

Sinteza i karakterizacija hibrida artezunata i β -karbolina

Kravaršćan, Neva

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:361755>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

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



Neva Kravaršćan

**Sinteza i karakterizacija
hibrida artezunata i β -karbolina**

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 je u Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Zrinke Rajić.

Srdačno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Zrinki Rajić

što me svojim predavanjima zainteresirala za kolegij Farmaceutska kemija 1 i pružala mi stručno vodstvo, savjete i pomoć prilikom izrade ovog rada pomoću kojeg sam pobliže dobila sliku o načinu rada ovog područja farmacije.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na ugodnoj radnoj atmosferi i pomoći u laboratoriju, posebice Goranu Poje, mag. pharm. na uvodu u temu i laboratorijski rad te usvojenom znanju.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Malaria	2
1.1.1. Plazmodij.....	2
1.1.2. Simptomi i tipovi malarije.....	2
1.1.3. Prevencija malarije	3
1.1.4. Dijagnoza i liječenje malarije.....	4
1.2. Otkriće artemizininina	5
1.2.1. Karakteristike artemizininina	6
1.2.2. Derivati artemizininina.....	7
1.2.3. Mehanizam djelovanja	8
1.2.4. Borba protiv rezistencije na ACT.....	9
1.3. Spojevi β-karbolinskog tipa	10
1.3.1. Harmala alkaloidi	10
1.3.2. Harmin.....	11
1.3.3. Proteini toplinskog šoka	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Sinteza 6-metoksi-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2-ijevog trifluoracetata (1)	17
3.2. Sinteza 6-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (2).....	17
3.3. Sinteza 1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-6-ola (3)	18
3.4. Sinteza <i>tert</i> -butil (2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>] indol-6-il)oksi)etil)karbamata (4) ..	19
3.5. Sinteza 2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>] indol-6-il)oksi)etan-1-amina (5).....	19

3.6. Sinteza (3 <i>R</i> ,5 <i>aR</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>aR</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>S</i> ,12 <i>aS</i>)-3,6,9-trimetildekahidro-12 <i>H</i> -3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3- <i>i</i>]izokromen-10-il 4-((2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-6-il)oksi)etil)amin)-4-oksobutanoata (6)	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
5. ZAKLJUČAK	29
6. LITERATURA	31
7. SAŽETAK/SUMMARY	36
8. PRILOZI.....	39
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	42

KRATICE

ACN	acetonitril
ACT	kombinirana terapija koja uključuje artemizinin
Arg	arginin
ATP	adenozin trifosfat
CRP	C-reaktivni protein
CYP2B6	citokrom P450 2B6
DCC	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DCE	1,2-dikloretan
DCM	diklormetan
DHA	dihidroartemizinin
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
ESI-MS	ionizacija elektroraspršenjem spregnuta s masenom spektrometrijom
HATU	1-[<i>bis</i> (dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]piridinijev-3-oksid heksafluorofosfat
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC-MS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s masenom spektrometrijom
HRPII	protein bogat histidinom II
HsHsp90	humani protein toplinskog šoka 90
Hsp	proteini toplinskog šoka

IFN- γ	interferon gama
IL-10	interleukin deset
IR	infracrveno
Lys	lizin
m/z	masa iona prema nabojnom broju
MW	mikrovalno zračenje
<i>Pf</i> ATP6	adenozin trifosfat 6 vrste <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pf</i> Hsp90	protein toplinskog šoka 90 vrste <i>Plasmodium falciparum</i>
s.t.	sobna temperatura
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i> WHO)
t_t	temperatura tališta
TBAHS	tetrabutylamonijev hidrogen sulfat
TCTP	translacijski kontrolirani tumorski protein
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctena kiselina
TLC	tankoslojna kromatografija
TNF- α	faktor nekroze tumora alfa
TMS	tetrametilsilan
UDP	uridin difosfat
^1H NMR	^1H nuklearna magnetska rezonancija
^{13}C NMR	^{13}C nuklearna magnetska rezonancija

1. UVOD

1.1. Malarija

Malarija je infektivna vektorska bolest koja je tisućljećima prisutna među ljudskom populacijom. Nekada se smatralo da je uzrok bolesti loš zrak (tal. *mal aria*), ali danas je poznato da je uzrokuje parazit iz roda *Plasmodium* (Ma i sur., 2020; Hempelmann i Krafts, 2013). Prijenosnik, odnosno vektor bolesti ženka je komarca iz roda *Anopheles* (Rossati i sur., 2016). Postoje i manje značajni, posredni načini prijenosa bolesti: intrauterino sa zaražene majke na nerođeno dijete, preko transfuzije zaražene krvi ili dijeljenjem kontaminiranih igala prilikom zlouporabe narkotika (Nadjm i sur., 2012; <https://www.mayoclinic.org>).

Malarija pogađa najugroženiji sloj društva u zemljama Trećeg svijeta (White, 2008). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2021. godine, u svijetu je u 2020. godini od malarije oboljelo 241 milijun osoba, a od posljedica komplikacija bolesti preminulo je 627 000 osoba (WHO, 2021). Najzahvaćeniji prostori su područja jugoistočne Azije, istočnog dijela Mediterana, Srednje i Južne Amerike, Oceanije te subsaharske Afrike na koju se odnosi oko 95 % svih zabilježenih slučajeva malarije u svijetu (<http://www.who.int/malaria/en/>; WHO, 2021).

1.1.1. Plazmodij

Danas je poznato više od sto različitih vrsta roda *Plasmodium*, ali samo njih pet može uzrokovati malariju u čovjeka: *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* i *P. falciparum*, koji ujedno uzrokuje i najteži oblik malarije (Tu, 2016). Navedene vrste razlikuju se po biološkim i morfološkim karakteristikama i po odgovoru na pojedine vrste danas poznatih antimalarijskih lijekova. Međutim, svaka vrsta prolazi kroz iste faze razvojnoga ciklusa. Spolna faza se odvija unutar ženke komarca *Anopheles*, dok se nespolna faza odvija unutar zaraženog pojedinca (Vuk i sur., 2008). Svi stadiji plazmodija su u ljudskom organizmu prisutni unutar hepatocita ili eritrocita što im pruža zaštitu od ljudskog imunosnog sustava, što otežava razvoj učinkovitog cjepiva i liječenje (Tu, 2016).

1.1.2. Simptomi i tipovi malarije

Prvi simptomi malarije, s obzirom na vrstu plazmodija i vrijeme inkubacije, najčešće se javljaju tjedan dana nakon infekcije (Garcia, 2010). Imunosni sustav zaraženog pojedinca aktivira se s napredovanjem životnog ciklusa pojedine vrste plazmodija. Rupturu hepatocita te

kasniju rupturu eritrocita prati porast proupalnih faktora, između ostalih TNF- α , CRP-a, IL-10 te IFN- γ , što se u konačnici manifestira kao simptomi malarije (Milner, 2018).

Nekomplicirani oblik malarije karakterizira zimica, osjećaj slabosti i nespecifična rekurentna vrućica (White, 1996). Vrućicu koja se pojavljuje u okviru 48 sati, a danas se povezuje s infekcijom *P. vivax*, starogrčki liječnik Hipokrat nazvao je benigna tercijarna vrućica, a onu koja se javlja svakih 72 sati te je uzrokovana *P. malariae*, kvartalna vrućica (Garcia, 2010; Hempelmann i Krafts, 2013). Od ostalih simptoma mogu se pojaviti gastrointestinalne tegobe te blaga anemija (White, 1996). *P. falciparum* uzrokuje teški multisistemski oblik malarije tzv. malignu tercijarnu vrućicu i stvara adhezivni fenotip zbog mogućnosti promjene površine zaraženih eritrocita (Garcia, 2010; Grau i Craig, 2012). Adhezijom za endotel krvnih žila dolazi do koagulopatije i cirkulacijskog šoka (Grau i Craig, 2012; White, 1996).

Stupanj težine malarije korelira s brojnošću parazita u čovjeka (White, 1996). Progresijom bolesti u kratkom vremenskom periodu dolazi do zatajenja bubrega, rupture jetre i slezene, encefalopatije te problema s disanjem uzrokovanih plućnim edemom. Moguće komplikacije još uključuju i hipoglikemiju, žuticu, ozbiljnu anemiju i acidozu. Do cerebralne malarije i kome može doći ako parazit prijeđe krvno moždanu barijeru i uđe u mozak.

Nemogućnost primjene odgovarajućeg antimalarika, ozbiljna disfunkcija vitalnih organa i veliki broj parazita u organizmu povećavaju vjerojatnost smrtnog ishoda (White, 1996; Milner, 2018; Bartoloni i Zammarchi, 2012; www.mayoclinic.org).

1.1.3. Prevencija malarije

Agencije za kontrolu i prevenciju bolesti imaju ujednačene upute vezano za malariju u skladu sa smjernicama SZO. Po preporuci treba izbjegavati putovanje u visokorizične države ili se pravovremeno informirati kako bi prevencija bila što uspješnija (WHO, 2022). Prevencija se sastoji od kemoprofilakse i zaštite od uboda komarca. Putnicima te djeci i trudnicama zaraženih područja predlaže se uporaba odgovarajućeg antimalarika (npr. kombinacija sulfadoksina i pirimetamina, atovakvona i progvanila, amodiakina uz sulfadoksin i pirimetamin, klorokin ili hidroksiklorokin, doksiciklin, meflokin, primakin ili tafenokin) u profilaktičke svrhe (<https://wwwnc.cdc.gov>; WHO, 2022). Poželjno je nositi odjeću dugih rukava, koristiti repelente i larvicide, a krevete zaštititi mrežama impregniranim insekticidima. Trebalo bi izbjegavati noćno izlaženje jer su komarci iz roda *Anopheles* najaktivniji noću (<https://wwwnc.cdc.gov>; <https://www.nhs.uk>; <https://ecdc.europa.eu>). Unatoč naporu uloženom

u pronalazak cjepiva, RTS,S/AS01 (Mosquirix™) je zasad jedino cjepivo preporučeno od strane SZO. Namijenjeno je djeci umjerenih do visokorizičnih područja s ciljem prevencije malarije uzrokovane *P. falciparum* (<https://www.ema.europa.eu>; WHO, 2022).

1.1.4. Dijagnoza i liječenje malarije

Odgadanje dijagnoze i liječenja predstavlja glavni uzrok smrti od malarije. Kako pravovremenu kliničku dijagnostiku otežava nespecifičnost simptoma, potrebno je laboratorijskim testovima dokazati prisutnost parazita za potvrdu dijagnoze. Zlatni standard za potvrđivanje potencijalnog slučaja malarije je parazitološka pretraga mikroskopom ili brzim dijagnostičkim testom. Rezultati takvog testiranja trebaju biti gotovi unutar 2 sata kako bi se na vrijeme moglo krenuti s liječenjem (WHO, 2022).

Liječenje nekomplikirane malarije sastoji se od simptomatskog liječenja te sprječavanja progresije bolesti. Odabir antimalarika za liječenje ovisi o dobi pacijenta, vrsti uzročnika, ozbiljnosti simptoma te prisutnosti trudnoće (<https://www.mayoclinic.org>). Oboljelima od teškog oblika malarije treba biti dostupan najučinkovitiji lijek, svakodnevna njega te primjena intravenskih antimalarika (WHO, 2022).

