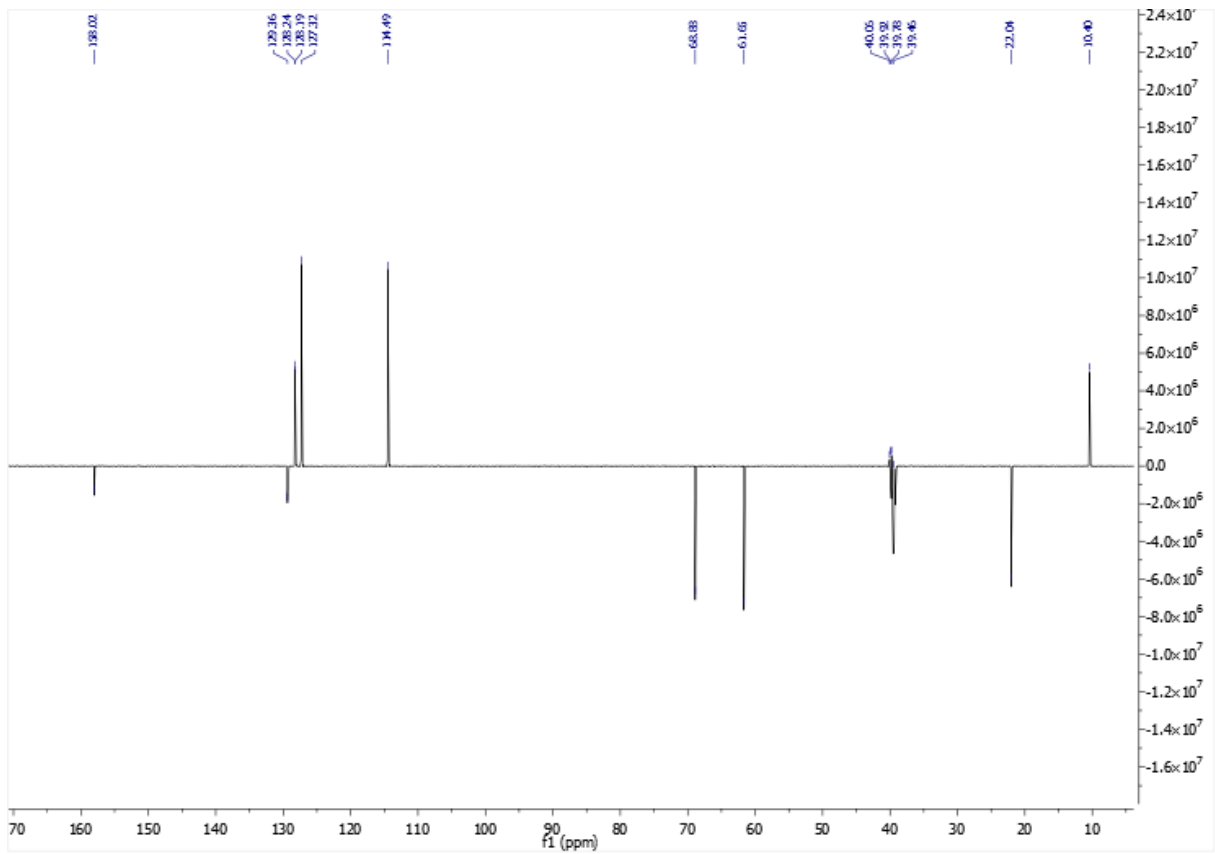


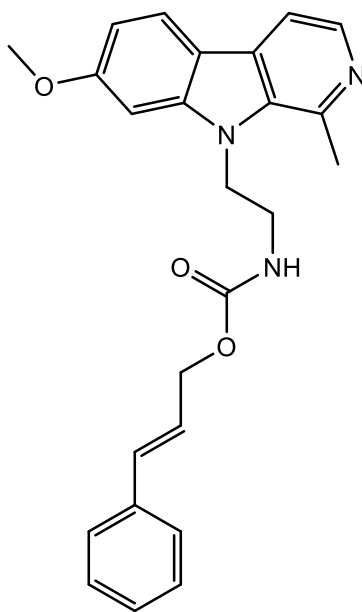




