

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Josip Rešetar

**Sinteza i karakterizacija harmizinina triazolskog tipa, hibridnih spojeva  
harmina i artemizinina**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Zrinke Rajić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

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



## KRATICE

8505C – humana stanična linija anaplastičnog karcinoma štitne žlijezde

8505Cr – humana stanična linija anaplastičnog karcinoma štitne žlijezde

A172 – humana stanična linija glioblastoma

A549 – humana stanična linija karcinoma pluća

A549 cisR – humana stanična linija karcinoma pluća rezistentna na cisplatin

ADMA – acetaldehid dimetil acetal

B16 – humana stanična linija melanoma

Bel7402 – humana stanična linija karcinoma jetre

Boc – 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)etilna skupina

CLL – humana stanična linija kronične limfocitne leukemije

CuAAC – bakrom(I) katalizirana alkin-azid cikloadicija (engl. *copper(I) catalyzed alkyne azide cycloaddition*)

DCM – diklormetan

DLD1 – humana stanična linija kolorektalnog adenokarcinoma

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

HCT116 – humana stanična linija karcinoma debelog crijeva

HEK293 – humana stanična linija imortalnih embrionalnih stanica bubrega

HeLa – humana stanična linija humanih epitelnih stanica karcinoma vrata maternice

HepG2 – humana stanična linija karcinoma jetre

HER2 – receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*)

HT-29 – humana stanična linija karcinoma debelog crijeva

IR – infracrveno elektromagnetsko zračenje

ISA × HCl – hidrokloridna sol imidazol-1-sulfonil azida

KAT4 – humana stanična linija anaplastičnog karcinoma štitne žlijezde

KAT4r – humana stanična linija anaplastičnog karcinoma štitne žlijezde

L02 – humana stanična linija karcinoma jetre

MCF10 – humana stanična linija adenokarcinoma dojke

MCF7 – humana stanična linija adenokarcinoma dojke

MGC803 – humana stanična linija karcinoma želuca

MS – masena spektrometrija

NCIH460 – humana stanična linija ne-malih stanica karcinoma pluća

NFκB – nuklearni faktor kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

NO – dušikov monoksid

PC3 – humana stanična linija karcinoma prostate

*PfHsp90* – protein toplinskog šoka (engl. *heat shock protein*) 90 vrste *Plasmodium falciparum*

s.t. – sobna temperatura

SAR – odnos strukture i djelovanja (engl. *structure-activity relationship*)

SiHa – humana stanična linija karcinoma maternice

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

TEA – trietilamin

TFA – trifluoroctena kiselina

TLC – tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*)

TLR 9 – receptor nalik Toll-u 9 (engl. *Toll like receptor 9*)

TMS - trimetilsilan

TMSCl – trimetilsilil-klorid

$t_t$  – temperatura taljenja

U87 – humana stanična linija glioblastoma

U87MG – humana stanična linija glioblastoma

UV – ultraljubičasto zračenje (engl. *ultraviolet*)

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

*q.s.* – količina koja je dovoljna (lat. *quantum satis*)

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Zarazne i kronične nezarazne bolesti .....	2
1.2. Prenamjena lijekova .....	3
1.3. Antimalarici kao potencijalni citostatici .....	4
1.4. Artemizinin i njegovi derivati u terapiji malarije i raka.....	8
1.5. Harmin.....	11
1.6. Klik-kemija .....	13
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	15
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Sinteza 1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-ola (1).....	20
3.2. Sinteza <i>tert</i> -butil (2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)oksi)etil)karbamata (2)....	20
3.3. Sinteza 2-((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)oksi)etan-1-amina (3) .....	20
3.4. Sinteza 7-(2-azidoetoksi)-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (4).....	21
3.5. 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 (5) .....	21
3.6. Sinteza 2-(7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etan-1-amina (6) .....	21
3.7. Sinteza 9-(2-azidoetil)-7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (7).....	22
3.8. Sinteza 6-metoksi-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-2-ium 2,2,2- trifluoroacetata (8).....	22
3.9. Sinteza 6-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (9) .....	22
3.10. Sinteza <i>tert</i> -butil (2-(6-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etil)karbamata (10).....	22
3.11. Sinteza 2-(6-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-9-il)etan-1-amina (11) .....	23
3.12. Sinteza 9-(2-azidoetil)-6-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (12).....	23
3.13. Sinteza (3 <i>R</i> ,5 <i>aS</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,12 <i>aR</i> )-3,6,9-trimetil-10-(prop-2-in-1- iloksi)dekahidro-12 <i>H</i> -3,12-epoksi[1,2]dioksepinolo[4,3- <i>i</i> ]izokromena (13) .....	24

3.14. Sinteza harmizinina triazolskog tipa u položaju O-7: 1-Metil-7-(2-(4- (((3 <i>R</i> ,5 <i>aS</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,12 <i>aR</i> )-3,6,9-trimetildekahidro-12 <i>H</i> -3,12- epoksi[1,2]dioksepino[4,3- <i>i</i> ]izokromen-10-il)oksi)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1- il)etoksi)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol (14) .....	24
3.15. Sinteza harmizinina triazolskog tipa u položaju N-9 (15, 16) .....	25
3.15.1. 7-Metoksi-1-metil-9-(2-(4-(((3 <i>R</i> ,5 <i>aS</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,12 <i>aR</i> )-3,6,9- trimetildekahidro-12 <i>H</i> -3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3- <i>i</i> ]izokromen-10- il)oksi)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)etil)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol (15).....	25
3.15.2. 6-Metoksi-1-metil-9-(2-(4-(((3 <i>R</i> ,5 <i>aS</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,12 <i>aR</i> )-3,6,9- trimetildekahidro-12 <i>H</i> -3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3- <i>i</i> ]izokromen-10- il)oksi)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)etil)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol (16).....	26
4. <b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	27
5. <b>ZAKLJUČCI</b> .....	34
6. <b>ZAHVALE</b> .....	36
7. <b>POPIS LITERATURE</b> .....	38
8. <b>SAŽETAK</b> .....	44
9. <b>SUMMARY</b> .....	46
10. <b>PRILOZI</b> .....	48



## **1. UVOD**

## 1.1. Zarazne i kronične nezarazne bolesti

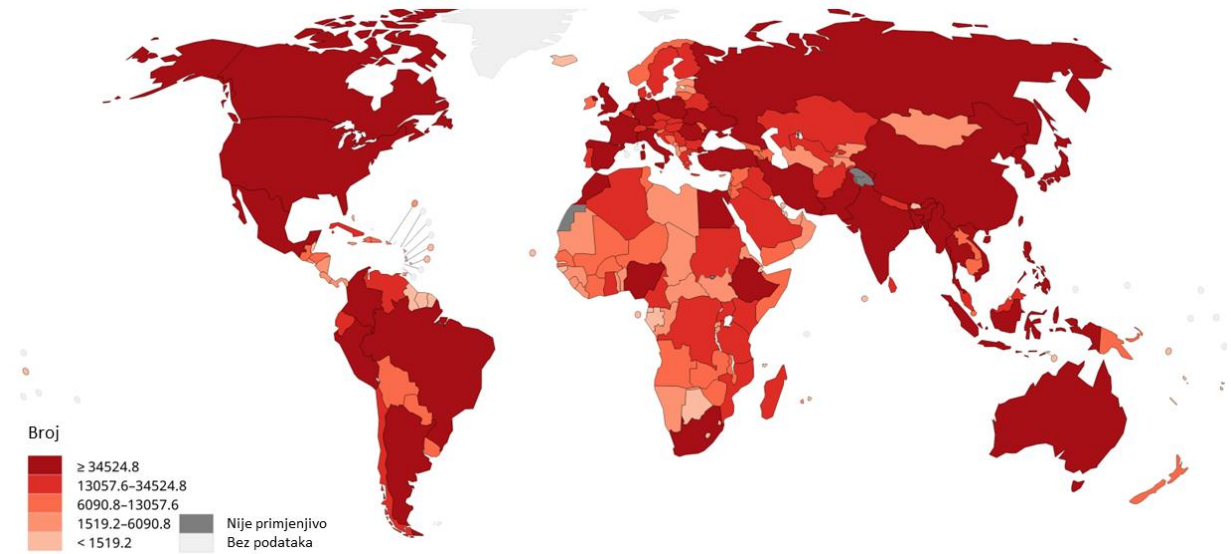
Zarazne ili infektivne bolesti su bolesti uzrokovane patogenima ili patogenim toksinima. Širenje zaraznih bolesti odvija se transmisijom preko zaražene osobe, životinje ili kontaminiranog neživog predmeta [1]. Iako su zarazne bolesti još prije 100 godina bile glavni uzročnik smrtnosti, smatra se da je napredak u njihovoj terapiji od 1950. godine do danas produžio očekivani životni vijek za 24 godine [2]. Bez obzira na to, dio zaraznih bolesti endemskog karaktera, poput malarije, tuberkuloze, denga groznice, leishmanijaze i shistosomijaze i dalje predstavlja visoki javnozdravstveni rizik. Dodatan problem predstavlja i sve manja učinkovitost lijekova koji su doprinijeli značajnom smanjenju smrtnosti od infektivnih bolesti u drugoj polovici 20. stoljeća. Zbog antimikrobne rezistencije Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je 2018. godine izdala prioritetni popis mikroorganizama prema kojima je potrebno usmjeriti daljnji razvoj lijekova [3]. Osim tuberkuloze, od koje prema procjenama SZO godišnje umre preko 1,5 milijun svjetske populacije [4], sve veći izazov postaje i liječenje malarije, bolesti uzrokovane multirezistentnim parazitima roda *Plasmodium* [5]. Tijekom 2020. godine od posljedica malarije preminulo je 627 000 tisuća osoba, pretežito u područjima tropske i subtropske Afrike [6].

Za razliku od zaraznih bolesti, kronične nezarazne bolesti imaju nešto duži tijek i nastaju kao rezultat kombinacije genetskih, fizioloških, okolišnih i ponašajnih čimbenika [7]. Glavne skupine kroničnih nezaraznih bolesti uključuju kardiovaskularne bolesti, rak, kronične respiratorne bolesti i dijabetes. Iako se većina bolesti iz navedenih skupina može prevenirati, najveće terapijske izazove zbog heterogene prirode bolesti predstavlja liječenje raka [8].

Rak je zajednički naziv za skup malignih bolesti karakteriziranih nekontroliranim rastom i razmnožavanjem stanica u različitim tkivima i organima. Glavni problem raka proizlazi iz njegove invazivnosti - abnormalne stanice izravno napadaju okolna tkiva ili u udaljena tkiva metastaziraju putem krvotoka i limfnog sustava [9]. Suprotno normalnim stanicama, karcinogene stanice rastu i bez podražaja za rast, izbjegavaju proces programirane stanične smrti, stvaraju nove krvne žile, akumuliraju genetske pogreške i zaobilaze uništenje djelovanjem imunskog sustava [9].

Prema podacima SZO rak je drugi po učestalosti uzročnik smrti u svijetu koji je u 2020. godini odnio 10 milijuna života [10]. Smrtnost od raka je različita u različitim dijelovima svijeta (Slika 1). Pretpostavlja se da razvijene zemlje i zemlje u razvoju bilježe veće stope smrtnosti zbog duljeg očekivanog životnog vijeka i veće prevalencije rizičnih čimbenika poput pušenja,

prekomjerne tjelesne mase, neadekvatne prehrane te izloženosti okolišnim ksenobioticima povezanim s urbanizacijom [11].



**Slika 1.** Procijenjena smrtnost od svih oblika raka u 2020. godini (prilagođeno prema [12])

Liječenje raka ovisi o njegovom tipu, lokalizaciji i uznapredovalosti. Obično uključuje kombinaciju kirurškog, kemoterapijskog i radioterapijskog liječenja [13]. Kod pojedinih tipova raka kod kojih trenutno ne postoji zadovoljavajuća terapijska opcija, jedan od pristupa može biti i eksperimentalno liječenje unutar kontroliranih kliničkih studija. Unatoč sve većem napretku u liječenju raka, problemi nedovoljne selektivnosti, izražene toksičnosti i rezistencije malignih stanica na citostatike su i dalje prisutni [14]. Navedeni problemi nedvojbeno ukazuju na povećanu potrebu razvoja selektivnijih i manje toksičnih protutumorskih lijekova [15].

## 1.2. Prenamjena lijekova

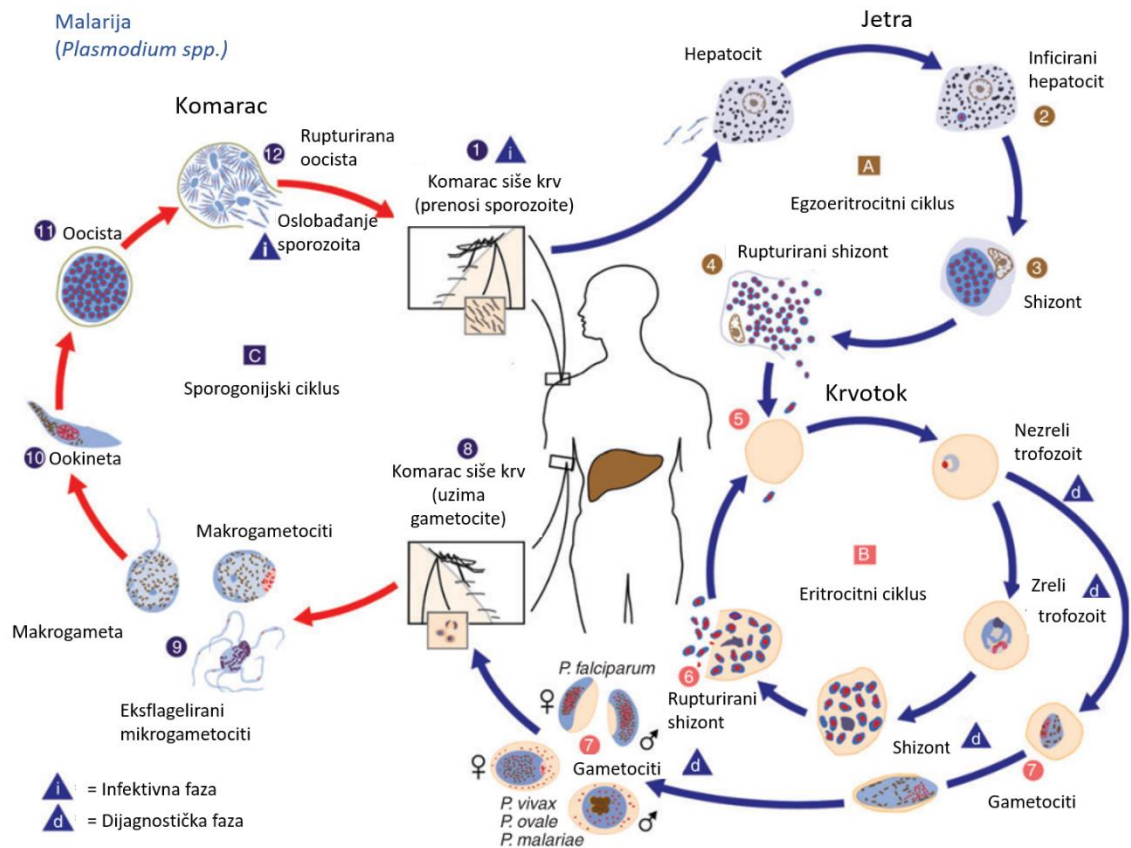
Proces razvoja novog lijeka izrazito je skup i vremenski zahtjevan pothvat [16]. S ciljem smanjenja troškova i ubrzanja razvoja novog lijeka, znanstvenici sve češće koriste prenamjenu postojećih lijekova kao alternativnu strategiju razvoja [16]. Relativno veliki broj spojeva koji nije prošao završne faze kliničkih ispitivanja može poslužiti kao spoj uzor za dizajniranje novih lijekova. Budući da su ti lijekovi već prošli fazu ispitivanja sigurnosnog profila, izravno mogu ući u drugu fazu kliničkih ispitivanja - fazu ispitivanja učinkovitosti. Time se troškovi razvoja novog lijeka smanjuju s prosječnih 1–2 milijarde na 300 milijuna američkih dolara, dok se vrijeme razvoja smanjuje s 12–15 godina na prosječno 6,5 godina [17, 18].

Izvori spojeva za prenamjenu mogu biti knjižice spojeva u akademskoj zajednici ili industriji. Prilikom odabira spoja uzora prednost se daje spojevima koji su uspješno prošli prvu fazu kliničkih istraživanja i pritom zabilježili najmanji broj nuspojava. Prenamjena lijeka može se provoditi i s molekulama koje su već dugo u primjeni, a čiji su mehanizmi djelovanja relativno dobro opisani [16].

Većina istraživanja prenamjene lijekova ima za cilj razvoj novih citostatika. Razlog za to je dvojak - potrebe za razvojem novih citostatika sve su veće, dok su kriteriji regulatornih agencija prilikom registracije novih protutumorskih lijekova blaži u odnosu na druge skupine lijekova. Lijekovi iz različitih skupina ispituju se kao potencijalni citostatici i kandidati strategije prenamjene lijekova. Interesantnu skupinu potencijalnih protutumorskih lijekova čine antimalarici, od kojih se neki trenutno nalaze u kliničkim ispitivanjima liječenja karcinoma [19]. Zbog mogućnosti smanjenja rezistencije karcinogenih stanica i sinergističkog djelovanja s konvencionalnim citostaticima, antimalarici i derivati antimalarika sve se češće spominju u kontekstu prenamjene u liječenju različitih oblika raka [20].

### **1.3. Antimalarici kao potencijalni citostatici**

Antimalarici su heterogena skupina spojeva koji se koriste u kemoprofilaksi i liječenju malarije. Mehanizmi djelovanja antimalarika ovise o razvojnom stadiju parazita (Slika 2), te se s obzirom na to dijele na: tkivne shizontocide, hipnozoitocide, krvne shizontocide, gametocide i sporontocide.



