

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

**Marko Dužević**

**Sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolskih  
derivata harmina i klorokina s potencijalnim  
antimalarijskim djelovanjem**

Zagreb 2020.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Perković i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

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



## KRATICE

5-HT <sub>2A</sub>	5-hidroksitriptaminski receptor 2A
ACE2	angiotenzin konvertirajući enzim 2
ACT	kombinirana terapija temeljena na artemisininu (engl. <i>artemisinin-based combination therapy</i> )
ADMP	2-azido-1,3-dimetil-imidazolin heksafluorofosfat
AL	artemeter + lumefantrin
aps.	apsorpcija
ASAQ	artesunat + amodiakin
ASMQ	artesunat + meflokin
ASSP	artesunat + sulfadoksin / pirimetamin
ATP	adenozin trifosfat
CAI	karboksiamidotriazol
COVID-19	koronavirusna bolest 2019 (engl. <i>coronavirus disease-19</i> )
CQ	klorokin
CuAAC	bakrom (I)-katalizirana alkin-azidna cikloadicija (engl. <i>copper(I)-catalyzed azidealkyne cycloaddition</i> )
CYP	citokrom P450
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en
DHA-PPQ	dihidroartemisinin + piperakin
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
ESI	ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>electrospray ionization</i> )

FLEX	fleksibilnost molekule koja je uvjetovana brojem rotirajućih veza
GABA	$\gamma$ -aminomaslačna kiselina (engl. <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i> )
GIT	gastro-intestinalni trakt
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
$IC_{50}$	koncentracija koja inhibira rast 50 % stanica
INSATU	zasićenost strukture koja odražava udio ugljika sa $sp^3$ -hibridnim orbitalama
INSOLU	topljivost molekule izražena preko logaritma topljivosti
IR	infracrvena spektroskopija
KMB	krvno-moždana barijera
LIPO	lipofilnost molekule izražena preko logaritma koeficijenta raspodjele (XLOGP3)
MAO-A	monoaminooksigenaza A
MR	molekularna refraktivnost
MS	masena spektrometrija
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PA	artesunat + pironaridin
<i>Pf</i> HSP90	protein toplinskog šoka (engl. <i>heat shock protein</i> ) 90 vrste <i>Plasmodium falciparum</i>
PGP	P-glikoprotein
$pK_a$	negativni logaritam (po bazi 10) konstante disocijacije kiseline ( $K_a$ )
POLAR	polarnost molekule izražena preko topološke polarne površine (TPSA)

SAR	odnos kemijske strukture i biološke aktivnosti (engl. <i>structure activity relationship</i> )
SIZE	veličina molekule izražena kao molekulska masa
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TPSA	topološka polarna površina molekule
TSAO	<i>tert</i> -butildimetilsilil-spiroaminooksatioldioksid
$t_i$	temperatura taljenja
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 Malaria.....	- 2 -
1.1.1 Razvoj rezistencije .....	- 3 -
1.2 Harmin .....	- 4 -
1.3 Klorokin.....	- 6 -
1.4 Click-kemija .....	- 7 -
1.5 Triazoli.....	- 8 -
1.5.1 1,2,3-Triazolski derivati klorokina s antimalarijskim djelovanjem .....	- 10 -
<b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>- 20 -</b>
3.1 Sinteza 4-azido-7-klorokinolina (1).....	- 23 -
3.2 Sinteza 2-((7-klorokinolin-4-il)amino)etanola (2).....	- 24 -
3.3 Sinteza <i>N</i> -(2-azidoetil)-7-klorokinolin-4-amina (3).....	- 25 -
3.4 Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (4).....	- 26 -
3.5 Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (5).....	- 27 -
3.6 Sinteza 9-((1-(7-klorokinolin-4-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> - pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (6) .....	- 28 -
3.7 Sinteza 7-kloro- <i>N</i> -(2-(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)etil)kinolin-4-amina (7).....	- 29 -
3.8 Sinteza 7-((1-(7-klorokinolin-4-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-1-metil- 9 <i>H</i> pirido[3,4- <i>b</i> ]indola (8).....	- 30 -
3.9 Sinteza 7-kloro- <i>N</i> -(2-(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)etil)kinolin-4-amina (9) .....	- 31 -
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>- 33 -</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>- 46 -</b>
<b>6. ZAHVALE</b> .....	<b>- 48 -</b>
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>- 50 -</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>- 57 -</b>