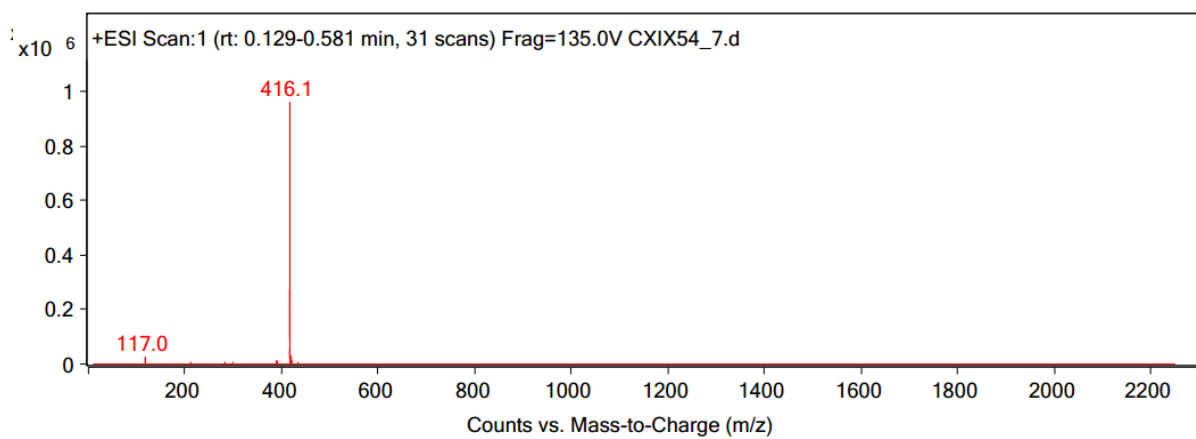
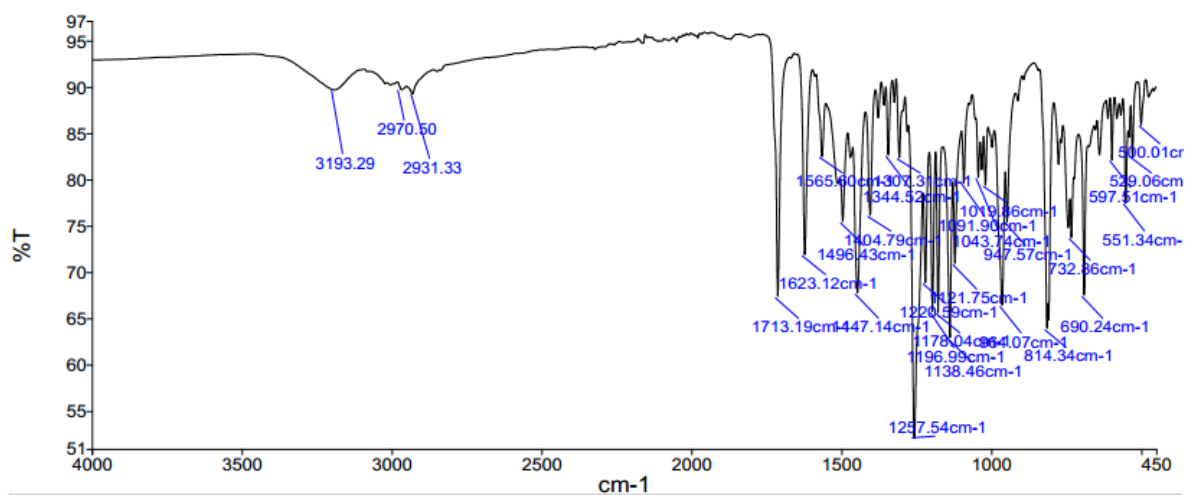
5