**Slika 2.** Životni ciklus plazmodija u komarcu roda *Anopheles* i u čovjeku (prilagođeno prema [21])

Tkivni shizontocidi djeluju na egzoeritocitnu fazu životnog ciklusa parazita čime spječavaju ulazak parazita u sistemsku cirkulaciju. Hipnozoitocidi djeluju na dormantne oblike vrsta *P. vivax* i *P. ovale* u jetri, hipnozoite. Krvni shizontocidi djeluju na eritrocitnu fazu životnog ciklusa parazita u kojoj merozoiti, nakon razaranja hepatocita, ulaze u krvotok i inficiraju eritrocite. Gametocidi spječavaju daljnje prenošenje bolesti na način da uništavaju gamete plazmodija neophodne za prijenos putem komarca, dok sporontocidi djeluju na sporozoite koje komarac prenosi u čovjeka prilikom uboda [22].

Antimalarike je, osim prema mehanizmu djelovanja, moguće podijeliti i prema kemijskoj strukturi na: 4-supstituirane kinoline, 8-aminokinoline, bigvanide, diaminopirimidine, artemizinine te ostale lijekove. Podjela lijekova prema kemijskoj strukturi uz pripadajući mehanizam antimalarijskog djelovanja i kliničku primjenu prikazana je u tablici 1.

**Tablica 1.** Podjela antimalarika prema kemijskoj strukturi uz predloženi mehanizam djelovanja i kliničku primjenu [22].

Skupina lijekova	Lijekovi	Meta (stadij plazmodija)	Mehanizam djelovanja	Klinička primjena
4-supstituirani kinolini	Kinin, klorokin, amodiakin, meflokin	Krvni shizonti	Blokiranje detoksikacijskog procesa polimerizacije hema u hemozoin	Liječenje i kemoprofilaksa
8-aminokinolini	Primakin, tafenokin	Tkivni shizonti, hipnozoiti, gamete	Generiranje toksičnih metabolita i reaktivnih kisikovih vrsta u plazmodiju	Liječenje i terminalna kemoprofilaksa vrstama <i>P. ovale</i> i <i>P. vivax</i> (uvijek u kombinaciji s klorokinom)
Bigvanidi	Progvanil*	Krvni shizonti	Inhibicija dihidrofolat reduktaze	Liječenje i kemoprofilaksa
Diaminopirimidini	Pirimetamin**	Krvni shizonti	Inhibicija dihidrofolat reduktaze	Liječenje i kemoprofilaksa
Artemizinin	Artemizinin, artemeter, Na-artezunat	Krvni shizonti, gamete	U reakciji s fero-ionima pucanje endoperoksidnog mosta, nastajanje slobodnih radikala, alkilacija hema, oksidativno oštećenje membrane	Liječenje najtežih oblika malarije (u kombinaciji s krvnim shizontocidima različitih mehanizama djelovanja)
Ostali lijekovi	Halofantrin, doksiciklin	Krvni shizonti	Inhibicija hem polimeraze i vakuolarne degradacije (halofantrin), inhibicija sinteze mitohondrijskih proteina (doksiciklin)	Liječenje klorokin-rezistentnih parazita <i>P. falciparum</i> (halofantrin), liječenje i kemoprofilaksa (doksiciklin)

\* Progvanil se uvijek primjenjuje u kombinaciji s atovakvonom (inhibitor dihidropteroat sintetaze)

\*\* Pirimetamin se uvijek primjenjuje u kombinaciji s sulfadoksinom (inhibitor dihidropteroat sintetaze)

Brojna istraživanja su pokazala da pojedini lijekovi namijenjeni liječenju malarije posjeduju protutumorska svojstva, te se stoga istražuje mogućnost njihove prenamjene za liječenje raka [23]. Većina antimalarika samostalno pokazuje dobar protutumorski učinak na

različite stanične linije karcinoma [24–26], a dio njih pokazuje i sinergistički učinak s konvencionalnim kemoterapeuticima [27–31].

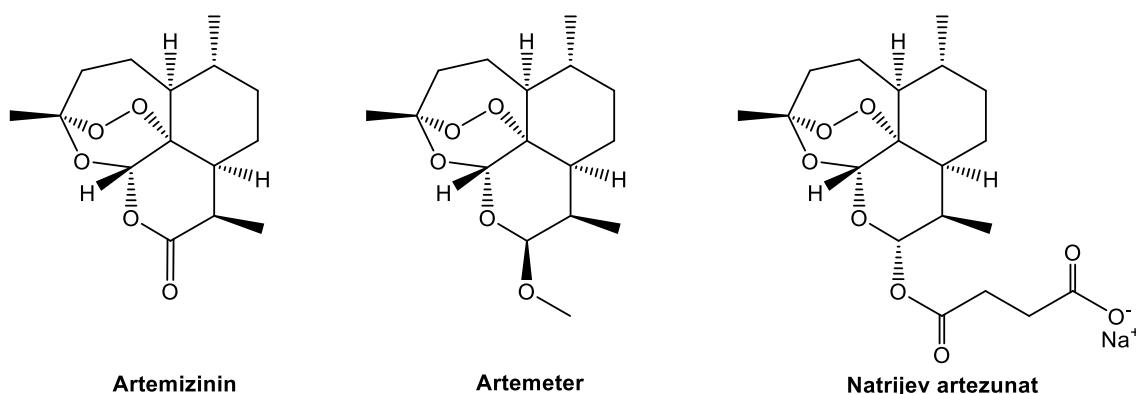
Das i sur. su ispitivali protutumorski učinak meflokina, atovakvona, primakina i tafenokina na humanoj staničnoj liniji kronične limfocitne leukemije (CLL). Meflokin i tafenokin pokazali su najizraženija protutumorska svojstva, a predloženi mehanizam djelovanja bio je lizosomalna apoptoza [24]. Meflokin je pokazao potentan protutumorski učinak i na humanoj staničnoj liniji karcinoma prostate (PC3), gdje je njegova primjena bila povezana s izraženijom neapoptotičkom staničnom smrću PC3 stanica uz povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta [25]. Povećana stimulacija Toll-like receptora 9 (TLR 9) pronađena je kod različitih visoko invazivnih staničnih linija karcinoma. Budući da klorokin djeluje kao nespecifični inhibitor TLR 9, znanstvena skupina Zhang i sur. odlučila je ispitati protutumorski učinak meflokina na humanoj staničnoj liniji karcinoma želuca (MGC803). Rezultati su pokazali da je primjena meflokina smanjila mogućnost nastanka novih metastaza inhibicijom TLR 9/NF $\kappa$ B signalnog puta [26].

Rezistencija na postojeće citostatske lijekove predstavlja sve veći problem u liječenju raka. Vođeni ovom činjenicom, znanstvenici su pokušali ispitati može li kombiniranje postojećih citostatika i antimalarika rezultirati sinergističkim protutumorskim učinkom. Duarte i Vale su ispitali citotoksični učinak različitih kombinacija antimalarika (meflokin, artezumat i klorokin) i konvencionalnih citostatika (doksorubicin i paklitaksel) na humanu staničnu liniju adenokarcinoma dojke (MCF7). Primjenjeni u kombinaciji, gotovo svi antimalarici su ostvarili veći protutumorski učinak u odnosu na samostalno primijenjeni paklitaksel i doksorubicin. Dodatno, kombinacija meflokina i doksorubicina zabilježila je najveći citotoksični učinak, a kombinacija artezunata i doksorubicina najveći sinergistički učinak [27]. Artezumat, derivat artemizina, i u brojnim je drugim istraživanjima na humanim staničnim linijama pokazao obećavajuća protutumorska svojstva što je pokrenulo istraživanje njegovog sinergističkog djelovanja i s drugim kemoterapeuticima. Tako je artezumat u kombinaciji s temozolomidom poboljšao antiproliferativni učinak na humanim staničnim linijama glioblastoma (U87MG i A172) [28], u kombinaciji s cisplatinom povećao uspješnost DNA lomova i inhibirao proliferaciju humanih staničnih linija ovarija [29], a u kombinaciji s doksorubicinom doprinio učinkovitijoj apoptozi humanih staničnih linija anaplastičnog karcinoma štitne žlijezde (8505C, 8505Cr, KAT4r i KAT4) [30]. Dihidroartemizinin, kao i artezumat, u kombinaciji s konvencionalnim kemoterapeuticima je poboljšao protutumorski učinak na nizu humanih tumorskih staničnih linija (ovarij, pluća, dojka, gušterača, jetra) [31].

#### 1.4. Artemizinin i njegovi derivati u terapiji malarije i raka

Artemizinin je seskviterpenski trioksanski lakton izoliran iz biljke *Artemisia annua* L. Nakon kinina, riječ je o drugom po redu prirodnom produktu koji je uveden u terapiju liječenja malarije [32]. Mehanizam antimalarijskog djelovanja artemizinina još nije u potpunosti razjašnjen, međutim pretpostavlja se da ključnu ulogu ima endoperoksidni most prisutan u strukturi artemizinina. Naime, samo u stanicama inficiranim parazitom prisutni su slobodni  $\text{Fe}^{2+}$  ioni koji uzrokuju cijepanje endoperoksidnog mosta pri čemu nastaju slobodni radikali koji dovode do smrti stanice parazita [33].

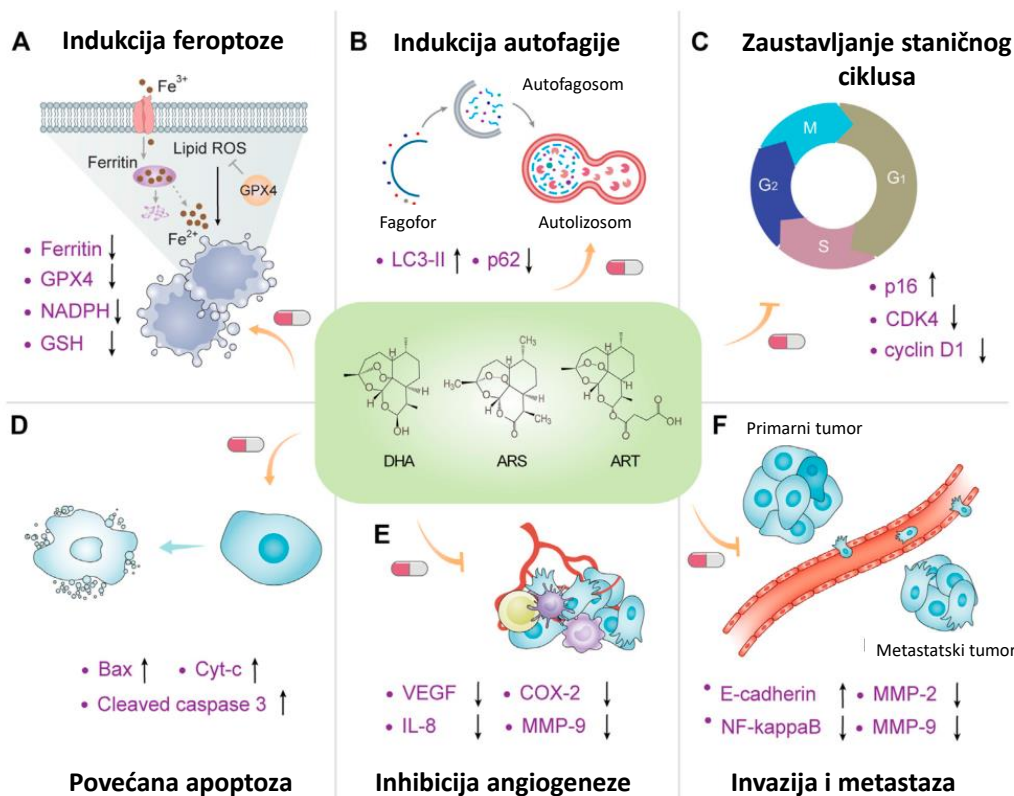
Artemizinin ima nisku peroralnu bioraspodivnost, kratko poluvrijeme života i podložan je iscrpnom metabolizmu prvog prolaska kroz jetru [34]. S ciljem poboljšanja farmakokinetičkih karakteristika sintetizirani su različiti derivati od kojih su danas u primjeni artezunat i artemeter (Slika 3).



Slika 3. Artemizinin i njegovi derivati

Osim antimalarijskog učinka, derivati artemizinina pokazuju snažan terapijski učinak i na niz drugih bolesti. Značajna protutumorska, antibakterijska, antivirusna i antifungalna aktivnost uočena je unutar brojnih *in vitro* i *in vivo* pokusa [35]. Protutumorski učinak artemizinina i derivata artemizinina ogleda se u indukciji aresta staničnog ciklusa, inicijaciji reaktivnim kisikovim vrstama potpomognute apoptoze, narušavanju lizosomalnog integriteta, inhibiciji angiogeneze te redukciji stanične proliferacije [23, 36].





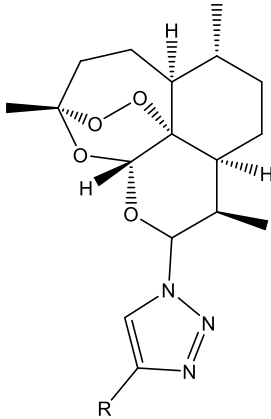
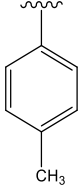
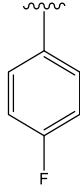
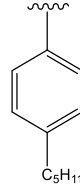
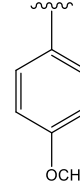
**Slika 4.** Predloženi mehanizmi protutumorskog djelovanja artemizininских derivata (DHA – dihidroartemizinin, ARS – artemizinin, ART – artezunat) (prilagođeno prema [36])

Polusintetski derivat artemizinina, artezunat, najbolji protutumorski učinak ostvaruje kod određenih tipova leukemija i limfoma B-stanica. Glavni mehanizmi protutumorskog djelovanja artezunata pretpostavljaju oštećenje nukleinskih kiselina i inhibiciju homologne rekombinacije što dovodi do smrti stanice raka [37]. Primjena artezunata pokazala se korisnom i kod kemorezistentnih karcinoma, osobito karcinoma debelog crijeva [38]. S druge strane, dihidroartemizinin je uspješno smanjio problem kemorezistencije kod multiplog mijeloma i karcinoma pluća Lewisovih stanica [39]. Dihidroartemizinin je pokazao i obećavajući učinak u liječenju agresivnog karcinoma dojke na način da je sinergistički djelovao s doksorubicinom (trostruko negativni karcinom dojke) i trastuzumabom (HER2+ karcinom dojke) [40]. Iako je većina dosadašnjih istraživanja proučavala artemizininске derivate s ciljem optimizacije postojećih kemoterapeutskih opcija, novija istraživanja otvaraju prostor dodatnim mogućnostima primjene. Budući da su artemizininски derivati relativno sigurne i dobro tolerirane molekule njihova primjena bi se mogla proširiti i na kemoprevenciju pojedinih oblika karcinoma [41].

Dodatna derivatizacija artemizinina i artemizininских derivata, preko različitih vrsta poveznica, u velikom je broju istraživanja dovela do poboljšanja protutumorskog učinka.

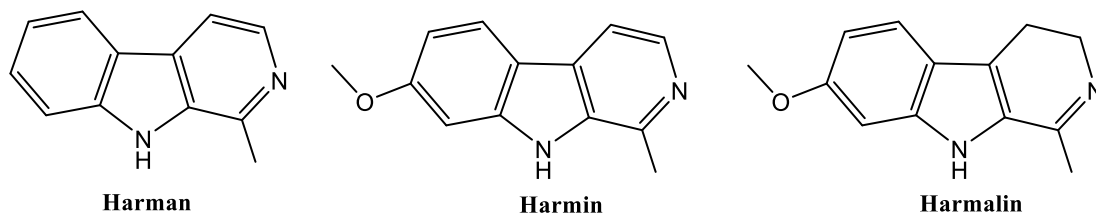
Primjerice, Hu i sur. su sintetizirali hibridne molekule dihidroartemizinin-indol i artezunat-imidazol koje su pokazale bolja citotoksična svojstva na humanim staničnim linijama karcinoma jetre (HepG2 i L02) i karcinoma dojke (MCF7) u odnosu na samostalno primjenjeni dihidroartemizinin i artezunat [42]. Hibridne molekule koje su imale poveznice s manjim brojem ugljikovih atoma ujedno su imale i izraženija protutumorska svojstva. U istraživanju Tian i sur. sintetizirani su derivati dihidroartemizinin-kumarina s različitom dužinom poveznica koje su uključivale 1,2,3-triazole [43], dok su Yu i sur. sintetizirali hibride dihidroartemizinina i kumarina, ali bez triazolske poveznice [44]. Obje skupine hibridnih molekula pokazale su najbolji protutumorski učinak na humanu staničnu liniju karcinoma debelog crijeva (HT29), uz dodatak da je učinak bio nešto bolji kod spojeva s triazolskom poveznicom [45]. Sinteza novih derivata artemizinina s triazolskom poveznicom je i na nizu drugih staničnih linija rezultirala poboljšanim citotoksičnim svojstvima (Tablica 2) [46].

**Tablica 2.** Triazolski derivati artemizinina i njihovo protutumorsko djelovanje.

<b>Opća formula</b>				
				
<b>R</b>				
<b>Djelovanje</b>	Najbolji citostatski učinak na HeLa i DLD1 stanične linije	Izraženo citostatsko djelovanje na DLD1 staničnu liniju	Snažno citostatsko djelovanje na stanične linije DLD1, U87, HeLa, SiHa, A172 i B16	Selektivno citostatsko djelovanje na staničnu liniju SiHa

## 1.5. Harmin

Harmin (7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*] indol) je  $\beta$ -karbolinski alkaloid izoliran iz sjemenki biljke *Peganum harmala* L. [47]. Okosnica  $\beta$ -karbolina sastoji se od tricikličkog prstenskog sustava u kojem je pirimidinski prsten povezan s indolom preko pirola. Osim harmina, do danas su izolirani i brojni drugi spojevi iz skupine harmala alkaloida (harman, harmalin) (Slika 5).



