

Sinteza i karakterizacija harmicina, hibrida harmina i derivata cimetine kiseline, u položaju N-9 β -karbolinskog prstena

Vrdoljak, Mislav

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:317413>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Mislav Vrdoljak

**Sinteza i karakterizacija harmicina, hibrida
harmina i derivata cimetine kiseline, u položaju
N-9 β -karbolinskog prstena**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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

Zahvaljujem prof. dr. sc. Zrinki Rajić na ukazanoj prilici da budem dio ovog projekta.

Posebne zahvale dragom mentoru dr. sc. Goranu Poje na pomoći, vodstvu i puno strpljenja koje je imao za mene. Hvala i ostalim kolegama iz laboratorija, bili su dobro društvo i velika pomoć.

Puno hvala obitelji i prijateljima te djevojci Ivani koji su mi bili podrška u svemu.

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



SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tumor	2
1.1.1. Gliom	3
1.2. Multiformni glioblastom.....	3
1.2.1. Epidemiologija.....	4
1.2.2. Patogeneza i klasifikacija multiformnog glioblastoma.....	5
1.2.3. Terapija	6
1.3. Temozolomid.....	7
1.3.1. Mehanizam djelovanja	7
1.3.2. Rezistencija na temozolomid	8
1.4. Alkaloidi β -karbolinskog tipa.....	9
1.4.1. Harmin	10
1.4.2. Djelovanje harmina i njegovih derivata na multiformni glioblastom.....	11
1.5. Cimetna kiselina	13
1.5.1. Djelovanje cimetne kiseline i derivata na multiformni glioblastom.....	14
1.6. Triazol.....	15
1.6.1. Klik-kemija	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Sinteza etilnih estera derivata cimetne kiseline (1a-c). Opća metoda.....	24
Etil-(<i>E</i>)-3-(3-bromfenil)prop-2-eonat (1a).....	24
Etil-(<i>E</i>)-3-(3-fluorfenil)prop-2-eonat (1b)	24
Etil-(<i>E</i>)-3-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)prop-2-eonat (1c)	24
3.2. Sinteza alkohola derivata cimetne kiseline (2a-c). Opća metoda.....	25
(<i>E</i>)-3-(3-bromfenil)prop-2-en-1-ol (2a).....	25
(<i>E</i>)-3-(3-fluorfenil)prop-2-en-1-ol (2b)	25
(<i>E</i>)-3-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)prop-2-en-1-ol (2c).....	25
3.3. Sinteza azida derivata cimetne kiseline (3a-c). Opći propis.....	25
(<i>E</i>)-1-(3-azidoprop-1-en-1-il)-3-brombenzen (3a)	26
(<i>E</i>)-1-(3-azidoprop-1-en-1-il)-3-fluorbenzen (3b).....	26
(<i>E</i>)-5-(3-azidoprop-1-en-1-il)benzo[d][1,3]dioksol (3c)	27
3.4. Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-b]indola (4)	27

3.5. Sinteza harmicina (5a-c). Opća metoda	28
1-[(2 <i>E</i>)-3-(3-bromfenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il}metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol (5a)	28
1-[(2 <i>E</i>)-3-(3-fluorfenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il}metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol (5b)	29
1-[(2 <i>E</i>)-3-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioksol-5-il)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il}metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol (5c)	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Sinteza	32
4.2. <i>In silico</i> procjena oralne bioraspoloživosti i farmakokinetičkih svojstva harmicina	40
5. ZAKLJUČAK.....	44
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	46
7. LITERATURA	49
8. SAŽETAK/SUMMARY	59
9. PRILOZI.....	62
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

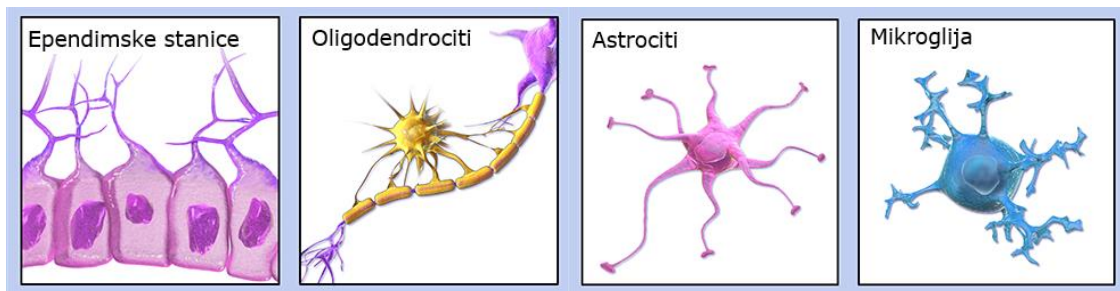
1.1. Tumor

Tumor ili neoplazma je naziv za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu. Nastaje zbog sloma regulacijskih mehanizama koji upravljaju proliferacijom, diferencijacijom i preživljenjem normalnih stanica. Postoje dobroćudni (benigni) i zloćudni (maligni) tumori koji su poznati kao rak. Dobroćudni tumori su spororastući i ostaju ograničeni na mjesto na kojem su nastali, dok zloćudni brže proliferiraju i šire se po čitavom tijelu (metastaziraju) zbog čega ometaju funkciju normalnih tkiva i organa (Cooper, 2019). Prema tkivnom podrijetlu razlikujemo karcinome, koji zahvaćaju stanice epitela i čine 90 % svih vrsta raka, sarkome (tumore vezivnih tkiva) te leukemije i limfome koji nastaju iz krvotvornih stanica i stanica imunskog sustava (Mohan, 2015; Cooper, 2019).

Proces nastanka tumora sastoji se od više koraka koji uključuju mutacije gena i selekciju stanica sa sve izraženijim sposobnostima proliferacije, preživljavanja i metastaziranja. Inicijacija tumora, prvi korak u ovom procesu, rezultat je genskih promjena koje dovode do nenormalne proliferacije samo jedne stanice (progenitorska stanica) (Cooper, 2019). Nastanku tumora najviše pridonose mutacije gena koje rezultiraju aktivacijom protoonkogeno (npr. *ras* gen) i deaktivacijom tumor-supresorskih gena (npr. TP53) (Graham, 2017). Progenitorska stanica nema sve karakteristike tumorske stanice, ali se umnaža brže u odnosu na normalne stanice i stvara početnu populaciju tumorskih stanica. Ove stanice su zbog brzog dijeljenja i manjka mehanizama za popravak DNA genetički nestabilne i često mutiraju. Ako određena mutacija daje selektivnu prednost nekoj stanici (npr. brži rast) klonovi te stanice postat će dominantni u tumorskoj populaciji. Ovaj proces naziva se klonalna selekcija (Cooper, 2019). Stanice tumora klonalnom selekcijom razvijaju zajednička obilježja poput održavanja proliferativne signalizacije, otpornosti prema supresorima rasta, izbjegavanja programirane stanične smrti (apoptoze), replikacijske besmrtnosti, indukcije angiogeneze i metastaziranja (Hanahan i Weinberg, 2011). Klonalna selekcija se ponavlja tijekom razvoja tumora zbog čega tumor raste brže i postaje maligniji (Cooper, 2019).

1.1.1. Gliom

Gliom je naziv za tumore nastale iz glije, potpornih stanica živčanog sustava. U središnjem živčanom sustavu (engl. *central nervous system*, CNS) postoje 3 vrste glija stanica: astrociti, oligodendrociti, ependimske stanice (Mohan, 2015), a neki literaturni izvori u gliju ubrajaju i stanice mikroglije (Jäkel i sur., 2017) (Slika 1). Najbrojniji su astrociti, zvjezdolike stanice, koji vrše brojne funkcije: podržavaju strukturu i održavaju homeostazu CNS-a, reguliraju metabolizam, sintetiziraju glikogen i djeluju neuroprotektivno. Osim toga, sudjeluju u ponovnoj pohrani i recikliranju neurotransmitora, propagaciji signala između neurona, održavaju pH izvanstanične tekućine u CNS-u, uklanjaju slobodne radikale i reguliraju funkciju krvno-moždane barijere (Wei i Morrison, 2023; Cabezas i sur., 2014). Funkcija oligodendrocita je stvaranje i održavanje mijelina u CNS-u, dok ependimske stanice utječu na stvaranje i sastav cerebrospinalnog likvora i svojim cilijama pomažu u njegovom protoku (Mohan, 2015). Mikroglija su male stanice koje imaju sposobnost fagocitoze i pomažu pri uklanjanju apoptotičkih stanica, plakova i patogena (<https://faculty.sites.uci.edu/kimgreen/>).



Slika 1. Glijne stanice CNS-a (preuzeto s <https://www.uq.edu.au/>)

Astrocitomi, tumori astrocita, su najčešća vrsta glioma. Imaju tendenciju progresije iz niže razine anaplazije u višu i prema tome su podijeljeni u 4 stupnja: 1) difuzni astrocitom, 2) dobro diferencirani astrocitom, 3) anaplastični astrocitom i 4) multiformni glioblastom (engl. *glioblastoma multiforme*, GBM). Astrociti nižih stupnjeva se sporije šire i imaju bolju prognozu bolesti, dok astrocite viših stupnjeva karakterizira brže pogoršanje stanja pacijenta i lošija prognoza (Mohan, 2015).

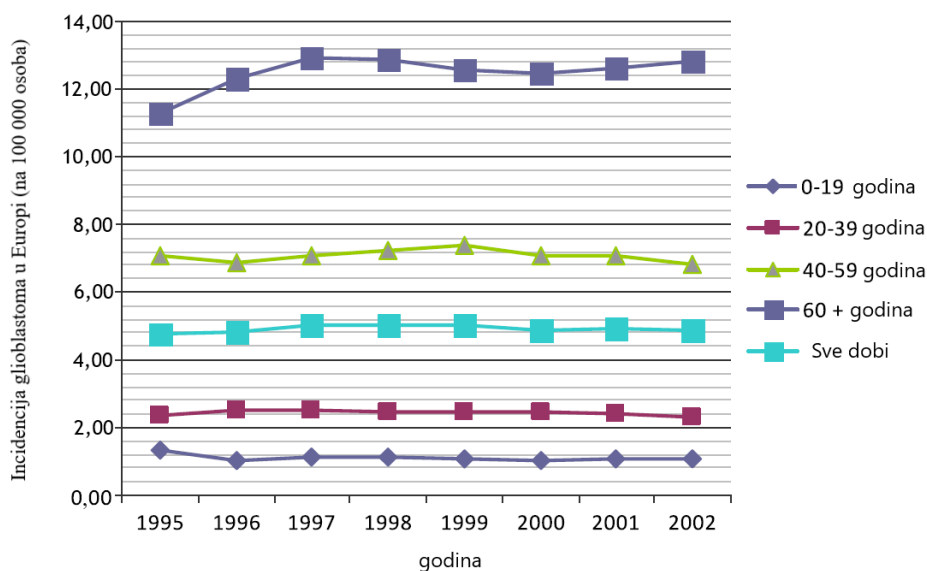
1.2. Multiformni glioblastom

GBM je najagresivniji i najinvazivniji astrocitom. Jednogodišnje preživljenje je 40 %, petogodišnje 5 % (Ostrom i sur., 2017), dok medijan preživljenja iznosi samo 15 mjeseci

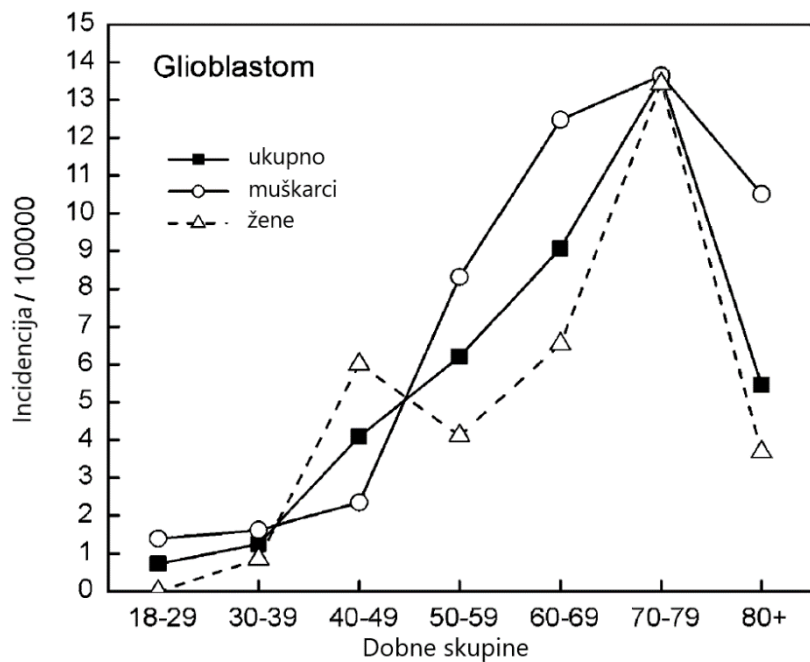
(Grochans i sur., 2022). Uglavnom zahvaća frontalni (25,8 %) , temporalni (19,7 %) i parijetalni režanj mozga (12,2 %) (Wirsching i sur., 2016). Simptomi su različiti, ovisno o dijelu mozga koji je zahvaćen tumorom, a najčešće uključuju perzistirajuće glavobolje, povraćanje, zamućen vid, promjene raspoloženja te probleme s učenjem i pamćenjem (<https://www.aans.org>). GBM može biti primarni ako stanice 4. stupnja glioma nastanu *de novo*, bez kliničkih ili histoloških dokaza prekursorskih stanica nižeg stupnja. Primarni GBM-i su češći (90 % svih slučajeva), pogotovo kod starijih osoba, i imaju lošiju prognozu bolesti. Sekundarni (manje česti) GBM-i se razvijaju iz prethodno dijagnosticiranih glioma 2. ili 3. stupnja. Javljaju se kod mlađih pacijenata i imaju bolju prognozu bolesti (Ohgaki i Kleihues, 2013).

1.2.1. Epidemiologija

GBM čini 48 % svih zloćudnih tumora CNS-a i najčešći je maligni primarni tumor ovog organskog sustava. Ukupna incidencija po svim dobnim skupinama je 3,19 – 4,17 na 100 000 osoba, ovisno o literaturnom izvoru. Incidencija raste s dobi i kod mlađih od 20 godina iznosi oko 1,2 na 100 000 osoba, dok kod starijih od 60 godina iznosi oko 13 na 100 000 osoba (Slika 2) (Crocetti i sur., 2012). Epidemiološka studija provedena na sjeveru Hrvatske ustanovila je slične trendove (Slika 3).



Slika 2. Incidencija GBM-a u Europi u razdoblju 1995. – 2002. (preuzeto iz Crocetti i sur., 2012, uz dopuštenje autora)



Slika 3. Incidencija GBM-a po dobnim skupinama na sjeveru Hrvatske u razdoblju 1996. – 2004. (preuzeto iz Dobec-Meić i sur., 2006, uz dopuštenje autora)

1.2.2. Patogeneza i klasifikacija multifornog glioblastoma

S obzirom na genske promjene i histopatologiju Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je GBM klasificirala u 4 skupine. Prvu skupinu čini GBM s nemutiranom izocitrat dehidrogenazom (engl. *isocitrate dehydrogenase*, IDH) koji je ujedno i najčešći (90 % slučajeva), a drugu GBM s mutiranom IDH. U treću skupinu spada GBM s nespecificiranim mutacijama, a uključuje tumore za koje se mutacijski status nije mogao utvrditi zbog manjka biološkog materijala. U četvrtu skupinu, neklasificirani GBM (engl. *not-elsewhere-classified glioblastoma*), ubrajaju se GBM-i za koje postoje neslaganja između kliničkih, imunohistoloških i genetičkih svojstava tumora ili ako je otkrivena neka sasvim nova kombinacija svojstava tumora (Grochans i sur., 2022).

Mutirani IDH ima manji afinitet za prirodni supstrat izocitrat, a veći za α -ketoglutarat što rezultira nastankom 2-hidroksiglutarata, onkometabolita koji blokira dioksigenaze ovisne o alfa-ketoglutaratu. Rezultat je blokada demetilacije DNA i histona, što vodi aktivaciji faktora induciranog hipoksijom 1 i negativno utječe na diferencijaciju stanica. Smatra se da ova

promjena dovodi do razvoja glioma nižih razreda, a da bi se oni razvili u sekundarni glioblastom trebaju nastati i druge genske promjene (Reiter-Brennan i sur., 2018).

Mutacija gena za receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR), receptorske tirozin kinaze, uočena je kod 40 % svih GBM-a. Kod normalnih stanica epidermalni faktor rasta (EGF) vezanjem za izvanstaničnu domenu EGFR-a potiče unutarstaničnu kaskadu koja uzrokuje proliferaciju stanice. Mutacijom gena za EGFR (npr. EGFRvIII) nizvodni putovi postaju konstitutivno aktivni što dovodi do nenormalne proliferacije stanica (Heimberger i Sampson, 2009).

Ostale bitne mutacije su inaktivacija tumor supresorskog proteina p53, pojačana aktivnost telomerazne reverzne transkriptaze (TERT) i gubitak funkcije fosfataze i tenzinskog homologa (PTEN) (Grochans i sur., 2022). Poznavanje ovih genskih promjena pomaže u karakterizaciji tumora i razumijevanju njegove progresije, razvijanju specifične terapije i optimizaciji postojeće.

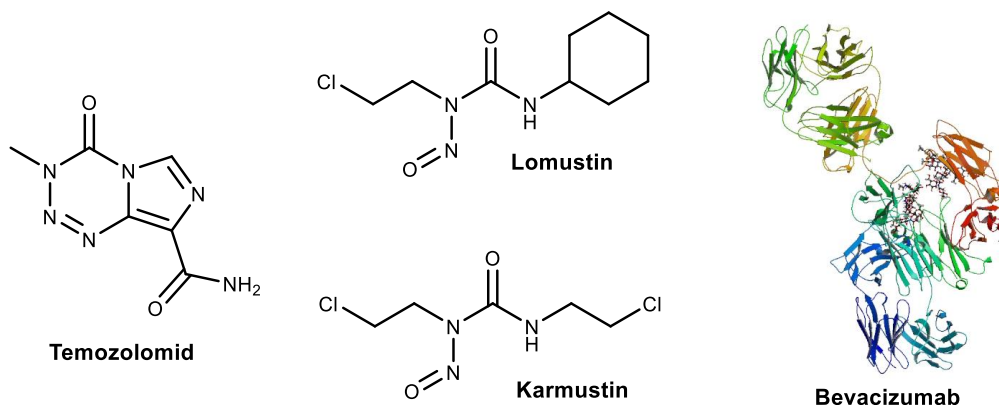
1.2.3. Terapija

Postojeća terapija ne dovodi do izlječenja bolesti, ali produljuje preživljenje pacijenta. Uključuje operaciju (kiruršku resekciju tumora), nakon čega slijedi radioterapija i kemoterapija (Ali i sur., 2020). Resekcijom se nastoji ukloniti što veća masa tumora i minimalno oštetiti okolno tkivo, a time i funkcije poput govora, vida, motorike, ovisno u kojem dijelu mozga se tumor nalazi. Iako operacijom nije moguće ukloniti sve tumorske stanice jer infiltriraju u okolno zdravo tkivo, korisna je jer smanjuje masu tumora i intrakranijalni tlak, a uklanjanjem stanica u središtu tumora daljnja terapija biva uspješnija (<https://www.aans.org>).

Nakon operacije i zacjeljivanja rane slijedi 6 tjedana kombinirane terapije koja uključuje radioterapiju i kemoterapiju. Radioterapija se daje u 30 frakcija, a ukupna doza zračenja iznosi 60 Gy (Ali i sur., 2020). Zračenje uništava tumorske stanice infiltrirane u okolno tkivo, dok slabije djeluje na normalne stanice (<https://www.aans.org>). Radioterapijom nije moguće uništiti sve stanice raka jer one postaju rezistentne zbog specifičnog tumorskog mikrookoliša, hipoksije, matičnih stanica glioma i heterogenosti tumora (Ali i sur., 2020).

Kao standard u kemoterapiji koristi se temozolomid (TMZ) (Slika 4). Tijekom kombinirane terapije daje se u dozi 75 mg/m²/dan, a po završetku kombinirane terapije, u sklopu terapije

održavanja, u dozi 150-200 mg/m²/dan tijekom prvih pet dana 28-dnevnog ciklusa (Fernandes i sur., 2017). Ostali lijekovi odobreni za terapiju GBM-a su bevacizumab (monoklonsko protutijelo protiv vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), te alkilirajući agensi lomustin i karmustin (<https://www.ema.europa.eu/en>) (Slika 4). Meta analiza iz 2021. pokazala je da monoterapija bevacizumabom povećava preživljenje bez progresije bolesti, ali ne i ukupno preživljenje, dok kombinirana terapija bevacizumabom i lomustinom smanjuje progresiju tumora i statistički značajno povećava ukupno preživljenje (Ren i sur., 2021).



Slika 4. Lijekovi koji se koriste u terapiji GBM-a (prikaz bevacizumaba preuzet s <https://go.drugbank.com>)

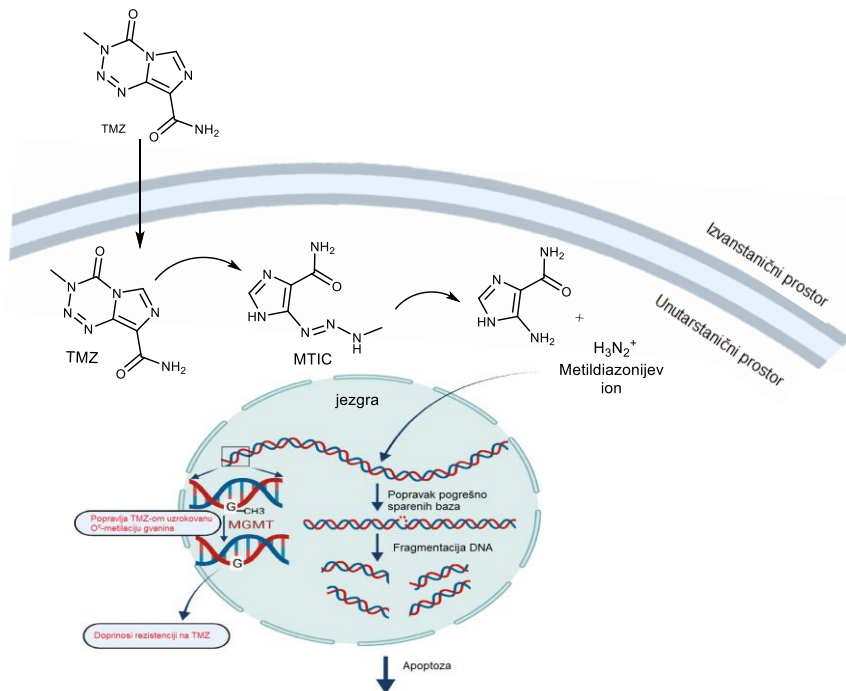
1.3. Temozolomid

TMZ je imidazotetrazinski alkilirajući agens koji je indiciran za terapiju GBM-a i anaplastičnog astrocitoma (<https://www.ema.europa.eu/>). Primjenjuje se peroralno ili intravenski. Najčešće nuspojave koje uzrokuje TMZ su mučnina i povraćanje, oportunističke infekcije, neutropenija, trombocitopenija, agitacija, depresija i duboka venska tromboza (<https://mediately.co/hr>). Kontraindiciran je kod osoba koje su prije pokazale preosjetljivost na djelatnu tvar ili dakarbazin i u slučaju teške mijelosupresije (<https://www.ema.europa.eu>).

1.3.1. Mehanizam djelovanja

TMZ se nakon peroralne primjene brzo i potpuno apsorbira iz GIT-a i prolazi krvno-moždanu barijeru. Stabilan je pri kiselom i neutralnom pH, dok se u slabo bazičnom spontano pregrađuje u 5-(3-metil-1-triazenil)imidazol-4-karboksamid (MTIC). Potonji metabolit se spontano i brzo

raspada u metildiazonijev ion, aktivni alkilirajući agens (Friedman i sur., 2000). Metildiazonijev ion metilira *N*-7 i *O*-6 položaje gvanina te *N*-3 položaj adenina što dovodi do pogrešnog sparivanja baza. Aktivira se sustav popravka pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch repair*) što rezultira fragmentacijom DNA, zaustavljanjem staničnog ciklusa u G2/M fazi i apoptozom (Slika 5) (Tomar i sur., 2021).



