

# Sinteza i karakterizacija urea harmina i aminoalkohola

---

Jurak, Ines

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:163:766573>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

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



**Ines Jurak**

**Sinteza i karakterizacija urea harmina i  
aminoalkohola**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

*Nakon svih proživljenih emocija na ovom fakultetu, nezamisliva je činjenica da je došlo vrijeme zahvala. Prije svega zahvalu dugujem mentorici, prof. dr. sc. Zrinki Rajić na neizmjernom strpljenju i iskustvu koje sam dobila izrađujući ovaj diplomski, kako eksperimentalni, tako i pisani dio.*

*Zahvalu dugujem također i asistentima - Marini za svako pitanje i svaku nedoumicu kojih je svakako bilo napretek te neizostavnom Goranu, koji su zajedno izradu eksperimentalnog dijela učinili neizmjereno zabavnijim.*

*Zadnju, ali najslađu zahvalu, dugujem svojim suputnicima na ovom spisateljsko-akademsom putu, posebno Sari i Luki te Mariju i svojim roditeljima na nesebičnoj podršci i razumijevanju tokom studentskih dana.*

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



## KRATICE:

AIDS	Sindrom stečene imunodeficijencije (engl. <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> )
ACT	Kombinirana terapija bazirana na artemizininu (engl. <i>Artemisinin-based combination therapy</i> )
ATP	Adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
ATR	Prigušena totalna refleksija (engl. <i>attenuated total reflectance</i> )
Btc	Benzotriazolkarbonil
BtcCl	Klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
ESI	Ionizacija elektronskim raspršenjem
G6PD	Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (engl. <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> )
HPLC-MS/MS	Tehnika vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске masene spektrometrije
HsHsp90	Humani protein toplinskog šoka 90
Hsp90	Protein toplinskog šoka 90 (engl. <i>heat shock protein</i> )
IR	Infracrvena spektroskopija
MS	Masena spektrometrija
MW	Mikrovalni reaktor
<i>p.a.</i>	<i>Pro analysis</i>
<i>PfHsp90</i>	Protein toplinskog šoka 90 parazita <i>P. falciparum</i>
SAR	Odnos strukture i djelovanja (engl. <i>structure-activity relationship</i> )
SM	Teški oblik malarije (engl. <i>severe malaria</i> )

s.t.	Sobna temperatura
TEA	Trietilamin
TLC	Tankoslojna kromatografija
$t$	Temperatura tališta
TMS	Tetrametilsilan
UV	Ultraljubičasto zračenje
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )
$^{13}\text{C}$ NMR	$^{13}\text{C}$ Nuklearna magnetska rezonancija
$^1\text{H}$ NMR	$^1\text{H}$ Nuklearna magnetska rezonancija

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
1.1. Malaria.....	2
1.2. Životni ciklus plazmodija .....	3
1.3. Terapija malarije.....	4
1.3.1. Terapija nekomplikirane malarije.....	4
1.3.2. Terapija komplikirane malarije .....	5
1.4. Rezistencija na postojeću terapiju .....	7
1.5. Alkaloidi $\beta$ -karbolinskog tipa.....	8
1.6. Harmin .....	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. Sinteza <i>tert</i> -butil (2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etil)karbamata (1) 14	
3.2. Sinteza 2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etan-1-amina (2).....	15
3.3. Sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl) (3) .....	16
3.4. Sinteza <i>N</i> -(2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etil)-1 <i>H</i> - benzo[ <i>d</i> ][1,2,3]triazol-1-karboksamida (4) .....	16
3.5. Sinteza urea harmina i aminoalkohola 5a,b.....	17
3.5.1. Sinteza 1-(1-(hidroksimetil)ciklobutil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etil)uree (5a) .....	17
3.5.2. Sinteza 1-(4-hidroksifenetil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9- il)etil)uree (5b) .....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	20
5. ZAKLJUČCI .....	26
6. LITERATURA .....	28
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	33
8. PRILOZI.....	36

<b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD .....</b>	<b>47</b>
---	-----------



## **1. UVOD**

Malarija je parazitska bolest i jedan od vodećih uzroka bolesti i smrti na svijetu među infektivnim bolestima te zbog toga predstavlja ozbiljan globalni javnozdravstveni problem (<https://www.cdc.gov/>). Prezentira se kao akutna febrilna bolest uzrokovana krvno-tkivnim parazitima roda *Plasmodium* (<https://www.who.int/>; Kalenić i sur., 2013). Prenosi se ubodom inficirane ženke komarca roda *Anopheles* te postoji pet vrsti parazita roda *Plasmodium* koji mogu uzrokovati malariju u ljudi: *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. vivax* i *P. knowlesi* (Rossati i sur., 2016; Buyon LE i sur., 2021). Posljednjoj vrsti, za razliku od ostalih, prirodni domaćin nije čovjek, iako su uočeni neki slučajevi infekcije ljudi (<https://www.cdc.gov/>). Vrste *P. falciparum* i *P. vivax* uzrokuju gotovo 95 % svih slučajeva infekcije – *P. falciparum* uzrokuje najveći broj slučajeva malarije globalno, no *P. vivax* uzrokuje najveći broj oboljenja van afričkog kontinenta (Garcia, 2010; Rossati i sur., 2016; Buyon i sur., 2021).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) u 2020. godini zabilježeno je gotovo 241 milijun slučajeva zaraze malarijom. Procjena broja umrlih je iznosila 627 tisuća, što predstavlja povećanje za 14 milijuna zaraženih, odnosno 69 tisuća umrlih u odnosu na 2019. godinu (World malaria report, 2021.). Najugroženija skupina su djeca mlađa od pet godina, koja ujedno čine i najveći udio ukupnog broja umrlih od malarije u svijetu (Garcia, 2010; World malaria report, 2021). Uz njih, u skupinu osoba s najvećim rizikom za razvoj teškog oblika malarije spadaju također i trudnice, osobe oboljele od AIDS-a te osobe s lošijim imunitetom koje se nalaze u područjima visokog stupnja transmisije bolesti (<https://www.who.int/>).

## 1.1. Malarija

Malarija je bolest pretežito vezana uz tropske i suptropske krajeve, u kojima klimatski uvjeti omogućavaju razmnožavanje parazita u organizmu vektora, no uzevši u obzir klimatske promjene, rasprostranjenost malarije bi mogla bi se mogla proširiti. Afrika je trenutno područje s najvećim brojem slučajeva malarije zbog kombinacije više čimbenika koji pogoduju visokoj stopi prijenosa i razmnožavanja uzročnika malarije. U područjima visokog prijenosa malarije u najvećem riziku su trudnice, djeca koja još nisu razvila imunitet na malariju te osobe sa slabijim imunitetom iz područja u kojima malarija nije raširena (<https://www.cdc.gov/>). Iako je malarija pretežito vezana uz putovanja u endemske krajeve, riziku od infekcije mogu doprinijeti transfuzije krvi i transplantacije koštane srži, korištenje kontaminiranih hipodermičkih igli te kongenitalne infekcije, a na taj način se infekcija može pojaviti i u razvijenim dijelovima svijeta (Garcia, 2010).

Prvi simptomi malarije se javljaju u prosjeku 10 do 15 dana nakon uboda zaraženog komarca te uključuju groznicu, glavobolju i povišenu tjelesnu temperaturu. Zbog tih blagih i nespecifičnih simptoma malarija može proći bez prave dijagnoze te se može prijeći u ozbiljni oblik koji može završiti i smrtnim ishodom (<https://www.who.int/>). Ostali simptomi koji se često povezuju s malarijom su mialgije, artralgije, opća slabost te određeni gastrointestinalni problemi poput dijareje i povraćanja. Težina kliničke slike može ovisiti o vrsti parazita koji je uzrokovao infekciju, razini parazitemije te stanju imunskog sustava pacijenta (<https://www.cdc.gov/>). Malarija se može prezentirati u nekoliko kliničkih oblika poput asimptomatske parazitemije, nekomplicirane malarije, teške te fatalne malarije. Posljednja dva oblika malarije su najčešće uzrokovana vrstom *P. falciparum*, koja može dovesti do začepjenja malih krvnih žila u mozgu te respiratornog i bubrežnog zatajenja. Takav slučaj nije uočen kod infekcije *P. vivax* te *P. knowlesi* (Plewes i sur., 2019).

## 1.2. Životni ciklus plazmodija

Plazmodij je jednostanični eukariot te unutarstanični parazit (Kalenić i sur., 2013). Njegov životni ciklus može se podijeliti na dva dijela ovisno o načinu razmnožavanja i tipu domaćina. Unutar ženke komarca roda *Anopheles* parazit se razmnožava spolnim načinom te se množe gamogonijom, dok se unutar ljudskog organizma dijele nespolnim načinom, točnije diobom (Garcia, 2010). Tijekom nespolne faze života plazmodij se, ovisno o životnom ciklusu, nalazi u hepatocitima ili eritrocitima (Kalenić i sur., 2013).

Infekcija parazitom započinje ubodom ženke komarca roda *Anopheles*, čime dolazi do prijenosa sporozoita parazita u ljudski organizam. Sporozoiti ulaze u perifernu cirkulaciju gdje se zadržavaju oko 20 minuta te dolaze do jetre. Pri dolasku u jetru započinje preeritrocitna faza ili primarna egzoeritrocitna faza životnog ciklusa plazmodija gdje se sporozoiti mogu dalje razvijati u dva smjera. Paraziti *P. vivax* te *P. ovale* mogu stvarati hipnozoite, dormantne stadije uzročnika bolesti koji se ne repliciraju te ostaju dormantni tjednima ili čak mjesecima nakon primarne infekcije, nakon čega može doći do relapsa bolesti. Ukoliko ne dolazi do razvoja hipnozoita ili se radi o drugim vrstama parazita *Plasmodium* koje ne mogu stvarati hipnozoite, plazmodij se razmnožava shizogonijom u hepatocitima, čime nastaje shizont koji u sebi sadržava veliku količinu merozoita te taj stadij traje jedan do dva tjedna. Nakon shizogonije, raspadom hepatocita i shizonta otpuštaju se merozoiti koji napuštaju jetru i odlaze u krvotok gdje ulaze u eritrocite, čime započinje eritrocitna faza. Merozoiti se u eritrocitima hrane hemoglobinom te stvaraju trofozoite koji se kasnije razvijaju u shizonte. Oni u sebi sadržavaju

nove merozoite koji se raspadom eritrocita otpuštaju u krvotok te ponovno inficiraju zdrave eritrocite. Eritrocitna faza životnog ciklusa plazmodija povezana je s kliničkim simptomima malarije – samo inficirana osoba u slučaju rupture jetrenog shizonta te otpuštanja merozoita u perifernu cirkulaciju pokazuje simptome malarije (Garcia, 2010; Kalenić i sur., 2013; Adams i Mueller, 2017; Meibalan i Marti, 2017; Milner, 2018; WHO Guidelines for malaria, 2021).

Nakon nekoliko ciklusa eritrocitne faze, dio merozoita ne prolazi ponovno kroz shizogoniju, već se diferenciraju u gametocite, koji se ubodom komarca ponovno vraćaju u njegov organizam. Zreli gametociti se u organizmu komarca diferenciraju u gamete te podliježu oplodnji. Oplodnjom nastaje diploidna zigota, koja se razvija u ookinetu koja prelazi želučani epitel te postaje oocista. Rupturom zrele oociste otpuštaju se sporozoiti koji dozrijevaju te se mogu pronaći u žlijezdama slinovnicama komarca. Nakon uboda, sporozoiti ponovno prelaze u ljudski krvotok, čime ponovno kreće životni ciklus (Garcia, 2010; Kalenić i sur., 2013; Meibalan i Marti, 2017).

### **1.3. Terapija malarije**

#### **1.3.1. Terapija nekomplikirane malarije**

Nekomplikirani oblik malarije je karakteriziran blagim simptomima poput vrućice bez kliničkih znakova koji bi ukazivali na tešku kliničku sliku ili disfunkciju vitalnih organa te s pozitivnim parazitološkim testom. U tom slučaju pristupa se terapiji antimalarijskim lijekovima čiji će izbor ovisiti o vrsti parazita koji je uzrokovao infekciju (Milner, 2018). Terapijski cilj liječenja nekomplikirane malarije počiva na izlječenju pacijenta te sprječavanju progresije i transmisije bolesti te razvoju rezistencije na lijekove. Usprkos lakim simptomima, nekomplikirana malarija može rapidno progredirati u teški oblik malarije, a u konačnici dovesti i do fatalnih ishoda, što se najčešće može dogoditi kod imunokompromitiranih pacijenata. Zbog toga je važno rano postavljanje dijagnoze te što raniji početak liječenja (Plewes i sur., 2019).

Kod djece i odraslih osoba s nekomplikiranom malarijom uzrokovanom vrstom *P. falciparum* preporuka je započeti liječenje kombiniranom terapijom baziranom na artemizininu (engl. *Artemisinin – based Combination Therapy*, ACT). Ona predstavlja kombinaciju brzodjelujućeg derivata artemizininina sa sinergističkim lijekom koji ima sporije djelovanje (WHO Guidelines for malaria, 2021). Brzodjelujući derivat artemizininina nakon primjene u kratkom periodu snižava razinu parazitacije, dok partnerski lijek uništava ostatak uzročnika bolesti koji je ostao nakon djelovanja prvog lijeka (Plewes i sur., 2019). U tu vrstu terapije

svrstavamo kombinacije artemetera i lumefantrina, artezunata i amodiakina ili meflokina, artezunata, sufladoksina i pirimetamina, koji su prva linija liječenja nekomplikirane malarije. Zbog svoje sigurnosti te učinkovitosti preporučaju se i kombinacije artezunata i pironaridina, nove kombinacije u skupini ACT-a, koji su učinkoviti kod infekcija *P. falciparum* i *P. vivax* (WHO, The use of artesunate-pyronaridine for the treatment of uncomplicated malaria; Pryce i Hine, 2019). Navedene kombinacije lijekova dolaze u fiksnim dozama te su učinkovite kao oralni oblici s malo nuspojava, a mogu se koristiti kod odraslih, djece, dojenčadi te dojilja i trudnica u drugom i trećem tromjesečju trudnoće. Za trudnice u prvom tromjesečju trudnoće preporuka je koristiti kombiniranu terapiju kinina i klindamicina tijekom sedam dana. Odlučujući faktori zbog kojih bi se određena kombinacija lijekova koristila kao prva linija u odnosu na druge kombinacije uključuju rezistenciju (ovisno o geografskom području), procjenu učinkovitosti i sigurnosti, cijenu te dostupnost potrebnih formulacija (WHO Guidelines for malaria, 2021). Artemizinska komponenta ACT-a bi se trebala uzimati tijekom tri dana kako bi se smanjila količina parazita u organizmu (Plewes i sur, 2019), što ostavlja samo manji dio uzročnika infekcije za drugu komponentu lijeka, čime se smanjuje šansa za potencijalnim razvojem rezistencije (Sinclair i sur. 2009; WHO Guidelines for malaria, 2021).