**Slika 5.**  $\beta$ -karbolinski harmala alkaloidi

Spektar bioloških učinaka  $\beta$ -karbolina doista je širok - uključuje protuupalno, neuroprotektivno, antidijabetičko, sedativno, antimikrobno, antiviralno, antiparazitarno i protutumorsko djelovanje [47, 48]. S obzirom da su obećavajući klinički rezultati uočeni prilikom primjene ovih spojeva u liječenju raka i malarije, harmala alkaloidi su još prije 25 godina identificirani kao dobri spojevi uzori za razvoj novih antimalarika i citostatika [49].

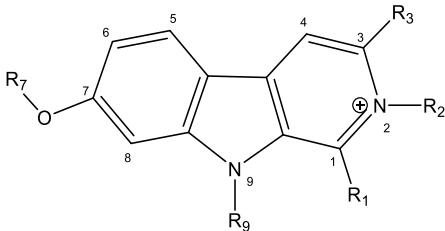
Pretpostavlja se da harmala alkaloidi antimalarijsko djelovanje ostvaruju inhibicijom ATP-vezujuće domene proteina toplinskog šoka 90 (engl. *heat shock protein 90*) vrste *P. falciparum* (*PfHsp90*) [50]. Riječ je o proteinu koji prvenstveno služi kao šaperon (protein koji osigurava pravilno smatanje polipeptidnog lanca). Dodatno, *PfHsp90* omogućuje regulaciju toplinskog šoka te svojom aktivnošću pojačava patogenost i otpornost parazita na lijekove [51, 52]. Upravo zato, inhibicija *PfHsp90* mogla bi dovesti do smanjenja rezistencije parazita na antimalarike.

Točan mehanizam protutumorskog djelovanja harmala alkaloida nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da harmala alkaloidi protutumorski učinak ostvaruju sinergističkim i simultanim djelovanjem na više staničnih meta: vežu se za DNA i oštećuju je, interferiraju sa sintezom i replikacijom DNA, inhibiraju DNA topoizomerase, inhibiraju različite vrste kinaza (ciklin ovisne kinaze, dualno-specifične tirozinom regulirane kinaze i haspin kinaze) te inhibiraju proces angiogeneze (snižavanje koncentracije vaskularnog entotelnog faktora rasta

(VEGF), receptora za VEGF, dušikova monoksida (NO) i drugih angiogenetskih čimbenika) [47].

Od mnogobrojnih harmala alkaloida harmin se smatra najaktivnijim  $\beta$ -karbolinom. U svrhu toga provedena su brojna istraživanja u kojima su varirani supstituenti s ciljem dobivanja poboljšanih farmakodinamičkih i farmakokinetičkih karakteristika. Ispitivanjem odnosa strukture i djelovanja, odnosno SAR-a (engl. *structure-activity relationship*), sintetiziranih derivata harmina došlo se do zaključka kako pojedini supstituenti utječu na promatrane farmakološke parametre (Tablica 3) [47].

**Tablica 3.** Modifikacije harmina koje dovode do boljeg i selektivnijeg antitumorskog učinka.

<b>Kemijska struktura harmina</b>		
		
Položaj	Supstituent	Djelovanje
1	4-metoksifenil	↑antiproliferativni učinak ↑selektivnost prema histonskim deacetilazama
2	benzil	↑citotoksičnost ↑antitumorski potencijal
3	formijat	↓neurotoksičnost
7	voluminozna alkoksi skupina (umjesto metoksi)	↓neurotoksičnost
9	alkil i/ili aril-alkil	↑antitumorska aktivnost ↑afinitet za DNA i topoizomerazu I

Osim variranja supstituenata na različitim položajima  $\beta$ -karbolinskog prstena, u zadnjih nekoliko godina sintetizirani su i brojni  $\beta$ -karbolinski derivati čiji je protutumorski potencijal ispitan u *in vitro* studijama. Samo neki od farmakofora kojima je derivatizirana  $\beta$ -karbolinska jezgra uključuju ditiokarbamat, hidroksamsku kiselinu, salicilnu kiselinu, kalkon, cinamid, tiazolidindion, piperazin i triazol. Štoviše,  $\beta$ -karbolini su derivatizirani i s poznatim spojevima, koji pokazuju citostatsko djelovanje, poput podofilotoksina i kombretastatina. Glavnina dobivenih derivata ne samo da je ostvarila izvrstan protutumorski učinak, već je pružila i zadovoljavajuću selektivnost prema tumorskim stanicama [53].

Dizajniranje potencijalnih citostatika s  $\beta$ -karbolinskom jezgrom prošireno je i na bioorganometalnu kemiju. Racionalni razvoj organometalnih protutumorskih terapeutika počiva na mehanizmu djelovanja metalirajućeg citostatika cisplatina - interkalacija u DNA molekulu putem reaktivnih kationa, unutarlančano poprečno povezivanje te inhibicija transkripcije s posljedičnom indukcijom apoptoze. Na tragu toga, sintetizirani su  $\beta$ -karbolinski kompleksi s rutenijem(II) i iridijem(III). Kompleksi s rutenijem(III), u odnosu na cisplatin, pokazali su se učinkovitijim na nizu humanih tumorskih staničnih linija (MCF7, MCF10, NC1H460, A549, HepG2, Bel7402, L02, HeLa, HCT116 i HEK293). S druge strane, kompleksi s iridijem(III) su na dugom panelu humanih tumorskih staničnih linija (A549, A549 cisR, HepG2, HeLa, L02) ostvarili bolji antiproliferativni učinak u odnosu na cisplatin kao standard [54].

Unatoč obećavajućim rezultatima *in vitro* studija sintetiziranih  $\beta$ -karbolinskih hibrida i kompleksa, protutumorski učinak navedenih spojeva potrebno je potvrditi i u *in vivo* pokusima. Pored ispitivanja sigurnosti i učinkovitosti, *in vivo* pokusi bi ubrzali identifikaciju derivata koji bi mogli poslužiti kao spojevi uzori za razvoj budućih citostatika s  $\beta$ -karbolinskom jezgrom.

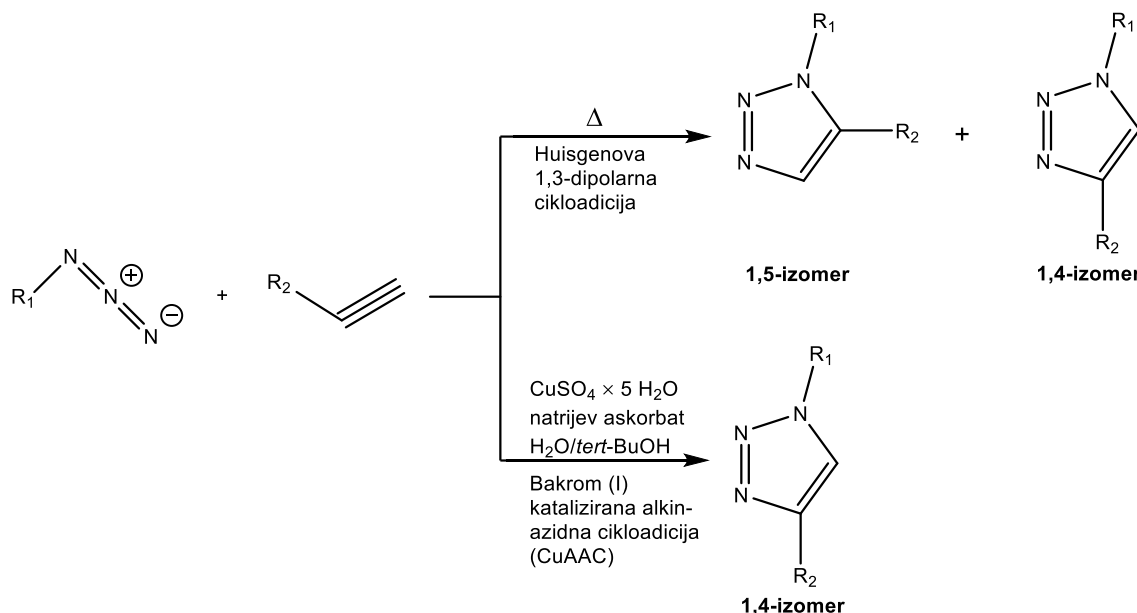
## 1.6. Klik-kemija

Brojne biljne vrste mogu sintetizirati kompleksne bioaktivne molekula na prilično jednostavan način, uz prisutnost vode i kisika. Upravo ta činjenica bila je povod za razvoj novog smjera farmaceutske kemije u kojem glavno pravilo glasi da sva istraživanja trebaju biti ograničena na molekule koje se mogu lako sintetizirati. Novi kemijski koncept unutar kojeg, po uzoru na biosintetske reakcije, dolazi do brze reakcije između ugljikovih atoma dviju molekulskih vrsta preko heteroatomske poveznice (C-X-C) nazvan je klik-kemijom.

Termin klik-kemije uveo je 1998. godine američki kemičar i nobelovac Karl Barry Sharpless, a riječ je o bakrom(I) kataliziranoj alkin-azid cikloadiciji (engl. *copper(I) catalyzed alkyne azide cycloaddition*, CuAAC) [55]. Da bi reakcija zadovoljila koncept klik-kemije ona mora biti stereospecifična, modularna, visokih prinosa i s neškodljivim nusproduktima koji mogu biti jednostavno uklonjeni nekromatografskim tehnikama. Reagensi uključeni u reakcije trebaju biti lako dostupni, otapala neškodljiva i lako uklonjiva, reakcijski uvjeti blagi (neosjetljivost na kisik i vodu), a izolacija spoja jednostavna. Pročišćeni produkt mora biti stabilan pri fiziološkim uvjetima [56].

Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija bila je preteča klik-reakcija kakve poznajemo danas. Cikloadicijom terminalnih alkina i azida pri povišenoj temperaturi, kroz 10–48 sati,

dobiva se smjesa 1,4- i 1,5-triazola. Nastanak smjese izomera, dugo vrijeme reakcije te korištenje povišenih temperatura bili su glavni nedostaci Huisgenove cikloadicije. Uvođenjem bakrovih(I) iona kao katalizatora već pri sobnoj temperaturi i znatno kraćem vremenu, ostvarena je sinteza regioselektivnih 1,4-triazola što je zadovoljilo glavne kriterije klik-kemije [55] (Shema 1).



**Shema 1.** Usporedba Huisgenove cikloadicije i CuAAC (klik-reakcija)

Standardni katalitički CuAAC sustav obično uključuje bakrove(II) soli (bakrov(II) sulfat pentahidrat ili bakrov(II) acetat)) koje se *in situ*, u suvišku reducirajućeg sredstva (natrijev askorbat), neprestano prevode do bakrovih(I) iona. U reakciji se kao otapalo najčešće koristi smjesa *tert*-butanola i vode. Organska otapala kao što su tetrahidrofuran i 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 [57].

Uvođenje triazolskog strukturnog elementa klik-kemijom često dovodi do poboljšanja biološkog učinka derivata koji ga u strukturi sadrže. Razlog poboljšanja proizlazi iz same strukture triazola. Naime, zbog jakog dipolnog momenta (5,2–5,6 Debye) triazoli mogu formirati vodikove veze te sudjelovati u dipol-dipol i  $\pi$ - $\pi$  interakcijama. Ovo svojstvo omogućuje triazolima dobru topljivost, ali i vezanje na brojne biološke mete. Vrlo su otporni na metaboličku i kemijsku razgradnju što dodatno doprinosi stabilnosti lijekova koje imaju triazol u svojoj strukturi [58, 59]. Navedena svojstva primjenjuju se pri optimiranju farmakoloških svojstava novih lijekova bilo da dovode do jačanja djelovanja ili smanjenja toksičnosti [60], 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**

Cilj ovog istraživačkog rada je primjenom principa molekulske hibridizacije sintetizirati i karakterizirati nove hibridne spojeve harmina i artemizinina, s triazolom kao poveznicom, odnosno harmizinine triazolskog tipa, koji bi imali potencijalno protutumorsko i/ili antimalarijsko djelovanje. Molekulska hibridizacija omogućava povezivanje dvaju ili više fragmenata u jedinstvenu molekulu koja pokazuje poboljšana farmakokinetička, farmakodinamička ili biološka svojstva u odnosu na roditeljske molekule. Nadalje, molekulskom hibridizacijom moguće je dobiti spojeve jačeg djelovanja, povećane selektivnosti i s manjim brojem nuspojava [61].

1,2,3-Triazolski prsten korišten je kao poveznica dvaju fragmenata, a u strukturu hibrida uveden je Cu(I) kataliziranom alkin-azid cikloadicijom (klik-reakcijom). Odabran je zbog dobre kemijske i biološke stabilnosti kao i niza korisnih interakcija koje ostvaruje s ciljanim biološkim metama (enzimima i receptorima) [60].

U daljnjim istraživanjima, koja nadilaze okvire ovog rada, ispitat će se protutumorsko i antimalarijsko 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.

IR spektri snimljeni su na FT-IR Spectrometer Spectrum Two spektrometru (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD).

$^1\text{H}$  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, SAD). 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, SAD). 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/metanol (1:1:0,5) te diklormetan/metanol (8:1). Mrlje su vizualizirane kratkovalnim UV svjetlom ( $\lambda = 254$  i 360 nm), parama joda i lužnatom otopinom  $\text{KMnO}_4$ .

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 u TLC-u.

Reakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem provedena je u mikrovalnom reaktoru CEM Discover 2.0 (CEM, SAD).

Harmin, glacijalna octena kiselina, acetaldehid dimetil acetal (ADMA), bezvodni metanol, 10 %-tni paladij na ugljenu, litijev karbonat, propargil alkohol i trimetilsilil klorid (TMSCI) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich, dihidroartemizina, cezijev karbonat, 5-metoksitriptamin, 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)etil bromid, trifluorocetna kiselina, trikloroacetonitril od tvrtke TCI (Njemačka), 47 %-tna bromovodična kiselina, natrijev azid i imidazol od tvrtke Merck (Njemačka), kalijev karbonat od tvrtke Kemika (Hrvatska), etil-acetat, metanol, dietil-eter, cikloheksan, acetonitril, koncentrirana klorovodična kiselina i tionil klorid od proizvođača Honeywell/Riedel-de Haën (Njemačka). Petroleter je nabavljen od proizvođača Carlo Erba reagents (Francuska), diklormetan od proizvođača Fisher Chemical (Belgija), natrijev askorbat i bezvodni etanol od tvrtke Acros organics (Belgija), bakrov(II)

sulfat pentahidrat od tvrtke Zorka Šabac (Srbija) i bezvodni natrijev sulfat od tvrtke Gram-mol (Hrvatska).

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

Hidrokloridna sol imidazol-1-sulfonil azida ( $\text{ISA} \times \text{HCl}$ ) pripravljena je prema poznatom propisu [62]. Sulfonilklorid i azid miješani su na s.t. tijekom 18 h nakon čega je u reakcijsku smjesu dodan imidazol. Nakon ekstrakcije etil-acetatom i zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata, dokapana je 1 M klorovodična kiselina do taloženja soli.

Spoj **1** pripremljen je prema radu Perković i sur. [63], spojevi **2**, **3**, **5** i **6** prema radu Marinović i sur. [64], spojevi **8** i **9** prema radu Eagon i Anderson [65], a spoj **13** prema radu Goswami i sur. [66].  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri, MS i IR, kao i  $t_r$ , navedeni su samo za nove spojeve, osim za azid **12**, čija je struktura potvrđena indirektno, prevođenjem u harmizinin **16** putem CuAAC.

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

Smjesa harmina (0,075 g, 0,351 mmol), glacijalne octene kiseline (1,5 mL) i 47 %-tne bromovodične kiseline (0,75 mL) miješani su 0,42 h na 140 °C u mikrovalnom reaktoru (P = 100 W). Reakcijska smjesa je razrijeđena vodom (25 mL) te je otopina zaljučena pomoću 5 %-tnog NaOH do pH 9. Produkt je ekstrahiran etil-acetatom (5 × 60 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltrirani. Otapalo je upareno je pod sniženim tlakom, a sirovi produkt **1** pročišćen rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: 0,057 g (81,9 %).

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

Suspenciji harmola **1** (0,402 g, 2,028 mmol) u suhom DMF-u (4 mL) zagrijanoj je na 95 °C dodan je cezijev karbonat (0,925 g, 2,839 mmol). Nakon 10 minuta u reakcijsku smjesu je dodan 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)etil bromid (1,091 g, 4,867 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na 95 °C tijekom 18 h. Potom je reakcijska smjesa razrijeđena vodom (50 mL), a produkt ekstrahiran etil-acetatom (3 × 40 mL). Organski slojevi su skupljeni, isprani vodom (2 x 50 mL), sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a sirovi produkt **2** pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5 i rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: 0,322 g (46,5 %).

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

U otopinu spoja **2** (0,322 g, 0,944 mmol) u metanolu (4 mL) dodana je 4 M klorovodična kiselina (0,944 mL, 3,776 mmol). Reakcijska smjesa grijana je na 50 °C tijekom 18 h, nakon čega je otapalo upareno pod sniženim tlakom. Ostatak nakon uparavanja otopljen je u vodi (30 mL) te je otopina zaljučena pomoću 5 %-tnog NaOH do pH 10. Produkt je ekstrahiran etil-acetatom (4 × 30 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a dobiveni bijeli talog amina **3** pročišćen rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: 0,201 g (88,2 %).