Slika 5. Mehanizam aktivacije i djelovanja TMZ-a (preuzeto i prilagođeno prema Tomar i sur., 2021, uz dopuštenje izdavača)

1.3.2. Rezistencija na temozolomid

Tumorske stanice imaju razvijene mehanizme popravka metiliranih dušičnih baza koji im omogućuju razvoj rezistencije i uzrokuju gubitak učinkovitosti TMZ-a (Slika 5). Važni enzimi koji sudjeluju u razvoju rezistencije na TMZ su *O*-6-metilgvanin-DNA metiltransferaza (MGMT), koja demetilira *O*-6-metilgvanin, i DNA-glikozilaza koja popravljala oštećenja DNA nastala zbog *N*-7-metilgvanina i *N*-3-metiladenina (Tang i sur., 2011).

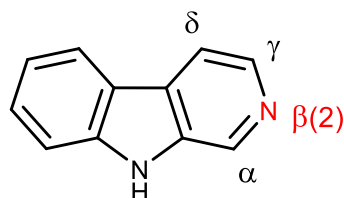
Metilacija promotora za MGMT smanjuje njegovu ekspresiju. Kod GBM-a s metiliranim promotorom za MGMT i time manjom ekspresijom proteina preživljenje nakon liječenja TMZ-

om je duže jer MGMT u manjoj mjeri poništava djelovanje lijeka (Hegi i sur., 2005). Nasuprot tome, povećana ekspresija MGMT je glavni uzrok za rezistenciju stanica GBM-a na TMZ.

Osim na razini popravka DNA, rezistencija na TMZ se javlja zbog povećanog efluksa, indukcije autofagije i izbjegavanja apoptoze. Ovi procesi regulirani su mikro-RNA (miRNA) molekulama, koje posttranskripcijski reguliraju ekspresiju gena. Pretjerana ekspresija onkogenih ili smanjena ekspresija tumor-supresorskih miRNA doprinose razvoju rezistencije na TMZ (Tomar i sur., 2021).

1.4. Alkaloidi β -karbolinskog tipa

U skupinu β -karbolina spadaju alkaloidi i srodni sintetski spojevi koji u strukturi sadrže triciklički pirido[3,4-*b*]indolski prsten. S obzirom na položaj atoma dušika u piridinskom prstenu, postoje α -, β -, γ - i δ -karbolini. Prefiks β u nazivu ove skupine spojeva označava da se dušik nalazi u položaju 2 (Slika 6). Ovisno o zasićenosti piridinskog prstena postoje nezasićeni β -karbolini, djelomično nezasićeni β -karbolini (dihidro- β -karbolini) i zasićeni β -karbolini (tetrahidro- β -karbolini) (Aaghaz i sur., 2021).

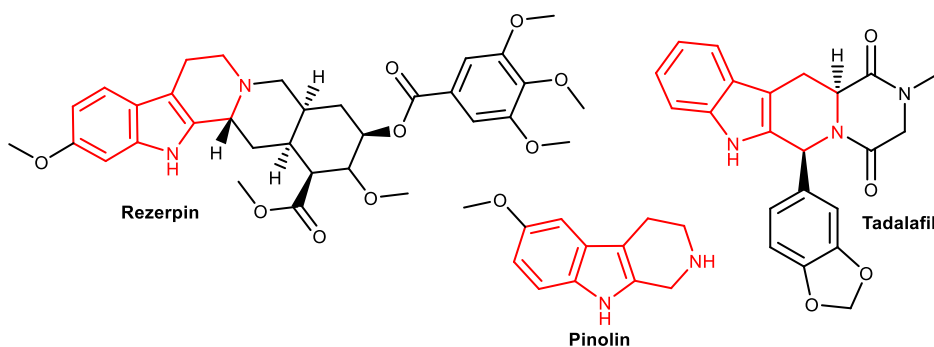


Slika 6. β -Karbolinjska jezgra

β -karbolini i njihovi derivati posjeduju široki spektar djelovanja, uključujući protutumorsko (Zheng i sur., 2014), antimikrobno (Nenaah, 2010), antimalarijsko (Perković i sur., 2020), sedativno (Smith i sur., 2013) i hipnotičko zbog čega se intenzivno istražuju u području farmaceutске kemije (Kaijima i sur., 1984).

Prirodni β -karbolini mogu se pronaći u biljkama iz porodica Rutaceae, Caryophyllaceae, Rubiaceae, Simaroubaceae i Zygophyllaceae, morskim organizmima poput koralja, žarnjaka, spužvi, prehrambenim proizvodima, alkoholnim pićima, duhanskom dimu, ljudskim tkivima i tjelesnim tekućinama (Aaghaz i sur., 2021). Poznati primjeri su pinolin, koji inhibira ponovnu pohranu serotonina i monoaminooksidazu A (MAO-A), a stimulira neurogenezu (de la Fuente

Revena i sur., 2015), i rezerpin, izoliran iz korijena biljke *Rauwolfia serpentina*, koji se koristi za snižavanje povišenog krvnog tlaka (Siddiqui i sur., 2020).

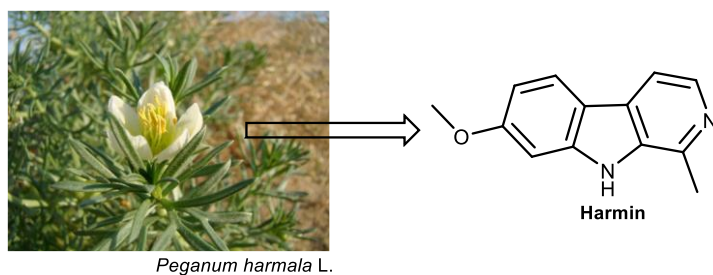


Slika 7. Kemijske strukturne formule odabranih β -karbolina

Primjer sintetskog β -karbolina je tadalafil (Slika 7), inhibitor fosfodiesteraze 5, koji ima vazodilatatorno djelovanje te se koristi u liječenju erektilne disfunkcije, plućne arterijske hipertenzije i simptoma benigne hiperplazije prostate (<https://mediately.co/hr>).

1.4.1. Harmin

Harmin, prema IUPAC-u 7-metoksi-1-metil-9H-pirido-[3,4-b]indol, je jedan od poznatijih i dobro istraženih β -karbolina. Izoliran je iz sirijske rutvice (*Peganum harmala* L., Nitrariaceae), biljke koja raste na Bliskom istoku i u nekim dijelovima Kine (Slika 8) (Zhang i sur., 2020).



Slika 8. Sirijska rutvica i harmin (preuzeto s <https://hr.wikipedia.org>)

Harmin ispoljava mnoga farmakološka djelovanja poput protutumorskog, antioksidativnog (Moura i sur., 2007), antimikrobnog (Ahmad i sur., 1992), antiparazitskog, protuupalnog, neuroprotektivnog i antidijabetskog (Zhang i sur., 2020). Protutumorsko djelovanje posljedica je različitih mehanizama djelovanja: interkaliranja u DNA, inhibicije topoizomeraze i kinaza ovisnih o ciklinima, izazivanja apoptoze (Sharma i sur., 2016). Uz to, harmin suprimira

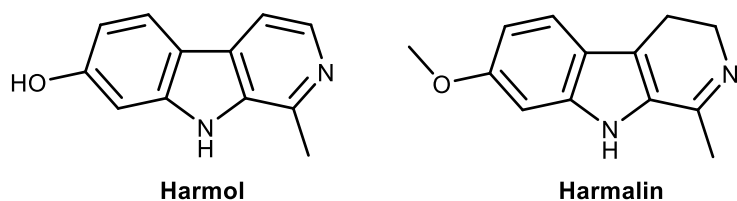
tumorsku angiogenezu smanjenjem sinteze VEGF, receptora VEGF 2 i dušičnog oksida, povećava koncentraciju protutumorskih faktora poput interleukina-2 i metaloproteinaza matriksa (MMP), a smanjuje koncentraciju protumorskih poput nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) (Hamsa i Kuttan, 2010). Istraživanjima je potvrđeno protutumorsko djelovanje harmina na karcinome želuca, pluća, dojke, jetre i kolona (Zhang i sur., 2020) i GBM-a (Zhu i sur., 2021).

1.4.2. Djelovanje harmina i njegovih derivata na multififormni glioblastom

Zhu i suradnici ispitali su djelovanje harmina *in vitro* na dvije humane stanične linije GBM-a: U251 (mutirani IDH, PTEN, TERT i TP53) i U373 (mutirani PTEN, TERT i TP53) (<https://www.cellosaurus.org>). Uočili su da harmin značajno inhibira proliferaciju tumorskih stanica ovisno o dozi i vremenu. Molekularni mehanizam inhibicije je smanjenje bazalne i EGF-om uzrokovane fosforilacije kinaze fokalne adhezije (FAK) i protein kinaze B (Akt). FAK/Akt signalni put kontrolira preživljavanje, migraciju i apoptozu stanica, a smanjenje aktivnosti ovog puta negativno utječe na proliferaciju stanica. Osim toga, otkrili su da harmin smanjuje razinu MMP-a 2 i 9 te VEGF-a čime inhibira migraciju U251 stanica. Harmin je u *in vivo* ispitivanjima na mišjim modelima ksenografta s humanim GBM-om inhibirao rast tumora (Zhu i sur., 2021).

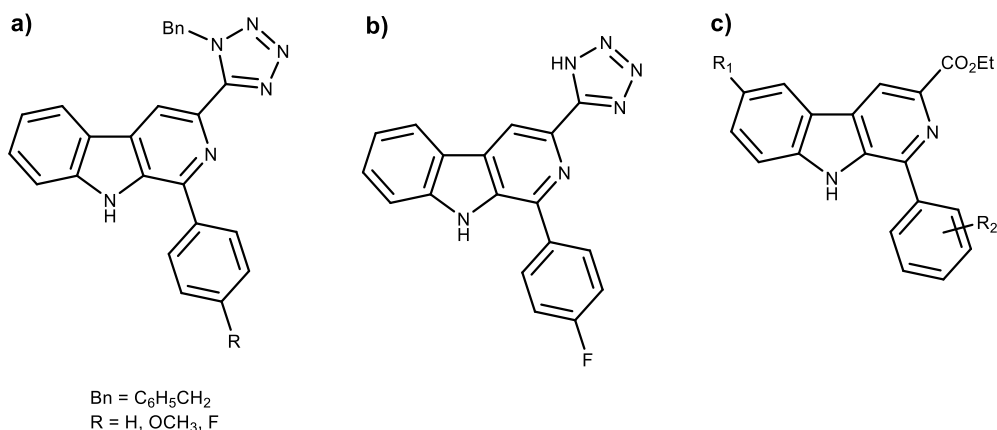
Harmin i njemu srodan β -karbolin harmol (Slika 9a) inhibitori su dvostruko-specifične fosforiliranim tirozinom regulirane kinaze 1A (DYRK1A) koja je prekomjerno eksprimirana u stanicama glioma. Inhibicija DYRK1A smanjuje vijabilnost tumorskih stanica, inducira apoptozu i smanjuje rast GBM-a ovisan o EGFR-u. Harmin, uz DYRK1A, inhibira i MAO-A što dovodi do neželjenih učinaka, dok harmol selektivno djeluje na DYRK1A. Osim toga, harmol je u *in vivo* ispitivanjima na mišjim modelima ksenografta s humanim GBM pokazao snažnije djelovanje u odnosu na harmin (Tarpley i sur., 2021).

Vahedi i suradnici ispitali su djelovanje harmalina (Slika 9b) na humanu staničnu liniju GBM-a U-87. Pokazali su da harmalin smanjuje proliferaciju i potiče apoptozu stanica te suprimira aktivnost MMP-a 2 i 9 čime smanjuje migraciju i potencijalno metastaziranje tumorskih stanica (Vahedi i sur., 2023).



Slika 6. Kemijske strukturne formule harmola (a) i harmalina (b)

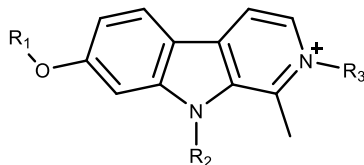
Panice i suradnici pripravili su 3-tetrazolil- β -karboline i β -karbolin-3-karboksilate (Slika 10) te su ispitali njihovo djelovanje na nizu humanih tumorskih staničnih linija, uključujući U251. U seriji tetrazola (Slika 10a) najsnažnije djelovanje ostvario je derivat supstituiran fluorom ($R = F$, $IC_{50} = 1,38 \mu M$), dok je njegov analog (Slika 10b) koji u strukturi ne sadrži benzilnu skupinu (Bn) pokazao slabije djelovanje. U seriji karboksilata (Slika 10c) najsnažnije je djelovao derivat supstituiran metoksi (R_1) i *p*-dimetilamino (R_2) skupinama ($IC_{50} = 0,95 \mu M$). Svi pripremljeni tetrazoli i karboksilati djelovali su slabije u odnosu na referentni lijek doksorubicin (Panice i sur., 2019).



Slika 10. β -Karbolski tetrazoli i karboksilati

Frédéric i suradnici pripravili su 50-ak novih mono-, di- i trisupstituiranih β -karbolina koji su strukturno slični harminu (Slika 11) te ispitali njihovo antiproliferativno djelovanje na tri stanične linije glioma (U373, T98G i Hs683) i dvije stanične linije ezofagealnog karcinoma (OE21 i OE23). Disupstituirani derivati koji nisu supstituirani u položaju *N*-2 (ne sadrže R_3) pokazali su značajno slabije antiproliferativno djelovanje u odnosu na trisupstituirane derivate. S druge strane, gotovi svi trisupstituirani derivati ostvarili su 10 puta snažnije djelovanje u odnosu na harmin. Ciklički lipofilni supstituenti poput benzila, 3'- ili 4'-fluorbenzila i metilcikloheksila u položajima *O*-7 i *N*-9 (supstituenti R_1 i R_2) značajno su doprinijeli

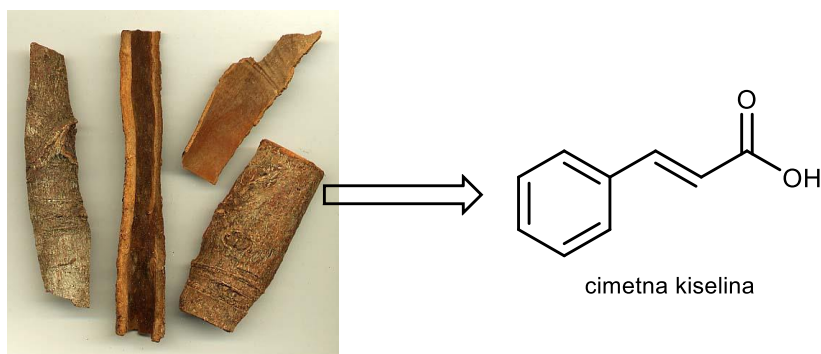
antiproliferativnom djelovanju. Općenito, uočeno je da lipofilniji derivati veće relativne molekulske mase ispoljavaju snažnije djelovanje (Frédérick i sur., 2012).



Slika 11. Mono-, di- i trisupstituirani β -karbolini

1.5. Cimetna kiselina

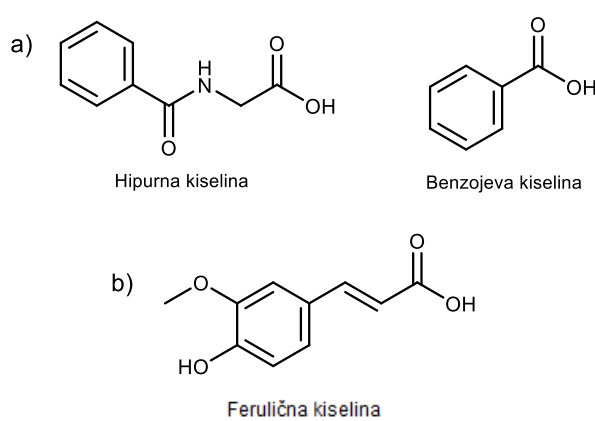
Cimetna kiselina (3-fenilprop-2-enska ili fenilakrilna kiselina) je aromatska kiselina široko rasprostranjena u prirodi, posebno u kori biljaka iz roda *Cinnamomum* (Slika 12) (Ruwizhi i Aderibigbe, 2020). Cimetna kiselina i njeni derivati (DCK-i) koriste se u proizvodnji mirisa i okusa, a imaju i brojna fiziološka djelovanja poput protutumorskog, antioksidativnog, antimikrobnog, hepatoprotektivnog, anksiolitičkog i antidijabetičkog (Sharma, 2011). Protutumorsko djelovanje DCK-i postižu raznim mehanizmima djelovanja poput zaustavljanja staničnog ciklusa, narušavanja staničnog citoskeleta, aktivacije kaspaza, generiranja reaktivnih kisikovih vrsta te inhibicije histonskih deacetilaza. Reguliraju funkciju MMP-a što negativno utječe na invaziju tumora (De i sur., 2011). Osim toga, inhibiraju NF- κ B čime smanjuju rast tumora, te izazivaju apoptozu povećanom sintezom proapoptotskih proteina (Onori i sur., 2009).



Slika 12. Kora vrste *Cinnamomum cassia*, L., Lauraceae i cimetna kiselina (preuzeto s <https://en.wikipedia.org/>)

1.5.1. Djelovanje cimetine kiseline i njenih derivata na multififormni glioblastom

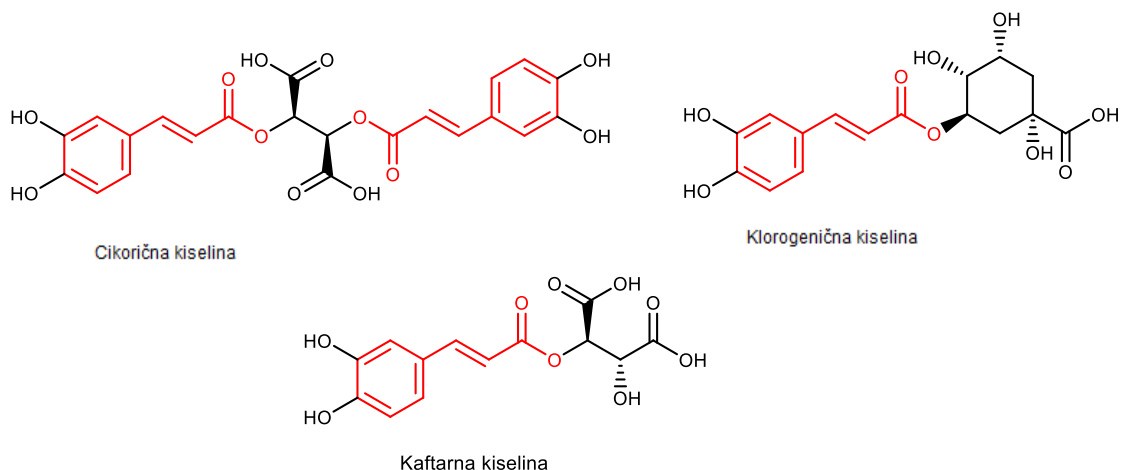
Liu i suradnici istražili su protutumorsko djelovanje cimetine kiseline i njenih glavnih metabolita, hipurne i benzojeve kiseline (Slika 13a), na različite humane tumorske stanične linije: A549 (adenokarcinom alveolarnog bazalnog epitela), PC-3 i Du145 (karcinom prostate), A172 i U251 (glioblastom) te SK-MEL-28 i A375 (maligni melanom). Cimetna kiselina je inhibirala rast svih staničnih linija u koncentracijama 5-20 puta manjim od onih koje uzrokuju inhibiciju rasta normalnih stanica (FS-4, fibroblasti ljudskog prepucija), dok hipurna i benzojeva kiselina nisu inhibirale rast ni tumorskih ni zdravih stanica (Liu i sur., 1995).



Slika 13. Kemijske strukturne formule hipurne i benzojeve kiseline (a) te ferulične kiseline (b)

Naumowicz i suradnici ispitali su djelovanje cimetine i ferulične kiseline (Slika 13b) na LN-229 humanoj staničnoj liniji GBM-a. Iako su obje kiseline smanjile vijabilnost ispitivanih stanica, cimetna kiselina je ispoljila snažnije djelovanje. Daljnja istraživanja pokazala su da ove molekule stupaju u interakciju sa staničnom membranom i mijenjaju površinsku gustoću električnog naboja (Naumowicz i sur., 2020).

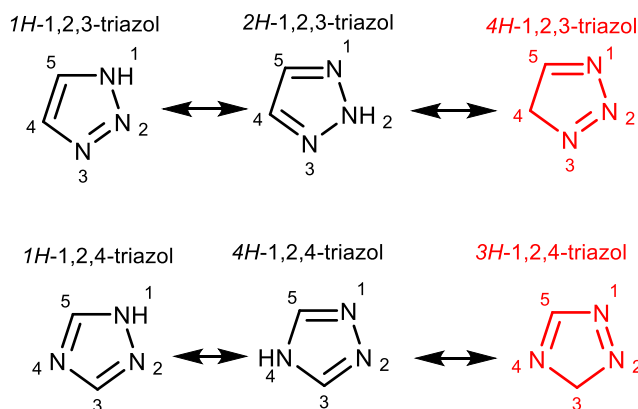
Fulga i suradnici istražili su anti-GBM djelovanje ekstrakata dobivenih iz ljekovitog maslačka na humanoj staničnoj liniji GBM-a U-138. Ekstrakti ove biljke sadrže veće količine derivata cimetine kiseline: cikoričnu, klorogeničnu i kaftarnu kiselinu (Slika 14). Anti-GBM djelovanje ekstrakta bilo je usporedivo s doksorubicinom, referentnim lijekom, i ovisilo je o vrsti ekstrakta i koncentraciji derivata cimetine kiseline (Fulga i sur., 2023).



Slika 14. Kemijske strukturne formule cikorične, klorogenične i kaftarne kiseline (crvenom bojom je istaknut motiv cimetine kiseline)

1.6. Triazol

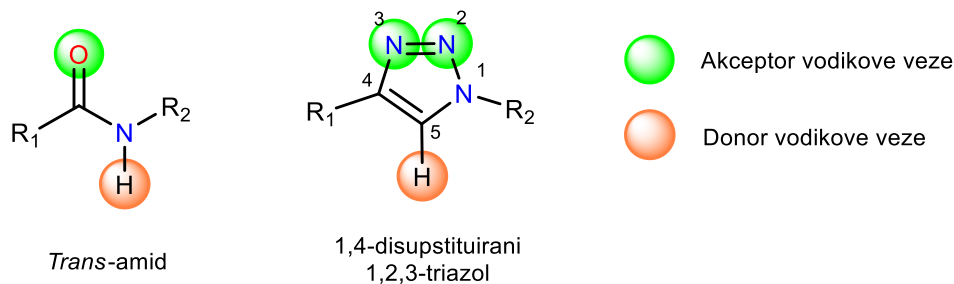
Triazol je peteročlani prsten građen od 3 dušikova i 2 ugljikova atoma, molekulske formule $C_2H_3N_3$. S obzirom na raspored dušikovih atoma može postojati u dva izomerna oblika: 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol. Svaki izomer ima 2 aromatska i 1 nearomatski tautomer (Slika 15) (Song i Deng, 2018).



Slika 15. Tautomeri triazola (crna boja – aromatski tautomeri, crvena boja – nearomatski tautomeri)

1,2,3-Triazolski prsten zanimljiv je za područje farmaceutske kemije jer pokazuje brojna biološka djelovanja poput antimikrobnog, antiviralnog, antituberkulotskog, antidepresivnog, protuupalnog i protutumorskog (Ayati i sur., 2016). Bioizoster je amida, funkcionalne skupine

koja je prisutna u strukturi velikog broja ljekovitih tvari. 1,5-disupstituirani triazoli su izosteri *cis*-amida, a 1,4-disupstituirani triazoli su izosteri *trans*-amida (Slika 16) (Bonandi i sur., 2017).



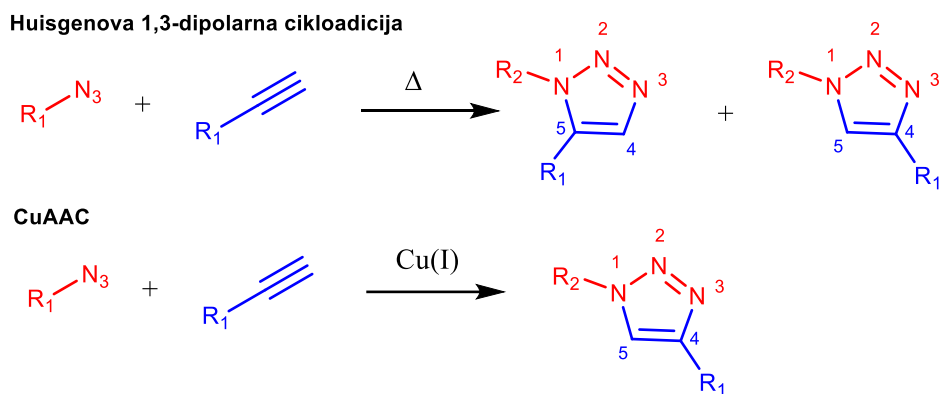
Slika 16. Strukturne sličnosti *trans*-amida i 1,4-disupstituiranog 1,2,3-triazola

Triazol je otporan na oksidaciju i redukciju te manje podložan metaboličkim reakcijama u odnosu na amid. Zbog velikog dipolnog momenta stvara dipol-dipol interakcije, a s obzirom da sadrži aromatski prsten, može stupati i u π -interakcije (Krzywik i sur., 2021). Uz sve to, relativno se jednostavno priprema reakcijom klik-kemije (Haldón i sur., 2015).