Za liječenje nekomplikirane malarije uzrokovane parazitom *P. vivax* WHO predlaže uporabu klorokina ili određenog ACT-a u slučaju postojanja rezistencije na klorokin. Ukoliko se radi o trudnici ili je uočena rezistencija na klorokin, WHO predlaže korištenje kinina. Preporuka za liječenje jetrenog stadija infekcije uzrokovanom *P. vivax* ili *P. ovale* je primakin (Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response: 10 years of surveillance, 2020). Primakin se također koristi za sprječavanje relapsa infekcije uzrokovane parazitima *P. vivax* ili *P. ovale* iz jetrenih hipnozoita te se kod djece i odraslih koristi u trajanju od 14 dana. U tom slučaju potrebno je provesti procjenu statusa glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (engl. *glucose – 6 – phosphate – dehydrogenase*, G6PD) kod pacijenata kako bi se odredila prikladna doza za pacijenta te kako bi se spriječio nastanak akutne hemolitičke anemije (Luzzatto i sur., 2016; WHO Guidelines for malaria, 2021). Osim primakina, najnoviji odobreni lijek za sprječavanje relapsa infekcije je tafenokin, lijek iz skupine 8-aminokinolina. Za razliku od primakina, koristi se kao jednodozna terapija u kombinaciji s trodnevnom klorokinom čime je znatno povećana adherencija, a time i klinička učinkovitost terapije (Duparc i sur., 2020).

### **1.3.2. Terapija komplicirane malarije**

Ukoliko se nekomplikirana malarija pravodobno ne liječi, ona se može razviti u teški oblik već unutar 24 sata od pojave simptoma (<https://www.cdc.gov/>). Teški oblik malarije (engl. *severe malaria*, SM) je multisustavna bolest koja se najčešće manifestira kao cerebralna malarija, teška anemija uzrokovana malarijom te kao respiratorno zatajenje koje se prepoznaje po acidozi i hiperlaktatemiji (Varo i sur., 2020; World Malaria Report 2021). Neki od ostalih simptoma koji se mogu javiti su hipoglikemija, oštećenje bubrega, žutica, konvulzije, pulmonalni edem, znatna krvarenja i stanje šoka. Teški oblik malarije je potencijalno fatalan te smrtni ishod može nastupiti već nakon nekoliko sati od prijema u bolnicu. Zbog toga liječenju treba pristupiti s najvećom mogućom pažnjom te terapijske koncentracije najučinkovitijih antimalarijskih lijekova moraju biti postignute u što kraćem roku. Glavni terapijski cilj kod ovog oblika malarije je spriječiti smrt pacijenta, dok se sekundarni ciljevi odnose na prevenciju mogućih invaliditeta i ponovne pojave infekcije (WHO Guidelines for malaria, 2021).

U početnim fazama liječenja teškog oblika malarije potrebno je primijeniti učinkovite doze izabranog lijeka parenteralnim ili rektalnim putem, nakon čega trebaju uslijediti oralne doze lijeka iz skupine ACT-a. Kod liječenja teškog oblika malarije parenteralni oblik artezunata (intravenski ili intramuskularni) je lijek prvog izbora kod svih ljudi, uključujući djecu, dojilje i trudnice (Severe malaria, 2014; Plewes i sur., 2019), no osim njega u parenteralnom obliku postoji i artemeter te kinin i kinidin. Prednost parenteralnih oblika artemizina je u činjenici da za njih nije potrebno prilagoditi dozu ukoliko postoji oštećenje funkcije jetre ili bubrega. Parenteralno liječenje potrebno je nastaviti barem 24 sata nakon prve primjene, neovisno o pacijentovoj sposobnosti uzimanja oralnih oblika, a terapija se nastavlja oralno tek nakon 24 sata ili kasnije ukoliko pacijent nije u mogućnosti primiti peroralnu terapiju. Peroralni oblici su lijekovi iz skupine ACT-a (kombinacije artezunata/amodiakina, artemeter/lumefantrina, dihidroartemizina/piperakina) te se nakon parenteralnog liječenja oralno liječenje nastavlja tijekom tri dana. Kombinacije koje sadržavaju meflokin bi se trebale izbjegavati ukoliko je pacijent pokazao poremećaje svijesti, a ukoliko neki od navedenih lijekova iz skupine ACT-a nije dostupan liječenje se može nastaviti kombinacijama artezunata ili kinina s klindamicinom ili doksiciklinom. Doksiciklin bi se trebao izbjegavati ukoliko se radi o trudnicama ili djeci, a tada se može zamijeniti klindamicinom (Severe malaria, 2014; Plewes i sur., 2019; WHO Guidelines for malaria, 2021).

U slučaju teškog oblika malarije može doći do razvoja komplikacija poput kome, konvulzija, hipoglikemije, teške anemije, šoka, metaboličke acidoze, itd. U tom slučaju može se pristupiti liječenju drugim lijekovima poput antikonvulziva (intravenskom ili rektalnom

primjenom diazepama, lorazepama ili midazolama te intramuskularnom primjenom paraldehida) (WHO Guidelines for malaria, 2021).

#### 1.4. Rezistencija na postojeću terapiju

Rezistencija na antimalarijske lijekove predstavlja sposobnost preživljavanja i razmnožavanja parazita usprkos primjeni i izloženosti lijeku u organizmu koji je dan u dozama jednakim ili višim od preporučenih doza, a mjeri se u incidenciji te ozbiljnosti neuspjeha liječenja (Price i sur., 2014; WHO Guidelines for malaria, 2021). Pojava rezistencije jedna je od najvećih prepreka u kontroli malarije, a javlja se zbog genetskih promjena u parazitu, uzrokujući njihovu smanjenu osjetljivost na lijekove. Do sada je dokazana u dvije vrste uzročnika malarije – *P. vivax* te *P. falciparum*, dok nije poznato postojanje rezistencije vezane uz vrste *P. malariae* ili *P. ovale* (<https://www.cdc.gov/>).

Rezistencija parazita *P. falciparum* na klorokin te kombinaciju sulfadoksin-pirimetamin uočena je u svim dijelovima svijeta (Plewes i sur., 2019), no osim na njih, ta vrsta parazita je pokazala znakove rezistencije i na ostale dostupne antimalarijske lijekove. *P. falciparum* je u određenim područjima pokazao znakove rezistencije na artemizinin, koja se očituje kao odgoda u klirensu parazita iz cirkulacije, zbog čega sve više pacijenata nakon trodnevne terapije artemizininom i dalje ima određenu veću količinu parazita u cirkulaciji. Ta činjenica predstavlja veliki izazov zbog značajne uloge artemizinina u smanjivanju razine parazita u cirkulaciji, zbog čega može doći do povećane stope neuspješnosti terapije ACT-om te povećanja koncentracije parazita u krvi. Osim toga, neuspjeh artemizinina u terapiji stavlja veću ulogu u liječenju na sporodjelujuće partnerske lijekove koji se nalaze u fiksnim kombinacijama, što može uzrokovati povećane stope rezistencije i na te lijekove (Plewes i sur., 2019; WHO Guidelines for malaria, 2021). Rezistencija na artemizinin može biti posljedica neracionalnog korištenja lijekova, neadekvatne adherencije na terapiju te široke rasprostranjenosti monoterapije oralnim oblicima artemizinina (WHO Guidelines for malaria, 2021; Tackling antimalarial drug resistance, 2021). Usprkos svemu, odgođeni klirens parazita iz cirkulacije ne smatra se potpunom, već samo djelomičnom rezistencijom parazita na artemizinin. U određenim područjima pojavila se rezistencija *P. falciparum* i na terapijsku kombinaciju koja se sastojala od artezunata i sulfadoksina ili pirimetamina, što je zahtijevalo promjenu postojećeg pristupa liječenju na druge alternative iz skupine ACT (Tackling antimalarial drug resistance, 2021).

Razlog za zabrinutost daje i vrsta *P. vivax*, koja je u mnogim područjima pokazala znatnu razinu rezistencije na klorokin, lijek prvog izbora kod liječenja malarije uzrokovane

ovom vrstom. Usprkos tome, u područjima umjerene rezistencije i dalje se u svrhu liječenja koristi klorokin u kombinaciji s primakinom, no sve se više daje prednost zamjenskoj terapiji koja se sastoji od lijekova iz skupine ACT-a (Pryce i Hine, 2019). *P. vivax* je osim toga pokazao određenu razinu rezistencije i na meflokin, sulfadoksin te pirimetamin (Buyon LE i sur., 2021). Rezistencija se može nadići korištenjem kombinacija antimalarijskih lijekova koji imaju različite mehanizme djelovanja (WHO Guidelines for malaria, 2021). Od izuzetne je važnosti pratiti učinkovitost te rezistenciju na antimalarijske lijekove kako bi se rano mogla detektirati pojava rezistencije pojedinih vrsta parazita na određenu terapiju te kako bi se mogle pokrenuti pravovremene akcije u svrhu kontrole širenja i smanjivanja utjecaja na globalne napore u terapiji malarije (Tackling antimalarial drug resistance, 2021).

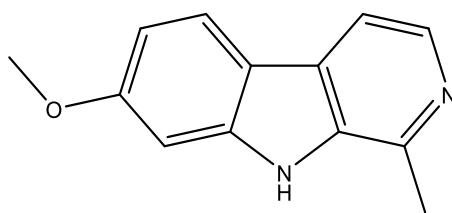
### 1.5. Alkaloidi $\beta$ -karbolinskog tipa

Alkaloidi  $\beta$ -karbolinskog tipa su skup sintetskih spojeva te spojeva iz prirodnih izvora koji u svojoj strukturi sadržavaju pirido[3,4-*b*]indolni prsten. Ovisno o zasićenosti šesteročlanog prstena koji sadržava heteroatom dušika, mogu se podijeliti na aromatske  $\beta$ -karboline, dihidro- $\beta$ -karboline te tetrahidro- $\beta$ -karboline. Prvotno su izolirani iz biljke *Peganum harmala*, Nitrariaceae te su se pokazali korisnima u terapiji raznih bolesti zbog svojih biokemijskih učinaka, koji uključuju interakciju s DNA te raznim enzimatskim sustavima i receptorima, zbog čega su zanimljivi u okviru razvoja novih potencijalnih lijekova (Cao i sur., 2007). Neki od  $\beta$ -karbolinskih alkaloida uključuju harmin, harman, harmalin, harmalol, tetrahidroharmin, norharman te harmalan, koji su u *in vitro* istraživanjima pokazali antimalarijski učinak na *P. falciparum* (Ashok i sur., 2013).

### 1.6. Harmin

Razni prirodni spojevi imaju važnu ulogu u terapiji malarije, a veliki broj danas važnih lijekova potječe upravo iz prirodnih izvora. Najbolji primjeri su kinin, spoj izoliran iz kore stabla kininovca, koji je prvi uspješni antimalarijski lijek, te artemizinin, spoj izoliran iz lišća biljke *Artemisia annua*, Asteraceae koji je zajedno sa svojim derivatima neizostavan u današnjoj terapiji malarije (Tajuddeen i Van Heerden, 2019). Osim njih, obećavajuću budućnost u terapiji malarije ima i spoj harmin (Slika 1, Tablica 1), izoliran iz sjemenki biljke *Peganum harmala*, Nitrariaceae, koja se široko upotrebljavala u tradicionalnoj medicini za liječenje malarije i raka (Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2013).





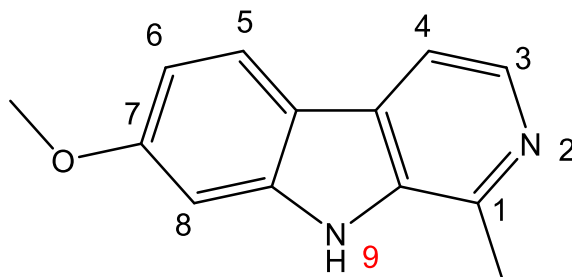
**Slika 1.** Strukturna formula harmina

**Tablica 1.** Fizikalna i kemijska svojstva harmina

Molekulska formula	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
Relativna molekulska masa ( $M_r$ )	212,25
Temperatura tališta ( $t_f$ ) (°C)	264 – 265
log $P$	3,56

Harmin, kemijskog imena 7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol, alkaloid je koji pripada skupini β-karbolina. Osim iz biljke iz koje je izoliran, može se naći i u biljci *Banisteriopsis caapi*, Malpighiaceae (Aronson, 2014), iz koje se dobiva poznato psihoaktivno piće Ayahuasca. Posjeduje brojne farmakološke učinke, među kojima su protuupalno, antimikrobno, antitumorsko, antioksidativno, antimalarijsko, antidijabetsko te neuroprotektivno djelovanje. Iako bi mogla pronaći svoje mjesto u kliničkoj upotrebi zbog svojih potencijalnih farmakoloških učinaka, loša bioraspodjelivost i nuspojave ograničavaju njegovu izravnu uporabu (Zhang i sur., 2018).

U brojnim studijama pripremljeni su mnogi derivati harmina s ciljem postizanja boljih farmakodinamskih te farmakokinetičkih svojstva promjenom strukture u odnosu na samu molekulu harmina. Među pripremljenim derivatima, amidni derivati harmina i cimetne kiseline u položaju N-9 β-karbolinskog prstena pokazali su se aktivnima u inhibiciji plazmodija u odnosu na druge derivate, koji su uključivali amidne i alkilne supstituente u raznim drugim položajima u prstenu (Marinović M i sur., 2021), zbog čega taj položaj predstavlja potencijal za nove aktivne spojeve. Na slici 2. prikazana su mjesta modifikacije molekule harmina, od kojih su mjesta 1, 3, 6, 7 i 9 najčešća mjesta modifikacije. (Marinović M i sur., 2021; Kamboj i sur., 2021).



**Slika 2.** Mjesta modifikacija molekule harmina (Kamboj i sur., 2021).

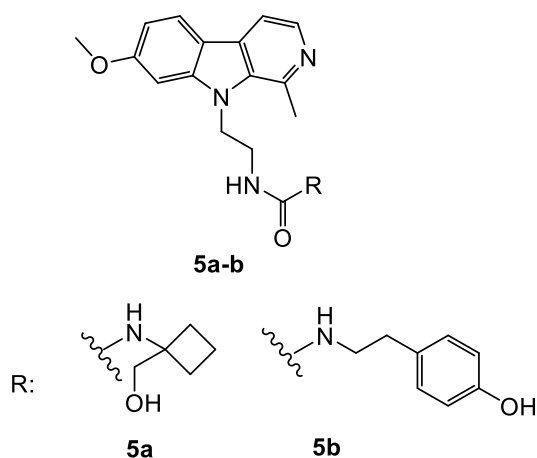
Značajno antimalarijsko djelovanje koje je pokazao harmin moguće se zasniva na selektivnoj inhibiciji proteina toplinskog šoka Hsp90 parazita *P. falciparum* (engl. *Plasmodium falciparum heat shock protein 90*, *PfHsp90*). Proteini toplinskog šoka važni su molekularni šaperoni (engl. *chaperones*) koji omogućavaju pravilno smatanje proteina, a neki od supstrata Hsp90 su proteini važni u procesima poput diferencijacije, genske ekspresije, staničnog ciklusa, odnosno oni koji su bitni za opstanak organizma (Bayih i sur., 2016). Hsp90 bitan je tijekom intraeritrocitnog stadija *P. falciparum* u kojem dolazi do naglih temperaturnih promjena zbog febrilnosti pacijenta te zbog prelaska iz organizma komarca u ljudski organizam gdje doživljava naglu temperaturnu promjenu od 10 °C (Acharya i sur., 2007). Mehanizam inhibicije leži u kompeticiji za vezno mjesto adenzina trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) u katalitičkom mjestu *PfHsp90*. Inhibicijom se onemogućava pravilno smatanje proteina, a time i njihova pravilna funkcija u organizmu, što onemogućava preživljavanje stanice. Ta inhibicija rezultira toksičnošću za organizme koji uvelike ovise o pravilnoj funkciji Hsp90, poput parazita ili tumorskih stanica (Murillo-Solano i sur., 2017), dok se njegovom selektivnošću izbjegava potencijalna citotoksičnost za humane stanice. ATP vezajuća domena *PfHsp90* je evolucijski visoko konzervirana što ju čini pogodnom metom novih lijekova te, sinergističkim djelovanjem s drugim lijekovima, predstavlja potencijal za smanjenjem postojeće rezistencije. Vezanjem na vezno mjesto ATP-a inhibira se njegov učinak, što otvara mogućnost nadvladavanja razvoja rezistencije na potencijalne lijekove bazirane na harminu (Shahinas i sur., 2010; Bayih i sur., 2016; Kamboj i sur., 2021).

