

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivana Vrdoljak i Jakov Vuk

**Sinteza i karakterizacija novih hibrida harmina i primakina s  
potencijalnim citostatskim djelovanjem**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Kristine Pavić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

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



## KRATICE

A549 – humana stanična linija raka pluća

ADMA – acetaldehid dimetil acetal

B16F-10 – mišja stanična linija melanoma

C57BL/6 – ime soja laboratorijskog miša

CDK – kinaza ovisna o ciklinu

COVID-19 – koronavirusna bolest 2019

Csp3 – udio  $sp^3$  hibridiziranih atoma ugljika u ukupnom broju atoma ugljika u strukturi

CYP – citokrom

CuAAC – bakrom(I) katalizirana alkin-azidna cikloadicija

DCM – diklormetan

DMF – dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

FLEX – fleksibilnost molekule koja je uvjetovana brojem rotirajućih veza

HBL-100 – humana stanična linija epitela dojke

HCT116 – humana stanična linija kolorektalnog karcinoma

HeLa – humana stanična linija adenokarcinoma grlića maternice

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HSP90 – protein toplinskog šoka 90

HT-29 – humana stanična linija kolorektalnog adenokarcinoma

INSATU – zasićenost strukture koja odražava udio ugljika sa  $sp^3$ -hibridnim orbitalama

INSOLU – topljivost molekule izražena preko logaritma topljivosti

KBV 20C – humana stanična linija fibrokarcinoma otpornog na citostatike

KMB – krvno-moždana barijera

LIPO – lipofilnost molekule izražena preko logaritma koeficijenta raspodjele (XLOGP3)

$\log P$  – logaritam koeficijenta raspodjele (mjera lipofilnosti molekule)

$\log S$  – logaritam topljivosti spoja u vodi

MCF-7 – stanična linija adenokarcinoma dojke

MS – masena spektrometrija

NF  $\kappa$ B - nuklearni faktor kapa B

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

pGP – P-glikoprotein

POLAR – polarnost molekule izražena preko topološke polarne površine (TPSA)

PLK – polo-slične kinaze

PQ – primakin

SAR – odnos kemijske strukture i biološke aktivnosti

SIZE – veličina molekule izražena kao molekulska masa

SW620 – humana stanična linija adenokarcinoma debelog crijeva

TBAHS – tetrabutilamonijev hidrogensulfat

TEA – trietilamin

TLC – tankoslojna kromatografija

TPSA – topološka polarna površina molekule

UV – ultraljubičasto zračenje

$t_f$  – temperatura taljenja

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

XLOG P3 – metoda računanja  $\log P$  algoritmom XLOGP3

# Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 1.1. Rak.....  | 2  |
| 1.2. Antimalarici i njihovi derivati kao potencijalni citostatici .....  | 3  |
| 1.3. Primakin .....  | 6  |
| 1.4. Harmin .....  | 7  |
| 1.5. Derivati uree .....   | 10 |
| 1.6. Click kemija .....  | 11 |
| 1.7. Triazoli.....   | 13 |
| 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....   | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....   | 16 |
| 3.1. Sinteza benzotriazolida primakina 8 ( <i>N</i> -{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}- 1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,2,3]triazol-1-karboksamida) (BtcPQ, 1).....           | 19 |
| 3.2. Sinteza <i>N</i> -(5-azidopentan-2-il)-6-metoksikinolin-8-amina (azid PQ, 2).....   | 20 |
| 3.3. Sinteza 1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-ola (harmol, 3).....  | 21 |
| 3.4. Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (4) .....   | 22 |
| 3.5. Sinteza <i>tert</i> -butil (2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)oksi)etil)karbamata (5).....   | 23 |
| 3.6. Sinteza 2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)oksi)etan-1-amina (6).....   | 24 |
| 3.7. Sinteza 6-metoksi- <i>N</i> -(5-(4-(((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-6-il)oksi)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)pentan-2-il)kinolin-8-amina (7).....      | 25 |
| 3.8. Sinteza 1-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-3-(2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)oksi)etil)uree (8).....  | 26 |
| 3.9. Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (9).....  | 27 |
| 3.10. Sinteza <i>tert</i> -butil (2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etil)karbamata (10) .....  | 28 |
| 3.11. Sinteza 2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etan-1-amin (11).....  | 29 |
| 3.12. Sinteza 6-metoksi- <i>N</i> -(4-(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-1-il)butan-2-il)kinolin-8-amina (12)..... | 30 |
| 3.13. Sinteza 1-(2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etil)-3-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)uree (13) .....                                   | 31 |
| 3.14. Sinteza 6-metoksi-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -karbazola (14) .....  | 32 |
| 3.15. Sinteza 6-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido [3,4- <i>b</i> ]indola (15).....  | 33 |
| 3.16. Sinteza 1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-6-ola (16).....  | 34 |
| 3.17. Sinteza 1-metil-6-(prop-2-in-1-iloksi)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (17) .....   | 35 |
| 3.18. Sinteza <i>tert</i> -butil (2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-6-il)oksi)etil) karbamata (18)....   | 36 |
| 3.19. Sinteza 2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-6-il)oksi)etan-1-amina (19).....   | 37 |

|   |    |
|---|----|
| 3.20. Sinteza 6-metoksi- <i>N</i> -(5-(4-(((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)oksi)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)pentan-2-il)kinolin-8-amina (20)..... | 38 |
| 3.21. Sinteza 1-(4-((6-metoksiizokinolin-8-il)amino)pentil)-3-(((2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-6-il)oksi)etil)amino)metil)uree (21).....                    | 39 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....   | 40 |
| 5. ZAKLJUČAK.....   | 60 |
| 6. ZAHVALE .....  | 63 |
| 7. POPIS LITERATURE.....  | 65 |
| 8. SAŽETAK.....   | 72 |
| 9. SUMMARY.....   | 74 |
| 10.PRILOZI.....   | 76 |
| 11.ŽIVOTOPISI .....   | 89 |

## **1. UVOD**



## 1.1. Rak

Rak je zajednički naziv za bolesti koje definira nekontrolirani rast abnormalnih stanica, a može započeti u bilo kojem tkivu ili organu. Nakupina abnormalnih stanica može biti benigna (nekancerogena) i maligna (kancerogena). Karakteristika raka je metastaziranje – proces širenja abnormalnih stanica krvotokom i limfnim sustavom u ostala tkiva i organe [1]. Patologija ove bolesti povezuje se s promjenom ili oštećenjem genetskog materijala (deoksiribonukleinske kiseline, DNK) pri čemu dolazi do mutacija prilikom rasta i diobe stanica. Kao posljedica toga stare i oštećene stanice ne odumiru, a tijelo stvara nove stanice i kada nema potrebe za njima [2].

Na globalnoj razini rak je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) tijekom 2018. godine od raka je umrlo 9,6 milijuna ljudi [1]. Tijekom 2015. godine u Hrvatskoj je dijagnosticirano 22 503 novih slučajeva raka, a od njega su umrle 14 012 osobe [3].

Liječenje raka najčešće uključuje kombinaciju tri osnovna načina liječenja: kirurško odstranjivanje, lijekovi (kemoterapija, imunoterapija, hormonska i ciljana terapija) te zračenje [2]. Unatoč značajnom napretku u terapiji ovih bolesti, problem i dalje predstavlja mala selektivnost ili prevelika toksičnost citostatika što dovodi do ozbiljnih nuspojava, a uočena je i rezistencija tumorskih stanica na citostatike. Sve navedeno upućuje na to kako je potrebno ići u smjeru razvoja novih lijekova s ciljem veće selektivnosti i učinkovitosti [4].

Proces istraživanja i razvoja lijeka je dugotrajan (10–15 godina) te vrlo skup (u prosjeku 2,6 milijardi dolara), a od lijekova koji uđu u klinička ispitivanja samo 12 % dospije na tržište [4]. U protekloj 2020. godini, unatoč pandemiji koronavirusne bolesti 2019 (COVID-19), u Sjedinjenim Američkim Državama odobreno je 53 novih lijekova [5].

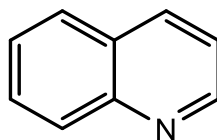
Prenamjena postojećih lijekova sve je učestaliji pristup u istraživanju i razvoju novih lijekova. Ovaj pristup uvelike se koristi upravo zato što se prenamjenom mogu „popuniti“ praznine u prvotnom liječenju. Osim toga, malim modifikacijama strukture lijeka može se povećati učinkovitosti i selektivnosti lijeka. Podatci koji se prikupljaju u kliničkim studijama te ostali koji su javno dostupni ključni su za prenamjenu lijeka. Ovakav način istraživanja svakako smanjuje troškove razvoja novih lijekova [6].

## 1.2. Antimalarici i njihovi derivati kao potencijalni citostatici

Antitumorsko djelovanje antimalarika i njihovih derivata, njihovo sinergističko djelovanje s već postojećim citostaticima kao i smanjenje rezistencije tumorskih stanica nakon kombinirane terapije tema je brojnih studija objavljenih u proteklih dvadeset godina [4].

U liječenju brojnih vrsta raka široku primjenu imaju antimitotski lijekovi. Oni vezanjem na mikrotubule i sprječavanjem njihove polimerizacije ili depolimerizacije, inhibiraju mitozu. Kako se vrlo često razvija rezistencija na citostatike, istraživanja su se usredotočila na poboljšanje učinkovitosti liječenja, konkretno na razvoj mitotika koji će uzrokovati apoptozu. Za učinkovitu borbu protiv malarije razvijeni su razni lijekovi, a najčešće su korišteni klorokin, primakin, meflokin, artemizinin, artesunat, atovakvon te doksicilin. Ustanovljeno je da neki antimalarici imaju i antiproliferativno djelovanje te se istraživao njihov učinak samostalno te u kombinaciji s odobrenim citostaticima. Kada bi se ispitao njihov mehanizam djelovanja u liječenju karcinoma, bili bi lako dostupni u kliničkoj uporabi obzirom na to da im je poznata toksičnost. Kim i suradnici su u svom istraživanju pokušali identificirati mehanizam koji je uključen u djelovanje lijekova protiv malarije na stanice raka. Otkriveno je kako istodobna primjena primakina ili meflokina s vinblastinom visoko senzibilizira humanu staničnu liniju fibrokarcinoma otpornog na citostatike KBV20C. Efekti senzibilizacije uključivali su inhibiciju P-glikoproteina, a to je spriječilo izbacivanje vinblastina preko P-glikoproteina [7].

Kinolin (benzopiridin, 1-azanaftalen) (Slika 1) i njegovi derivati pokazali su različita biološka djelovanja, a među njima i značajan učinak na stanice raka. Jain i suradnici u preglednom radu opisuju različite mehanizme kinolinskih derivata kojima uzrokuju inhibiciju rasta stanica raka. Neki od mehanizama su zaustavljanje staničnog ciklusa, apoptoza, inhibicija angiogeneze i ometanje migracije stanica [8]. Na molekulskoj razini to je primarno inhibicija različitih enzima [9].



**Slika 1.** Strukturna formula kinolina

Zbog svega navedenog, u kliničkoj primjeni postoji velik broj kinolinskih derivata u različitim farmakoterapijskim skupinama:

- antimalarici – kinin, kinidin, klorokin, primakin, hidroksiklorokin, meflokin, amodiakin,
- antivirolici – sakvinavir, elvitegravir
- antimikrobni lijekovi – fluorokinoloni, nitroksolin
- anthelmintici – oksamnivkin
- lokalni anestetici – dibukain
- antiastmatici – montelukast
- lijekovi za liječenje glaukoma – kartilol
- kardiotonici – veznarinon
- antipsihotici – aripiprazol, brekspiprazol
- citostatici – kamptotecin, irinotekan, topotekan [9].

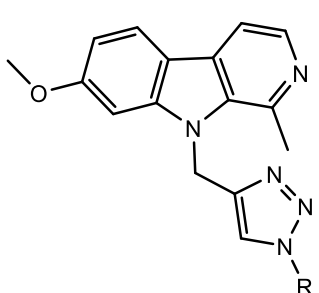
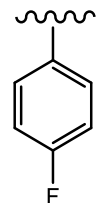
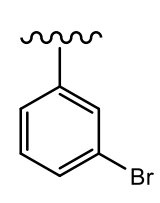
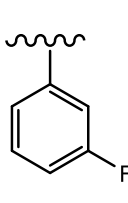
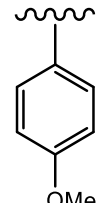
Istraživačka skupina Zavoda za farmaceutsku kemiju posljednjih petnaest godina fokusirana je na derivatizaciju primakina koji sam ima umjereno citostatsko djelovanje [10]. U znanstvenim radovima koji su objavljeni opisane su sinteze novih derivata primakina s potencijalnim citostatskim djelovanjem, a ispitano im je antitumorsko [10, 11, 12, 13], antivirusno [11, 12], antioksidativno [10, 12, 13], antimalarijsko [14], antituberkulozno [13], antibakterijsko te djelovanje na biofilm [15]. Rezultati ispitivanja derivata primakina s poveznicom ureom i semikarbazidom pokazali su značajnu aktivnost prema svim ispitanim staničnim linijama među kojima se ističe visoka aktivnost pojedinih derivata na staničnu liniju adenokarcinoma dojke (MCF-7) i kolorektalnog adenokarcinoma (SW 620) [15].

Osim kinolinskih derivata, harmin je  $\beta$ -karbolin koji se zbog širokog spektra djelovanja koje posjeduje koristi kao spoj uzor za razvoj novih lijekova. Obzirom na brojne biološke i farmakološke učinke (antiproliferativno, antimikrobno, antioksidativno, protuupalno, antidepresivno i neuroprotektivno) derivatizacijom njegove strukture žele se poboljšati njegova farmakokinetička i farmakodinamička svojstva [16].

U različitim istraživanjima, dokazano je da harmin i njegovi derivati različitim mehanizmima pokazuju antitumorsko djelovanje tako da se interkaliraju u strukturu DNA i tako inhibiraju enzime kao što su topoizomeraza I i II, kinaze ovisne o ciklinima (CDK), polo-slične kinaze (PLK 1), kinaze slične proteinu Eg5 te I $\kappa$ B kinaze [17].

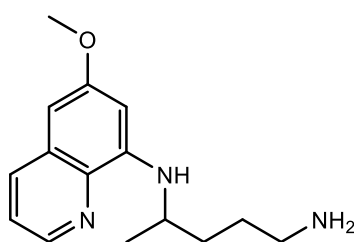
Ayoob i suradnici su u svom istraživanju *click* kemijom sintetizirali različite triazolske derivate harmina kojima su ispitali citostatsko djelovanje na nekoliko staničnih linija: humanog epitela dojke (HBL-100), raka pluća (A549), kolorektalnog adenokarcinoma (HT-29 i HCT-116) te adenokarcinoma grlića maternice (HeLa). Navedeni derivati i djelovanje prikazani su u Tablici 1 [18].

**Tablica 1.** Triazolski derivati harmina i njihovo djelovanje ovisno o supstituentu.

| OPĆA FORMULA  |   |   |  |   |
|---|---|---|--|---|
|  |   |   |  |   |
| <b>R</b>  |  |  |  |  |
| <b>Djelovanje</b>   | Najbolji učinak na sve stanične linije  | Selektivno djelovanje na stanične linije HBL-100 i A549                             | Djelovanje na staničnu liniju HBL-100  | Selektivnost na stanične linije A549, HCT116 i HT-29                                  |

### 1.3. Primakin

Primakin (PQ) je međunarodno nezaštićeno ime *N*-(6-metoksikinolin-8-il)pentan-1,4-diamina (Slika 2). Sintetski je antimalarijski lijek iz skupine 8-aminokinolina, a primjenjuje se više od 60 godina [19]. 1952. godine Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država odobrila je stavljanje PQ u promet, a danas se nalazi na Listi esencijalnih lijekova SZO [20]. Dostupan je kao generički lijek brojnih proizvođača, a na tržištu dolazi u obliku soli s fosfatnom kiselinom. Upotrebljava se kao racemat, iako ima kiralni centar.



**Slika 2.** Strukturna formula primakina (PQ)

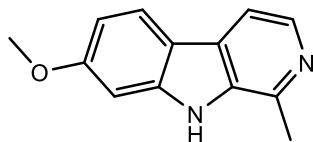
Kao antimalarik djeluje na tkivne shizonte svih vrsta plazmodija – uzročnika malarije. Jedini je koji ima djelovanje na hipnozoite – latentni oblik karakterističan za vrstu *Plasmodium vivax* i *Plasmodium ovale*. Zbog toga se koristi za liječenje akutnih infekcija uzrokovanih ovim vrstama te se daje i kao primarna profilaksa svih vrsta malarije [19]. Vrlo je učinkovit protiv gametocita svih vrsta plazmodija uključujući i vrstu *P. falciparum* [21]. Ovo djelovanje je važno za sprječavanje širenja infekcije. S obzirom na to da ima jako slabo djelovanje na aseksualne eritrocitne oblike plazmodija, uvijek se primjenjuje u kombinaciji s krvnim shizontocidima kao što su klorokin i artemizinin [4].

Mehanizam djelovanja PQ povezuje se s metaboličkim reakcijama u mitohondriju parazita. Smatra se da PQ oponaša ubikinon koji prenosi elektrone u respiratornom lancu. Osim toga, potencijalno djelovanje povezuje se s produkcijom visokoreaktivnih metabolita koji uzrokuju oksidativni stres [21]. Neka istraživanja su pokazala i djelovanje PQ na membranske lipide. Pri fiziološkom pH, PQ je pozitivno nabijen te kao takav reagira s negativno nabijenim fosfolipidima što rezultira povećanjem fluidnosti stanične membrane i promjenama u funkciji membranskih proteina [22].

Modifikacijom strukture PQ dobiveni su derivati različitih djelovanja. Razlikujemo derivate sa supstituentima na kinolinskom prstenu i derivate koji su dobiveni modifikacijom primarne amino skupine bočnog lanca [21]. Osim što su neki sintetizirani derivati pokazali poboljšano antimalarijsko djelovanje i smanjenu toksičnost, identificirani su i neki koji pokazuju citostatsko i antimikobakterijsko djelovanje [15].

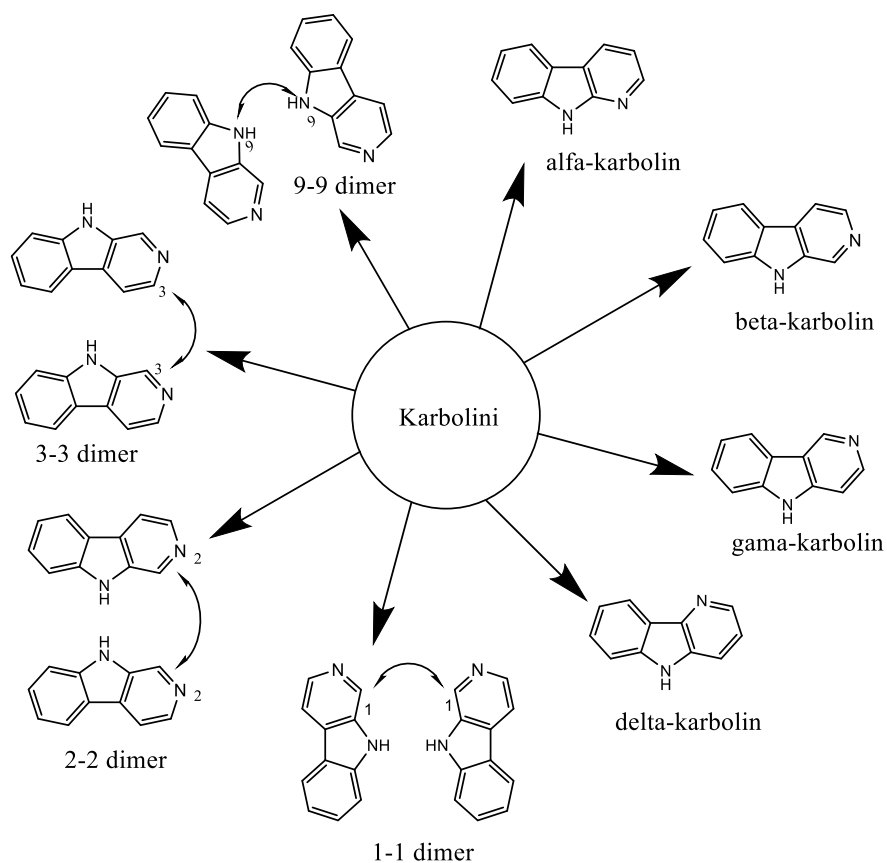
#### 1.4. Harmin

Harmin (Slika 3) pripada skupini organskih spojeva znanih kao harmala alkaloidi. Harmala alkaloidi imaju prepoznatljivi  $\beta$ -karbolinski strukturni skelet koji se sastoji od tri prstena: pirimidina fuzioniranog s pirolom iz indola što čini karakteristični pirido[3,4-*b*]indolski triciklički sustav. Harmin ili telepatin, kemijskog naziva 7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol, samo je jedan od mnogobrojnih  $\beta$ -karbolina koji se izvorno nalazi u korijenju i sjemenkama biljne vrste *Peganum harmala*, Nitrariaceae (sirijska rutvica). Uz harmin, harmala alkaloide čine i harmalin, harmol, harmolol i harman [23].



**Slika 3.** Harmin

Karbolini su klasificirani kao  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  karbolini u odnosu na položaj dušika u prstenu. Osim monomernih molekula moguća su i povezivanja karbolina u dimere na 1-1, 2-2, 3-3 i 9-9 pozicijama (Slika 4).  $\beta$ -Karbolini pokazuju širok spektar djelovanja uključujući sedativno, anksiolitičko, hipnotičko, antikonvulzivno, antiviralno, antiparazitsko i antitumorsko koje je glavni fokus našeg istraživanja [23].



**Slika 4.** Različiti karbolini [23]

Harmin je kristalni prah bijele boje koji je slabo topljiv u polarnim dok se dobro otapa u nepolarnim organskim otapalima. Pod ultraljubičastim (UV) svjetlom fluorescira te je zbog toga njegove derivate lako uočiti tankoslojnom kromatografijom (TLC) pod UV svjetlom. Najvažnija su fizikalno-kemijska svojstva harmina navedena u Tablici 2.

**Tablica 2.** Fizikalno-kemijska svojstva harmina.

|                                     |                       |
|-------------------------------------|-----------------------|
| <b>Kemijska formula</b>             | $C_{13}H_{12}N_2O$    |
| <b>Relativna molarna masa</b>       | 212,25 g/mol          |
| <b>Temperatura taljenja</b>         | 264-265 °C            |
| <b>Formalni naboj</b>               | 0                     |
| <b>Broj donora vodikove veze</b>    | 1                     |
| <b>Broj akceptora vodikove veze</b> | 2                     |
| <b>Gustoća</b>                      | 1,3 g/cm <sup>3</sup> |
| <b>log <i>P</i></b>                 | 3,56                  |

Potencijalne bi mete farmakološkog djelovanja harmina bile protein-kinaze, poput CDK. CDK su porodica kinaza koje imaju ulogu u regulaciji staničnoga ciklusa. Kompleksi ciklina s pripadajućim kinazama reguliraju progresiju kroz stanični ciklus te je poznato najmanje devet CDK, od kojih su CDK1, CDK2, CDK3 i CDK4 direktno involvirane u regulaciju staničnog ciklusa. Svoj učinak ispoljavaju fosforilacijom supstrata koji je povezan s progresijom kroz određeni stanični ciklus. Dakle, inhibicijom se CDK1, CDK2 i CDK5 zaustavlja napredovanje stanice kroz ciklus na način da harmin ulazi u kompeticiju s adenozin trifosfatom za vezno mjesto na kinazi [25].