1.6.1. Klik-kemija

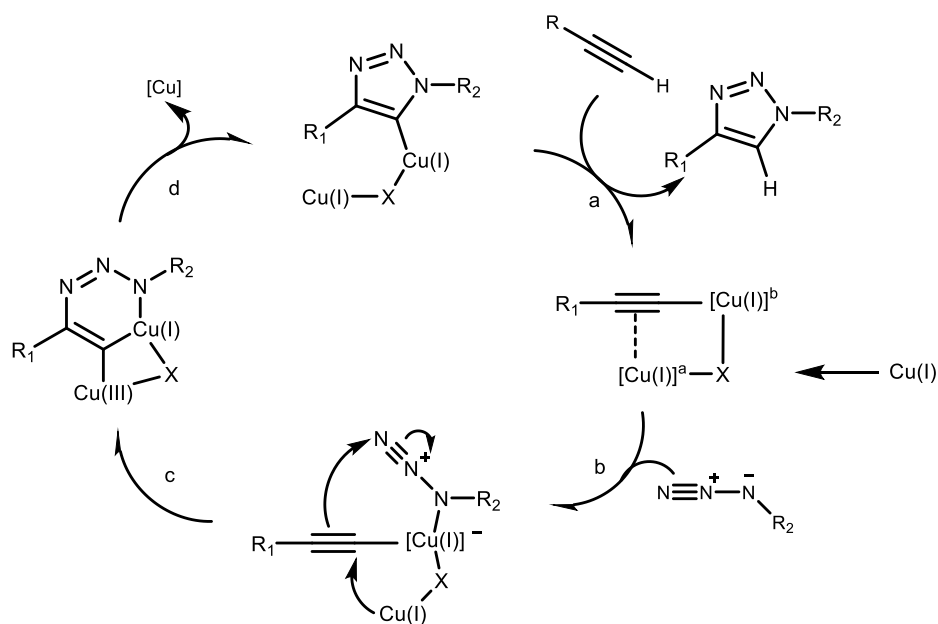
Pojam klik-kemije uveo je Karl Barry Sharpless 2001. kako bi opisao reakcije koje su široko primjenjive, visokog iskorištenja, stereospecifične, provedive uz blage reakcijske uvjete i otapala koja nisu štetna i lako se uklanjaju te daju produkte koji se jednostavno mogu izolirati iz reakcijske smjese (Devaraj i Finn, 2021; Kolb i sur., 2001).

Tipičan primjer reakcije klik-kemije je bakrom(I) katalizirana azid-alkin cikloadicija (CuAAC) koja je razvijena iz Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije. Klasična Huisgenova reakcija je spora i dugotrajna, provodi se pri visokim temperaturama, a produkt reakcije je ekvimolarna smjesa 1,4- i 1,5-disupstituiranog regioizomera 1,2,3-triazola. Istraživačke skupine predvođene Sharplessom i Meldalom nezavisno su otkrile da korištenje katalitičke količine bakra(I) ubrzava reakciju za 7 redova veličine, a kao produkt nastaje samo 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol (Slika 17) (Haldón i sur., 2015).



Slika 17. Usporedba Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije i CuAAC

Pretpostavljeni mehanizam CuAAC sastoji se od više koraka (Shema 1). U prvom koraku (a) dolazi do deprotoniranja alkina i stvaranja bakrovog acetilida. Iako je prvotni mehanizam kojeg su predložili Sharpless, Folkin i suradnici predviđao nastajanje σ -bakrovog acetilida, novija istraživanja pokazuju da je izglednije stvaranje σ,π -dibakrovog acetilida. π interakcija između elektronima bogatog alkina i Cu(I)^a pogoduje disocijaciji terminalnog vodika u alkinu i stvaranju σ interakcije s Cu(I)^b. Ovaj korak ubrzavaju tvari koje djeluju kao baze, npr. askorbat i acetat jer pomažu deprotoniranje alkina. Ligand (X) djeluje kao poveznica između dva bakrova iona. U idućem koraku (b) dolazi do interakcije σ,π -dibakrovog acetilida s azidom pri čemu nastaje azid/alkin/bakar(I) ternarni kompleks koji se pregrađuje u metalociklički intermedijer uz nastanak C-N veze (c). Redukcijom bakra i kontrakcijom prstena (d) nastaje bakrov(I) triazolid koji deprotonira alkin uz nastajanje triazola, a katalitički ciklus biva dovršen (Zhu i sur., 2016).



Shema 1. Mehanizam CuAAC

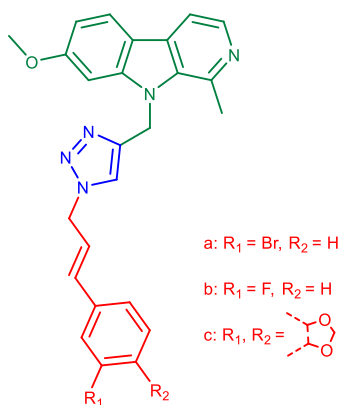
Katalitički aktivni Cu(I) ioni mogu se dodati u reakcijsku smjesu izravno korištenjem soli ili kompleksa koji sadrže Cu(I) ili se mogu generirati *in situ* iz prekatalizatora. Izravno korištenje soli Cu(I) (npr. CuI ili CuBr) je jednostavno i često se koristi, ali se reakcija mora odvijati u inertnoj atmosferi kako ne bi došlo do oksidacije Cu(I) u Cu(II) (Haldón i sur., 2015). Kompleksi Cu(I) rijetko se koriste jer su njihova priprava i skladištenje otežani zbog nestabilnosti. CuBr(PPh₃)₃ je primjer stabilnog kompleksa koji se priprema relativno jednostavno (Méndez-Ardoy i sur., 2009). Najčešće korišteni prekatalizator je CuSO₄·5H₂O koji u redoks-reakciji s natrijevim askorbatom daje Cu(I) ione. Natrijev askorbat se u reakciju dodaje u suvišku kako bi spriječio oksidaciju Cu(I) iona (Haldón i sur., 2015). Mogu se koristiti i drugi prekatalizatorski sustavi kao što je bakrov(II) acetat i metanol (Perković i sur., 2020). Bakrena žica također se može koristiti kao katalizator, jer se komproporcijom Cu(II) iona prisutnog u patini metala i Cu(0) stvara katalitički aktivni Cu(I). Vrijeme trajanja reakcije je duže, no reakcija se može ubrzati mikrovalnim zračenjem, a produkt je znatno manje onečišćen bakrovim ionima (Haldón i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

GBM je najčešći primarni maligni tumor CNS-a s medijanom preživljenja nakon dijagnoze od samo 15 mjeseci. Terapija ove bolesti uključuje operaciju (kirurško odstranjivanje) tumora, nakon čega slijede zračenje i kemoterapija. Trenutno postoji svega nekoliko lijekova koji se mogu koristiti u kemoterapiji: temozolomid, koji predstavlja standard, lomustin, karmustin i bevacizumab. Postojeći lijekovi ne dovode do izlječenja bolesti, već produljuju preživljenje pacijenta. Osim toga, zbog razvoja rezistencije s vremenom postaju neučinkoviti što dovodi do recidiva i progresije bolesti, a često ispoljavaju i neželjena djelovanja poput neurotoksičnosti. Zbog svega navedenoga, bitno je kontinuirano istraživati i razvijati nove, učinkovitije i sigurnije djelatne tvari za liječenje GBM-a.

Posljednjih desetljeća popularan pristup u razvoju novih lijekova je molekulska hibridizacija kojom se dvije bioaktivne molekule povezuju u jedinstvenu, hibridnu molekulu. Farmakofori u hibridnim molekulama djeluju sinergistički zbog čega ostvaruju snažnije biološko djelovanje. Osim toga, farmakofori djeluju različitim mehanizmima što je pogodno za terapiju kompleksnih bolesti poput raka, a hibridne molekule čini otpornijim prema razvoju rezistencije.

Cilj ovog diplomskog rada je priprava i karakterizacija hibrida harmina i derivata cimetne kiseline – harmicina (Slika 18). S obzirom da harmin ispoljava anti GBM-činak, a cimetna kiselina i DCK-i također djeluju protutumorski, očekuje se da će pripremljeni hibridi pokazati snažnije anti-GBM djelovanje u odnosu na roditeljske molekule. U pripravi hibrida korištena je reakcija klik-kemije kojom je generiran triazolski tip poveznice. Triazol je bioizoster amida, pokazuje dobra fizičko-kemijska svojstva i smatra da će pridonijeti farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima hibrida.



Slika 18. Opća strukturna formula predloženih harmicina (zelena boja – harminski dio, plava boja – triazol, crvena boja – cimetni dio)

3. MATERIJALI I METODE

Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka) te diklormetan/metanol (9:1), cikloheksan/etil-acetat (2:1 i 9:1), cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5) kao pokretne faze. Analizirani spojevi detektirani su UV ($\lambda = 254\text{nm}$) i parama joda. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Merck) uz iste pokretne faze kao u TLC-u. Pročišćavanje derivata dobivenih klik-reakcijom provedeno je kromatografijom na koloni uz dodatak sloja Al₂O₃ kako bi se uklonile zaostale bakrove soli. Iskorištenja reakcija nisu optimirana.

¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na NMR spektrometru Bruker Avance III HD (Bruker, SAD) kod 400 ili 600 MHz za ¹H i kod 75, 101 ili 151 MHz za ¹³C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO-*d*₆ 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 ¹H, odnosno signal DMSO-a u ¹³C spektru (39,52 ppm). Konstante sprege (*J*) izražene su u Hz. IR spektri snimljeni su na Paragon 500 instrumentu (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 6420 Triple Quad, SAD). Kao tehnika ionizacije korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom i/ili negativnom modu. Tališta (*t*_i) su određena na Stuart SMP3 instrumentu za određivanje tališta (Barloworld Scientific, UK) u otvorenim kapilarama i nisu korigirana.

Harmin i 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en (DBU) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Od iste tvrtke nabavljene su *m*-fluorcimetna kiselina, *m*-bromcimetna kiselina i 3,4-(metilendioksi)cimetna kiselina kao trans stereoizomeri ($\geq 99\%$). LiAlH₄ je nabavljen od tvrtke Merck (Njemačka). 2-azido-1,3-dimetilimidazolinijev heksafluorofosfat (ADMP), propargil-bromid, cezijev karbonat i *N,N*-dimetilformamid (DMF) nabavljeni su od tvrtke Tokyo Chemical Industry (Japan). Aceton, cikloheksan, metanol, etil-acetat, klorovodična kiselina, toluen i dietil-eter nabavljeni su od tvrtke Honeywell (SAD). Bakrov(II) acetat i trietilamin (TEA) nabavljeni su od tvrtke Alfa Aesar (SAD), diklormetan od tvrtke Fisher Chemical (SAD), a tionil-klorid od tvrtke Fluka (SAD). U reakcijama organske sinteze korištena su bezvodna otapala. Bezvodni dietil-eter nabavljen je od tvrtke J.T. Baker (SAD), a bezvodni DMF od tvrtke Tokyo Chemical industry (Japan). Bezvodni toluen dobiven je sljedećim postupkom: toluen je ekstrahiran vodom, osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destiliran i čuvan nad elementarnim natrijem. Sve kemikalije bile su *p. a.* čistoće.

Spojevi **1a-c**, **4** i **5a-c** pripravljeni su prema ranije objavljenim propisima (Perković i sur., 2019), dok su spojevi **2a-c** i **3a-c** pripravljeni prema modificiranim ranije objavljenim propisima (Perković i sur., 2019; Kitamura i sur., 2012).

3.1. Sinteza etilnih estera derivata cimetne kiseline (1a-c). Opća metoda

Suspenciji DCK-a (3 mmol) u 10 ml bezvodnog toluena dodan je tionil-klorid (1,09 mL, 15 mmol) i katalitička količina bezvodnog DMF-a te je reakcijska smjesa miješana 1 h na s.t. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja naparen je tri puta bezvodnim toluenom te je korišten u sljedećem reakcijskom koraku bez pročišćavanja.

Otopina odgovarajućeg kiselinskog klorida u bezvodnom diklormetanu (10 mL) dokapana je otopini TEA (0,42 mL, 3 mmol) u bezvodnom etanolu (5 mL) te je reakcijska smjesa miješana 3 h na s.t. Zatim je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a ostatak otopljen u etil-acetatu (20 mL) i ispran vodom (3 × 20 mL). Organski sloj sušen je nad bezvodnim Na₂SO₄, profiltriran, a otapalo uklonjeno iz filtrata uparavanjem pod sniženim tlakom te je dobiveno žuto ulje **1a-c**.

Etil-(E)-3-(3-bromfenil)prop-2-eonat (1a)

Količina reaktanta: 0,681 g *m*-bromcimetne kiseline.

Iskorištenje: 0,566 g (74 %).

Etil-(E)-3-(3-fluorfenil)prop-2-eonat (1b)

Količina reaktanta: 0,498 g *m*-fluorcimetne kiseline.

Iskorištenje: 0,472 g (81 %).

Etil-(E)-3-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)prop-2-eonat (1c)

Količina reaktanta: 0,577 g 3,4-(metilendioksi)cimetne kiseline.

Iskorištenje: 0,575 g (87 %).

3.2. Sinteza alkohola derivata cimetine kiseline (2a-c). Opća metoda

Otopini odgovarajućeg estera DCK-a **1a-c** (2,219 mmol) u bezvodnom dietil-eteru pri -5 °C dodan je LiAlH₄ (0,084 g, 2,219 mmol) u malim obrocima. Reakcijska smjesa miješana je 1 h na < 0 °C u atmosferi argona, nakon čega je dodana voda (20 mL). Smjesa je zakiseljena s nekoliko kapi 10 %-tne HCl do prestanka pjenjenja. Potom je dodan dietil-eter (10 mL) te je smjesa isprana 1 %-tnom klorovodičnom kiselinom (2 × 20 mL) i vodom (2 × 20 mL). Organski sloj je sušen nad bezvodnim Na₂SO₄, profiltriran, a otapalo je uklonjeno iz filtrata uparavanjem pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat 2:1 te je dobiven uljasti produkt **2a-c**.

(E)-3-(3-bromfenil)prop-2-en-1-ol (2a)

Količina reaktanta: 0,566 g estera **1a**.

Iskorištenje: 0,208 g (44 %).

(E)-3-(3-fluorfenil)prop-2-en-1-ol (2b)

Količina reaktanta: 0,431 g estera **1b**.

Iskorištenje: 0,138 g (41 %).

(E)-3-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)prop-2-en-1-ol (2c)

Količina reaktanta: 0,489 g estera **1c**.

Iskorištenje: 0,178 g (45 %).

3.3. Sinteza azida derivata cimetine kiseline (3a-c). Opći propis

Otopini odgovarajućeg alkohola **2a-c** (0,976 mmol) u bezvodnom THF-u (5 mL) pri 0 °C dodani su ADMP (0,334 g, 1,171 mmol) i DBU (0,189 mL, 1,269 mmol), te je reakcijska smjesa miješana 0,5 h na 0 °C. Zatim je dodana zasićena otopina NH₄Cl (15 mL) te je smjesa

ekstrahirana diklormetanom (2 × 20 mL). Organski slojevi su skupljeni, isprani zasićenom vodenom otopinom NaCl (2 × 40 mL), sušeni nad bezvodnim Na₂SO₄, profiltrirani, a otapalo je uklonjeno iz filtrata uparavanjem pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat 9:1 te je dobiven uljasti produkt **3a-c**.

(E)-1-(3-azidoprop-1-en-1-il)-3-brombenzen (3a)

Količina reaktanta: 0,208 g alkohola **2a**.

Iskorištenje: 0,123 g (53 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,72 (t, 1H, *J* = 1,8 Hz), 7,52 – 7,46 (m, 2H), 7,32 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz), 6,68 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz), 6,49 (dt, 1H, *J* = 15,9, 6,4 Hz), 4,06 (d, 2H, *J* = 6,4 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 138,46, 131,90, 130,79, 130,64, 129,05, 125,57, 125,22, 122,18, 51,95.

IR (KBr, *v*/cm⁻¹): 3062, 3034, 2926, 2868, 2100, 1702, 1680, 1655, 1591, 1563, 1509, 1472, 1424, 1348, 1267, 1237, 1166, 1120, 1072, 996, 964, 878, 818, 774, 679, 600, 560, 502.

(E)-1-(3-azidoprop-1-en-1-il)-3-fluorbenzen (3b)

Količina reaktanta: 0,148 g alkohola **2b**.

Iskorištenje: 0,150 g (87 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,42 – 7,31 (m, 3H), 7,14 – 7,08 (m, 1H), 6,71 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz), 6,48 (dt, 1H, *J* = 15,9, 6,4 Hz), 4,06 (d, 2H, *J* = 6,4 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 163,74, 161,32 (d, *J* = 243,1 Hz), 138,58, 138,50 (d, *J* = 7,9 Hz), 132,26, 130,66, 130,57 (d, *J* = 8,5 Hz), 125,04, 122,95, 122,93 (d, *J* = 2,0 Hz), 114,82, 114,61 (d, *J* = 21,3 Hz), 112,89, 112,67 (d, *J* = 21,8 Hz), 51,94.

IR (KBr, *v*/cm⁻¹): 3039, 2958, 2928, 2870, 2393, 2102, 1734, 1684, 1654, 1611, 1584, 1522, 1490, 1446, 1350, 1269, 1250, 1197, 1146, 1075, 1040, 965, 871, 779, 682, 624, 608, 582, 562, 521.

(E)-5-(3-azidoprop-1-en-1-il)benzo[d][1,3]dioksol (3c)

Količina reaktanta: 0,174 g alkohola **2c**.

Iskorištenje: 0,089 g (45 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,17 (d, 1H, *J* = 1,3 Hz), 6,94 – 6,86 (m, 2H), 6,62 (d, 1H, *J* = 15,8 Hz), 6,25 (dt, 1H, *J* = 15,7, 6,7 Hz), 6,02 (s, 2H), 3,99 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 147,82, 147,23, 133,70, 130,27, 121,60, 121,04, 108,29, 105,62, 101,11, 52,25.

IR (KBr, *v*/cm⁻¹): 3072, 3036, 2995, 2898, 2780, 2101, 1851, 1753, 1687, 1652, 1607, 1504, 1490, 1447, 1402, 1360, 1333, 1314, 1251, 1194, 1124, 1102, 1040, 966, 932, 862, 797, 718, 665, 606, 560, 501.

3.4. Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-*b*]indola (4)

Otopini harmina (0,300 g, 1,413 mmol) u 4 mL bezvodnog DMF-a dodani su Cs₂CO₃ (0,644 g, 1,978 mmol) i propargil-bromid (0,181 mL, 1,696 mmol) te je reakcijska smjesa miješana u atmosferi argona 3 h na s.t. Zatim je dodana voda (40 mL), a smjesa ekstrahirana etil-acetatom (3 × 40 mL). Organski slojevi su skupljeni, isprani vodom (2 × 20 mL), osušeni nad bezvodnim Na₂SO₄, a otapalo je uklonjeno iz filtrata uparavanjem pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu DCM/metanol 9:1 i rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: 0,149 g (42 %).

*t*_f 147 – 148 °C.

ESI-MS(*m/z*): 251,2 (M+1)⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,20 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz), 8,10 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 7,88 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz), 7,33 (d, 1H, *J* = 2,2 Hz), 6,91 (dd, 1H, *J* = 8,6, 2,2 Hz), 5,45 (d, 2H, *J* = 2,5 Hz), 3,92 (s, 3H), 3,37 (t, 1H, *J* = 2,4 Hz), 3,05 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 160,72, 142,60, 141,10, 138,54, 134,41, 128,92, 122,50, 114,42, 112,29, 109,70, 93,84, 80,25, 75,59, 55,68, 34,22, 22,50.

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3270, 3184, 3064, 3020, 2966, 2842, 2118, 1616, 1568, 1494, 1450, 1402, 1340, 1294, 1254, 1226, 1192, 1170, 1138, 1042, 976, 922, 830, 806, 722, 690, 648, 598, 552.

3.5. Sinteza harmicina (5a-c). Opća metoda

Otopini alkina **4** (0,05 g, 0,2 mmol) i odgovarajućeg azida **3a-c** (0,22 mmol) u metanolu (5 mL) dodana je katalitička količina bakrovog(II) acetata te je reakcijska smjesa miješana 18 h na s.t. Zatim je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a sirovi produkt pročišćen kromatografijom na koloni s dodatkom sloja aluminijevog(III) oksida uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 3:1:0,5 i rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera.

1-[(2E)-3-(3-bromfenil)prop-2-en-1-il]-4-((7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)metil)-1H-1,2,3-triazol (5a)

Količina reaktanta: 0,052 g azida **3a**.

Iskorištenje: 0,043 g (44 %).

t_f 183 – 184 °C.

ESI-MS: m/z 490,1 (M+1)⁺.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,18 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 8,01 (s, 1H), 7,88 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 7,61 (t, 1H, $J = 1,8$ Hz), 7,46 – 7,43 (m, 1H), 7,40 – 7,37 (m, 1H), 7,34 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz), 7,27 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz), 6,89 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,58 – 6,43 (m, 2H), 5,89 (s, 2H), 5,09 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz), 3,88 (s, 3H), 3,05 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 160,54, 144,11, 142,66, 141,12, 138,22, 138,08, 134,65, 131,64, 130,74, 130,69, 128,99, 128,52, 125,75, 125,53, 122,94, 122,38, 122,13, 114,48, 112,25, 109,33, 94,13, 55,61, 51,08, 23,24.

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3434, 3396, 3272, 3228, 3194, 3130, 3048, 3002, 2970, 2924, 2834, 1624, 1562, 1500, 1450, 1410, 1342, 1306, 1254, 1226, 1254, 1226, 1172, 1138, 1042, 970, 924, 876, 818, 742, 686, 636, 598, 552.

1-[(2E)-3-(3-fluorfenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il}metil)-1H-1,2,3-triazol (5b)

Količina reaktanta: 0,039 g azida **3b**.

Iskorištenje: 0,033 g (39 %).

t_f 179 – 180 °C.

ESI-MS: m/z 428,2 (M+1)⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,18 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 8,01 (s, 1H), 7,88 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 7,39 – 7,33 (m, 2H), 7,29 – 7,25 (m, 1H), 7,22 – 7,19 (m, 1H), 7,11 – 7,06 (m, 1H), 6,89 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,57 – 6,46 (m, 2H), 5,89 (s, 2H), 5,10 (d, 2H, $J = 5,0$ Hz), 3,88 (s, 3H), 3,05 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 163,69, 161,27 (d, $J = 243,2$ Hz), 160,56, 144,14, 142,68, 141,14, 138,35, 138,27 (d, $J = 7,9$ Hz), 138,09, 134,67, 132,05, 130,64, 130,56 (d, $J = 8,5$ Hz), 128,55, 125,58, 122,96, 122,93 (d, $J = 2,7$ Hz), 122,91, 122,41, 114,90, 114,68 (d, $J = 21,2$ Hz), 114,49, 112,85, 112,63 (d, $J = 21,9$ Hz), 112,28, 109,34, 94,14, 55,62, 51,09, 23,24.

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3169, 3124, 3078, 3017, 2988, 2970, 2947, 2901, 2841, 2763, 1621, 1583, 1563, 1496, 1442, 1406, 1383, 1359, 1343, 1319, 1303, 1280, 1253, 1222, 1196, 1174, 1139, 1095, 1045, 1022, 976, 925, 880, 812, 786, 750, 727, 706, 688, 673, 636, 595, 576, 552, 523.

1-[(2E)-3-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il}metil)-1H-1,2,3-triazol (5c)

Količina reaktanta: 0,045 g azida **3c**.

Iskorištenje: 0,024 g (26 %).

t_f 203 – 204 °C.

ESI-MS: m/z 454,1 (M+1)⁺.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,17 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 7,98 (s, 1H), 7,87 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz), 7,34 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz), 7,07 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz), 6,88 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,86 – 6,78 (m, 2H), 6,44 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz), 6,32 – 6,25 (m, 1H), 6,00 (s, 2H), 5,88 (s, 2H), 5,04 (d, 2H, $J = 6,3$ Hz), 3,88 (s, 3H), 3,04 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 160,54, 147,79, 147,24, 144,08, 142,66, 141,13, 138,07, 134,65, 133,25, 130,10, 128,51, 122,77, 122,38, 121,71, 121,59, 114,47, 112,25, 109,31, 108,25, 105,55, 101,10, 94,13, 55,61, 51,29, 23,23.