Harmin je također pokazao i sinergističko djelovanje s drugim antimalarijskim lijekovima (primjerice klorokinom), što je bitna stavka uzimajući u obzir rastuću rezistenciju plazmodija na postojeću terapiju malarije (Shahinas i sur., 2012).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Zbog povećanog broja ljudi oboljelih od malarije, velikog broja povezanih smrtnih slučajeva i pojave rezistencije javlja se potreba za razvojem novih i učinkovitih lijekova (Garcia, 2010, Marinović M i sur., 2021). Posebno je zabrinjavajuća rastuća pojava rezistencije plazmodija, koja predstavlja prepreku globalnim naporima u iskorjenjivanju ove bolesti. Također je zabilježena i pojava rezistentnih sojeva *P. falciparum* na ACT, što dodatno otežava situaciju. Prirodni produkti predstavljaju veliki izvor biološki aktivnih spojeva pa su se tako brojni biološki aktivni spojevi izolirani iz biljaka koristili kao spojevi uzori u razvoju novih lijekova. Jedan od njih je i harmin,  $\beta$ -karbolinski alkaloid (Zhang i sur., 2020), kojemu je dokazano *in vitro* i *in vivo* antimalarijsko djelovanje. Mogući mehanizam antimalarijskog djelovanja harmina je inhibicija *PfHsp90*, čime harmin uspješno ometa pravilno smatanje proteina koji su nužni za opstanak stanice (Shahinas D i sur., 2012; Murillo-Solano i sur., 2017).

Cilj ovog rada je sinteza i strukturna karakterizacija novih urea harmina i aminoalkohola u položaju N-9  $\beta$ -karbolinskog prstena, budući da su ranije pripremljeni amidi harmina u položaju N-9 pokazali najsnažnije djelovanje.



**Slika 3.** Strukturne formule ciljnih spojeva **5a** i **5b**

Ispitivanje antimalarijskog djelovanja bit će provedeno naknadno te izlazi iz okvira ovoga rada.

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

Tijek reakcija i čistoća dobivenih produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC), za koju su korištene silikagel ploče 60 F<sub>254</sub> (Merck, Njemačka) te cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5 i 1:1:0,5) kao pokretna faza. Za pročišćavanje dobivenih spojeva korištena je kromatografija na koloni, u kojoj se koristio silikagel veličine čestica 70-230 mesh i veličine pora 60 angströma (Sigma-Aldrich) kao nepokretna faza te smjese cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i diklormetan/metanol (8:1 i 9:1) kao pokretne faze. Dobiveni produkti detektirani su pod UV zračenjem ( $\lambda = 254$  nm).

Temperatura tališta spojeva ( $t_i$ ) određena su na Stuart SMP3 instrumentu za određivanje tališta (Barloworld Scientific, UK) te nisu korigirana. IR spektri su snimljeni na spektrofotometru FT-IR Perkin Elmer Spectrum Two (Perkin Elmer, UK). <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-600 (Bruker, SAD) kod 400, odnosno 600 MHz za <sup>1</sup>H i kod 101, odnosno 151 MHz za <sup>13</sup>C NMR. Uzorci su mjereni u DMSO-*d*<sub>6</sub> otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard u <sup>1</sup>H spektrima te u odnosu na rezidualni pik DMSO-a na 39,52 ppm kao standard u <sup>13</sup>C. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent, SAD). Za reakcije u mikrovalnom reaktoru korišten je CEM Discover reaktor (CEM GmbH, Njemačka).

Harmin, tionil klorid, trifosgen, cikloheksan i diklormetan nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Trietilamin (TEA), benzotriazol (BtH) i tiramin su nabavljeni od tvrtke Alfa Aesar (SAD). Cezijev karbonat i *tert*-butil(2-bromoetil)karbamata nabavljeni su od tvrtke TCI (Japan). Klorovodična kiselina, bezvodni dietil-eter, toluen i metanol nabavljeni su od tvrtke Honeywell Riedel de Haën. 1-aminociklobutil-metil nabavljen je od tvrtke Enamine (Ukrajina). Bezvodni natrijev sulfat nabavljen je od tvrtke Gram-mol (Hrvatska).

Bezvodna otapala korištena u eksperimentalnom dijelu dobivena su sljedećim postupcima – bezvodni diklormetan: diklormetan je ekstrahiran vodom, a zatim sušen iznad kalcijeva klorida, predestiliran i čuvan nad aktiviranim molekulskim sitima. Bezvodni dimetilformamid (DMF): bezvodni DMF čuvan je nad aktiviranim molekulskim sitima. Bezvodni toluen: toluen je destiliran i čuvan iznad natrija. Bezvodni trietilamin je destiliran i sušen nad natrijevim hidroksidom (NaOH).

Sve ostale kemikalije bile su *p.a.* čistoće.

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

U otopinu harmina (0,500 g, 2,355 mmol) u bezvodnom DMF-u (5 mL) na 90 °C u inertnoj atmosferi dušika dodan je cezijev karbonat (3,300 g, 10,127 mmol) te *tert*-butil(2-

bromoetil)karbamat (2,111 g, 9,420 mmol) nakon 10 minuta. Reakcijska smjesa miješana je na 90 °C preko noći. Potom je produkt ekstrahiran etil-acetatom (3 × 30 mL) te ispran vodom (1 × 30 mL). Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (8:1). Dobiveni produkt je rastrljan u dietil-eteru i odsisan te je dobiven spoj **1**.

Iskorištenje: 0,379 g (14,52 %).

$t_t$  197,5 – 199 °C.

IR (ATR,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 3183, 3065, 3013, 2993, 2969, 2937, 1701, 1623, 1567, 1502, 1447, 1409, 1366, 1343, 1313, 1278, 1247, 1195, 1166, 1146, 1124, 1092, 1048, 1018, 970, 944, 876, 841, 803, 768, 727, 684, 639, 598, 559, 534.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  8,16 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz, 7), 8,07 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz, 3), 7,85 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H, 6), 7,22 (s, 1H, 12), 7,02 (t, 1H,  $J = 5,9$  Hz, 3'), 6,88 (dd, 1H,  $J = 8,7, 2,1$  Hz, 2), 4,56 (t, 2H,  $J = 6,7$  Hz, 1'), 3,92 (s, 3H, 14), 3,36 – 3,31 (m, 2H, 2'), 2,95 (s, 3H, 13), 1,30 (s, 8H, 6' – 8'), 1,02 (s, 1H, 6' – 8').

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  160,45 (4'), 155,62 (1), 142,85 (8), 140,47 (9), 137,64 (7), 134,70 (11), 128,40 (4), 122,21 (3), 114,35 (5), 112,11 (6), 108,95 (2), 93,81 (12), 77,78 (5'), 55,48 (14), 43,99 (1'), 39,97 (2') 28,02 (6' – 8'), 23,00 (13).

MS (ESI) ( $m/z$ ) 356,2 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

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

U otopinu spoja **1** (0,379 g, 1,261 mmol) u metanolu (4 mL) dodana je klorovodična kiselina (4 M otopina u metanolu) (1,066 mL, 4,264 mmol) te je reakcijska smjesa grijana pri 50 °C preko noći. Po završetku reakcije uparen je metanol, a zaostadni talog smeđe boje otopljen je u 10 mL vode i zalužen 5 % otopinom natrijeva hidroksida do pH 12. Novonastali talog dobivenog spoja **2** je odsisan i ispran dietil-eterom.

Iskorištenje: 0,212 g (65,84 %).

$t_r$  135,7 – 136,7 °C.

MS (ESI) ( $m/z$ ) 256,3 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

IR (ATR,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 3350, 3267, 2966, 2836, 1621, 1563, 1497, 1444, 1405, 1343, 1220, 1150, 1137, 1042, 1020, 1017, 975, 941, 815, 641, 598, 552.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  8,16 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz, 7), 8,08 (d, 1H,  $J = 8,6$  Hz, 3), 7,86 (d, 1H,  $J = 5,1$  Hz, 6), 7,24 (d, 1H,  $J = 2,2$  Hz, 12), 6,87 (dd, 1H,  $J = 8,6, 2,2$  Hz, 2), 4,54 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 2,97 (s, 3H, 13), 2,96 – 2,91 (m, 2H, 2').

<sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  160,50 (1), 142,92 (8), 140,64 (9), 137,66 (7), 134,76 (11), 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).

### 3.3. Sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl) (3)

Otopina benzotriazola (0,065 g, 0,545 mmol) i trifosgena (0,092 g, 0,310 mmol) u bezvodnom toluenu (5 mL) miješana je na temperaturi refluksa (118 °C) 3 sata. Nakon završetka, reakcijska smjesa je ohlađena, toluen uparen te je zaostatni talog naparen toluenom (3 × 10 mL). Dobiveni talog BtcCl-a korišten je u idućem koraku bez dodatnog pročišćavanja.

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

U prethodno pripravljenu otopinu BtcCl u diklormetanu (3 mL) dodan je trietilamin (0,053 mL, 0,543 mmol) pri 0 °C, zatim je dokapavana otopina spoja **2** (0,099 g, 0,388 mmol) u bezvodnom diklormetanu (3 mL) te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nastali bijeli talog je odsisan te je pročišćen kromatografijom na koloni s pokretnom fazom cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) pri čemu je dobiven spoj **4**.

Iskorištenje: 0,057 g (36,7 %).

$t_r$  238,2 – 240,1 °C.

IR (ATR,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 3010, 2966, 1728, 1621, 1563, 1486, 1460, 1445, 1413, 1381, 1365, 1343, 1330, 1294, 1256, 1227, 1196, 1179, 1127, 1114, 1065, 1043, 1010, 979, 918, 852, 838, 819, 784, 770, 748, 707, 656, 635, 600, 584, 555, 529.



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  9,52 (t, 1H,  $J = 6,1$  Hz, 3'), 8,18 (dd, 2H,  $J = 1,8, 6,7$  Hz, 3, 7), 8,10 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz, 6'), 8,05 (d, 1H,  $J = 8,6$  Hz, 9'), 7,88 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz, 6), 7,70 (t, 1H,  $J = 7,6$  Hz, 7'), 7,55 (t, 1H,  $J = 7,6$  Hz, 8'), 7,31 (d, 1H,  $J = 2,2$  Hz, 12), 6,79 (dd, 1H,  $J = 8,5, 2,2$  Hz, 2), 4,81 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz, 1'), 3,83 (s, 3H, 14), 3,79 (q, 2H,  $J = 6,7$  Hz, 2'), 3,05 (s, 3H, 13).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  160,45 (1), 149,20 (4'), 145,40 (10'), 142,93 (8), 140,61 (9), 137,94 (7), 134,64 (11), 131,15 (5'), 130,00 (7'), 128,60 (4), 125,56 (8'), 122,34 (3), 119,76 (9'), 114,31 (5), 113,49 (6'), 112,25 (6), 109,29 (2), 93,40 (12), 55,25 (14), 43,32 (2'), 23,12 (13).

### 3.5. Sinteza urea harmina i aminoalkohola 5a,b

**Opći postupak:** Smjesa spoja **4** (0,056 g, 0,140 mmol), odgovarajućeg aminoalkohola (0,280 mmol) i trietilamina (0,280 mmol) u bezvodnom diklormetanu (2 mL) miješana je u mikrovalnom reaktoru na 60 °C, uz snagu mikrovalova 100 W tijekom 40 minuta. Reakcijska smjesa pročišćivana je metodom A ili B.

**Metoda A:** Novonastali talog je odsisan, rastrljan u dietil-eteru te pročišćen kromatografijom na koloni s pokretnom fazom cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5).

**Metoda B:** Reakcijska smjesa je ekstrahirana vodom, pH vodenog sloja je namješten na 12 s 10 % otopinom NaOH te je zatim vodeni sloj dodatno ekstrahiran etil-acetatom (2 × 30 mL). Organski slojevi su sakupljeni i sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani, a otapalo upareno pod sniženim tlakom. Dobiveni talog pročišćen je kromatografijom na koloni s pokretnom fazom cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) te je zatim rastrljan u dietil-eteru i odsisan.

#### 3.5.1. Sinteza 1-(1-(hidroksimetil)ciklobutil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)uree (5a)

Količina aminoalkohola: 0,028 g 1-aminociklobutila.

Metoda pročišćavanja: **B**.

Iskorištenje: 0,0307 g (62 %).

$t_r$  133,2 – 135,0 °C.

MS/MS ( $m/z$ ) 383 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (ATR,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 3392, 3289, 3000, 2932, 2816, 2726, 1642, 1624, 1566, 1411, 1289, 1251, 1198, 1178, 1141, 1124, 1027, 986, 813, 734, 645, 601, 561.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  8,16 (d, 1H,  $J = 5,1$  Hz, 7), 8,08 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz, 3), 7,87 (d, 1H,  $J = 5,1$  Hz, 6), 7,29 (d, 1H,  $J = 2,2$  Hz, 12), 6,88 (dd, 1H,  $J = 8,6, 2,2$  Hz, 2), 6,13 (s, 1H, 5'), 6,11 (t, 1H,  $J = 5,9$  Hz, 3'), 4,96 (t, 1H,  $J = 5,4$  Hz, 11'), 4,56 (t, 2H,  $J = 6,7$  Hz, 1'), 3,92 (s, 3H, 14), 3,44 (d, 2H,  $J = 5,4$  Hz, 10'), 3,38 (q, 2H,  $J = 6,1$  Hz, 2'), 2,96 (s, 3H, 13), 2,09 (q,  $J = 9,7$  Hz, 2H, 7'), 1,95 (dt,  $J = 12,0, 6,2$  Hz, 2H, 9'), 1,74 (tt,  $J = 9,9, 5,1$  Hz, 1H, 8), 1,63 (dt,  $J = 11,2, 8,6$  Hz, 1H, 8).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  160,48 (4'), 157,76 (1), 142,85 (8), 140,75 (9), 137,67 (7), 134,77 (11), 128,29 (4), 122,26 (3), 114,28 (5), 112,18 (6), 109,11 (2), 93,96 (12), 65,89 (10'), 56,72 (6'), 55,50 (14), 44,61 (1'), 39,30 (2'), 29,37 (7', 9'), 23,16 (13), 13,98 (8').

### 3.5.2. Sinteza 1-(4-hidroksifenetil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)uree (5b)

Količina aminoalkohola: 0,038 g tiramina.

Metoda pročišćavanja: A.

Iskorištenje: 0,056 g (31,86 %).

$t_r$  254,9 – 256,1 °C.

MS (ESI) ( $m/z$ ) 419,1 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (ATR,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 3362, 3318, 2920, 2806, 2682, 2608, 1625, 1585, 1517, 1467, 1436, 1410, 1390, 1356, 1344, 1295, 1249, 1236, 1205, 1180, 1142, 1125, 1101, 1048, 1028, 990, 947, 825, 803, 770, 638, 605, 597, 553, 518, 467.