<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>- 60 -</b>
<b>10. PRILOZI</b> .....	<b>- 63 -</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>- 83 -</b>



## **1. UVOD**

## 1.1 Malarija

Malarija je zarazna bolest uzrokovana parazitom iz roda *Plasmodium* koja se prenosi na čovjeka putem ugriza inficirane ženke komarca iz roda *Anopheles*. Malariju kod ljudi uzrokuje pet vrsta roda *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* te *P. knowlesi*). *P. vivax* odgovoran je za 80% svih slučajeva malarije jer ova vrsta ima najširu rasprostranjenost – nalazimo je u tropima, suptropima i umjerenim zonama. Ipak, *P. falciparum* uzrokuje najtežu kliničku sliku te ima najveću stopu smrtnosti [1]. Endemična malarija, tj. malarija koja je stalno prisutna na nekom području, postoji u većini afričkih zemalja južno od Sahare, u tropskim i suptropskim područjima južne i srednje Amerike, istočnom Mediteranu, jugoistočnoj Aziji i na zapadnom Pacifiku.

Životni ciklus parazita sastoji se od spolne i nespolne faze. Započinje kada ženka komarca ubode osobu zaraženu malarijom i usiše krv koja sadrži gametocite parazita. Oni zatim dospiju u žlijezde slinovnice komarca gdje dolazi do oplodnje i nastanka oociste sa sporozoitima. Tu započinje nespolna faza razvoja. Nakon što komarac ugize drugog čovjeka, sporozoiti ulaze u krvotok kojim dolaze do hepatocita jetre gdje se nespolno razmnožavaju izvaneritocitnom shizogonijom. Kod vrsti *P. vivax* i *P. ovale* u jetri može nastati mirujući stadij, hipnozoit, koji se može aktivirati tjednima ili čak godinama kasnije. Uglavnom se sporozoiti razvijaju u merozoite koji uzrokuju rupturu hepatocita i ponovno ulaze u krvotok inficirajući eritrocite. U eritrocitima se merozoiti pretvaraju u trofozoite koji se nespolno razmnožavaju eritrocitnom shizogonijom pri čemu nastaju novi merozoiti koji mogu napadati druge eritrocite. Dio merozoita se dalje razvija u gametocite koji putem krvi opet završavaju u komarcu čime se ciklus zatvara [2]. Ovaj ciklus se s obzirom na mjesto sazrijevanja i razmnožavanja dijeli na dvije faze pa razlikujemo egzoeritocitu (hepatocitnu) i eritrocitnu (krvnu) fazu. Klinička slika bolesti je vrlo nespecifična (groznica, vrućica, prenojavanje, glavobolja, mučnina, povraćanje, bol u cijelom tijelu te opća slabost) pa se dijagnoza postavlja na temelju pozitivnog nalaza parazita u krvi, a ne na temelju simptoma. Uznapredovalu bolest karakteriziraju još i anemija, žutica, splenomegalija, hepatomegalija i malarijski paroksizam [3].

Koliko je malarija raširena bolest govori podatak da je u 2018. bilo procijenjeno 228 milijuna slučajeva malarije diljem svijeta, od čega je 405 000 slučajeva završilo smrću. Posebno valja naglasiti da su djeca mlađa od 5 godina i trudnice najugroženije skupine pogođene ovom bolešću. U 2018. godini oni su činili 67% (272 000) svih smrtnih slučajeva od malarije u

svijetu [4]. Malarija zauzima 6. mjesto na listi 10 najčešćih uzroka smrti u zemljama s niskim stupnjem razvoja u 2016. godini [5] te predstavlja najopasniju parazitsku bolest od koje umire više ljudi od bilo koje druge zarazne bolesti (izuzev tuberkuloze) [6].