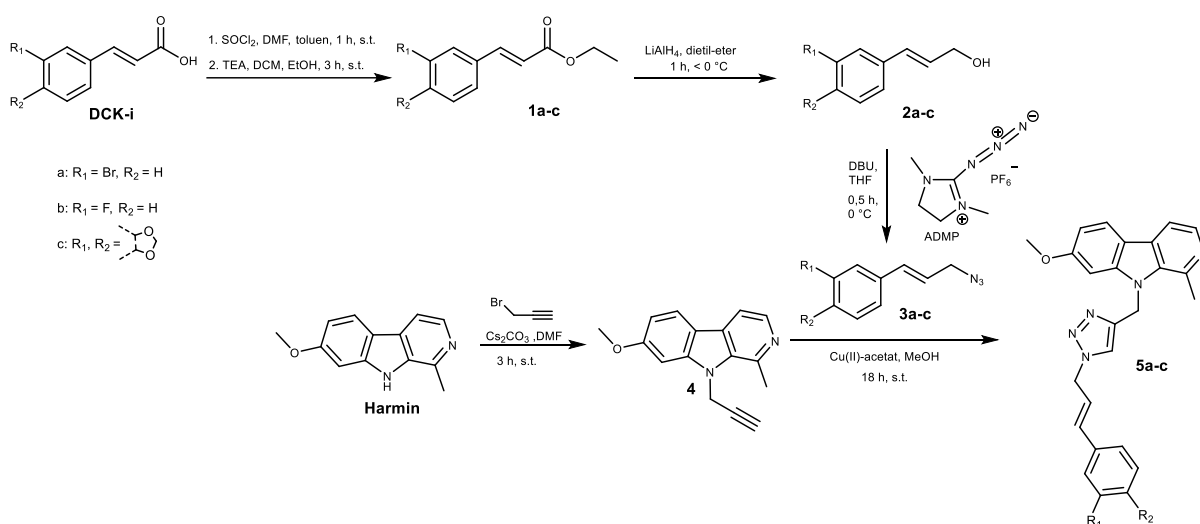
IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3427, 3123, 3057, 2996, 2930, 2780, 1622, 1570, 1497, 1448, 1405, 1351, 1300, 1250, 1167, 1127, 1038, 970, 926, 815, 726, 632, 597, 555, 435.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza

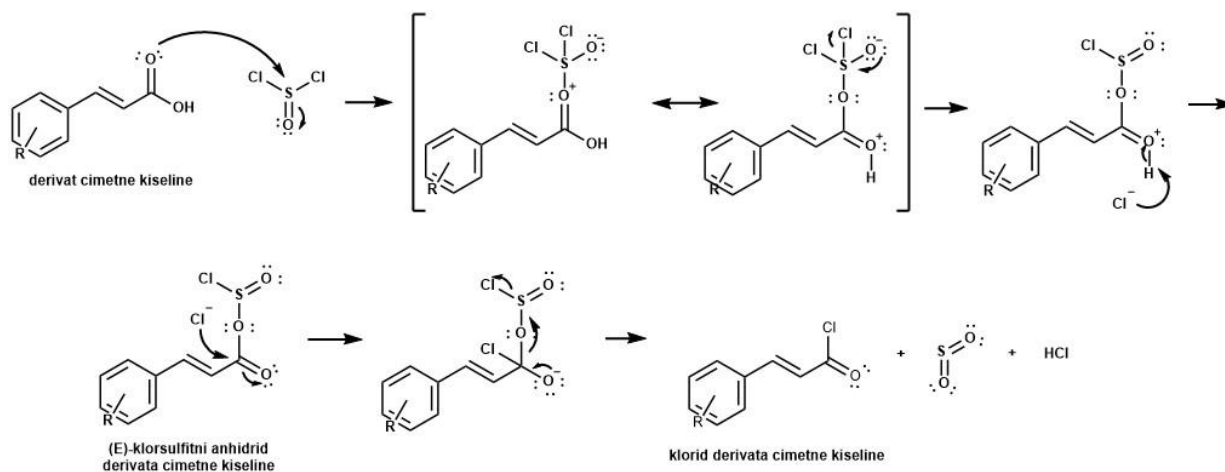
U ovom diplomskom radu opisana je priprava, karakterizacija i svojstva poželjna za ljekovite tvari hibridnih spojeva harmina i DCK-a (harmicina). Hibridi su pripremljeni u položaju *N*-9 harmina, a strukturna raznolikost ostvarena je variranjem supstituenata na benzenskom prstenu cimetnog dijela molekule (*m*-Br, *m*-F i dioksolan). Kao poveznica između harminskog i cimetnog dijela hibrida korišten je 1,2,3-triazol koji je pripremljen klik-reakcijom te su dobiveni derivati triazolskog tipa (TT).

U svrhu priprave harmicina bilo je potrebno pripremiti njihove prekursore, azide DCK-a **3a-c** i alkin harmina u položaju *N*-9, spoj **4** (Shema 2).



Shema 2. Sinteza harmicina

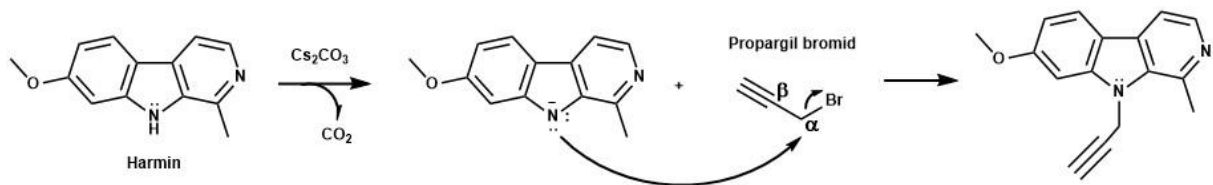
Azidi DCK-a pripremljeni su u 4 reakcijska koraka. U prvom reakcijskom koraku DCK-i su prevedeni u odgovarajuće kiselinske kloride uz tionil-klorid i katalitičku količinu DMF-a. Mehanizam pretvorbe karboksilne kiseline u kiselinski klorid prikazan je na Shemi 3. U prvom stupnju karbonilni kisik napada elektrofilni sumpor u tionil-kloridu, a kloridni ion napušta molekulu. Gubitkom protona nastaje reaktivni klorsulfitni anhidrid koji u reakciji nukleofilne supstitucije s kloridnim ionom daje acil-klorid (Wade, 2017). U reakciji s tionil-kloridom, uz acil-klorid, nastaju nusprodukti HCl i SO₂ koji se lako uklanjaju iz reakcijske smjese naparavanjem.



Shema 3. Mehanizam pretvorbe karboksilne kiseline u kiselinski klorid

Pripravljeni kiselinski kloridi su reakcijom nukleofilne supstitucije prevedeni u odgovarajuće estere uz etanol i TEA. Reakcija započinje nukleofilnim napadom kisika iz hidroksilne skupine etanola na karbonilni ugljikov atom kiselinskog klorida. Nastaje tetraedarski međuprodukt koji nakon eliminacije klora prelazi u ester. TEA se dodaje u reakcijsku smjesu kako bi neutralizirala oslobođenu HCl. Potom su esteri reducirani u alkohole pomoću LiAlH₄. Ovaj reducens je izvor hidridnih iona koji nukleofilno napadaju karbonilni ugljikov atom estera dajući, nakon eliminacije alkoksida, aldehyd. Potonji se brzo, adicijom drugog hidridnog iona, prevodi u alkoxid koji se obradom reakcijske smjese s razrijeđenom HCl protonira i daje alkohol (Wade, 2017). LiAlH₄ je dodavan u reakcijsku smjesu u obrocima kako ne bi reducirao i dvostruku vezu u DCK-a. Redukcija je provedena u atmosferi argona da se eliminira oksidativni učinak kisika iz zraka. U zadnjem reakcijskom koraku alkoholi su prevedeni u azide korištenjem 2-azido-1,3-dimetil-imidazolinijevog heksafluorofosfata (ADMP) i 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-ena (DBU). ADMP služi kao donor azidne skupine, dok se DBU, aprotonska baza, koristi jer reakciji pogoduju bazični uvjeti (Kitamura i sur., 2012). Osim TLC-om azidi se mogu identificirati i pojavom nove vrpce u IR spektru na otprilike 2100 cm⁻¹.

Alkin harmina **4** pripravljen je u jednom reakcijskom koraku, alkiliranjem harmina propargil-bromidom u prisustvu baze Cs₂CO₃. Ova reakcija je nukleofilna supstitucija na zasićenom ugljiku koja se odvija S_N2 mehanizmom (Shema 4). Cs₂CO₃ deprotonira amin u položaju N-9 β-karbolinskog prstena te nastaje jači nukleofil koji napada α-C atom propargil-bromida, bromidni ion napušta molekulu i nastaje nova C-N veza. (Wade, 2017).



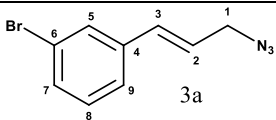
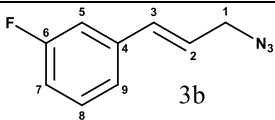
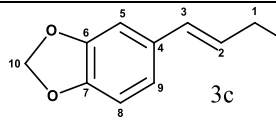
Shema 4. Mehanizam alkiliranja harmina propargil-bromidom

Pripravljeni azidi i alkin povezani su u hibride korištenjem CuAAC. Reakcija je provedena uz Cu(II)-acetat u metanolu. Redoks reakcijom Cu(II) i metanola *in situ* se generiraju Cu(I) ioni potrebni za odvijanje reakcije. (Hein i Fokin, 2010). Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz aluminijev(III) oksid kako bi se uklonili zaostali bakrovi ioni.

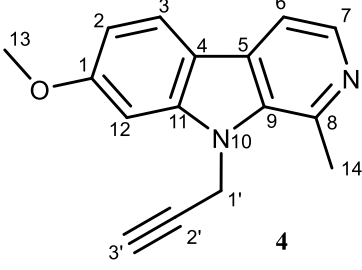
Tijek reakcija i čistoća produkata reakcija praćeni su TLC-om. Novi spojevi karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (^1H i ^{13}C NMR, IR i MS) te im je određena temperatura tališta.

Analitički i spektroskopski podaci spojeva sintetiziranih u okviru ovog rada prikazani su u Tablicama 1-5, a spektri spojeva dani su u poglavlju *Prilozi*.

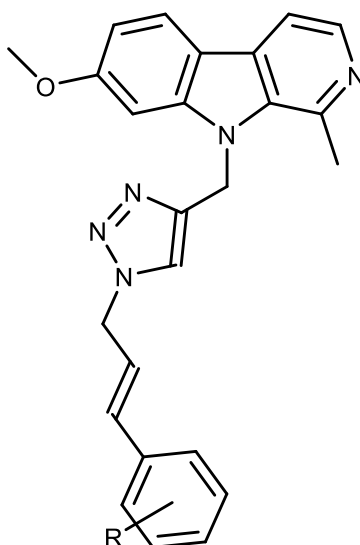
Tablica 1. Analitički i spektroskopski podaci azida DCK-a **3a-c**

Spoj			
t_f (°C)	ulje	ulje	ulje
Molekulska formula	$C_9H_8BrN_3$	$C_9H_8FN_3$	$C_{10}H_9N_3O_2$
M_r	238,09	177,18	203,20
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)	7,72 (t, 1H, 5, $J = 1,8$ Hz), 7,52 – 7,46 (m, 2H, 7, 9), 7,32 (t, 1H, 8, $J = 7,8$ Hz), 6,68 (d, 1H, 3, $J = 15,9$ Hz), 6,49 (dt, 1H, 2, $J = 15,9, 6,4$ Hz), 4,06 (d, 2H, 1, $J = 6,4$ Hz)	7,42 – 7,31 (m, 3H, 7, 8, 9), 7,14 – 7,08 (m, 1H, 5), 6,71 (d, 1H, 3, $J = 15,9$ Hz), 6,48 (dt, 1H, 2, $J = 15,9, 6,4$ Hz), 4,06 (d, 2H, 1, $J = 6,4$ Hz)	7,17 (d, 1H, 5, $J = 1,3$ Hz), 6,94 – 6,86 (m, 2H, 8, 9), 6,62 (d, 1H, 3, $J = 15,8$ Hz), 6,25 (dt, 1H, 2, $J = 15,7, 6,7$ Hz), 6,02 (s, 2H, 10), 3,99 (d, 2H, 1, $J = 6,6$ Hz)
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)	138,46 (4), 131,90 (7), 130,79 (3), 130,64 (5), 129,05 (8), 125,57 (9), 125,22 (2), 122,18 (6), 51,95 (1)	163,74, 161,32 (d, 6, $J = 243,1$ Hz), 138,58, 138,50 (d, 4, $J = 7,9$ Hz), 132,26 (3), 130,66, 130,57 (d, 8, $J = 8,5$ Hz), 125,04 (2), 122,95, 122,93 (d, 9, $J = 2,0$ Hz), 114,82, 114,61(d, 7, $J = 21,3$ Hz), 112,89, 112,67 (d, 5, $J = 21,8$ Hz), 51,94 (1)	147,82 (6), 147,23 (7), 133,70 (3), 130,27 (4), 121,60 (2), 121,04 (9), 108,29 (8), 105,62 (5), 101,11 (10), 52,25 (1)
IR (KBr, ν/cm^{-1})	3062, 3034, 2926, 2868, 2100, 1702, 1680, 1655, 1591, 1563, 1509, 1472, 1424, 1348, 1267, 1237, 1166, 1120, 1072, 996, 964, 878, 818, 774, 679, 600, 560, 502	3039, 2958, 2928, 2870, 2393, 2102, 1734, 1684, 1654, 1611, 1584, 1522, 1490, 1446, 1350, 1269, 1250, 1197, 1146, 1075, 1040, 965, 871, 779, 682, 624, 608, 582, 562, 521	3072, 3036, 2995, 2898, 2780, 2101, 1851, 1753, 1687, 1652, 1607, 1504, 1490, 1447, 1402, 1360, 1333, 1314, 1251, 1194, 1124, 1102, 1040, 966, 932, 862, 797, 718, 665, 606, 560, 501

Tablica 2. Analitički i spektroskopski podaci alkina **4**

Spoj	
t_f (°C)	147 – 148 °C
Molekulska formula	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O
MS (m/z)	251,2 (M+1) ⁺
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	8,20 (d, 1H, 7, $J = 5,1$ Hz), 8,10 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,33 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz), 6,91 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 5,45 (d, 2H, 1', $J = 2,5$ Hz), 3,92 (s, 3H, 13), 3,37 (t, 1H, 3', $J = 2,4$ Hz), 3,05 (s, 3H, 14)
¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm)	160,72 (1), 142,60 (8), 141,10 (9), 138,54 (7), 134,41 (11), 128,92 (4), 122,50 (3), 114,42 (5), 112,29 (6), 109,70 (2), 93,84 (12), 80,25 (3'), 75,59 (2'), 55,68 (13), 34,22 (1'), 22,50 (14)
IR (KBr, ν/cm^{-1})	3270, 3184, 3064, 3020, 2966, 2842, 2118, 1616, 1568, 1494, 1450, 1402, 1340, 1294, 1254, 1226, 1192, 1170, 1138, 1042, 976, 922, 830, 806, 722, 690, 648, 598, 552

Tablica 3. Analitički i MS podatci harmicina **5a-c**

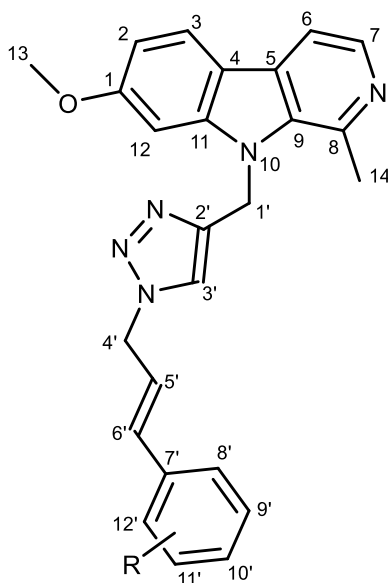


Spoj	R	Iskor. (%)	t_f (°C)	Molekulska formula	M_r	MS (m/z)
5a	<i>m</i> -Br	44	183 – 184 °C	C ₂₅ H ₂₂ BrN ₅ O	488,39	490,1 (M+1) ⁺
5b	<i>m</i> -F	39	179 – 180 °C	C ₂₅ H ₂₂ FN ₅ O	427,48	428,2 (M+1) ⁺
5c		26	203 – 204 °C	C ₂₆ H ₂₃ N ₅ O ₃	453,50	454,1 (M+1) ⁺

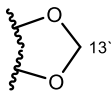
Tablica 4. IR spektroskopski podatci harmicina (**5a-c**)

Spoj	R	IR (KBr, ν/cm^{-1})
5a	<i>m</i> -Br	3434, 3396, 3272, 3228, 3194, 3130, 3048, 3002, 2970, 2924, 2834, 1624, 1562, 1500, 1450, 1410, 1342, 1306, 1254, 1226, 1254, 1226, 1172, 1138, 1042, 970, 924, 876, 818, 742, 686, 636, 598, 552
5b	<i>m</i> -F	3169, 3124, 3078, 3017, 2988, 2970, 2947, 2901, 2841, 2763, 1621, 1583, 1563, 1496, 1442, 1406, 1383, 1359, 1343, 1319, 1303, 1280, 1253, 1222, 1196, 1174, 1139, 1095, 1045, 1022, 976, 925, 880, 812, 786, 750, 727, 706, 688, 673, 636, 595, 576, 552, 523
5c		3427, 3123, 3057, 2996, 2930, 2780, 1622, 1570, 1497, 1448, 1405, 1351, 1300, 1250, 1167, 1127, 1038, 970, 926, 815, 726, 632, 597, 555, 435

Tablica 5. ^1H i ^{13}C NMR spektroskopski podatci harmicina (**5a-c**)



Spoj	R	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)	^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm)
5a	<i>m</i> -Br	8,18 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 8,01 (s, 1H, 3'), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,61 (t, 1H, 8', $J = 1,8$ Hz), 7,46 – 7,43 (m, 1H, 10'), 7,40 – 7,37 (m, 1H, 12'), 7,34 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz), 7,27 (t, 1H, 11', $J = 7,8$ Hz), 6,89 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,58 – 6,43 (m, 2H, 5', 6'), 5,89 (s, 2H, 1'), 5,09 (d, 2H, 4', $J = 5,8$ Hz), 3,88 (s, 3H, 13), 3,05 (s, 3H, 14)	160,54 (1), 144,11 (8), 142,66 (7'), 141,12 (9), 138,22 (11), 138,08 (7), 134,65 (2'), 131,64 (5'), 130,74 (10'), 130,69 (8'), 128,99 (11'), 128,52 (9'), 125,75 (12'), 125,53 (3'), 122,94 (6'), 122,38 (3), 122,13 (4), 114,48 (5), 112,25 (6), 109,33 (2), 94,13 (12), 55,61 (13), 51,08 (4'), 23,24 (14)
5b	<i>m</i> -F	8,18 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 8,01 (s, 1H, 3'), 7,88 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,39 – 7,33 (m, 2H, 12, 8'), 7,29 – 7,25 (m, 1H, 10'), 7,22 – 7,19 (m, 1H, 12'), 7,11 – 7,06 (m, 1H, 11'), 6,89 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,57 – 6,46 (m, 2H, 5', 6'), 5,89 (s, 2H, 1'), 5,10 (d, 2H, 4', $J = 5,0$ Hz), 3,88 (s, 3H, 13), 3,05 (s, 3H, 14)	163,69, 161,27 (d, 9', $J = 243,2$ Hz), 160,56 (1), 144,14 (8), 142,68 (9), 141,14 (11), 138,35, 138,27 (d, 7', $J = 7,9$ Hz), 138,09 (7), 134,67 (2'), 132,05 (6'), 130,64, 130,56 (d, 11', $J = 8,5$ Hz), 128,55 (4), 125,58 (3'), 122,96, 122,93 (d, 12', $J = 2,7$ Hz), 122,91 (5'), 122,41 (3), 114,90, 114,68 (d, 10', $J = 21,2$ Hz), 114,49 (5), 112,85, 112,63 (d, 8', $J = 21,9$ Hz), 112,28 (6), 109,34 (2), 94,14 (12), 55,62 (13), 51,09 (4'), 23,24 (14)

<p>5c</p>		<p>8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,09 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,98 (s, 1H, 3[`]), 7,87 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,34 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz), 7,07 (d, 1H, 8[`], $J = 1,6$ Hz), 6,88 (dd, 1H, 2, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,86 – 6,78 (m, 2H, 11[`], 12[`]), 6,44 (d, 1H, 6[`], $J = 15,8$ Hz), 6,32 – 6,25 (m, 1H, 5[`]), 6,00 (s, 2H, 13[`]), 5,88 (s, 2H, 1[`]), 5,04 (d, 2H, 4[`], $J = 6,3$ Hz), 3,88 (s, 3H, 13), 3,04 (s, 3H, 14)</p>	<p>160,54 (1), 147,79 (9[`]), 147,24 (10[`]), 144,08 (8), 142,66 (9), 141,13 (11), 138,07 (7), 134,65 (7[`]), 133,25 (5[`]), 130,10 (2[`]), 128,51 (4), 122,77 (3[`]), 122,38 (6[`]), 121,71 (3), 121,59 (12[`]), 114,47 (5), 112,25 (6), 109,31 (2), 108,25 (11[`]), 105,55 (8[`]), 101,10 (13[`]), 94,13 (12), 55,61 (13), 51,29 (4[`]), 23,23 (14)</p>
------------------	---	--	---

4.2. *In silico* procjena oralne bioraspoloživosti i farmakokinetičkih svojstva harmicina

Oralni put primjene lijeka je najjednostavniji i najprihvatljiviji za pacijenta, a uz to i najjeftiniji, zbog čega se najčešće koristi. Bitan korak u dizajniranju i razvoju novih djelatnih tvari je procjena oralne bioraspoloživosti, odnosno količine djelatne tvari koja će nakon oralne primjene biti apsorbirana iz GIT-a i dospjeti u sistemska cirkulaciju. Ovim pristupom može se u ranoj fazi razvoja lijeka izvršiti probir molekula, čime se skraćuje vrijeme i smanjuju troškovi istraživanja.

Postoje brojna pravila koja na temelju fizičko-kemijskih svojstava molekule predviđaju oralnu bioraspoloživost, od kojih su najpoznatija Lipinskijeva i Veberova pravila. Lipinskijevo pravilo 5 nalaže da će spoj imati dobru oralnu bioraspoloživost ako ima 5 ili manje donora vodikove veze, 10 ili manje akceptora vodikove veze, molekulsku masu (M_r) manju od 500 Da i $\log P$ (logaritam koeficijenta raspodjele spoja između *n*-oktanol i vode) manji od 5 (Lipinski i sur. 1997). Prema Veberu i suradnicima povećana fleksibilnost i polarnost površine molekule negativno utječu na bioraspoloživost. Molekuli se može predvidjeti dobra oralna raspoloživost ako ima: 1) 10 ili manje veza koje mogu rotirati i 2) polarnu površinu molekule (engl. *polar surface area*, PSA) manju od 140 Å² ili ukupan broj donora i akceptora vodikove veze manji od 12 (Veber i sur., 2002).

Harmicinima **5a-c** su korištenjem mrežnog softvera *SwissADME* određena sljedeća fizičko-kemijska svojstva: relativna molekulsku masa, broj donora i akceptora vodikove veze, $\log P$, PSA i broj rotirajućih veza. Podaci su dani u Tablici 6. Oralna bioraspoloživost novosintetiziranih harmicina procijenjena je s obzirom na Lipinskijeva i Veberova pravila. Vidljivo je da svi harmicini zadovoljavaju oba seta pravila zbog čega se im se može predvidjeti dobra oralna bioraspoloživost.