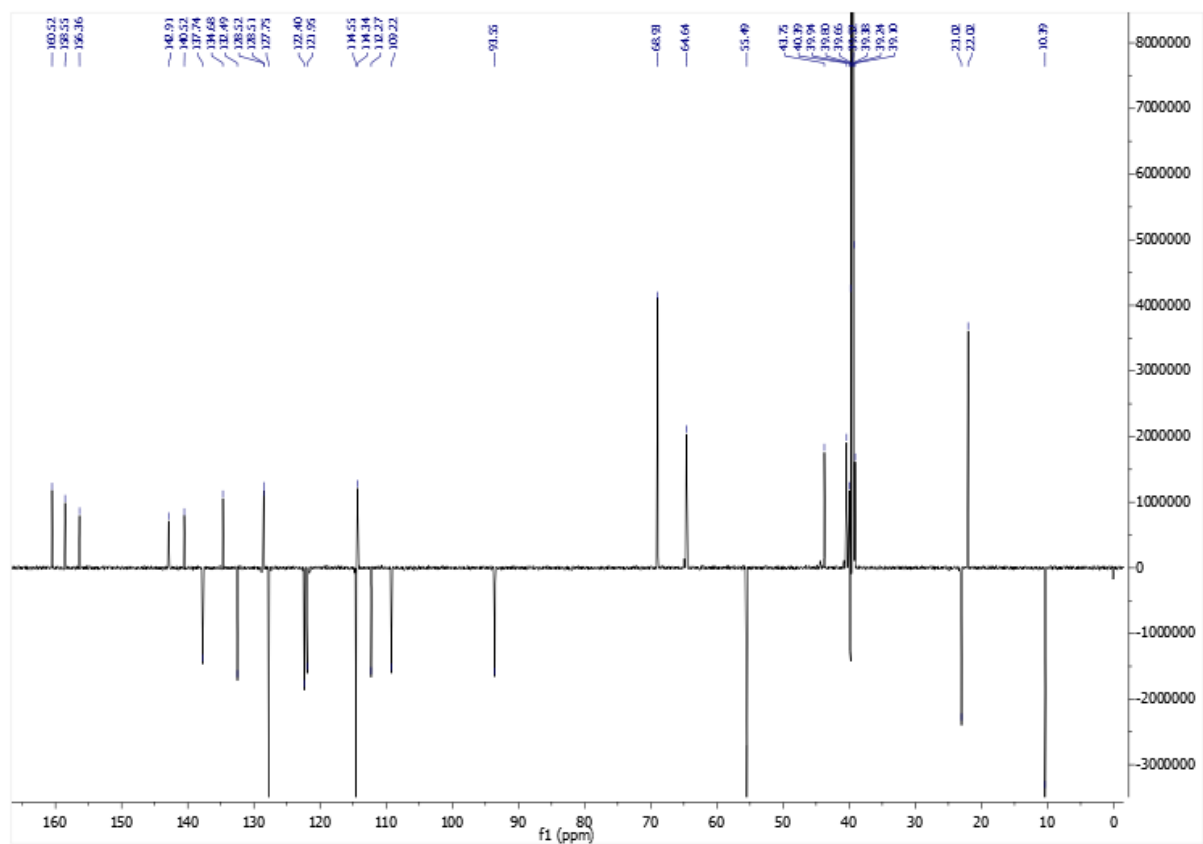
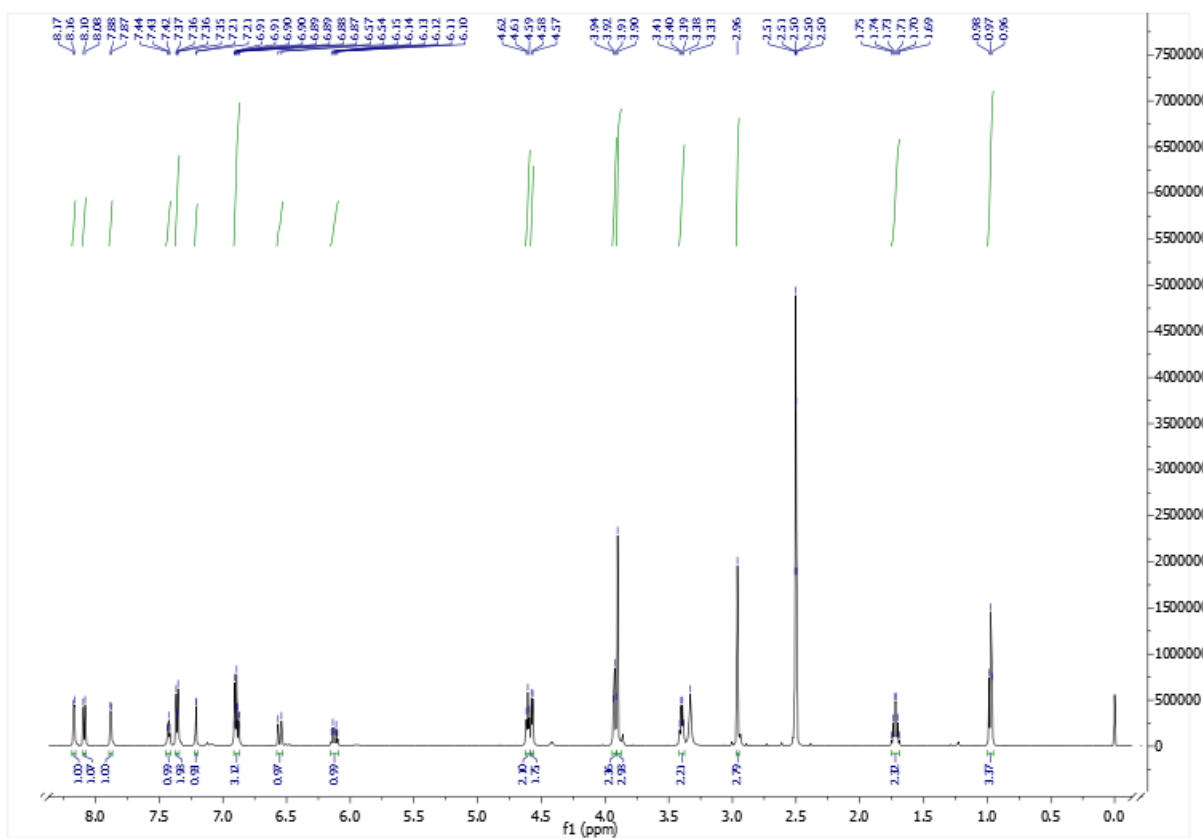