Antimalarici se kemijski klasificiraju kao:

- 4-supstituirani kinolini : kinin, klorokin, piperakin, amodiakin, meflokin
- 8-aminokinolini : primakin, tafenokin, bulakin
- bigvanidi : progvanil (kombinacija s atovakvonom)
- diaminopiridini : pirimetamin (kombinacija sa sulfadoksinom)
- seskviterpenski laktoni : artemizinin, artemeter, artezunat
- ostali : halofantrin, lumefantrin, pironaridin, doksiciklin (Makoah i Pradel, 2013).

Zaraza *P. falciparum* predstavlja veliki javnozdravstveni problem u visokorizičnim područjima zbog visoke stope morbiditeta i mortaliteta (Laurens, 2020). Prvu liniju liječenja čini kombinirana terapija koja uključuje artemizinin (engl. *artemisinin-combination therapy*, ACT), koja podrazumijeva istovremenu primjenu brzodjelujućeg visokoučinkovitog artemizininina ili njegovog derivata, sa sporodjelujućim partnerskim lijekom tijekom 3 dana. Primjena artemizininina dovodi do uništenja većine parazita tijekom nekoliko dana, dok partnerski lijek uklanja preostale parazite. Izbjegavanjem monoterapije artemizininima smanjuje se rizik razvijanja rezistencije koja predstavlja problem u liječenju malarije (WHO, 2022; Fairhurst i Dondorp, 2016).

1.2. Otkriće artemizina

Malarija je liječena klorokinom i kinolinima sve do 60-ih godina prošlog stoljeća, odnosno do pojave rezistencije koja je otežala i usporila eradikaciju malarije. Vijetnamski rat uzrokovao je porast broja umrlih od malarije te povećao potrebu za pronalaskom novog antimalarika (Tu, 2016).

Sinteza i karakterizacija novog antimalarika postaje politička dužnost za kineske znanstvenike koji 1964. godine počinju raditi na povjerljivom znanstvenom projektu. Kako prve godine rada nisu donijele rezultate, promijenjen je pristup otkrivanju novog antimalarika te se projektu kao pomoć pridružila Tu Yoyou, članica Instituta kineskog medicinskog znanja na Akademiji tradicionalne kineske medicine (Tu, 2016). Institut predstavlja jednu od najstarijih kineskih nacionalnih institucija koja proučava tradicionalni pristup medicini (www.icmm.ac.cn). Pregledavanjem zapisa tradicionalne kineske medicine, prikupljeno je više od 2000 prirodnih produkta koji su predstavljali potencijalne kandidate za novi lijek. Na temelju ispitivanja, Tu Youyou je provela selekciju i smanjila taj broj te je naposljetku objedinila 640 recepata u brošuri namijenjenoj daljnjoj obradi.

Većina propisa za obradu biljnih droga nalaže obradu postupkom dekokcije. Ispijanjem pripravljenoga dekokta nastupa olakšanje simptoma. Takva obrada je primijenjena na početku ispitivanja „*Qinghao*“ 1971. godine, ali bez rezultata. Kasnije je utvrđeno kako je visoka temperatura ključale vode najvjerojatnije razgradila aktivne komponente „*Qinghao*“ prilikom dekokcije (Tu, 2016). Kineski filozof i liječnik Ge Hong, prvi u povijesti medicine savjetuje upotrebu „*Qinghao*“ za liječenje isprekidane vrućice, a u svome djelu predlaže i drugačiji način obrade koji glasi „Šaku *Qinghao* namakati u dvije litre vode, sok iscijediti i cijelog ga popiti.“ (Hsu, 2006; Ma i sur., 2020). Na temelju toga, Tu Youyou je promijenila tijekom pokusa provodeći odvojenu ekstrakciju listova i stabljike „*Qinghao*“ na nižoj temperaturi pomoću vode, etanola i etil-etera. Tako dobiveni ekstrakt potom je pročistila lužnatom otopinom radi uklanjanja kiselih onečišćenja. Dobivena neutralna frakcija tzv. uzorak br. 191. pokazao je 100 %-tnu učinkovitost prilikom primjene u malaričnim glodavcima i majmunima (Tu, 2016).

Usprkos pritužbama na uvjete rada i neučinkovite sustave ventilacije, 1972. godine uspješno je provedeno prvo kliničko ispitivanje uzorka br. 191, a iz neutralne frakcije „*Qinghao*“ izolirana je aktivna sastavnica antimalarijskog djelovanja nazvana artemizinin (Tu, 2016). Tu Youyou (Slika 1) podsjetila je znanstvenu zajednicu na potencijal tradicionalne kineske

medicine, a njena predanost i cjeloživotna posvećenost nagrađena je Nobelovom nagradom za fiziologiju i medicinu 2015. godine (www.nobelprize.org).



Slika 1. Tu Youyou

(preuzeto sa <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/tu/facts/>)

1.2.1. Karakteristike artemizininina

Artemizinin je kristalinična bezbojna tvar molekulske formule $C_{15}H_{22}O_5$, bez atoma dušika u strukturi što je razlika u odnosu na antimalarike primjenjivane prije njegovog otkrića (Ma i sur., 2020). Karakterizacija molekule artemizininina bila je izazovna zbog strukturne specifičnosti.

Masenom spektrometrijom (MS) visoke rezolucije potvrđena je struktura seskviterpena, C_{15} terpenoida građenog od tri izoprenske jedinice (Awouafack i sur., 2013; Ma i sur., 2020). Infracrvenom (IR) spektroskopijom dokazana je prisutnost endoperoksidnog mosta (Ma i sur., 2020). Nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR) i difrakcijom X-zraka, prvi put korištenom u Kini s ovom namjenom, definirana je struktura i relativna konfiguracija molekule (Ma i sur., 2020; Tu, 2016). *Trans*-konfiguracija laktonskog prstena i apsolutna konfiguracija artemizininina, konačno su utvrđene 1979. godine (Ma i sur., 2020).

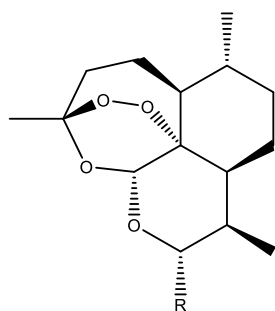
Funkcionalne skupine u artemizininu definirane su kemijskom modifikacijom endoperoksidne i karbonilne skupine u molekuli. Vodotopljiviji dihidroartemizinin (DHA) dobiven je redukcijom karbonilne skupine artemizininina, a deoksiartemizinin endoperoksidne skupine. Posljednjem spoju nije dokazan antimalarijski učinak što upućuje da je endoperoksidna skupina odgovorna za antimalarijsko djelovanje (Tu, 2016).

Reakcijama metaboličke biotransformacije u najvećoj mjeri posredovane CYP2B6, nastaju inaktivni metaboliti putem kojih se artemizinin eliminira s vremenom polueliminacije 2-5 sati nakon oralne primjene i 0-6 sati nakon rektalne primjene (Gautam i sur., 2009; White, 2008; de Vries i Dien, 1996).

1.2.2. Derivati artemizininina

Redukcijom karbonilne skupine dobiveni su derivati artemizininina (Slika 2) koje karakterizira različita topljivosti u vodi i lipidima te promijenjena bioraspodivnosti što je predstavljalo rješenje problema netopljivosti artemizininina u vodi nakon peroralne primjene (Adebayo i sur., 2020; de Vries i Dien, 1996).

Artezunat je vodotopljiviji sukcinatni ester DHA, najčešće primijenjen oralno osim kod teškog oblika malarije, kada se primjenjuje intravenski, intramuskularno ili rektalno. Vrijeme polueliminacije intravenskog oblika je 45 minuta, a nakon oralne primjene, potrebno je 20-45 minuta da se hidrolizira pomoću esteraza u DHA (Afolabi i Okoromah, 2004; Adebayo i sur., 2020). Arteeter je lipofilni etilni eter DHA, registriran za intramuskularnu primjenu u liječenju teškog oblika malarije u Indiji i Nizozemskoj (www.medindia.net). Za razliku od ostalih derivata artemizininina, ima znatno dulje vrijeme polueliminacije od 20 sati te ga karakterizira veća stabilnost. Potrebno je još kliničkih ispitivanja da se potvrdi njegova sigurnost (Afolabi i Okoromah, 2004). Artemeter je lipofilni metilni eter DHA, najčešće primijenjen intramuskularno s vremenom polueliminacije 3–11 sati (de Vries i Dien, 1996).



R	Naziv molekule
OH	dihidroartemizinin
OCH ₃	artemeter
OCH ₂ CH ₃	arteeter
OCO(CH ₂) ₂ COOH	artezunat

Slika 2. Opća formula artemizinina

Artemizinin, artezunat, artemeter i arteeter se u jetri metaboliziraju u DHA, aktivni oblik koji ispoljava 10 puta jače antimalarijsko djelovanje od artemizinina (Navaratnam i sur., 2000; Teja-Isavadharm i sur., 2001; Gautam i sur., 2009, Tu, 2016). DHA se metabolizira reakcijom glukuronidacije uz UDP-glukuronil transferazu u inaktivni oblik koji se eliminira urinom, a manji dio glukuronida DHA se eliminira putem žuči (Ilett i sur., 2002).

Karakteristike nabrojanih derivata artemizinina danas se nastoje unaprijediti kemijskom modifikacijom i stvaranjem hibrida s ciljem nadvladavanja rezistencije (Adebayo i sur., 2020).

1.2.3. Mehanizam djelovanja

Plazmodij tijekom eritrocitne faze iskorištava i razgrađuje hemoglobin domaćina kao izvor potrebnih aminokiselina. Pritom kao nusprodukt nastaje toksičan hem. Polimerizacijom hema u hemozoin pomoću translacijskog kontroliranog tumorskog proteina (TCTP) i proteina bogatog histidinom II (HRPII), *P. falciparum* izbjegava stanje potencijalnog oksidativnog stresa (Adebayo i sur., 2020; Meunier 2008).

Artemizinin stupa u interakciju s Fe²⁺ ionima koji se unutar inficiranih stanica nalaze izvan razgrađenog hemoglobina. Razlog selektivne toksičnosti artemizinina i njegovih derivata leži upravo u Fe²⁺ ionima koji se u neinficiranim stanicama nalaze unutar hemoglobina te iz toga razloga ne mogu reagirati s artemizininom (Gautam i sur., 2009; Meshnick, 2002). Redukcijom endoperoksidnog mosta s Fe²⁺ ionima nastaju slobodni radikali artemizinina i Fe³⁺ hematin. Nastali radikali potiču stvaranje novih reaktivnih elektrofilnih specija koje uzrokuju lipidnu peroksidaciju membrane inficiranih stanica, alkilaciju DNA molekula, TCTP-a i HRPII-a te poprečno povezivanje biomolekula što sveukupno rezultira smrću

inficirane stanice (Adebayo i sur., 2020; Bhisutthibhan i sur., 1998; Gautam i sur., 2009; Ma i sur., 2020; Meshnick, 2002).

Uz opisani mehanizam djelovanja, razmatra se interakcija i inhibicija *Pf*ATP6 kalcijeve pumpe u membrani endoplazmatskog retikuluma čime se narušava homeostaza unutarstanične razine kalcijevih iona (Adebayo i sur., 2020; Shandilya i sur., 2013).

Artemizinini, osim antimalarijskog djelovanja, pokazuju učinak i na rane stadije trematoda, krvnog metilja i jetrenog metilja. Također, zbog inhibicije angiogeneze i rasta određenih humanih tumorskih staničnih linija, ispituje se njihova prenamjena za liječenje raka (White, 2008).