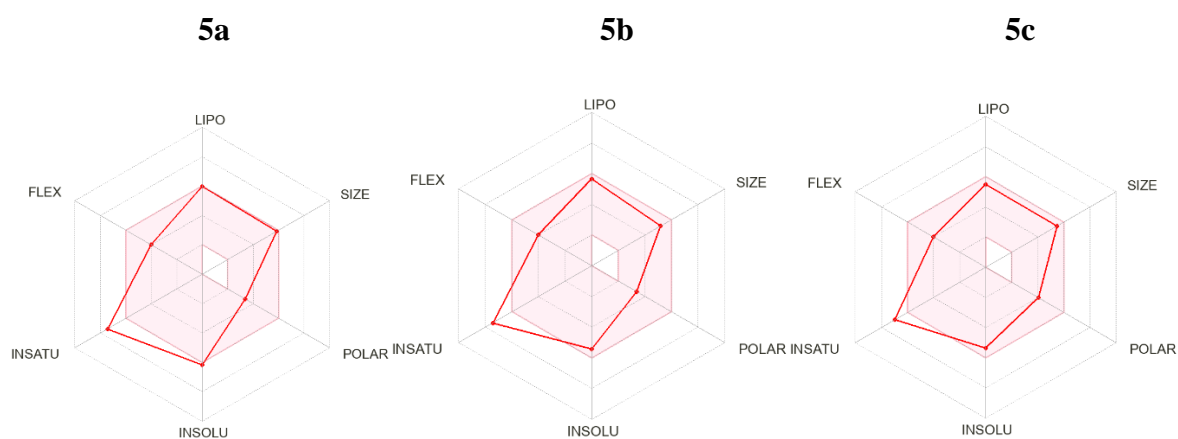
Tablica 6. Fizičko-kemijska svojstva novosintetiziranih spojeva **5a-c**

Spoj	M_r	DVV ^a	AVV ^b	$\log P^c$	PSA ^d	Broj rotirajućih veza	Lipinskijeva pravila ^e
5a	488,39	0	4	4,50	57,76	6	4
5b	427,48	0	5	4,23	57,76	6	4
5c	453,50	0	6	3,80	76,22	6	4

^a DVV – broj donora vodikove veze; ^b AVV – broj akceptora vodikove veze; ^c $\log P$ – partijski koeficijent;

^d PSA – polarna površina molekule; ^e broj zadovoljenih Lipinskijevih kriterija (od četiri)

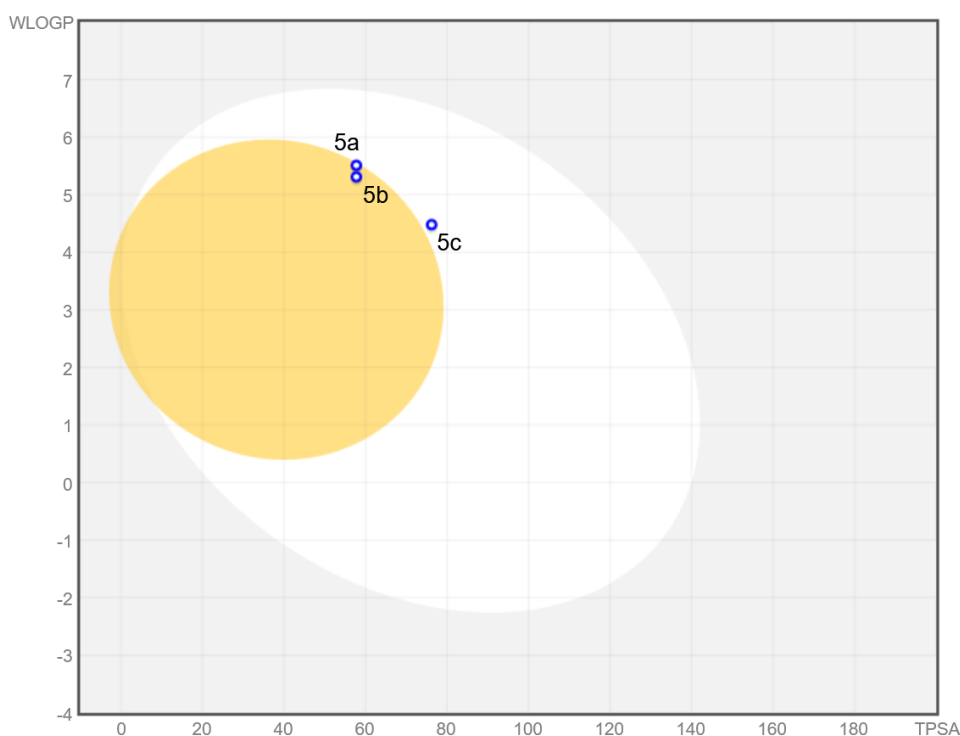
Oralna bioraspoloživost harmicina procijenjena je i pomoću alata *Bioavailability radar* na temelju sljedećih 6 parametara: lipofilnost (XLOGP3 u vrijednosti između -0,7 do 5,0), relativna molekulska masa (M_r 150–500), polarnost (TPSA 20–130 Å²), topljivost u vodi (log S 0–6 (ESOL model)), nezasićenost (udio sp³ hibridiziranih atoma ugljika u ukupnom broju atoma ugljika u strukturi (Csp³ 0,25–1)) i fleksibilnost molekule (broj rotirajućih veza < 9). Na Slici 19 prikazani su ilustrativni modeli za predviđanje oralne bioraspoloživosti novosintetiziranih spojeva dobiveni pomoću alata *Bioavailability radar*. U ovim modelima gornje vrijednosti prije spomenutih parametara tvore vrhove pravilnog ružičastog šesterokuta. Vrijednosti istih parametara novosintetiziranih spojeva opisuju šesterokut crvene boje. Ukoliko se neki od vrhova crvenog šesterokuta nalazi izvan ružičasnog šesterokuta taj parametar novosintetizirane molekule odstupa od kriterija. Na Slici 19 vidljivo je da spoj **5a** zadovoljava 4 od 6 kriterija (ne zadovoljava kriterije nezasićenosti i topljivosti), dok spojevi **5b** i **5c** zadovoljavaju 5 od 6 kriterija (ne ispunjavaju kriterij nezasićenosti).



Slika 19. Ilustrativni modeli za predviđanje oralne bioraspoloživosti harmicina **5a-c** (preuzeto s <http://www.swissadme.ch/>)

Harmicini **5a-c** također su analizirani pomoću farmakokinetičkog modela *BOILED-Egg* na temelju dva fizičko-kemijska deskriptora (WLOGP i TPSA). U grafu dobivenim *BOILED-Egg* modelom (Slika 20) molekule su prikazane plavim kružićima ako su supstrati P-glikoproteina (P-gp), odnosno crveno ako nisu supstrati tog proteina. Ukoliko se kružić nalazi u bijelom polju (tzv. bjelanjku) za molekulu se predviđa pasivna apsorpcija iz GIT-a, a ako se nalazi u žutom polju (tzv. žumanjku) predviđa se prolazak KMB-e pasivnom difuzijom (Daina i sur., 2017).

Slika 20 potvrđuje dobru oralnu bioraspodjelu novosintetiziranih harmicina. Također, vidljivo je da su harmicini **5a-c** potencijalni supstrati P-gp. Ovaj protein nalazi se na membrani stanica mnogih tkiva i organa (bubrega, jetre, testisa, GIT-a, endotela krvnih žila koje tvore KMB). Njegova primarna funkcija je izbacivanje ksenobiotika iz stanica u izvanstanični prostor čime negativno utječe na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova. Primjerice, smanjuje apsorpciju lijekova iz GIT-a i njihov ulazak u CNS. Za stanice tumora karakteristična je povećana ekspresija P-gp što doprinosi rezistenciji tumorskih stanica na lijekove (Ahmed Juvala II i sur., 2022). Harmicinima **5a** i **5b** se, za razliku od hibrida **5c**, predviđa prolazak KMB-e pasivnom difuzijom. Sposobnosti prolaska KMB-e poželjna je ako se molekule razvijaju kao potencijalni lijekovi za liječenje tumora mozga. S druge strane, ako lijek djeluje na metu izvan CNS-a, sposobnost prolaska KMB je nepoželjna zbog uzrokovanja nuspojava.



Slika 20. Prikaz farmakokinetičkog BOILED-Egg modela za harmicine **5a-c** (preuzeto s <http://www.swissadme.ch/>)

Bitno je poznavati i utjecaj novosintetiziranih molekula na enzime uključene u reakcije biotransformacije lijekova, ponajprije enzime iz porodice citokroma P450 (CYP) jer metaboliziraju 96 % poznatih lijekova. Ukoliko novosintetizirani spoj djeluje kao inhibitor ili

induktor određenog CYP enzima može bitno utjecati na metabolizam drugih lijekova i dovesti do toksičnih učinaka. Tablica 7 prikazuje procjenu inhibicije najznačajnijih CYP enzima harmicinima **5a-c**. Vidljivo je da svi harmicini inhibiraju barem 3 CYP enzima. Valja istaknuti da svi spojevi inhibiraju CYP3A4 koji, unutar CYP superporodice enzima, metabolizira najveći broj poznatih lijekova (33 %).

Tablica 7. Inhibicija najznačajnijih CYP enzima harmicinima **5a-c**

(<http://www.swissadme.ch/>)

Spoj	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
5a	+	+	+	-	+
5b	-	+	+	-	+
5c	-	+	+	+	+

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada opisana je priprava i karakterizacija harmicina, hibridnih spojeva harmina i DCK-a.

Sintetizirani i karakterizirani su sljedeći harmicini:

- 1-[(2*E*)-3-(3-bromfenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil)-1*H*-1,2,3-triazol (**5a**)
- 1-[(2*E*)-3-(3-fluorfenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil)-1*H*-1,2,3-triazol (**5b**)
- 1-[(2*E*)-3-(benzo[d][1,3]dioks-5-il)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil)-1*H*-1,2,3-triazol (**5c**)

Za potrebe reakcija klik-kemije sintetizirani su i odgovarajući prekursori: azidi DCK-a **3a-c** i alkin harmina **4**.

Novosintetizirani harmicini i njihovi prekursori karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (¹H i ¹³C NMR, IR i MS) te im je određena temperatura tališta. Na temelju *in silico* analize farmakokinetičkih svojstava svim harmicinima se procjenjuje dobra oralna bioraspoloživost i sposobnost inhibicije CYP enzima, dok se harmicinima **5a-b** predviđa i pasivan prolazak KMB-e.

Pripravljenim harmicinima će se u sklopu daljnjih istraživanja, koja prelaze okvire ovog rada, *in vitro* ispitati antiproliferativno djelovanje na humanu staničnu liniju GBM-a.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

A172	humana stanična linija glioblastoma
A375	humana stanična linija melanoma
A549	humana stanična linija adenokarcinoma alveolarnog bazalnog epitela
ADMP	2-azido-1,3-dimetilimidazolinijev heksafluorofosfat
AKT	protein kinaza B
Bn	benzilna skupina
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i>)
CuAAC	bakrom(I) katalizirana azid-alkin cikloadicija (engl. <i>Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>)
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en
DCK	derivati cimetine kiseline (engl. <i>cinnamic acid derivatives</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
Du-145	humana stanična linija karcinoma prostate
DYRK1A	dvostruko-specifična fosforiliranim tirozinom regulirana kinaza 1A
EGF	epidermalni faktor rasta
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
FAK	kinaza fokalne adhezije (engl. <i>focal adhesion kinase</i>)
FS-4	fibroblasti ljudskog prepucija
GABA	γ -aminomaslačna kiselina
GBM	multiformni glioblastom (engl. <i>glioblastoma multiforme</i>)
Gy	grej
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
Hs683	humana stanična linija glioma
IDH	izocitrat dehidrogenaza (engl. <i>isocitrate dehydrogenase</i>)
IR	infracrvena spektroskopija
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
KMB	krvno-moždana barijera
LN-229	humana stanična linija glioblastoma
MAO-A	monoaminooksidaza tipa A

MGMT	O-6-metilgvanin-DNA metiltransferaza
miRNA	mikro-ribonukleinska kiselina
MMP	metaloproteinaza matriksa
MS	spektrometrija masa
MTIC	5-(3-metil-1-triazeno)imidazol-4-karboksamid
NF- κ B	nuklearni faktor κ B
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
OE21	humana stanična linija ezofagealnog karcinoma
OE23	humana stanična linija ezofagealnog karcinoma
P-gp	P-glikoprotein
PC-3	humana stanična linija karcinoma prostate
PSA	zona polarne površine (engl. <i>polar surface area</i>)
PTEN	fosfatazni i tenzinski homolog
SK-MEL-28	humana stanična linija melanoma
s.t.	sobna temperatura
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
T98G	humana stanična linija glioblastoma
TEA	trietilamin
TERT	telomerazna reverzna transkriptaza
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TMZ	temozolomid
TP53	tumorski protein 53
t_i	temperatura tališta
U-87	humana stanična linija glioblastoma
U-138	humana stanična linija glioblastoma
U251	humana stanična linija glioblastoma
U373	humana stanična linija glioblastoma
UV	ultraljubičasto zračenje
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta

7. LITERATURA

Aaghaz S, Sharma K, Jain R, Kamal A. β -Carbolines as potential anticancer agents. *Eur J Med Chem*, 2021, 216, 113321.

Ahmad A, Khan KA, Sultana S, Siddiqui BS, Begum S, Faizi S, Siddiqui S. Study of the *in vitro* antimicrobial activity of harmine, harmaline and their derivatives. *J Ethnopharmacol*, 1992, 35, 289-294.

Ahmed Juvale II, Abdul Hamid AA, Abd Halim KB, Che Has AT. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*, 2022, 8, e09777.

Ali MY, Oliva CR, Noman ASM, Allen BG, Goswami PC, Zakharia Y, Monga V, Spitz DR, Buatti JM, Griguer CE. Radioresistance in glioblastoma and the development of radiosensitizers. *Cancers*, 2020, 12, 2511.

Ayati A, Emami S, Foroumadi A. The importance of triazole scaffold in the development of anticonvulsant agents. *Eur J Med Chem*, 2016, 109, 380-392.

Bevacizumab, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00112>, pristupljeno 19. 8. 2023.

Bonandi E, Christodoulou MS, Fumagalli G, Perdicchia D, Rastelli G, Passarella D. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. *Drug Discov Today*, 2017, 22, 1572-1581.

Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, El-Bachá RS, Báez E, García-Segura LM, Jurado Coronel JC, Capani F, Cardona-Gomez GP, Barreto GE. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci*, 2014, 48, 211.

Cellosaurus, 2023., https://www.cellosaurus.org/CVCL_0021, pristupljeno 9.6.2023.

Cellosaurus, 2023., https://www.cellosaurus.org/CVCL_2219, pristupljeno 9.6.2023.

Cinnamomum cassia, https://en.wikipedia.org/wiki/Cinnamomum_cassia, pristupljeno 3.9.2023.

Cooper GM. The cell: a molecular approach, 8th ed. Oxford, Oxford University Press, 2019.

Crocetti E, Trama A, Stiller C, Caldarella A, Soffietti R, Jaal J, Weber DC, Ricardi U, Slowinski J, Brandes A. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer*, 2012, 48, 1532-1542.

Daina A, Michelin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 2017, 7, 42717.

De la Fuente Revenga M, Pérez C, Morales-García JA, Alonso-Gil S, Pérez-Castillo A, Caignard DH, Yáñez M, Gamo AM, Rodríguez-Franco MI. Neurogenic potential assessment and pharmacological characterization of 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (pinoline) and melatonin-pinoline hybrids. *ACS Chem Neurosci*, 2015, 6, 800-810.

De P, Baltas M, Bedos-Belval F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – a review. *Curr Med Chem*, 2011, 18, 1672-1703.

Devaraj NK, Finn MG. Introduction: click chemistry. *Chem Rev*, 2021, 121,6697-6698.

Dobec-Meić B, Pikija S, Cvetko D, Trkulja V, Pazanin L, Kudelić N, Rotim K, Pavlicek I, Kostanjevec AR. Intracranial tumors in adult population of the Varazdin County (Croatia) 1996-2004: a population-based retrospective incidence study. *J Neurooncol*, 2006, 78, 303-310.

EMA, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu302085>, pristupljeno 22.8.2023.

Fernandes C, Costa A, Osório L, Lago RC, Linhares P, Carvalho B, Caeiro C. Current standards of care in glioblastoma therapy. *Glioblastoma*, 2017, 11, 197-243.

Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res*, 2000, 6, 2585-2597.

Frédéric R, Bruyère C, Vancraeynest C, Reniers J, Meinguet C, Pochet L, Backlund A, Masereel B, Kiss R, Wouters J. Novel trisubstituted harmine derivatives with original *in vitro* anticancer activity. *J Med Chem*, 2012, 55, 6489-6501.

Fulga A, Casian A, Casian I, Protopop S, Gudumac V, Tagadiuc O. Effects of *Taraxacum officinale* on glioblastoma cell culture and their correlation with hydroxycinnamic acids content. *Medical Sciences Forum*, 2023; 21, 18.

Glia, <https://qbi.uq.edu.au/brain-basics/brain/brain-physiology/types-glia>, pristupljeno 3.9.2023.

Glioblastoma multiforme, <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Glioblastoma-Multiforme>, pristupljeno 28.6.2023.

Graham LP. An introduction to medicinal chemistry. 6th ed. Oxford, Oxford University Press, 2017.

Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Epidemiology of glioblastoma multiforme – literature review. *Cancers*, 2022, 14, 2412.

Haldón E, Nicasio MC, Pérez PJ. Copper-catalysed azide-alkyne cycloadditions (CuAAC): an update. *Org Biomol Chem*, 2015, 13, 9528-9550.

Hamsa TP, Kuttan G. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both *in vivo* and *in vitro*. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649, 64-73.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144, 646-674.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100, 57-70.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005, 352, 997-1003.

Heimberger AB, Sampson JH. The PEPvIII-KLH (CDX-110) vaccine in glioblastoma multiforme patients. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9, 1087-1098.

Hein JE, Fokin VV. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chem Soc Rev*, 2010, 39, 1302-1315.

Histology, Astrocytes, 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545142/>, pristupljeno 4.9.2023.

Jäkel S, Dimou L. Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11, 24.

Kaijima M, Da Costa-Rochette L, Dodd RH, Rossier J, Naquet R. Hypnotic action of ethyl beta-carboline-3-carboxylate, a benzodiazepine receptor antagonist, in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1984, 58, 277-281.

Kitamura M, Koga T, Masakazu Y, Tatsuo O. Direct synthesis of organic azides from alcohols using 2-azido-1,3-dimethylimidazolinium hexafluorophosphate. *Synlett*, 2012, 23, 1335–1338.

Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2001, 40, 2004-2021.

Krzywik J, Nasulewicz-Goldeman A, Mozga W, Wietrzyk J, Huczyński A. Novel double-modified colchicine derivatives bearing 1,2,3-triazole: design, synthesis, and biological activity evaluation. *ACS Omega*, 2021, 6, 26583-26600.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev*, 1997, 23, 3-25.

Liu L, Hudgins WR, Shack S, Yin MQ, Samid D. Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. *Int J Cancer*, 1995, 62, 345-350.

Mediately, 2023. <https://mediately.co/hr/drugs?q=tadalafil>, pristupljeno 21.6.2023.

Méndez-Ardoy A, Gómez-García M, Ortiz Mellet C, Sevillano N, Girón MD, Salto R, Santoyo-González F, García Fernández JM. Preorganized macromolecular gene delivery systems: amphiphilic beta-cyclodextrin "click clusters". *Org Biomol Chem*, 2009, 7, 2681-2684.

Mikroglia, <https://faculty.sites.uci.edu/kimgreen/bio/microglia-in-the-healthy-brain/>, pristupljeno 4.9.2023.

Mohan H. Textbook of pathology. 6th ed. New Delhi, Jaypee Brothers Medical Publishers, 2010.

Moura DJ, Richter MF, Boeira JM, Pêgas Henriques JA, Saffi J. Antioxidant properties of beta-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, 2007, 22, 293-302.

Naumowicz M, Kusaczuk M, Zajac M, Gál M, Kotyńska J. Monitoring of the surface charge density changes of human glioblastoma cell membranes upon cinnamic and ferulic acids treatment. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 6972.

Nenaah G. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, 2010, 81, 779-782.

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19, 764-772.

Onori P, DeMorrow S, Gaudio E, Franchitto A, Mancinelli R, Venter J, Kopriva S, Ueno Y, Alvaro D, Savage J, Alpini G, Francis H. Caffeic acid phenethyl ester decreases cholangiocarcinoma growth by inhibition of NF-kappaB and induction of apoptosis. *Int J Cancer*, 2009, 125, 565-576.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol*. 2017, 19, v1-v88.

Panice MR, Lopes SMM, Figueiredo MC, Goes Ruiz ALT, Foglio MA, Nazari Formagio AS, Sarragiotto MH, Pinho E Melo TMVD. New 3-tetrazolyl- β -carboline and β -carboline-3-carboxylates with anti-cancer activity. *Eur J Med Chem*, 2019, 179, 123-132.

Perković I, Raić-Malić S, Fontinha D, Prudêncio M, Pessanha de Carvalho L, Held, J, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić Z. Harmicines – harmine and cinnamic acid hybrids as novel antiplasmodial hits. *Eur J Med Chem*, 2020, 187, 111927.

Reiter-Brennan C, Semmler L, Klein A. The effects of 2-hydroxyglutarate on the tumorigenesis of gliomas. *Contemp Oncol*, 2018, 22, 215-222.

Ren X, Ai D, Li T, Xia L, Sun L. Effectiveness of lomustine combined with bevacizumab in glioblastoma: a meta-analysis. *Front Neurol*, 2021, 11, 603947.

Ruwizhi N, Aderibigbe BA. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 5712.

Schaftenaar G, de Vileg J. Quantum mechanical polar surface area. *J Comput-Aided Mol Des*, 2012, 26, 311-318.

Sharma P. Cinnamic acid derivatives: a new chapter of various pharmacological activities. *J Chem Pharm Res*, 2011, 3, 403–23.

Sharma S, Yadav M, Gupta SP, Pandav K, Kumar S. Spectroscopic and structural studies on the interaction of an anticancer β -carboline alkaloid, harmine with GC and AT specific DNA oligonucleotides. *Chem Biol Interact*, 2016, 260, 256-262.

Sirijska rutvica, https://hr.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Peganum_harmala_Baikonur_06.jpg, pristupljeno 20.8.2023.

Siddiqui M, Bhatt H, Judd EK, Oparil S, Calhoun DA. Reserpine substantially lowers blood pressure in patients with refractory hypertension: a proof-of-concept study. *Am J Hypertens*, 2020, 33, 741-747.

Smith KL, Ford GK, Jessop DS, Finn DP. Behavioural, neurochemical and neuroendocrine effects of the endogenous β -carboline harmine in fear-conditioned rats. *J Psychopharmacol*, 2013, 27, 162-170.

Song MX, Deng XQ. Recent developments on triazole nucleus in anticonvulsant compounds: a review. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018, 33, 453-478.

SwissADME, <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 24.4.2023.

Tang JB, Svilar D, Trivedi RN, Wang XH, Goellner EM, Moore B, Hamilton RL, Banze LA, Brown AR, Sobol RW. *N*-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase beta modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide. *Neuro Oncol*, 2011, 13, 471-86.

Tarpley M, Oladapo HO, Strepay D, Caligan TB, Chdid L, Shehata H, Roques JR, Thomas R, Laudeman CP, Onyenwoke RU, Darr DB, Williams KP. Identification of harmine and β -carboline analogs from a high-throughput screen of an approved drug collection; profiling as differential inhibitors of DYRK1A and monoamine oxidase A and for *in vitro* and *in vivo* anti-cancer studies. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 162, 105821.

Temozolomid,

[#undesirable](https://mediately.co/hr/drugs/I4AAGzoVw8UsZEUushb8SjOH7r/temozolomid-accord-100-mg-tvrde-kapsule), pristupljeno 22.8.2023.

Temozolomid, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/temozolomide-teva-epar-product-information_hr.pdf, pristupljeno 3.9.2023.

Tomar MS, Kumar A, Srivastava C, Shrivastava A. Elucidating the mechanisms of temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021,1876, 188616.

Vahedi MM, Shahini A, Mottahedi M, Garousi S, Shariat Razavi SA, Pouyamanesh G, Afshari AR, Ferns GA, Bahrami A. Harmaline exerts potentially anti-cancer effects on U-87 human malignant glioblastoma cells in vitro. *Mol Biol Rep*, 2023, 50, 4357-4366.

Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615-2623.

Wade LG. Organska kemija. 1st ed. Zagreb, Školska knjiga, 2017.

Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*, 2016, 134, 381-397.

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

Zheng C, Fang Y, Tong W, Li G, Wu H, Zhou W, Lin Q, Yang F, Yang Z, Wang P, Peng Y, Pang X, Yi Z, Luo J, Liu M, Chen Y. Synthesis and biological evaluation of novel tetrahydro- β -carboline derivatives as antitumor growth and metastasis agents through inhibiting the transforming growth factor- β signaling pathway. *J Med Chem*, 2014, 57, 600-612.

Zhu L, Brassard CJ, Zhang X, Guha PM, Clark RJ. On the mechanism of copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem Rec*, 2016, 16, 1501-1517.