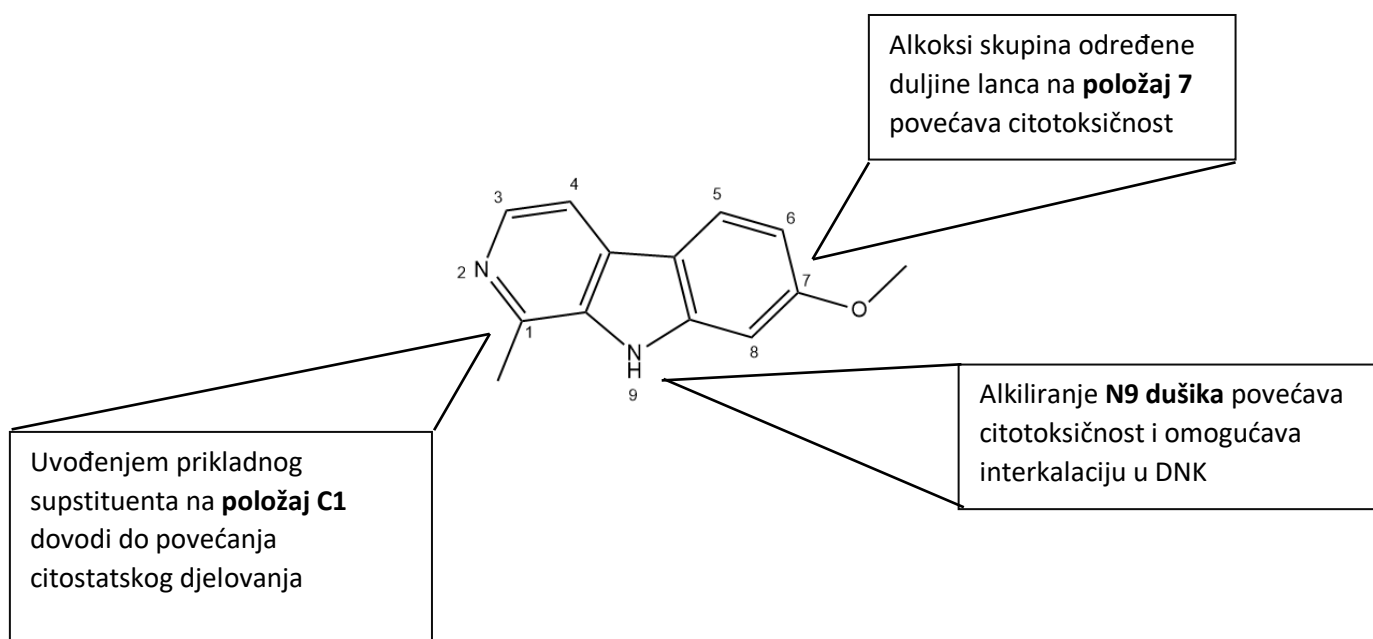
U *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima uočeno je citotoksično, genotoksično i mutageno djelovanje harmina u različitim organizmima, uključujući njegovu sposobnost jednolančanih i dvolančanih lomova DNK u kvasca *Saccharomyces cerevisiae* [24], interkalacije u strukturu DNK i inhibicije enzima topoizomeraze I [24], aktivacije programirane stanične smrti (apoptoze) te regulacije transkripcijskih faktora i lučenja proupalnih citokina u staničnoj kulturi mišjeg melanoma (B16F-10), kao i njegovo potencijalno antiangiogeno djelovanje na stanice B16F-10 kod C57BL/6 miševa [25]. Svakako je jasno da su onda brojni navedeni učinci potaknuli sintezu novih analoga s potencijalnim antiproliferativnim djelovanjem.

Od mnogobrojnih harmala alkaloida harmin se smatra najaktivnijim  $\beta$ -karbolinom i u svrhu toga su napravljene mnoge studije u kojima su varirani supstituenti u svrhu dobivanja određenih farmakodinamičkih i farmakokinetičkih karakteristika. Ispitivanjem odnosa strukture i djelovanja, odnosno SAR-a (*engl.* Structure-activity relationship) sintetiziranih derivata došlo se do određenih zaključaka (Slika 5):

- 1) Uvođenjem **alkoksi** skupine na **položaj 7**  $\beta$ -karbolinskog prstena utječe se na povećanje citotoksičnosti molekule. Variranjem duljine lanca alkoksi supstituenta povećava se citotoksičnost te omogućuje specifično djelovanje na određene stanične linije karcinoma [18].
- 2) Derivati harmina **alkilirani na N9 dušiku** pokazuju značajnu citotoksičnost [18].
- 3) Kao što je već prije navedeno, interkalacijom derivata harmina u DNK propagira se apoptoza stanica pa se u tu svrhu išlo na povećanje citostatskog djelovanja *in vivo* i *in vitro* uvođenjem prikladnih supstituenata na **položaj 9** pirola.



- 4) **Metoksi skupina** koja se nalazi na **položaju 7** indola harmina zaslužna je za neurotoksičnost pa se ona značajno smanjuje zamjenom metoksi skupine nekim većim supstituentom [18].
- 5) **Ugljikov atom** na položaju **C1** bitan je za citostatsko djelovanje  $\beta$ -karbolinskih derivata. Prikladan supstituent uveden na ovom mjestu u molekuli može dovesti do značajnog povećanja citostatskog djelovanja [17].



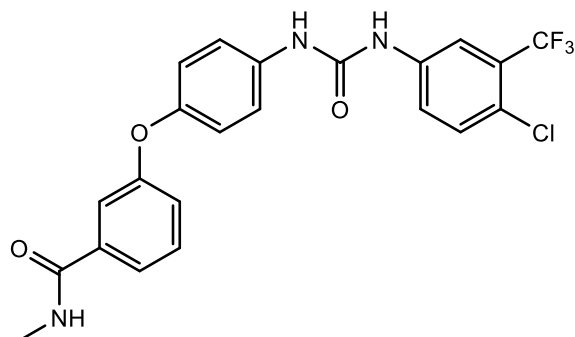
**Slika 5.** Pregled modifikacija harminskog skeleta koji utječu na povećanje citostatskog djelovanja

### 1.5. Derivati uree

Derivati uree koji obuhvaćaju *N*-nitrozouree, diarilsulfoniluree, benzoiluree kao i tiouree prepoznati su kao potencijalne skupine s antikancerogenom aktivnošću [26]. Urea je, kao poveznica između dviju molekula, prisutna u mnogim skupinama biološki aktivnih spojeva [27, 28, 29]. Tako je, primjerice, Bayer razvio sorafenib (Slika 6), inhibitor protein-kinaze, koji se koristi kao citostatik, odnosno, za liječenje uznapredovalog karcinoma bubrega, jetre i štitne žlijezde.

Mnogo se truda ulaže u proučavanje strukturnih varijacija analoga urea u svrhu postizanja visoke efikasnosti liječenja [30, 31]. Benzoiluree su se pokazale kao potencijalni

citostatici zbog njihove sposobnosti da inhibiraju formiranje mikrotubula iz tubulina čime se inhibira stanični ciklus u M-fazi i izaziva apoptoza promoviranjem bcl-2 fosforilacije [31, 32].

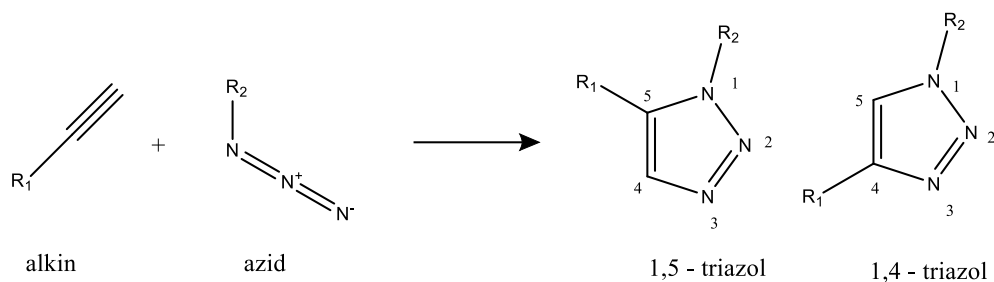


**Slika 6.** Sorafenib

## 1.6. Click kemija

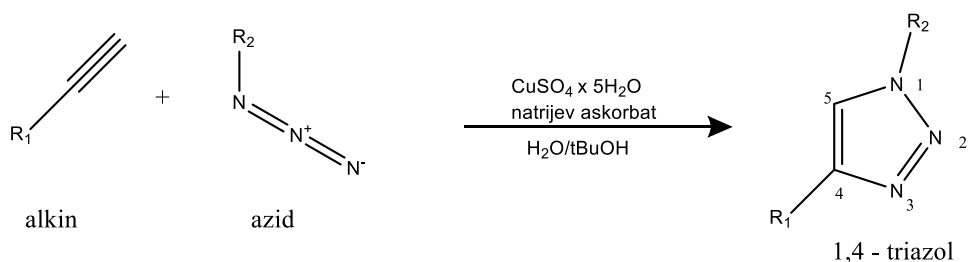
Glavni cilj optimiranja struktura postojećih spojeva tijekom istraživanja i razvoja lijekova je sintetizirati u što kraćem vremenu velik broj spojeva (tzv. knjižnice spojeva) s određenim djelovanjem. Kako bi doprinijeli bržoj izgradnji novih molekula, potrebno je neprestano razvijati nove metode sinteze koje će biti pouzdane, selektivne i učinkovite. Upravo je jedna takva metoda predstavljena 2001. pod vodstvom Sharplessa i suradnika koji su otkrićem bakrom (I)-katalizirane alkin-azidne cikloadicije (CuAAC) definirali novi kemijski koncept – *click* kemija. Ukoliko se neka kemijska reakcija naziva *click* reakcijom, mora zadovoljavati kriterije da je modularna i stereospecifična, ne nužno i enantioselektivna te mora imati široki opseg i veliko iskorištenje. Uvjeti reakcije trebaju biti jednostavni, a reakcije trebaju biti neosjetljive na vodu i kisik. Polazni reagensi i kemikalije trebaju biti lako dostupni, a otapalo u kojem se reakcija odvija ne smije biti uobičajeno industrijsko već neškodljiva otapala poput vode ili otapala koja se lako uklanjaju. U reakciji se mogu generirati samo neškodljivi nusprodukti koji se mogu ukloniti nekromatografskim metodama kao što je prekrystalizacija ili destilacija. Čisti produkt mora biti stabilan pri fiziološkim uvjetima [33].

CuAAC unaprijedila je Huisgenovu alkin-azidnu cikloadiciju (1,3-dipolarna cikloadicija) u kojoj su osnovni nedostaci bili nastanak smjese 1,4- i 1,5- supstituiranih produkata (Shema 1), vrijeme reakcije (oko 18 h) i odvijanje reakcije na povišenoj temperaturi (oko 98 °C) [34].



**Shema 1.** Huisgenova alkin-azidna cikloadicija s regioselektivnim produktima

Uvođenjem bakra (I) u reakciju, cikloadicija je moguća bez zagrijavanja, a reakcija je ubrzana 10 milijuna puta. Glavna prednost bakra (I) u reakciji je regioselektivnost – u reakciji nastaje samo produkt 1,4-regioizomer (Shema 2) [35, 36].



**Shema 2.** CuAAC – click reakcija [38]

Kako bi dobili učinkovit katalitički sustav, često se koriste bakrove (II) soli kao što su bakrov (II) sulfat pentahidrat ili bakrov (II) acetat uz prisustvo reducirajućeg agensa (natrijev askorbat, elementarni bakar ili metanol). Uloga reducirajućeg agensa je neprestano reducirati bakar (II) u bakar (I). U reakciji se kao otapalo najčešće koristi smjesa *tert*-butanola i vode. Organska otapala kao što su tetrahidrofuran, diklormetan uz prisustvo stehiometrijske količine bakrove (I) soli i suviška baze (tercijarni amin, npr trietilamin, TEA) koriste se samo ukoliko uvjeti reakcije ne dozvoljavaju vodeni medij [37].

## 1.7. Triazoli

Triazoli su peteročlani heterociklički prstenovi koji imaju tri atoma dušika. Ovisno o položaju razlikujemo 1,2,3- i 1,2,4-triazole. Imaju i bazična i kisela svojstva, a s obzirom na visoku aromatsku stabilizaciju, stabilni su i u reducirajućim i oksidirajućim uvjetima. Posjeduju jaki dipolni moment (5,2–5,6 Debye) zbog čega mogu formirati vodikove veze (akceptori su) te sudjelovati u dipol-dipol i  $\pi$ - $\pi$  interakcijama. Ovo svojstvo omogućuje triazolima dobru topljivost, ali i vezanje na brojne biomolekularne mete. Vrlo su otporni na metaboličku i kemijsku razgradnju što dodatno doprinosi stabilnosti lijekova koje imaju triazol u svojoj strukturi [39, 40]. Navedena svojstva primjenjuju se pri optimiranju farmakoloških svojstava novih lijekova bilo da dovode do jačanja djelovanja ili smanjenja toksičnosti [41], a korisni su i kao poveznice farmakofora u homodimerne ili heterodimerne lijekove gdje se povezuju molekule koje se vežu na različita mjesta na istoj meti.

## **2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Ciljevi ovog istraživačkog rada su sinteza i karakterizacija novih hibridnih molekula, derivata primakina i harmina s ureom ili triazolom kao poveznicama koji bi imali potencijalno citostatsko i/ili antimalarijsko djelovanje. Kao kvalitetna i atraktivna strategija u ostvarivanju navedenih ciljeva, pokazala se metoda molekulske hibridizacije. Ona omogućuje povezivanje fragmenata u jednu molekulu, točnije dva fragmenta koja posjeduju željenu aktivnost [42]. Novosintetizirane molekule idealno bi imale manji broj nuspojava te viši stupanj djelotvornosti. U ovom radu prikazana je sinteza spojeva koji u strukturi sadrže primakin – antimalarijski lijek iz skupine 8-aminokinolina te harmin,  $\beta$ -karbolinski alkaloid nađen u brojnim biljkama.

Urea i 1,2,3-triazolski prsten korišteni su kao poveznica dvaju fragmenata. Odabrani su radi svoje kemijske i biološke stabilnosti kao i niza interakcija koje ostvaruju s enzimima i receptorima, a dokazane su kao korisne [42].

U daljnjem će se istraživanju, koje nadilazi okvire ovog rada, ispitati citostatsko djelovanje novosintetiziranih spojeva.

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

Tališta novosintetiziranih spojeva ( $t_f$ ) određena su na Stuart Melting Point Apparatusu 3 (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana.

$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na NMR spektrometru Bruker Avance III HD koji radi na 600, odnosno 400 MHz za  $^1\text{H}$  te 151, odnosno 101 MHz za  $^{13}\text{C}$  jezgre (Bruker, Billerica, MA, USA). Uzorci su mjereni u DMSO- $d_6$  otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su u ppm (parts per million) u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard u  $^1\text{H}$ , odnosno signal DMSO u  $^{13}\text{C}$  spektru (39,52 ppm). Konstante sprezanja ( $J$ ) izražene su u Hz.

Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS instrumentu (HPLC, Agilent Technologies 1200 Series; MS, Agilent Technologies 6410 TripleQuad, Santa Clara, CA, USA). Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom modu korištena je kao tehnika ionizacije. Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na silikagel pločama 60 F254 (Merck, Njemačka) uz sljedeće pokretne faze: cikloheksan/etil-acetat (1:1) cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5, 1:1:0,1, 3:1:0,5) te diklormetan/metanol (8,5:1,5, 7,5:2,5, 9:1, 9,5:0,5, 8:2). Mrlje su vizualizirane kratkovalnim UV svjetlom ( $\lambda = 254$  i 360 nm) i parama joda.

Za pročišćavanje produkata korištena je normalno-fazna kromatografija na koloni. Kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Sigma-Aldrich (SAD), a kao pokretne su faze korištene iste smjese diklormetana, etil-acetata, metanola i cikloheksana u istim omjerima kao i u TLC-u kojom je provjeravan tijek i čistoća produkta. Analizirani spojevi su također detektirani UV zračenjem ( $\lambda = 254$  i 360 nm) i parama joda.

Reakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem provedena je u CEM Discover (CEM, SAD) mikrovalnom reaktoru u staklenim kivetama.

Harmin, natrijev hidrid, PQ difosfat, glacijalna octena kiselina, acetaldehid dimetil acetal (ADMA), bezvodni metanol i TEA nabavljeni su od tvrtke Sigma Aldrich (SAD), cezijev karbonat i 80 % otopina propargil-bromida u toluenu od tvrtke TCI (Njemačka), 47 % bromovodična kiselina, natrijev azid i imidazol od tvrtke Merck (Njemačka), kalijev karbonat i natrijev ditionit od tvrtke Kemika (Hrvatska), a tionil klorid od proizvođača Honeywell Fluka Chemicals (Njemačka). Bakrov (II) acetat nabavljen je od proizvođača Alfa Aesar (SAD).

Korišten je bezvodni DMF, čuvan nad aktiviranim molekulskim sitima. Sve ostale kemikalije bile su *p.a.* čistoće.

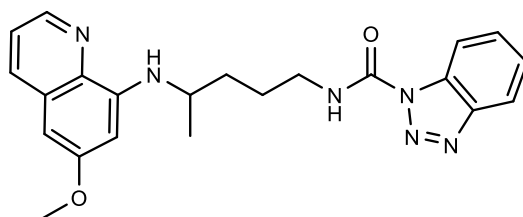


Klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (Btc-Cl) dobiven je prema prethodno opisanom postupku refluksiranjem otopine BtH (benzotriazol) i trifozgena u bezvodnom toluenu na 115 °C kroz 3 h [11].

Primakin je iz soli primakin difosfata oslobođen tako da je otopina primakin difosfata u vodi zaluzena 5 % otopinom NaOH do pH 10-11 te ekstrahirana diklormetanom [4].

Hidrokloridna sol imidazol-1-sulfonil azida ( $ISA \times HCl$ ) dobivena je u dva koraka. U prvom koraku sulfonilkorid i azid su miješani na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon 24 h u reakcijsku smjesu dodan je imidazol. Nakon ekstrakcije etil-acetatom i zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata dokapana je 1 M klorovodična kiselina do taloženja nakon čega je sol odsisana.

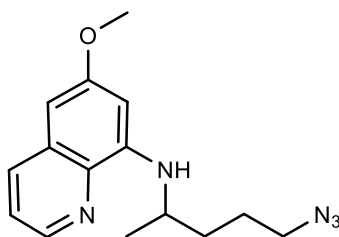
**3.1. Sinteza benzotriazolida primakina 8 (*N*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-karboksamida) (BtcPQ, 1)**



Spoj **1** pripremljen je po literaturnom postupku [11]. Uz miješanje na ledenoj kupelji tijekom 0,25 h smjesi 1,324 g (7,42 mmol) 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl) i 0,749 g (7,42 mmol) TEA u bezvodnom toluenu (30 mL) dokapana je otopina PQ (1,924 g, 7,42 mmol) u bezvodnom toluenu (20 mL). Reakcijska smjesa je miješana 2 h na sobnoj temperaturi, a zatim je ekstrahirana vodom (3 × 30 mL). Organski sloj osušen je nad bezvodnim natrijevim slufatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni spoj pročišćen je na kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 3:1:0,5. Čisti spoj **1** rastrljan je u dietil-eteru i odsisan.

Iskorištenje: 0,053 g (78 %).

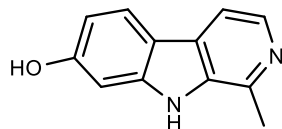
### 3.2. Sinteza *N*-(5-azidopentan-2-il)-6-metoksikinolin-8-amina (azid PQ, 2)



0,2 g PQ difosfata suspendirano je u 2 mL bezvodnog metanola te je dodano 0,212 g kalijevog karbonata, na vrhu špatule bakrov (II) sulfat pentahidrat te 0,091 g ISA × HCl. Reakcija smjesa je bila zaštićena od svjetlosti. Nakon 2,5 h reakcija je gotova te je uparen metanol te je dodano 30 mL destilirane vode. pH je podešen, s 5 % NaOH na 10-11 te je smjesa ekstrahirana diklormetanom (3 × 40 mL). Nakon sušenja nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtracije uklonjeno je organsko otapalo uparavanjem pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja na kromatografskoj koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 3:1:0,5 dobiven je čisti spoj **2**.

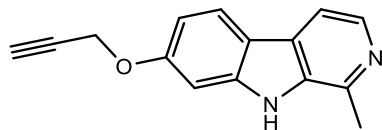
Iskorištenje: 0,083 g (66 %).

### 3.3. Sinteza 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ola (harmol, **3**)



Spoj **3** napravljen prema literaturnom postupku [42]. 0,151 g (0,707 mmol) harmina, 3 mL glacijalne octene kiseline i 1,5 mL bromovodične kiseline (47 %) pomiješano je u kiveti za mikrovalni reaktor (75 W, 140 °C, 25 min). Postupak je ponovljen s istim količinama još pet puta. Reakcijske smjese svih šest kiveta prebačene su u 50 mL destilirane vode te je zalučeno s 5 % NaOH do pH 9-10. Nakon što je podešen pH, spoj je ekstrahiran etil-acetatom (3 × 400 mL), organski sloj sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom te filtriran, a organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom. Dobiveni žuti talog spoja **3** rastrljan je u dietil-eteru i odsisan. Iskorištenje: 0,803 g (95,5 %).

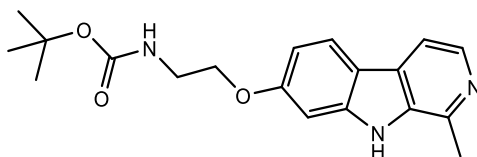
### 3.4. Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-b]indola (4)



0,270 g (1,362 mmol) harmola **3** otopljeno je u 5 mL suhog DMF-a. Otopini je dodano 0,621 g (1,907 mmol) cezijeva karbonata te je propuhano dušikom. Nakon 15 minuta dodano je 0,182 mL (1,634 mmol) 80 % propargil-bromida i opet je propuhano dušikom. Smjesa je miješana 4 h na sobnoj temperaturi. Reakcija je praćena TLC-om (diklormetan/metanol 9:1). U reakcijsku smjesu dodano je 50 mL destilirane vode te je spoj ekstrahiran etil-acetatom. Organski sloj je isparan destiliranom vodom, a zatim je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltriran. Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom, a preostalo je smeđe ulje koje kristalizira. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 9:1 i rastrljavanja u dietil-eteru dobiven je sivi talog spoja **4**.

Iskorištenje: 0,197 g (61,2 %).

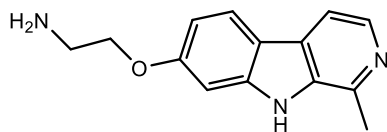
**3.5. Sinteza *tert*-butil (2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)karbamata (5)**



U 2 mL suhog DMF-a suspendirano je 0,625 g (1,337mmol) harmola **3** i 0,610 g (1,871 mmol) cezijeva karbonata. Reakcijska smjesa propuhana dušikom. Nakon 10 minuta dodano 0,719 g (3,209 mmol) 2-(Boc-amino)etil bromida. Reakcija je zagrijana na 95 °C. Preko noći je ostavljeno na sobnoj temperaturi, a iduće jutro opet upaljeno zagrijavanje te je reakcija gotova nakon 1 h. U reakcijsku smjesu dodano 25 mL destilirane vode. Produkt je ekstrahiran etil-acetatom (3 × 30 mL). Organski sloj ispran je zasićenom otopinom natrijevog klorida (2 × 20 mL), sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 8:1. Čisti spoj **5** rastrljan je u dietil-eteru i odsisan.

Iskorištenje: 0,3 g (62,2 %).

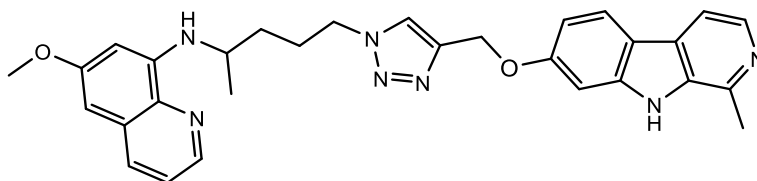
### 3.6. Sinteza 2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)oksi)etan-1-amina (6)



0,581 g (1,702 mmol) spoja **5** otopljeno je u 4 mL metanola. U otopinu dodano 4,255 mL (17,02 mmol) 4M klorovodične kiseline. Reakcijska smjesa zagrijana je na 50 °C. Preko noći ostavljena na sobnoj temperaturi i idući dan je gotova. Metanol je uparen pod sniženim tlakom, a ostatak otopljen u vodi. Otopina je zaluzena s 5 % NaOH do pH 10 i ekstrahirana etil-acetatom (5 × 30mL). Organski sloj ispran je vodom (2 × 20 mL), osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Zatim je organsko otapalo upareno pod sniženim tlakom, a čisti produkt **6** je rastrljan u dietil-eteru i odsisan.

Iskorištenje: 0,327 g (80 %).

**3.7. Sinteza 6-metoksi-N-(5-(4-(((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)pentan-2-il)kinolin-8-amina (7)**



U 2 mL DMF-a dodano je 0,069g (0,242 mmol) azida PQ **2** i 0,038 g (0,161 mmol) alkina **4**. U reakcijsku smjesu dodano je 0,04 g natrijevog askorbata otopljenog u 1 mL destilirane vode te 20  $\mu$ L bakrovog (II) sulfata. Nakon 24 h reakcija je gotova te je reakcijska smjesa ekstrahirana etil-acetatom (5  $\times$  20 mL). Organski sloj je osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Zatim je organsko otapalo upareno pod sniženim tlakom, a dobiveni spoj je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5. Čisti spoj **20** je rastrljan u smjesi dietil-etera i petroletera te odsisan.

Iskorištenje: 0,028 g (33 %).

Talište: 156-158 °C.