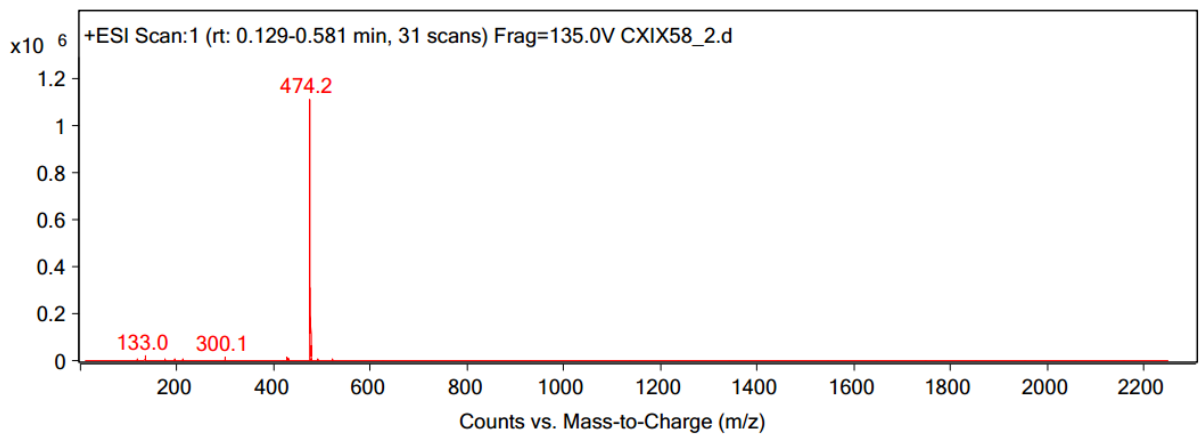
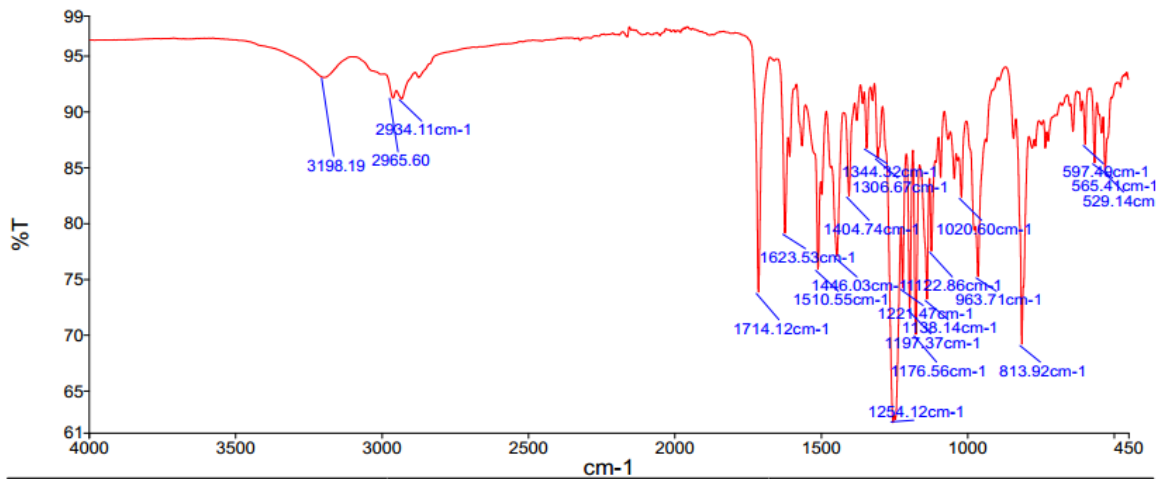
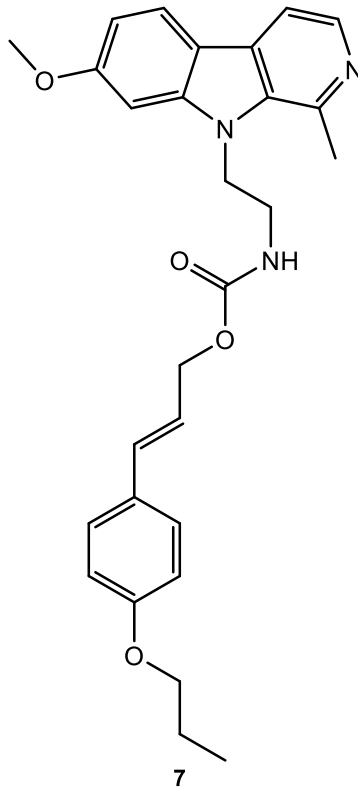