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

U suspenziju spoja **3** (0,189 g, 0,784 mmol) u bezvodnom metanolu (3 mL) dodan je kalijev karbonat (0,268 g, 1,936 mmol), bakrov(II) sulfat pentahidrat (*q.s.*, vrh špatule) i ISA × HCl (0,197 g, 0,941 mmol). Nakon 2 h otapalo je upareno pod sniženim tlakom, ostatak nakon uparavanja otopljen u vodi (15 mL) te je otopina zaljučena pomoću 5 %-tnog NaOH do pH 9. Produkt je ekstrahiran etil-acetatom (2 × 30 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a sirovi produkt **4** pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5.

Iskorištenje: 0,175 g (83,5 %).

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

Suspenziji harmina (0,595 g, 2,803 mmol) u suhom DMF-u (4 mL) zagrijanoj na 95 °C dodan je cezijev karbonat (3,927 g, 12,053 mmol). Nakon 10 minuta u reakcijsku smjesu je dodan 2-(*tert*-butoksikarbonilamino)etil bromid (2,513 g, 11,212 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na 95 °C tijekom 24 h. Potom je reakcijska smjesa razrijeđena vodom (50 mL) te je otopina zaljučena pomoću 5 %-tnog NaOH do pH 9. Produkt je ekstrahiran etil-acetatom (3 × 40 mL). Organski slojevi su skupljeni, isprani vodom (2 x 120 mL), sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a sirovi produkt **5** pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol 8:1 i rastrljavanjem u dietil- eteru.

Iskorištenje: 0,265 g (26,6 %).

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

Spoj **6** pripravljen je analogno pripremi spoja **3** (umjesto spoja **2**, reakcija je provedena sa spojem **5**).

Količina reaktanta: 0,336 g (0,944 mmol) spoja **5**.

Iskorištenje: 0,202 g (83,8 %).

### 3.7. Sinteza 9-(2-azidoetil)-7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indola (7)

Spoj 7 pripravljen je analogno pripremi spoja 4 (umjesto spoja 3, reakcija je provedena sa spojem 6).

Količina reaktanta: 0,200 g (0,784 mmol) spoja 6.

Iskorištenje: 0,116 g (52,7 %).

### 3.8. Sinteza 6-metoksi-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-*b*]indol-2-ium 2,2,2-trifluoroacetata (8)

Otopini 5-metoksitriptamina (0,200 g, 1,05 mmol) u acetonitrilu (4,5 mL) uz miješanje su dodani ADMA (0,234 mL, 2,10 mmol) i trifluoroctena kiselina (0,161 mL, 2,10 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 0,17 h na 110 °C u mikrovalnom reaktoru (P = 100 W). Dodatkom dietil-etera (80 mL) istaložen je sirovi produkt 8.

Iskorištenje: 0,225 g (64,9 %).

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

Suspenzija spoja 8 (0,200 g, 0,602 mmol), litijevog karbonata (0,089 g, 1,204 mmol) i 10 %-tnog Pd/C (0,023 g) u apsolutnom etanolu (4 mL) miješana je 0,42 h na 150 °C u mikrovalnom reaktoru (P = 100 W). Reakcijska smjesa je ohlađena i filtrirana kroz sloj Celita. Otapalo je iz filtrata uklonjeno uparavanjem pod sniženim tlakom. Dobiveni sirovi produkt 9 pročišćen je rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera.

Iskorištenje: 0,063 g (49,3 %).

### 3.10. Sinteza *tert*-butil (2-(6-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamata (10)

Spoj 10 pripravljen je analogno pripremi spoja 5 (umjesto harmina, reakcija je provedena sa spojem 9).

Količina reaktanta: 0,595 g (2,803 mmol) spoja 9.

Iskorištenje: 0,453 g (45,6 %).

$t_f$  161–162 °C.

ESI-MS  $m/z$  356,3 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (ATR):  $\nu_{\max}$  3205, 3013, 2990, 2941, 2831, 1703, 1584, 1570, 1489, 1475, 1450, 1402, 1389, 1363, 1355, 1286, 1251, 1227, 1202, 1187, 1168, 1122, 1101, 1048, 1024, 1003, 985, 939, 884, 863, 846, 837, 815, 806, 757, 705, 670, 616, 596, 555, 534, 523, 498, 479  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,17 (d, 1H,  $J = 5,1$ ), 7,97 (d, 1H,  $J = 5,2$ ), 7,78 (d, 1H,  $J = 2,5$ ), 7,59 (d, 1H,  $J = 8,9$ ), 7,23 (dd, 1H,  $J = 9,0$ ,  $J = 2,6$ ), 7,03 (t, 1H,  $J = 6,0$ ), 4,58 (t, 2H,  $J = 6,8$ ), 3,86 (s, 3H), 3,29 (q, 2H,  $J = 6,5$ ), 2,96 (s, 3H), 1,31 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 155,69, 153,63, 141,36, 136,86, 136,25, 135,00, 127,84, 120,99, 117,85, 113,00, 111,11, 103,43, 77,86, 55,69, 43,94, 40,26, 28,11, 23,18.

### 3.11. Sinteza 2-(6-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)etan-1-amina (11)

Spoj **11** pripravljen je analogno pripremi spoja **3** (umjesto spoja **2**, reakcija je provedena sa spojem **10**).

Količina reaktanta: 0,336 g (0,944 mmol) spoja **10**.

Iskorištenje: 0,220 g (91,3 %).

$t_{\text{t}}$  110–113  $^{\circ}\text{C}$ .

ESI-MS  $m/z$  256,2 ( $\text{M}+1$ ) $^{+}$ .

IR (ATR):  $\nu_{\max}$  3201, 3064, 2999, 2922, 2829, 1704, 1583, 1561, 1489, 1448, 1402, 1352, 1289, 1242, 1220, 1167, 1048, 983, 837, 814, 721, 616, 497  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,16 (d, 1H,  $J = 5,2$ ), 7,96 (d, 1H,  $J = 5,2$ ), 7,77 (d, 1H,  $J = 2,5$ ), 7,67 (d, 1H,  $J = 9,0$ ), 7,22 (dd, 1H,  $J = 8,9$ ,  $J = 2,5$ ), 4,54 (t, 2H,  $J = 7,2$ ), 3,87 (s, 3H), 2,98 (s, 3H), 2,90 (t, 2H,  $J = 7,2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 153,53, 141,47, 136,79, 136,27, 135,08, 127,57, 120,80, 117,81, 112,97, 111,49, 103,34, 55,66, 47,29, 42,28, 23,40.

### 3.12. Sinteza 9-(2-azidoetil)-6-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indola (12)

Spoj **12** pripravljen je analogno pripremi spoja **4** (umjesto spoja **3**, reakcija je provedena sa spojem **11**).

Količina reaktanta: 0,200 g (0,784 mmol) spoja **11**.

Iskorištenje: 0,090 g (40,8 %).

**3.13. Sinteza (3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetil-10-(prop-2-in-1-iloksi)dekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromena (13)**

U suspenziju dihidroartemizina (0,200 g, 0,703 mmol) u suhom diklormetanu (6 mL) dodan je acetonitril (1 mL, 9,983 mmol) i 10 %-tni TMSCl u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,01 mL). U reakcijsku smjesu potom je dokapan propargilni alkohol (1 mL). Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a sirovi produkt **13** pročišćen rastrljavanjem u petroleteru.

Iskorištenje: 0,128 g (56,5 %).

**3.14. Sinteza harmizina triazolskog tipa u položaju O-7: 1-Metil-7-(2-(4-(((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etoksi)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (14)**

U otopinu alkina **13** (0,100 g, 0,310 mmol) i azida **4** (0,083 g, 0,310 mmol) u DCM-u (2 mL), dodana je otopina natrijevog askorbata (0,01 g, 0,05 mmol) u vodi (1 mL) i 1 M otopina CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O (0,02 mL, 0,02 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na 45 °C 0,5 h. Po završetku reakcijska smjesa je razrijeđena vodom (15 mL) te je smjesa ekstrahirana etil-acetatom (3 × 20 mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani, a otapalo upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt **14** pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5 i rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera.

Iskorištenje: 0,029 g (15,9 %).

*t*<sub>f</sub> 145–149 °C.

ESI-MS *m/z* 590,3 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (ATR): *v*<sub>max</sub> 2931, 2877, 1743, 1628, 1569, 1449, 1376, 1324, 1278, 1236, 1175, 1137, 1099, 1036, 1008, 956, 938, 874, 824, 632, 586, 567, 482 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, *δ* ppm, *J*/Hz): 11,43 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,14 (d, 1H, *J* = 5,3), 8,04 (d, 1H, *J* = 8,6), 7,80 (d, 1H, *J* = 5,3), 7,00 (d, 1H, *J* = 2,3), 6,80 (dd, 1H, *J* = 8,6, *J* = 2,2), 5,38 (s, 1H), 4,85–4,81 (m, 3H), 4,77 (d, 1H, *J* = 12,3), 4,55–4,50 (m, 3H), 2,72 (s, 3H), 2,42–2,39 (m, 1H), 2,19–2,14 (m, 1H), 1,99–1,95 (m, 1H), 1,77–1,73 (m, 1H), 1,71–1,64 (m, 1H), 1,60–1,56 (m, 1H), 1,50–1,46 (m, 1H), 1,38–1,22 (m, 6H), 1,12 (dd, 1H, *J* = 11,5, *J* = 6,7), 0,86–0,75 (m, 7H).



$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 158,56, 144,04, 141,72, 141,35, 137,77, 134,59, 127,07, 124,29, 122,65, 115,30, 111,97, 109,20, 103,35, 100,07, 95,62, 87,02, 80,47, 66,53, 60,46, 52,02, 49,07, 43,78, 36,62, 36,01, 34,02, 30,35, 25,64, 24,20, 23,97, 20,36, 20,11, 12,67.

### 3.15. Sinteza harmizinina triazolskog tipa u položaju N-9 (15, 16)

**Opći propis:** U otopinu alkina **13** (0,100 g, 0,310 mmol) i odgovarajućeg azida **7** ili **12** u DCM-u (2 mL), dodana je otopina natrijevog askorbata (0,01 g, 0,05 mmol) u vodi (2 mL) i 1 M otopina  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (0,02 mL, 0,02 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na s.t. 2 h. Po završetku reakcijska smjesa je razrijeđena vodom (20 mL) i ekstrahirana DCM-om ( $2 \times 20$  mL). Organski slojevi su skupljeni, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani, a otapalo upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5 i rastrljavanjem u smjesi dietil-etera i petroletera.

#### 3.15.1. 7-Metoksi-1-metil-9-(2-(4-(((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (15)

Količina reaktanta: 0,087 g (0,310 mmol) spoja **7**.

Iskorištenje: 0,054 g (28,9 %).

$t_f$  147–150 °C.

ESI-MS  $m/z$  604,4 ( $\text{M}+1$ )<sup>+</sup>.

IR (ATR):  $\nu_{\text{max}}$  2937, 2872, 1624, 1565, 1498, 1445, 1406, 1375, 1345, 1281, 1254, 1212, 1159, 1137, 1100, 1027, 1010, 995, 940, 924, 875, 821, 638, 600, 570, 545, 490  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ ): 8,17 (d, 1H,  $J = 5,2$ ), 8,03 (d, 1H,  $J = 8,5$ ), 7,86 (d, 1H,  $J = 5,2$ ), 7,70 (s, 1H), 6,81 (dd, 1H,  $J = 8,6$ ,  $J = 2,1$ ), 6,78 (d, 1H,  $J = 2,1$ ), 5,31 (s, 1H), 5,03 (t, 2H,  $J = 5,9$ ), 4,87 (t, 2H,  $J = 5,9$ ), 4,61 (d, 1H,  $J = 3,5$ ), 4,58 (d, 1H,  $J = 12,3$ ), 4,35 (d, 1H,  $J = 12,3$ ), 3,83 (s, 3H), 2,85 (s, 3H), 2,37–2,33 (m, 1H), 2,18 (td, 1H,  $J = 14,0$ ,  $J = 3,9$ ), 2,02–1,98 (m, 1H), 1,80 (ddt, 1H,  $J = 13,7$ ,  $J = 6,9$ ,  $J = 3,3$ ), 1,57–1,46 (m, 3H), 1,41–1,21 (m, 6H), 1,12 (td, 1H,  $J = 11,4$ ,  $J = 6,6$ ), 0,91–0,77 (m, 4H), 0,67 (d, 3H,  $J = 7,3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 160,44, 143,86, 142,67, 140,67, 138,10, 134,57, 128,72, 124,51, 122,19, 114,12, 112,22, 109,55, 103,35, 99,73, 92,96, 86,94, 80,44, 60,08, 55,34, 52,02, 49,44, 44,45, 43,75, 36,61, 36,02, 34,03, 30,22, 25,64, 24,26, 23,89, 23,08, 20,16, 12,55.

**3.15.2. 6-Metoksi-1-metil-9-(2-(4-(((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epooksil[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (16)**

Količina reaktanta: 0,087 g (0,310 mmol) spoja **12**.

Iskorištenje: 0,025 g (13,4 %).

$t_r$  167–170 °C.

ESI-MS  $m/z$  604,4 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (ATR):  $\nu_{\max}$  2943, 1740, 1562, 1489, 1451, 1440, 1404, 1374, 1357, 1293, 1231, 1212, 1173, 1136, 1099, 1077, 1039, 1028, 1012, 996, 950, 922, 875, 863, 848, 839, 824, 804, 782, 713, 672, 623, 596, 544, 490, 479 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm,  $J$ /Hz): 8,18 (d, 1H,  $J = 5,2$ ), 7,97 (d, 1H,  $J = 5,2$ ), 7,75 (d, 1H,  $J = 2,5$ ), 7,73 (s, 1H), 7,33 (d, 1H,  $J = 9,0$ ), 7,11 (dd, 1H,  $J = 9,0$ ,  $J = 2,6$ ), 5,33 (s, 1H), 5,02 (t, 2H,  $J = 6,1$ ), 4,83 (t, 2H,  $J = 6,1$ ), 4,62 (d, 1H,  $J = 3,5$ ), 4,59 (d, 1H,  $J = 12,4$ ), 4,36 (d, 1H,  $J = 12,4$ ), 3,85 (s, 3H), 2,84 (s, 3H), 2,40–2,35 (m, 1H), 2,21–2,15 (m, 1H), 2,02–1,98 (m, 1H), 1,83–1,78 (m, 1H), 1,60–1,48 (m, 3H), 1,40–1,26 (m, 6H), 1,13 (dt, 1H,  $J = 11,5$ ,  $J = 6,6$ ), 0,90–0,81 (m, 4H), 0,70 (d, 3H,  $J = 7,3$ ).

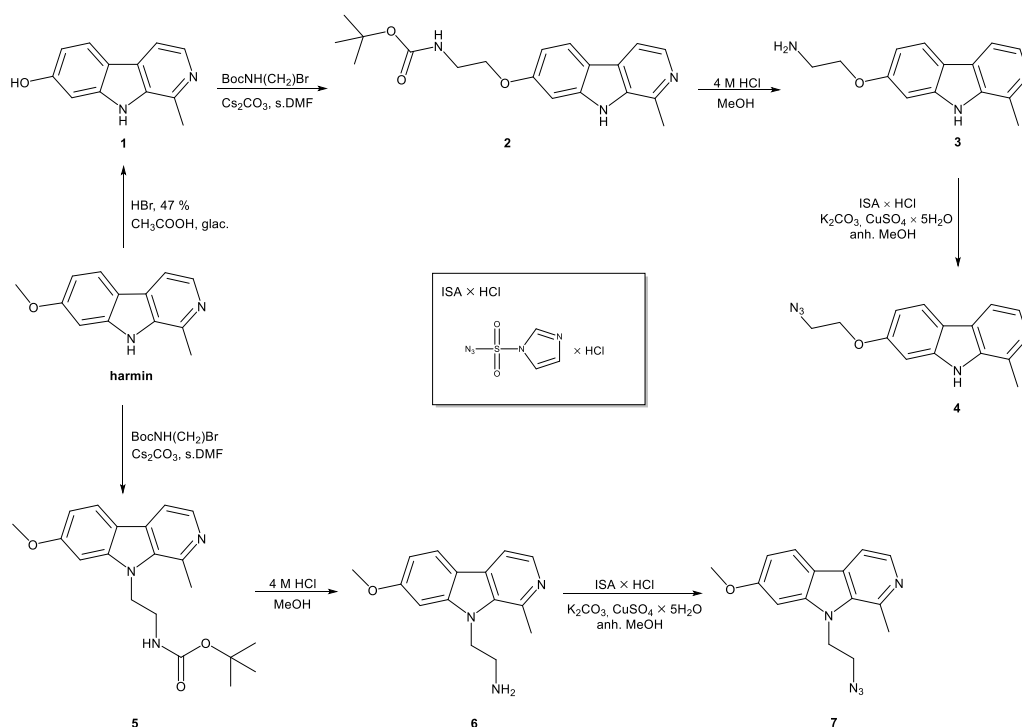
<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm): 153,73, 143,84, 141,42, 137,30, 135,84, 134,88, 128,14, 124,34, 121,07, 117,66, 113,02, 110,83, 103,40, 103,35, 99,71, 86,95, 80,45, 60,01, 55,62, 52,02, 49,37, 44,58, 43,76, 36,62, 36,02, 34,03, 30,24, 25,63, 24,26, 23,92, 23,09, 20,15, 12,60.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Cilj ovog istraživačkog rada bila je sinteza harmizinina, hibridnih spojeva harmina i artemizinina, povezanih 1,2,3-triazolom. Kao što je u uvodnom dijelu detaljnije obrazloženo, artemizinin i harmin pokazuju dobar protutumorski učinak na nizu humanih tumorskih staničnih linija, kao i antimalarijsko djelovanje. Prisutnost triazolskog prstena dodatno doprinosi stabilnosti hibridnih molekula te povećava broj mogućih interakcija s potencijalnim biološkim metama. Zbog dualnog biološkog učinka harminskog i artemizininiskog farmakofora, sintetizirani harmizinini bi mogli pronaći primjenu u liječenju dviju naizgled nespojivih bolesti – malarije i raka.