1.2.4. Borba protiv rezistencije na ACT

Svjetska zdravstvena organizacija od 2001. godine preporučuje primjenu ACT u terapiji malarije čime pouzdani, visokoučinkoviti i niskotoksični lijekovi - artemizinin, DHA, artemeter i artezumat postaju prvi izbor liječnika (de Vries i Dien, 1996; Miller i Su, 2011; White, 2008; WHO, 2022). Prednost ove skupine antimalarika u odnosu na druge predstavlja brzo uklanjanje parazita iz organizma što je ključno u slučajevima cerebralne i teškog oblika malarije (Hsu, 2006). Farmakokinetika artemizininina i njegovih derivata najvjerojatnije je odgovorna za sporiji razvoj rezistencije, a tome su također pridonijeli kombinirana terapija te djelovanje na veći broj meta (Meshnick, 2002).

Rezistencija na artemizinin manifestira se sve sporijom eliminacijom parazita iz organizma, a uzrok rezistencije leži u mutaciji na genskom lokusu za protein kelch 13 (Fairhurst i Dondorp, 2016). Rastuća prisutnost *P. falciparum* otpornog na artemizinin utvrđena je u zemljama podregije Veliki Mekong koja obuhvaća Kambodžu, Laos, Mjanmar, Tajland, Vijetnam i Kinu, a također je proširen i izvan nje na područjima Nigerije, Madagaskara, Indije i Sjere Leone (Adebayo i sur., 2020). Zbog zabrinutosti po tom pitanju, SZO 2011. i 2013. godine izdaje sistematiziran pristup kontrole, liječenja i suzbijanja pojave i širenja malarije, čime se nastoji nadvladati razvijanje rezistencije (Tu, 2016). Usprkos naporima, rezistentan *P. falciparum* se proširio duž cijele podregije Veliki Mekong zbog čega je SZO izdala strategiju za suzbijanje malarije na navedenom području u razdoblju 2015.-2030. godina (Fairhurst i Dondorp, 2016).

Realizacija ciljeva trenutno je otežana. Iako je u razdoblju 2015.-2019. godine zabilježeno smanjenje smrtnosti za 18 %, to je malo u usporedbi sa željenim smanjenjem od 40 %.

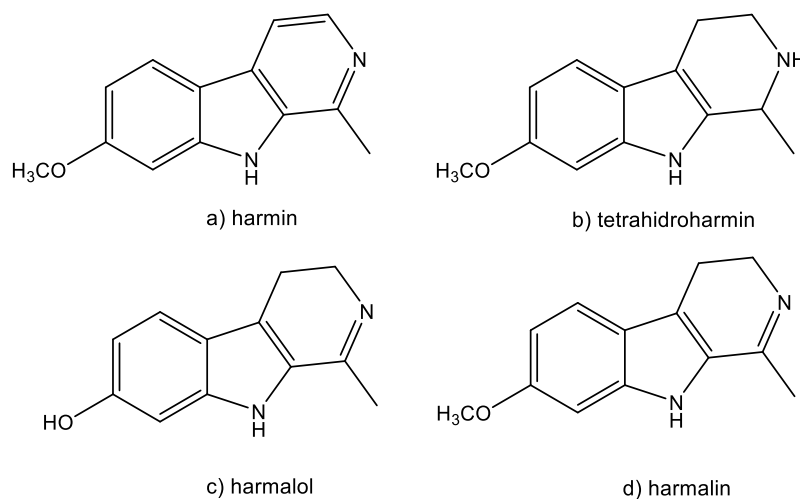
Konačan cilj smanjenja za najmanje 90 % do 2030. u opisanim okolnostima čini se neizvediv (<https://www.who.int>).

1.3. Spojevi β -karbolinskog tipa

β -Karbolini pripadaju skupini strukturno sličnih indolskih alkaloida prisutnih u različitim biljnim i životinjskim vrstama. Osim prirodnog izvora, β -karbolinski prsten moguće je sintetizirati Pictet-Spenglerovom reakcijom (Konjevod i sur., 2021). Pictet-Spenglerova kondenzacija podrazumijeva reakciju triptamina ili njegovih derivata i aldehida u prisutnosti jake kiseline. Oksidacijom sintetiziranog tetrahidro- β -karbolina nastaje β -karbolin. Zbog dugotrajnosti procesa, razvijena je metoda sinteze u mikrovalnom reaktoru čime je znatno ubrzan tijek reakcije (Eagon i Anderson, 2014).

Piridinski prsten, uz indolsku osnovu, sadrži atom dušika čiji je karakter bazičniji od kiselijeg indolskog dušika. S obzirom na stupanj nezasićenosti razlikuju se dihidro, tetrahidro ili aromatski β -karbolin. Ovisno o pH vrijednosti i vrsti otapala ionska forma β -karbolina može biti kation, zwitterion, anion i neutralna forma (Konjevod i sur., 2021).

1.3.1. Harmala alkaloidi



Slika 3. Strukturne formule harmala alkaloida

Nazivom harmala alkaloidi objedinjena je skupina β -karbolinskih spojeva koju čine harmin, harmalin, harmalol i tetrahydroharmin (Slika 3). Karakterizira ih metilni supstituent u položaju C1, metoksi ili fenolna skupina u položaju C7 te različiti stupanj zasićenosti piridinskog

prstena. U usporedbi s drugim β -karbolinskim spojevima, farmakološko djelovanje harmala alkaloida najbolje je istraženo i prisutno u različitim terapijskim područjima (Konjevod i sur., 2021).

1.3.2. Harmin

Harmin je β -karbolinski alkaloid izoliran iz sjemenke sirijske rutvice, *Peganum harmala* L., višegodišnje biljke koja raste u sušnim područjima srednjeg Istoka i Kine i primjenjuje se tradicionalnoj medicini Bliskog Istoka, Indije, Kine i Afrike (Zhang i sur., 2020; Ibraheem i sur., 2015). Ekstrakt sjemenki sirijske rutvice je prepoznat kao učinkovit lijek protiv malarije (Konjevod i sur., 2021). Tijekom potrage za novim antimalaricima uočen je potencijal harmina i njegovih derivata. Ispitivanja su potvrdila selektivno vezanje harmina za protein toplinskog šoka *P. falciparum* (PfHsp90) u odnosu na humani protein toplinskog šoka (HsHsp90), kao i njegovo antimalarijsko djelovanje (Shahinas i sur., 2010).

1.3.3. Proteini toplinskog šoka

Proteini toplinskog šoka (Hsp) pripadaju skupini visoko konzerviranih molekularnih šaperona koji su konstitutivno eksprimirani u organizmu. Međutim, razina ekspresije se može povećati prilikom izloženosti stresu poput promjene pH ili temperature s ciljem bolje prilagodbe (Neckers i Tatu, 2008). Iz toga razloga dolazi do promjene ekspresije Hsp90 prilikom prelaska plazmodija iz komarca u čovjeka zbog temperaturne razlike od 10 °C (Acharya i sur., 2007).

Šaperoni imaju ključnu ulogu u normalnoj metaboličkoj aktivnosti stanica jer su zaslužni za pravilno smatanje proteina, odvijanje unutarstaničnog prometa proteina, pravilnu ekspresiju gena, diferencijaciju stanica te pravilan staničan ciklus. Na N-terminalnoj domeni sadrže ATP-veznu domenu ključnu za interakciju s ciljnim proteinima. Usprkos velikom postotku homologije, prikladnost ATP-vezne domene kao mete djelovanja leži u strukturnoj i funkcionalnoj različitosti PfHsp90 i HsHsp90 (Bayih i sur., 2016).

Smatra se da C6 metoksi skupina harmina stupa u interakciju s gvanidinskom skupinom arginina koja je konzervirana među parazitskim Hsp90, iako nema značajniju ulogu u ATP-aznoj aktivnosti domene. Zbog prisutnosti fenolne skupine u položaju C6, harmalol se neselektivno veže i za ATP-vezni džep HsHsp90 polarnim interakcijama s lizinom. Planarna

konformacija omogućuje harminu i harmalolu dobro uklapanje u hidrofobno i bazično okruženje ATP-veznog džepa Hsp90. Međutim, harmin stupa u specifičniju interakciju s užim i hidrofobnijim ATP-veznim džepom *PfHsp90* u odnosu na *HsHsp90* zbog metoksi skupine u položaju C6 (Shahinas i sur., 2012).

Inhibicijom *PfHsp90* onemogućuje se pravilno smatanje proteina čime oni ne poprimaju pravilnu konformaciju te kao nefunkcionalni proteini bivaju razgrađeni proteasomom (Bayih i sur., 2016; Shahinas i sur., 2013). Utvrđeno je da degradacijom proteina dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze stanica raka zbog čega se spektar djelovanja inhibitora Hsp90 nastoji iskoristiti i za liječenje drugih bolesti poput malarije (Shahinas i sur., 2013). Ispitivanjima je potvrđeno selektivno inhibitorno djelovanje analoga harmina i sinergizam s postojećim antimalaricima poput klorokina i artemizina (Shahinas i sur., 2012). Na mišjem modelu malarije, utvrđen je značajan pad parazitemije prilikom primjene analoga harmina i DHA u usporedbi s monoterapijom DHA (Bayih i sur., 2016).

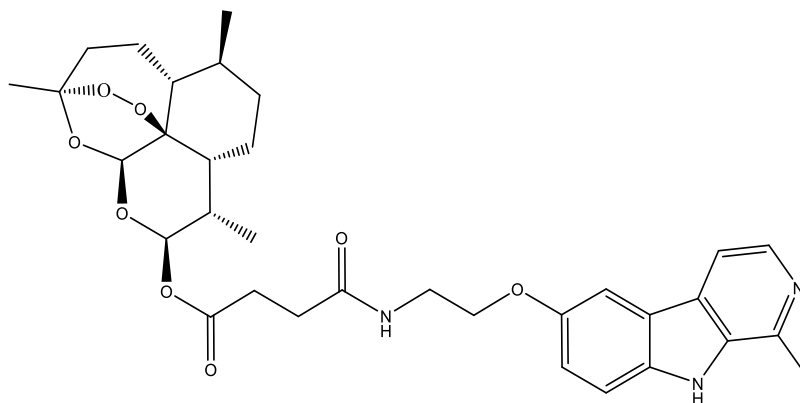
2. OBRAZLOŽENJE TEME

Malarija je jedna od najstarijih i najsmrtonosnijih bolesti uzrokovanih parazitima. Unatoč velikim naporima, suzbijanje bolesti otežano je razvojem rezistencije *P. falciparum* na postojeću terapiju, a zadnjih godina i usporeno zbog izbijanja pandemije COVID-19.

Otkriće artemizininina označilo je prekretnicu u terapiji malarije jer se ovaj spoj mehanizmom djelovanja, brzinom nastupanja učinka, kao i eliminacijom iz organizma, razlikuje od bilo kojeg drugog antimalarika. Unatoč pojavi rezistencije, artemizininini i dalje predstavljaju najbolje terapijsko rješenje u kombiniranoj terapiji.

Hibridne molekule se definiraju kao kemijski entitet dviju ili više kovalentno povezanih “roditeljskih” molekula. Budući da sadrže barem dva farmakofora koji djeluju na istu ili različite mete, hibridne molekule ostvaruju dvojako djelovanje (Meunier, 2008).

Cilj ovog diplomskog rada bio je sintetizirati i okarakterizirati novu hibridnu molekulu u kojoj će dva farmakofora, β -karbolin i artezunat, biti povezani amidnom vezom (spoj **6**, Slika 4).