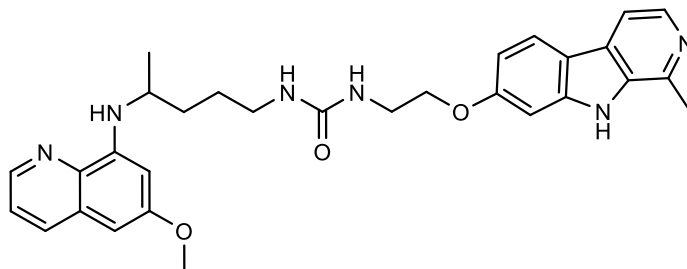
ESI-MS:  $m/z$  522,2 (M+1)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm) 11,45 (s, 1H), 8,53-8,52 (dd,  $J$  = 4,2, 1,6 Hz, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,15-8,14 (d,  $J$  = 5,2 Hz, 1H), 8,08-8,07 (dd,  $J$  = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 8,06-8,04 (d,  $J$  = 8,6 Hz, 1H), 7,80-7,79 (d,  $J$  = 5,2 Hz, 1H), 7,43-7,41 (dd,  $J$  = 8,2, 4,2 Hz, 1H), 7,16 (s, 1H), 6,90-6,88 (dd,  $J$  = 8,6, 2,3 Hz, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,27 (s, 1H), 6,15-6,14 (d,  $J$  = 8,9 Hz, 1H), 5,24 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 4,42-4,40 (td,  $J$  = 7,1, 1,5 Hz, 2H), 3,67-3,64 (m, 1H), 2,71 (s, 3H), 1,68-1,63 (m, 1H), 1,53-1,48 (m, 1H), 1,18 (d,  $J$  = 6,3 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm) 158,99, 158,78, 144,57, 144,27, 142,67, 141,77, 141,32, 137,72, 134,82, 134,57, 134,53, 129,58, 127,13, 124,46, 122,63, 122,12, 115,09, 111,95, 109,48, 96,27, 95,81, 91,75, 61,52, 55,00, 49,43, 46,76, 32,79, 26,73, 20,31, 20,10.



**3.8. Sinteza 1-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-3-(2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)oksi)etil)uree (8)**



Smjesa 0,053 g (0,133mmol) amina **6**, 0,064 g (0,266 mmol) BtcPQ **1**, 0,059 mL (0,426 mmol) TEA, 2 mL suhog DCM-a i natrijevog ditionita (na vrhu špatule) grijana je 75 min na 65 °C u mikrovalnom reaktoru uz snagu mikrovalova 75 W. U reakcijsku smjesu je dodano 20 mL DCM-a te je ekstrahirano 5 % otopinom NaOH (3 × 20 mL). Organski sloj ispran je destiliranom vodom (2 × 20mL), osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i filtriran. Zatim je organsko otapalo upareno pod sniženim tlakom. Dobiveni talog pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5. Čisti žuto-zeleni talog rastrljan je u dietil-eteru i odsisan čime je dobiven konačni produkt **8**.

Iskorištenje: 0,036 g (51 %).

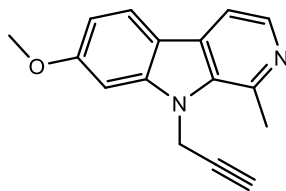
Talište: 159-161 °C

ESI-MS:  $m/z$  527,1 (M+1)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 11,41 (s, 1H), 8,53-8,52 (dd,  $J$  = 4,2, 1,7 Hz, 1H), 8,15-8,14 (d,  $J$  = 5,2 Hz, 1H), 8,08 (dd,  $J$  = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 8,06-8,02 (d,  $J$  = 8,6 Hz, 1H), 7,80-7,78 (d,  $J$  = 5,2 Hz, 1H), 7,43-7,40 (dd,  $J$  = 8,2, 4,2 Hz, 1H), 7,02-7,01 (d,  $J$  = 2,3 Hz, 1H), 6,85-6,83 (dd,  $J$  = 8,6, 2,2 Hz, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,26 (s, 1H), 6,13-6,03 (m, 3H), 4,07-4,04 (t,  $J$  = 5,6 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,64-3,60 (m, 1H), 3,45-3,40 (q,  $J$  = 5,0, 4,4 Hz, 2H), 3,06-3,01 (d,  $J$  = 5,0 Hz, 2H), 2,72 (s, 3H), 1,66-1,44 (m, 4H), 1,20-1,19 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm) 159,21, 159,00, 158,04, 144,63, 144,24, 141,86, 141,28, 137,74, 134,80, 134,55, 134,51, 134,51, 129,58, 127,15, 122,60, 122,10, 114,94, 111,90, 109,31, 96,11, 95,32, 91,61, 67,58, 54,98, 47,04, 40,15, 39,94, 33,53, 26,90, 20,35, 20,22.

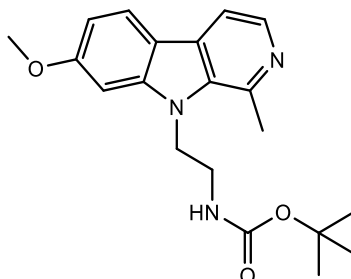
### 3.9. Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-b]indola (9)



0,254 g (1,199 mmol) harmina suspendirano je u 5 mL suhog DMF-a. U reakcijsku smjesu dodano je 0,077 g (1,918 mmol) 60 % natrijevog hidrida dispergiranog u mineralnom ulju te je propuhano dušikom kroz 15 min. Zatim je dodano 0,517 g (3,477 mmol) 80 % propargil-bromida. Reakcija je propuhana dušikom i nakon 1 h je dodano 50 mL destilirane vode. Dobiveni spoj je ekstrahiran etil-acetatom (3 × 50 mL). Organski sloj je ispran dva puta destiliranom vodom, osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltriran. Zatim je organsko otapalo upareno pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 9:1. Čisti spoj rastrljan je u dietil-eteru i odsisan je alkin **9**.

Iskorištenje: 0,235 g (78,3 %).

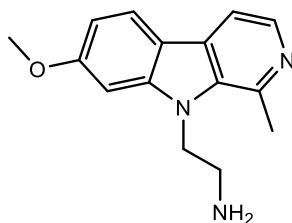
**3.10. Sinteza *tert*-butil (2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamata (10)**



0,179 g (0,845 mmol) harmina suspendirano je u 3 mL suhog DMF-a. Reakcijska smjesa je zagrijana na 90 °C. Zatim je dodano 1,238 g (3,801 mmol) cezijeva karbonata, temperatura je spuštена na 70 °C i propuhano je dušikom. U reakcijsku smjesu dodano je 0,757 g (3,38 mmol) *N*-Boc-aminoetil bromida i miješano je u atmosferi dušika na 70 °C 24 h. Idući dan je dodano 40 mL destilirane vode i produkt je ekstrahiran etil-acetatom (3 × 40 mL). Organski sloj je ispran dva puta destiliranom vodom, osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltriran. Organsko otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 8:1, rastrljavanja u dietil-eteru i odsisavanja dobiven je čisti spoj **10**.

Iskorištenje: 0,204 g (68 %).

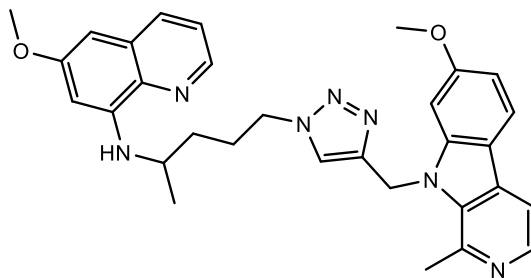
### 3.11. Sinteza 2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)etan-1-amin (11)



0,204 g (0,547 mmol) spoja **10** otopljeno je 5 mL metanola. U otopinu je dodano 1,44 mL (5,743 mmol) 4M klorovodične kiseline. Reakcijska smjesa zagrijana je na 55 °C i miješana preko noći nakon čega je metanol uparen pod sniženim tlakom. Kremasti talog otopljen je u 15 mL destilirane vode, a 5 % otopinom NaOH podešen je pH na 12. Produkt je ekstrahiran etil-acetatom (5 × 30 mL). Organski sloj je ispran dva puta zasićenom otopinom natrijevog klorida, osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltriran. Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom. Dobiveni bijeli talog rastrljan je u dietil-eteru i odsisan je amin **11**.

Iskorištenje: 0,103 g (50,5 %).

**3.12. Sinteza 6-metoksi-*N*-(4-(4-((7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)butan-2-il)kinolin-8-amina (12)**



0,063 g (0,249 mmol) azida PQ **2** i 0,04 g (0,160 mmol) alkena **9** otopljeno je u 2 mL DMF-a. U otopinu je dodano 0,04 g natrijevog askorbata prethodno otopljenog u 2 mL destilirane vode i 20  $\mu$ l bakrovog (II) sulfata (1 M). Nakon 19 h reakcija je gotova te je dodano 5 mL destilirane vode. Reakcijska smjesa prebačena je u lijevak za ekstrakciju te je ekstrahirano etil-acetatom (4  $\times$  20 mL). Organski sloj je ispran dva puta zasićenom otopinom natrijevog klorida, osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltriran. Organska faza uparena je pod sniženim tlakom, a produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5. Pročišćeni spoj **12** rastavljen je u smjesi dietil-etera i petroletera i odsisan.

Iskorištenje: 0,025g (29 %).

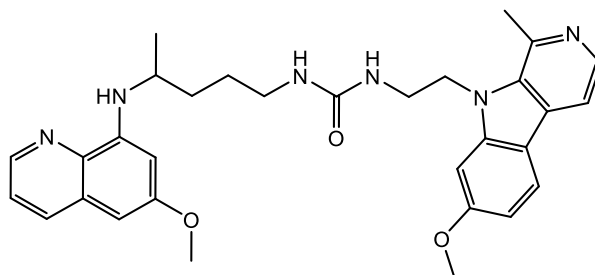
Talište: 157-159 °C.

ESI-MS:  $m/z$  536,2 (M+1)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm, *J*/Hz) 8,52-8,51 (dd, *J* = 4,2, 1,6 Hz, 1H), 8,17-8,16 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,09-8,06 (m, 2H), 7,96 (s, 1H), 7,88-7,87 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 7,43-7,41 (dd, *J* = 8,2, 4,2 Hz, 1H), 7,31-7,30 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 6,88-6,86 (dd, *J* = 8,6, 2,2 Hz, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,23 (s, 1H), 6,09-6,08 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 5,85 (s, 2H), 4,30-4,27 (td, *J* = 7,1, 2,4 Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,62-3,57 (m, 1H), 3,01 (s, 3H), 1,59-1,55 (dq, *J* = 17,0, 5,8 Hz), 1,42-1,38 (m, 2H), 1,13-1,12 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm) 160,57, 158,98, 144,55, 144,28, 143,86, 142,71, 134,84, 134,64, 134,52, 129,58, 122,86, 122,42, 122,15, 114,43, 112,29, 109,42, 96,26, 94,02, 91,73, 55,61, 55,01, 49,31, 46,68, 39,71, 32,74, 26,73, 23,19, 20,08.

**3.13. Sinteza 1-(2-(7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)etil)-3-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)uree (13)**



U epruvetu za MW dodano je 0,075 g (0,185 mmol) BtcPQ **1**, 0,057 g (0,222 mmol) amina **11**, koji je prethodno otopljen u 2 mL suhog diklormetana, 0,03 mL (0,222mmol) TEA i natrijev ditionit na vrhu špatule. Reakcija je grijana na 65 °C u mikrovalnom reaktoru 2,5 h uz snagu mikrovalova 75 W nakon čega je reakcijska smjesa ulivena u 20 mL 5 % otopine NaOH i ekstrahirana diklormetanom (3 × 20 mL). Organski sloj je osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltriran. Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5 dobiveno je žuto ulje koje je rastrijano u dietil-eteru i odsisano te je dobiven čisti spoj **13**.

Iskorištenje: 0,071 g (71 %).

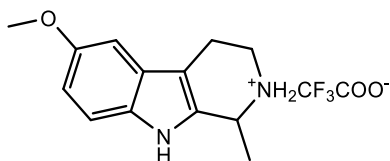
Talište: 144-147 °C.

ESI-MS:  $m/z$  541,1 (M+1)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 8,53-8,52 (d,  $J$  = 4,3 Hz, 1H), 8,16-8,15 (d,  $J$  = 5,2 Hz, 1H), 8,07-8,04 (dd,  $J$  = 8,7, 3,4 Hz, 2H), 7,86-7,85 (d,  $J$  = 5,2 Hz, 1H), 7,42-7,39 (dd,  $J$  = 8,2, 4,2 Hz, 1H), 7,26 (s, 1H), 6,87-6,85 (d,  $J$  = 8,6 Hz, 1H), 6,46 (s, 1H), 6,27 (s, 1H), 6,13-6,11 (d,  $J$  = 8,6 Hz, 1H), 6,04-6,00 (m, 2H), 4,55-4,52 (t,  $J$  = 6,9 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,62 (bs, 1H), 3,40-3,36 (m, 2H), 3,01-3,00 (d,  $J$  = 6,9 Hz, 2H), 2,96 (s, 3H), 1,66-1,42 (m, 4H), 1,21 (d,  $J$  = 6,3 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm) 160,47, 159,00, 158,18, 144,64, 144,23, 142,93, 140,72, 137,64, 134,78, 134,68, 134,52, 129,57, 128,29, 122,23, 122,08, 114,18, 112,17, 109,21, 96,11, 93,75, 91,57, 55,43, 54,96, 47,04, 44,40, 40,14, 39,73, 33,47, 26,79 23,10, 20,22.

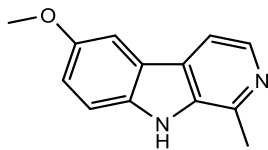
### 3.14. Sinteza 6-metoksi-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-karbazola (**14**)



0,200 g (1,05mmol) 5-metoksitriptamina, 3,5 mL acetonitrila, 0,222 mL (2,10 mmol) ADMA i 0,156 (2,10 mmol) trifluoroctene kiseline pomiješano je u kivetu za mikrovalni reaktor (75 W, 110 °C, 10 min). Postupak je ponovljen osam puta s istim količinama. Nakon završetka reakcijske su smjese svih kiveta prebačene u tikvicu od 100 mL te im je dodano 50 mL etera i ostavljeno u frižideru da kristalizira do idućeg dana. Nastali je talog usitnjen na ultrazvučnoj kupelji. Nakon odsisavanja dobiven je konačni produkt **14**.

Iskorištenje: 1,991 g (72 %).

### 3.15. Sinteza 6-metoksi-1-metil-9H-pirido [3,4-*b*]indola (**15**)

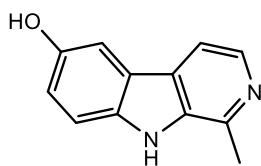


0,100 g (0,301 mmol) spoja **14**, 0,0445 g (0,602 mmol) litijevog karbonata, 0,0116 g 10 % Pd/C i 4 mL apsolutnog etanola pomiješano je u kiveti za mikrovalni reaktor (75 W, 150 °C, 20 min). Postupak je ponovljen osam puta s istim količinama. Nakon završetka reakcijske su smjese svih kiveta spojene, a katalizator je odsisan preko celita. Nakon rastrljavanja u 20 % otopini natrijevog klorida i odsisavanja dobiven je konačni produkt **15**.

Iskorištenje: 0,730 g (57 %).



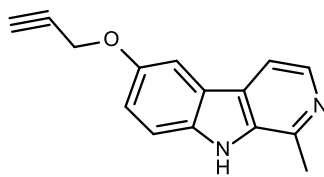
### 3.16. Sinteza 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-ola (16)



0,100 g (0,471 mmol) spoja **15** suspendirano je u 1,2 mL glacijalne octene kiseline i 0,6 mL 47 % bromovodične kiseline u kivetu za mikrovalni reaktor (75 W, 140 °C, 25 min). Postupak je ponovljen sedam puta s istim količinama. Nakon završetka sve reakcijske smjese spojene su u tikvicu te je zalučeno s 5 % otopinom NaOH do pH 8 i ekstrahirano etil-acetatom (4 × 150 mL). Organski je sloj sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran te je organska faza uparena pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 7,5:2,5 dobiven je konačni produkt **16**.

Iskorištenje: 0,466 g (71 %).

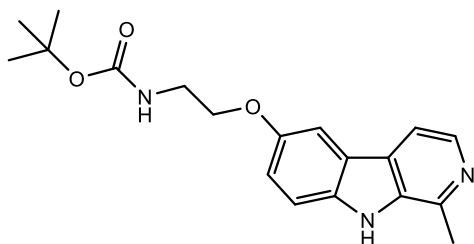
### 3.17. Sinteza 1-metil-6-(prop-2-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-b]indola (17)



0,295 g fenola **16** otopljeno je u 5 mL suhog DMF-a kojemu je dodano 0,679 g (2,083 mmol) cezijeva karbonata. Reakcijska smjesa propuhana je dušikom kroz 15 min te je zatim dodano 0,199 mL (1,786 mmol) 80 % propargil-bromida te ponovno propuhano dušikom. Nakon 3 h na sobnoj temperaturi u atmosferi dušika reakcija je gotova te je dodano 50 mL destilirane vode. Smjesa je prebačena u lijevak za ekstrakciju i ekstrahirana etil-acetatom (3 × 90 mL). Organski je sloj dva puta ispran vodom i sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen. Smjesa je pročišćena kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 9:1. Nakon rastrljavanja u dietil-eteru i usitnjavanja na ultrazvučnoj kupelji dobiven je konačni produkt alkin **17**.

Iskorištenje: 0,180 g (51 %)

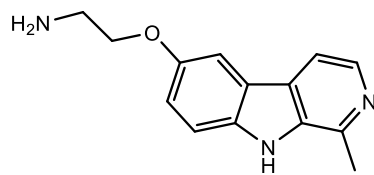
**3.18. Sinteza *tert*-butil (2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil) karbamata (18)**



0,299 g (1,508 mmol) spoja **16** otopljeno je u 5 mL suhog DMF-a te je dodano 1,376 g (4,223 mmol) cezijeveg karbonata i 0,410 g (1,206 mmol) TBAHS. U atmosferi dušika smjesi je dodano 1,352 g (6,032 mmol) 2-(Boc-amino)etil bromida. Reakcija je miješana 1 h u atmosferi dušika nakon čega je prekinuta dodatkom 20 mL destilirane vode i prebačena u lijevak za odjeljivanje. Produkt je ekstrahiran etil-acetatom (3 × 30 mL). Organski je sloj sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran, a organska je faza uparena pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavnaja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 8:1 dobiven je konačni produkt **18**.

Iskorištenje: 0,232 g (45 %).

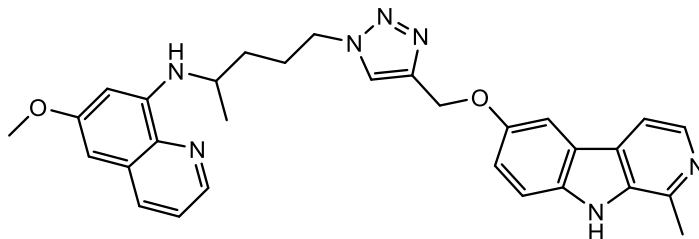
### 3.19. Sinteza 2-((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-il)oksi)etan-1-amina (19)



0,232g (0,680 mmol) spoja **18** otopljeno je u 4 mL metanola te mu je dodana 1,699 mL (6,795 mmol) 4 M klorovodična kiselina. Reakcijska je smjesa zagrijavana na 50 °C. Nakon 72 h reakcija je prekinuta, metanol je uparen, a zaostali je talog otopljen u 8 mL destilirane vode te zalužen do pH 12. Novonastali je talog odsisan te je dobiven konačni produkt **19**.

Iskorištenje: 0,143 g (87 %).

**3.20. Sinteza 6-metoksi-N-(5-(4-(((1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)pentan-2-il)kinolin-8-amina (20)**



0,042g (0,148 mmol) azida PQ 2, 0,032g (0,134 mmol) alkina 17, 2 mL suhog DCM-a i bakrov (II) acetat (vrh špatule) pomiješani su u tikvici te je miješano na sobnoj temperaturi. Nakon 24 h reakcija je gotova te je metanol uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni talog pročišćen je na kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5. Produkt je rastrljan u smjesi dietil-eter i petroletera dva puta i odsisan te je dobiven žuti talog triazola **20**.

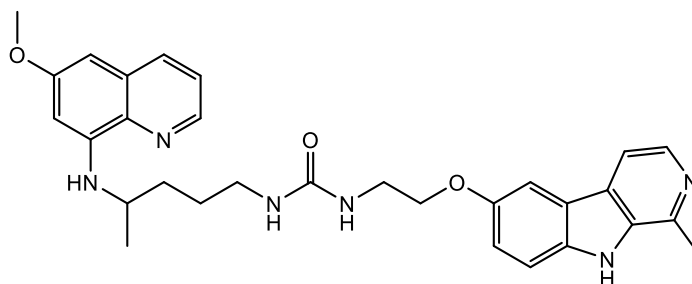
Iskorištenje: 0,017 g (24 %).

Talište: 197-200 °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 11,40 (s, 1H), 8,51-8,48 (dd,  $J = 8,3, 4,0$  Hz, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,16-8,14 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 7,89-7,86 (q,  $J = 4,6, 4,0$  Hz, 2H), 7,51-7,46 (dd,  $J = 8,8, 3,2$  Hz, 1H), 7,30-7,29 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 7,24-7,20 (m, 2H), 6,63 (s, 1H), 6,37-6,34 (dd,  $J = 9,0, 3,4$  Hz, 1H), 5,22 (s, 2H), 4,49-4,46 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 3,86-3,82 (q,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,04-1,98 (m, 2H), 1,78-1,60 (m, 2H), 1,28 (t,  $J = 4,7$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ /ppm) 156,64 151,96, 144,64, 143,88 142,97, 142,20, 136,95, 135,43, 135,08, 133,71, 133,02, 129,41, 126,69, 124,38, 121,95, 121,35, 118,35, 112,74, 112,65, 105,12, 92,86, 61,99 55,90, 49,47, 46,81, 33,05, 26,78, 20,40, 20,36.

**3.21. Sinteza 1-(4-((6-metoksiizokinolin-8-il)amino)pentil)-3-(((2-((1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)amino)metil)uree (21)**



0,053g (0,133 mmol) BtcPQ **1**, 0,064g (0,266 mmol) amina **19**, 0,059 mL (0,426 mmol) TEA, 4 mL suhog DCM-a i natrijev ditionit (vrh špatule) pomiješani su u kiveti za mikrovalni reaktor (75 W, 65 °C, 1,6 h). Otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Smjesa je adsorbirana na silikagel te je pročišćena kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil acetat/metanol 1:1:0,5. Nakon rastrljavanja u dietil-eteru dobiven je konačni produkt urea **21**.

Iskorištenje: 0,048 g (69 %).

Talište: 173-176 °C.

ESI-MS:  $m/z$  527,2 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm,  $J$ /Hz) 11,35 (s, 1H), 8,53-8,52 (dd,  $J = 4,2, 1,6$  Hz, 1H), 8,15-8,14 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 8,08-8,06 (dd,  $J = 8,3, 1,7$  Hz, 1H), 7,88-7,87 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 7,75 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 7,49-7,48 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 7,42-7,40 (dd,  $J = 8,2, 4,2$  Hz, 1H), 7,18-7,16 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,26 (s, 1H), 6,12-6,11 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 6,04 (m, 2H), 4,04-4,02 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,63-3,61 (m, 1H), 3,43-3,40 (m, 2H), 3,05-3,01 (m, 2H), 2,73 (s, 3H), 1,65-1,43 (m, 4H), 1,20 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm) 158,40, 157,44, 151,77, 144,03, 143,64, 141,55, 136,30, 134,66, 134,46, 134,20, 133,91, 128,97, 126,09, 121,50, 120,80, 117,57, 112,09, 104,00, 95,50, 91,00, 67,44, 54,37, 46,43, 40,06, 39,94, 32,93, 26,30, 19,79, 19,62.

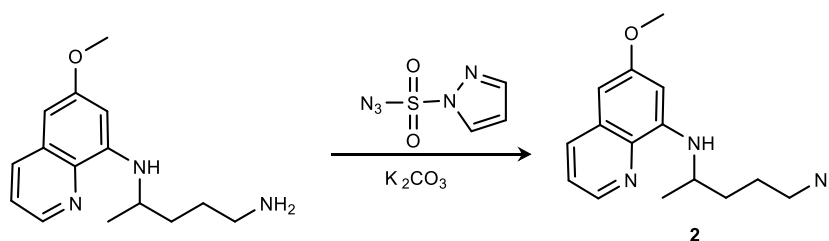
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Fokus ovog istraživanja primarno je stavljen na variranje:

- poveznice (urea ili 1,2,3-triazol) i
- mjesta povezivanja (*O6*, *O7* ili *N9*  $\beta$ -karbolinskog prstena)

između dva farmakofora – kinolinskog (PQ) i  $\beta$ -karbolinskog (harmin). Kao što je u uvodnom dijelu obrazloženo, poznato je da i PQ i harmin posjeduju određeno citostatsko djelovanje. U jednom je setu reakcija sintetizirana urea kao poveznica primjenom benzotriazolske kemije dok je u drugom pomoću bakrom (I) katalizirane alkin-azidne cikloadicije (CuAAC) sintetiziran 1,2,3-triazolska poveznica.