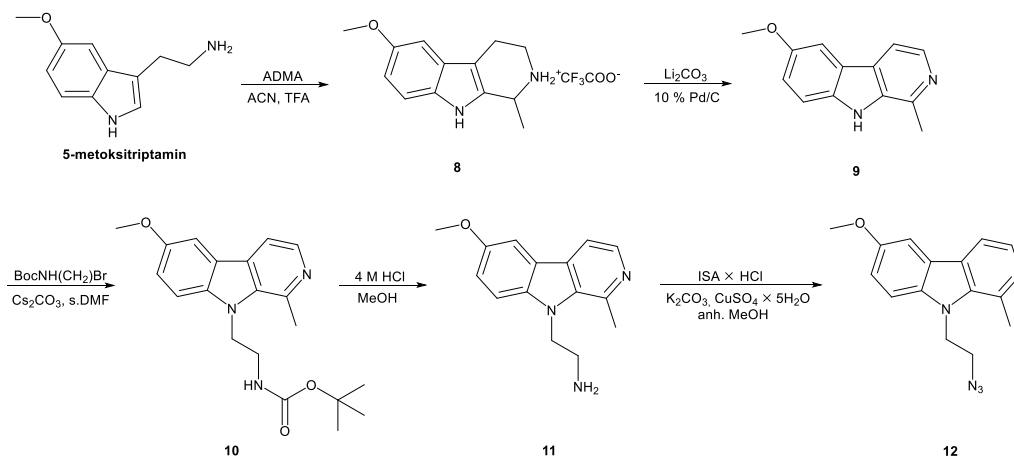
Za sintezu hibrida harmina i artemizinina povezanih triazolskim tipom poveznice bilo je potrebno pripremiti odgovarajuće prekursore: azide  $\beta$ -karbolina i alkin artemizinina.

Azidi  $\beta$ -karbolina pripremljeni su u položajima O-7 (**4**) i N-9 (**7** i **12**). Sintaza azida **4** započinje O-demetilacijom harmina u smjesi HBr (47 %) i glacijalne octene kiseline čime se dobiva fenol **1**. Sljedeći korak uključuje alkiliranje harmola 2-(*tert*-butoksikarbonilamin)etil bromidom uz bazu cezijev karbonat u suhom DMF-u čime nastaje Boc-zaštićeni amin **2**. Uklanjanjem Boc-zaštitne skupine u prisutstvu klorovodične kiseline i metanola nastaje amin **3**, koji se reakcijom diazo transfera uz ISA  $\times$  HCl i bakar(II) sulfat pentahidrat, u bazičnim uvjetima, prevodi u azid **4**. Sintaza azida **7** odvija se u tri reakcijska koraka koja su jednaka završnim koracima prethodno opisane sinteze azida **4** (Shema 2).



**Shema 2. Sintaza azida 4 i 7**

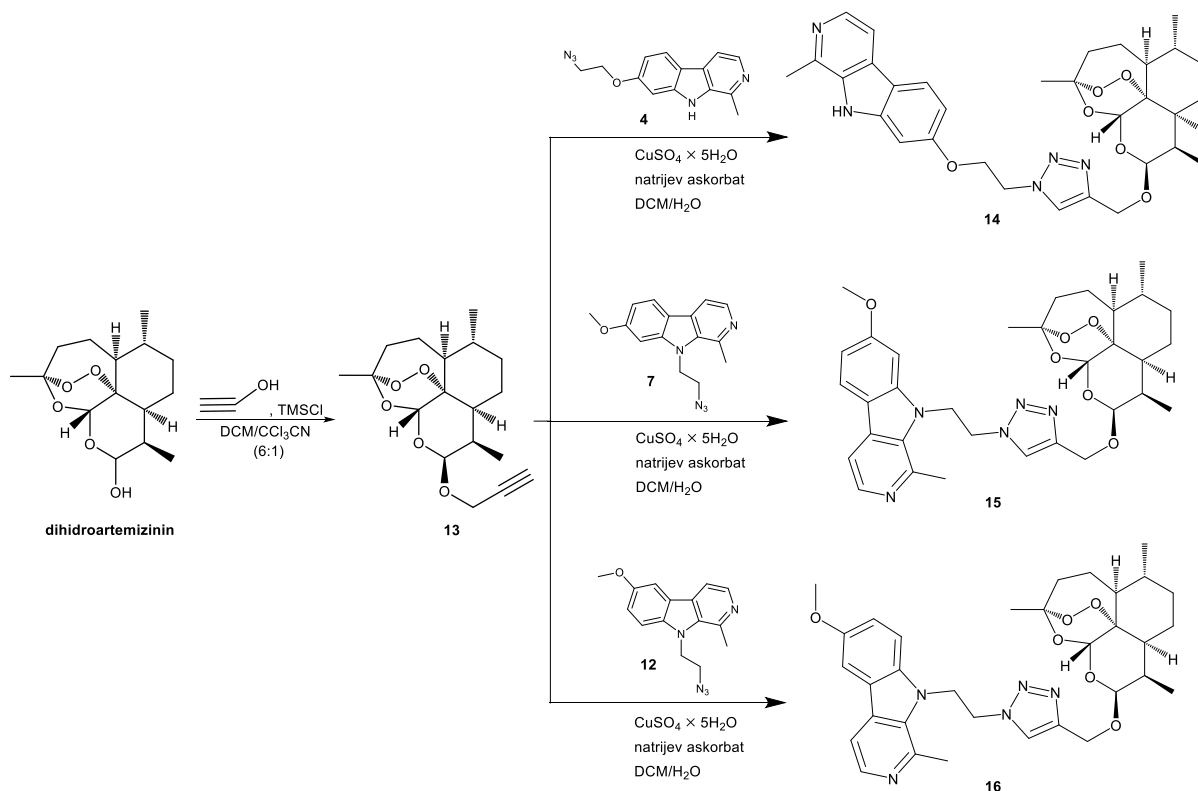
Sinteza azida **12** odvija se u pet reakcijskih koraka. U prvom koraku se Pictet-Spenglerovom reakcijom 5-metoksitriptamina i ADMA, uz TFA (katalizator), sintetizira tetrahidro- $\beta$ -karbolin **8**, koji se uz 10 %-tni Pd/C i Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, primjenom mikrovalnog zračenja, oksidira u  $\beta$ -karbolin **9**. Alkiliranjem spoja **9** 2-(*tert*-butoksikarbonilamin)etil bromidom, uz cezijev karbonat u suhom DMF-u, nastaje Boc-zaštićeni amin **10**. Uklanjanjem Boc-zaštićene skupine u kiselim uvjetima nastaje amin **11**, koji se diazo transferom prevodi u azid **12**, kako je prethodno opisano (Shema 3).



**Shema 3.** Sinteza azida **12**

Alkin artemizinina **13** pripremljen je reakcijom dihidroartemizinina i propargilnog alkohola uz trimetilsilil-klorid (katalizator) u smjesi DCM-a i trikloroacetonitrila u omjeru 6:1. Pravilnim omjerom DCM-a i trikloroacetonitrila (6:1) favorizirano je nastajanje stereospecifičnog  $\beta$ -izomera alkina artemizinina [62].

Konačno, klik-reakcijom alkina **13** i azida **4**, **7** i **12** pripremljene su ciljane hibridne molekule **14-16** (Shema 4). Klik-reakcija provedena je u smjesi DCM-a i vode uz prekatalitički sustav Cu(II) sulfat pentahidrat i natrijev askorbat. Redoks reakcijom bakar(II) sulfata pentahidrata i askorbata dolazi do *in situ* generiranja Cu(I) iona potrebnih za odvijanje klik-reakcije. Sirovi produkti pročišćeni su kromatografijom na koloni uz sloj aluminijevog oksida kako bi se uklonili zaostali bakrovi ioni.



**Shema 4.** Sinteza harmizininina **14-16**

Pripravljani su i karakterizirani sljedeći, dosada u literaturi neopisani, spojevi:

- 1-metil-7-(2-(4-(((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etoksi)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**14**),
- 7-metoksi-1-metil-9-(2-(4-(((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**15**),
- 6-metoksi-1-metil-9-(2-(4-(((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**16**),

i prekursori u njihovoj sintezi:

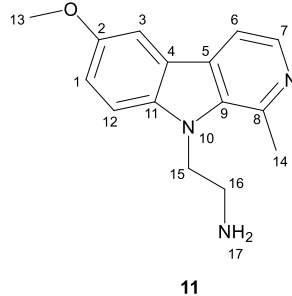
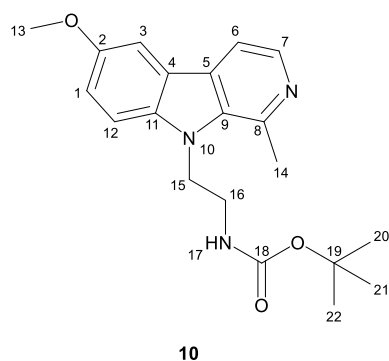
- *tert*-butil (2-(6-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamat (**10**),
- 2-(6-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etan-1-amin (**11**).

Strukture novih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS i IR). U tablicama 4-6 dani su njihovi analitički i spektroskopski podaci, dok se spektri nalaze u prilogu.

**Tablica 4.** Analitički i ESI-MS spektroskopski podaci za spojeve **10-11** i **14-16**.

Spoj	Iskorištenje (%)	$t_r$ (°C)	Molekulska formula ( $M_r$ )	IR (ATR) $\nu_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> )	MS ( $m/z$ )
<b>10</b>	46	161–162	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (355,44)	3205, 3013, 2990, 2941, 2831, 1703, 1584, 1570, 1489, 1475, 1450, 1402, 1389, 1363, 1355, 1286, 1251, 1227, 1202, 1187, 1168, 1122, 1101, 1048, 1024, 1003, 985, 939, 884, 863, 846, 837, 815, 806, 757, 705, 670, 616, 596, 555, 534, 523, 498, 479	356,3 (M+1) <sup>+</sup>
<b>11</b>	91	110–113	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O (255,32)	3201, 3064, 2999, 2922, 2829, 1704, 1583, 1561, 1489, 1448, 1402, 1352, 1289, 1242, 1220, 1167, 1048, 983, 837, 814, 721, 616, 497	256,2 (M+1) <sup>+</sup>
<b>14</b>	16	145–149	C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> (589,69)	2931, 2877, 1743, 1628, 1569, 1449, 1376, 1324, 1278, 1236, 1175, 1137, 1099, 1036, 1008, 956, 938, 874, 824, 632, 586, 567, 482	590,3 (M+1) <sup>+</sup>
<b>15</b>	29	147–150	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> (603,72)	2937, 2872, 1624, 1565, 1498, 1445, 1406, 1375, 1345, 1281, 1254, 1212, 1159, 1137, 1100, 1027, 1010, 995, 940, 924, 875, 821, 638, 600, 570, 545, 490	604,4 (M+1) <sup>+</sup>
<b>16</b>	13	167–170	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> (603,72)	2943, 1740, 1562, 1489, 1451, 1440, 1404, 1374, 1357, 1293, 1231, 1212, 1173, 1136, 1099, 1077, 1039, 1028, 1012, 996, 950, 922, 875, 863, 848, 839, 824, 804, 782, 713, 672, 623, 596, 544, 490, 479	604,4 (M+1) <sup>+</sup>

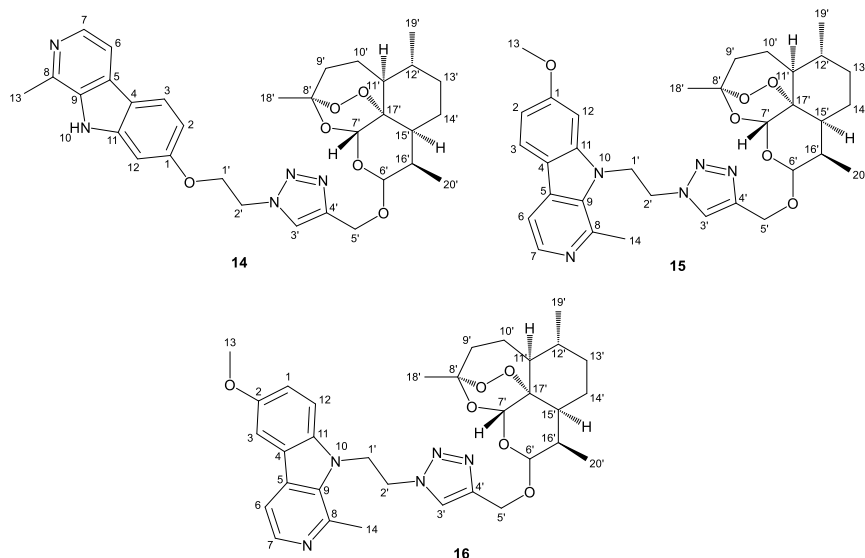
**Tablica 5.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopski podaci spojeva **10** i **11**.



Spoj	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm, J/Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm, J/Hz)
<b>10</b>	8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,1$ ), 7,97 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ ), 7,78 (d, 1H, 3, $J = 2,5$ ), 7,59 (d, 1H, 12, $J = 8,9$ ), 7,23 (dd, 1H, 1, $J = 9,0$ , $J = 2,6$ ), 7,03 (t, 1H, 17, $J = 6,0$ ), 4,58 (t, 2H, 15, $J = 6,8$ ), 3,86 (s, 3H, 13), 3,29 (q, 2H, 16, $J = 6,5$ ), 2,96 (s, 3H, 14), 1,31 (s, 9H, 20, 21, 22)	155,69 (18), 153,63 (2), 141,36 (8), 136,86 (7), 136,25 (9), 135,00 (11), 127,84 (4), 120,99 (5), 117,85 (6), 113,00 (1), 111,11 (12), 103,43 (3), 77,86 (19), 55,69 (13), 43,94 (15), 40,26 (16), 28,11 (20, 21, 22), 23,18 (14)
<b>11</b>	8,16 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ ), 7,96 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ ), 7,77 (d, 1H, 3, $J = 2,5$ ), 7,67 (d, 1H, 12, $J = 9,0$ ), 7,22 (dd, 1H, 1, $J = 8,9$ , $J = 2,5$ ), 4,54 (t, 2H, 15, $J = 7,2$ ), 3,87 (s, 3H, 13), 2,98 (s, 3H, 14), 2,90 (t, 2H, 16, $J = 7,2$ )	153,53 (2), 141,47 (8), 136,79 (7), 136,27 (9), 135,08 (11), 127,57 (4), 120,80 (5), 117,81 (6), 112,97 (1), 111,49 (12), 103,34 (3), 55,66 (13), 47,29 (15), 42,28 (16), 23,40 (14)



**Tablica 6.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopski podaci spojeva **14-16**.



Spoj	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm, J/Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm, J/Hz)
<b>14</b>	11,43 (s, 1H, 10), 8,20 (s, 1H, 3'), 8,14 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ ), 8,04 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ ), 7,80 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ ), 7,00 (d, 1H, 12, $J = 2,3$ ), 6,80 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$ , $J = 2,2$ ), 5,38 (s, 1H, 7'), 4,85–4,81 (m, 3H, 1', 5a'), 4,77 (d, 1H, 5b', $J = 12,3$ ), 4,55–4,50 (m, 3H, 2', 6'), 2,72 (s, 3H, 13), 2,42–2,39 (m, 1H, 16'), 2,19–2,14 (m, 1H, 9a'), 1,99–1,95 (m, 1H, 9b'), 1,77–1,73 (m, 1H, 14a'), 1,71–1,64 (m, 1H, 14b'), 1,60–1,56 (m, 1H, 13a'), 1,50–1,46 (m, 1H, 10a'), 1,38–1,22 (m, 6H, 10b', 12', 15', 18'), 1,12 (dd, 1H, 11', $J = 11,5$ , $J = 6,7$ ), 0,86–0,75 (m, 7H, 13b', 19', 20')	158,56 (1), 144,04 (4'), 141,72 (8), 141,35 (11), 137,77 (7), 134,59 (9), 127,07 (8'), 124,29 (3'), 122,65 (3), 115,30 (4), 111,97 (6), 109,20 (6'), 103,35 (5), 100,07 (2), 95,62 (12), 87,02 (7'), 80,47 (17'), 66,53 (1'), 60,46 (5), 52,02 (11'), 49,07 (2), 43,78 (15'), 36,62 (12'), 36,01 (9), 34,02 (13'), 30,35 (16'), 25,64 (18'), 24,20 (14'), 23,97 (10'), 20,36 (13), 20,11 (19'), 12,67 (20')
<b>15</b>	8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ ), 8,03 (d, 1H, 3, $J = 8,5$ ), 7,86 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ ), 7,70 (s, 1H, 3'), 6,81 (dd, 1H, 2, $J = 8,6$ , $J = 2,1$ ), 6,78 (d, 1H, 12, $J = 2,1$ ), 5,31 (s, 1H, 7'), 5,03 (t, 2H, 1', $J = 5,9$ ), 4,87 (t, 2H, 2', $J = 5,9$ ), 4,61 (d, 1H, 6', $J = 3,5$ ), 4,58 (d, 1H, 5a', $J = 12,3$ ), 4,35 (d, 1H, 5b', $J = 12,3$ ), 3,83 (s, 3H, 13), 2,85 (s, 3H, 14), 2,37–2,33 (m, 1H, 16'), 2,18 (td, 1H, 9a', $J = 14,0$ , $J = 3,9$ ), 2,02–1,98 (m, 1H, 9b'), 1,80 (ddt, 1H, 14a', $J = 13,7$ , $J = 6,9$ , $J = 3,3$ ), 1,57–1,46 (m, 3H, 10a', 13a', 14b'), 1,41–1,21 (m, 6H, 10b', 12', 15', 18'), 1,12 (td, 1H, 11', $J = 11,4$ , $J = 6,6$ ), 0,91–0,77 (m, 4H, 13b', 19'), 0,67 (d, 3H, 20', $J = 7,3$ )	160,44 (1), 143,86 (8), 142,67 (4'), 140,67 (9), 138,10 (7), 134,57 (11), 128,72 (8'), 124,51 (3'), 122,19 (3), 114,12 (4), 112,22 (6), 109,55 (6'), 103,35 (5), 99,73 (2), 92,96 (12), 86,94 (7'), 80,44 (17'), 60,08 (5'), 55,34 (13), 52,02 (11'), 49,44 (1'), 44,45 (2') 43,75 (15'), 36,61 (12'), 36,02 (9'), 34,03 (13'), 30,22 (16'), 25,64 (18'), 24,26 (14'), 23,89 (10'), 23,08 (14), 20,16 (19'), 12,55 (20')
<b>16</b>	8,18 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ ), 7,97 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ ), 7,75 (d, 1H, 3, $J = 2,5$ ), 7,73 (s, 3', 1H), 7,33 (d, 1H, 12, $J = 9,0$ ), 7,11 (dd, 1H, 1, $J = 9,0$ , $J = 2,6$ ), 5,33 (s, 1H, 7'), 5,02 (t, 2H, 1', $J = 6,1$ ), 4,83 (t, 2H, 2', $J = 6,1$ ), 4,62 (d, 1H, 6', $J = 3,5$ ), 4,59 (d, 1H, 5a', $J = 12,4$ ), 4,36 (d, 1H, 5b', $J = 12,4$ ), 3,85 (s, 3H, 13), 2,84 (s, 3H, 14), 2,40–2,35 (m, 1H, 16'), 2,21–2,15 (m, 1H, 9a'), 2,02–1,98 (m, 1H, 9b'), 1,83–1,78 (m, 1H, 14a'), 1,60–1,48 (m, 3H, 10a', 13a', 14b'), 1,40–1,26 (m, 6H, 10b', 12', 15', 18'), 1,13 (dt, 1H, 11', $J = 11,5$ , $J = 6,6$ ), 0,90–0,81 (m, 4H, 13b', 19'), 0,70 (d, 3H, 20', $J = 7,3$ )	153,73 (2), 143,84 (8), 141,42 (4'), 137,30 (7), 135,84 (9), 134,88 (11), 128,14 (4), 124,34 (3'), 121,07 (8'), 117,66 (1), 113,02 (6), 110,83 (12), 103,40 (3), 103,35 (5), 99,71 (6'), 86,95 (7'), 80,45 (17'), 60,01 (5'), 55,62 (13), 52,02 (11'), 49,37 (1'), 44,58 (2'), 43,76 (15'), 36,62 (12'), 36,02 (9'), 34,03 (13'), 30,24 (16'), 25,63 (18'), 24,26 (14'), 23,92 (10'), 23,09 (14), 20,15 (19'), 12,60 (20')