Slika 4. Strukturna formula hibridne molekule artezunata i derivata harmina

S obzirom na to da harmin i artezunat pokazuju antimalarijsko djelovanje, hibridna molekula mogla bi ostvariti sinergističko, selektivnije i snažnije farmakološko djelovanje, poboljšana farmakokinetička svojstva te manje izražene nuspojave (Decker, 2011, 2008; Li i sur., 2019). Također, hibridna molekula bi predstavljala potencijalno rješenje u nadvladavanju rezistencije na postojeću farmakoterapiju (Decker, 2011; Li i sur., 2019).

3. MATERIJALI I METODE

Tališta (t_r) sintetiziranih spojeva određena su na Stuart SMP3 instrumentu za određivanje tališta (Barloworld Scientific, UK) u otvorenim kapilarama i nisu korigirana. CEM Discover mikrovalni reaktor (CEM Corporation, SAD) korišten je u sintezi uz pomoć mikrovalova ($P = 150 \text{ W}$).

Tankoslojnom kromatografijom (TLC) praćen je tijek kemijskih reakcija i čistoća produkata. Za TLC su upotrijebljene staklene silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka) kao nepokretna faza te diklorometan/metanol (10:1 + 5 % TEA, 85:15 i 8:1) i cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) kao pokretne faze. Analizirani spojevi detektirani su ultraljubičastim svjetlom ($\lambda = 254$ i 366 nm) i parama joda. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel visokog stupnja čistoće, veličine čestica 0,063-0,200 mm (Merck, Njemačka) uz iste pokretne faze kao u TLC-u. Iskorištenja reakcija nisu optimirana.

^1H i ^{13}C NMR snimljeni su na NMR spektrometru Bruker Avance III HD Ascend (Bruker, SAD) pri 400 ili 600 MHz za ^1H te pri 75, 101 ili 151 MHz za ^{13}C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO- d_6 otopinama na temperaturi od $20 \text{ }^\circ\text{C}$ u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na unutarnji standard tetrametilsilan (TMS) u ^1H spektrima, odnosno signal DMSO-a pri 39,52 ppm u ^{13}C spektru. Konstantne sprege (J) izražene su u Hz. IR spektri snimljeni su na Paragon 500 spektrometru (Perkin Elmer, UK) i Fourier-Transform Infrared Attenuated Total Reflection UATR Two spectrometer (Perkin Elmer, UK) u području valnih brojeva od 4000 do 450 cm^{-1} . Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS instrumentu (HPLC, Agilent Technologies 1200; MS, Agilent Technologies 6410 Triple Quad, SAD). Kao tehnika ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom i/ili negativnom modu.

10 %-tni paladij na ugljiku, acetaldehid-dimetil-acetal, litijev karbonat, tetrabutilamonijev hidrogen sulfat (TBAHS) i octena kiselina nabavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD). Acetonitril (ACN), aceton, metanol, cikloheksan, etil-acetat, klorovodična kiselina i dietil-eter nabavljeni su od proizvođača Honeywell (SAD). Trietilamin (TEA) nabavljen je od proizvođača Alfa Aesar (SAD), diklormetan (DCM) od tvrtke Fisher Chemical (SAD). Etanol je nabavljen od proizvođača Acros Organics (Belgija). 5-Metoksitriptamin, trifluorocena kiselina (TFA), cezijev karbonat, *N,N*-dimetilformamid (DMF), *tert*-butil-*N*-(2-brometil)karbamat, 1-[*bis*(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazol[4,5 *b*]piridinijev-3-oksid heksafluorfosfat (HATU). *N,N*-diizopropiletilamin (DIEA) i artezunat nabavljeni su od proizvođača Tokyo Chemical Industry (Belgija). Bromovodična kiselina nabavljena je od proizvođača Merck (Njemačka). Bezvodni natrijev sulfat nabavljen je od proizvođača

Grammol (Hrvatska), a kalijev karbonat od proizvođača Kemika (Hrvatska). U reakcijama organske sinteze korištena su bezvodna otapala. Bezvodni acetonitril i metanol nabavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich, bezvodni etanol od proizvođača Acros Organics (Belgija) i bezvodni dietil-eter od proizvođača J.T. Baker (SAD).

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

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

Suspenciji 5-metoksitriptamina (0,200 g, 1,051 mmol) u ACN-u (4 mL) uz miješanje su dodani acetaldehid-dimetil-acetal (0,222 mL, 2,102 mmol) i TFA (0,161 mL, 2,102 mmol) te je reakcijska smjesa miješana u mikrovalnom reaktoru na 110 °C tijekom 0,17 h ($P = 100$ W). Po završetku, reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu te je dodan dietil-eter (20 mL). Nastali talog je odsisan te ispran ACN-om (5 mL).

Iskorištenje reakcije: 0,238 g (68 %).

t_f 212 °C (raspad).

ESI-MS: m/z raspad spoja.

IR (KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3900, 3850, 3798, 3752, 3646, 3286, 3044, 2920, 2840, 2750, 2712, 2494, 2354, 1864, 1788, 1676, 1632, 1598, 1488, 1440, 1384, 1328, 1286, 1204, 1136, 1060, 1026, 956, 914, 880, 834, 800, 724, 632, 558, 510.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 11,01 (s, 1H), 9,49-9,22 (m, 2H), 7,25 (d, 1H, $J = 8,7$), 6,95 (d, 1H, $J = 2,4$), 6,75 (dd, 1H, $J = 8,7, 2,5$), 4,70 (q, 1H, $J = 6,9$), 3,75 (s, 3H), 3,60 (dt, 1H, $J = 12,7, 5,0$), 3,01–2,78 (m, 2H), 1,60 (d, 3H, $J = 6,8$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) 153,44, 131,70, 131,15, 126,22, 112,05, 111,64, 105,05, 100,10, 55,36, 48,47, 40,49, 18,32, 17,13.

3.2. Sinteza 6-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indola (2)

Suspencija spoja **1** (0,238 g, 0,716 mmol), litijevog karbonata (0,106 g, 1,432 mmol) i 10 %-tnog Pd/C (0,027 g) u apsolutnom etanolu (4,17 mL) miješana je u mikrovalnom reaktoru na 150 °C tijekom 0,42 h ($P = 75$ W). Po završetku, reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu, filtrirana kroz celit, a otapalo je uklonjeno iz filtrata uparavanjem pod sniženim

tlakom. Ostatak nakon uparavanja rastrljan je u 20 %-tnoj vodenoj otopini natrijeva klorida. Dobiveni talog je odsisan te ispran dietil-eterom (2×5 mL).

Iskorištenje reakcije: 0,048 g (31 %).

t_t 207 °C (raspad).

ESI-MS: m/z 213,1 ($M+1$)⁺.

IR (KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3746, 3454, 3142, 3078, 2960, 2884, 2786, 2608, 2516, 2434, 2362, 2280, 2040, 1882, 1778, 1696, 1632, 1598, 1566, 1496, 1464, 1436, 1398, 1338, 1290, 1214, 1176, 1120, 1068, 1022, 980, 946, 880, 826, 746, 692, 620, 572.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J/Hz) 11,35 (s, 1H), 8,15 (d, 1H, $J = 5,4$), 7,89 (d, 1H, $J = 5,3$), 7,73 (d, 1H, $J = 2,5$), 7,50 (d, 1H, $J = 8,8$), 7,17 (dd, 1H, $J = 8,9, 2,6$), 3,85 (s, 3H), 2,74 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm) 153,75, 142,65, 137,38, 135,67, 135,53, 127,17, 121,86, 118,30, 113,21, 113,13, 103,97, 56,05, 20,88.

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

Otopina spoja **2** (0,100 g, 0,471 mmol) u smjesi ledene octene kiseline (1,2 mL) i 47 %-tne bromovodične kiseline (0,6 mL) miješana je u mikrovalnom reaktoru na 140 °C tijekom 0,42 h ($P = 75$ W). Reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu, zaljučena korištenjem 5 %-tnog natrijevog hidroksida do pH 8-9 te je produkt ekstrahiran etil-acetatom (3×100 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani, a otapalo upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 85:15 i rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje reakcije: 0,072 g (71 %).

t_t 213 °C (raspad).

ESI-MS: m/z 199,3 ($M+1$)⁺.

IR (KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3796, 3728, 3676, 3380, 3062, 3026, 2924, 2850, 2680, 2602, 2506, 2364, 2330, 1878, 1848, 1762, 1734, 1640, 1576, 1516, 1458, 1428, 1376, 1296, 1264, 1192, 1128, 1030, 982, 952, 866, 806, 702, 622, 594.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 11,28 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 8,12 (d, 1H, $J = 5,4$), 7,82 (d, 1H, $J = 5,4$), 7,48 (d, 1H, $J = 2,4$), 7,42 (d, 1H, $J = 8,7$), 7,07 (dd, 1H, $J = 8,8, 2,4$), 2,73 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) 150,87, 141,84, 136,31, 135,06, 134,58, 126,64, 121,66, 118,05, 112,68, 112,47, 105,62, 20,22.

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

Otopini fenola **3** (0,288 g, 1,453 mmol) u suhom DMF-u (4 mL) dodani su cezijev karbonat (1,325 g, 4,068 mmol) i TBAHS (0,395 g, 1,162 mmol) te je smjesa propuhana argonom. Nakon 0,42 h dodan je *tert*-butil-*N*-(2-brometil)karbamata (1,302 g, 5,812 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na s.t. tijekom 48 h pod atmosferom argona. Potom je reakcijska smjesa razrijeđena vodom (40 mL) te je produkt ekstrahiran etil-acetatom (4 × 40 mL). Organski slojevi su skupljeni, isprani vodom (2 × 120 mL), sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani, a otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 8:1 i rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera.

Iskorištenje reakcije: 0,311 g (63 %).

ESI-MS: m/z 342,4 ($M+1$)⁺.

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz) 11,41 (s, 1H), 8,16 (d, 1H, $J = 5,4$), 7,92 (d, 1H, $J = 5,4$), 7,77 (d, 1H, $J = 2,5$), 7,51 (d, 1H, $J = 8,8$), 7,18 (dd, 1H, $J = 8,8, 2,5$), 7,06 (t, 1H, $J = 5,8$), 4,05 (t, 2H, $J = 5,9$), 3,36 (d, 2H, $J = 5,9$), 2,75 (s, 3H), 1,40 (d, 9H, $J = 22,8$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) 155,73, 152,39, 142,04, 136,56, 135,41, 135,03, 126,88, 121,35, 118,42, 112,78, 112,75, 104,67, 77,76, 67,19, 40,14, 28,24, 20,23.

3.5. Sinteza 2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etan-1-amina (5)

Otopini spoja **4** (0,290 g, 0,849 mmol) u metanolu (6 mL) dodana je 4 M klorovodična kiselina (2,123 mL) te je reakcijska smjesa miješana na 50 °C tijekom 18 h. Potom je otapalo upareno, a ostatak nakon uparavanja otopljen u vodi (15 mL). Otopina je korištenjem 5 % -tnog natrijevog hidroksida zalužena do pH 11, a nastali talog je odsisan te ispran dietil-eterom (2 × 10 mL).

Iskorištenje reakcije: 0,148 g (69 %).

ESI-MS: m/z 242,2 ($M+1$)⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz) 11,36 (s, 1H), 8,15 (d, 1H, $J = 5,3$), 7,90 (d, 1H, $J = 5,3$), 7,74 (d, 1H, $J = 2,3$), 7,50 (d, 1H, $J = 8,8$), 7,19 (dd, 1H, $J = 8,8, 2,5$), 4,02 (t, 2H, $J = 5,8$), 2,94 (t, 2H, $J = 5,7$), 2,74 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm) 152,47, 141,87, 136,70, 135,19, 134,93, 126,54, 121,29, 117,98, 112,34, 112,18, 104,86, 71,06, 40,87, 19,97.