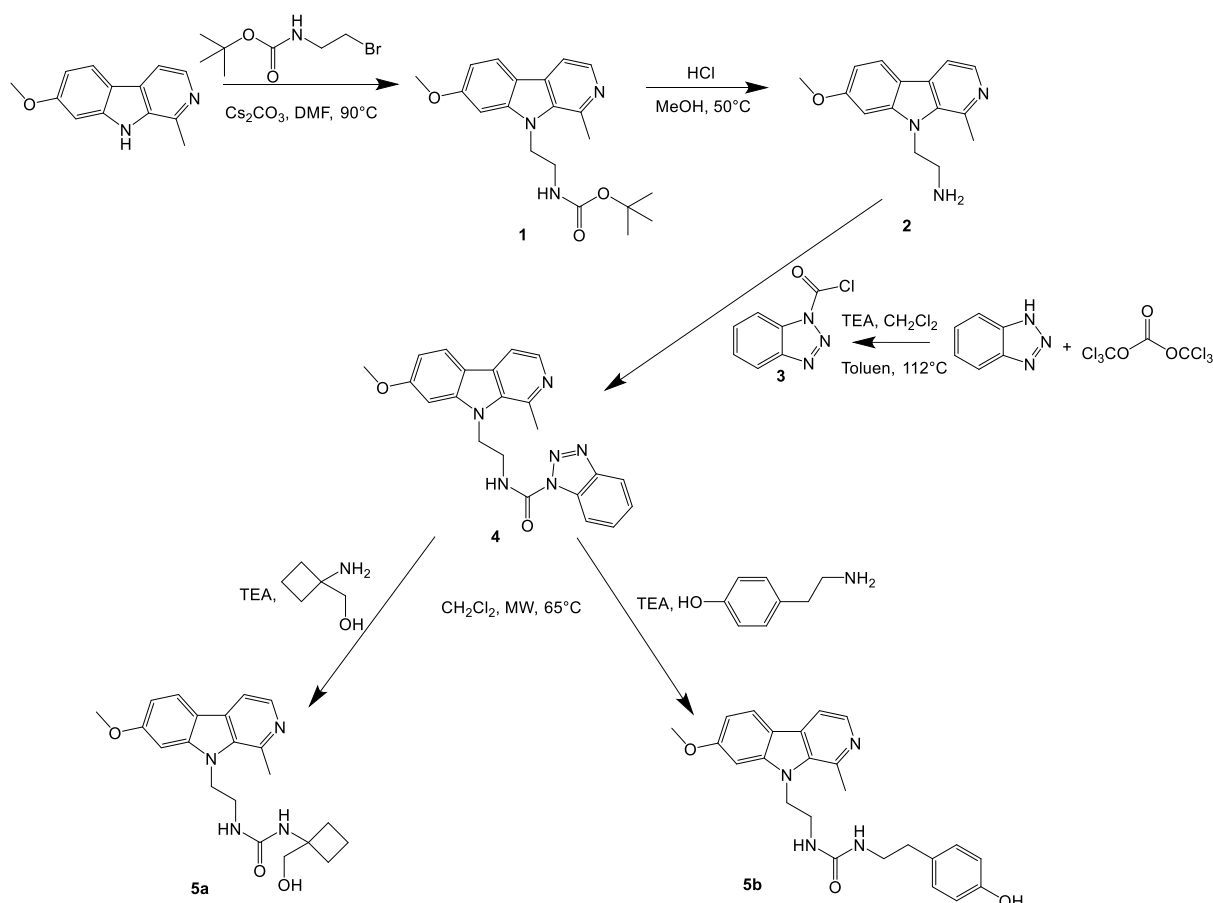
<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  9,15 (s, 1H, 14'), 8,16 (d, 1H,  $J = 5,1$  Hz, 7), 8,08 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz, 3), 7,86 (d, 1H,  $J = 5,1$  Hz, 6), 7,28 (d, 1H, 12), 6,96 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz, 9', 13'), 6,87 (dd, 1H,  $J = 8,6, 2,2$  Hz, 2), 6,67 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, 10', 12'), 6,10 (t, 1H,  $J = 5,8$  Hz, 5'), 5,95

(t, 1H,  $J = 5,6$  Hz, 3'), 4,56 (t, 2H,  $J = 6,9$  Hz, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 3,39 (q, 2H,  $J = 6,6$  Hz, 6'), 3,15 (q, 2H,  $J = 6,8$  Hz, 2'), 2,97 (s, 3H, 13), 2,53 (d, 2H,  $J = 7,4$  Hz, 7').

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm)  $\delta$  160,48 (4'), 158,11 (1), 155,56 (11'), 142,93 (8), 140,75 (9), 137,69 (7), 134,72 (11), 129,67 (8'), 129,47 (9', 13'), 128,30 (5), 122,26 (3), 115,07 (10', 12'), 114,23 (4), 112,19 (6), 109,19 (2), 93,80 (12), 55,46 (14), 44,42 (6'), 41,35 (2'), 35,32 (7'), 23,15 (13).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu opisana je sinteza urea harmina i aminoalkohola, pripremljenih u položaju N-9  $\beta$ -karbolinskog prstena: 1-(1-(hidroksimetil)ciklobutil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)uree (**5a**) i 1-(4-hidroksifenetil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)uree (**5b**). Sintetski put prikazan je na Shemi 1.



**Shema 1.** Sinteza spojeva **5a** i **5b**

Polazni spoj u sintezi željenih derivata **5a** i **5b** bio je harmin. Spoj **1** pripremljen je reakcijom nukleofilne supstitucije *tert*-butil(2-bromoetil)karbamata na atom dušika u položaju 9  $\beta$ -karbolinskog prstena harmina uz prisutnost cezijeveg karbonata koji služi kao baza za deprotoniranje ranije navedenog atoma dušika, s ciljem povećanja njegove nukleofilnosti. Sljedeći korak predstavlja uklanjanje Boc zaštitne skupine spoja **1** u kiselim uvjetima korištenjem 4 M klorovodične kiseline u metanolu. Pri uklanjanju zaštitne skupine dolazi do kisele hidrolize karbamata, nakon čega slijedi dekarboksilacija, pri čemu nastaje primarni amin **2**.

Odabrani put sinteze željenih urea **5a** i **5b** uključuje pripravu benzotriazolida harmina **4**, iz klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (**3**) i amina **2**. Klorid **3** pripremljen je reakcijom

benzotriazola i trifosgena u suhom toluenu pri temperaturi refluksa, koji u daljnjoj reakciji sa spojem **2** daje benzotriazolid **4**, odnosno aktivnu ureu). Benzotriazol je spoj koji se lako može uvesti u molekulu, stabilan je tijekom kemijskih reakcija te se može jednostavno ukloniti iz reakcijske smjese ekstrakcijom, što ga čini vrlo korisnim „pomoćnikom“ u velikom broju sinteza. Osim navedenog, koristan je i kao aktivirajuća skupina polaznog spoja u reakciji (Katritzky i sur., 1998).

U posljednjem koraku, derivati harmina **5a** i **5b** pripremljeni su reakcijama nukleofilne supstitucije (dolazi do supstitucije benzotriazola, koji je dobra izlazna skupina, amino skupinom odgovarajućih aminoalkohola). Reakcije su provedene u mikrovalnom reaktoru pri 65 °C i jačini od 150 W tijekom 45 minuta. Mikrovalno zračenje koje proizvodi mikrovalni reaktor može ubrzati organske reakcije, a također rezultira i većim iskorištenjima, mogućnosti korištenja blažih reakcijskih uvjeta te kraćeg vremena trajanja samih reakcija. To se pripisuje „mikrovalnom učinku“, koji se sastoji od kombinacije toplinske energije i energije zračenja, a zbog navedenih pozitivnih učinaka na kemijske reakcije postao je nezaobilazan dio organskih sinteza (De la Hoz i sur., 2005).

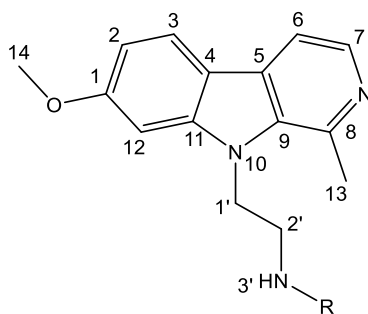
Za pripravu konačnih spojeva **5a** i **5b** korištene su dvije metode pročišćavanja, **A** i **B**. Metoda **A** sastojala se od pročišćavanja dobivenog taloga korištenjem kromatografije na koloni s pokretnom fazom cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5), dok se metoda **B** sastojala od ekstrakcije pomoću sustava voda/diklormetan u kojoj je vodeni sloj dodatno ekstrahiran etil-acetatom, a talog dobiven iz sjedinjenih organskih faza pročišćen kromatografijom na koloni s pokretnom fazom cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i rastrljavanjem s dietil-eterom.

Navedenim postupcima dobiveni su sljedeći spojevi:

- 1-(1-(hidroksimetilciklobutil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)urea (**5a**)
- 1-(4-hidroksifenetil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)urea (**5b**).

Benzotriazolid **4**, kao i uree **5a,b**, su novi spojevi, do sada neopisani u literaturi. Provedena je strukturna karakterizacija dobivenih spojeva, a obuhvaća spektroskopske te analitičke metode koje uključuju <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, IR, MS, te im je određeno talište.

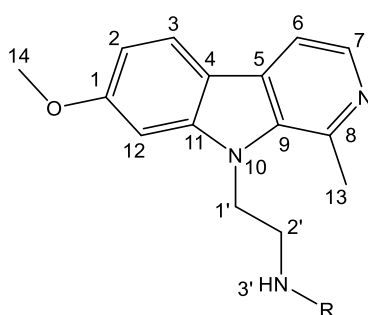
**Tablica 2.** Analitički i spektroskopski podaci za spojeve **1**, **2**



Spoj	<b>1</b>	<b>2</b>
R		H
Molekulska formula	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O
<i>t</i> <sub>t</sub> (°C)	197,5 – 199	133,5 – 135,5
M <sub>r</sub>	355,44	255,32
MS ( <i>m/z</i> )	356,2 (M+1) <sup>+</sup>	256,3 (M+1) <sup>+</sup>
IR (ATR, ν/cm <sup>-1</sup> )	3183, 3065, 3013, 2993, 2969, 2937, 1701, 1623, 1567, 1502, 1447, 1409, 1366, 1343, 1313, 1278, 1247, 1195, 1166, 1146, 1124, 1092, 1048, 1018, 970, 944, 876, 841, 803, 768, 727, 684, 639, 598, 559, 534.	3350, 3267, 2966, 2836, 1621, 1563, 1497, 1444, 1405, 1343, 1220, 1150, 1137, 1042, 1020, 1017, 975, 941, 815, 641, 598, 552.
<sup>1</sup> H NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ ppm)	8,16 (d, 1H, <i>J</i> = 5,2 Hz, 7), 8,07 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, 3), 7,85 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H, 6), 7,22 (s, 1H, 12), 7,02 (t, 1H, <i>J</i> = 5,9 Hz, 3'), 6,88 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,7, 2,1 Hz, 2), 4,56 (t, 2H, <i>J</i> = 6,7 Hz, 1'), 3,92 (s, 3H, 14), 3,36 – 3,31 (m, 2H, 2'), 2,95 (s, 3H, 13), 1,30 (s, 8H, 6' – 8'), 1,02 (s, 1H, 6' – 8')	8,16 (d, 1H, <i>J</i> = 5,2 Hz, 7), 8,08 (d, 1H, <i>J</i> = 8,6 Hz, 3), 7,86 (d, 1H, <i>J</i> = 5,1 Hz, 6), 7,24 (d, 1H, <i>J</i> = 2,2 Hz, 12), 6,87 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,6, 2,2 Hz, 2), 4,54 (t, 2H, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 2,97 (s, 3H, 13), 2,96 – 2,91 (m, 2H, 2')

<b><sup>13</sup>C NMR (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, δ ppm)</b>	160,45 (4'), 155,62 (1), 142,85 (8), 140,47 (9), 137,64 (7), 134,70 (11), 128,40 (4), 122,21 (3), 114,35 (5), 112,11 (6), 108,95 (2), 93,81 (12), 77,78 (5'), 55,48 (14), 43,99 (1'), 39,97 (2') 28,02 (6', 7', 8'), 23,00 (13)	160,50 (1), 142,92 (8), 140,64 (9), 137,66 (7), 134,76 (11), 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)
--	--	---

**Tablica 3.** Analitički i spektroskopski podaci za spojeve **4**, **5a**, **5b**



Spoj	<b>4</b>	<b>5a</b>	<b>5b</b>
<b>R</b>			
<b>Molekulska formula</b>	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
<i>t</i> <sub>f</sub> (°C)	238,2 – 240,1	133,2 – 135,0	254,9 – 256,1
<b>M<sub>r</sub></b>	400,44	382,46	418,50
<b>MS (m/z)</b>	-	383 (M+1) <sup>+</sup>	419,1 (M+1) <sup>+</sup>
<b>IR (ATR, ν/cm<sup>-1</sup>)</b>	3010, 2966, 1728, 1621, 1563, 1486, 1460, 1445, 1413, 1381, 1365, 1343, 1330, 1294, 1256, 1227, 1196, 1179, 1127, 1114, 1065, 1043, 1010, 979, 918, 852, 838, 819, 784, 770, 748, 707, 656, 635, 600, 584, 555, 530, 529	3392, 3289, 3000, 2932, 2816, 2726, 1642, 1624, 1566, 1411, 1289, 1251, 1198, 1178, 1141, 1124, 1027, 986, 813, 734, 645, 601, 561	3362, 3318, 2920, 2806, 2682, 2608, 1625, 1585, 1517, 1467, 1436, 1410, 1390, 1356, 1344, 1295, 1249, 1236, 1205, 1180, 1142, 1125, 1101, 1048, 1028, 990, 947, 825, 803, 770, 638, 605, 597, 553, 518, 467