## **5. ZAKLJUČCI**

U okviru ovog rada sintetizirani su i karakterizirani novi harmizinini triazolskog tipa

**14-16:**

- 1-metil-7-(2-(4-(((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etoksi)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**14**),
- 7-metoksi-1-metil-9-(2-(4-(((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**15**),
- 6-metoksi-1-metil-9-(2-(4-(((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izokromen-10-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**16**),

i prekursori u njihovoj sintezi:

- *tert*-butil (2-(6-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etil)karbamat (**10**),
- 2-(6-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)etan-1-amin (**11**).

Svi pripremljeni spojevi su novi, do sada neopisani u literaturi. Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim spektroskopskim metodama (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS i IR). U daljnjim istraživanjima, koja nadilaze okvire ovog rada, ispitat će se njihovo protutumorsko i antimalarijsko djelovanje.

## **6. ZAHVALE**

*Zahvaljujem se svim članovima Zavoda za farmaceutsku kemiju,  
a posebno prof. dr. sc. Zrinki Rajić na ukazanoj prilici i podršci u svakom trenutku tijekom  
izrade ovog rada.*

*Također, veliko hvala Goranu Poje, mag. pharm. i Marini Marinović, mag. appl. chem. koji  
su bili tu za svaki savjet i kod svakog izazova. Hvala vam na divnom prijateljstvu i vremenu  
koje smo proveli skupa.*

*Hvala i Ani Penavi, mag. appl. chem. na odličnom društvu u laboratoriju  
te svim savjetima i pomoći.*

*Naposljetku želim se zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima koji su uvijek bili dodatan  
vjetar u leđa u ostvarenju svih mojih ciljeva i želja.*

## **7. POPIS LITERATURE**

1. Van Seventer JM, Hochberg NS. Principles of Infectious Diseases: Transmission, Diagnosis, Prevention, and Control. U: International Encyclopedia of Public Health. Quah SR, Cockerham WC, urednici, Cambridge, Massachusetts, Academic Press, 2017, str. 22-39.
2. Bloom DE, Cadarette D. Infectious Disease Threats in the Twenty-First Century: Strengthening the Global Response. *Front Immunol*, 2019, 10, 549.
3. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher, U. WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(3), 318-327.
4. Tuberculosis, 2021., <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>, pristupljeno 10.5.2022.
5. Thu AM, Phyo AP, Landier J, Parker DM, Nosten FH. Combating multidrug-resistant Plasmodium falciparum malaria. *FEBS J*, 2017, 284(16), 2569-2578.
6. Malaria, 2022., <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>, pristupljeno 10.5.2022.
7. Noncommunicable diseases, 2021., <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>, pristupljeno 11.5.2022.
8. Wild CP. The role of cancer research in noncommunicable disease control. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(14), 1051-1058.
9. What is cancer?, 2021., <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, pristupljeno 11.5.2022.
10. Cancer, 2022., <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, pristupljeno 11.5.2022.
11. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012., *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2), 87-108.
12. Cancer today, 2022., [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=0&include\\_nmsc\\_other=0&projection=natural-earth&color\\_palette=default&map\\_scale=quantile&map\\_nb\\_colors=5&continent=0&show\\_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=0&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D), pristupljeno 11.5.2022.

13. Cancer treatment, 2022., <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>, pristupljeno 11.5.2022.
14. Pavić, Kristina. "Sinteza, karakterizacija i biološko djelovanje semikarbazida, urea i ureidoamida primakina." Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017.
15. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 3233.
16. Rodrigues R, Duarte D, Vale N. Drug Repurposing in Cancer Therapy: Influence of Patient's Genetic Background in Breast Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*, 2022, 23, 4280.
17. Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature*, 2015, 534, 314-316.
18. Chong CR, Sullivan DJ Jr. New uses for old drugs. *Nature*, 2007, 448, 645-646.
19. Duffy R, Wade C. Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products: a MEDLINE literature review. *Drug Discov*, 2012, 17, 942-953.
20. Kozlina F, Mlinarić Z, Rajić Džolić Z. Prenamjena lijekova kao strategija u razvoju novih lijekova. *Farm Glas*, 2018, 74(3), 201-208.
21. Malaria, 2020., <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>, pristupljeno 5.6.2022.
22. Alumasa, John. "New insights on the structure-function principles & design of quinoline antimalarial drugs." Dissertation, Georgetown University, Faculty of the Graduate School of Arts and Sciences, 2010.
23. Ellis T, Eze E, Raimi-Abraham BT. Malaria and Cancer: a critical review on the established associations and new perspectives. *Infect Agents Cancer*, 2021, 16, 33.
24. Das S, Dielschneider R, Chanas-LaRue A, Johnston JB, Gibson SB. Antimalarial drugs trigger lysosome-mediated cell death in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res*, 2018, 70, 79-86.
25. Yan K, Lin Y, Hsiao C, Wen Y, Lin K, Liu C, Hsieh M, Yao C, Yan M, Lai G, Chuang S, Lee L. Mefloquine induces cell death in prostate cancer cells and provides a potential novel treatment strategy in vivo. *Oncol Lett*, 2013, 5(5), 1567-1571.
26. Zhang Y, Li Y, Li Y, Li R, Ma Y, Wang H, Wang Y. Chloroquine inhibits MGC803 gastric cancer cell migration via the Toll-like receptor 9/nuclear factor kappa B signaling pathway. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2), 1366-1371.
27. Duarte D, Vale N. New Trends for Antimalarial Drugs: Synergism between Antineoplastics and Antimalarials on Breast Cancer Cells. *Biomolecules*, 2020, 10(12), 1623.



28. Karpel-Massler G, Westhoff MA, Kast ER, Dwucet A, Nonnenmacher L, Wirtz RC, Debatin KM, Halatsch ME. Artesunate Enhances the Antiproliferative Effect of Temozolomide on U87MG and A172 Glioblastoma Cell Lines, *Anti Cancer Agents Med*, 2014, 14(2), 313-318.
29. Wang B, Hou D, Liu Q, Wu T, Guo H, Zhang X, Zou Y, Liu Z, Liu J, Wei J. Artesunate sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin by downregulating RAD51. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16, 1548-1556.
30. Ma L i Fei H. Antimalarial drug artesunate is effective against chemoresistant anaplastic thyroid carcinoma via targeting mitochondrial metabolism. *J Bioenerg Biomembr*, 2020, 52, 123-130.
31. Dai X, Zhang X, Chen W, Chen Y, Zhang Q, Mo S, Lu J. Dihydroartemisinin: A Potential Natural Anticancer Drug. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(2), 603-622.
32. Ma N, Zhang Z, Liao F, Jiang T, Tu Y. The birth of artemisinin. *Pharmacol Ther*, 2020, 216, 107658.
33. Meshnick SR. Artemisinin antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Med Trop*, 1998, 58(3), 13-17.
34. Balint GA. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol Ther*, 2001, 90, 261-265.
35. Liu X, Cao J, Huang G, Zhao Q, Shen J. Biological Activities of Artemisinin Derivatives Beyond Malaria. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(3), 205-222.
36. Ma Z, Woon CY, Liu CG, Cheng JT, You M, Sethi G, Wong AL, Ho PC, Zhang D, Ong P, Wang L, Goh BC. Repurposing Artemisinin and its Derivatives as Anticancer Drugs: A Chance or Challenge?. *Front Pharmacol*, 2021, 12, 828856.
37. Berdelle N, Nikolov, T, Quiro, S, Efferth T, Kaina B. Artesunate induces oxidative DNA damage, sustained DNA double-strand breaks, and the ATM/ATR damage response in cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(12), 2224-2233.
38. Liu WM, Gravett AM, Dalglish AG. The antimalarial agent artesunate possesses anticancer properties that can be enhanced by combination strategies. *Int J Cancer*, 2011, 128(6), 1471-1480.
39. Zhang B, Zhang Z, Wang J, Yang B, Zhao Y, Rao Z, Gao J. Dihydroartemisinin sensitizes Lewis lung carcinoma cells to carboplatin therapy via p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Oncol Lett*, 2018, 15, 7531-7536.

40. Lucibello M, Adanti S, Antelmi E, Dezi D, Ciafrè S, Carcangiu M, Zonfrillo M, Nicotera G, Sica L, Braud FD, Pierimarchi P. Phospho-TCTP as a therapeutic target of Dihydroartemisinin for aggressive breast cancer cells. *Oncotarget*, 2015, 6, 5275-5291.
41. Abba ML, Patil N, Leupold JH, Saeed M, Efferth T, Allgayer H. Prevention of carcinogenesis and metastasis by Artemisinin-type drugs. *Cancer Lett*, 2018, 429, 11-18.
42. Hu Y, Li N, Zhang J, Wang Y, Chen L, Sun J. Artemisinin-indole and artemisinin-imidazole hybrids: Synthesis, cytotoxic evaluation and reversal effects on multidrug resistance in MCF-7/ADR cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29, 1138-1142.
43. Tian Y, Liang Z, Xu H, Mou Y, Guo C. Design, Synthesis and Cytotoxicity of Novel Dihydroartemisinin-Coumarin Hybrids via Click Chemistry. *Molecules*, 2016, 21, 758.
44. Yu H, Hou Z, Tian Y, Mou Y, Guo C. Design, synthesis, cytotoxicity and mechanism of novel dihydroartemisinin-coumarin hybrids as potential anti-cancer agents. *Eur J Med Chem*, 2018, 151, 434-449.
45. Peter S, Jama S, Alven S, Aderibigbe BA. Artemisinin and Derivatives-Based Hybrid Compounds: Promising Therapeutics for the Treatment of Cancer and Malaria. *Molecules*, 2021, 26(24), 7521.
46. Tien DD, Giang L, Anh D, Dung NT, Ha TN, Ha N, Phuong HT, Chinh PT, Van Kiem P, Van Tuyen N. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Artemisinin-triazole Hybrids. *Nat Prod Commun*, 2016, 11(12), 1789-1792.
47. Zhang L, Li D, Yu S. Pharmacological effects of harmine and its derivatives: a review. *Arch Pharm Res*, 2020, 43, 1259-1275.
48. Aaghaz S, Sharma K, Jain R, Kamal A.  $\beta$ -Carbolines as potential anticancer agents. *Eur J Med Chem*, 2021, 216, 113321.
49. Cao R, Chen Q, Hou X, Chen H, Guan H, Ma Y, Peng W, Xu A. Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted b-carboline derivatives. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12, 4613e4623.
50. Shahinas D, Liang M, Datti A, Pillai DR. A repurposing strategy identifies novel synergistic inhibitors of Plasmodium falciparum heat shock protein 90. *J Med Chem*, 2010, 53, 3552-3557.
51. Cowen LE, Lindquist S. Hsp 90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science*, 2005, 309, 2185-2189.
52. Pavithra SR, Kumar R, Tatu U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite Plasmodium falciparum. *PLoS Comput Biol*, 2007, 3, 1701-1715.

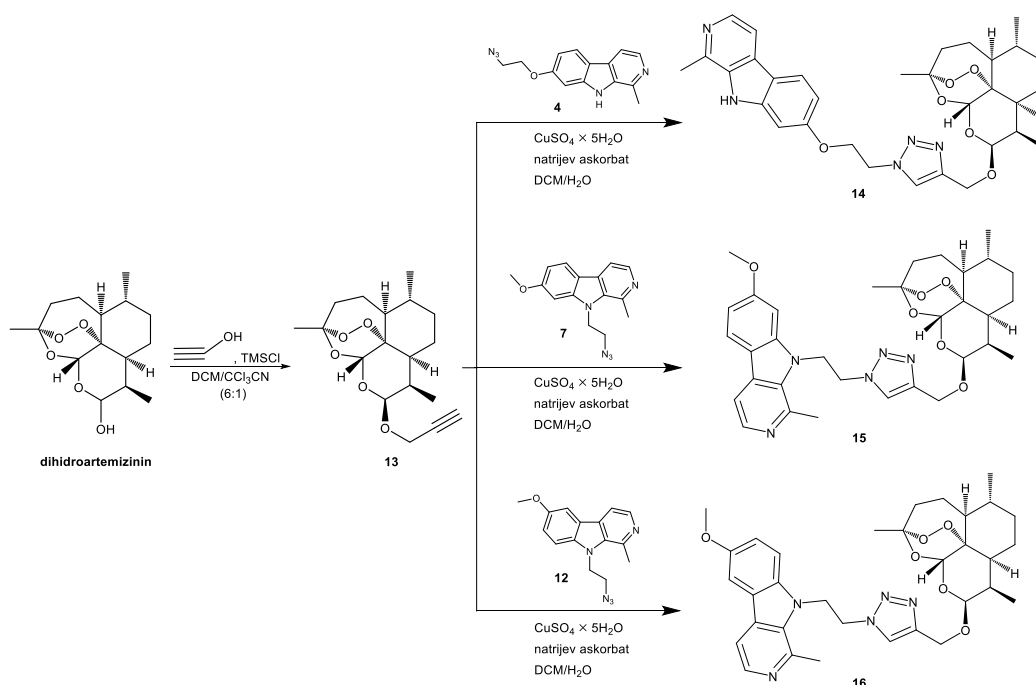
53. Soni JP, Yeole Y, Shankaraiah N.  $\beta$ -Carboline-based molecular hybrids as anticancer agents: a brief sketch. *RSC Med Chem*, 2021, 12(5), 730-750.
54. Kumar S, Singh A, Kumar K, Kumar V. Recent insights into synthetic  $\beta$ -carbolines with anti-cancer activities. *Eur J Med Chem*, 2017, 142, 48-73.
55. Evans RA. The rise of azide-alkyne 1,3-dipolar 'click' cycloaddition and its application to polymer science and surface modification. *Aust J Chem*, 2007, 60(6), 384-395.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. Kharb R, Sharma PC, Yar MS. Pharmacological significance of triazole scaffold. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2010, 26, 1-21.
61. Viegas-Junior C, Danuello A, da Silva Bolzani V, Barreiro EJ, Fraga CA. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr Med Chem*, 2007, 14(17), 1829-1852.
62. Goddard-Borger ED, Stick RV. An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Org Lett*, 2007, 9(19), 3797-3800.
63. 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.
64. Marinović M, Perković I, Fontinha D, Prudêncio M, Held J, Pessanha de Carvalho L, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić Z. Novel Harmicines with Improved Potency against *Plasmodium*. *Molecules*, 2020, 25(19), 4376.
65. Eagon S, Anderson MO. Microwave-Assisted Synthesis of Tetrahydro- $\beta$ -carbolines and  $\beta$ -Carbolines. *Eur J Org Chem*, 2014, 1653-1665.
66. Goswami L, Paul S, Kotammagari TK, Bhattacharya AK. Synthesis of artemisinin derived glycoconjugates inspired by click chemistry. *New J Chem.*, 2019, 43, 4017-4021.