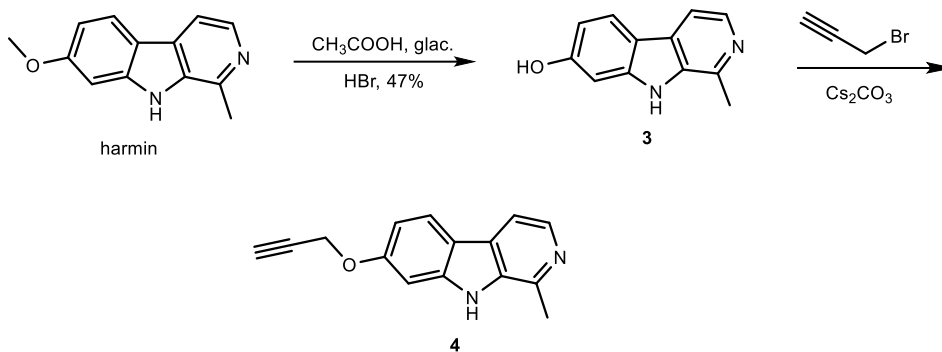
Za sintezu hibrida harmina i PQ triazolskog tipa (tzv. *click* derivati) bilo je potrebno pripremiti dvije vrste građevnih blokova – azid i alkine. Azid PQ **2** korišten je u sve tri *click* reakcije, a dobiven je jednostavnom reakcijom diazo transfera u bazičnim uvjetima izravno iz PQ uz reagens imidazol-1-sulfonil azid (Shema 3).



**Shema 3.** Sinteza azida PQ **2**

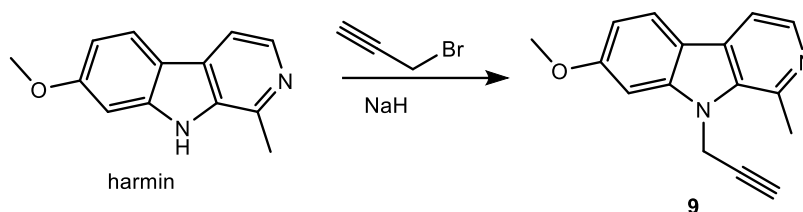
S druge strane, pripravljena su tri  $\beta$ -karbolinska alkena: **4** (alkin na *O7*), **9** (alkin na *N9*) i **17** (alkin na *O6*). Alkin **4** dobiven je u dva reakcijska koraka: 1) hidrolizom eterske skupine harmina nastaje fenol – harmol u kiselim uvjetima, i 2) Williamsonovom sintezom iz alkilbromida (propargil-bromida) i fenola (harmola) dobiven je alkin **4** supstituiran na položaju 6  $\beta$ -karbolinskog prstena. U sintezi je korištena baza cezijev karbonat koji deprotonira fenol te mu povećava nukleofilnost (Shema 4).





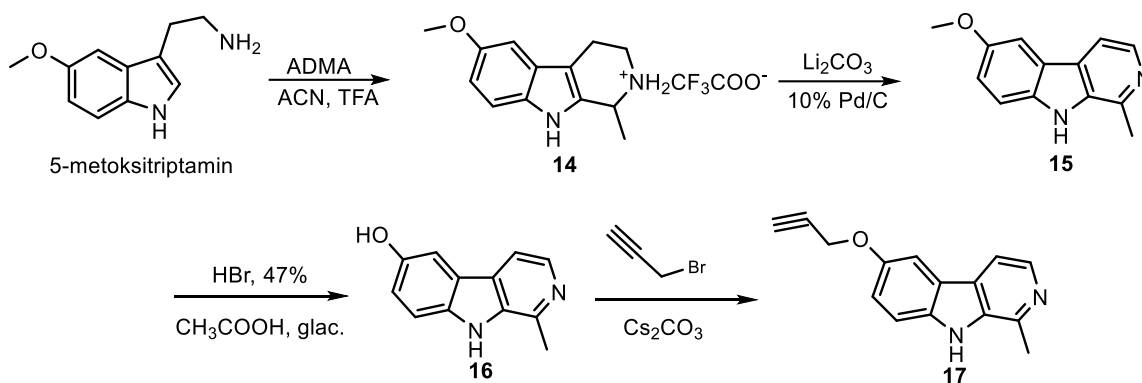
**Shema 4.** Sinteza alkina **4**

Alkin **9** dobiven je u jednom reakcijskom koraku u reakciji nukleofilne supstitucije direktno iz harmina i propargil-bromida uz natrijev hidrid kao bazu (Shema 5).



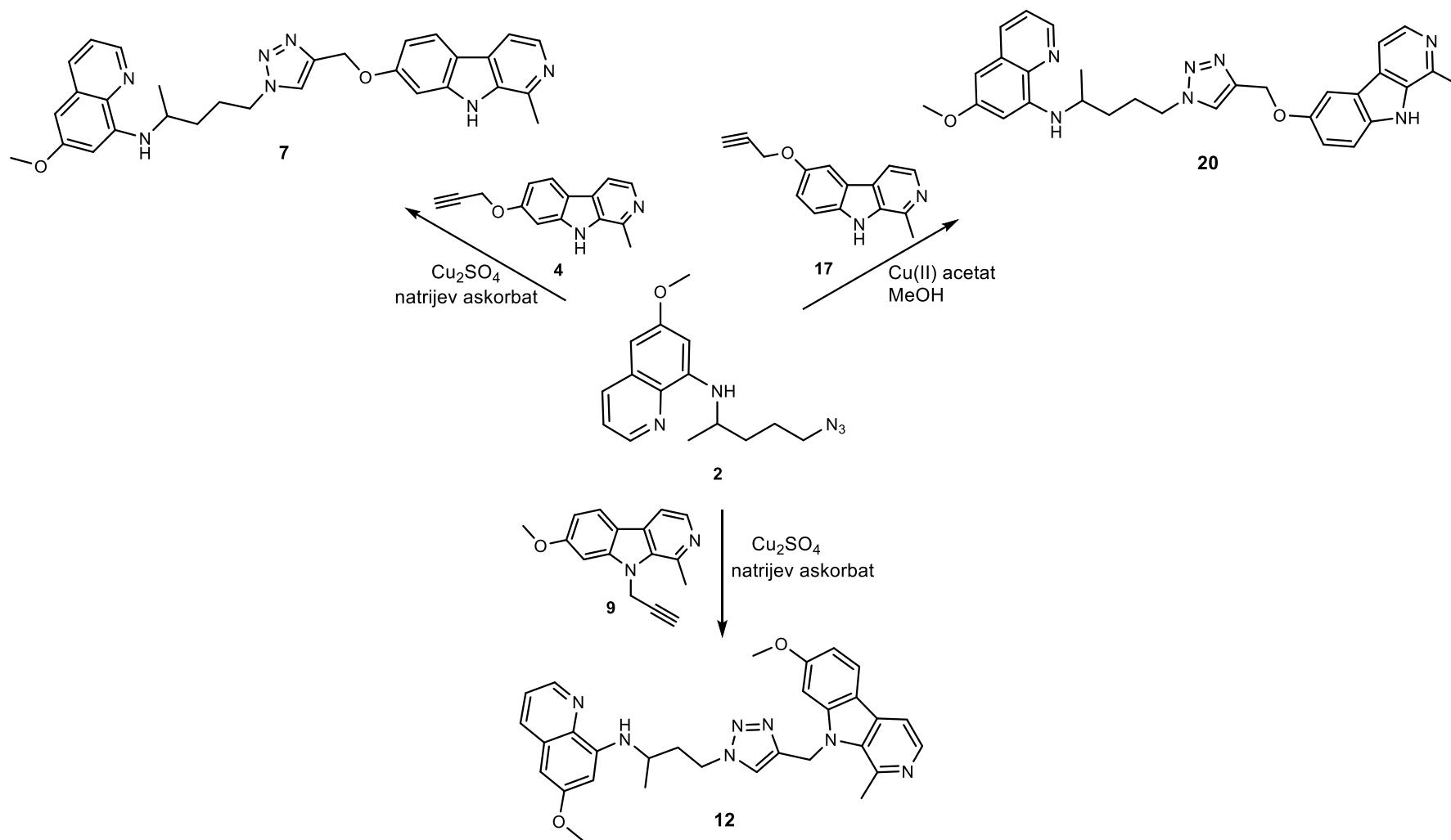
**Shema 5.** Sinteza alkina **9**

Sinteza alkina **17** odvijala se u četiri reakcijska koraka. Najprije je Pictet-Spenglerovom reakcijom sintetiziran tetrahidroksi- $\beta$ -karbolin **14** iz 5-metoksitriptamina i ADMA. Primjenom mikrovalnog zračenja dobiveni spoj aromatiziran uz katalizator 10 % Pd/C do  $\beta$ -karbolina **15** koji na položaju 6 ima metoksi skupinu. U reakciji je korištena baza  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  jer je  $\beta$ -karbolin **14** bio u obliku soli. Fenol **16** dobiven je *O*-demetilacijom  $\beta$ -karbolina **15** uz HBr (47 %) i glacijalnu octenu kiselinu. Mehanizam reakcije je nukleofilna supstitucija kod koje se u prvom koraku protonira kisikov atom, a time nastaju povoljni uvjeti koji omogućavaju cijepanje eterske veze te vezanje metilne skupine na bromid. U zadnjem reakcijskom koraku fenol **16** preveden je Williamsonovom sintezom u alkin **17** uz propargil-bromid (Shema 6).



**Shema 6.** Sinteza alkina **17**

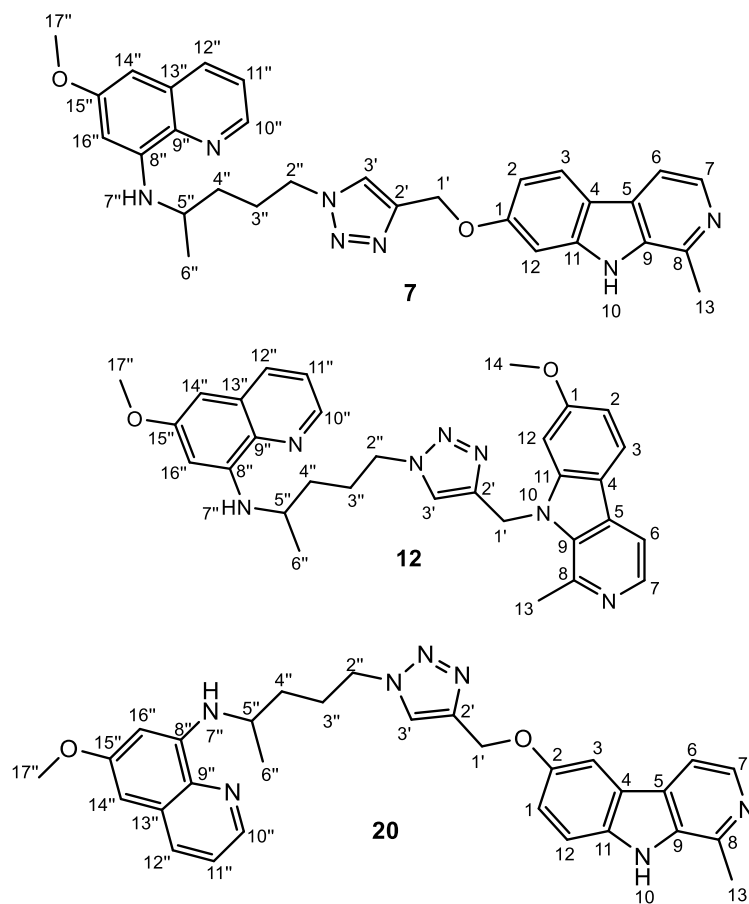
Konačni produkti 1,2,3-triazoli sintetizirani su Huisgenovom reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije katalizirane bakrom (I) u kojoj kao reaktanti sudjeluje spoj u obliku azida (azid PQ, **2**) i alkina (**4**, **9** i **17**). Reakcije za dobivanje spojeva **7**, **12** i **20** odvijale su se na sobnoj temperaturi preko noći. Triazoli **7** i **12** dobiveni su uz prekatalizator bakrov (II) sulfat te natrijev askorbat kao reducens. Isti reakcijski uvjeti nisu bili zadovoljavajući u sintezi triazola **20** na položaju 6  $\beta$ -karbolinskog prstena. Sintaza spoja **20** uz bakrov (II) acetat i metanol kao reducens dala je produkt odgovarajuće čistoće u zadovoljavajućem iskorištenju. Sirovi produkti su pročišćeni kromatografijom na koloni uz aluminijev oksid čija je uloga bila zadržati bakrove ione. Shema 7 prikazuje završni korak sinteze ciljnih produkata. Tablice 3 i 4 prikazuju analitičke i spektroskopske podatke novosintetiziranih derivata.



**Shema 7.** Sinteza 1,2,3-triazola harmina i PQ 7, 12 i 20

**Tablica 3.** Analitički i MS podaci za 1,2,3-triazole harmina i PQ.

| Spoj      | Iskorištenje (%) | $t_r$ (°C) | Molekulska formula   | Molekulska masa ( $M_r$ ) | MS ( $m/z$ )                 |
|-----------|------------------|------------|----------------------|---------------------------|------------------------------|
| <b>7</b>  | 33               | 156-158    | $C_{30}H_{31}N_7O_2$ | 521,63                    | 522,2 ( $M+1$ ) <sup>+</sup> |
| <b>12</b> | 29               | 157-159    | $C_{31}H_{33}N_7O_2$ | 535,65                    | 536,2 ( $M+1$ ) <sup>+</sup> |
| <b>20</b> | 24               | 197-200    | $C_{30}H_{31}N_7O_2$ | 521,63                    |                              |

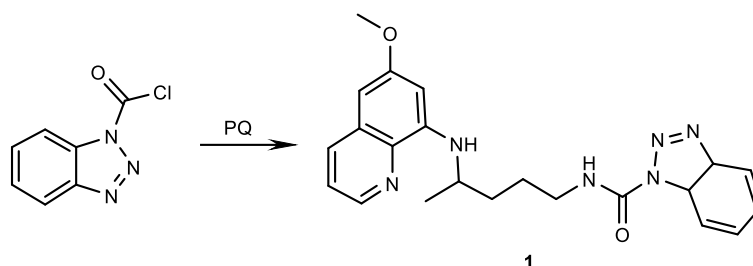


**Slika 7.** Numeracija atoma 1,2,3-triazola harmina i PQ za  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spektre

**Tablica 4.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci za 1,2,3-triazole harmina i PQ.

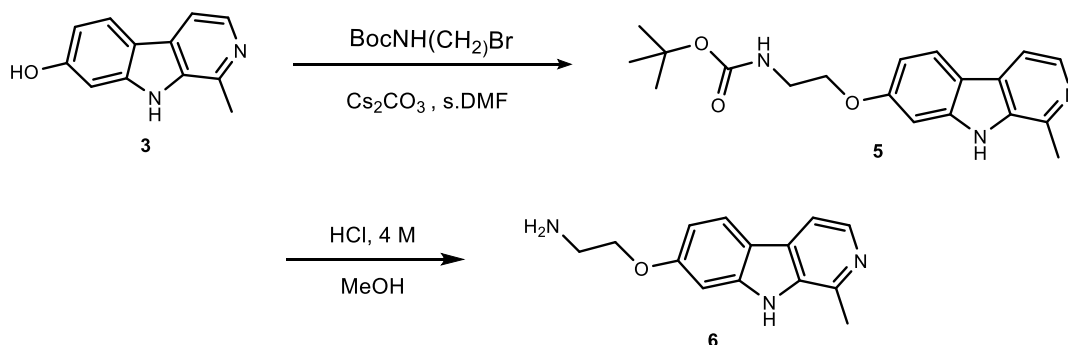
| Spoj | $^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm, $J$ /Hz)   | $^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm)   |
|------|---|---|
| 7    | 11,45 (s, 1H, 10), 8,53-8,52 (dd, $J = 4,2, 1,6$ Hz, 1H, 10"), 8,26 (s, 1H, 3'), 8,15-8,14 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 7), 8,08-8,07 (dd, $J = 8,3, 1,7$ Hz, 1H, 3), 8,06-8,04 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 12"), 7,80-7,79 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 6), 7,43-7,41 (dd, $J = 8,2, 4,2$ Hz, 1H, 11"), 7,16 (s, 1H, 12), 6,90-6,88 (dd, $J = 8,6, 2,3$ Hz, 1H, 2), 6,47 (s, 1H, 16"), 6,27 (s, 1H, 14"), 6,15-6,14 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, 7"), 5,24 (s, 2H, 1'), 4,42-4,40 (td, $J = 7,1, 1,5$ Hz, 2H, 2"), 3,82 (s, 3H, 17"), 3,67-3,64 (m, 1H, 5"), 2,71 (s, 3H, 13), 1,68-1,63 (m, 1H, 3"), 1,53-1,48 (m, 1H, 4"), 1,18 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H, 6") | 158,99 (15"), 158,78 (1), 144,57 (8"), 144,27 (10"), 142,67 (2'), 141,77 (8), 141,32 (11), 137,72 (7), 134,82 (12"), 134,57, 134,53 (9, 9"), 129,58 (13"), 127,13 (5), 124,46 (3'), 122,63 (3), 122,12 (11"), 115,09 (4), 111,95 (6), 109,48 (2), 96,27 (16"), 95,81 (12), 91,75 (14"), 61,52 (1'), 55,00 (17"), 49,43 (2"), 46,76 (5"), 32,79 (4"), 26,73 (3"), 20,31 (13), 20,10 (6") |
| 12   | 8,52-8,51 (dd, $J = 4,2, 1,6$ Hz, 1H, 10"), 8,17-8,16 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 7), 8,09-8,06 (m, 2H, 3, 12"), 7,96 (s, 1H, 3'), 7,88-7,87 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 6), 7,43-7,41 (dd, $J = 8,2, 4,2$ Hz, 1H, 11"), 7,31-7,30 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 12), 6,88-6,86 (dd, $J = 8,6, 2,2$ Hz, 1H, 2), 6,47 (s, 1H, 16"), 6,23 (s, 1H, 14"), 6,09-6,08 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, 7"), 5,85 (s, 2H, 1'), 4,30-4,27 (td, $J = 7,1, 2,4$ Hz, 2H, 2"), 3,88 (s, 3H, 14), 3,82 (s, 3H, 17"), 3,62-3,57 (m, 1H, 5"), 3,01 (s, 3H, 13), 1,59-1,55 (dq, $J = 17,0, 5,8$ Hz, 2H, 3"), 1,42-1,38 (m, 2H, 4"), 1,13-1,12 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H, 6")          | 160,57 (1), 158,98 (15"), 144,55 (8"), 144,28 (10"), 143,86 (8), 142,71 (11), 134,84 (12"), 134,64, 134,52 (9, 9"), 129,58 (5, 13"), 122,86 (3), 122,42, 122,15 (3, 11"), 114,43 (4), 112,29 (6), 109,42 (2), 96,26 (16"), 94,02 (12), 91,73 (14"), 55,61 (14), 55,01 (17"), 49,31 (1'), 46,68 (5"), 39,71 (2"), 32,74 (4"), 26,73 (3"), 23,19 (13), 20,08 (6")                         |
| 20   | 11,40 (s, 1H, 10), 8,51-8,48 (dd, $J = 8,3, 4,0$ Hz, 1H, 10"), 8,30 (s, 1H, 7), 8,16-8,14 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 12"), 7,89-7,86 (q, $J = 4,6, 4,0$ Hz, 2H, 3, 6), 7,51-7,46 (dd, $J = 8,8, 3,2$ Hz, 1H, 11"), 7,30-7,29 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, 12), 7,24-7,20 (m, 2H, 1, 16"), 6,63 (s, 1H, 14"), 6,37-6,34 (dd, $J = 9,0, 3,4$ Hz, 1H, 7), 5,22 (s, 2H, 1'), 4,49-4,46 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, 2"), 3,86-3,82 (q, $J = 7,4$ Hz, 1H, 5"), 3,69 (s, 3H, 17"), 2,73 (s, 3H, 13), 2,04-1,98 (m, 2H, 3"), 1,78-1,60 (m, 2H, 4"), 1,28 (t, $J = 4,7$ Hz, 3H, 6")  | 156,64 (15"), 151,96 (2), 144,64 (8"), 143,88 (10"), 142,97 (8), 142,20 (2'), 136,95 (12"), 135,43 (9), 135,08 (9"), 133,71 (13"), 133,02 (1), 129,41 (5), 126,69 (11), 124,38 (3'), 121,95 (3), 121,35 (4), 118,35 (11"), 112,74, 112,65 (6, 12), 105,12 (16"), 92,86 (14"), 61,99 (1'), 55,90 (17"), 49,47 (2"), 46,81 (54), 33,05 (3"), 26,78 (3"), 20,40 (6"), 20,36 (13)           |

Uree harmina i PQ dobivene su iz benzotriazolida PQ (BtcPQ, **1**) i odgovarajućeg amina (**6**, **11** ili **19**). BtcPQ **1** sintetiziran je prema prethodno opisanom postupku iz BtcCl i PQ (Shema 8) [11].

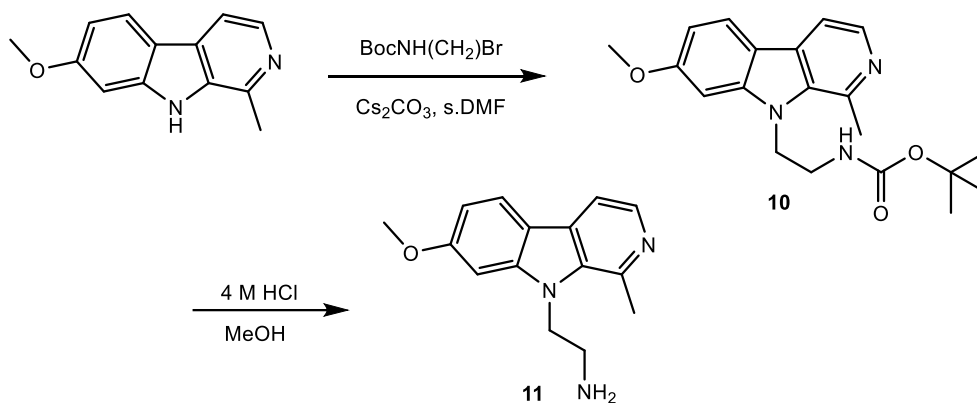


**Shema 8.** Sinteza benzotriazolida PQ, BtcPQ **2**

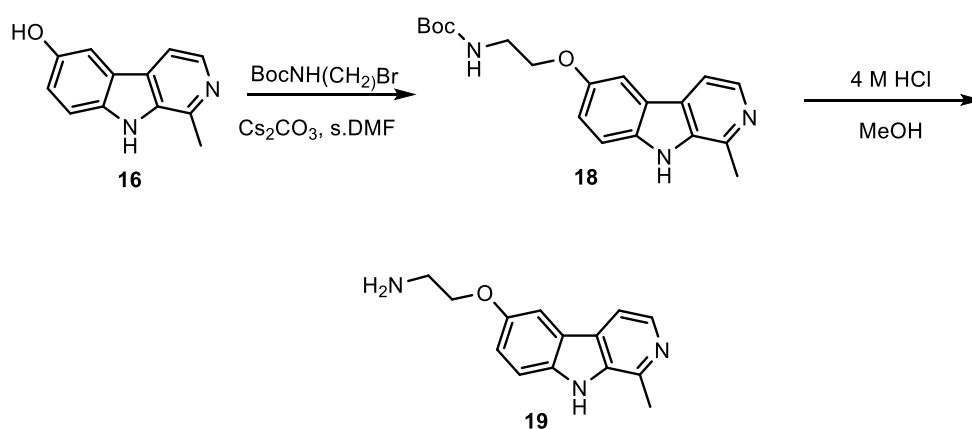
S druge strane, sintetizirana su tri amina. Svi amini dobivaju se u dva reakcijska koraka iz fenola (harmola **3** – amin **6** ili fenola **16** – amin **19**) ili harmina (amin **11**). Prvi korak uključuje alkiliranje odgovarajućeg fenola ili harmina 2-(*tert*-butokarbonilamin)etil bromidom uz bazu cesijev karbonat u suhom DMF-u pod atmosferom dušika čime se u strukturu uvodi amin zaštićen Boc-skupinom. U zadnjem koraku dolazi do uklanjanja zaštitne skupine u prisutstvu klorovodične kiseline i metanola čime nastaje amin (Sheme 9, 10 i 11).