3.6. Sinteza (3*R*,5*aR*,6*S*,8*aR*,9*S*,10*S*,12*S*,12*aS*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il4-((2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)amin)-4-oksobutanoata (6)

U suspenziju artezunata (0,088 g, 0,228 mmol) u DCM-u (3 mL) dodani su HATU (0,079 g, 0,207 mmol) i DIEA (0,070 mL, 0,414 mmol) te je smjesa miješana na s.t. tijekom 0,42 h. Potom je dodan amin **5** (0,050 g, 0,207 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 5 h na sobnoj temperaturi. Potom je reakcijska smjesa razrijeđena DCM-om (20 mL) te isprana vodom (2 × 25 mL). Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran, a otapalo uklonjeno uparavanjem pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0.5 te prekrizacijom iz dietil-etera.

Iskorištenje reakcije: 0,119 g (95 %).

t_t 141-144 °C.

ESI-MS: m/z 608,3 ($M+1$)⁺.

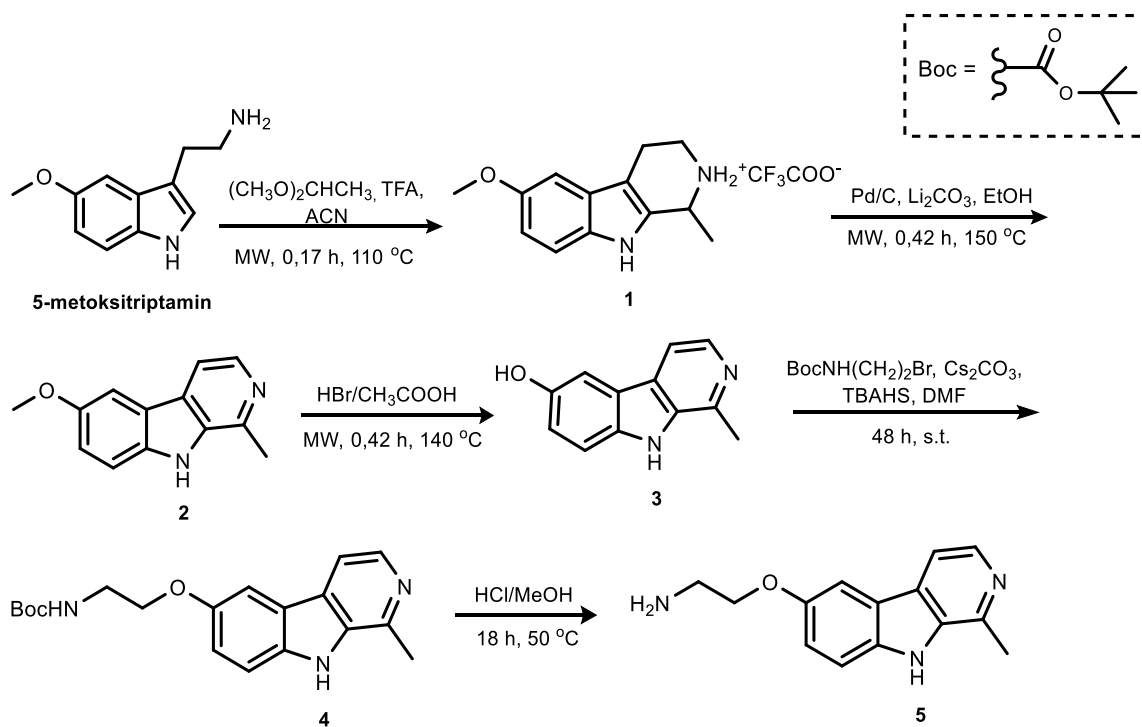
IR (ATR, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3433, 2933, 2051, 1748, 1658, 1568, 1496, 1460, 1379, 1282, 1201, 1155, 1131, 1099, 1071, 1033, 1009, 927, 875, 842, 740, 703, 622, 557, 486.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ ppm, J /Hz) 11,36 (s, 1H), 8,22 (t, 1H, $J = 5,5$), 8,15 (d, 1H, $J = 5,3$), 7,89 (d, 1H, $J = 5,3$), 7,76 (d, 1H, $J = 2,5$), 7,50 (d, 1H, $J = 8,8$), 7,19 (dd, 1H, $J = 8,8, 2,5$), 5,64 (d, 1H, $J = 9,7$), 5,52 (s, 1H), 4,07 (t, 2H, $J = 5,7$), 3,50–3,46 (m, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,62 (q, 2H, $J = 6,5$), 2,46 (t, 2H, $J = 7,2$), 2,30–2,25 (m, 1H), 2,20–2,14 (m, 1H), 2,01–1,96 (m, 1H), 1,82–1,77 (m, 1H), 1,59–1,48 (m, 3H), 1,40–1,27 (m, 6H), 1,18–1,12 (m, 1H), 0,92–0,85 (m, 4H), 0,75 (d, 3H, $J = 7,1$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm) 171,21, 170,87, 152,33, 142,16, 139,91, 135,33, 135,07, 126,07, 121,39, 118,28, 112,70, 112,67, 104,75, 103,56, 91,63, 90,56, 79,84, 67,18, 51,10, 44,54, 38,50, 35,94, 35,89, 33,67, 31,63, 29,51, 28,96, 25,52, 24,17, 20,97, 20,39, 20,04, 11,71.

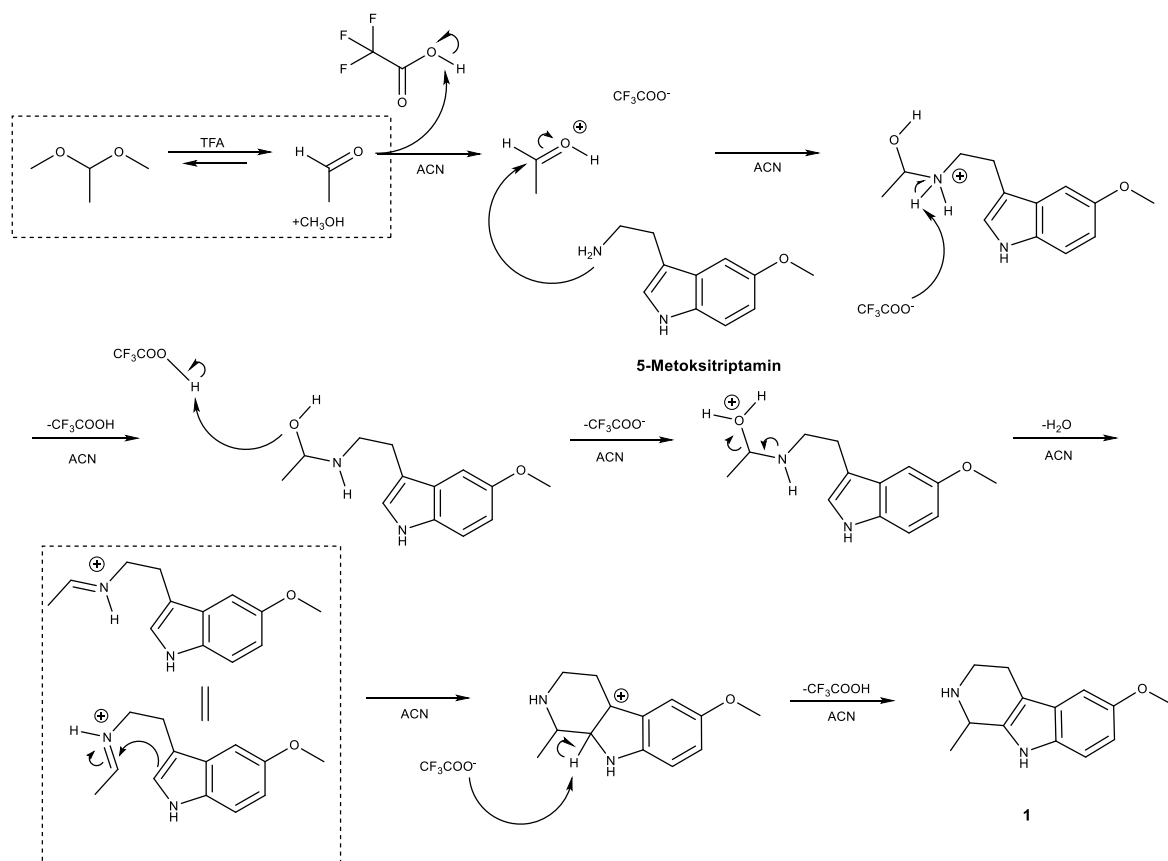
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu opisana je sinteza nove hibridne molekule artezunata i derivata harmina u položaju 6 β -karbolinskog prstena. Dva farmakofora uspješno su povezana amidnom vezom korištenjem reakcije povezivanja. Kako bi pripravili hibrid harmina i artezunata bilo je potrebno sintetizirati amin β -karbolina **5**, iz 5-metoksitriptamina, u 5 reakcijskih koraka (Shema 1).



Shema 1. Sinteza amina u položaju O-6 (**5**)

Pictet-Spenglerovom reakcijom 5-metoksitriptamina i acetaldehid-dimetil-acetala uz TFA na 110 °C pripravljena je trifluorocetna sol tetrahidro- β -karbolina **1** (Shema 2). Kao otapalo korišten je ACN jer omogućava taloženje produkta iz reakcijske smjese čime je pojednostavljen postupak njegove izolacije. TFA ima ulogu katalizatora: 1) protonira karbonilni kisik aldehida čime povećava elektrofilnost karbonilnog ugljika i pospješuje reakciju nukleofilne adicije amino skupine 5-metoksitriptamina i 2) protonira imin tvoreći elektrofilan iminijev ion koji u reakciji s elektronima bogatim indolskim prstenom daje tetrahidro- β -karbolin.

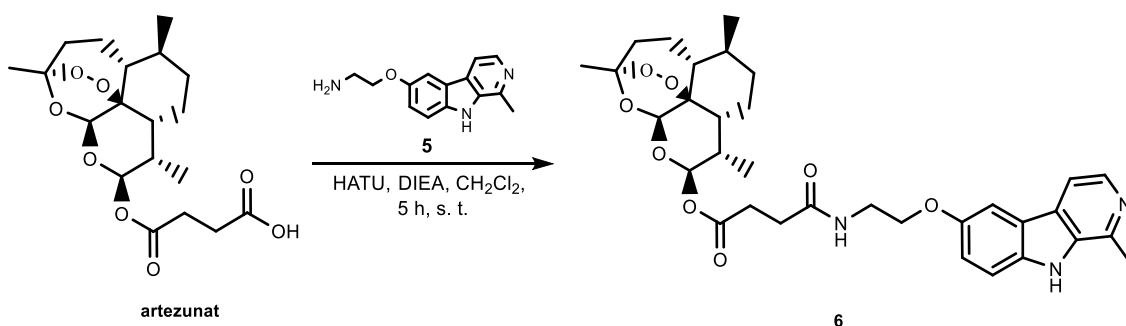


Shema 2. Shematski prikaz mehanizma Pictet-Spenglerove reakcije

Oksidacijom spoja **1** uz katalizator 10 %-tni Pd/C i Li_2CO_3 na $150\text{ }^\circ\text{C}$ dobiven je β -karbolin **2**. Li_2CO_3 je korišten kako bi oslobodio spoj **1** iz oblika soli. Grijanjem spoja **2** u smjesi ledene octene i bromovodične kiseline na $140\text{ }^\circ\text{C}$ provedena je hidroliza eterske skupine β -karbolina čime je pripravljen fenol **3**. Jaka bromovodična kiselina protonira kisik etera u položaju 6 β -karbolinskog prstena. Nastali bromidni ion dovoljno je jak nukleofil koji napada protonirani eter čime kao produkti reakcije nastaju metil-bromid i fenol **3**. Prethodne reakcije provedene su uz pomoć mikrovalova. Mikrovalovima potpomognutom sintezom omogućena je ravnomjerna raspodjela topline, odnosno brzo i podjednako zagrijavanje, što u konačnici doprinosi većem iskorištenju i bržem nastanku produkta uz manji ekonomski trošak.