<p><b><sup>1</sup>H NMR (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, δ ppm)</b></p>	<p>9,52 (t, 1H, <i>J</i> = 6,1 Hz, 3'), 8,18 (dd, 2H, <i>J</i> = 1,8, 6,7 Hz, 3, 7), 8,10 (d, 1H, <i>J</i> = 8,3 Hz, 6'), 8,05 (d, 1H, <i>J</i> = 8,6 Hz, 9'), 7,88 (d, 1H, <i>J</i> = 5,2 Hz, 6), 7,70 (t, 1H, <i>J</i> = 7,6 Hz, 7'), 7,55 (t, 1H, <i>J</i> = 7,6 Hz, 8), 7,31 (d, 1H, <i>J</i> = 2,2 Hz, 12), 6,79 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,5, 2,2 Hz, 2), 4,81 (t, 2H, <i>J</i> = 7,0 Hz, 1'), 3,83 (s, 3H, 14), 3,79 (q, 2H, <i>J</i> = 6,7 Hz, 2'), 3,05 (s, 3H, 13)</p>	<p>8,16 (d, 1H, <i>J</i> = 5,1 Hz, 7), 8,08 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, 3), 7,87 (d, 1H, <i>J</i> = 5,1 Hz, 6), 7,29 (d, 1H, <i>J</i> = 2,2 Hz, 12), 6,88 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,6, 2,2 Hz, 2), 6,13 (s, 1H, 5'), 6,11 (t, 1H, <i>J</i> = 5,9 Hz, 3'), 4,96 (t, 1H, <i>J</i> = 5,4 Hz, 11'), 4,56 (t, 2H, <i>J</i> = 6,7 Hz, 1'), 3,92 (s, 3H, 14), 3,44 (d, 2H, <i>J</i> = 5,4 Hz, 10'), 3,38 (q, 2H, <i>J</i> = 6,1 Hz, 2'), 2,96 (s, 3H, 13), 2,09 (q, <i>J</i> = 9,7 Hz, 2H, 7'), 1,95 (dt, <i>J</i> = 12,0, 6,2 Hz, 2H, 9'), 1,74 (tt, <i>J</i> = 9,9, 5,1 Hz, 1H, 8), 1,63 (dt, <i>J</i> = 11,2, 8,6 Hz, 1H, 8)</p>	<p>9,15 (s, 1H, 14'), 8,16 (d, 1H, <i>J</i> = 5,1 Hz, 7), 8,08 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, 3), 7,86 (d, 1H, <i>J</i> = 5,1 Hz, 6), 7,28 (d, 1H, 12), 6,96 (d, 2H, <i>J</i> = 8,1 Hz, 9', 13'), 6,87 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,6, 2,2 Hz, 2), 6,67 (d, 2H, <i>J</i> = 8,0 Hz, 10', 12'), 6,10 (t, 1H, <i>J</i> = 5,8 Hz, 5'), 5,95 (t, 1H, <i>J</i> = 5,6 Hz, 3'), 4,56 (t, 2H, <i>J</i> = 6,9 Hz, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 3,39 (q, 2H, <i>J</i> = 6,6 Hz, 6'), 3,15 (q, 2H, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2'), 2,97 (s, 3H, 13), 2,53 (d, 2H, <i>J</i> = 7,4 Hz, 7')</p>
<p><b><sup>13</sup>C NMR (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, δ ppm)</b></p>	<p>160,45 (1), 149,20 (4'), 145,40 (10'), 142,93 (8), 140,61 (9), 137,94 (7), 134,64 (11), 131,15 (5'), 130,00 (7'), 128,60 (4), 125,56 (8'), 122,34 (3), 119,76 (9'), 114,31 (5), 113,49 (6'), 112,25 (6), 109,29 (2), 93,40 (12), 55,25 (14), 43,32 (2'), 23,12 (13)</p>	<p>160,48 (4'), 157,76 (1), 142,85 (8), 140,75 (9), 137,67 (7), 134,77 (11), 128,29 (4), 122,26 (3), 114,28 (5), 112,18 (6), 109,11 (2), 93,96 (12), 65,89 (10'), 56,72 (6'), 55,50 (14), 44,61 (1'), 39,30 (2'), 29,37 (7', 9'), 23,16 (13), 13,98 (8')</p>	<p>160,48 (4'), 158,11 (1), 155,56 (11'), 142,93 (8), 140,75 (9), 137,69 (7), 134,72 (11), 129,67 (8'), 129,47 (9', 13'), 128,30 (5), 122,26 (3), 115,07 (10', 12'), 114,23 (4), 112,19 (6), 109,19 (2), 93,80 (12), 55,46 (14), 44,42 (6'), 41,35 (2'), 35,32 (7'), 23,15 (13)</p>

## **5. ZAKLJUČCI**

U okviru ovog rada sintetizirane su dvije uree harmina i aminoalkohola:

- 1-(1-(hidroksimetilciklobutil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)urea (**5a**)
- 1-(4-hidroksifenetil)-3-(2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)urea (**5b**)

Konačni spojevi **5a** i **5b** strukturno su karakterizirani spektroskopskim i analitičkim metodama koje uključuju IR, MS, <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR te im je određena temperatura tališta. Međuprodukti **1**, **2** i **4** strukturno su karakterizirani spektroskopskim metodama IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR te im je također određena temperatura tališta.

Tijekom daljnjih istraživanja, koja izlaze iz okvira ovog rada, ciljnim spojevima bit će ispitano antimalarijsko djelovanje.

## **6. LITERATURA**

Acharya P, Kumar R, Tatu U. Chaperoning a cellular upheaval in malaria: heat shock proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007, 153, 85-94.

Adams JH, Mueller I. The Biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017, 7, a025585.

Aronson J. 76 - Plant Poisons and Traditional Medicines, U: Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-third Edition), Farrar J, Hotez PJ, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ, Saunders WB, 2014, str. 1128 – 1150.

Ashok P, Ganguly S, Murugesan S. Review on in-vitro anti-Malarial activity of Natural - carboline Alkaloids . *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, 13, 1778 – 1791.

Bayih, AG, Folefoc A, Mohon AN et al. 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.

Buyon LE, Elsworth B, Duraisingh MT. The molecular basis of antimalarial drug resistance in *Plasmodium vivax*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2021, 16, 23 – 37.

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

De la Hoz A, Díaz-Ortiz A, Moreno A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem Soc Rev*. 2005, 34, 164 – 178.

Duparc S, Chalon S, Miller S, Richardson N, Toovey S. Neurological and psychiatric safety of tafenoquine in *Plasmodium vivax* relapse prevention: a review. *Malar J*. 2020, 19, 111.

Drug Resistance in the Malaria-Endemic World, <https://www.cdc.gov/>, pristupljeno 12.3.2022.

Garcia LS. Malaria. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2010, 30, 93 – 129.

Harmine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 18.5.2022.

Javeed M et al. Harmine and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in human diseases. *Bangladesh J Pharmacol*, 2018, 13, 203 – 213.

Kamboj A., Sihag B., Brar D.S., Kaur A., Salunke D.B, Structure Activity Relationship in  $\beta$ -Carboline Derived Anti-malarial Agents. *Eur J Med Chem*. 2021;221:113536.

Katritzky AR, Lan X, Yang JZ, Denisko OV. Properties and synthetic utility of N-substituted benzotriazoles. *Chem Rev*, 1998, 98, 409 – 548.

Kalenić i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada 2013. str. 604 – 609.

Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2016, 30, 373 – 393.

Malaria, <https://www.who.int/>, pristupljeno 3.3.2022.

Malaria, <https://www.cdc.gov/>, pristupljeno 24.3.2022.

Marinović M, Poje G, Perković I, et al. 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.

Meibalan E, Marti M. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017, 7, a025452.

Milner DA Jr. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018, 8, a025569.

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

Plewes K, Stije J. Leopold, Hugh W.F. Kingston, Arjen M. Dondorp, Malaria: What's New in the Management of Malaria?, *Infectious Disease Clinics of North America*, 2019, 33, 39 – 60.

Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14, 982 – 991.

Pryce J, Hine P. Pyronaridine-artesunate for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019, 1, CD006404.

Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria, *Infez Med*. 2016, 24, 93 – 104.

Severe malaria. *Trop Med Int Health*. 2014, 19, 7 – 131.

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.

Shahinas D, Liang M, Datti A, Pillai DR. A repurposing strategy identifies novel synergistic inhibitors of *Plasmodium falciparum* heat shock protein 90. *J Med Chem*. 2010, 53, 3552-3557.

Sinclair D, Zani B, Donegan S, Olliaro P, Garner P. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009, 2009, CD007483.

Tajuddeen, N., Van Heerden, F.R. Antiplasmodial natural products: an update. *Malar J*, 2019, 18, 404.

The use of artesunate-pyronaridine for the treatment of uncomplicated malaria. Geneva: World Health Organization, 2019.

Varo R, Chaccour C, Bassat Q. Update on malaria. *Med Clin (Barc)*. 2020, 155, 395 – 402.

WHO (2021), Guidelines for malaria, Geneva: World Health Organization.

WHO (2020), Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response: 10 years of surveillance (2010-2019), Geneva: World Health Organization.

WHO (2021), Tackling antimalarial drug resistance. WHOUCNGMP2020.07, Geneva: World Health Organization.

WHO (2021), World malaria report. Geneva: World Health Organization.

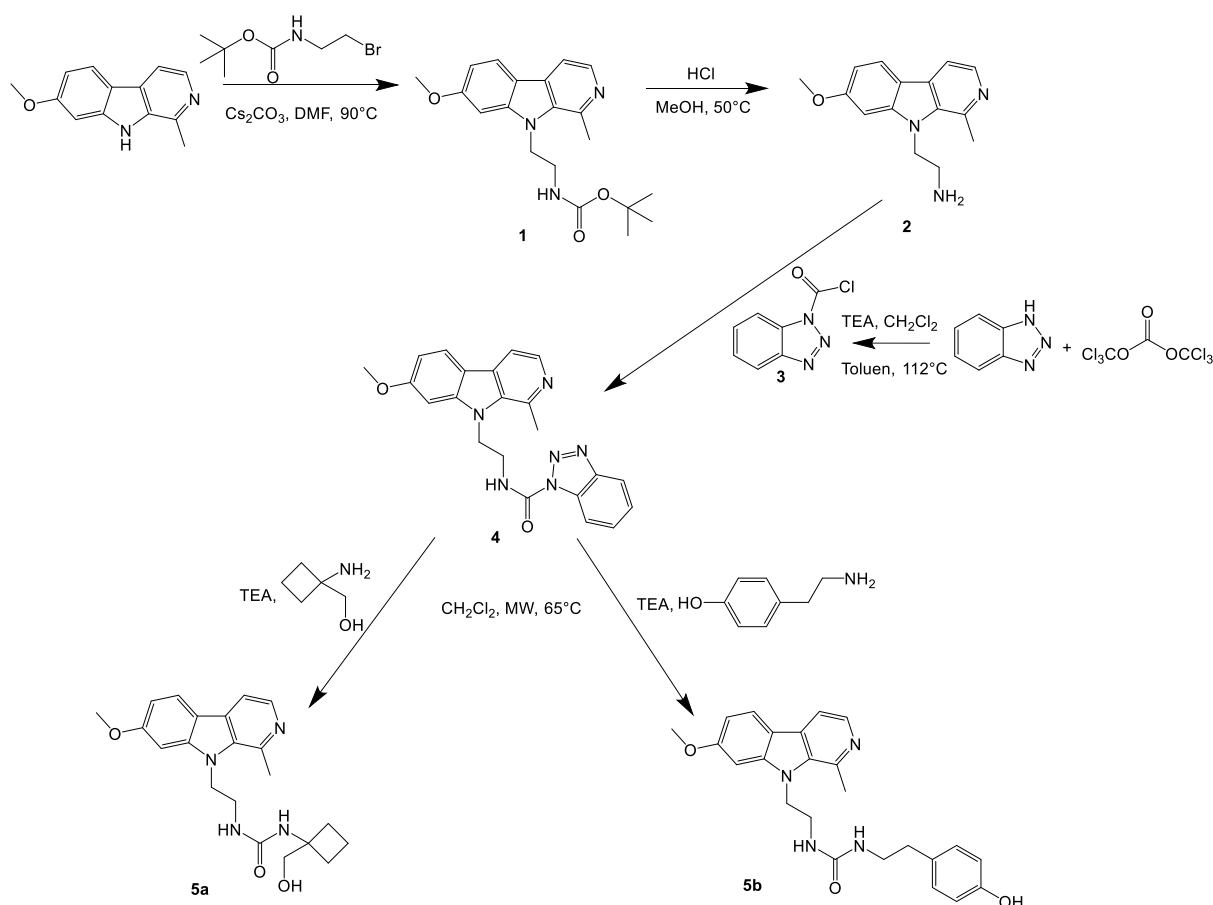
Zhang L, Li D, Yu S. Pharmacological effects of harmine and its derivatives: a review. *Arch Pharm Res.* 2020, 43, 1259 – 1275.



## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

## Sinteza i karakterizacija urea harmina i aminoalkohola

Harmin je  $\beta$ -karbolinski alkaloid prirodnog podrijetla koji je u mnogim istraživanjima pokazao brojne farmakološke učinke, uključujući i antimalarijsko djelovanje. Selektivnim inhibitornim djelovanjem na protein toplinskog šoka *P. falciparum* (PfHsp90) u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima uspješno je djelovao na parazita *P. falciparum*. Zbog specifičnog mehanizma djelovanja i mogućeg sinergizma s drugim lijekovima postoji značajan potencijal za smanjenje rezistencije na postojeću terapiju, koja je postala globalni javnozdravstveni problem. U okviru ovog rada sintetizirana su dva nova spoja, uree harmina s aminoalkoholima u položaju 9  $\beta$ -karbolinskog prstena (**5a,b**). Novosintetiziranim spojevima potvrđena je struktura te su okarakterizirani analitičkim i spektroskopskim metodama koje uključuju IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR te MS. Novim spojevima je također određena i temperatura tališta, a u kasnijim istraživanjima bit će im ispitano i antimalarijsko djelovanje.

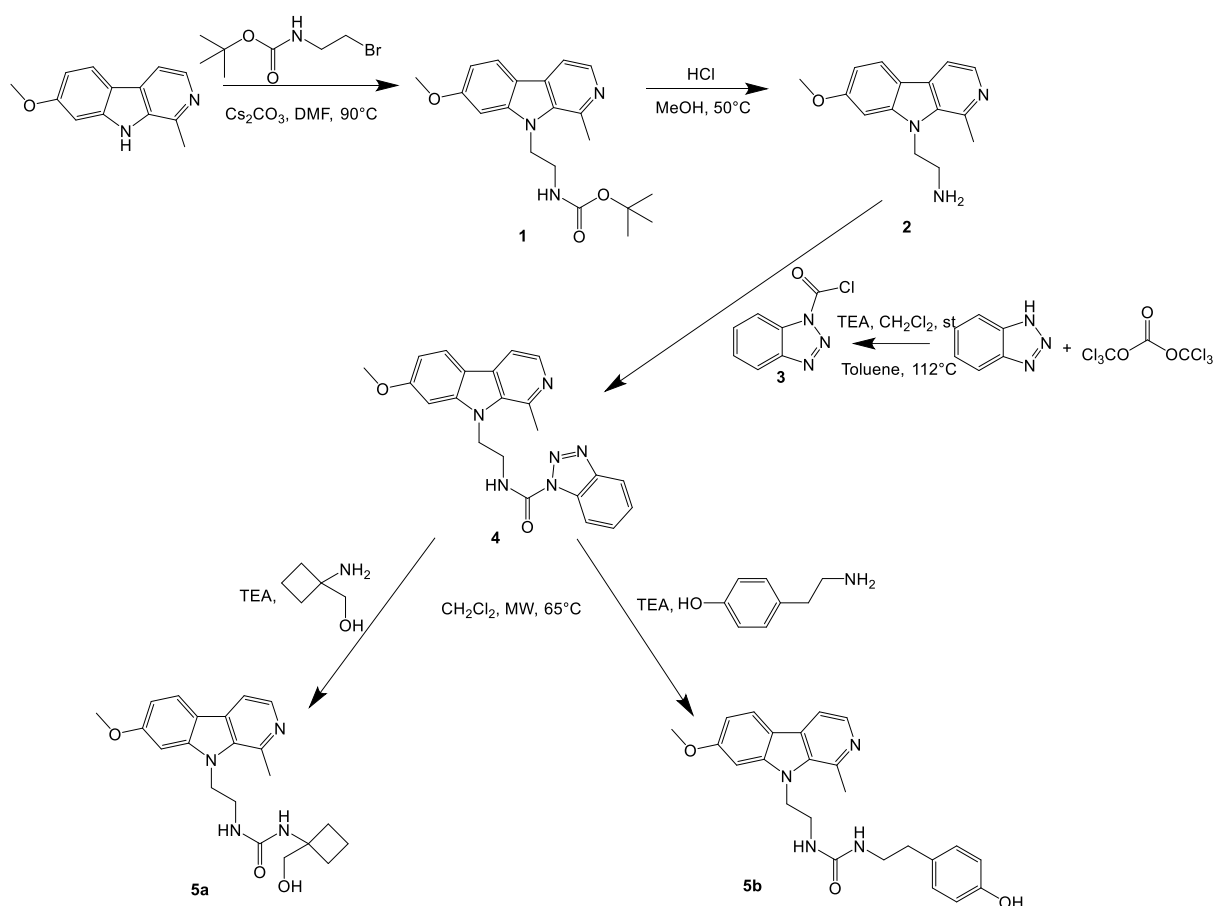


Shema. Sinteza urea **5a** i **5b**.