**Shema 9.** Sinteza amina **6**

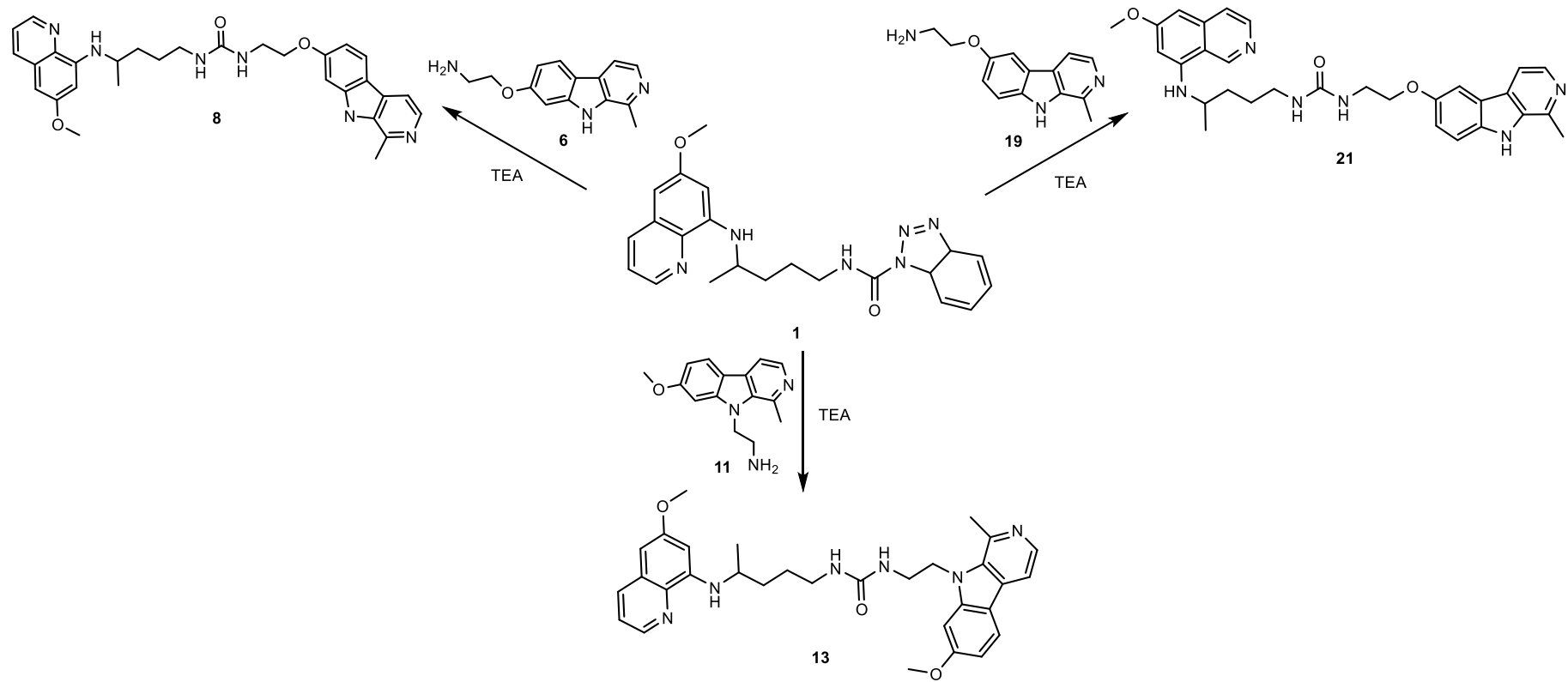


**Shema 10. Sinteza amina 11**



**Shema 11. Sinteza amina 19**

Konačni produkti, uree harmina i PQ, dobiveni su u benzotriazolskom metodom u jednom reakcijskom koraku iz BtcPQ i dva ekvivalenta odgovarajućeg amina te 3 ekvivalenta baze TEA. Amino skupina je nukleofil te supstituira benzotriazol u molekuli BtcPQ koji je dobra izlazna skupina. Reakcije su se odvijale potpomognute mikrovalnim zračenjem čime je značajno skraćeno trajanje reakcije te ograničeno nastaje nusprodukata. Shema 12 prikazuje sintezu urea harmina i PQ. Tablice 5 i 6 prikazuju analitičke i spektroskopske podatke novosintetiziranih derivata.

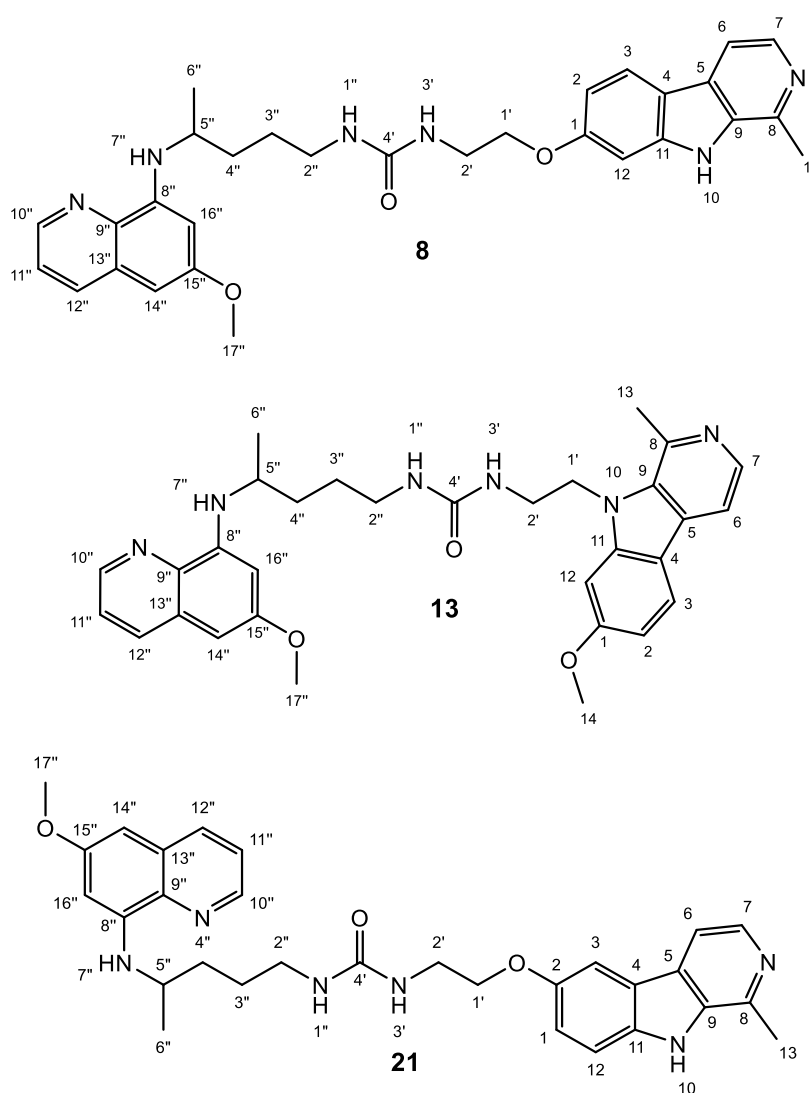


**Shema 12.** Sinteza urea harmina i PQ **8**, **13** i **21**



**Tablica 5.** Analitički i MS podaci za uree harmina i PQ.

| Spoj      | Iskorištenje (%) | $t_r$ (°C) | Molekulska formula   | Molekulska masa ( $M_r$ ) | MS ( $m/z$ )                    |
|-----------|------------------|------------|----------------------|---------------------------|---------------------------------|
| <b>8</b>  | 51               | 159-161    | $C_{30}H_{34}N_6O_3$ | 526,64                    | 527,1<br>( $M+1$ ) <sup>+</sup> |
| <b>13</b> | 71               | 144-147    | $C_{31}H_{36}N_6O_3$ | 540,67                    | 541,1<br>( $M+1$ ) <sup>+</sup> |
| <b>21</b> | 69               | 173-176    | $C_{30}H_{34}N_6O_3$ | 526,64                    | 527,2<br>( $M+1$ ) <sup>+</sup> |



**Slika 8.** Numeracija atoma urea harmina i PQ za <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektre

**Tablica 6.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podaci za uree harmina i PQ.

| Spoj | $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ , $J/\text{Hz}$ )   | $^{13}\text{C}$ NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ )  |
|------|--|--|
| 8    | 11,41 (s, 1H, 10), 8,53-8,52 (dd, $J = 4,2, 1,7$ Hz, 1H, 10"), 8,15-8,14 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 7), 8,08 (dd, $J = 8,3, 1,7$ Hz, 1H, 3), 8,06-8,02 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 12"), 7,80-7,78 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 6), 7,43-7,40 (dd, $J = 8,2, 4,2$ Hz, 1H, 11"), 7,02-7,01 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, 12), 6,85-6,83 (dd, $J = 8,6, 2,2$ Hz, 1H, 2), 6,47 (s, 1H, 16"), 6,26 (s, 1H, 14"), 6,13-6,03 (m, 3H, 3', 1", 7"), 4,07-4,04 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, 1'), 3,82 (s, 3H, 17"), 3,64-3,60 (m, 1H, 5"), 3,45-3,40 (q, $J = 5,0, 4,4$ Hz, 2H, 2'), 3,06-3,01 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H, 2"), 2,72 (s, 3H, 13), 1,66-1,44 (m, 4H, 3", 4"), 1,20-1,19 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, 6") | 159,21 (4'), 159,00 (15"), 158,04 (1), 144,63 (8"), 144,24 (10"), 141,86 (8), 141,28 (11), 137,74 (7), 134,80 (12"), 134,55, 134,51 (9, 9"), 134,51 (13"), 129,58 (13"), 127,15 (5), 122,60 (3), 122,10 (11"), 114,94 (4), 111,90 (6), 109,31 (2), 96,11 (16"), 95,32 (12), 91,61 (14"), 67,58 (1'), 54,98 (17"), 47,04 (5"), 40,15 (2"), 39,94 (2'), 33,53 (4"), 26,90 (3"), 20,35 (6"), 20,22 (13) |
| 13   | 8,53-8,52 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, 10"), 8,16-8,15 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 7), 8,07-8,04 (dd, $J = 8,7, 3,4$ Hz, 2H, 3, 12"), 7,86-7,85 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 6), 7,42-7,39 (dd, $J = 8,2, 4,2$ Hz, 1H, 11"), 7,26 (s, 1H, 12), 6,87-6,85 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 2), 6,46 (s, 1H, 16"), 6,27 (s, 1H, 14"), 6,13-6,11 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 7"), 6,04-6,00 (m, 2H, 3', 1"), 4,55-4,52 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, 1'), 3,89 (s, 3H, 14), 3,80 (s, 3H, 17"), 3,62 (bs, 1H, 5"), 3,40-3,36 (m, 2H, 2'), 3,01-3,00 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H, 2"), 2,96 (s, 3H, 13), 1,66-1,42 (m, 4H, 3", 4"), 1,21 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H, 6")  | 160,47 (1), 159,00 (15"), 158,18 (4'), 144,64 (8"), 144,23 (10"), 142,93 (8), 140,72 (11), 137,64 (7), 134,78 (12"), 134,68, 134,52 (9, 9"), 129,57 (13"), 128,29 (5), 122,23, 122,08 (3, 11"), 114,18 (4), 112,17 (6), 109,21 (2), 96,11 (16"), 93,75 (12), 91,57 (14"), 55,43 (14), 54,96 (17"), 47,04 (5"), 44,40 (2"), 40,14 (2'), 39,73 (1'), 33,47 (4"), 26,79 (3"), 23,10 (13), 20,22 (6")    |
| 21   | 11,35 (s, 1H, 10), 8,53-8,52 (dd, $J = 4,2, 1,6$ Hz, 1H, 10"), 8,15-8,14 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 7), 8,08-8,06 (dd, $J = 8,3, 1,7$ Hz, 1H, 12"), 7,88-7,87 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 3), 7,75 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, 6), 7,49-7,48 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, 12), 7,42-7,40 (dd, $J = 8,2, 4,2$ Hz, 1H, 11"), 7,18-7,16 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, 1), 6,47 (s, 1H, 16"), 6,26 (s, 1H, 14"), 6,12-6,11 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, 7"), 6,04 (m, 2H, 1", 3"), 4,04-4,02 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, 1'), 3,81 (s, 3H, 17"), 3,63-3,61 (m, 1H, 5"), 3,43-3,40 (m, 2H, 2'), 3,05-3,01 (m, 2H, 2"), 2,73 (s, 3H, 13), 1,65-1,43 (m, 4H, 3", 4"), 1,20 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H, 6")                 | 158,40 (15"), 157,44 (4'), 151,77 (2), 144,03 (8"), 143,64 (10"), 141,55 (8), 136,30 (7), 134,66, 134,46 (9, 11), 134,20 (12"), 133,91 (9"), 128,97 (13"), 126,09 (5), 121,50 (11"), 120,80 (4), 117,57 (3), 112,09 (6), 104,00 (1), 95,50 (16"), 91,00 (14"), 67,44 (1'), 54,37 (17"), 46,43 (5"), 40,06 (2'), 39,94 (2"), 32,93 (4"), 26,30 (3"), 19,79 (13), 19,62 (6")                           |

U sklopu ranog istraživanja lijekova veliki naglasak se stavlja na molekule zadovoljavajućih farmakokinetičkih parametara. Dobra i prihvatljiva fizikalno-kemijska svojstva lijeka garancija su dobre bioraspoloživosti. U tu su svrhu napravljeni razni programi koji predviđaju farmakokinetičke parametre uspoređujući strukturu molekule od interesa sa strukturama u bazi podataka u kojoj se nalaze svi registrirani lijekovi i kod kojih su pronađeni opetovani strukturni motivi koji utječu na bioraspoloživost. Iz tih su strukturnih motiva izvedena pravila koja omogućuju znanstvenicima da u ranim fazama razvoja lijeka naprave probir između onih s povoljnim fizikalno-kemijskim svojstvima. Također, omogućeno je predviđanje potencijala nosintetizirane molekule da posjeduje željena farmakokinetička svojstva [46].

Velika se većina *in silico* metoda bazira na predviđanju parametara apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije (ADME) analiziranjem molekulske strukture. Najznačajniji je rad znanstvenika Lipinski i suradnici koji su ispitivali oralno aktivne molekule kako bi definirali raspon fizikalno-kemijskih parametara u kojem lijek ima visoki afinitet da bude oralno primjenjiv (tzv. *drug-likeness*). Ta su pravila skupljena pod nazivom Lipinskijevo pravilo 5 koje daje poveznicu između farmakokinetike i fizikalno-kemijskih parametara molekule. Ono zahtijeva da molekula ima  $M_r \leq 500$ ,  $\log P \leq 5$ , broj donora vodikove veze  $\leq 5$  te broj akceptora vodikove veze  $\leq 10$  [45].

Veber i suradnici predlažu svoj skup pravila koja preciziraju i specificiraju Lipinskijevo pravilo 5. Oni uzimaju dodatno u obzir fleksibilnost i polarnost molekule uz obavezno postojanje najviše 10 veza koje mogu slobodno rotirati. Također, pravila zahtijevaju manje od 12 akceptora i donora vodikove veze te topološku polarnu površinu molekule (TPSA) manju od  $140 \text{ \AA}^2$  [44].

Ghose i suradnici su oformili pravila koja zahtijevaju da molekula ima molekularnu masu između 160 i 480 g/mol, također, WLOGP bi trebao biti između -0.4 i 5.6. Molarna bi refraktivnost (MR) trebala biti veća od 40, a manja od 130 te bi molekula trebala imati 20–70 atoma [43].

U Tablici 7 prikazana su odstupanja od Lipinskijevih, Veberovih i Ghoseovih pravila za nosintetizirane molekule. Svi su parametri izračunati pomoću programa SwissADME [46].

**Tablica 7.** Primjena Lipinskijevih, Veberovih i Ghoseovih pravila na novosintetizirane molekule

| Spoj  | 21  | 13  | 8   | 20  | 12  | 7   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Molekulska formula                                | C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>31</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> | C <sub>31</sub> H <sub>33</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> | C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> |
| Mr / g mol <sup>-1</sup>                          | 526,63  | 540,66  | 526,63  | 521,61  | 535,64  | 521,61  |
| log P   | 3,89  | 4,21  | 3,63  | 4,15  | 3,92  | 4,06  |
| Broj akceptora vodikovih veza                     | 5   | 5   | 5   | 6   | 6   | 6   |
| Broj donora vodikovih veza                        | 4   | 3   | 4   | 2   | 1   | 2   |
| Lipinski <sup>L</sup>                             | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   |
| Odstupanja  | M <sub>r</sub> > 500  | M <sub>r</sub> > 500  | M <sub>r</sub> > 500  | M <sub>r</sub> > 500  | M <sub>r</sub> > 500  | M <sub>r</sub> > 500  |
| Molarna refraktivnost (MR) / cm <sup>3</sup> /mol | 155,52  | 160,42  | 155,52  | 154,23  | 159,14  | 154,23  |
| Broj atoma  | 73  | 76  | 73  | 70  | 73  | 70  |
| WLOGP   | 5,35  | 5,45  | 5,35  | 5,69  | 5,79  | 5,69  |
| Ghose <sup>G</sup>                                | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Odstupanja  | M <sub>r</sub> > 480<br>MR >130<br>N (atoma) >70              | M <sub>r</sub> > 480<br>MR >130<br>N (atoma) >70              | M <sub>r</sub> > 480<br>MR >130<br>N (atoma) >70              | M <sub>r</sub> > 480<br>MR >130<br>WLOGP>5,6                  | M <sub>r</sub> > 480<br>MR >130<br>WLOGP>5,6<br>N (atoma) >70 | M <sub>r</sub> > 480<br>MR >130<br>WLOGP>5,6                  |
| Broj rotirajućih veza                             | 13  | 13  | 13  | 10  | 10  | 10  |
| Polarna površina / Å <sup>2</sup>                 | 113,19  | 102,33  | 113,19  | 102,77  | 91,91   | 102,77  |
| Veber <sup>V</sup>                                | -   | -   | -   | +   | +   | +   |
| Odstupanja  | N (rotora) >10  | N (rotora) >10  | N (rotora) >10  |   |   |   |

<sup>L</sup> Broj parametara (od 4) koji odgovaraju Lipinskijevim parametrima

<sup>G</sup> Slaganje s Ghoseovim pravilima

<sup>V</sup> Slaganje s Veberovim pravilima

*Bioavailability radar* [46] je koristan alat programa SwissADME koji slikovito prikazuje procijenjenu oralnu bioraspoloživost molekule. Uspoređujući šest fizikalno-kemijskih parametara molekule (lipofilnost, veličinu, polarnost, fleksibilnost, zasićenost i topljivost) s idealnim parametrima za dobru oralnu bioraspoloživost *Bioavailability radar* iscrtava polarni grafikon koji je pravilni šesterokut ružičaste boje za idealnu bioraspoloživost, dok svaki analizirani spoj s obzirom na vlastite vrijednosti parametara iscrtava šesterokut crvene boje. Takav prikaz omogućuje brzu procjenu jer ako se neki vrh crvenog šesterokuta nalazi izvan idealnog ružičastog šesterokuta znači da je taj parametar problematičan i da odstupa od kriterija za dobru oralnu bioraspoloživost.

Vrijednosti su parametara za novosintetizirane spojeve dane u Tablici 8, a polarni su dijagrami prikazani na Slikama 9 i 10.

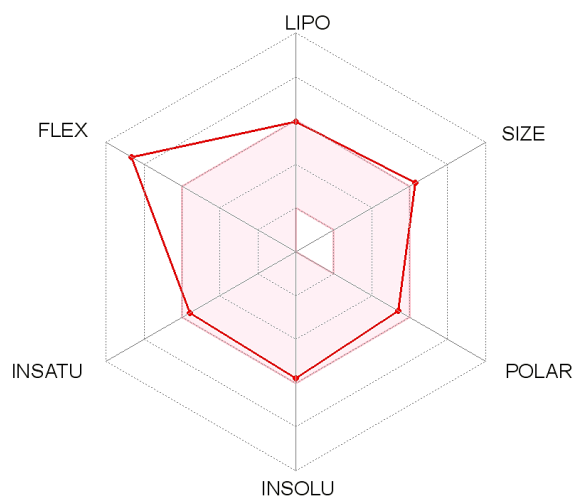
**Tablica 8.** Vrijednosti *Bioavailability radar* programa za novosintetizirane spojeve izračunate programom SwissADME.

| Spoj | XLOG P3 <sup>1</sup> | Log S <sup>2</sup> | Csp3 <sup>3</sup> |
|------|----------------------|--------------------|-------------------|
| 21   | 4,90                 | -5,77              | 0,30              |
| 13   | 4,78                 | -5,77              | 0,32              |
| 8    | 4,90                 | -5,77              | 0,30              |
| 20   | 4,98                 | -6,08              | 0,27              |
| 12   | 5,04                 | -6,19              | 0,29              |
| 7    | 4,98                 | -6,08              | 0,27              |

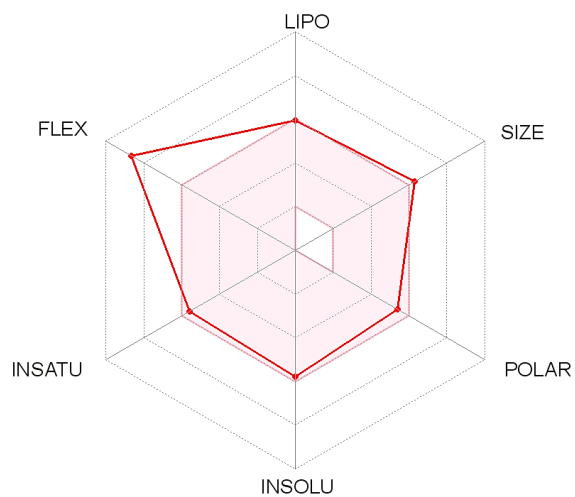
<sup>1</sup> XLOG P3 – metoda računanja log *P* algoritmom XLOGP3

<sup>2</sup> log *S* – logaritam topljivosti spoja u vodi

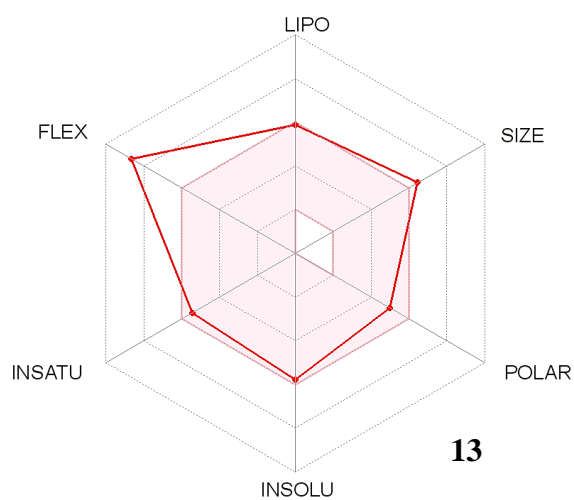
<sup>3</sup> Csp3 – udio *sp*<sup>3</sup> hibridiziranih atoma ugljika u ukupnom broju atoma ugljika u strukturi



**21**

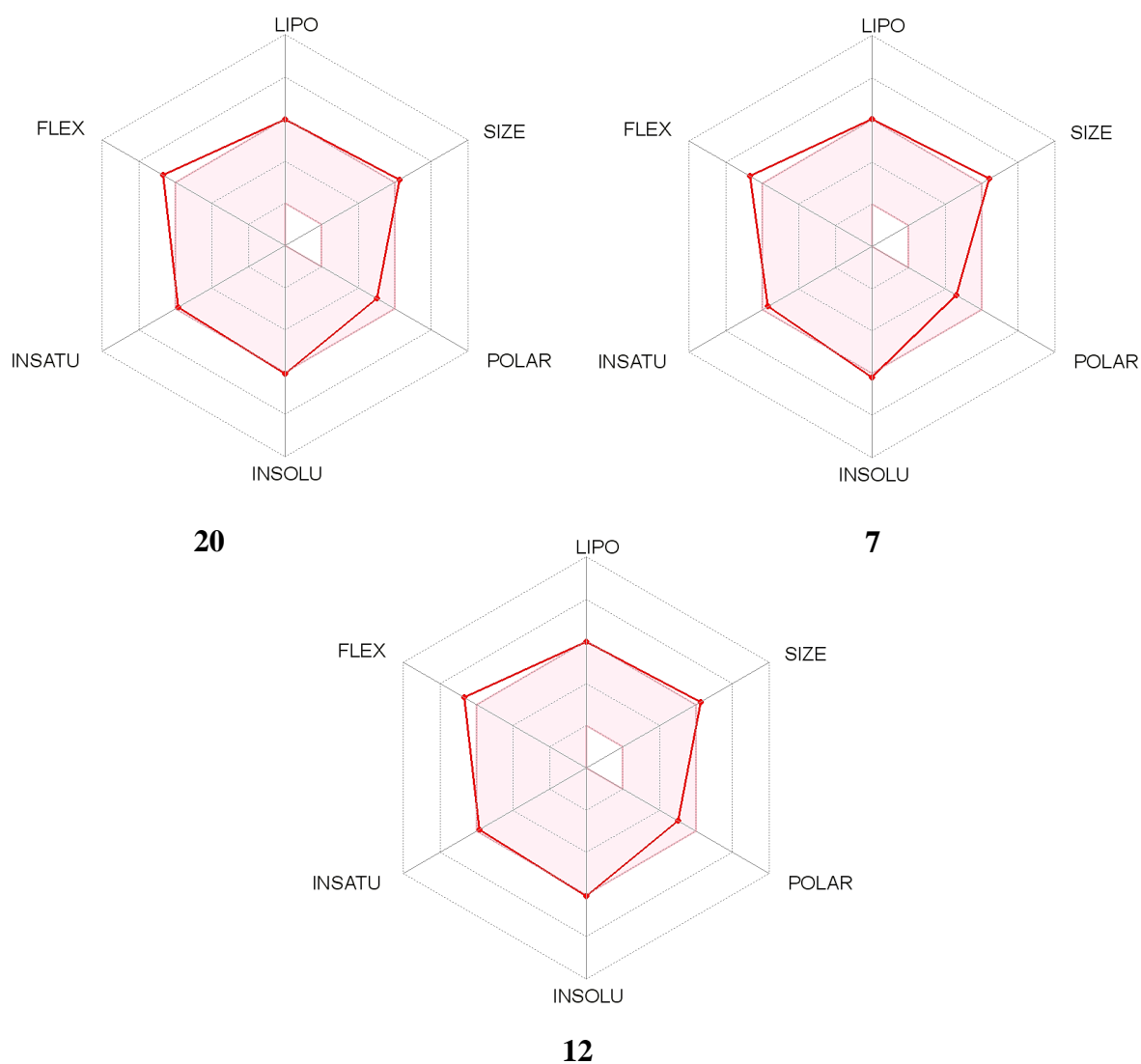


**8**



**13**

**Slika 9.** Prikaz *Bioavailability radar* modela za predviđanje oralne bioraspoloživosti novosintetiziranih urea



**Slika 10.** Prikaz *Bioavailability radar* modela za predviđanje oralne bioraspodjelivosti novosintetiziranih triazola

Ružičasti šesterokut predstavlja idealni raspon parametara za dobru bioraspodjelivost koja podrazumijeva:

Lipofilnost (**LIPO** – XLOGP3 između -0,7 i +5,0)

Veličinu (**SIZE** – Mr između 150 i 500 g/mol)

Polarnost (**POLAR** – TPSA između 20 i 130 Å<sup>2</sup>)

Topljivost (**INSOLU** – log S ne smije biti veći od 6)

Na polarnim se grafikonima sa Slika 9 i 10 vidi kako derivati triazola zadovoljavaju tri od šest parametara, a to su lipofilnost, polarnost i zasićenost, dok uree zadovoljavaju i parametar topljivosti uz prethodna tri. Glavni je problem relativna molekulska masa molekula koja je kod svih novosintetiziranih spojeva veća od 500. Također, uree pokazuju značajno odstupanje što se tiče fleksibilnosti u odnosu na triazole, što je i razumljivo pošto se uvođenjem 1,2,3-triazola u molekulu smanjuje njena fleksibilnost, odnosno, povećava se rigidnost molekule.