Danas se, prema važećim smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO), terapija nekomplikirane malarije uzrokovane klorokin otpornim *P. falciparum*, provodi kombiniranom terapijom temeljenom na artemisininu (engl. *artemisinin-based combination therapy*, ACT protokol) što podrazumijeva trodnevnu terapiju kombinacijom lijekova; brzodjelujućih derivata artemisinina i dugodjelujućih antimalarika (Tablica 1.). Artemisininska komponenta unutar prvih 48 sati brzo uklanja parazite iz krvi, a aktivna je i protiv spolnih stadija parazita koji sudjeluju u daljnjem prijenosu na komaraca. Dugodjelujući derivati uništavaju preostale parazite i preveniraju razvoj rezistencije na derivate artemisinina. Također, pružaju i razdoblje profilaksije nakon dovršetka liječenja [7]. Artemisininski su derivati letalni za parazit jer svojim aktivnim oblikom uzrokuju alkilaciju biomakromolekula (hema, proteina i lipida) uzrokujući oksidativni stres i smrt stanice [8].

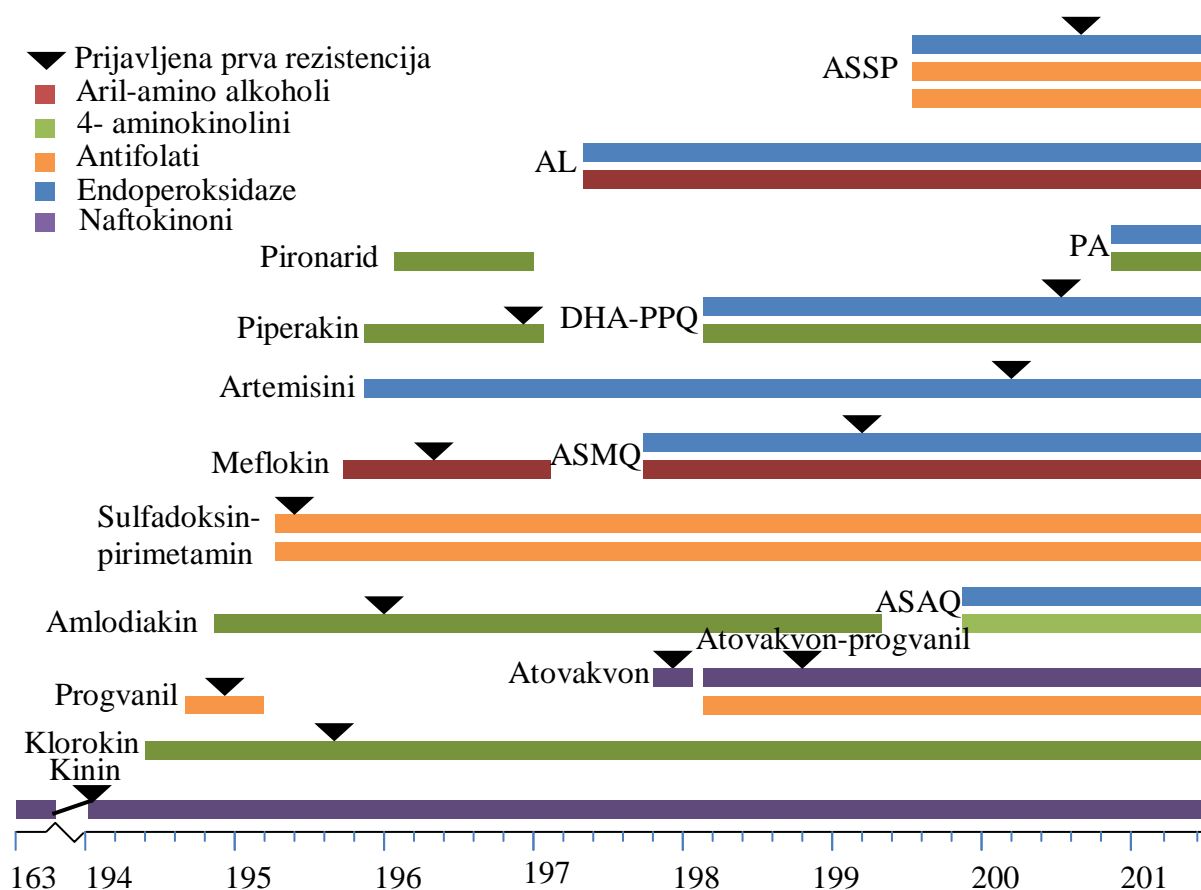
**Tablica 1.** Kombinacije lijekova u terapiji *P. falciparum* otpornog na klorokin