## **8. SAŽETAK**

## Sinteza i karakterizacija harmizinina triazolskog tipa, hibridnih spojeva harmina i artemizininina

Terapija raka, po učestalosti drugog uzročnika smrti u svijetu, zbog nedovoljne selektivnosti, izražene toksičnosti i rezistencije na postojeće citostatike, postaje sve veći izazov. S druge strane, od malarije, zarazne tropske bolesti, godišnje premine preko 600 000 osoba, a terapija je otežana zbog pojave multirezistentnih parazita roda *Plasmodium*. Stoga je potrebno usmjeriti istraživanja prema pronalasku molekula s novim mehanizmima djelovanja.

Zbog dokazanih antimalarijskih i protutumorskih svojstava antimalarijskog lijeka artemizininina te  $\beta$ -karbolinskog alkaloida harmina, u ovom je radu prikazana sinteza njihovih hibrida - harmizinina. Cu(I) kataliziranom alkin-azid cikloadicijom (klik-reakcijom) alkina artemizininina **13** i azida  $\beta$ -karbolina **4**, **7** i **12**, preko triazolske poveznice, pripravljene su ciljane hibridne molekule **14-16** (Shema). Strukture nosintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, MS i IR). U daljnjim istraživanjima, koja nadilaze okvire ovog rada, ispitat će se njihovo protutumorsko i antimalarijsko djelovanje.



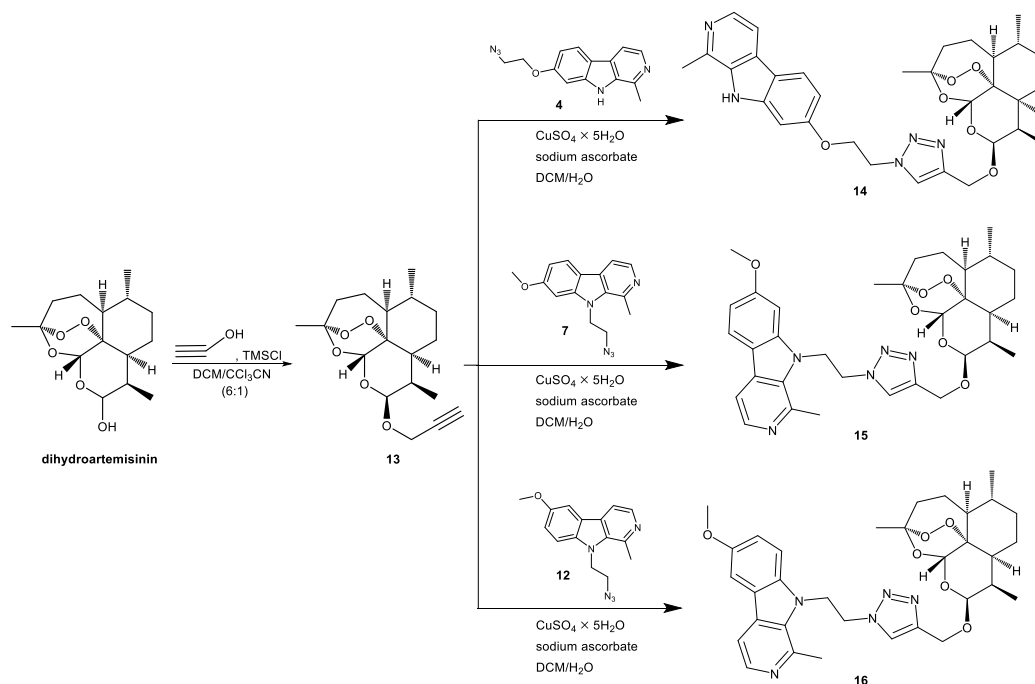
**Ključne riječi:** artemizinin, harmin, klik-kemija, rak, protutumorsko djelovanje, antimalarijsko djelovanje

## **9. SUMMARY**

## Synthesis and characterization of triazole type harmisinins, harmine and artemisinin hybrid drugs

Cancer is the second leading cause of death worldwide, and its therapy is becoming an increasing challenge due to inadequate selectivity, marked toxicity, and resistance to existing cytostatic drugs. On the other hand, malaria, a contagious tropical disease, kills over 600,000 people annually, and therapy is challenging due to the emergence of multidrug-resistant parasites of the genus *Plasmodium*. Therefore, it is necessary to direct research towards the discovery of molecules with new mechanisms of action.

Due to the well-documented antimalarial and antitumour properties of the antimalarial drug artemisinin and the  $\beta$ -carboline alkaloid harmine, the synthesis of their hybrids, harmisinins, is presented in this work. Cu(I)-catalyzed alkyne azide cycloaddition (click reaction) of artemisinin-based alkyne **13** and  $\beta$ -carboline-based azides **4**, **7** and **12** yielded target molecules **14-16**, linked *via* triazole linker (Scheme). The structures of the newly synthesized compounds were confirmed by the conventional analytical and spectroscopic methods ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, MS and IR). In further research, which is beyond the scope of this work, their antitumour and antimalarial activities will be investigated.

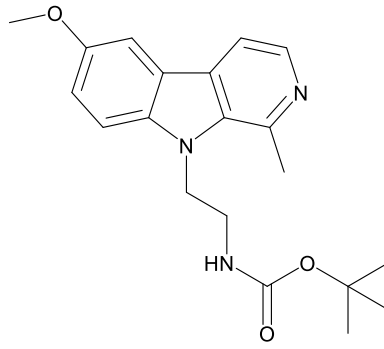


**Keywords:** artemisinin, harmine, *click*-chemistry, cancer, antitumour activity, antimalarial activity

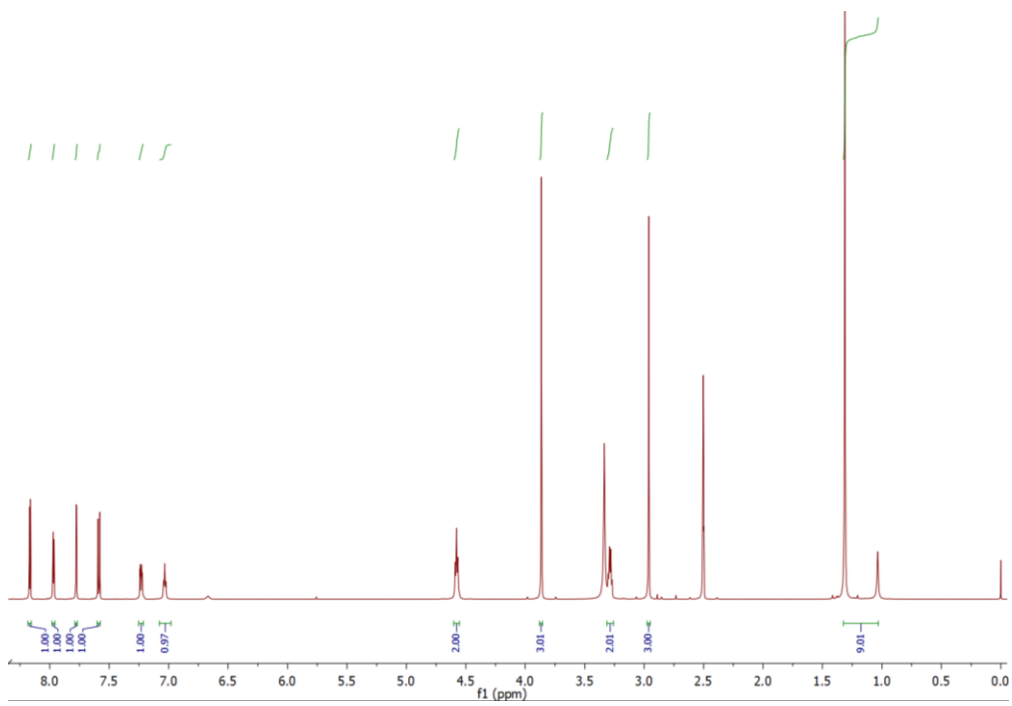
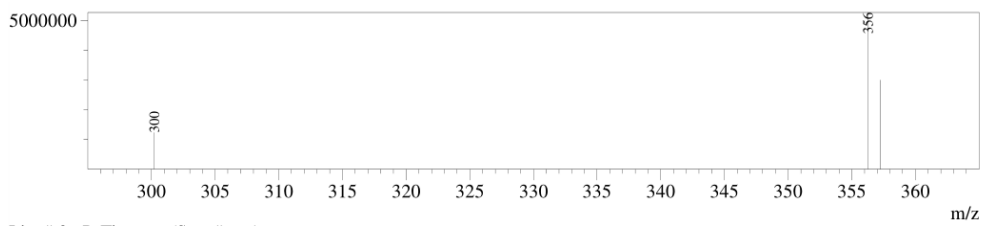
## **10. PRILOZI**

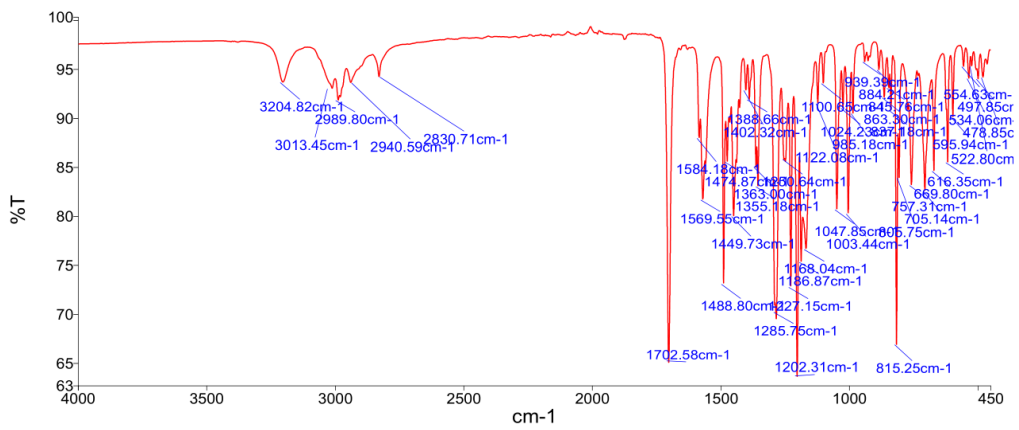
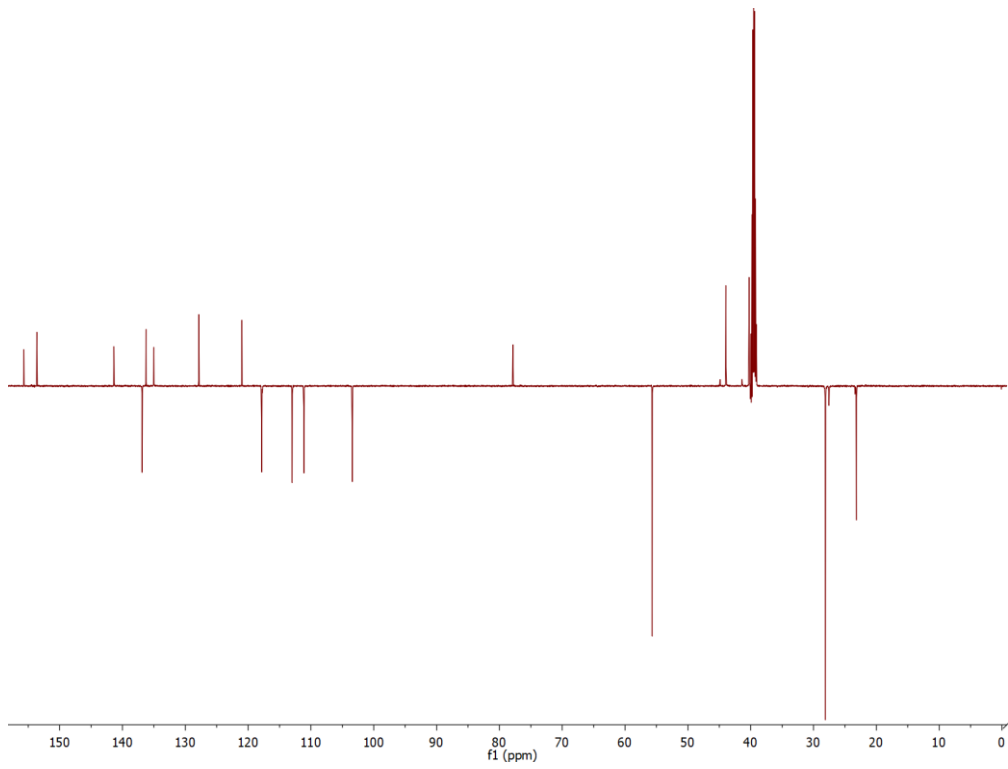


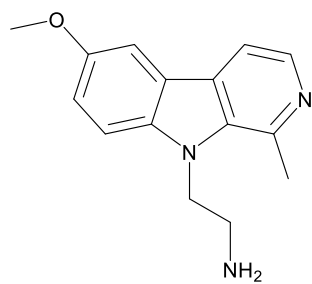
Prilozi sadrže  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS i IR spektre novosintetiziranih spojeva.



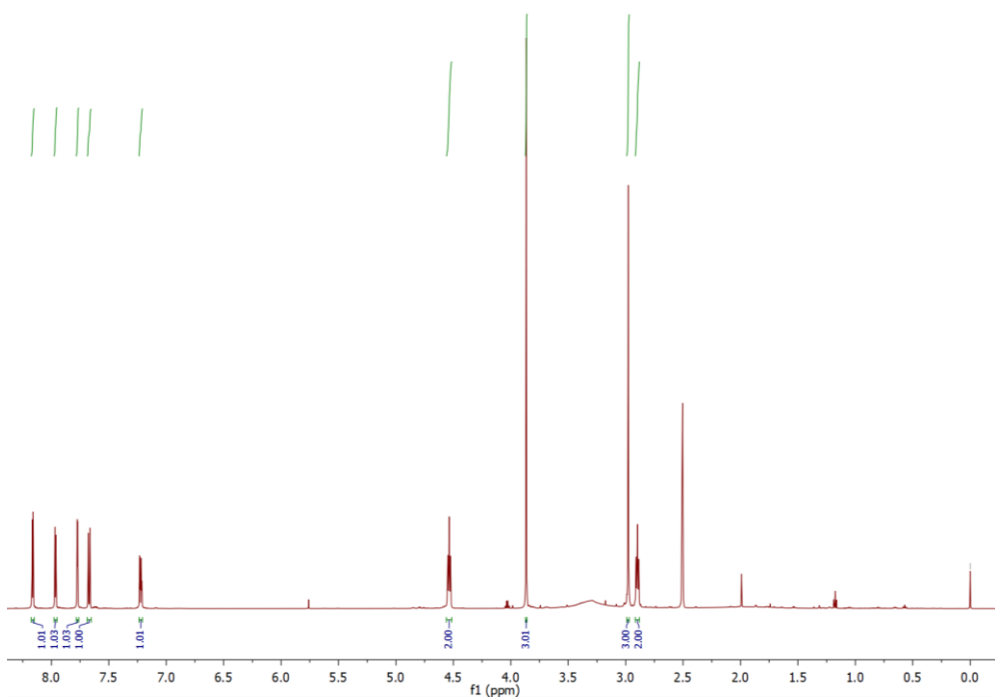
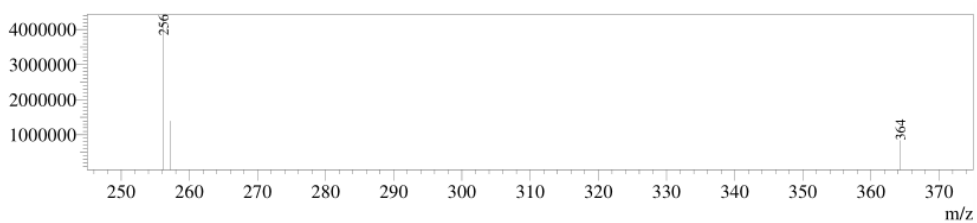
**10**

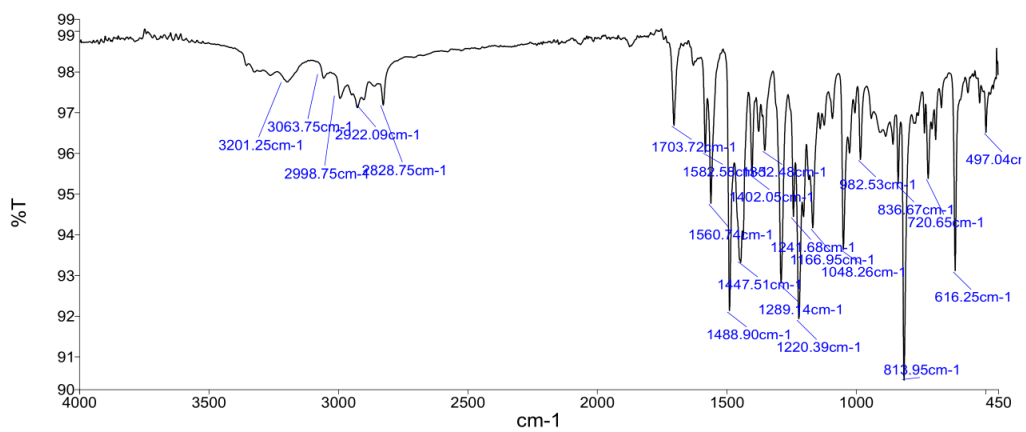
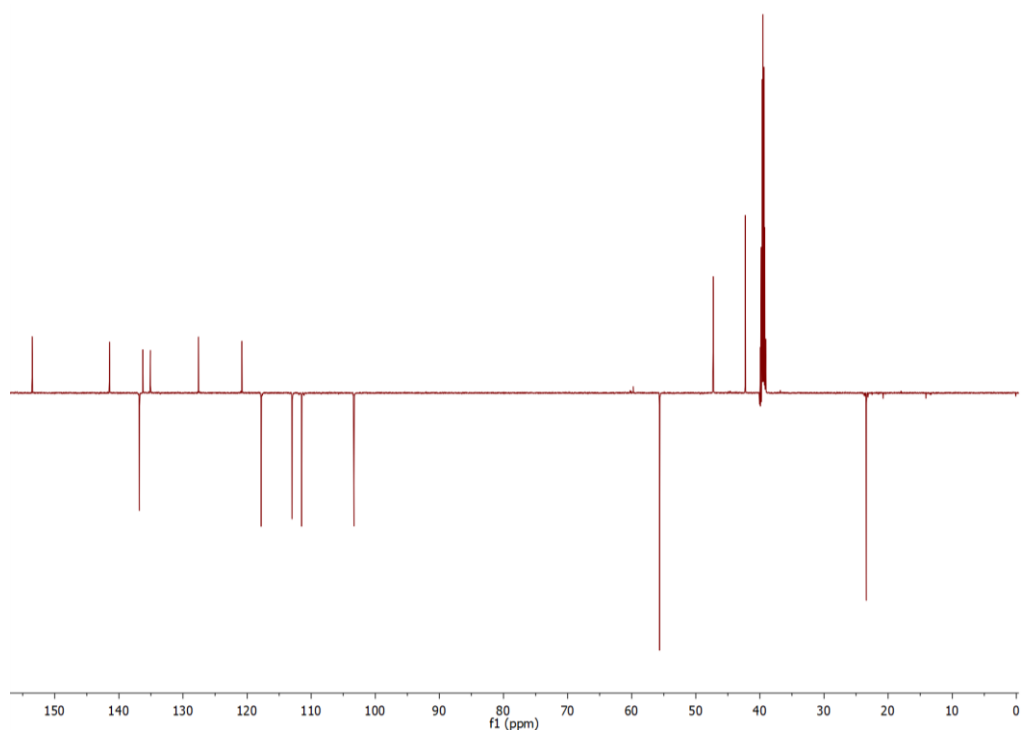