Ovisno o strukturi molekule ona podliježe različitim metaboličkim reakcijama što je još jedan važan aspekt farmakokinetike. Većina se lijekova metabolizira u jetri pa je vrlo korisno u ranim fazama istraživanja ispitati je li neka od novosintetiziranih molekula potencijalni inhibitor ili induktor nekog enzima citokroma (CYP) P450. Također, rutinski se ispituje i je li molekula supstrat P-glikoproteina (pGP) koji je glavni efluksni protein na krvno-moždanoj barijeri (KMB). Oralni je put primjene najprimjenjiviji pa se u tu svrhu ispituje i sposobnost apsorpcije molekule iz gastrointestinalnog trakta. Kako molekula ne bi imala potencijalne nuspojave na centralni živčani sustav, u okviru se preliminarnih ispitivanja vrše i ispitivanja sposobnosti molekula da prođe KMB. Razvijeni su razni računalni modeli koji prema strukturi molekula predviđanju navedene parametre metabolizma, apsorpcije ili prolaska KMB. Navedeni su parametri izračunati u Tablici 9.

**Tablica 9.** Farmakokinetički parametri za novosintetizirane spojeve izračunati pomoću programa SwissADME.

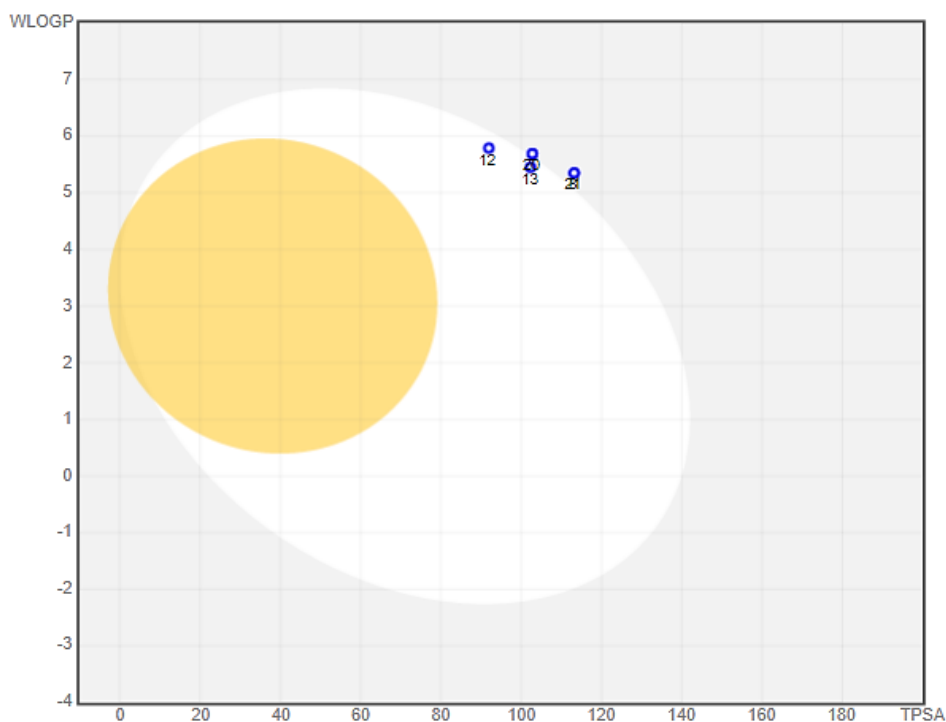
| Spoj | GIS aps. <sup>1</sup> | Prolazak kroz KMB | Supstrat za pGP | CYP1A2 inhibitor | CYP2C19 inhibitor | CYP2C9 inhibitor | CYP2D6 inhibitor | CYP3A4 inhibitor |
|------|-----------------------|-------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| 21   | Slaba                 | Ne                | Da              | Da               | Da                | Da               | Da               | Da               |
| 13   | Visoka                | Ne                | Da              | Da               | Da                | Da               | Da               | Da               |
| 8    | Slaba                 | Ne                | Da              | Da               | Da                | Da               | Da               | Da               |
| 20   | Slaba                 | Ne                | Da              | Da               | Da                | Da               | Da               | Da               |
| 12   | Visoka                | Ne                | Da              | Ne               | Da                | Da               | Da               | Da               |
| 7    | Slaba                 | Ne                | Da              | Da               | Da                | Da               | Da               | Da               |

<sup>1</sup> Sposobnost apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta

Iz tablice je jasno vidljivo kako niti jedna od molekula ne prolazi KMB i većini je sposobnost apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta slaba. Ta se dva parametra mogu prikazati na tzv. *Boiled-Egg* dijagramu [47] koji je kreiran pomoću programa SwissADME. Grafikon



opisuje prolazak neke molekule kroz tjelesne barijere. U obzir uzima TPSA i WLOGP i podijeljen je u tri zone. Lijekovi su na grafikonu prikazani kružićima. Ako su kružići plave boje tada je molekula potencijalni supstrat za pGP, a ako su kružići crveni onda nije. Ako se neka molekula nalazi unutar žute zone, odnosno, „žumanjka jajeta“ znači da prolazi KMB. Bijela zona, odnosno, „bjelanjak jajeta“ označava lijekove koji se pasivno apsorbiraju iz gastrointestinalnog trakta. Siva zona predstavlja područje gdje se nalaze molekule sa lošom sposobnošću prolaska kroz KMB i apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta. Slika 11 prikazuje *Boiled-Egg* dijagram za novosintetizirane spojeve.



**Slika 11.** *Boiled-Egg* dijagram kreiran programom SwissADME

Ovim se jednostavnim slikovnim prikazom vidi kako su samo dva od šest novosintetiziranih spojeva mogu primjenjivati oralno zbog dobre apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta. Zanimljivo je da su to triazol i urea kod kojih je harminski prsten supstituiran na položaju 9 – triazol **12** i urea **13**. Također, niti jedan od spojeva ne prolazi KMB zbog čega neće izazvati nuspojave povezane sa središnjim živčanim sustavom. Međutim, svi novosintetizirani spojevi inhibiraju skoro sve glavne enzime iz porodice CYP što znači da bi mogli ulaziti u interakcije s lijekovima koji se preko njih metaboliziraju ukoliko bi se

primjenjivali zajedno. Zbog toga bi daljnje modifikacije strukture trebale ići i u smjeru optimiranja metabolizma.

## **5. ZAKLJUČAK**

U ovome je radu opisana sinteza i karakterizacija novih hibrida harmina i PQ: 1,2,3-triazola i urea. Ovo je istraživanje provedeno u okviru istraživanja derivata harmina kao potencijalnih antimalarijskih i citostatskih lijekova koje se provodi proteklih godina na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Sintetizirani su i karakterizirani sljedeći spojevi koji do sada nisu opisani u literaturi:

- 1) 6-metoksi-*N*-(5-(4-(((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)pentan-2-il)kinolin-8-amin (**7**),
- 2) 6-metoksi-*N*-(4-(4-((7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)butan-2-il)kinolin-8-amin (**12**),
- 3) 6-metoksi-*N*-(5-(4-(((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)pentan-2-il)kinolin-8-amin (**20**),
- 4) 1-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)-3-(2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)etil)urea (**8**),
- 5) 1-(2-(7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)-3-(4-((6-metoksikinolin-8-il)amino)pentil)urea (**13**),
- 6) 1-(4-((6-metoksiizokinolin-8-il)amino)pentil)-3-(((2-((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)etil)amino)metil)urea (**21**).

Također, sintetizirano je 17 prekursora potrebnih za sintezu konačnih produkata. Konačni su produkti karakterizirani upotrebom uobičajenih analitičkih i spektroskopskih metoda (NMR, MS,  $t_r$ ).

Novosintetizirani spojevi zadovoljavaju većinu uvjeta Lipinskijevog pravila 5 za dobru oralnu bioraspoloživost lijekova (3/4). Derivati triazola zadovoljavaju Veberova pravila za dobru bioraspoloživost, dok niti jedan derivat ne zadovoljava Ghoseova pravila. Uzimajući u obzir tako predviđena fizikalno-kemijska svojstva, može se zaključiti da novosintetizirane molekule ne predstavljaju dobre kandidate za nove lijekove za oralnu primjenu već je potrebna daljnja optimizacija strukture u svrhu postizanja bolje oralne bioraspoloživosti.

Nadalje, računalna predviđanja farmakokinetičkih svojstava, napravljena pomoću programa SwissADME, pokazuju kako se spojevi **12** i **13** dobro apsorbiraju iz gastrointestinalnog trakta. KMB ne prelazi niti jedan novosintetizirani spoj te su svi supstrati za pGP. Prema predviđanjima *Bioavailability radara* derivati triazola zadovoljavaju 3 od 6 parametara dobre oralne bioraspoloživosti dok uree uz dobru lipofilnost, polarnost i dostatan udio  $sp^3$  hibridiziranih ugljikovih atoma zadovoljavaju i uvjet topljivosti. Glavni su problemi

prevelika fleksibilnost derivata uree, što je nešto manje izraženo kod derivata triazola zbog inkorporiranog 1,2,3-triazolskog prstena čime se smanjuje fleksibilnost molekule, te relativna molekulska masa koja prelazi 500. Prilikom buduće optimizacije trebalo bi poraditi na smanjenju fleksibilnosti i molekulske mase molekula.

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, ispitat će se citostatsko djelovanje novosintetiziranih spojeva.

## **6. ZAHVALE**

Zahvaljujemo se svim članovima Zavoda za farmaceutsku kemiju, a ponajprije dr. sc. Kristini Pavić pod čijim je mentorstvom vođeno ovo istraživanje te prof. dr. sc. Zrinki Rajić na pruženoj prilici da budemo dio istraživačkog tima na njenom projektu.

Posebne zahvale asistentima Marini Marinović, mag. appl. chem. i Goranu Poje, mag. pharm. na pruženoj pomoći i svesrdnoj podršci te na divnom prijateljstvu koje nam je proteklih nekoliko mjeseci uljepšalo rad u laboratoriju. Hvala vam na vašem strpljenju i vremenu za naše beskonačne upite.

Konačno, zahvaljujemo se našim obiteljima i prijateljima koji su nas podržavali i u neku ruku omogućili da ovaj rad uspješno privedemo kraju.

## **7. POPIS LITERATURE**



1. World Health Organisation. Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/>, pristupljeno 16.6.2021.
2. Onkologija. Incidencija raka u Hrvatskoj. Što je rak - Onkologija, pristupljeno 16.6.2021.
3. HZJZ. Bilten Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. godine | Hrvatski zavod za javno zdravstvo (hzjz.hr), pristupljeno 16.6.2021.
4. Pavić, Kristina. "Sinteza, karakterizacija i biološko djelovanje semikarbazida, urea i ureidoamida primakina." Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017.
5. US Food and Drug Administration. Novel Drugs 2020, 2021., <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2020> , pristupljeno 18.6.2021.
6. Oprea TI, Mestres J. Drug repurposing: Far beyond new targets for old drugs. *AAPS J*, 2012, 14, 759–763.
7. Kim JH, Choi AR, Yoon S. Co-treatment with the anti-malarial drugs mefloquine and primaquine highly sensitizes drug-resistant cancer cells by increasing P-gp inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441, 655–660.
8. Jain S, Chandra V, Jain PK, Pathak K, Pathak D, Vaidya A. Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents. *Arab J Chem*, 2016, 2019, 12, 4920–4946.
9. Afzal O, Kumar S, Haider MR, Ali MR, Kumar R, Jaggi M, Bawa S. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur J Med Chem*, 2015, 97, 871–910.
10. Šimunović M, Perković I, Zorc B, Ester K, Kralj M, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E. Urea and carbamate derivatives of primaquine: Synthesis, cytostatic and antioxidant activities. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17, 5605–5613.

11. Džimbeg G, Zorc B, Kralj M, Ester K, Pavelić K, Andrei G, Snoeck R, Balzarini J, De Clercq E, Mintas M. The novel primaquine derivatives of N-alkyl, cycloalkyl or aryl urea: Synthesis, cytostatic and antiviral activity evaluations. *Eur J Med Chem*, 2008, 43, 1180–1187.
12. Perković I, Tršinar S, Žanetić J, Kralj M, Martin-Kleiner I, Balzarini J, HadjipavlouLitina D, Katsori AM, Zorc B. Novel 1-acyl-4-substituted semicarbazide derivatives of primaquine – synthesis, cytostatic, antiviral and antioxidative studies. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2013, 28, 601–610.
13. Rajić Z, Zovko Končić M, Miloloža K, Perković I, Butula I, Zorc B, Bucar F. Primaquine-NSAID twin drugs: Synthesis, radical scavenging, antioxidant and Fe<sup>2+</sup> chelating activity. *Acta Pharm*, 2010, 60, 325–337.
14. Rajić Z, Kos G, Zorc B, Singh PP, Singh S. Macromolecular prodrugs. XII. Primaquine conjugates: synthesis and preliminary antimalarial evaluation. *Acta Pharm*, 2009, 59, 107–115.
15. Zorc B, Perković I, Pavić K, Rajić Z, Beus M. Primaquine derivatives: Modifications of the terminal amino group. *Eur J Med Chem*, 2019, 182, 111640.
16. Javeed M, Rasul A, Hussain G, Jabeen F, Rasool B, Shafiq N, Ali M. Harmine and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in human diseases. *Bangladesh J of Pharmacol*, 2018, 13, 203–213.
17. Guo L, Chen W, Cao R, Fan W, Ma Q, Zhang J, Dai, B. Synthesis and structure-activity relationships of asymmetric dimeric  $\beta$ -carboline derivatives as potential antitumor agents. *Eur J Med Chem*, 2018, 147, 253–265.
18. Ayoob I, Hazari YM, Lone SH, Shakeel-u-Rehman Khuroo MA, Fazili KM, Bhat KA. Phytochemical and Cytotoxic Evaluation of Peganum Harmala: Structure Activity Relationship Studies of Harmine. *ChemistrySelect*, 2017, 2, 2965–2968.

19. Recht J, Ashley E, White N. Safety of 8-aminoquinoline antimalarial medicines. Ženeva, World Health Organization, 2014.
20. World Health Organization. WHO model list of essential medicines. <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>, pristupljeno 20.5.2021.
21. Vale N, Moreiea R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem*, 2009, 44, 937–953.
22. Basso LG, Rodrigues RZ, Naal RMZG, Costa-Filho AJ. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. *BBA-Biomembranes*, 2011, 1808, 55–64.
23. Aaghaz S, Sharma K, Jain R, Kamal A.  $\beta$ -Carbolines as potential anticancer agents. *Eur J Med Chem*, 2021, 216, 113321.
24. Boeira JM, Viana AF, Picada JN, Henriques JAP. Genotoxic and recombinogenic activities of the two  $\beta$ -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat Res*, 2002, 500, 39–48.
25. Hamsa T, Kuttan G. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma, *Chin Med*, 2011, 6, 11.
26. Gnewuch CT, Sosnovsky G. A critical appraisal of the evolution of N-Nitrosoureas as anticancer drugs. *Chem Rev*, 1997, 97, 829–1014.
27. Denoyelle S, Chen T, Chen L, Wang Y, Klosi E, Halperin JA, Aktas BH, Chorev M. In vitro inhibition of translation initiation by N,N'-diaryllureas-potential anti-cancer agents, *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22, 402–409.
28. Marvania B, Lee PC, Chaniyara R, Dong Huajin, Suman S, Kakadiya R, Chou TC, Lee TC, Shah A, Su TL. Design, synthesis and antitumor evaluation of phenyl N-mustard-quinazoline conjugates, *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 1987–1998.

29. Ogita H, Isobe Y, Takaku H, Sekine R, Goto Y, Misawa S, Hayashi H. Synthesis and structure-activity relationship of diarylamide urea derivatives as selective inhibitors of the proliferation of human coronary artery smooth muscle cells, *Bioorg Med Chem*, 2002, 10, 1865–1871.
30. Esteves-Souza A, Pissinate K, Nascimento MdG, Grynberg NF, Echevarria A. Synthesis, cytotoxicity and DNA-topoisomerase inhibitory activity of new asymmetric ureas and thioureas, *Bioorg Med Chem*, 2006, 14, 492–499.
31. Fortin S, Moreau E, Lacroix J, Cote MF, Petitclerc E, C-Gaudreault R. Synthesis, antiproliferative activity evaluation and structure-activity relationships of novel aromatic urea and amide analogues of N-phenyl-N'-(2-chloroethyl) ureas, *Eur J Med Chem* 2010, 45, 2928–2937.
32. Fortin S, Wei L, Moreau E, Labrie P, Petitclerc E, Kotra PL, C-Gaudreault R. Mechanism of action of N-phenyl-N'-(2-chloroethyl)ureas in the colchicine-binding site at the interface between alpha- and beta-tubulin, *Bioorg Med Chem*, 2009, 17, 3690–3697.
33. 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.
34. Huisgen R. 1,3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick. *Angew Chem*, 1963, 75, 604–637.
35. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41, 2596–2599.
36. Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J Org Chem*, 2002, 67, 3057–3064.

37. Tron GC, Pirali T, Billington RA, Canonico PL, Sorba G, Genazzani AA. Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry: Applications of the 1,3-dipolar Cycloaddition Between Azides and Alkynes. *Med Res Rev*, 2008, 28, 278–308.
38. Himo F, Lovell T, Hilgraf R, Rostovtsev VV, Noodleman L, Sharpless KB, Fokin VV. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J Am Chem Soc*, 2005, 127, 210–216.
39. Tornøe CW, Sanderson SJ, Mottram JC, Coombs GH, Meldal M. Combinatorial Library of Peptidotriazoles: Identification of [1,2,3]-Triazole Inhibitors against a Recombinant *Leishmania mexicana* Cysteine Protease. *J Comb Chem*, 2004, 6, 312–324.
40. Whiting M, Muldoon J, Lin YC, Whiting, M., Muldoon, J., Lin, Y.-C., Silverman SM, Lindstrom W, Olson AJ, Fokin VV. Inhibitors of HIV-1 Protease by Using In Situ Click Chemistry. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45, 1435–1439.
41. Kharb R, Sharma PC, Yar MS. Pharmacological significance of triazole scaffold. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2010, 26, 1–21.
42. Perković I, Raić-Malić S, Fotinha D, Prudencio M, Carvalho LP, 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.
43. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem*, 1999, 55–68.
44. Veber DF, Johnson RS, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 2002, 2615–2623.
45. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 3–26.

46. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 2017, 7, 42717.
47. Daina A, Zoete V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 2016, 11, 1117–1121.

## **8. SAŽETAK**

**Ivana Vrdoljak i Jakov Vuk**

**Sinteza i karakterizacija novih hibrida harmina i primakina s potencijalnim  
citostatskim djelovanjem**

Rak je zajednički naziv za skupinu bolesti koje definira nekontrolirani rast malignih stanica. WHO je 2018. godine svrstala karcinom na drugo mjesto po uzroku smrti u svijetu. Liječenje karcinoma uključuje kombinaciju više citostatika, radioterapiju ili pak kirurško odstranjenje. Unatoč značajnom napretku u terapiji ovih bolesti, problem i dalje predstavlja mala selektivnost ili prevelika toksičnost citostatika što dovodi do ozbiljnih nuspojava, a uočena je i rezistencija tumorskih stanica na citostatike. Zbog svega navedenog postoji velika potreba za razvojem novih selektivnijih i manje toksičnih citostatika. Zbog dokazanih antiproliferativnih svojstava primakina, poznatog antimalarika, i harmina, prirodnog harmala alkaloida, odlučili smo se na povezivanje tih dviju molekula u jednu kako bi dobili novi potencijalni antitumorski lijek. Variranjem mjesta supstitucije na harminskom dijelu molekule (O6, O7 ili N9) te vrste poveznice (urea ili 1,2,3-triazol) nastojali smo pojačati citostatsko djelovanje. Sintetizirana su tri derivata uree benzotriazolskom metodom, dok su metodom *click* kemije sintetizirana tri derivata triazola. U radu su detaljno opisani postupci sinteze i strukturne karakterizacije spektroskopskim i analitičkim metodama šest novih hibridnih spojeva primakina i harmina. Novosintetizirani spojevi ne pokazuju potencijal za dobru oralnu bioraspoloživost te bi se u daljnjim optimiranjima trebalo ići prema poboljšanju bioraspoloživosti. U daljnjim istraživanjima, koja nadilaze okvire ovog rada, bit će ispitano citostatsko djelovanje na niz humanih malignih staničnih linija.

**Ključne riječi:** primakin, harmin, *click* kemija, urea, 1,2,3-triazol, citostatsko djelovanje



## **9. SUMMARY**

Ivana Vrdoljak and Jakov Vuk

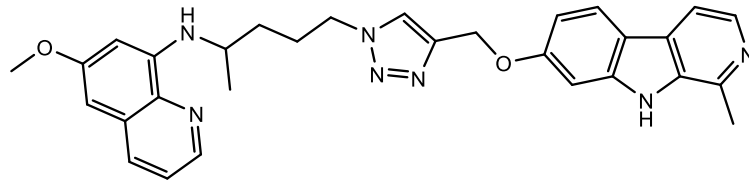
**Synthesis and characterization of novel harmine and primaquine hybrids with potential cytostatic activity**

Cancer is a common name for a group of diseases defined by the uncontrolled growth of malignant cells. In 2018, WHO ranked cancer as the second leading cause of death worldwide. Cancer treatment includes combination of multiple anticancer agents, radiotherapy, or surgical removal. Despite significant advances in the treatment of cancer, low selectivity, excessive toxicity of anticancer drugs, and cancer drug resistance remain a problem. Thus, there is a great need for the development of novel more selective, and less toxic anticancer agents. Due to the proven antiproliferative properties of both primaquine, a well-known antimalarial drug, and harmine, a natural harmala alkaloid, we have decided to combine these two moieties into one to obtain new potential anticancer agents. By varying the position of the substituent on the harmine part of the molecule (*O6*, *O7* or *N9*) and the linker type (urea or 1,2,3-triazole), we sought to enhance cytostatic activity. Three novel urea derivatives were synthesized utilizing benzotriazole method, while three new triazole hybrids were prepared by the employment of *click* chemistry. The paper describes in detail syntheses of six novel hybrid compounds of primaquine and harmine and their structural characterization by spectroscopic and analytical methods. The newly synthesized compounds do not show the potential for good oral bioavailability, therefore further optimization might be necessary. In further studies, which are beyond the scope of this paper, their cytostatic activity against human cancer cell lines will be evaluated.