Alkilacija fenola **3** provedena je uz cezijev karbonat, TBAHS i *tert*-butil-*N*-(2-brometil)karbammat u atmosferi argona. Kako u reakciji nukleofilne supstitucije mogu sudjelovati i atom kisika fenola u položaju 6 i atom dušika u položaju 9 β -karbolinskog prstena, provedena je optimizacija uvjeta reakcije s ciljem favoriziranja reakcije u položaju 6. Cezijev karbonat djeluje kao baza koja služi za deprotoniranje fenola. Zbog značajne

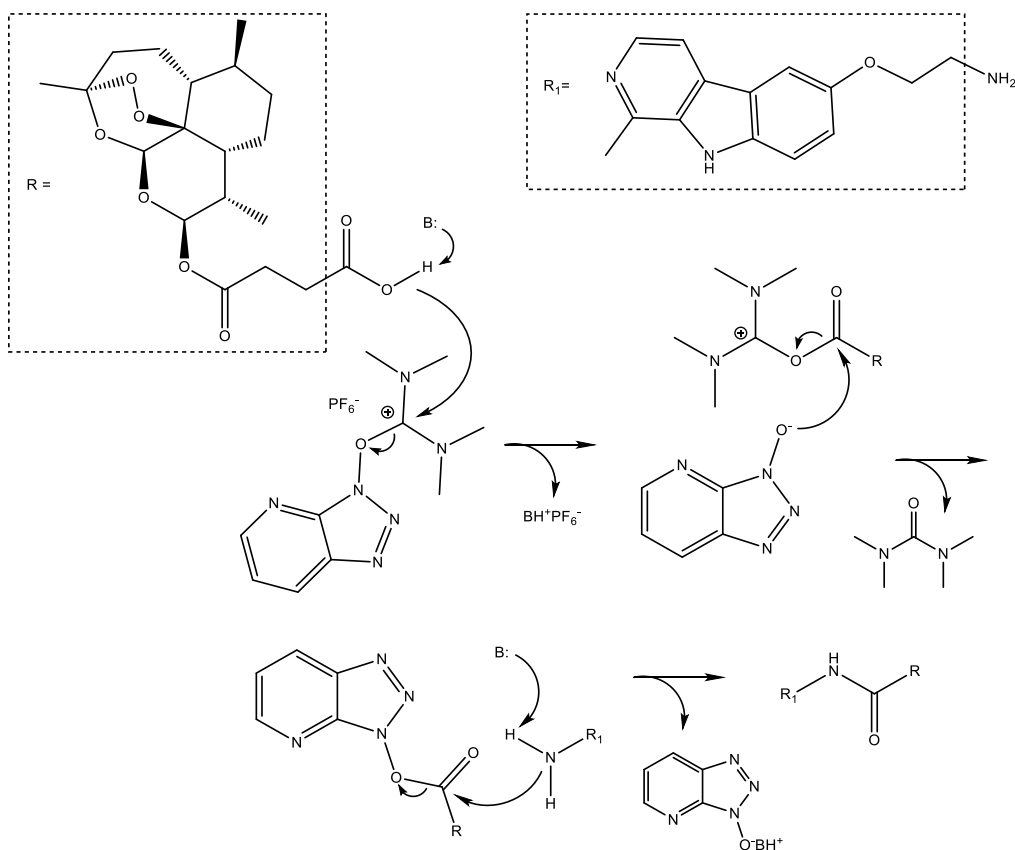
elektronegativnosti broma, dolazi do nukleofilnog napada kisika fenola **3** na elektrofilan ugljikov atom u molekuli *tert*-butil-*N*-(2-brometil)karbamata. TBAHS je katalizator faznog prijenosa i ubrzava odvijanje reakcije prebacivanjem anorganskih iona u organsku fazu. Amin **5** nastaje uklanjanjem Boc zaštitne skupine spoja **4** hidrolizom u kiselim uvjetima primjenom 4 M klorovodične kiseline u metanolu na 50 °C. Prilikom uklanjanja Boc zaštitne skupine prvo dolazi do hidrolize *O-tert*-butilne skupine, nakon čega slijedi spontana dekarboksilacija nastale nestabilne karbaminske kiseline. ¹H i ¹³C NMR spektroskopski podaci međuprodukata **1-5** odgovaraju literaturnim podacima.



Shema 3. Sinteza hibridne molekule artemizunata i derivata harmina (**6**)

Artemizunat i pripravljeni amin **5** povezani su u hibridnu molekulu (Shema 3) amidnom vezom reakcijom povezivanja. Jedan od načina sinteze amida uključuje reakciju amina i karboksilne kiseline kojoj se mora povećati elektrofilnost/reaktivnost prevođenjem u kiselinski klorid, anhidrid ili ester. Najčešće provedena metoda sinteze amida je kondenzacijom uz odgovarajući *coupling* reagens i Hünigovu bazu koji stvaraju reaktivnije međuprodukte od same karboksilne kiseline (www.moodle.srce.hr).

Dodatkom *coupling* reagensa HATU i Hünigove baze DIEA suspenziji artemizunata dolazi do reakcije povezivanja koja se odvija u tri koraka: 1) deprotonacija karboksilne kiseline artemizunata Hünigovom bazom uz nastanak aniona sposobnog za napad na elektrofilni ugljikov atom HATU-a, 2) reakcija nastalog aniona HATU s aktiviranom karboksilnom kiselinom čime nastaje stabilniji aktivirani ester, 3) nukleofilni napad dušikovog atoma amina **5** na elektrofilni karbonilni ugljik estera uz nastanak konačnog produkta amida **6** (Shema 4)

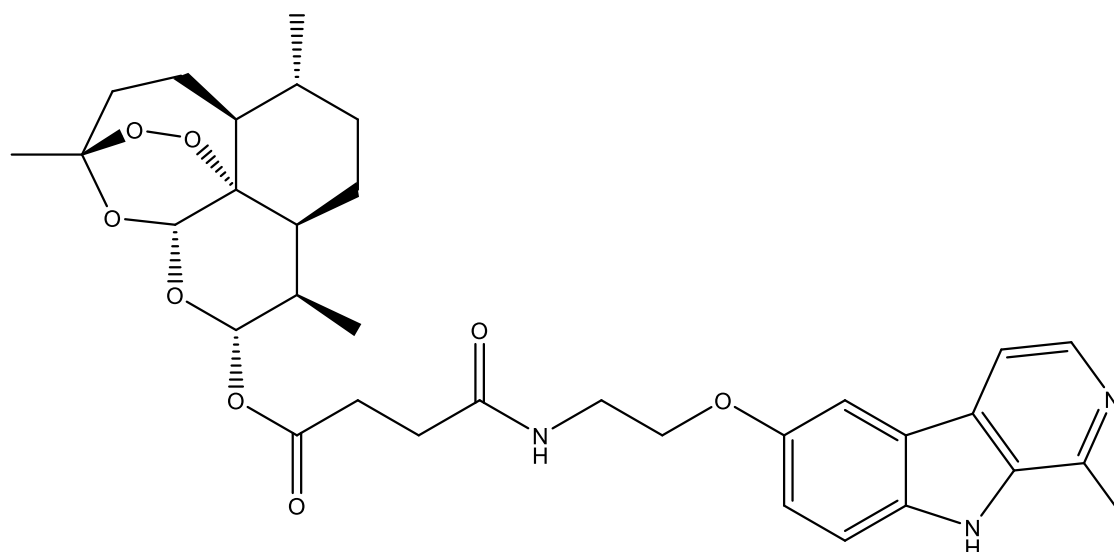


Shema 4. Shematski prikaz mehanizma reakcije povezivanja

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni te prekrizacijom iz dietil-etera. Njegova struktura potvrđena je uobičajnim metodama (IR, MS, ¹H i ¹³C NMR). Podaci su prikazani u Tablicama 1 i 2.

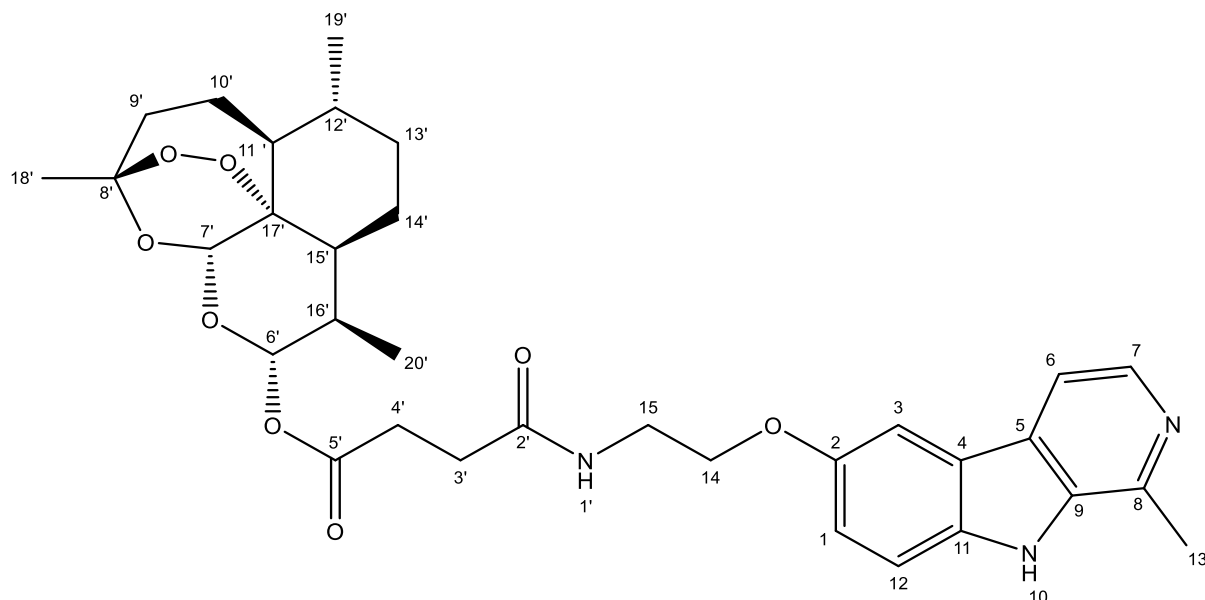
U MS spektru amida **6** vidljiv je pozitivno nabijen pseudomolekulski ion (m/z 608,3). U IR spektru spoja **6** vrpca vidljiva na 3433 cm^{-1} odgovara nastalom sekundarnom amidu (-CONHR-), dok ona na 1748 cm^{-1} odgovara karbonilnoj skupini estera (-COOR-) artezunata, a na 1658 cm^{-1} karbonilnoj skupini amida. Kemijski pomaci protona u ¹H NMR i ugljika u ¹³C NMR spektru spoja **6** u skladu su s predloženom strukturom U ¹H NMR spektru signal NH amina vidljiv je kao singlet na 11,36 ppm, a NH amida kao triplet (sprezanje s metilenskom skupinom) na 8,22 ppm. ¹³C NMR spektar spoja **6** sadrži vidljiv signal karbonila na 171,22 ppm i 170,87 ppm.