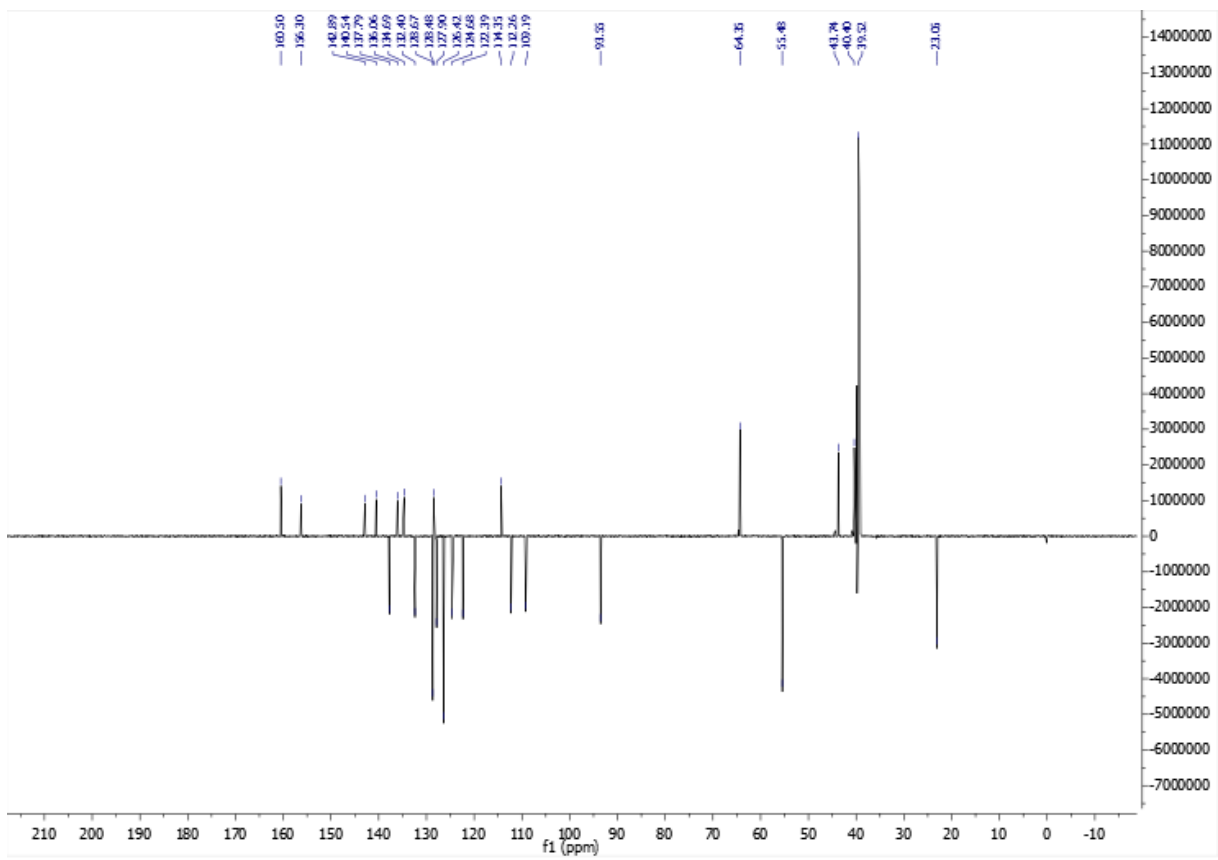