Ključne riječi: harmin, urea, malarija, aminoalkohol, benzotriazol.

## Synthesis and characterization of urea harmine and aminoalcohols

Harmine is a naturally occurring  $\beta$ -carboline alkaloid which was proven to have many pharmacological effects, including antimalarial. Harmine exhibited activity against *P. falciparum* in *in vitro* and *in vivo* studies, possibly due to its selective and inhibitory effect on *P. falciparum* heat shock protein (*PfHsp90*). Because of the specific mechanism of action and synergy with other antimalarials, harmine possesses a potential for lowering the incidence of resistance to the available drugs, which has become a global health burden. In this thesis two novel compounds were synthesised, harmine ureas with amino alcohols, **5a** and **5b**. The newly synthesized compounds have been characterized using spectroscopic and analytical methods, (IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS) and their melting point was determined. Future research will focus on evaluation of their antimalarial activity.

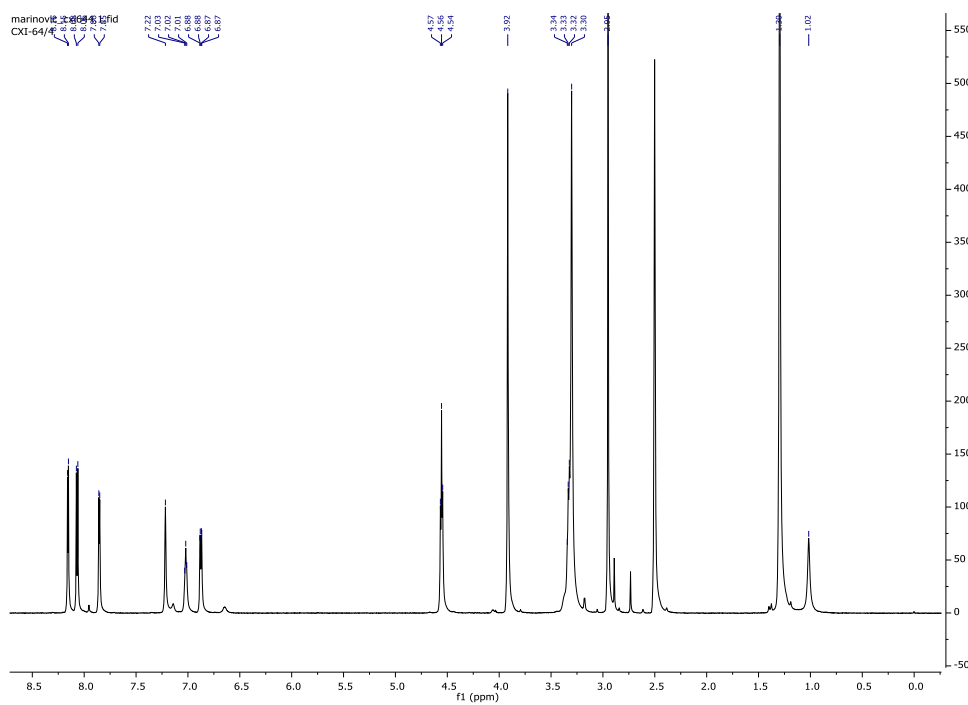
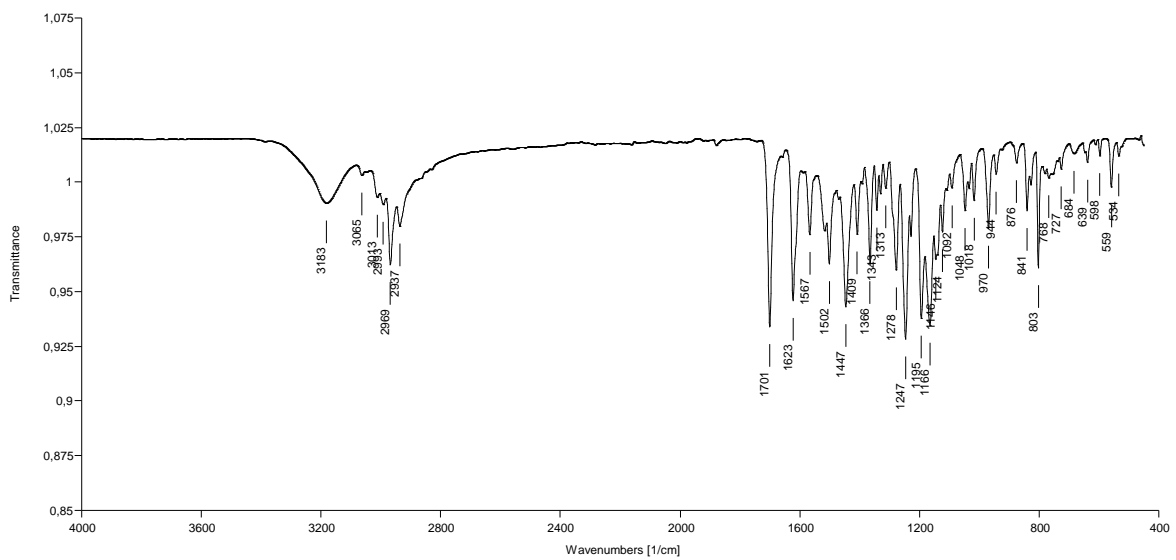
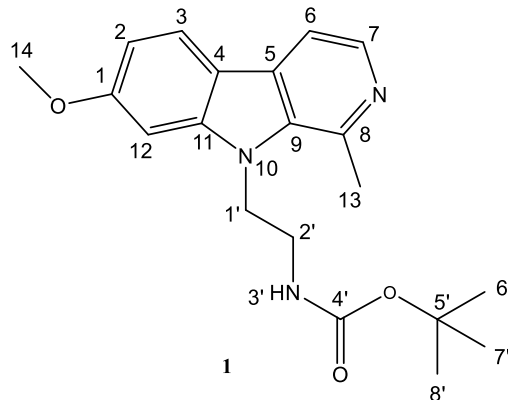


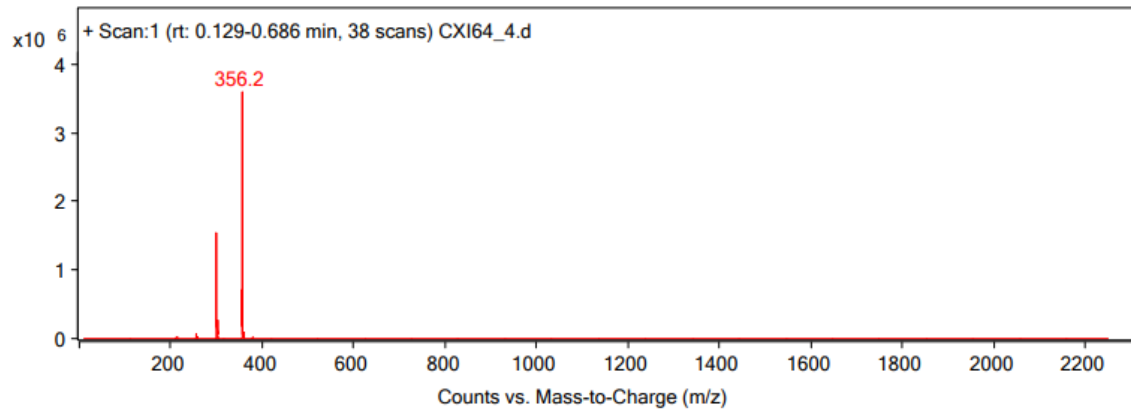
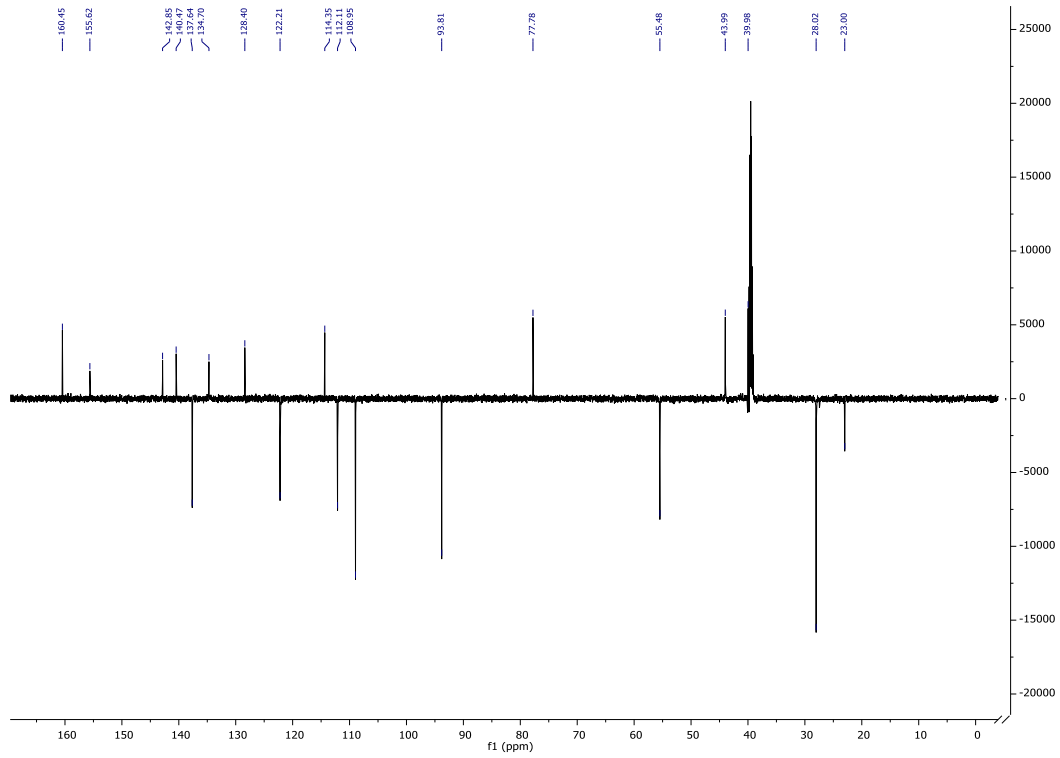
Scheme. Synthesis of ureas **5a,b**.

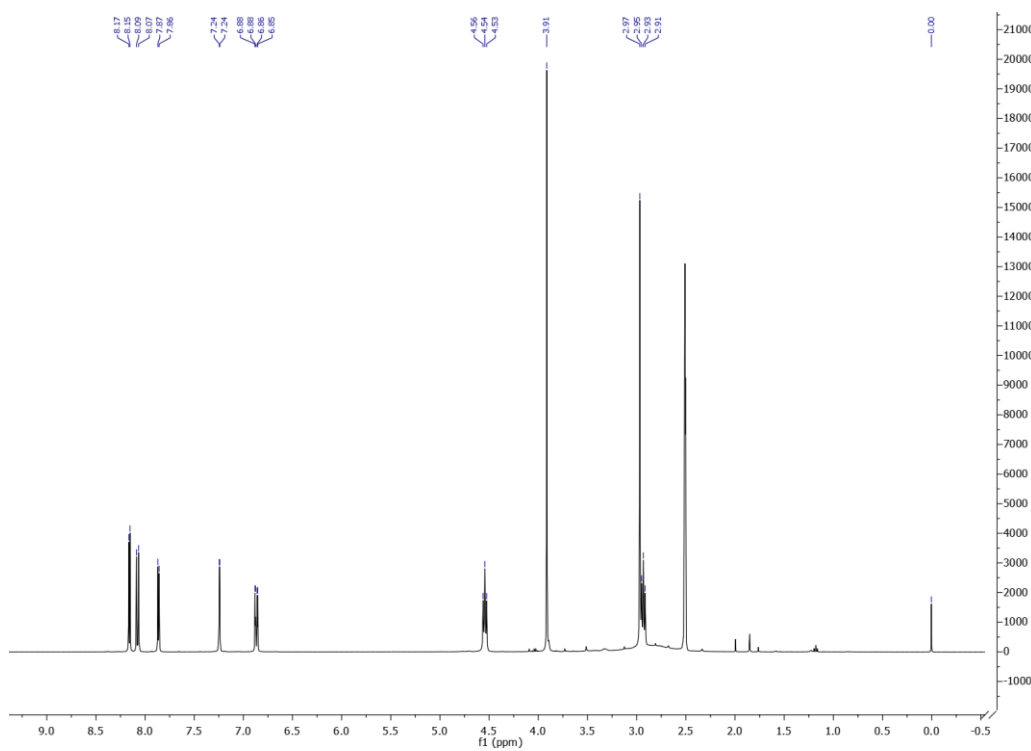
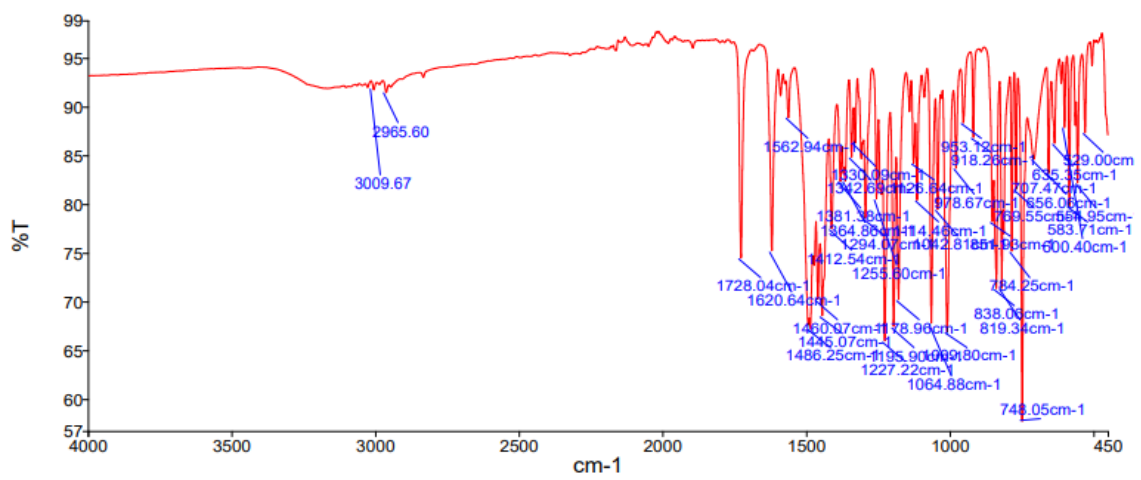
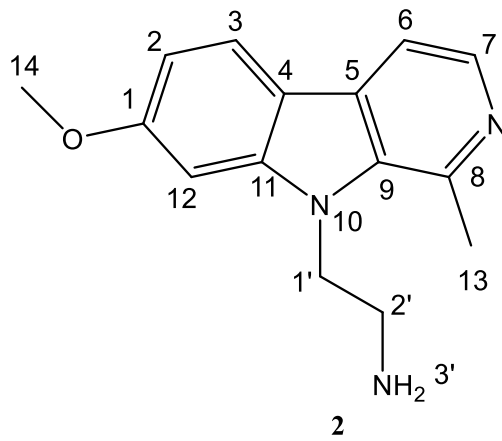
Keywords: harmine, urea, malaria, aminoalcohol, benzotriazole.