Tablica 1. Analitički i IR podaci za hibridnu molekulu **6**



Iskor. (%)	95
t_f (°C)	141-144
Molekulska formula	$C_{33}H_{41}N_3O_8$
M_r	607,29
MS (m/z)	608,3 (M+1) ⁺
IR (ATR, ν_{max} (cm⁻¹))	3433, 2933, 2051, 1748, 1658, 1568, 1496, 1460, 1379, 1282, 1201, 1155, 1131, 1099, 1071, 1033, 1009, 927, 875, 842, 740, 703, 622, 557, 486.

Tablica 2. ^1H i ^{13}C NMR podatci za hibridnu molekulu **6**



^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	11,36 (s, 1H, 10), 8,22 (t, 1H, 1', $J = 5,5$), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$), 7,89 (d, 1H, 6, $J = 5,3$), 7,76 (d, 1H, 3, $J = 2,5$), 7,50 (d, 1H, 12, $J = 8,8$), 7,19 (dd, 1H, 1, $J = 8,8, 2,5$), 5,64 (d, 1H, 6', $J = 9,7$), 5,52 (s, 1H, 7'), 4,07 (t, 2H, 14, $J = 5,7$), 3,50–3,46 (m, 2H, 15), 2,73 (s, 3H, 13), 2,62 (q, 2H, 3', $J = 6,5$), 2,46 (t, 2H, 4', $J = 7,2$), 2,30–2,25 (m, 1H, 16'), 2,20–2,14 (m, 1H, 9a'), 2,01–1,96 (m, 1H, 13a'), 1,82–1,77 (m, 1H, 14a'), 1,59–1,48 (m, 3H, 12', 9b', 13b'), 1,40–1,27 (m, 6H, 14b', 10a', 11', 18'), 1,18–1,12 (m, 1H, 15'), 0,92–0,85 (m, 4H, 10b', 19'), 0,75 (d, 3H, 20', $J = 7,1$)
--	---

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm)	171,21 (2'), 170,87 (5'), 152,33 (2), 142,16 (8), 139,91 (7), 135,33 (11), 135,07 (9), 126,07 (4), 121,39 (5), 118,28 (1), 112,70 (6), 112,67 (12), 104,75 (3), 103,56 (8'), 91,63 (6'), 90,56 (7'), 79,84 (17'), 67,18 (14), 51,10 (11'), 44,54 (15'), 38,50 (15), 35,94 (12'), 35,89 (9'), 33,67 (13'), 31,63 (16'), 29,51 (4'), 28,96 (14'), 25,52 (18'), 24,17 (3'), 20,97 (10'), 20,39 (13), 20,04 (19'), 11,71 (20')
---	--

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija nove hibridne molekule artezunata i derivata harmina, odnosno (3*R*,5*aR*,6*S*,8*aR*,9*S*,10*S*,12*S*,12*aS*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il4-((2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)amin)-4-oksobutanoata (**6**).

Kao metoda povezivanja korištena je reakcija povezivanja uz *coupling reagens* HATU i Hünigovu bazu DIEA. Za potrebe pripreme hibrida sintetiziran je amin β-karbolina (**5**) iz 5-metoksitriptamina u 5 reakcijskih koraka.

Konačnom spoju potvrđena je struktura uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS, ¹H i ¹³C NMR) te mu je određena temperatura tališta.

U nastavku istraživanja, koja nadilaze okvire ovog rada, pripremljenom spoju ispitat će se antimalarijsko i protutumorsko 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.

Adebayo JO, Tijjani H, Adegunloye AP, Ishola AA, Balogun EA, Malomo SO. Enhancing the antimalarial activity of artezunate. *Parasitol Res*, 2020, 119, 2749-2764.

Afolabi BB, Okoromah CN. Intramuscular arteether for treating severe malaria. *Cochrane Database of Syst Rev*, 2004, 2004, CD004391.

Arteether, 2017., https://www.medindia.net/doctors/drug_information/arteether.htm, pristupljeno 23.04.2022.

Awouafack MD, Tane P, Kuete V, Eloff, JN. Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa. U: Medicinal Plant Research in Africa. Kuete V, urednik, Elsevier, 2013, 33-103.

Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe Malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2012, 4, 2012026.

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

Bhisutthibhan J, Pan XQ, Hossler PA, Walker DJ, Yowell CA, Carlton J, Dame JB, Meshnick SR. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J Biol Chem*, 1998, 273, 16192-16198.

CDC Yellow Book, 2019., <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/malaria#1939>, pristupljeno 29.06.2022.

de Vries PJ, Dien TK. Clinical pharmacology and therapeutic potential of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria. *Drugs*, 1996, 52, 818-836.

Decker M. Hybrid molecules incorporating natural products: applications in cancer therapy, neurodegenerative disorders and beyond. *Curr Med Chem*, 2011, 18, 1464-1475.

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

Fairhurst RM, Dondorp AM. Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *Microbiol Spectr*, 2016, 4, 409-429.

Gautam A, Ahmed T, Paliwal J, Batra V. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of endoperoxide antimalarials. *Curr Drug Metab*, 2009, 10, 289-306.

Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med*, 2010, 30, 93-129.

Grau GER, Craig AG. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiol*, 2012, 7, 291-302.

Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malar J*, 2013, 12, 232.

Hsu E. The history of qing hao in the Chinese materia medica. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006, 100, 505-508.

Ibraheem ZO, Abdul Majid R, Mohd Noor S, Mohd Sidek H, Basir R. The Potential of β -Carbolin Alkaloids to Hinder Growth and Reverse Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Iran J Parasitol*, 2015, 10, 577-583.

Ibuproksam, 1994., <https://moodle.srce.hr/2019-2020/mod/folder/view.php?id=890126>, pristupljeno 09.05.2022.

Ilett KF, Ethell BT, Maggs JL, Davis TME, Batty KT, Burchell B, Binh TQ, Thu LTA, Hung NC, Pirmohamed M, Park BK, Edwards G. Glucuronidation of dihydroartemisinin *in vivo* and by human liver microsomes and expressed UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabol Dispos*, 2002, 30, 1005-1012.

Institutes of Chinese Materia Medica of the Academy of Traditional Chinese Medicine, 2022., <http://www.icmm.ac.cn/yw/2011/04/05/265.html>, pristupljeno 22.04.2022.

Konjevod V, Rajić Z, Perković I. Beta-karbolini - u potrazi za novim terapijskim mogućnostima. *Farm glas*, 2021, 77, 275-285.

Laurens MB. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16, 480-489.

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.

Ma N, Zhang Z, Liao F, Jiang T, Tu Y. The birth of artemisinin. *Pharmacology & Therapeutics*, 2020, 216, 107658.

Makoah N, Pradel G. Antimalarial drugs resistance in *Plasmodium falciparum* and the current strategies to overcome them. U: Microbial pathogens and strategies for combating them:

Science, technology and education, Vol. 1. Mendez-Vilas A, urednik, Badajos, Fromatex Research Center, 2013, 269-282.

Malaria, 2022., <https://www.ecdc.europa.eu>, pristupljeno 20.04.2022.

Malaria, 2022., https://www.who.int/health-topics/malaria#tab=tab_1, pristupljeno 19.04.2022.

Malaria, 2021., <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/malaria/diagnosis-treatment/drc-20351190>, pristupljeno 20.04.2022.

Malaria, 2020., https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/clinicians1.html, pristupljeno 20.04.2021.

Malaria, 2019., <https://www.nhs.uk/conditions/malaria/>, pristupljeno 20.04.2021.

Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol*, 2002, 32, 1655–1660.

Meunier B. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? *Acc Chem Res*, 2008, 41, 69–77.

Miller LH, Su X. Artemisinin: Discovery from the Chinese Herbal Garden. *Cell*, 2011, 146, 855–858.

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

Mosquirix/Europska Agencija za lijekove, 2020., <https://www.ema.europa.eu/en/opinion-medicine-use-outside-EU/human/mosquirix>, pristupljeno 20.04.2020.

Nadjm B, Behrens RH. Malaria: an update for physicians. *Infect Dis Clin North Am*, 2012, 26, 243-259.

Navaratnam V, Mansor SM, Sit NW, Grace J, Li Q, Olliaro P. Pharmacokinetics of Artemisinin-Type Compounds. *Clin Pharmacokinet*, 2000, 39, 255–270.

Neckers L, Tatu U. Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe*, 2008, 4, 519–527.

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

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

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

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.

Shandilya A, Chacko S, Jayaram B, Ghossh I. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach. *Sci rep*, 2013, 3, 2513.

Teja-Isavadharm P, Keeratithakul G, Sirisopana N, Luesutthiviboon L, Watt G, Eamsila C, Jongsakul K, Brewer TG, Kyle DE, Li Q. Comparative pharmacokinetics and effect kinetics of orally administered artesunate in healthy volunteers and patients with uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65, 717–721.

The Nobel Prize/Nobel Lecture, 2022., <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/tu/lecture/>, pristupljeno 19.05.2022.

Tu Y. Artemisinin-A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2016, 55, 10210-10226.

Vuk I, Rajić Z, Zorc B. Malarija i antimalarici. *Farm glas*, 2008, 64, 51–60.

White NJ. Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success. *Science*, 2008, 320, 330–334.

White NJ. The treatment of malaria. *N Engl J Med*, 1996, 335, 800–806

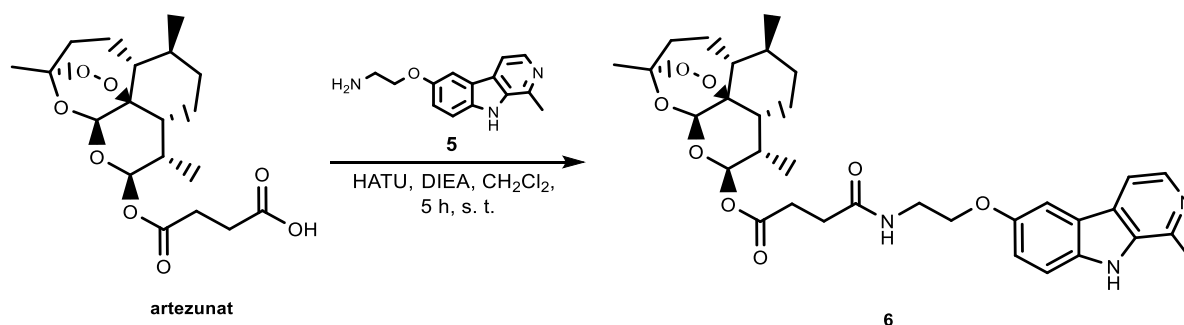
WHO (2022), Guidelines for malaria. Geneva: World Health Organization.