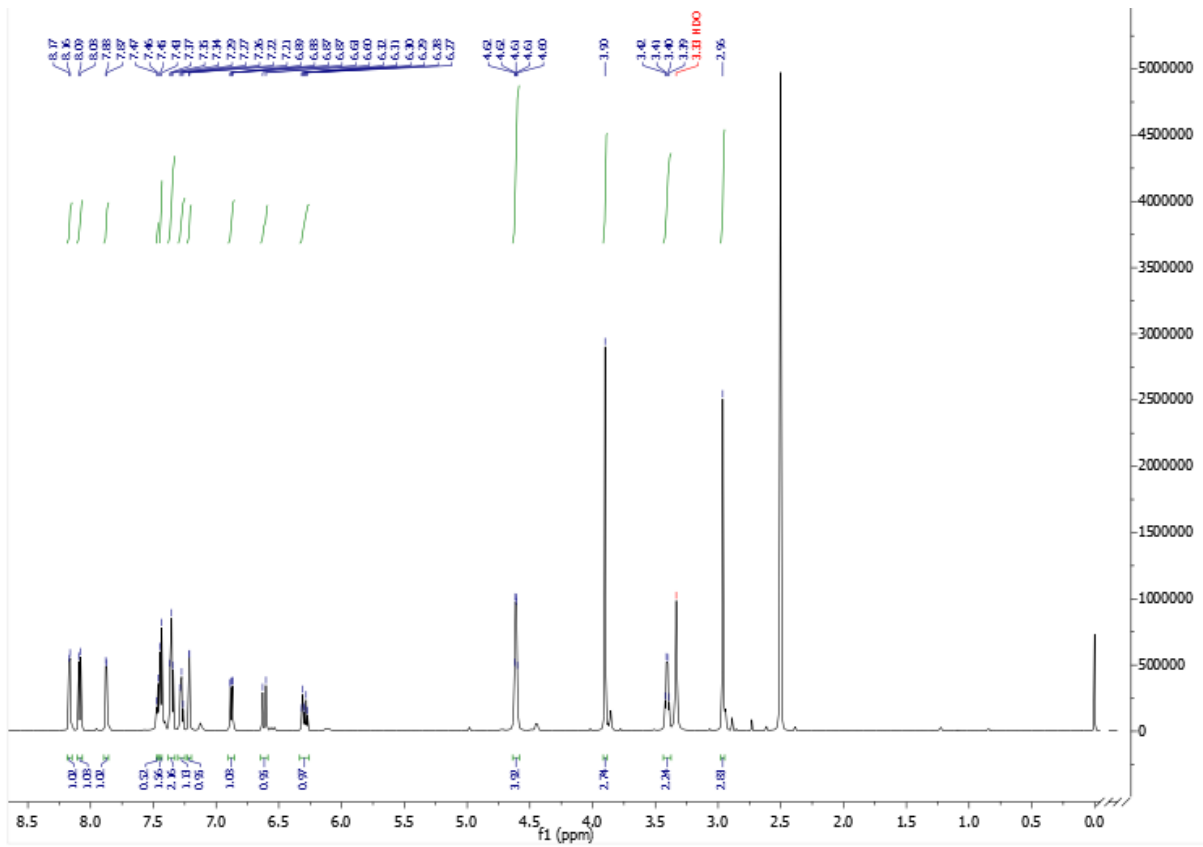