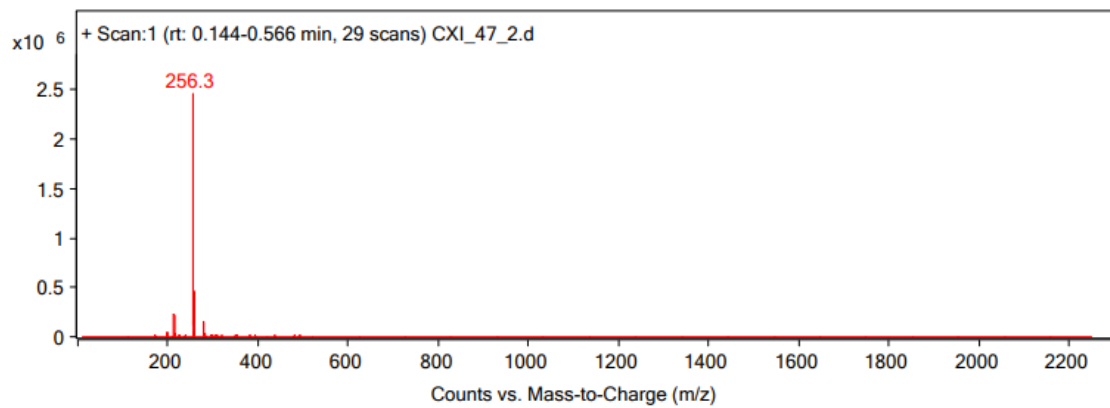
## **8. PRILOZI**

Prilozi sadrže IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR te MS spektre sintetiziranih spojeva.

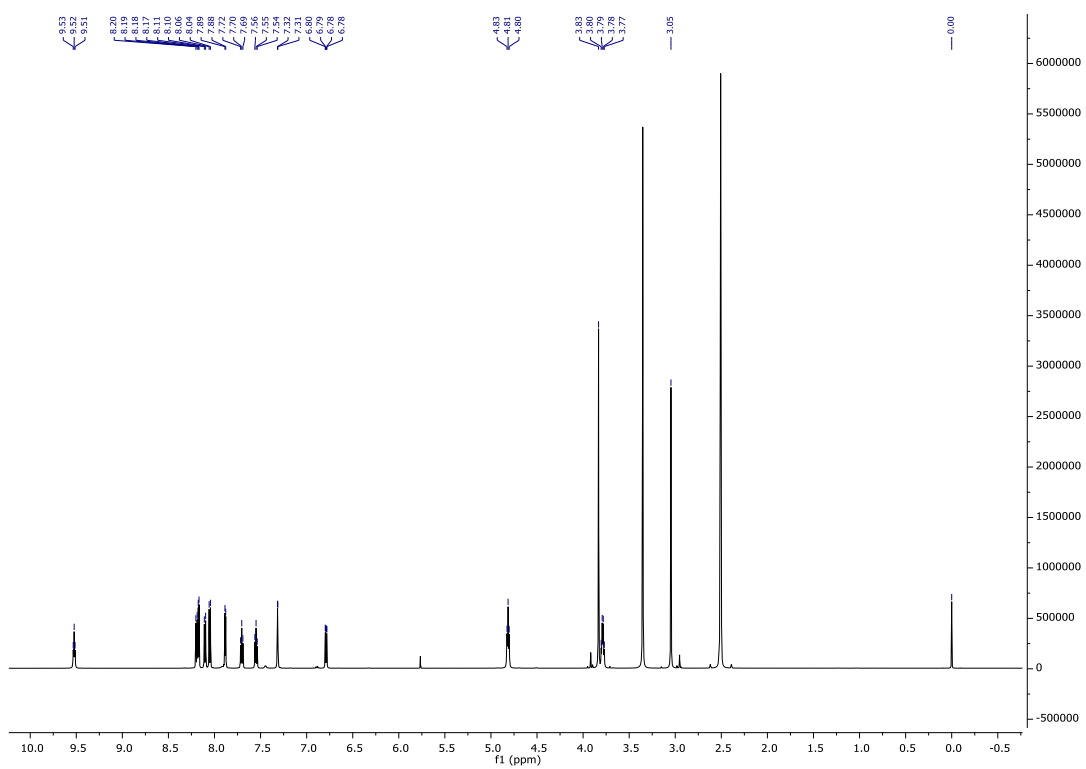
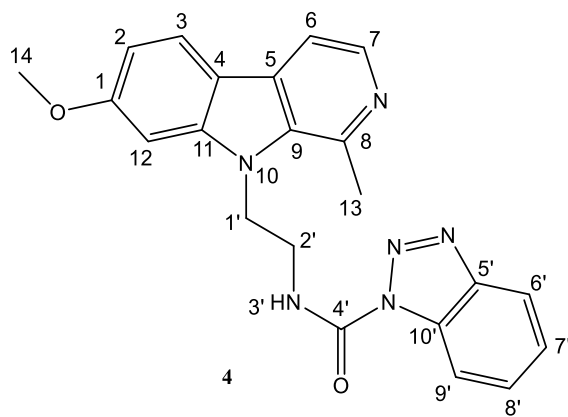


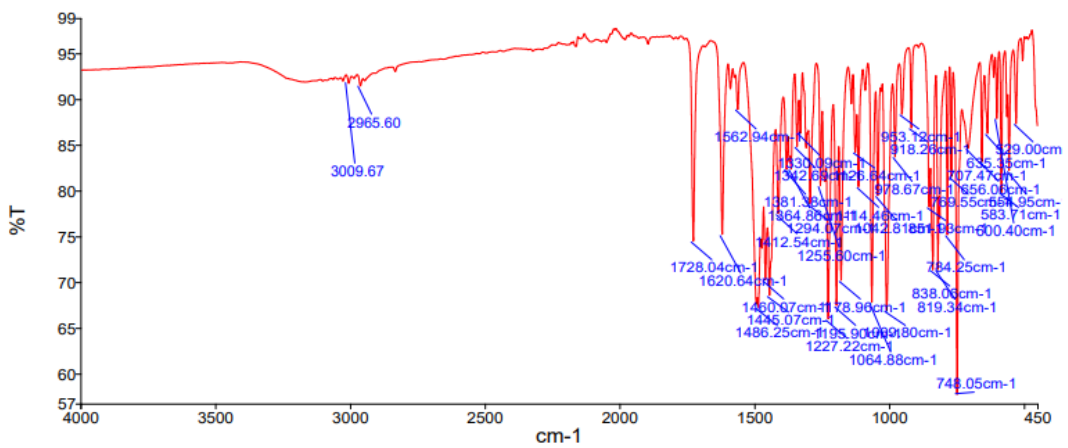
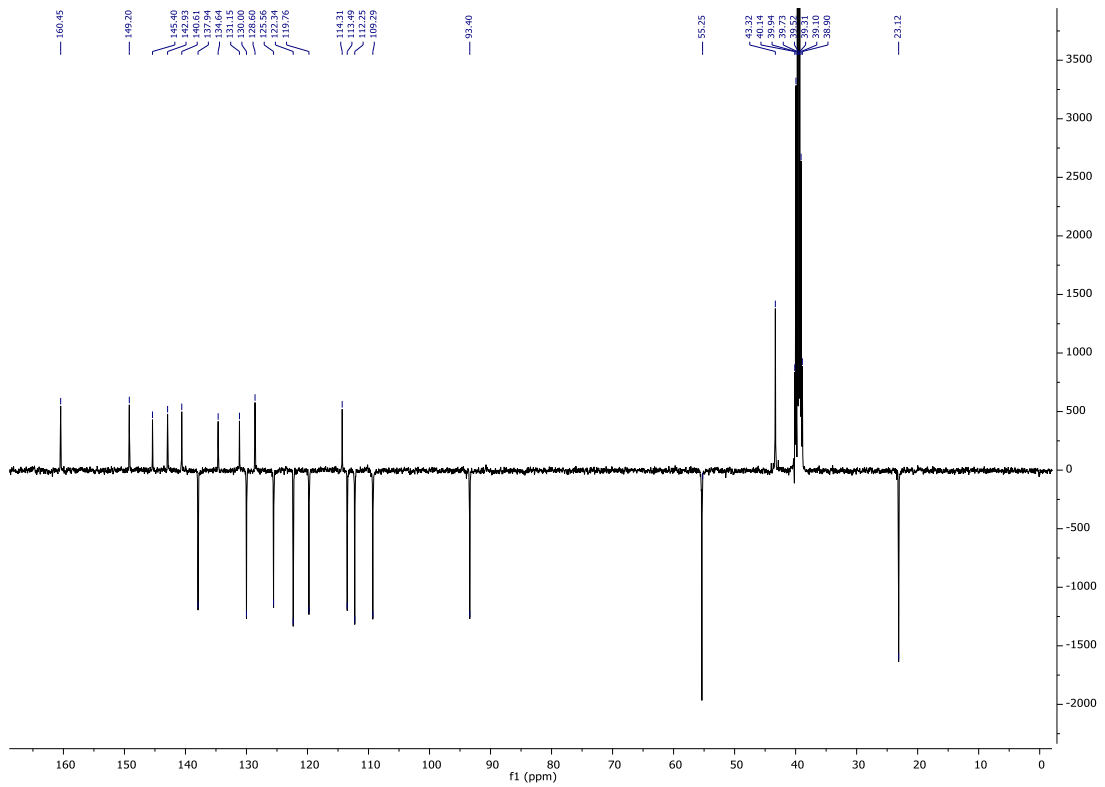


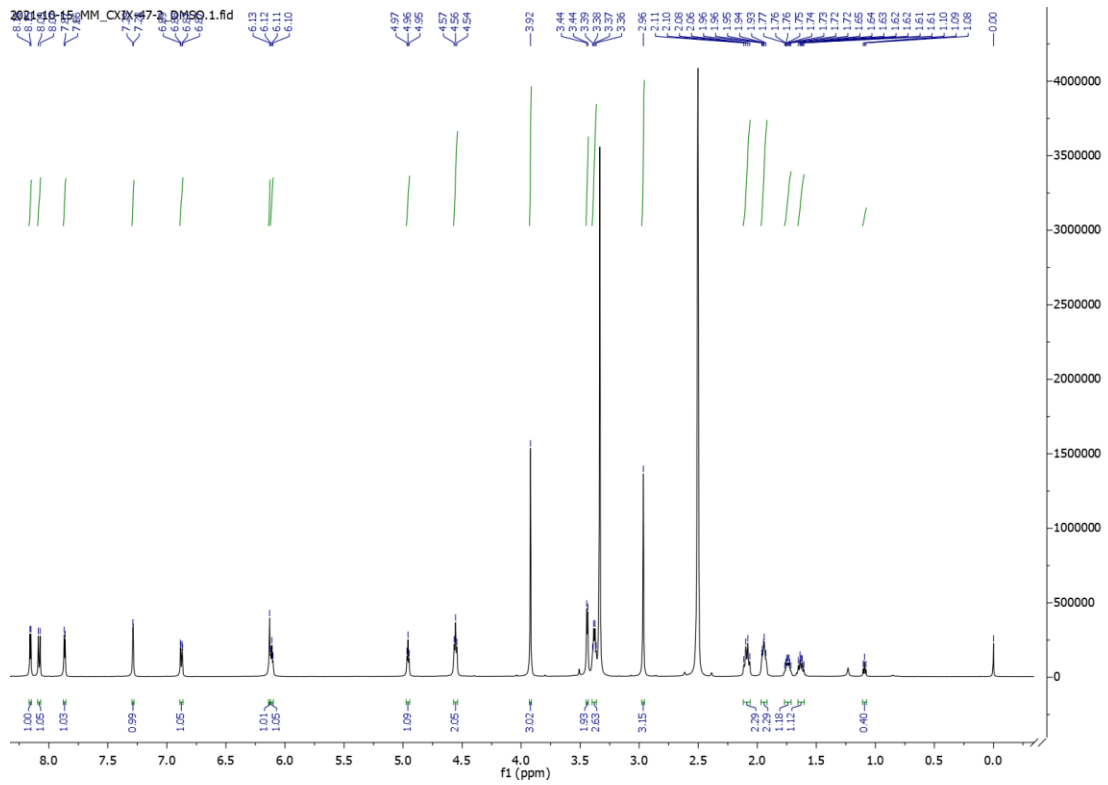
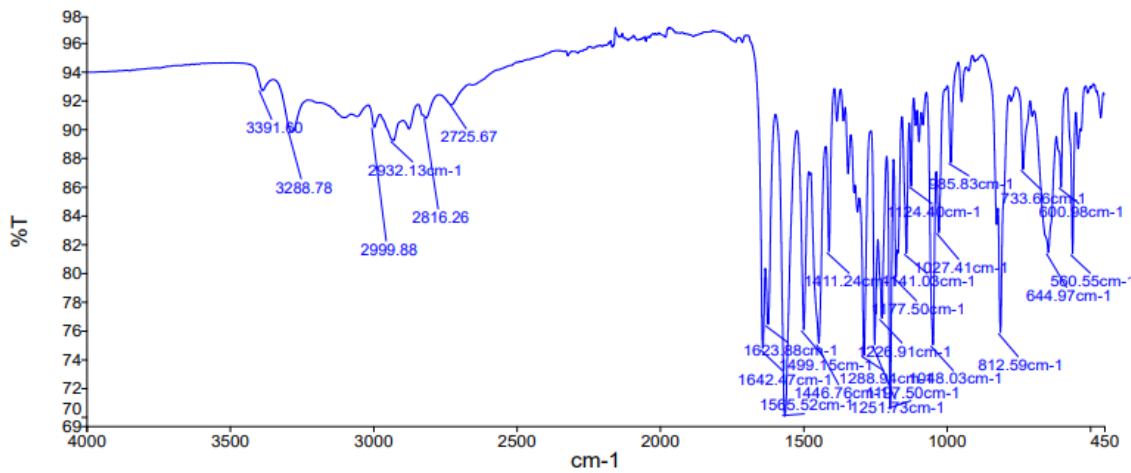
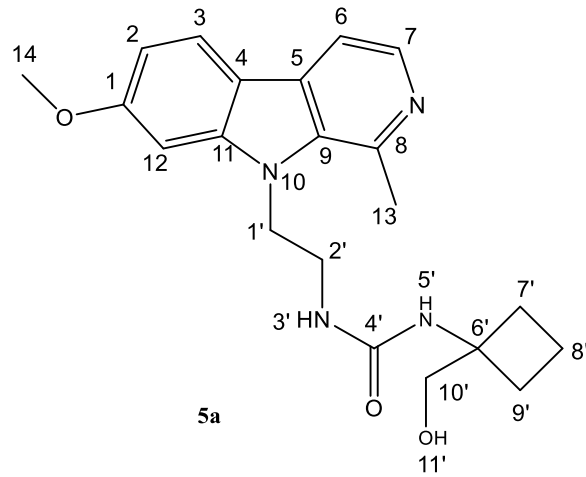