Zhu YG, Lv YX, Guo CY, Xiao ZM, Jiang QG, Kuang H, Zhang WH, Hu P. Harmine inhibits the proliferation and migration of glioblastoma cells via the FAK/AKT pathway. *Life Sci*, 2021, 270, 119112.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Sinteza i karakterizacija harmicina, hibrida harmina i derivata cimetine kiseline, u položaju N-9 β -karbolinskog prstena

Multiformni glioblastom (GBM) je najčešći primarni maligni tumor mozga s medijanom preživljenja nakon dijagnoze od samo 15 mjeseci. Liječenje ove bolesti je zahtjevno zbog pojave rezistencije tumorskih stanica na zračenje i kemoterapiju, što dovodi do progresije i recidiva bolesti. Osim toga, postoji svega nekoliko lijekova za terapiju multiformnog glioblastoma zbog čega je potrebno razvijati nove djelatne tvari koje bi bile učinkovitije i otpornije prema razvoju rezistencije.

Cilj ovog diplomskog rada bila je priprava novih molekula s anti-GBM djelovanjem korištenjem principa molekulske hibridizacije. Harmin, β -karbolinski alkaloid s raznolikim biološkim djelovanjem, i derivati cimetine kiseline (DCK-i) povezani su u jedinstvene molekule (harmicine) korištenjem bakrom(I) katalizirane azid-alkin cikloadicije (klik-reakcije) uz generiranje triazolskog tipa poveznice. S obzirom da harmin i DCK-i ispoljavaju anti-GBM svojstva, očekuje se da će pripremljeni hibridi posjedovati snažno anti-GBM djelovanje. U svrhu priprave hibrida bilo je potrebno sintetizirati odgovarajuće prekursore: azide DCK-a **3a-c** i alkin harmina **4**. Alkin je sintetiziran u jednom reakcijskom koraku, reakcijom harmina i propargilbromida uz Cs_2CO_3 , dok su azidi pripremljeni u četiri sintetska koraka. U prvom koraku DCK-i su u reakciji s SOCl_2 uz katalitičku količinu DMF-a, prevedeni u kiselinske kloride koji su potom esterificirani korištenjem EtOH i TEA. Etilni esteri **1a-c** reducirani su pomoću LiAlH_4 , a dobiveni alkoholi **2a-c** prevedeni su u azide **3a-c** uz ADMP i DBU. Željeni hibridi **5a-c** pripremljeni su klik-reakcijom odgovarajućih prekursora u MeOH uz katalitičku količinu Cu(II)-acetata.

Novosintetizirani harmicini karakterizirani su uobičajenim spektroskopskim i analitičkim metodama (^1H i ^{13}C NMR, MS i IR) te su procijenjena njihova farmakokinetička svojstva *in silico*. Svim harmicinima predviđa se dobra oralna bioraspoloživost, dok se hibridima **5a-b** predviđa sposobnost prolaska krvno-moždane barijere. U nastavku istraživanja ispitat će se antiproliferativno djelovanje harmicina *in vitro* na humanu staničnu liniju GBM-a.

Ključne riječi: multiformni glioblastom, harmin, derivati cimetine kiseline, klik-kemija

Synthesis and characterization of *N*-9-tethered harmicines, harmine-cinnamic acid derivate hybrids

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary malignant brain tumor with a median survival time of only 15 months. The main concern in GBM treatment is the development of resistance, which leads to disease progression and relapse. In addition, few drugs are available for GBM chemotherapy, highlighting the need for the development of novel and effective anti-GBM agents.

The aim of this work was to synthesize novel molecules with anti-GBM properties using the molecular hybridization approach. Harmine, the β -carboline alkaloid with multiple biological effects, and cinnamic acid derivatives (CADs) were linked *via* a triazole-type linker using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (“click” reaction) to form a hybrid molecule. Considering that both harmine and CADs exhibit anti-GBM properties, the proposed hybrids are expected to have a strong effect on GBM.

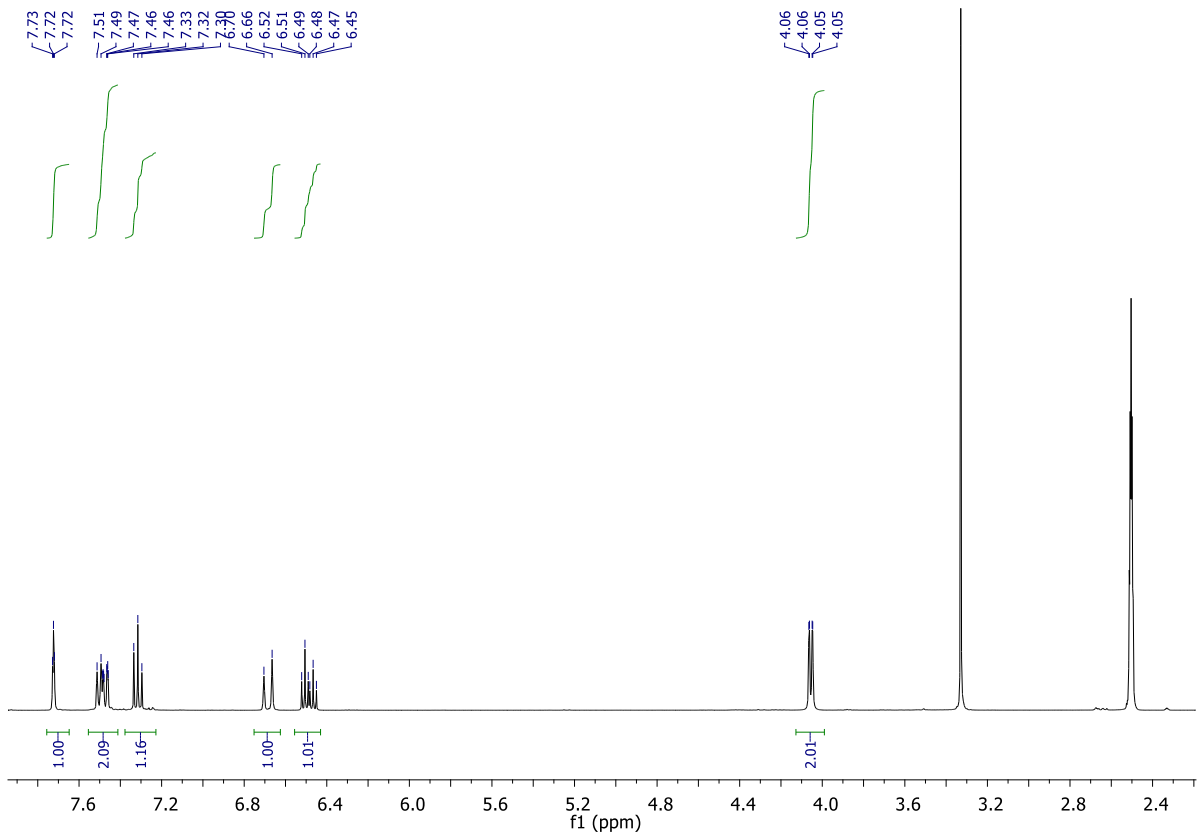
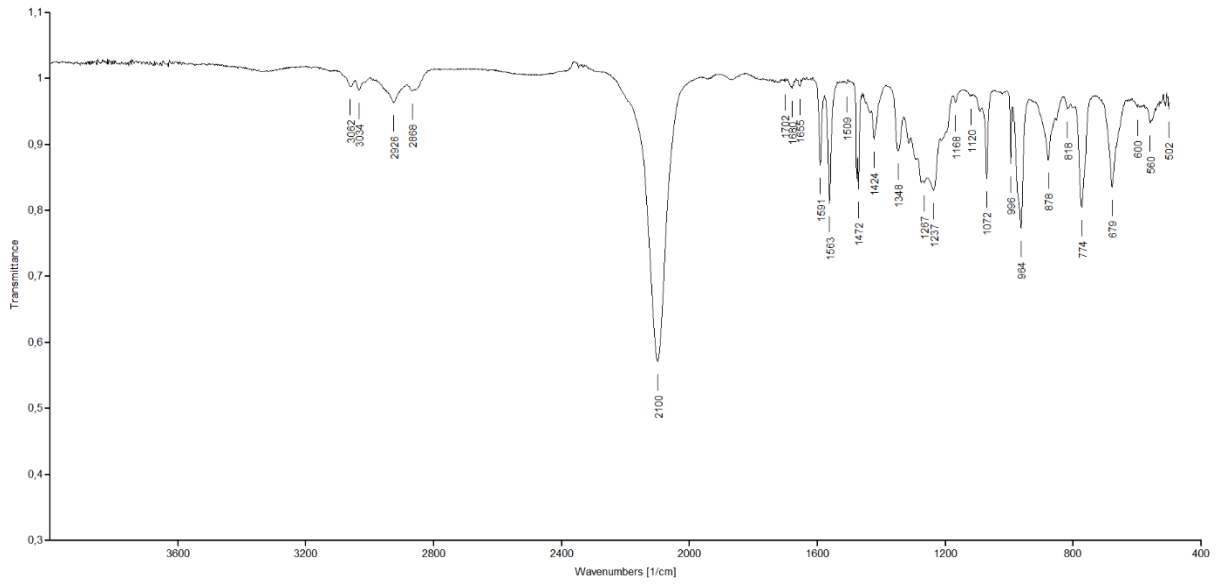
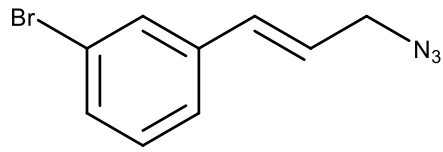
To prepare the target hybrids, CAD-based azides **3a-c** and harmine-based alkyne **4** were synthesized. The alkyne **4** was synthesized in one reaction step by reacting harmine with propargyl bromide in the presence of Cs_2CO_3 , whereas the preparation of azides **3a-c** required four-step procedure. In the first step, the CADs were converted to acyl chlorides with SOCl_2 in the presence of DMF. The acyl chlorides were then esterified with ethanol and TEA, and the obtained ethyl esters **1a-c** were reduced to alcohols **2a-c** with LiAlH_4 . Finally, the alcohols were efficiently converted to azides **3a-c** with ADMP and DBU. The “click” reaction of the prepared precursors proceeded smoothly in methanol with a catalytic amount of Cu(II) acetate and gave the desired hybrids **5a-c**.

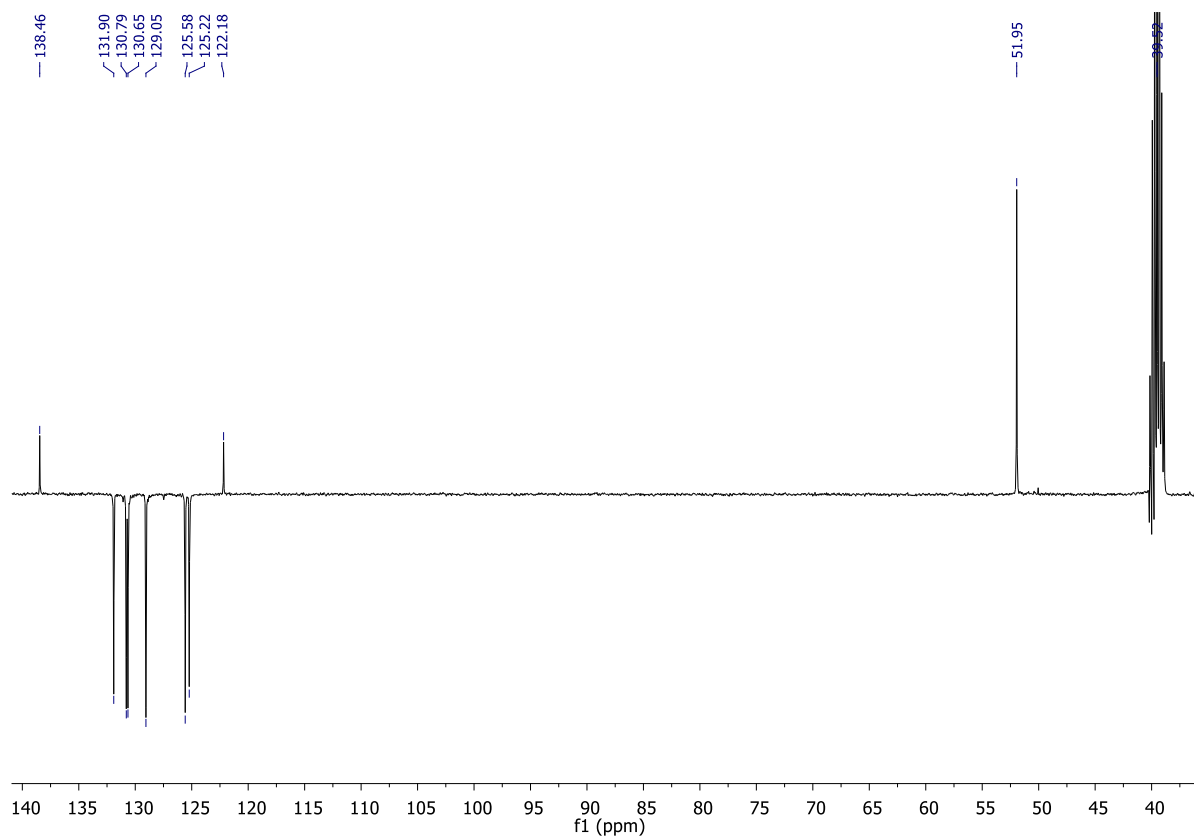
The structures of the harmicines were confirmed by standard analytical and spectroscopic methods (^1H and ^{13}C NMR, IR and MS). The pharmacokinetic properties of harmicines were calculated *in silico*. Good oral bioavailability was predicted for all harmicines. Additionally, compounds **5a-b** are expected to cross the blood-brain barrier. Further studies will investigate the antiproliferative activity of the harmicines *in vitro* against human GBM cell line.

Keywords: glioblastoma multiforme, harmine, cinnamic acid derivatives, “click” chemistry

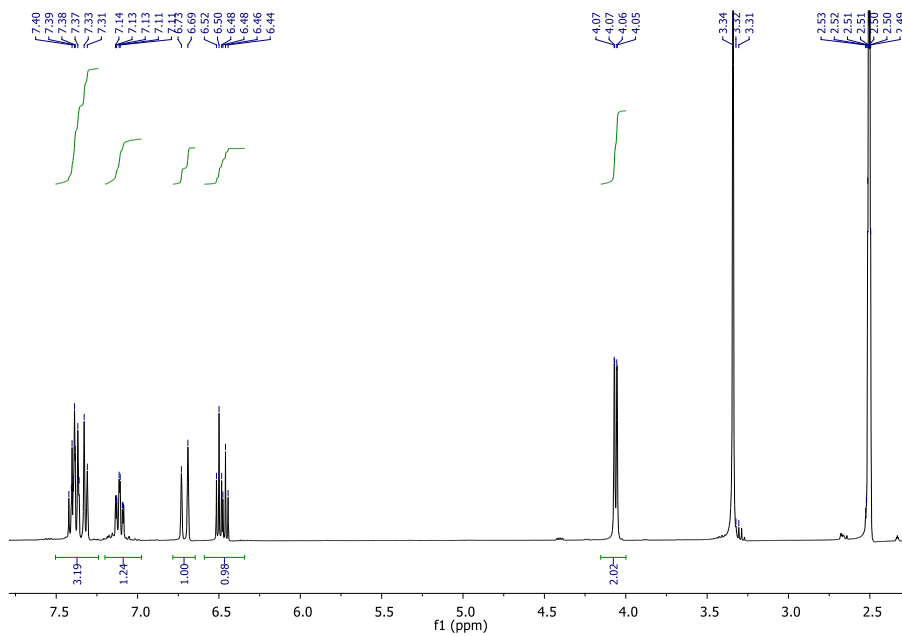
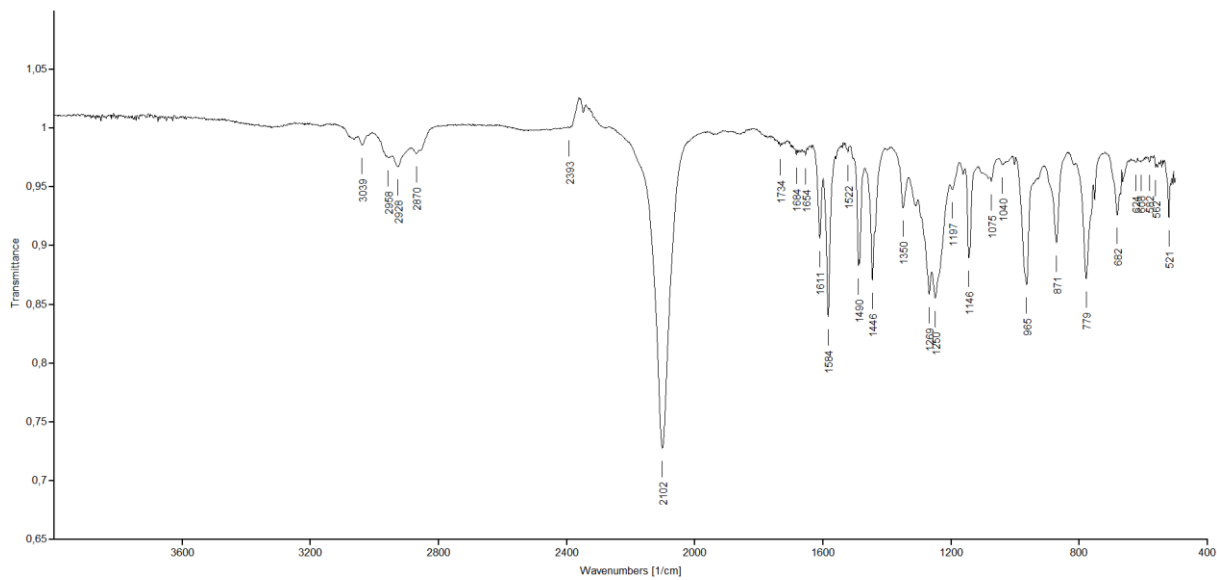
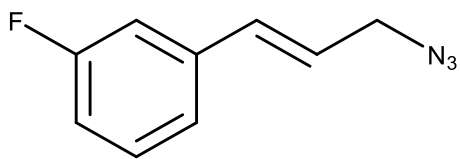
9. PRILOZI

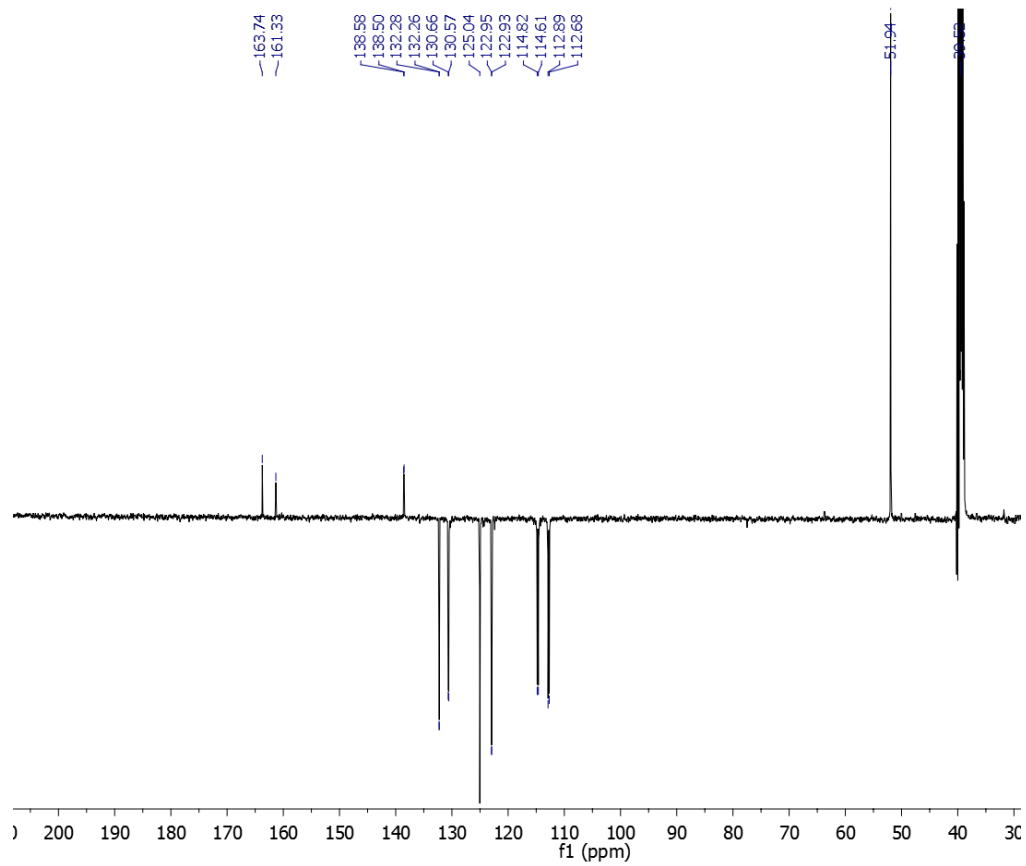
3a



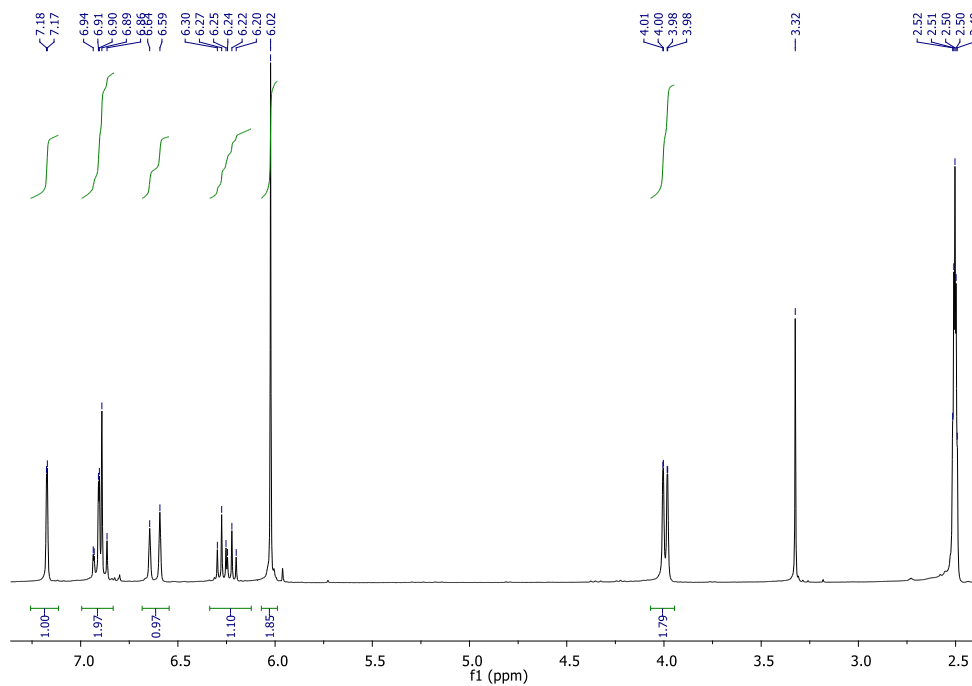
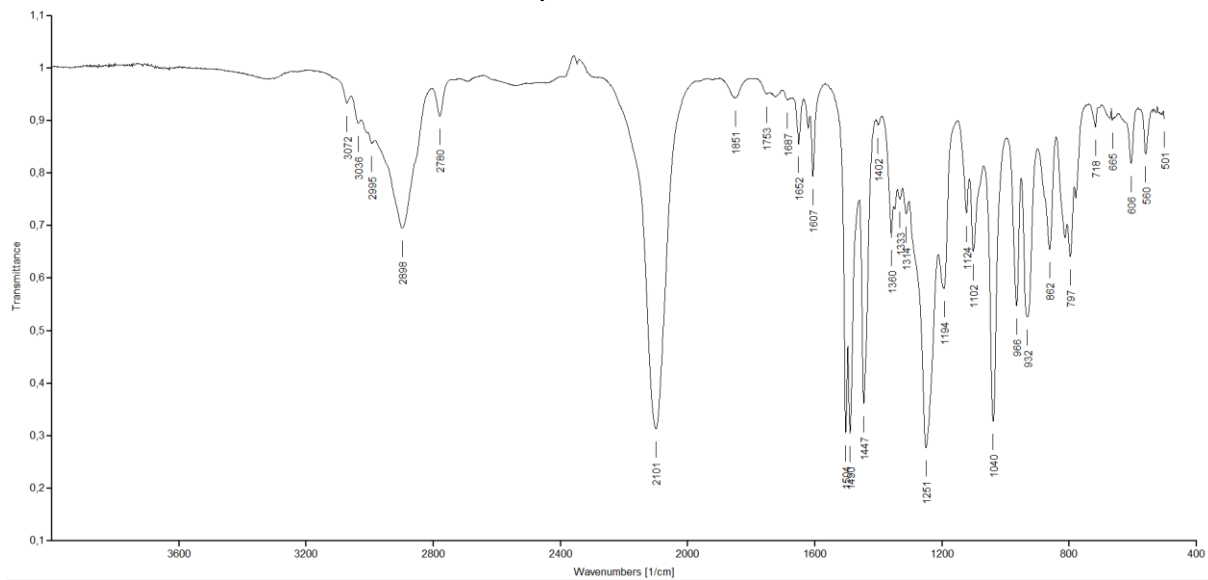
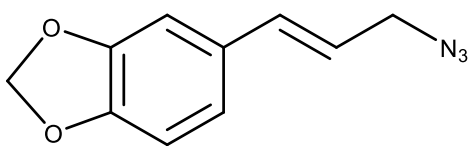