<b>artemeter + lumefantrin</b>
<b>artesunat + amodiakin</b>
<b>artesunat + meflokin</b>
<b>artesunat + sulfadoksin–pirimetamin (SP)</b>
<b>dihidroartemisinin + piperakin</b>

### 1.1.1 Razvoj rezistencije

Iako su derivati artemisinina pokazali veliku djelotvornost u vidu vrlo brzog klirensa parazita, kao njihov veliki nedostatak pokazala se pojava rezistencije u Kambodži prvi put prijavljena 2009. godine (Slika 1.) [9]. Utvrđeno je da je kod nekih pacijenata liječenih s ACT došlo do produženja vremena potrebnog za redukciju broja parazita za 50% (engl. *parasite clearance rate*) [10]. Smatra se da je Kelch-like protein K13 ključan za pojavu rezistencije u jugoistočnoj Aziji što je utvrđeno modifikacijom pripadajućeg gena [11].

Sve navedene činjenice ukazuju na važnost ulaganja u razvoj antimalarika jer, iako je došlo do pozitivnog napretka po pitanju liječenja i prevencije u proteklom desetljeću, i dalje postoji problem rezistencije, kako na ACT, zlatni standard antimalarijske terapije, tako i na ostale postojeće antimalarike. Upravo zato potrebno je razvijati nove lijekove i to s novim mehanizmima djelovanja.



**Slika 1.** Povijest uvođenja antimalarika i prvih pojava rezistencije na te lijekove [9].Kratice:

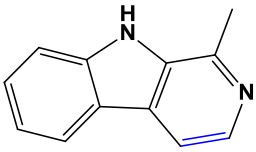
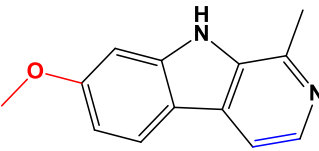
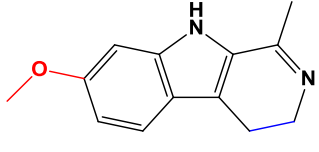
**AL** (artemeter + lumefantrin), **ASAQ** (artesunat + amodiakin) , **ASMQ** (artesunat + meflokin), **ASSP** (artesunat + sulfadoksin – pirimetamin), **DHA-PPQ** (dihidroartemisinin + piperakin), **PA** (artesunat + pironaridin)

## 1.2 Harmin

Harmin je spoj iz porodice  $\beta$ -karbolinskih alkaloida izoliran iz ekstrakata listova biljnih vrsti *Guiera senegalensis* i *Peganum harmala*. Ovi vazdazeleni grmovi potječu iz područja tropske Afrike gdje se koriste kao tradicionalni lijek za liječenje gastrointestinalnih poremećaja,

respiratornih infekcija, reumatizma i malarije [12]. Utvrđeno je, kako su za antimalarijsko djelovanje ekstrakata ovih biljaka, odgovorni spoj harman i njegovi  $\beta$ -karbolinski derivati (harmin i harmalin) (Tablica 2.) [13].

**Tablica 2.** Prikaz struktura i djelovanja spojeva s antimalarijskim potencijalom izoliranih iz biljnih vrsta *G. senegalensis* i *P. harmala*. Bojom su istaknute razlike u strukturi. (Izvor: PubChem)

	HARMAN	HARMIN	HARMALIN
SPOJ			
DJELOVANJE	<ul style="list-style-type: none"> <li>- reverzibilni inhibitor enzima MAO</li> <li>- inverzni agonist benzodiazepinskog mjesta GABA-a receptor</li> <li>- neurotoksin</li> <li>- mutagen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- inhibitor enzima MAO</li> <li>- antagonist 5-hidroksitriptamina</li> <li>- halucinogen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- reverzibilni inhibitor enzima MAO</li> <li>- inhibitor acetilkolinesteraze</li> <li>- stimulans središnjeg živčanog sustava</li> </ul>