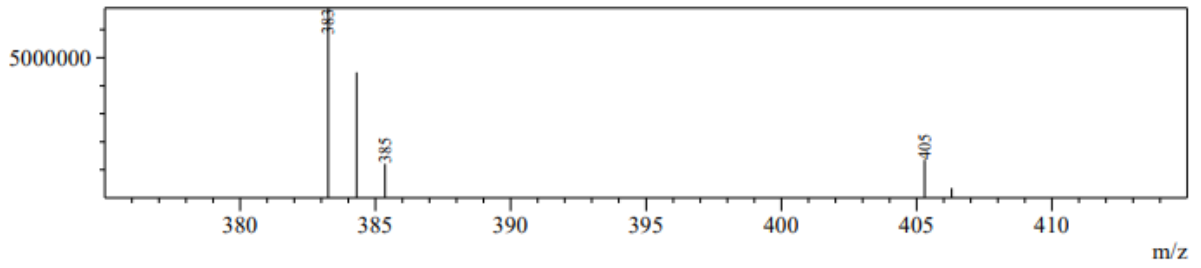
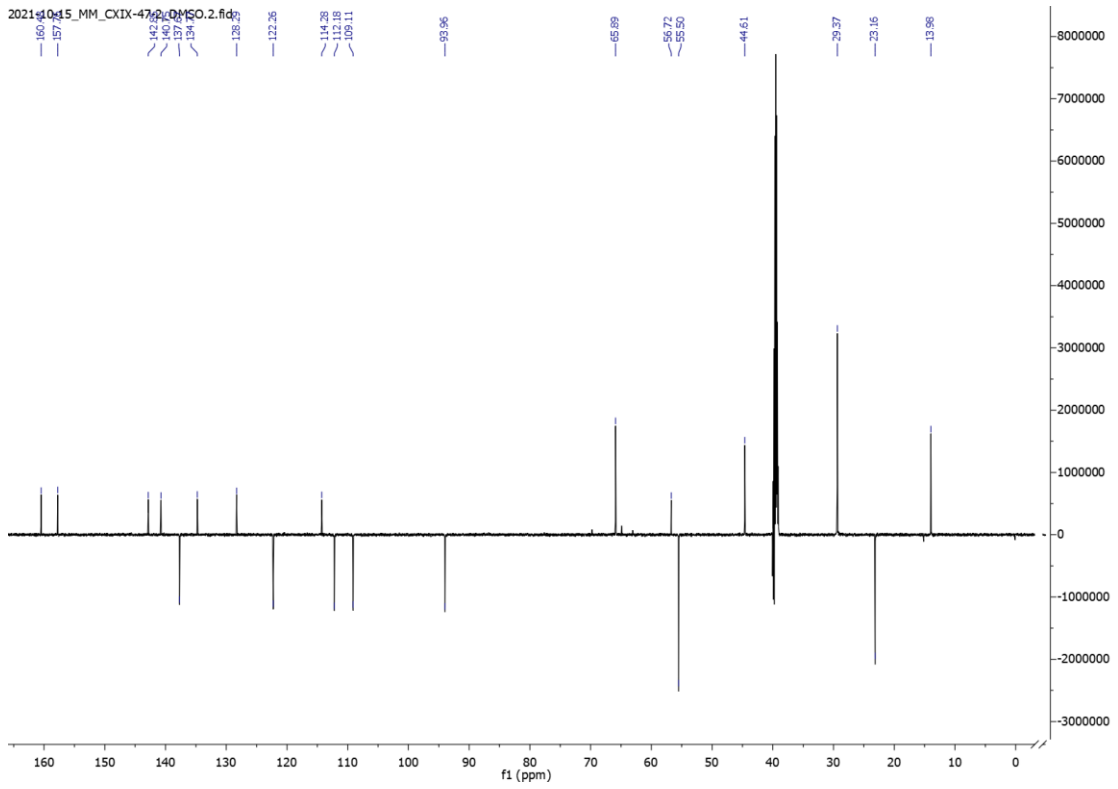


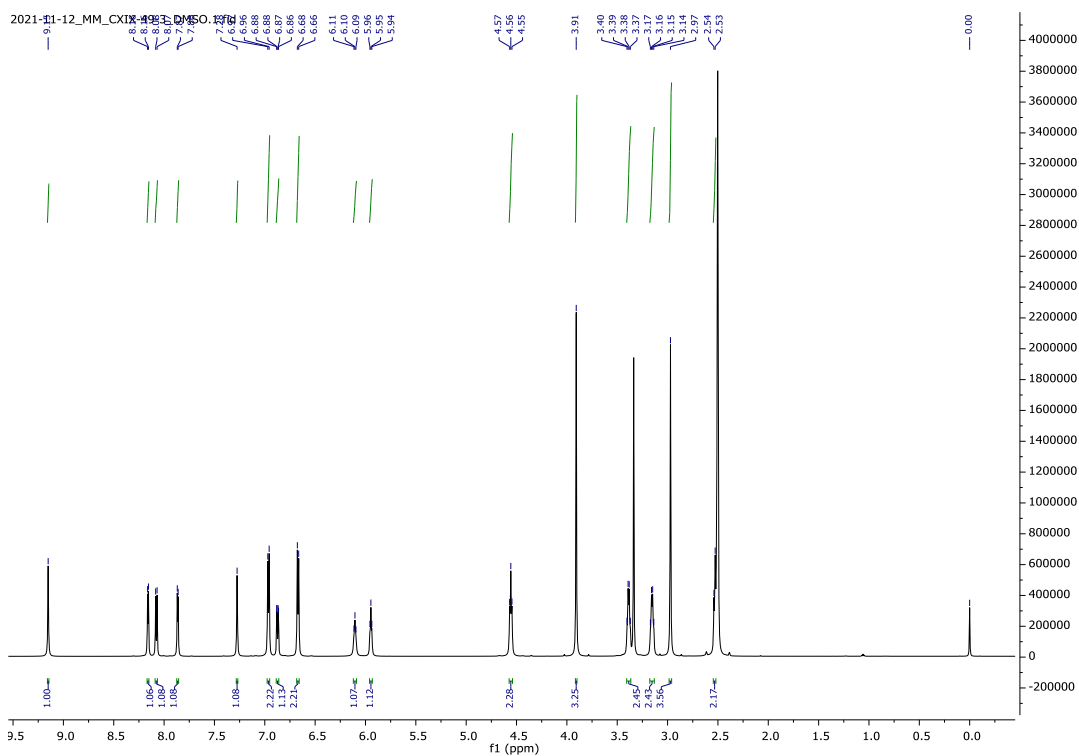
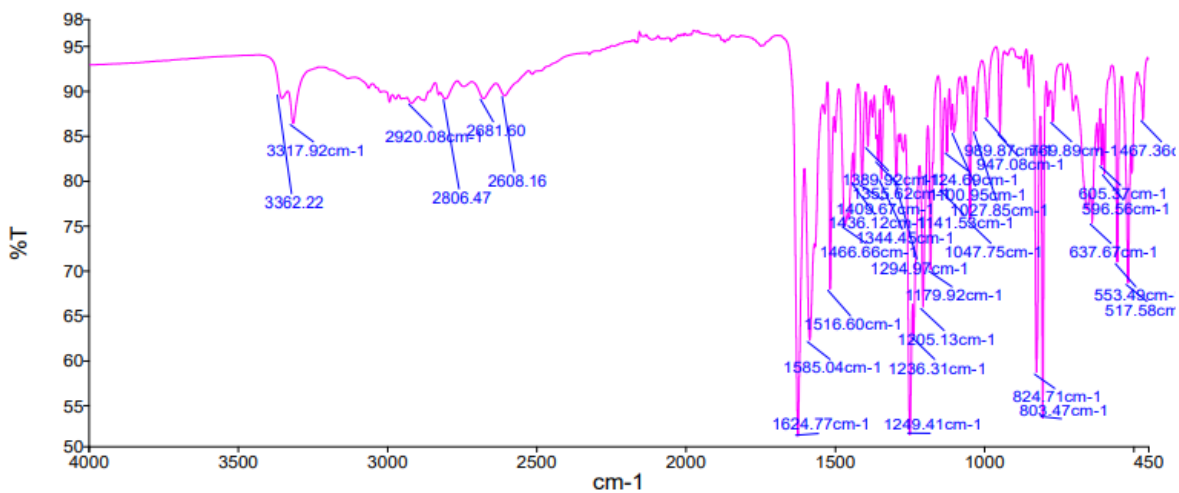
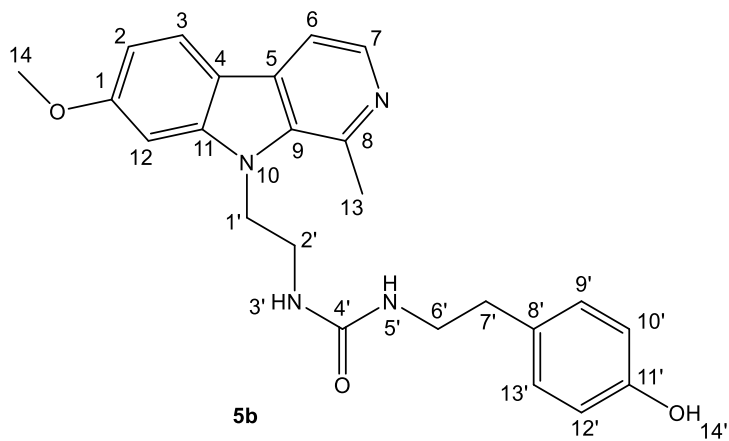


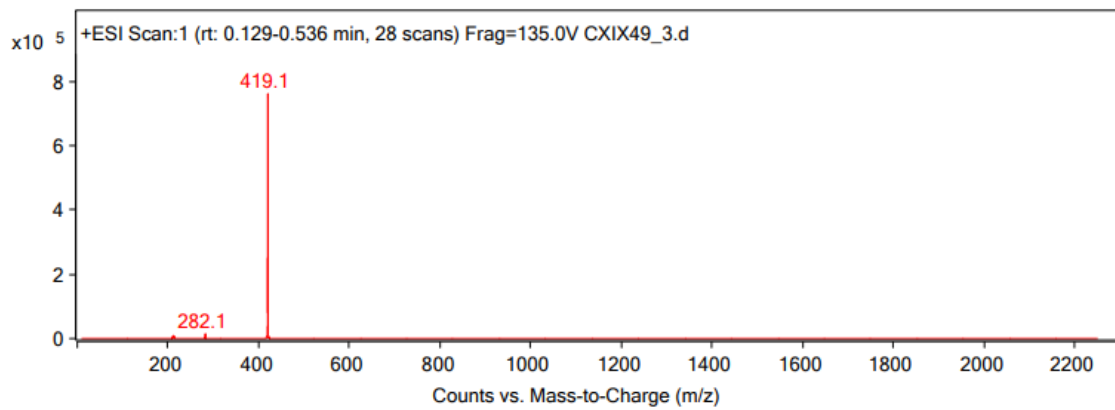
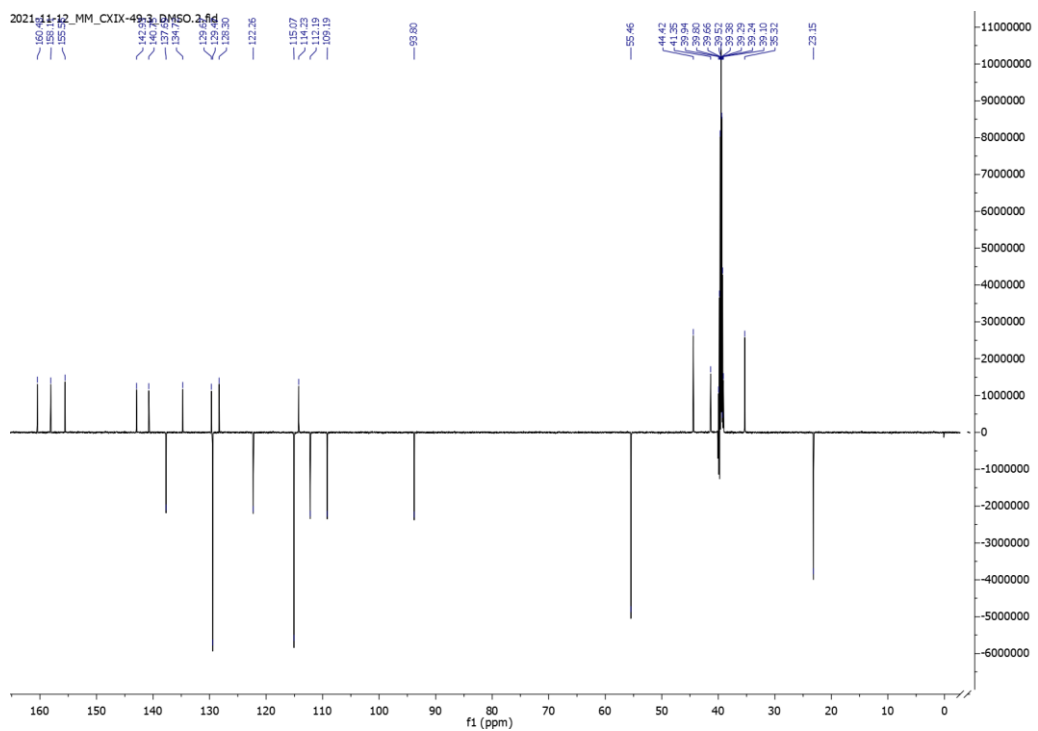












## **9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD**

## 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 UREA HARMINA I AMINOALKOHOLA

Ines Jurak

#### SAŽETAK

Harmin je  $\beta$ -karbolinski alkaloid prirodnog podrijetla koji je u mnogim istraživanjima pokazao brojne farmakološke učinke, uključujući i antimalarijsko djelovanje. Selektivnim inhibitornim djelovanjem na protein toplinskog šoka *P. falciparum* (PfHsp90) u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima uspješno je djelovao na parazita *P. falciparum*. Zbog specifičnog mehanizma djelovanja i mogućeg sinergizma s drugim lijekovima postoji značajan potencijal za smanjenje rezistencije na postojeću terapiju, koja je postala globalni javnozdravstveni problem. U okviru ovog rada sintetizirana su dva nova spoja, uree harmina s aminoalkoholima u položaju 9  $\beta$ -karbolinskog prstena (**5a,b**). Novosintetiziranim spojevima potvrđena je struktura te su okarakterizirani analitičkim i spektroskopskim metodama koje uključuju IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR te MS. Novim spojevima je također određena i temperatura tališta, a u kasnijim istraživanjima bit će im ispitano i antimalarijsko djelovanje.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 5 grafičkih prikaza, 3 tablice i 39 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: harmin, urea, malarija, aminoalkohol, benzotriazol.

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. Kristina Pavić**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Miranda Sertić**, izvanredna 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

Diploma thesis

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF UREA HARMINES AND AMINOALCOHOLS

Ines Jurak

#### SUMMARY

Harmine is a naturally occurring  $\beta$ -carboline alkaloid which was proven to have many pharmacological effects, including antimalarial. Harmine exhibited activity against *P. falciparum* in *in vitro* and *in vivo* studies, possibly due to its selective and inhibitory effect on *P. falciparum* heat shock protein (*PfHsp90*). Because of the specific mechanism of action and synergy with other antimalarials, harmine possesses a potential for lowering the incidence of resistance to the available drugs, which has become a global health burden. In this thesis two novel compounds were synthesised, harmine ureas with amino alcohols, **5a** and **5b**. The newly synthesized compounds have been characterized using spectroscopic and analytical methods, (IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS) and their melting point was determined. Future research will focus on evaluation of their antimalarial activity.

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

Thesis includes: 46 pages, 5 figures, 3 tables and 39 references. Original is in Croatian language.

Keywords: harmine, urea, malaria, aminoalcohol, benzotriazole.

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

**Kristina Pavić, Ph.D.** Postdoctoral associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Miranda Sertić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2022.