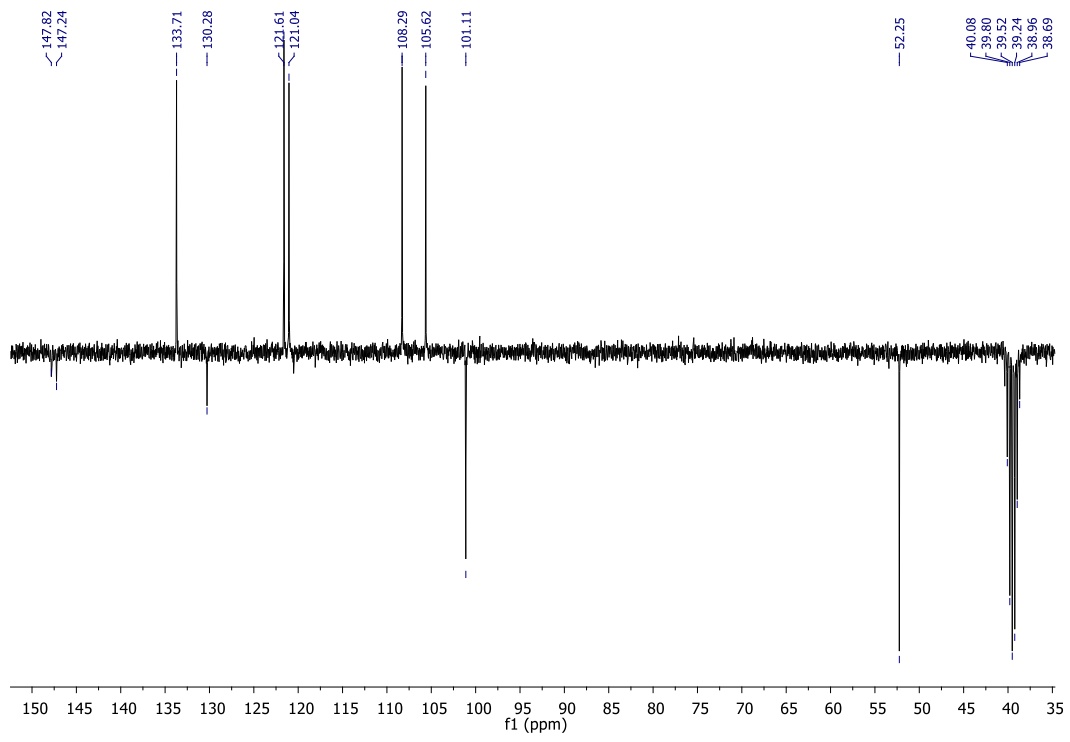
3b



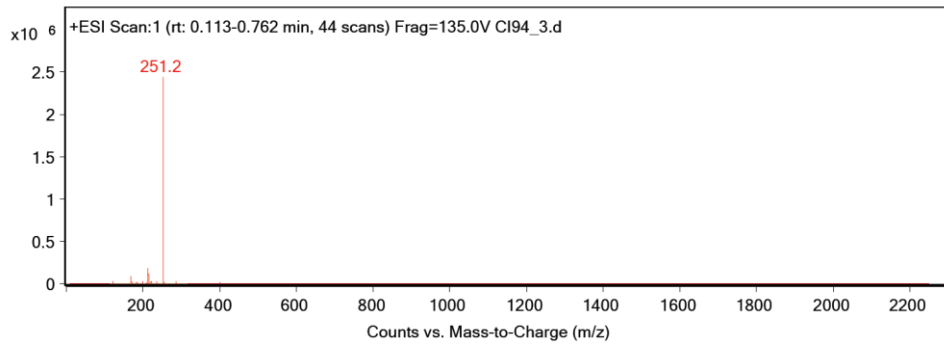
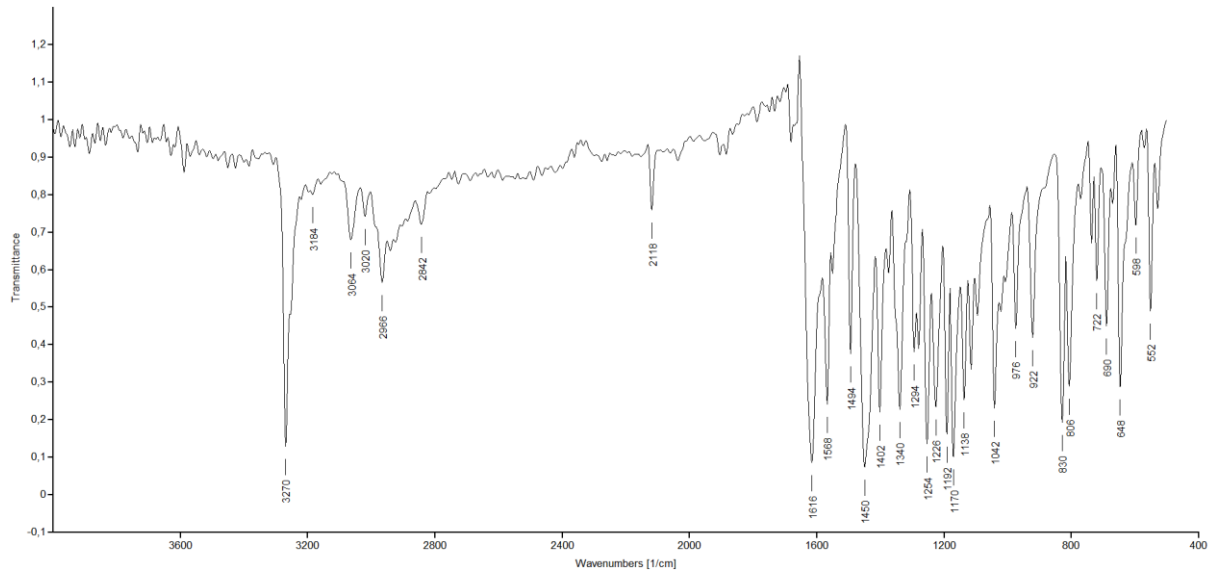
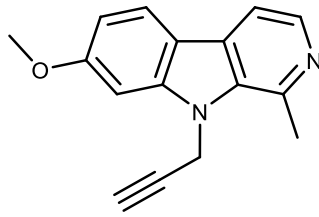


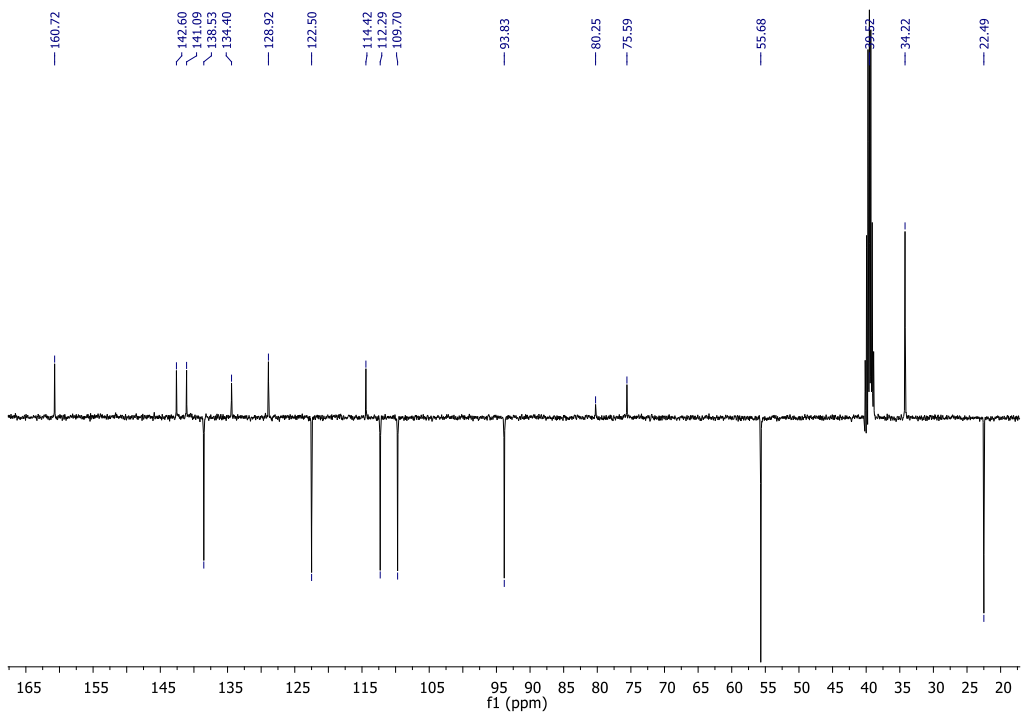
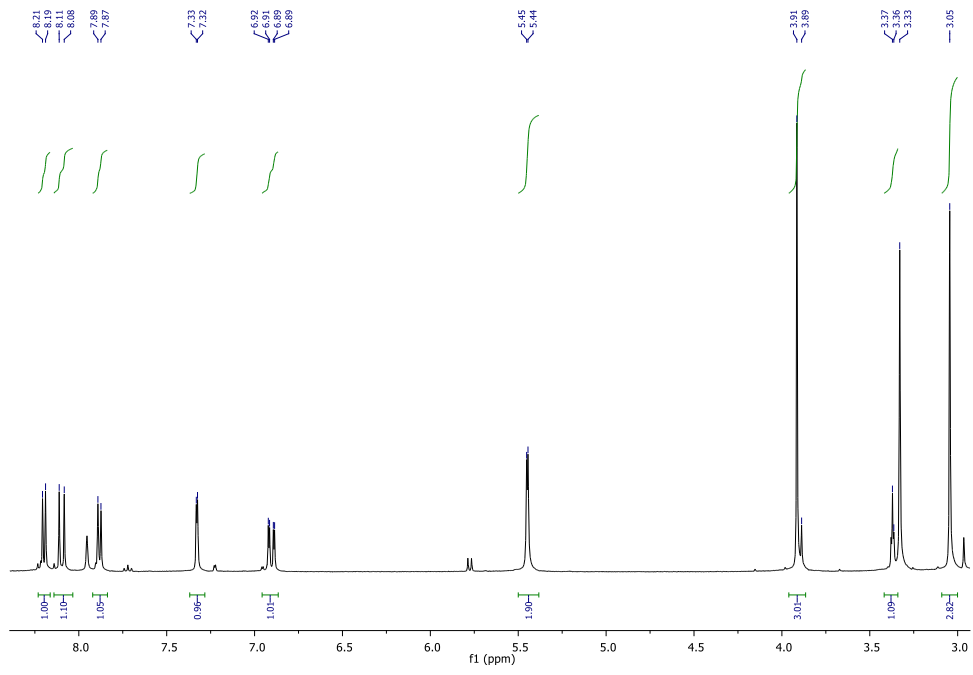
3c



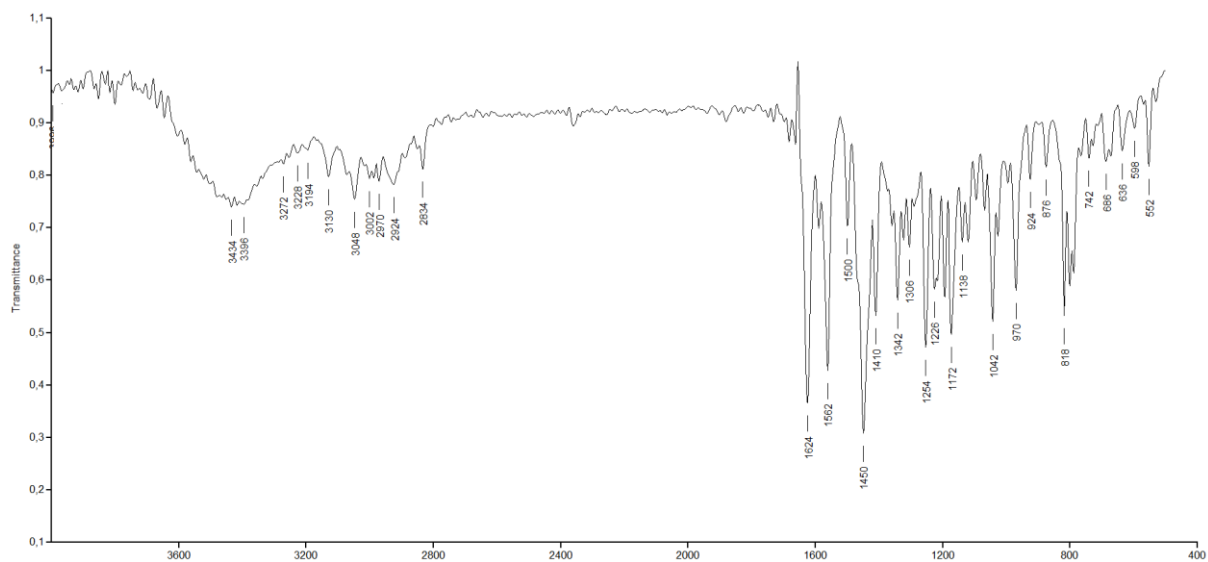
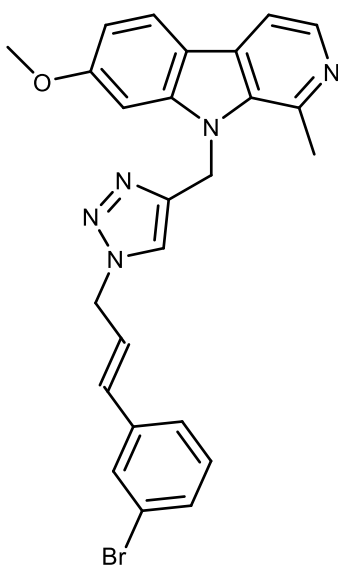


4





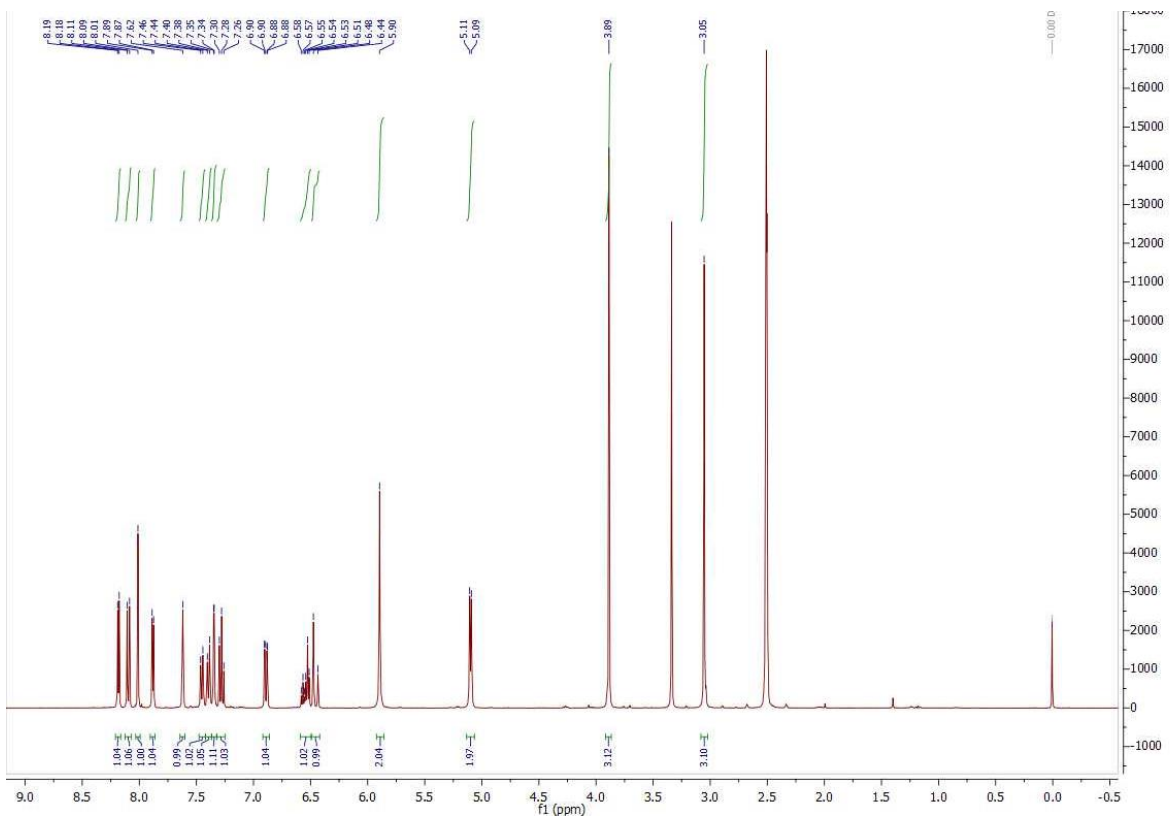
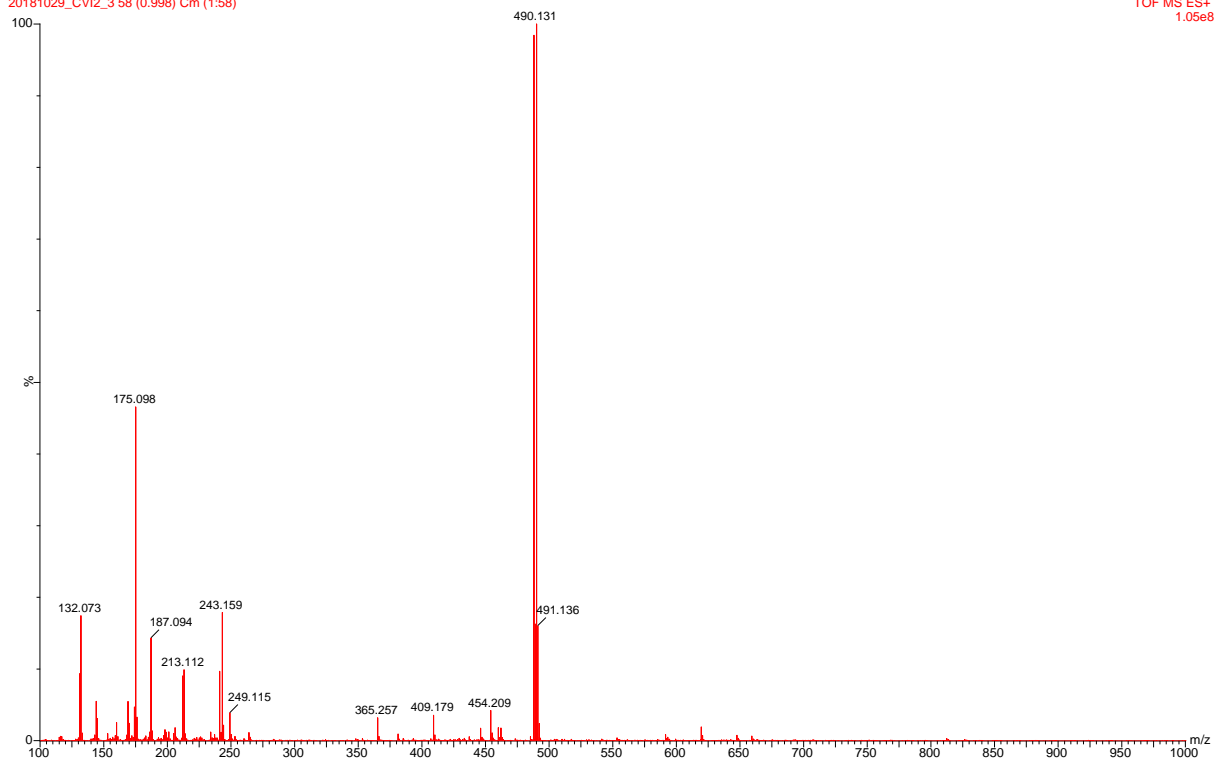
5a

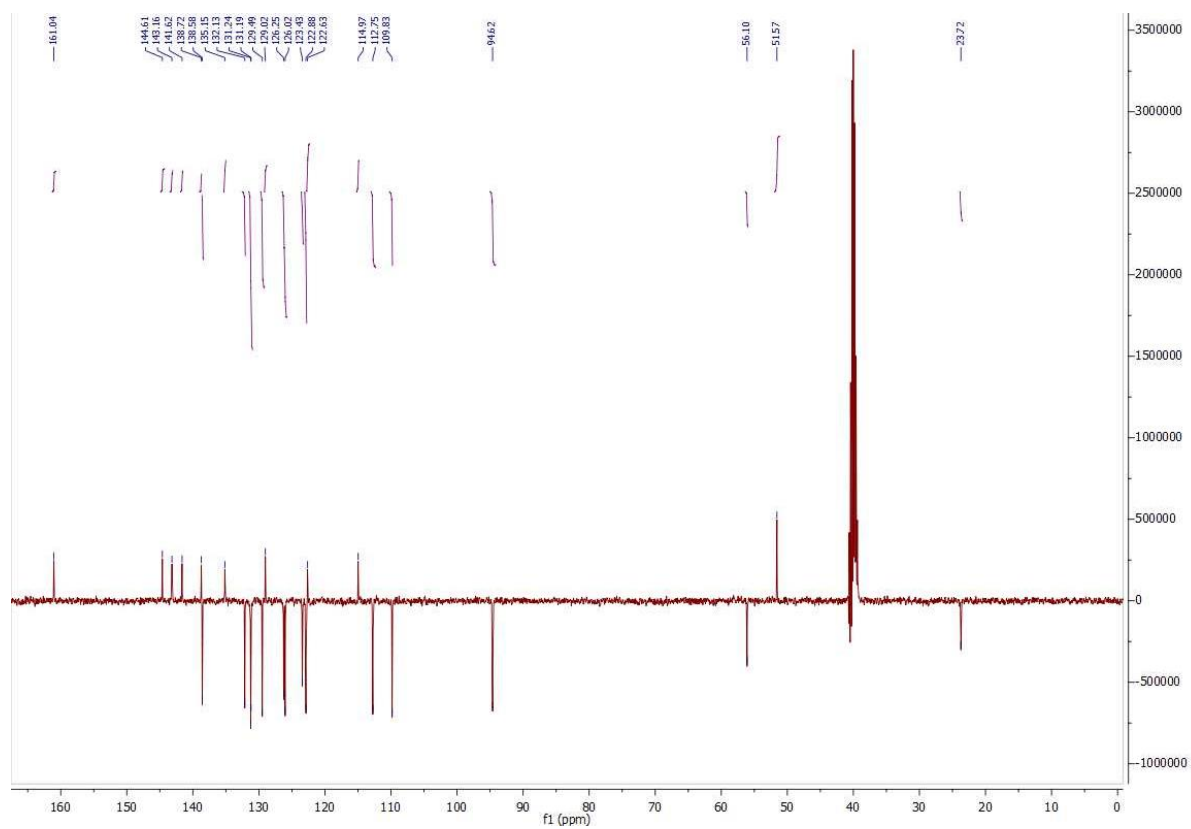


20181029_CVI2_3.58 (0.998) Cm (1:58)