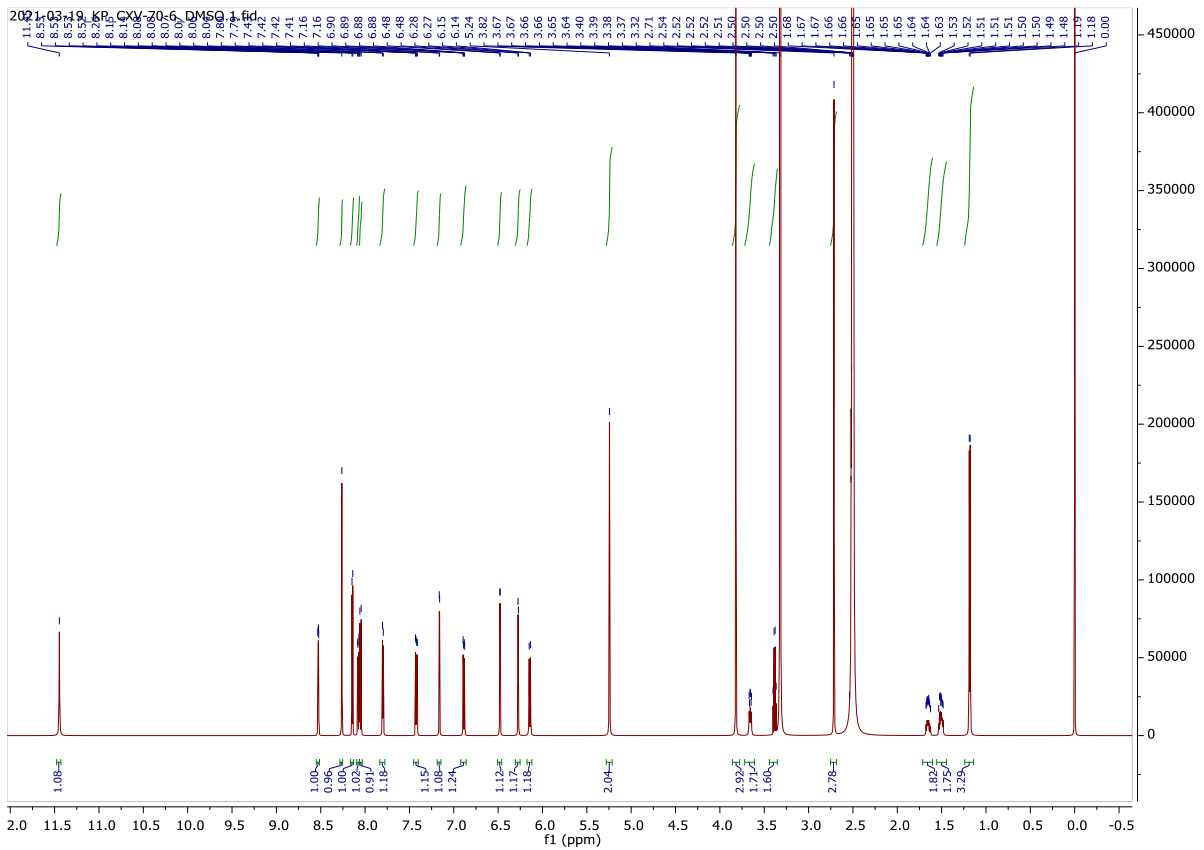
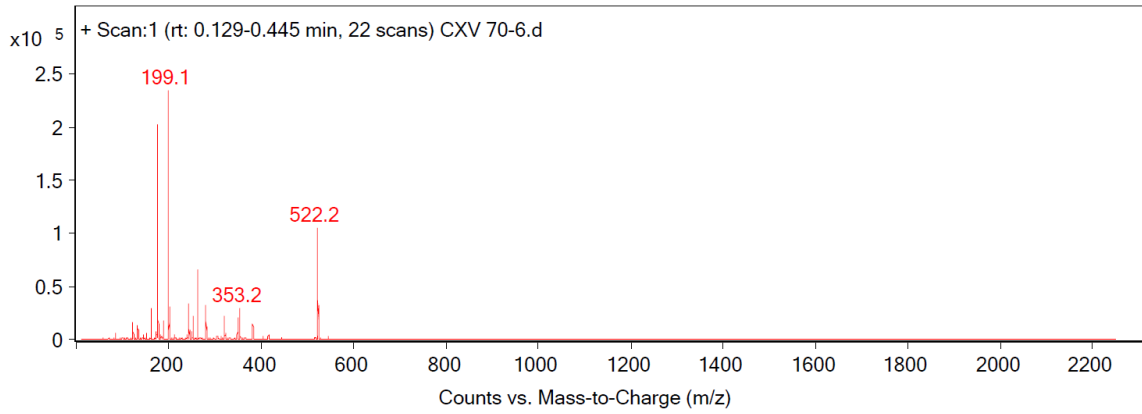
**Keywords:** primaquine, harmine, click chemistry, urea, 1,2,3-triazole, cytostatic activity

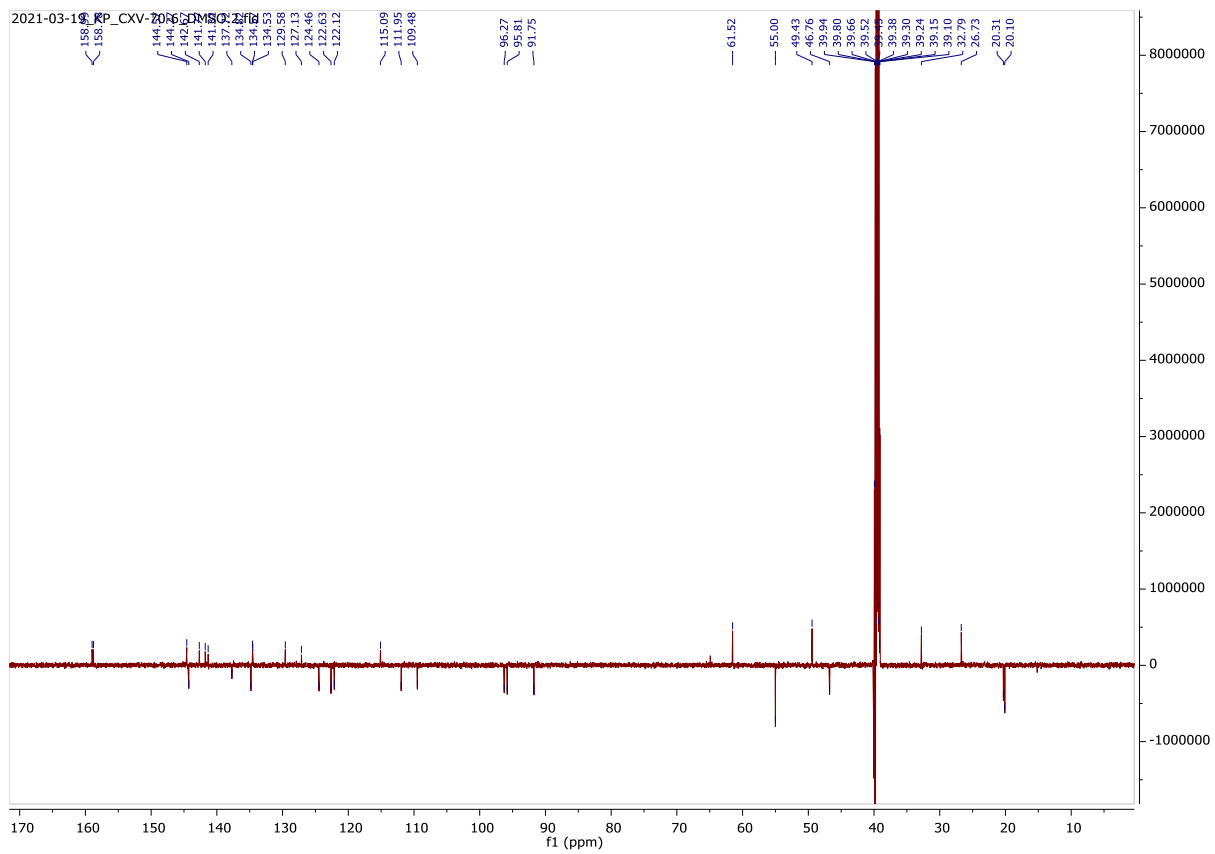
## **10. PRILOZI**

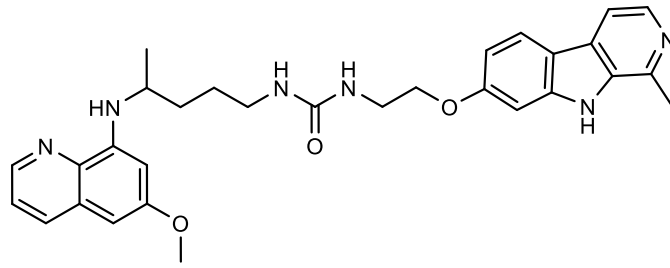
Prilozi sadrže  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR i MS spektre novosintetiziranih spojeva u ovom radu.



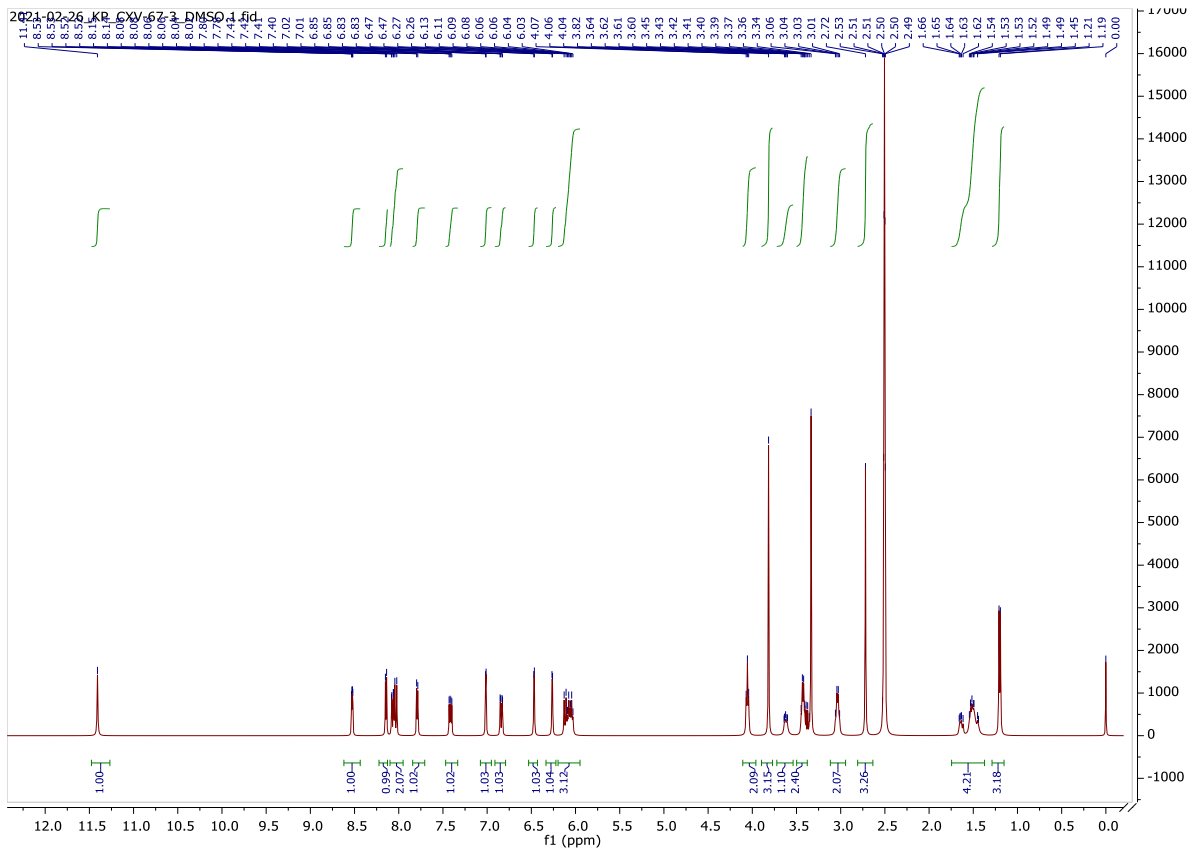
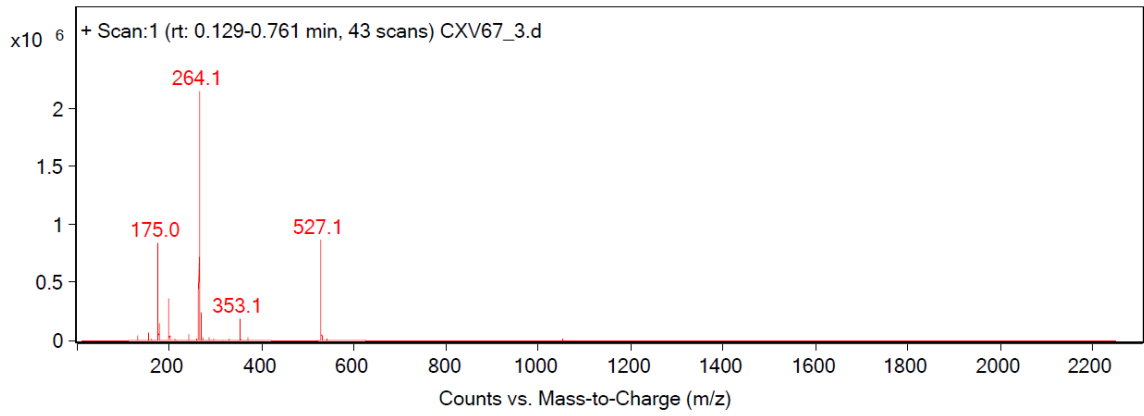
7

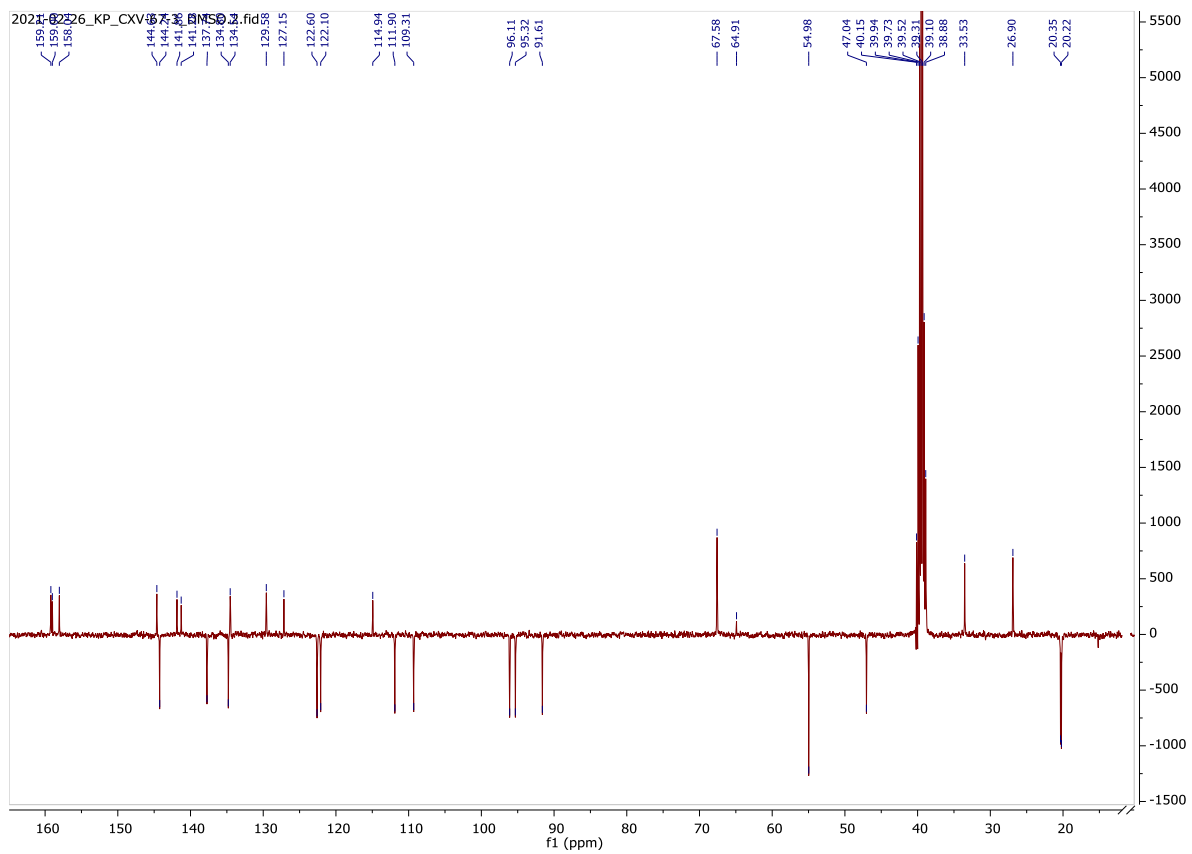




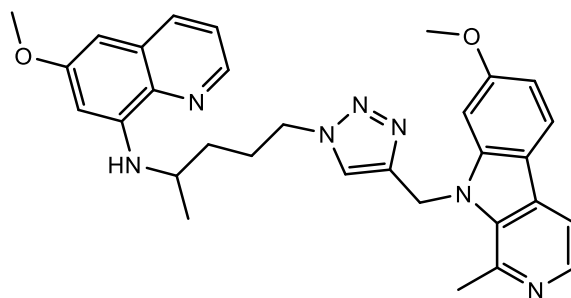


8

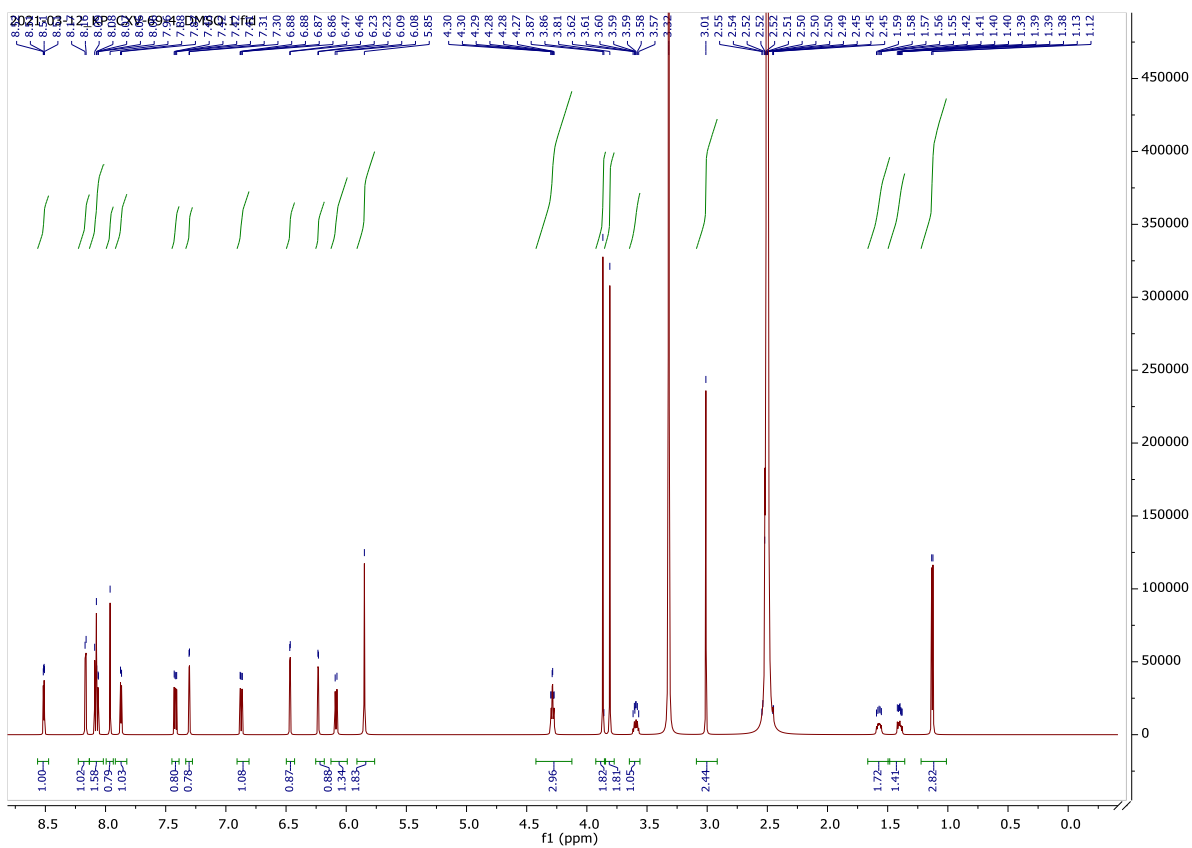
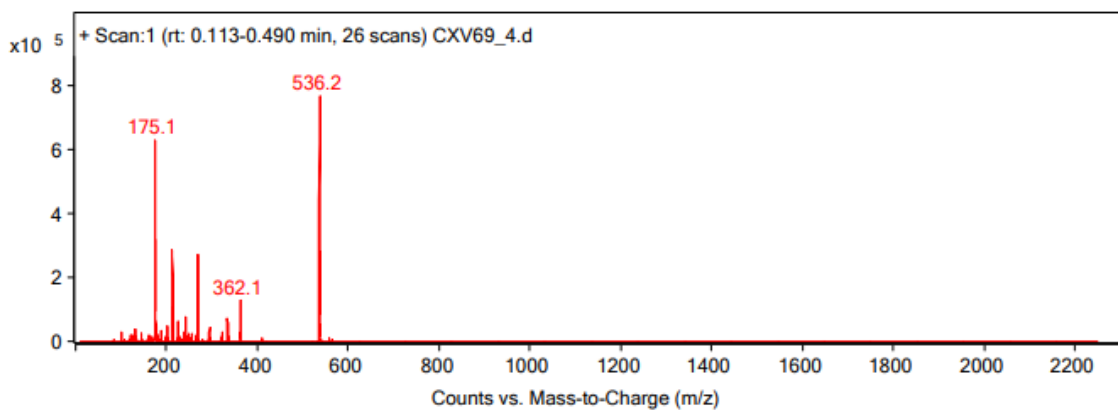