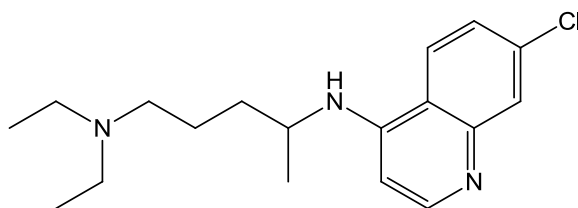
Pretpostavka je da se to djelovanje ostvaruje inhibicijom ATP-vezujuće domene heat shock proteina 90 *P. falciparum* (*PfHsp90*) [14]. Riječ je o proteinu koji prvenstveno služi kao šaperon (protein koji omogućuje pravilno savijanje polipeptidnog lanca proteina, dovodeći ga u stabilnu i aktivnu konformaciju). Uz navedeno, *PfHsp90* omogućuje i regulaciju toplinskog šoka te svojom aktivnošću pojačava patogenost i otpornost na lijekove [15, 16]. Upavo zato, inhibicija Hsp90 mogla bi dovesti do smanjenja rezistencije parazita na antimalarike.

Međutim, uz korisna djelovanja, dokazano je kako harman ima i karcinogena te genotoksična svojstva [17, 18], dok se harmalol veže za ljudski Hsp90 (*HsHsp90*) većim afinitetom od

parazitne varijante [14]. Stoga, jedino harmin ima potencijal kao spoj uzor (engl. *lead compound*) u daljnjem razvoju novih antimalarika. Računalnim doking studijama utvrđena je interakcija metoksi skupine harmina i gvanidinske skupine arginina na položaju 98. u veznom mjestu za ATP *PfHsp90*-a. Računalne studije potvrđene su i eksperimentalno [19].

### 1.3 Klorokin

Klorokin (Slika 2.) je sintetički 4-supstituirani aminokinolin razvijen 1940-ih kao zamjena za kinin koji se do tada koristio u profilaksi i liječenju malarije. Veže se na hematin u malarijskim intraeritocitnim trofozoitima i tako sprječava njegovo vezanje na hem polimerazu, enzim koji sudjeluje u metabolizmu hemoglobina kojeg *Plasmodium* koristi kao izvor aminokiselina [20]. Vezanjem na hematin, prekida se metabolizam toksičnog hema u netoksičan oblik (hemzoin) pa dolazi do njegovog nakupljanja i generiranja reaktivnih kisikovih radikala koji oštećuju hranidbenu vakuolu parazita uzrokujući njegovu smrt [21]. Lijek (slaba baza) pasivnom difuzijom prodire u kiselu hranidbenu vakuolu gdje se protonira i tako ostaje trajno "zatočen" unutar lizosoma [20].



**Slika 2.** Struktura klorokina

Iako je po strukturi sličan kininu, u odnosu na njega klorokin ima bolja farmakokinetiska svojstva što ga čini boljim izborom za antimalarijsku profilaksu i liječenje [22].

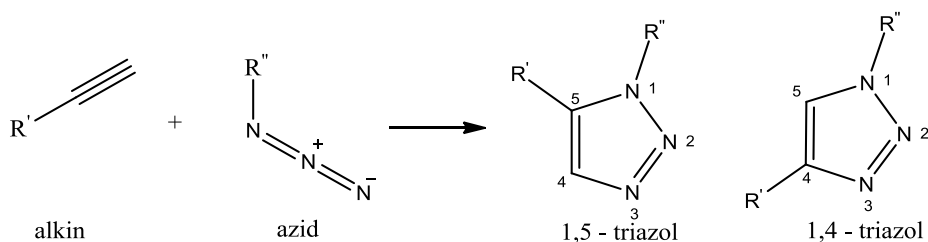
Osim antimalarijskog djelovanja, zbog protuupalnog i imunosupresivnog djelovanja, klorokin se koristi kao dio kompleksne terapije u liječenju sistemskog lupus eritematosusa, reumatoidnog artritisa i osteoartritisa. Međutim, uporaba ovog lijeka u borbi protiv navedenih bolesti ima mnoga ograničenja zbog njegove toksičnosti [23]. Zanimljivo je da klorokin inhibira glikozilaciju ACE2, receptora preko kojeg SARS-CoV-2 ulazi u stanicu [24], pa je njegov derivat, hidroksiklorokin, bio jedan od prvih lijekova na kojem su se provodila klinička istraživanja učinkovitosti liječenja COVID-19, zarazne bolesti s kojom se bori cijeli svijet u pandemiji nezapamćenih razmjera [25].