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

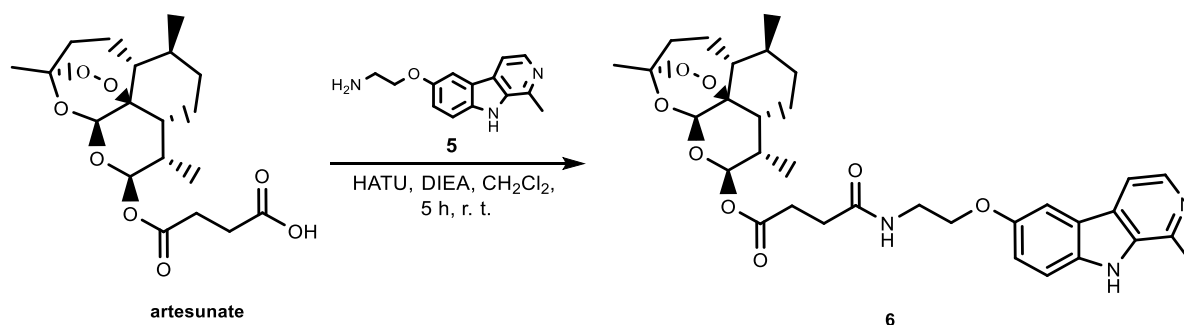
Otkriće artemizina označilo je prekretnicu u terapiji malarije, čemu svjedoči preporuka SZO da se ACT koristi kao prva linija u liječenju ove bolesti. Međutim, pojava rezistentnih sojeva plazmodija ugrožava učinkovitost terapije, zbog čega je potrebno kontinuirano razvijati nove antimalarike. Jedan od pristupa u dizajniranju i razvoju novih lijekova je molekulska hibridizacija koja podrazumijeva povezivanje dvije biološki aktivne molekule u jedinstveni kemijski entitet, odnosno hibridnu molekulu. Racionalnim odabirom roditeljskih molekula moguće je pripremiti hibrid koji djeluje na različite mete zbog čega ostvaruje snažnije djelovanje te neće doći do razvoja rezistencije. U okviru ovog diplomskog rada pripremljen je hibrid artezunata, polusintetskog derivata artemizinina i harmina, β -karbolinskog alkaloida s izraženim antimalarijskim djelovanjem korištenjem reakcije povezivanja uz *coupling* reagens HATU i bazu DIEA (spoj **6**). Za potrebe sinteze hibrida, sintetiziran je i amin **5**, u pet reakcijskih koraka. Struktura konačnog spoja potvrđena je uobičajnim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR). U nastavku istraživanja pripremljenom hibridu bit će ispitano antimalarijsko i protutumorsko djelovanje.



Shema. Sinteza hibridne molekule artezunata i derivata harmina (spoj **6**)

Ključne riječi: malarija, artemizinin, harmin, amid, hibridna molekula, reakcija povezivanja

The discovery of artemisinin was a breakthrough in the treatment of malaria leading to the recommendation of the WHO to use ACT as the first-line therapy against malaria. Nevertheless, the occurrence of drug-resistant *Plasmodium* strains challenges its efficiency and urges the need for constant development of new antimalarials. One of the approaches in the discovery of new bioactive agents is molecular hybridization, which represents synthesis of novel chemical entities (hybrid molecules) by forming covalent bond between two biologically active molecules. Rational selection of parent molecules enables the preparation of a hybrid with improved properties. Within this Master Thesis, hybrid (**6**) comprising artesunate, semisynthetic derivative of artemisinin and harmine, β -carboline alkaloid with pronounced antimalarial activity, was prepared by coupling reaction using HATU and DIEA. For the purpose of the hybrid synthesis, amine **5** was synthesized as well, through five reaction steps. The structure of novel compound was confirmed using standard analytical and spectroscopic methods (IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR). Antimalarial and antiproliferative activity of the synthesized hybrid **6** will be evaluated in the future studies.



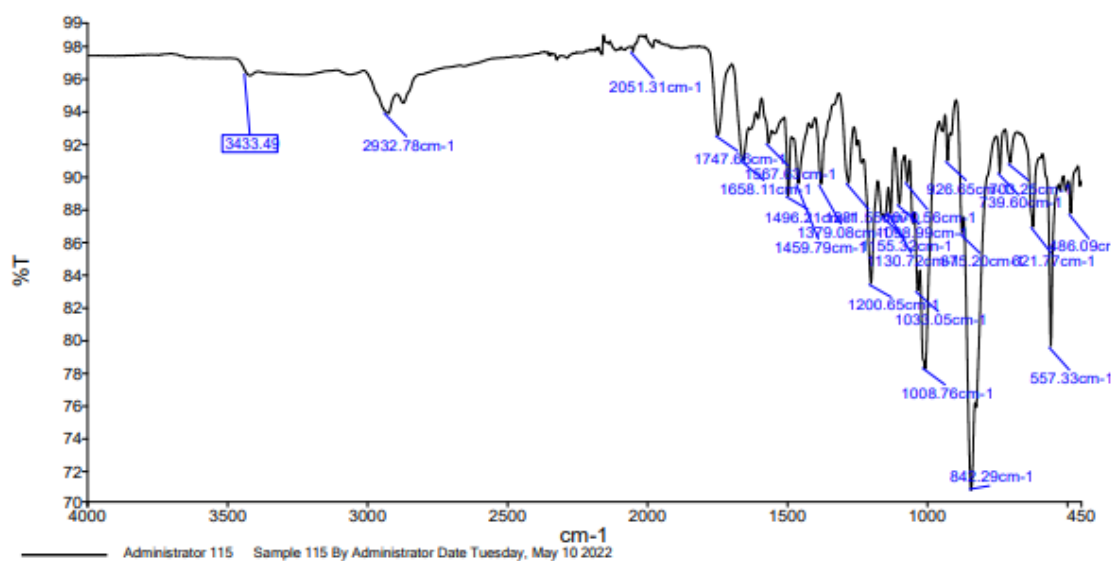
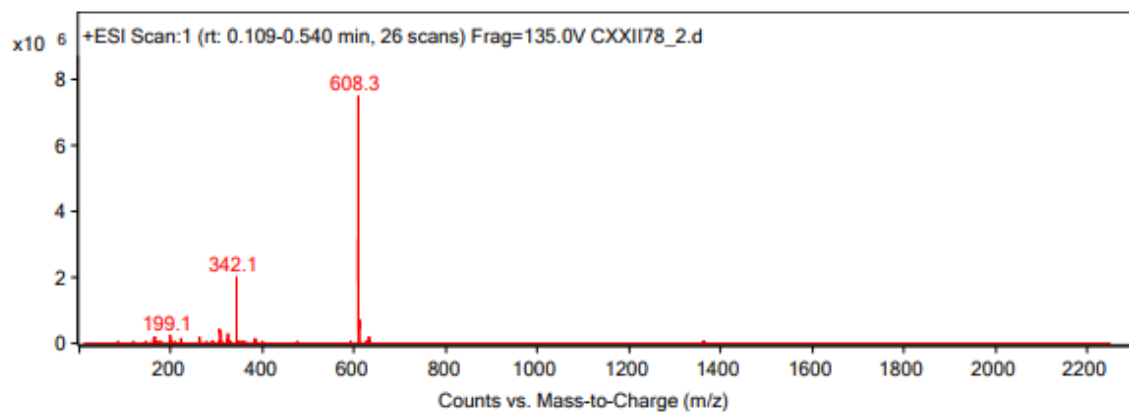
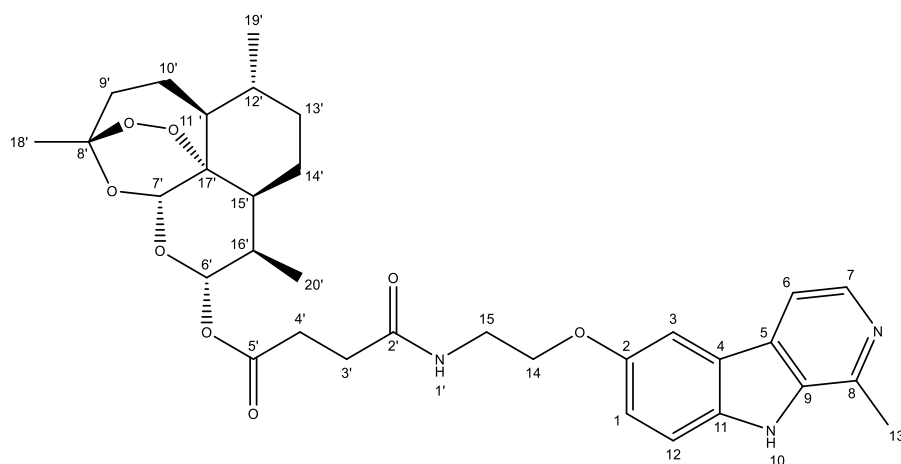
Scheme. Synthesis of artesunate-harmine hybrid (compound **6**)

Keywords: malaria, artemisinin, harmine, amide, hybrid molecule, coupling reaction

8. PRILOZI

Prilozi sadrže IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR sintetiziranog spoja.

6



**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA
KARTICA**

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 HIBRIDA ARTEZUNATA I β -KARBOLINA

Neva Kravaršćan

SAŽETAK

Otkriće artemizina označilo je prekretnicu u terapiji malarije, čemu svjedoči preporuka SZO da se ACT koristi kao prva linija u liječenju ove bolesti. Međutim, pojava rezistentnih sojeva plazmodija ugrožava učinkovitost terapije, zbog čega je potrebno kontinuirano razvijati nove antimalarike. Jedan od pristupa u dizajniranju i razvoju novih lijekova je molekulska hibridizacija koja podrazumijeva povezivanje dvije biološki aktivne molekule u jedinstveni kemijski entitet, odnosno hibridnu molekulu. Racionalnim odabirom roditeljskih molekula moguće je pripremiti hibrid koji djeluje na različite mete zbog čega ostvaruje snažnije djelovanje te neće doći do razvoja rezistencije. U okviru ovog diplomskog rada pripremljen je hibrid artezunata, polusintetskog derivata artemizina i harmina, β -karbolinskog alkaloida s izraženim antimalarijskim djelovanjem korištenjem reakcije povezivanja uz *coupling* reagens HATU i bazu DIEA (spoj **6**). Za potrebe sinteze hibrida, sintetiziran je i amin **5**, u pet reakcijskih koraka. Struktura konačnog spoja potvrđena je uobičajnim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR). U nastavku istraživanja pripremljenom hibridu bit će ispitano antimalarijsko i protutumorsko djelovanje.

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

Rad sadrži: 42 stranica, 15 grafičkih prikaza, 2 tablice i 54 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: malarija, artemizinin, harmin, amid, hibridna molekula, reakcija povezivanja

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Hrvoje Rimac, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz, 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 ARTEZUNATE β -CARBOLINE HYBRID

Neva Kravaršćan

SUMMARY

The discovery of artemisinin was a breakthrough in the treatment of malaria leading to the recommendation of the WHO to use ACT as the first-line therapy against malaria. Nevertheless, the occurrence of drug-resistant *Plasmodium* strains challenges its efficiency and urges the need for constant development of new antimalarials. One of the approaches in the discovery of new bioactive agents is molecular hybridization, which represents synthesis of novel chemical entities (hybrid molecule) by forming covalent bond between two biologically active molecules. Rational selection of parent molecules enables the preparation of a hybrid with improved properties. Within this Master Thesis, hybrid (**6**) comprising artesunate, semisynthetic derivative of artemisinin and harmine, β -carboline alkaloid with pronounced antimalarial activity, was prepared by coupling reaction using HATU and DIEA. For the purpose of the hybrid synthesis, amine **5** was synthesized as well, through five reaction steps. The structure of novel compound was confirmed using standard analytical and spectroscopic methods (IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR). Antimalarial and antiproliferative activity of the synthesized hybrid **6** will be evaluated in the future studies

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

Thesis includes: 42 pages, 15 figures, 2 tables and 54 references. Original is in Croatian language.

Keywords: malaria, artemisinin, harmine, amide, hybrid molecule, coupling reaction

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

Hrvoje Rimac, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August, 2022.