6









Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Sinteza i karakterizacija harmicina karbamatnog tipa

Karmela Klarić

SAŽETAK

Harmin i derivati cimetine kiseline pokazuju širok spektar farmakološkog djelovanja, među kojima je i antimalarijsko djelovanje. Njihovim povezivanjem nastaju harmicini te je cilj ovog rada bila sinteza i karakterizacija dva nova hibrida harmina i derivata cimetine kiseline povezana karbamatnom skupinom. Sintetski put uključivao je alkiliranje harmina i uklanjanje zaštitne skupine kako bi se dobio željeni amin **2**, sintezu odgovarajućeg alkohola **5** te sintezu harmicina **6** i **7** pomoću CDI-a (Shema).

Svim novosintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta. U daljnjim ispitivanjima, koja nadilaze okvir ovog rada, sintetiziranim derivatima ispitat će se antimalarijsko djelovanje.

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

Rad sadrži: 57 stranica, 4 grafička prikaza, 4 tablice i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: harmin, harmicini, derivati cimetine kiseline, karbamati, antimalarici

Mentor: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ivana Perković, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Synthesis and characterization of harmicines

Karmela Klarić

SUMMARY

Harmine and cinnamic acid derivatives (CAD) show a wide range of pharmacological activities, including antimalarial activity. Harmicines represent hybrids composed of harmine and CAD moieties and the aim of this thesis was the synthesis and characterization of two new carbamate-type harmicines. The synthetic pathway included alkylation of harmine and removal of the Boc-protecting group to obtain the desired amine **2**, synthesis of the alcohol **5** and finally, synthesis of harmicines in the presence of CDI.

The structures of the newly synthesized compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS) and their melting points were determined. Subsequent studies, which surpass this thesis, will determine antimalarial activity of the synthesized derivatives.

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

Thesis includes: 57 pages, 4 figures, 4 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: harmine, harmicines, cinnamic acid derivatives, carbamates, antimalarials.

Mentor: **Zrinka Rajić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Zrinka Rajić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Perković, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2022.