Treba reći kako je i na ovaj lijek zabilježena rezistencija davnih 1950-ih, a očituje se kao povećana tolerancija parazita na terapijske koncentracije lijeka. Kao potencijani razlozi navode se: povećanje  $pH$  unutar hranidbene vakuole, promjenjeno mjesto vezanja te brži metabolizam i eliminacija lijeka iz stanice [20].

#### 1.4 Click-kemija

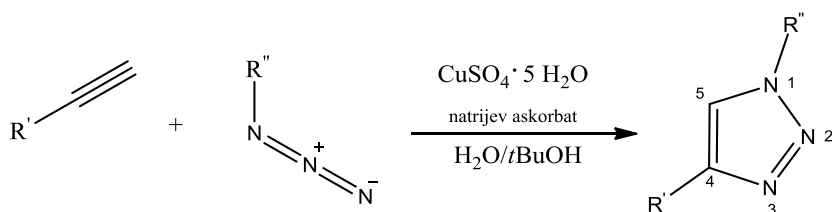
Tijekom optimiranja strukture vodećih spojeva u istraživanju i razvoju lijekova, glavni je cilj obuhvatiti što veći dio kemijskog prostora i u što kraćem vremenu sintetizirati velik broj novih spojeva (knjižnice spojeva) sa željenim svojstvima. Stoga je važno stalno razvijati nove metode sinteze koje će pokazati široku primjenjivost, pouzdanost, učinkovitost i selektivnost kemijskih reakcija te doprinijeti bržoj izgradnji novih molekula. Upravo je jednu takvu revolucionarnu metodu iznjedrio rad Sharplessa i suradnika koji su, otkrićem bakrom (I)-katalizirane alkin-azidne cikloadicije (*CuAAC*), uveli potpuno novi kemijski koncept nazvan click-kemija [26]. Da bi neku reakciju mogli nazvati click-reakcijom, ona mora biti modularna i stereospecifična (ali ne nužno i enantioselektivna) te mora imati širok opseg i veliko iskorištenje (visok prinos). Pritom smiju nastajati samo neškodljivi nusprodukti koji se mogu ukloniti nekromatografskim metodama. Nadalje, uvjeti takve reakcije trebaju biti jednostavni, reakcija neosjetljiva na kisik i vlagu, a polazne tvari i reagensi lako dostupni. Reakcija se ne smije odvijati u prisustvu uobičajenih industrijskih otapala pa se koriste neškodljiva otapala (poput vode) ili otapala koja se lako uklanjaju. Naposljetku, izolacija konačnog proizvoda treba biti moguća destilacijom ili kristalizacijom [26].

*CuAAC*, kao jedna od najistraženijih *click*-reakcija, unaprijedila je do tad korištenu 1,3-dipolarnu cikloadiciju, također poznatu i kao Huisgenova alkin-azidna cikloadicija, čiji su glavni nedostaci bili: nastanak regioselektivnih (1,4- i 1,5-supstituiranih) produkata (Slika 3.), vrijeme reakcije (oko 18 h) i provođenje reakcije na povišenoj temperaturi (oko 98°C) [27]. Naime, otkriveno je da upotreba soli bakra (I) ubrzava ovu cikloadiciju 10 milijuna puta te isključuje potrebu za zagrijavanjem. Najvažnija prednost korištenja soli bakra (I) u reakciji je postizanje regioselektivnosti; u reakciji kao produkt nastaje samo 1,4-regioizomer [28, 29].



**Slika 3.** Huisgenova alkin-azidna cikloadicija s regioneselektivnim produktima (R' i R'' su supstituenti koji se žele povezati u jednu molekulu)

Standardni katalitički sustav *CuAAC* podrazumijeva bakrove (II) soli (npr. bakrov (II) sulfat pentahidrat ili bakrov (II) acetat) u prisutnosti reducirajućeg agensa (natrijevog askorbata ili elementarnog bakra). Reducirajući agens se dodaje kako bi se bakar (II) konstantno reducirao do bakra (I) održavajući tako visoke razine katalitičkih vrsta. Kao otapalo upotrebljava se smjesa *tert*-butanola i vode jer pod tim uvjetima nije potrebno koristiti bazu za stvaranje bakrovog acetilida. Ova se smjesa može koristiti i za lipofilne spojeve. Kada se vodeni uvjeti iz nekog razloga ne mogu koristiti, koriste se organska otapala (npr. tetrahidrofur, toluen, diklormetan, acetonitril) u prisutnosti stehiometrijske količine bakrove (I) soli (npr. CuI, Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, CuBr(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> ili CuIP(OEt)<sub>3</sub>) i suviška baze (obično se koriste tercijarni amini kao npr. TEA ili DIPEA) [30]. Reakcijom dvaju fragmenata koji sadrže alkin i azid, u navedenim uvjetima nastaje 1,2,3-triazol koji preko položaja 1 i 4 povezuje ta dva fragmenta. (Slika 4.).