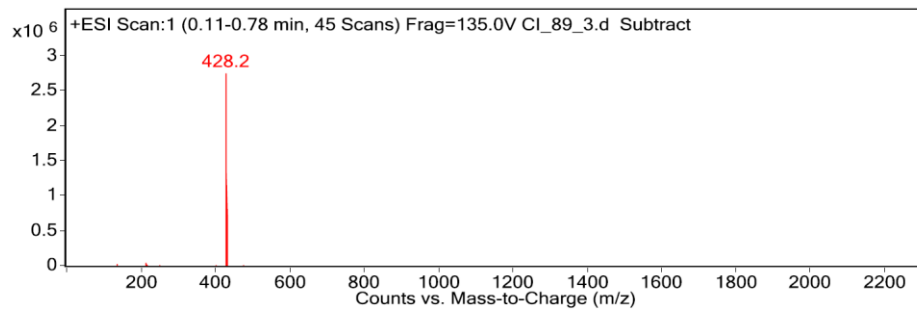
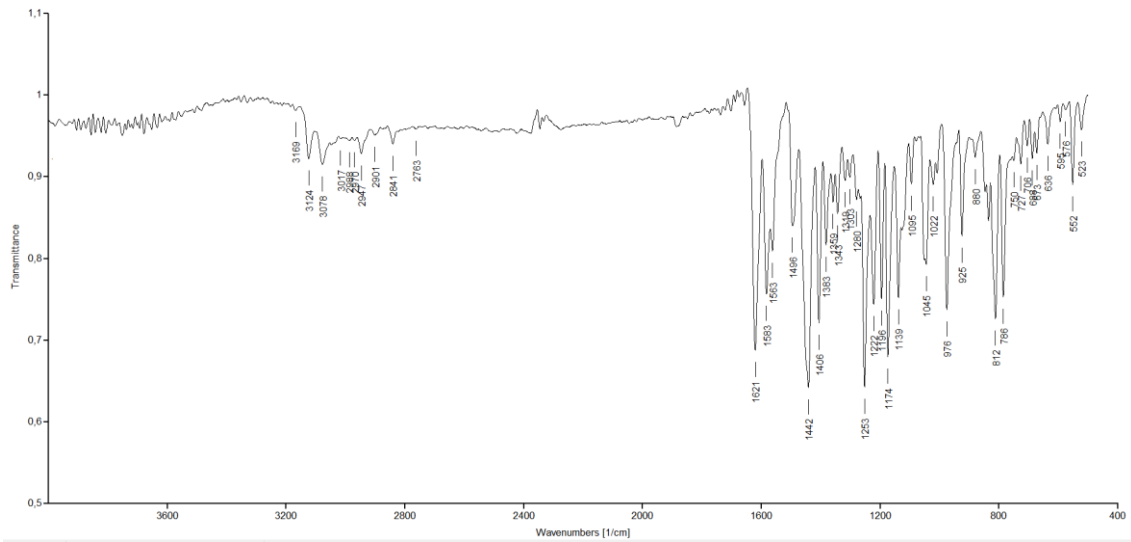
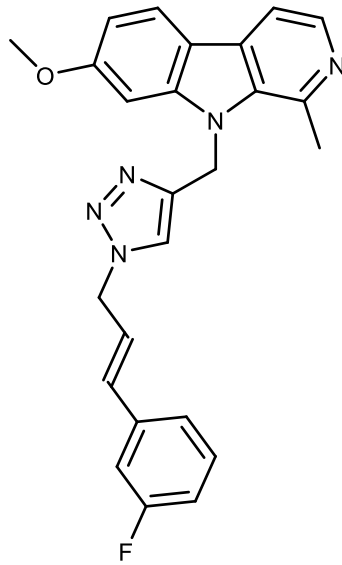
Waters Synapt G2-Si, S/N: UGA365

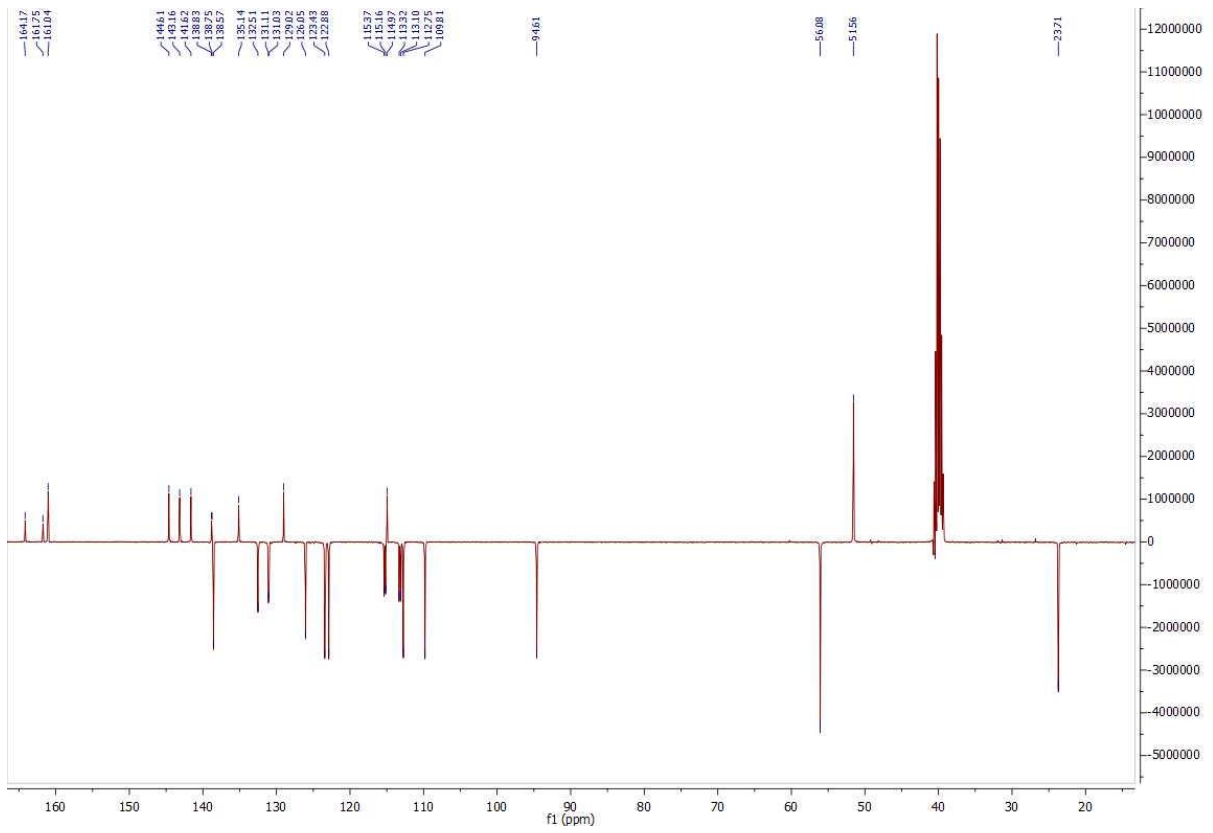
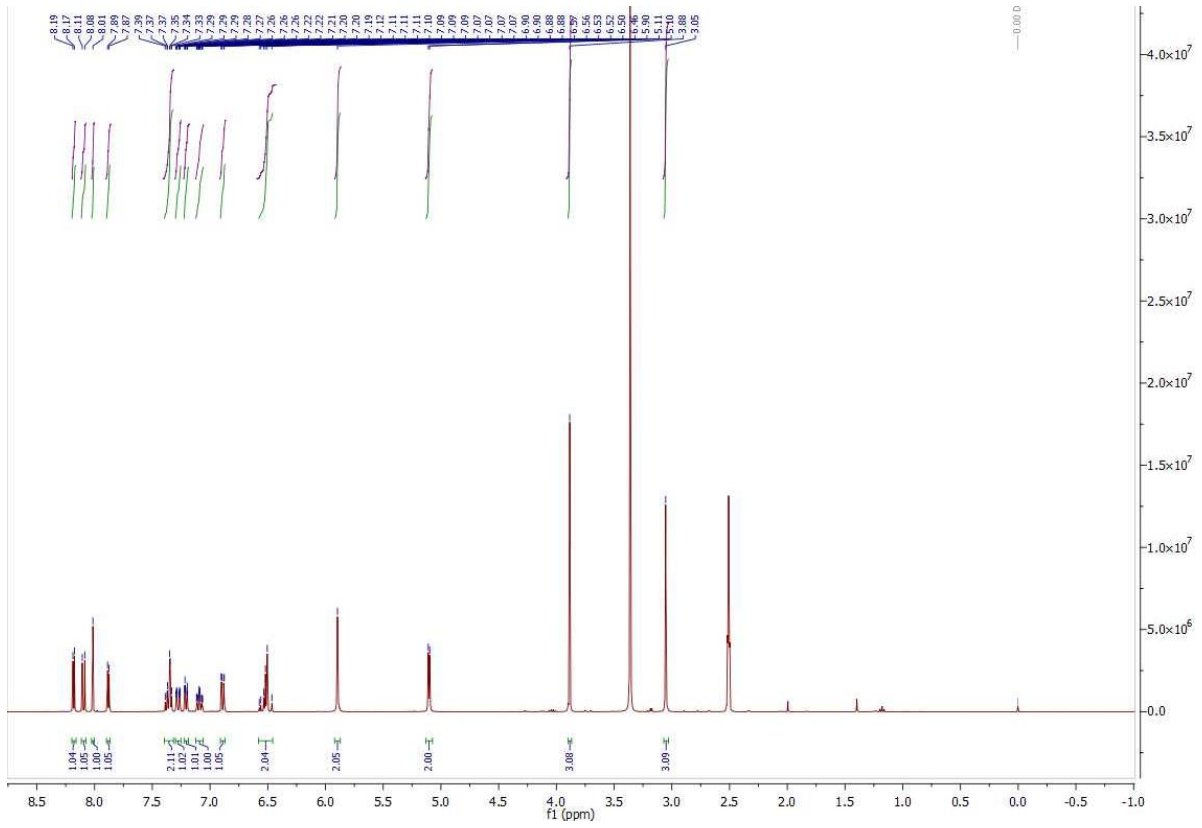
29-Oct-2018 15:48:16
TOF MS ES+
1.05e8



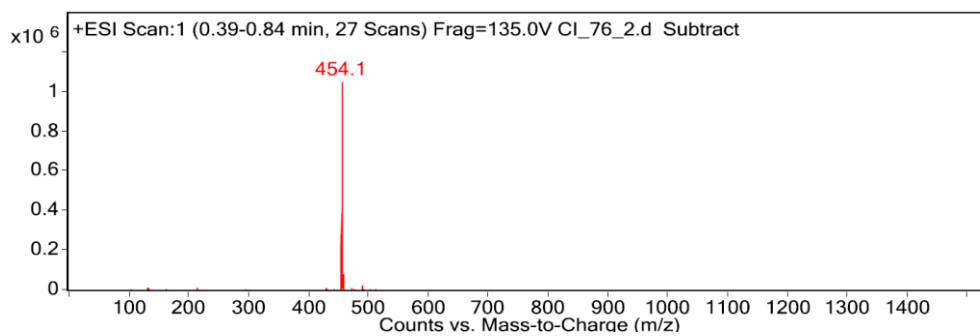
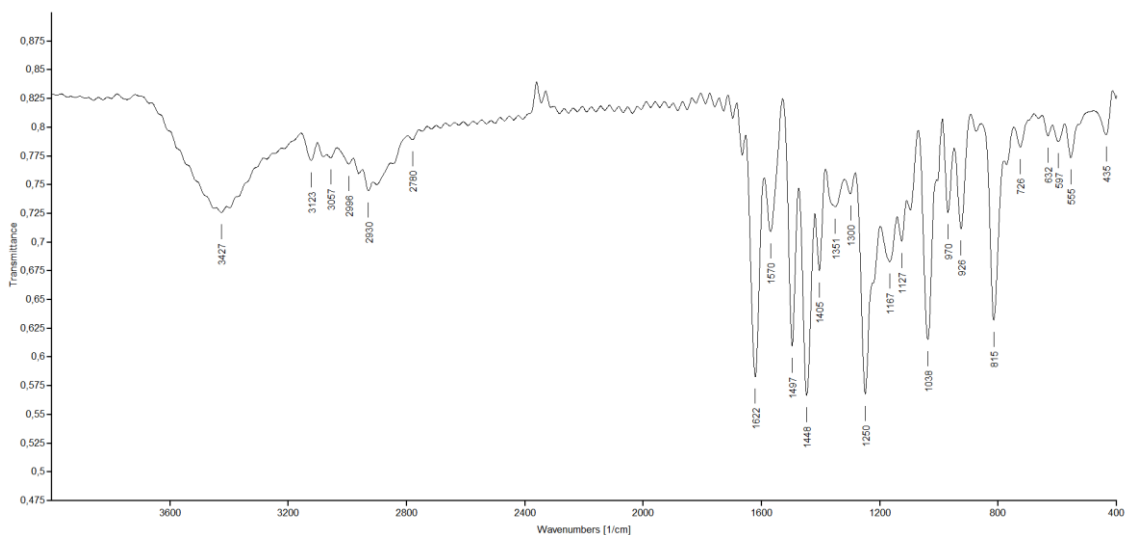
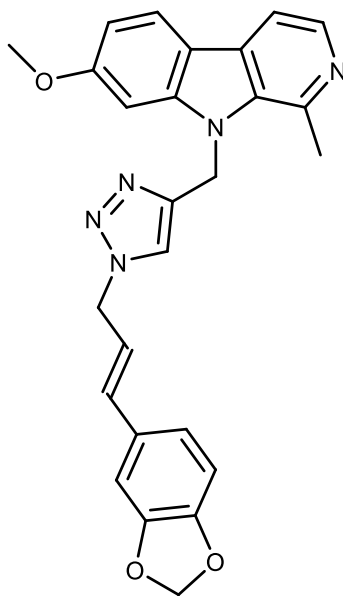


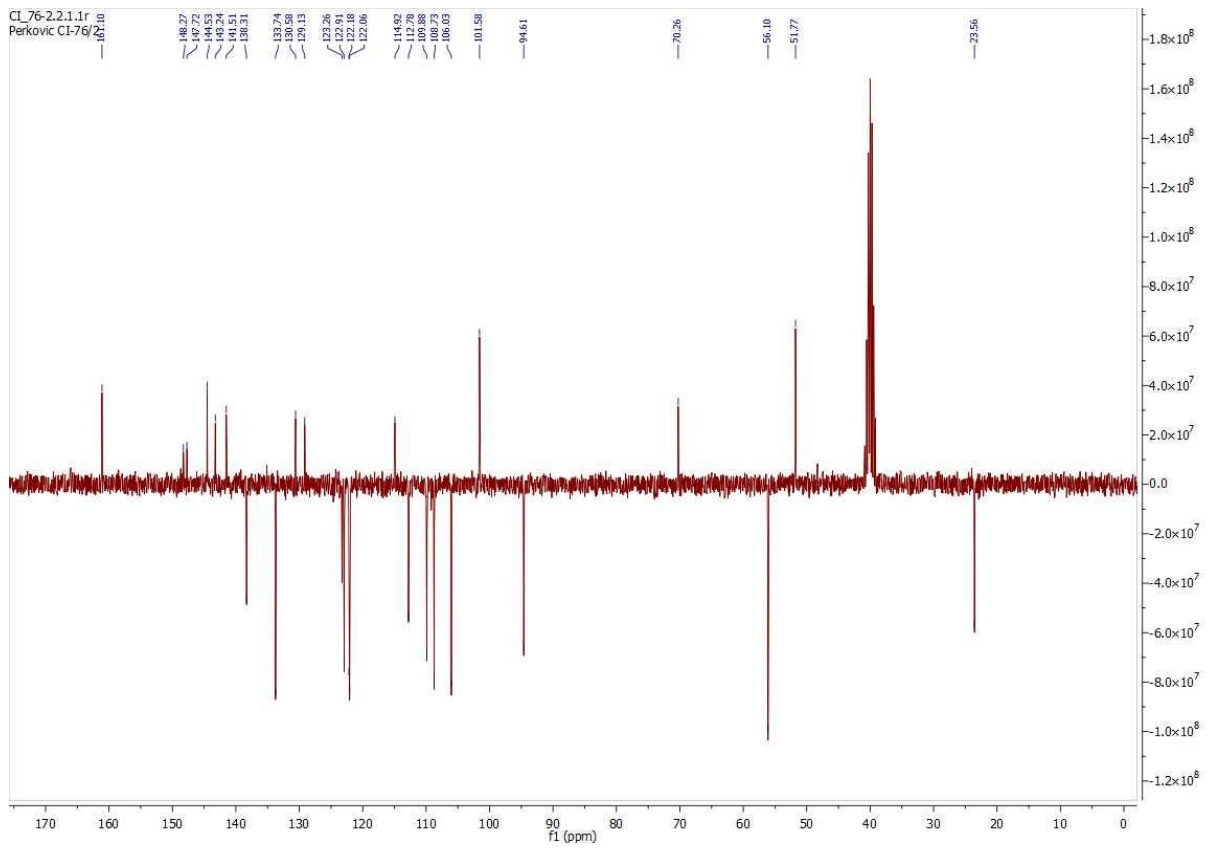
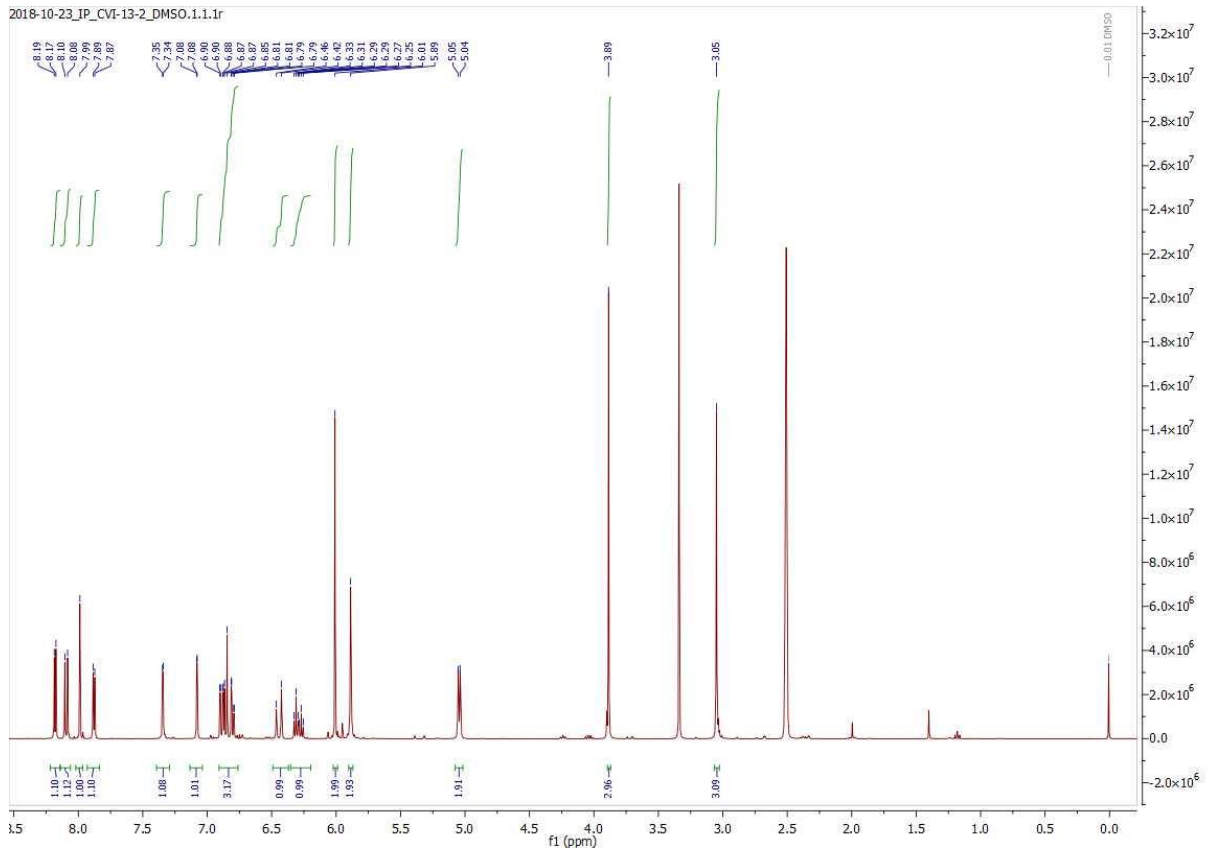
5b





5c





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

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Sinteza i karakterizacija harmicina, hibrida harmina i derivata cimetine kiseline, u položaju N-9 β -karbolinskog prstena

Mislav Vrdoljak

SAŽETAK

Multiformni glioblastom (GBM) je najčešći primarni maligni tumor mozga s medijanom preživljenja nakon dijagnoze od samo 15 mjeseci. Liječenje ove bolesti je zahtjevno zbog pojave rezistencije tumorskih stanica na zračenje i kemoterapiju, što dovodi do progresije i recidiva bolesti. Osim toga, postoji svega nekoliko lijekova za terapiju multiformnog glioblastoma zbog čega je potrebno razvijati nove djelatne tvari koje bi bile učinkovitije i otpornije prema razvoju rezistencije.

Cilj ovog diplomskog rada bila je priprava novih molekula s anti-GBM djelovanjem korištenjem principa molekulske hibridizacije. Harmin, β -karbolinski alkaloid s raznolikim biološkim djelovanjem, i derivati cimetine kiseline (DCK-i) povezani su u jedinstvene molekule (harmicine) korištenjem bakrom(I) katalizirane azid-alkin cikloadicije (klik-reakcije) uz generiranje triazolnog tipa poveznice. S obzirom da harmin i DCK-i ispoljavaju anti-GBM svojstva, očekuje se da će pripremljeni hibridi posjedovati snažno anti-GBM djelovanje. U svrhu pripreme hibrida bilo je potrebno sintetizirati odgovarajuće prekursore: azide DCK-a **3a-c** i alkin harmina **4**. Alkin je sintetiziran u jednom reakcijskom koraku, reakcijom harmina i propargil-bromida uz Cs_2CO_3 , dok su azidi pripremljeni u četiri sintetska koraka. U prvom koraku DCK-i su u reakciji s SOCl_2 uz katalitičku količinu DMF-a, prevedeni u kiselinske kloride koji su potom esterificirani korištenjem EtOH i TEA. Etilni esteri **1a-c** reducirani su pomoću LiAlH_4 , a dobiveni alkoholi **2a-c** prevedeni su u azide **3a-c** uz ADMP i DBU. Željeni hibridi **5a-c** pripremljeni su klik-reakcijom odgovarajućih prekursora u MeOH uz katalitičku količinu Cu(II)-acetata.

Novosintetizirani harmicini karakterizirani su uobičajenim spektroskopskim i analitičkim metodama (^1H i ^{13}C NMR, MS i IR) te su procijenjena njihova farmakokinetička svojstva *in silico*. Svim harmicinima predviđa se dobra oralna bioraspoloživost, dok se hibridima **5a-b** predviđa sposobnost prolaska krvno-moždane barijere. U nastavku istraživanja ispitat će se antiproliferativno djelovanje harmicina *in vitro* na humanu staničnu liniju GBM-a.

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

Rad sadrži: 77 stranica, 20 grafičkih prikaza, 7 tablica i 78 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: multiformni glioblastom, harmin, derivati cimetine kiseline, klik-kemija

Mentor: **Dr. sc. Goran Poje**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Goran Poje**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2023.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Synthesis and characterization of *N*-9-tethered harmicines, harmine-cinnamic acid derivate hybrids

Mislav Vrdoljak

SUMMARY

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary malignant brain tumor with a median survival time of only 15 months. The main concern in GBM treatment is the development of resistance, which leads to disease progression and relapse. In addition, few drugs are available for GBM chemotherapy, highlighting the need for the development of novel and effective anti-GBM agents.

The aim of this work was to synthesize novel molecules with anti-GBM properties using the molecular hybridization approach. Harmine, the β -carboline alkaloid with multiple biological effects, and cinnamic acid derivatives (CADs) were linked *via* a triazole-type linker using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (“click” reaction) to form a hybrid molecule. Considering that both harmine and CADs exhibit anti-GBM properties, the proposed hybrids are expected to have a strong effect on GBM.

To prepare the target hybrids, CAD-based azides **3a-c** and harmine-based alkyne **4** were synthesized. The alkyne **4** was synthesized in one reaction step by reacting harmine with propargyl bromide in the presence of Cs_2CO_3 , whereas the preparation of azides **3a-c** required four-step procedure. In the first step, the CADs were converted to acyl chlorides with SOCl_2 in the presence of DMF. The acyl chlorides were then esterified with ethanol and TEA, and the obtained ethyl esters **1a-c** were reduced to alcohols **2a-c** with LiAlH_4 . Finally, the alcohols were efficiently converted to azides **3a-c** with ADMP and DBU. The “click” reaction of the prepared precursors proceeded smoothly in methanol with a catalytic amount of Cu(II) acetate and gave the desired hybrids **5a-c**.

The structures of the harmicines were confirmed by standard analytical and spectroscopic methods (^1H and ^{13}C NMR, IR and MS). The pharmacokinetic properties of harmicines were calculated *in silico*. Good oral bioavailability was predicted for all harmicines. Additionally, compounds **5a-b** are expected to cross the blood-brain barrier. Further studies will investigate the antiproliferative activity of the harmicines *in vitro* against human GBM cell line.

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

Thesis includes: 77 pages, 20 figures, 7 tables and 78 references. Original is in Croatian language.

Keywords: glioblastoma multiforme, harmine, cinnamic acid derivate, “click” chemistry

Mentor: **Goran Poje, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Goran Poje, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

Daniela Amidžić Klarić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2023.