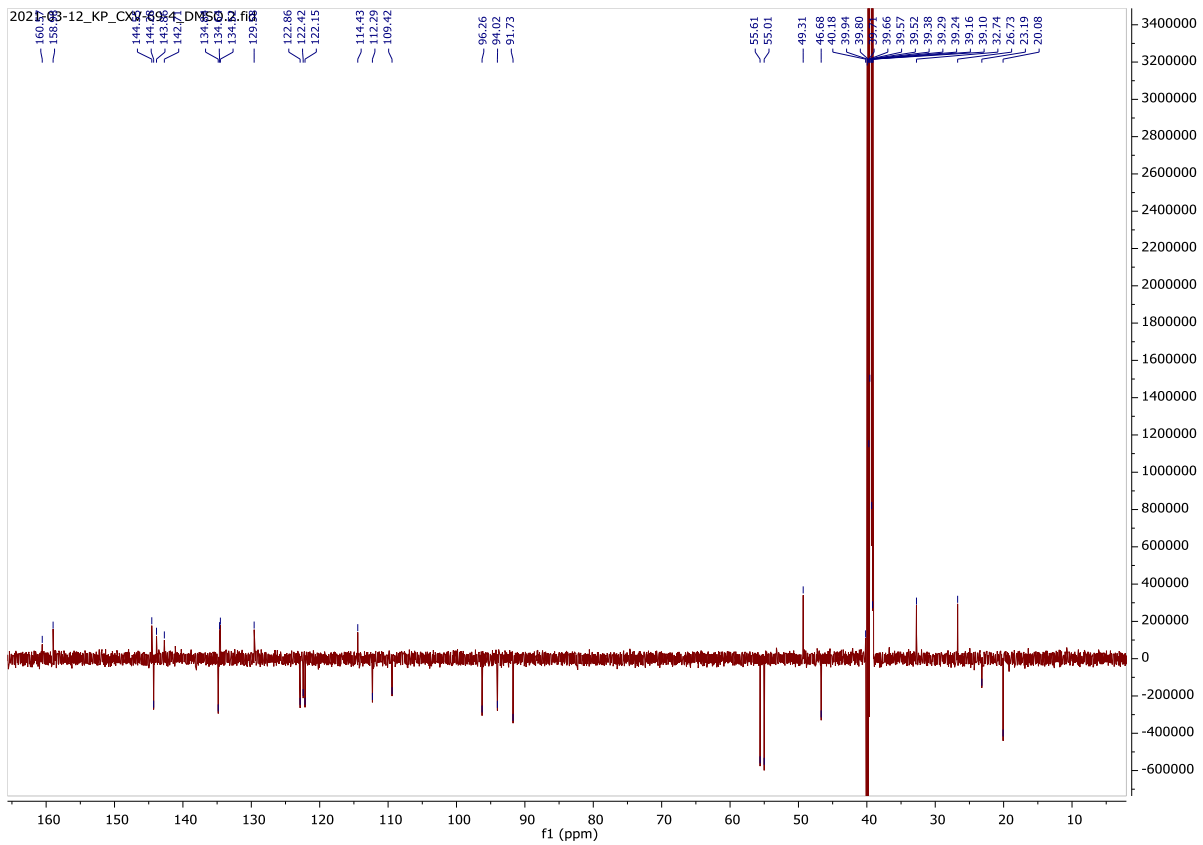


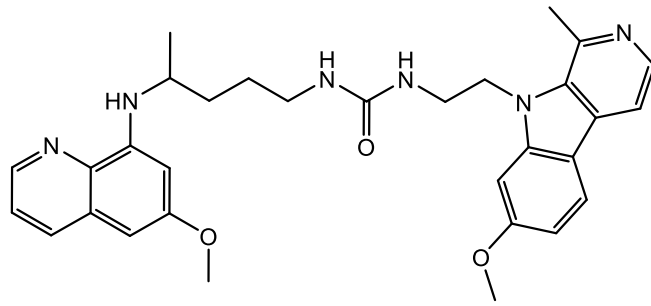




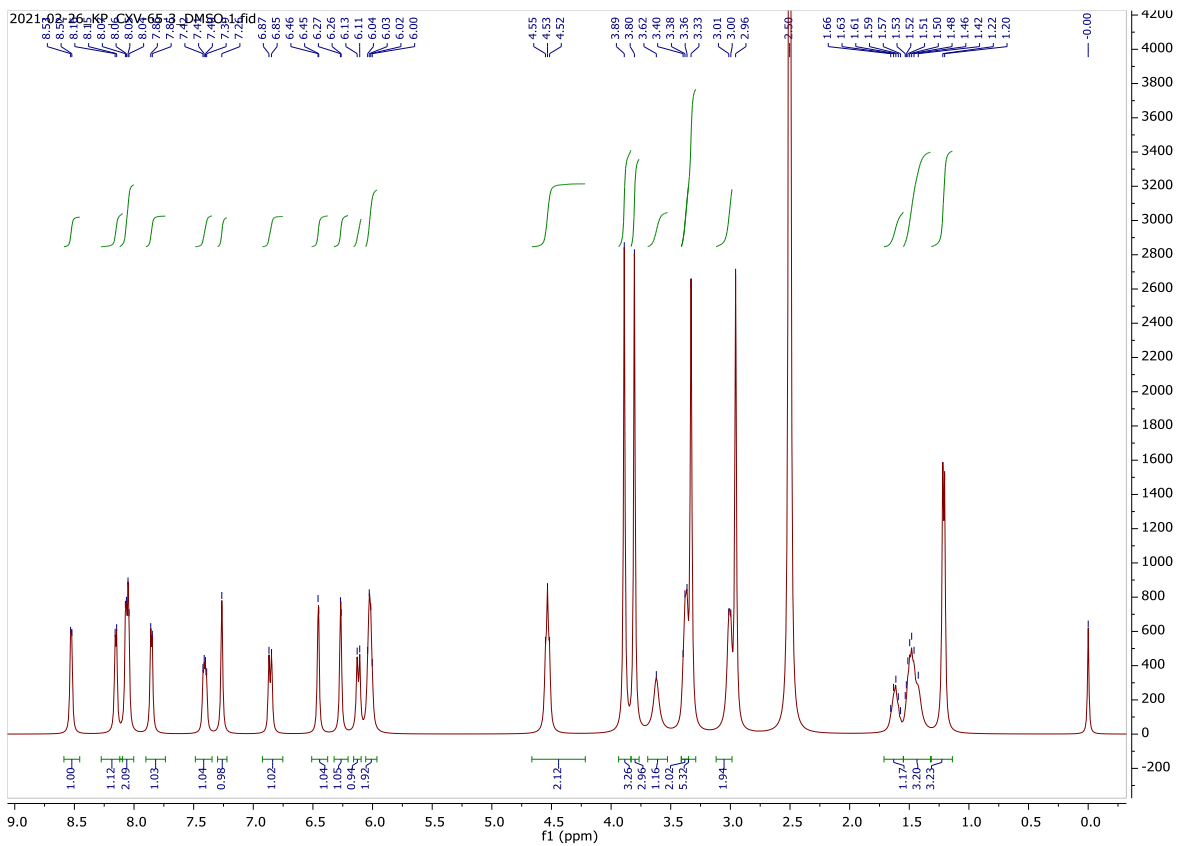
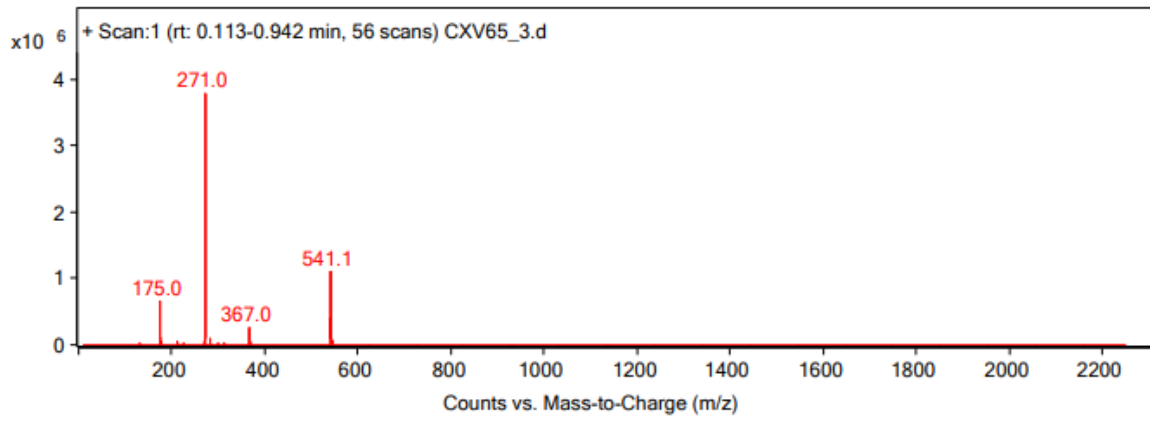
12

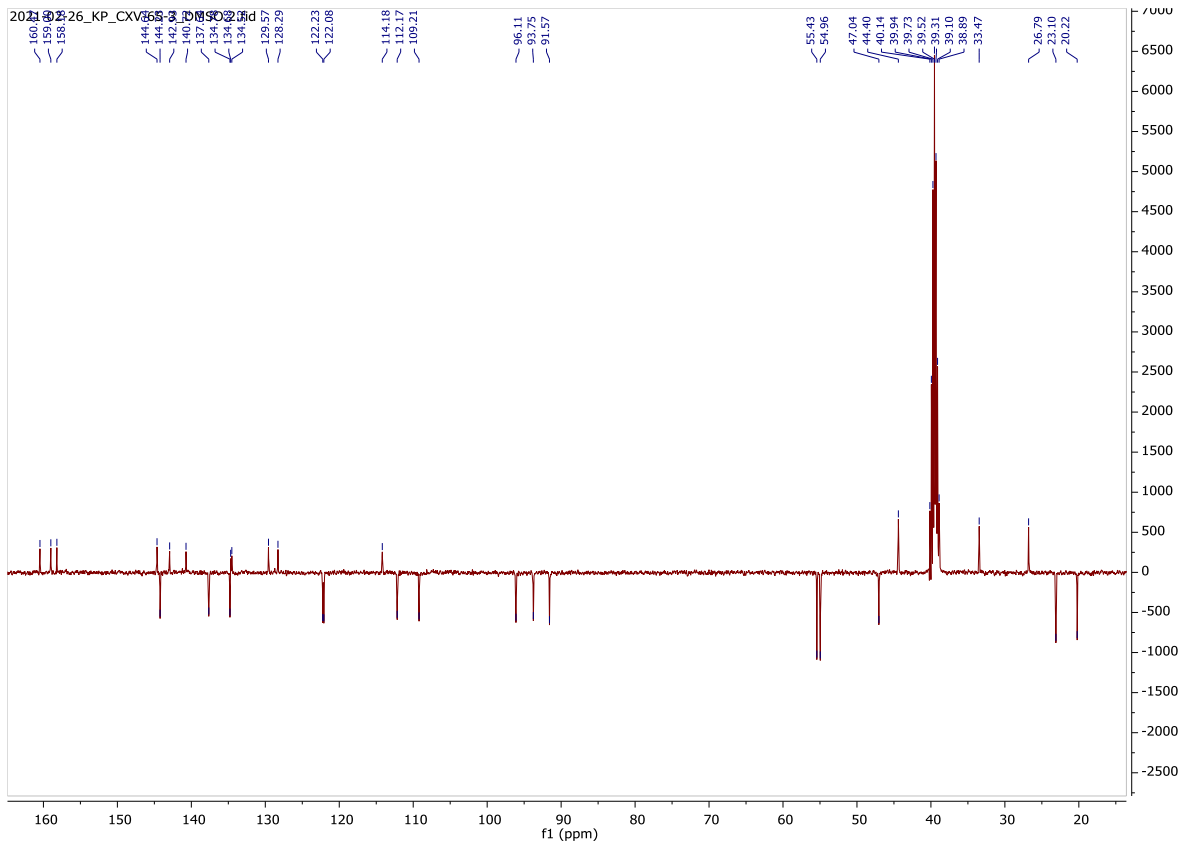


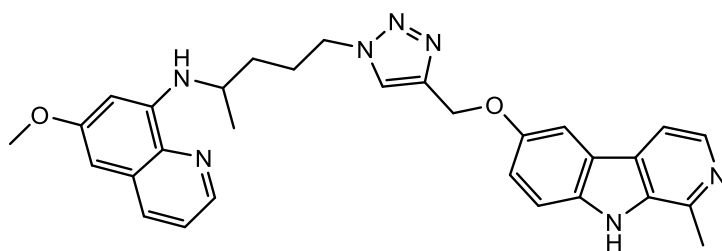




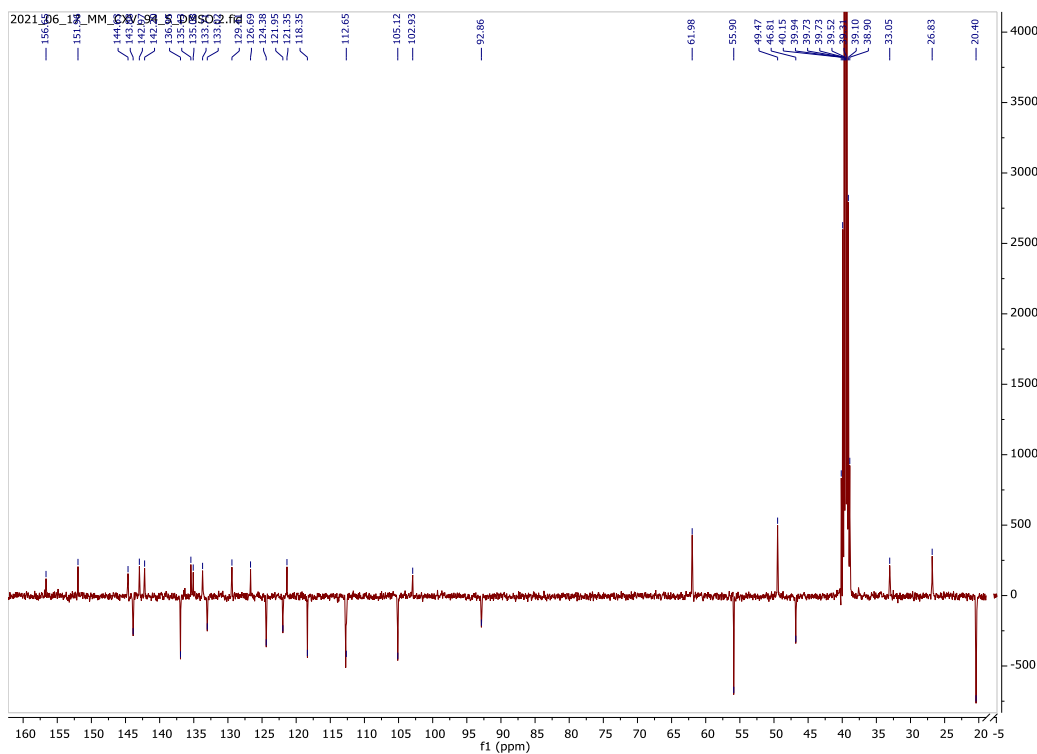
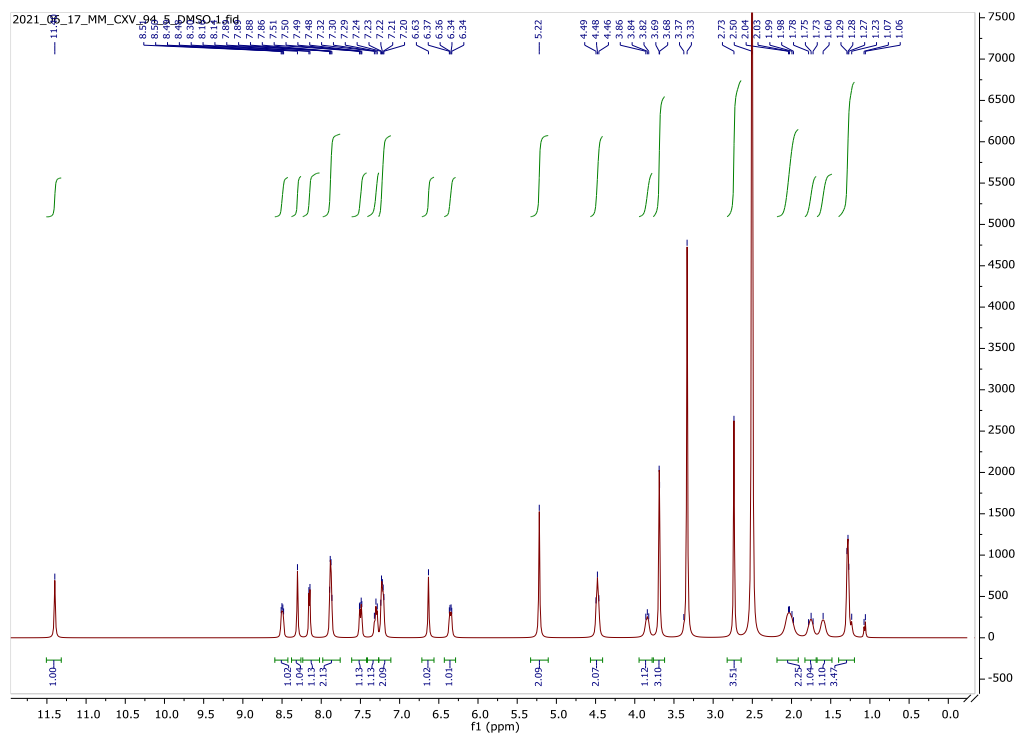
13



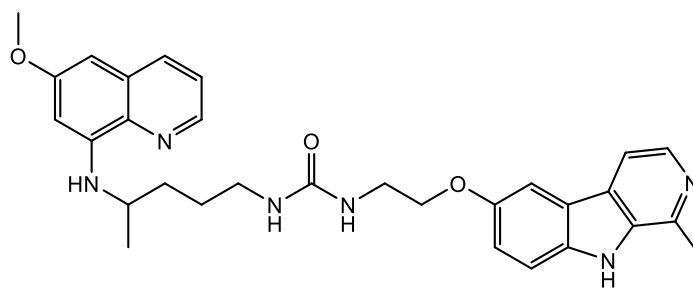




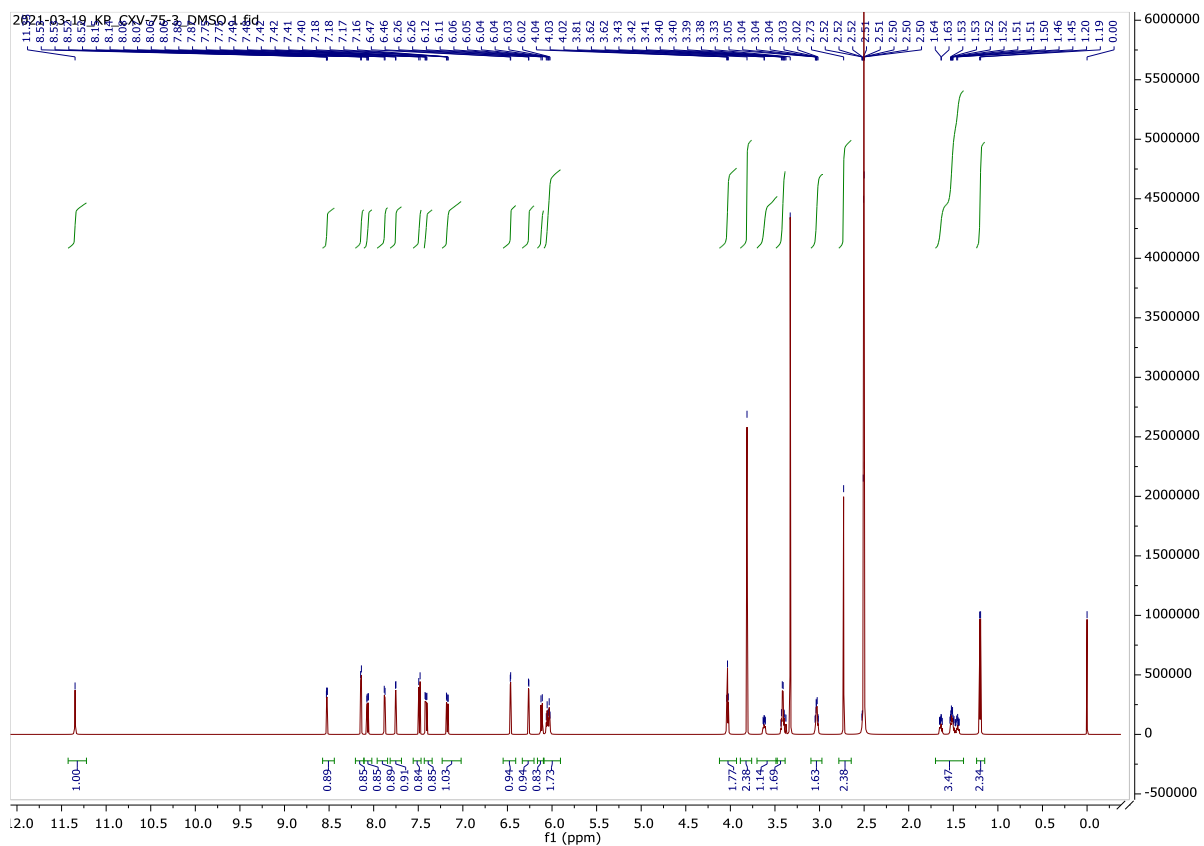
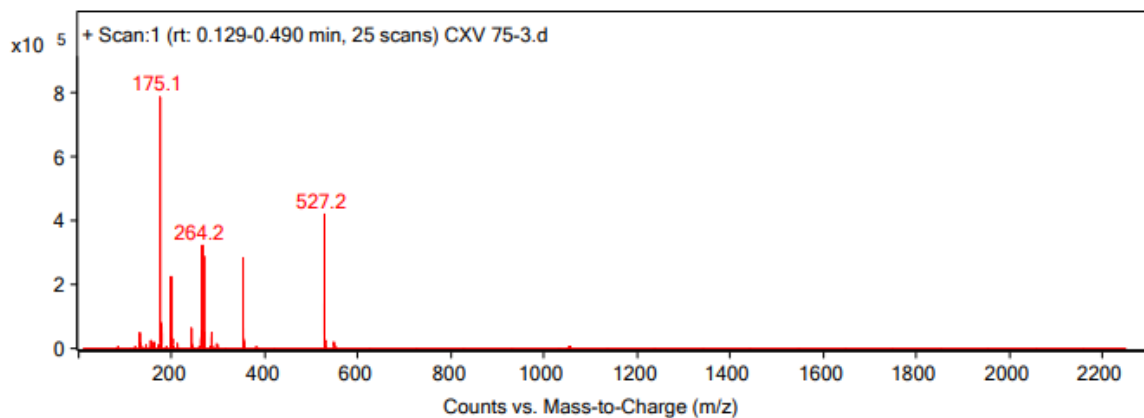
20

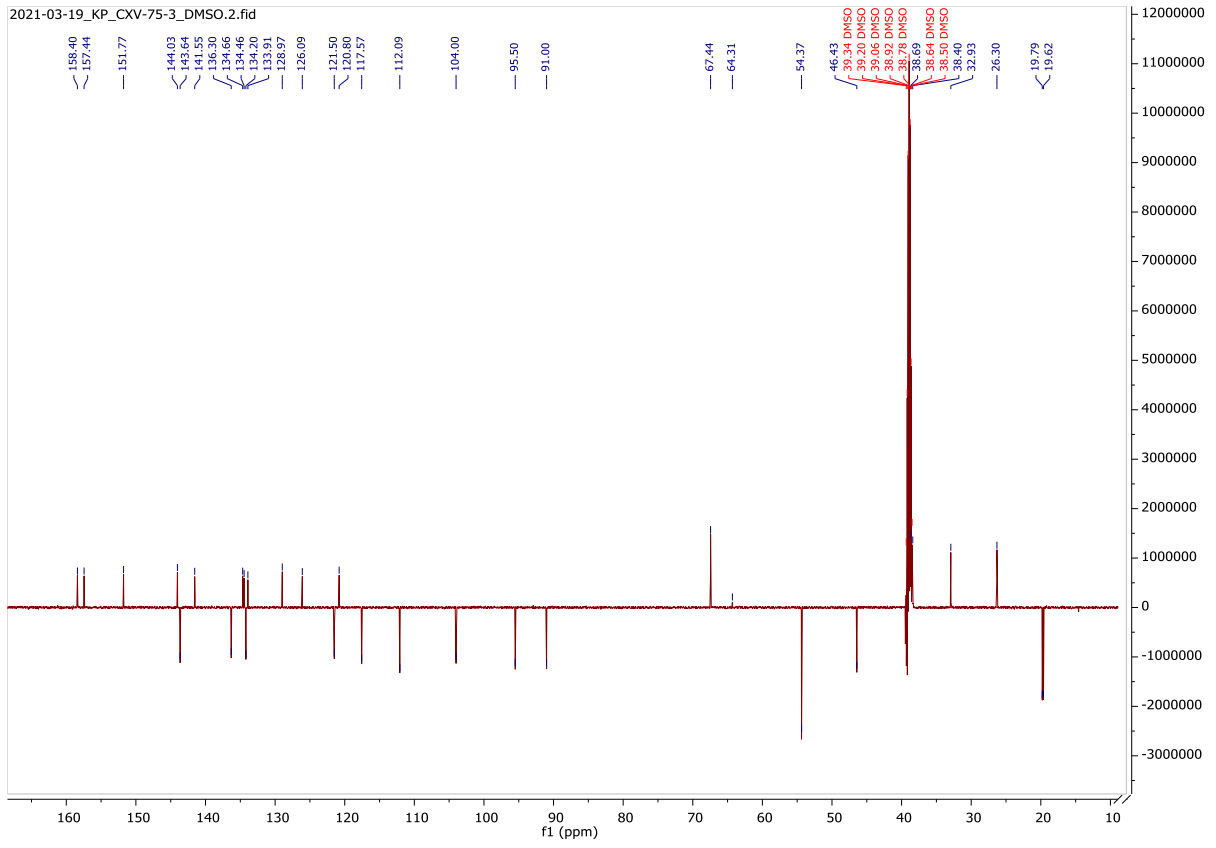


86



21





## **11.ŽIVOTOPISI**



Ivana Vrdoljak rođena je 27. 9. 1996. godine u Splitu. Opću gimnaziju Marko Marulić u Splitu završava 2015. godine s odličnim uspjehom. Iste godine upisuje Zdravstveno veleučilište – smjer medicinsko-laboratorijska dijagnostika koji uspješno završava 2018. godine obranom završnog rada na temu Patologija dojke – karcinom dojke. 2017. godine upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji godinu dana stavlja u mirovanje te s pohađanjem kreće 2018. godine, a sada je redovni student treće godine. Na drugoj godini studija postaje članom Udruge studenta farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA) te je bila demonstratorica na Zavodu za analitičku kemiju. Vođena mišlju kako život, pa tako i studiranje, čini više kockica spojenih u cjelinu, odlučila se priključiti znanstvenom istraživačkom timu na Zavodu za farmaceutsku kemiju. Smatra kako se radom na ovom istraživanju naučila kolegijalnosti, radu u znanosti te dobila kvalitetna saznanja o istraživanju lijekova kao jednom od dijelova farmacije.

Jakov Vuk rođen je 7. 2. 2000. godine u Čakovcu. 2018. završio je Gimnaziju Josipa Slavenskog Čakovec u Čakovcu, s odličnim uspjehom. Iste godine upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te je sada odličan student treće godine. Na početku studija postaje članom Sportske udruge i Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA) u sklopu koje sudjeluje u aktivnostima i događanjima udruge. 2020./21. biva nagrađen Dekanovom pohvalom za najbolji uspjeh na drugoj godini studiranja te biva pobjednikom Natjecanja u konzultacijskim vještinama (PCE). Iste se godine priključuje izradi ovog rada zbog zainteresiranosti za znanost, istraživanje te sintezu i karakterizaciju novih lijekova. Poticaj da bude dio istraživačkog tima na Zavodu za farmaceutsku kemiju bili su mu želja za stjecanjem novih vještina, iskustava i znanja u području sinteza novih lijekova.