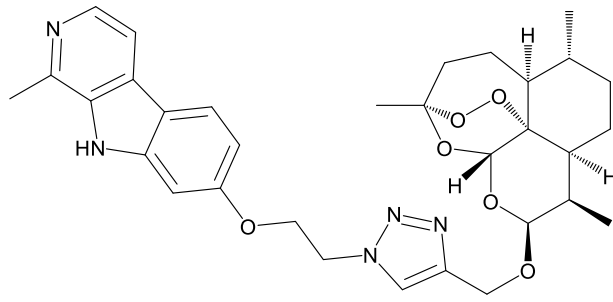




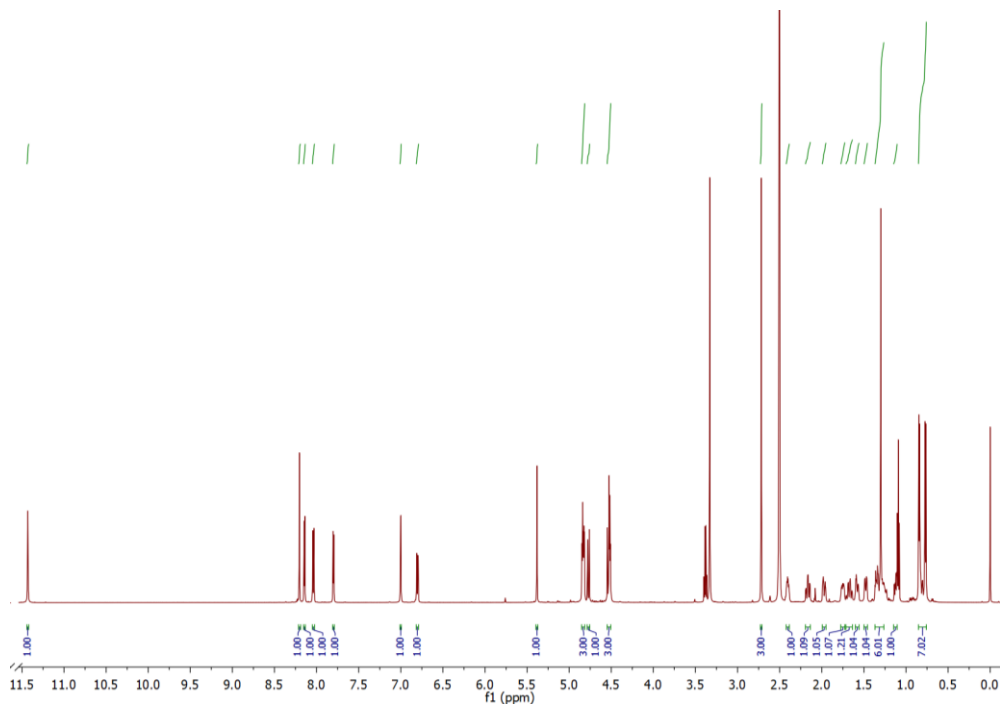
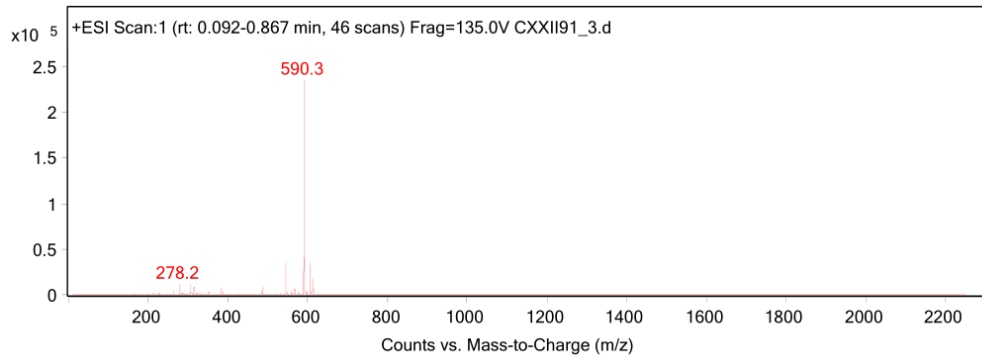
**11**

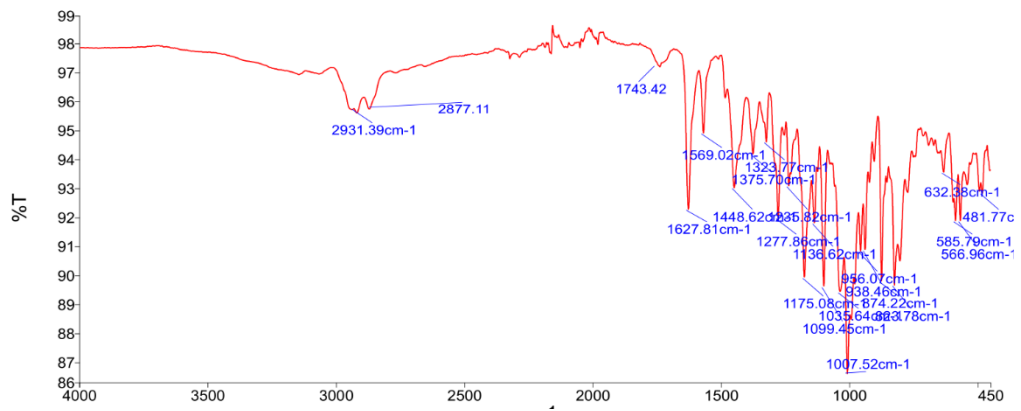
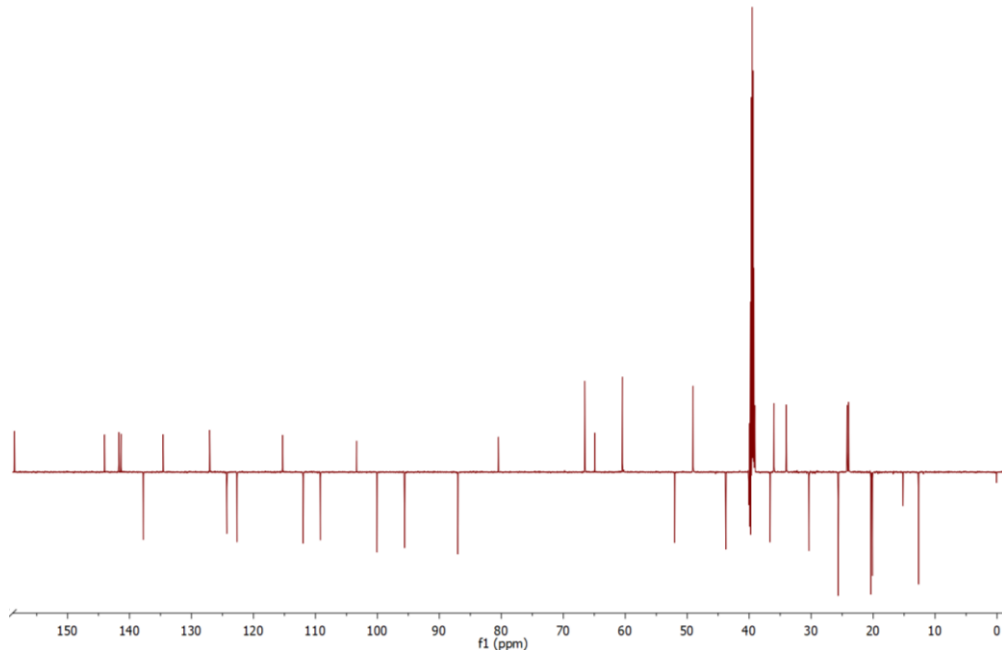


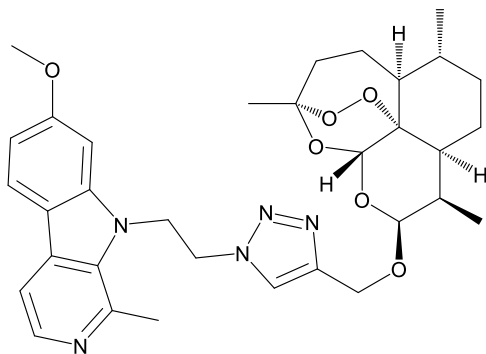




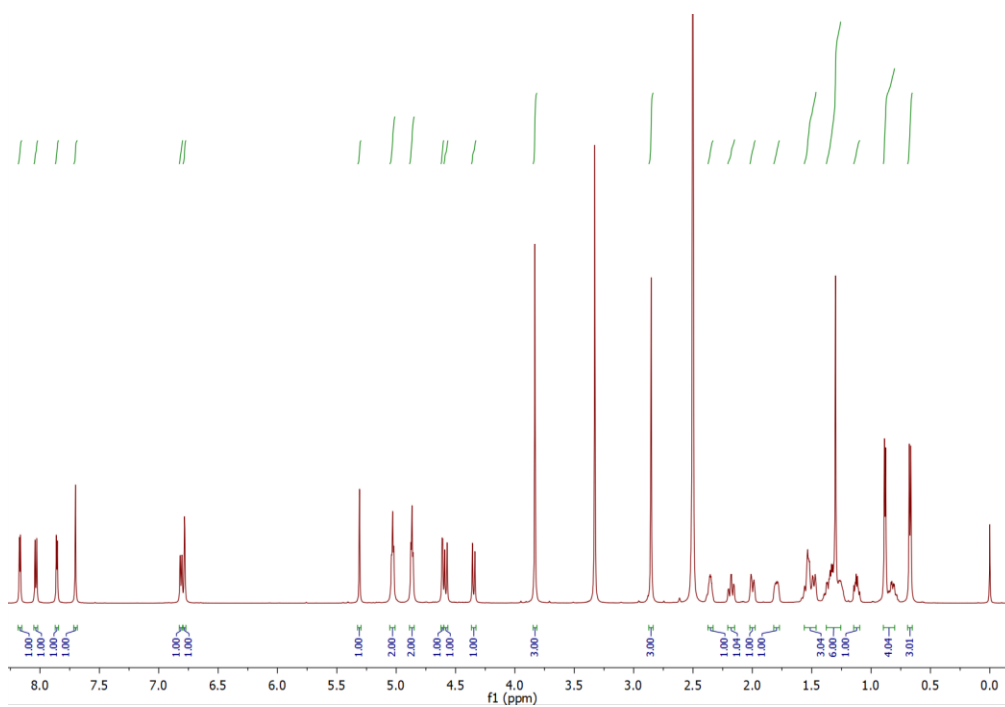
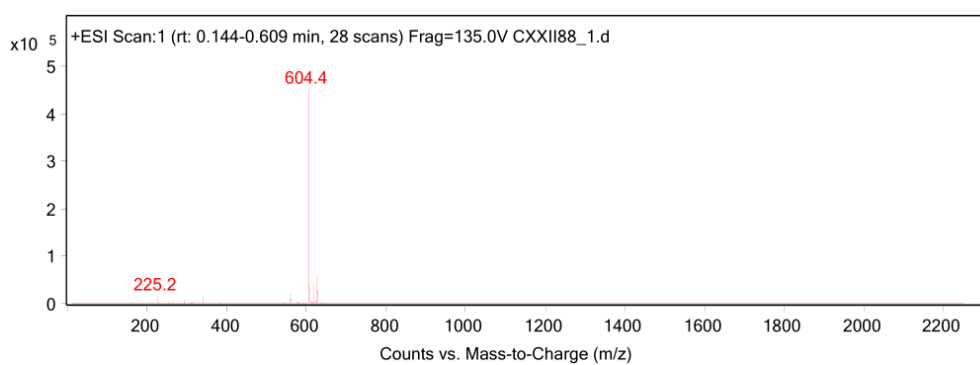
14



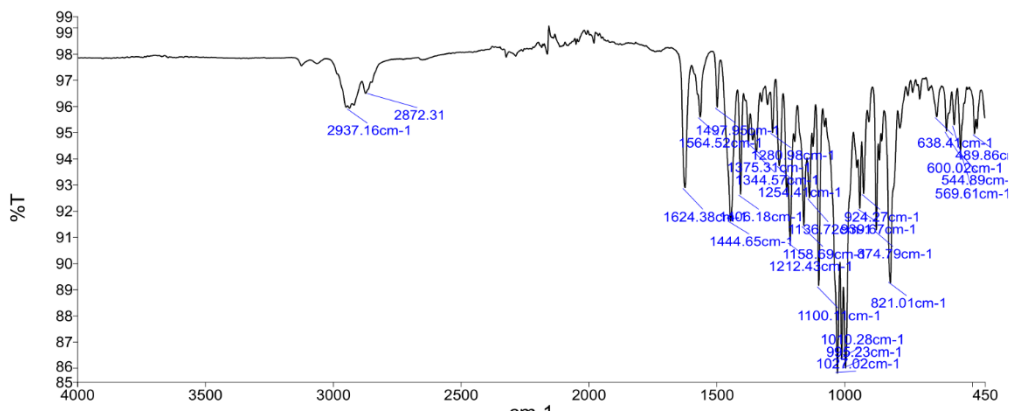
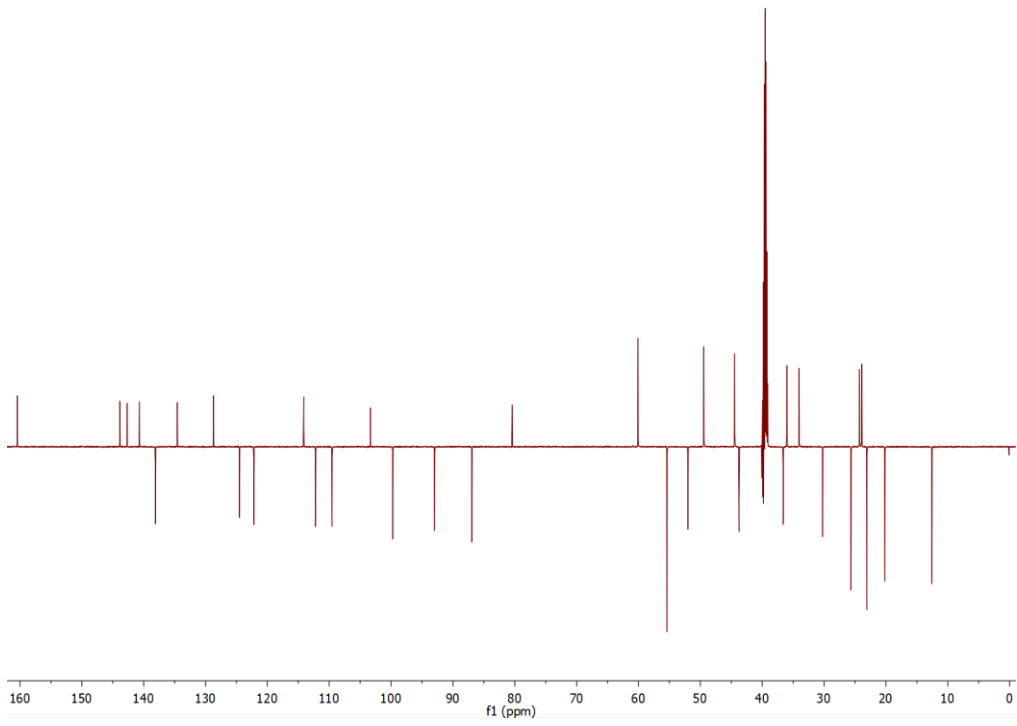


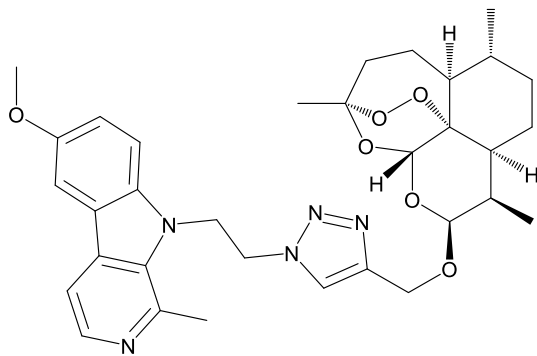


15









16