**Slika 4.** Primjer *CuAAC* (R' i R'' su fragmenti koji se žele povezati u jednu molekulu) [31]

## 1.5 Triazoli

Triazoli su peteročlani heterociklički prstenovi koji u svojoj strukturi sadrže tri atoma dušika. Postoje dva tipa ovisno o položaju atoma dušika. Razlikujemo 1,2,3 i 1,2,4 triazole Utvrđeno je kako su ovi heterocikli vrlo otporni na kiselu i bazičnu hidrolizu te da su stabilni u redukcijskim i oksidirajućim uvjetima, što je rezultat visoke aromatske stabilizacije. Nadalje,



imaju visoki dipolni moment, a to im omogućuje sudjelovanje u dipol-dipol i  $\pi$ - $\pi$  interakcijama te stvaranje vodikovih veza. Navedene interakcije čine spojeve s triazolima u svojoj strukturi dobro topljivima te im omogućuju vezanje s različitim enzimima i receptorima kao metama lijekova. Naposljetku, treba reći i kako su triazoli relativno otporni na metaboličku razgradnju, što je poželjna karakteristika svakog lijeka [32, 33]. Sve navedene karakteristike razlog su zašto triazole možemo pronaći kao sastavni dio mnogih važnih biološki aktivnih spojeva od kojih se neki već nalaze u terapiji a mnogi su još u različitim fazama razvoja (Tablica 3.) [34]. Uvođenje triazola u postojeće strukture potencijalnih lijekova dovodi do jačanja djelovanja i/ili smanjenja toksičnosti. Ova strategija primjenjuje se u svrhu optimiranja farmakoloških svojstava novih lijekova [35].

**Tablica 3.** Lijekovi koji u svojoj strukturi imaju triazol [35, 36, 37]

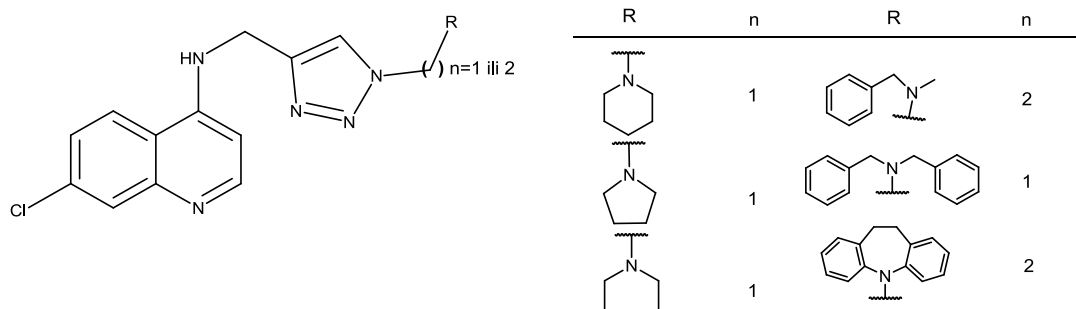
<b>Derivati 1,2,4-triazola</b>	
<b>alprazolam</b> (lijek za smirenje)	<b>etoperidon</b> (antidepresiv)
<b>estazolam</b> (hipnotik, sedativ, sredstvo za smirenje)	<b>nefazodon</b> (antidepresiv, 5-HT <sub>2A</sub> -antagonist)
<b>rilmazafon</b> (hipnotik, anksiolitik, sedativ)	<b>anastrozozol, letrozol, vorozol</b> (antitumorski lijekovi, nesteroidni kompetitivni inhibitori aromataze)
<b>benatradin</b> (diuretik)	<b>ribavirin</b> (antivirotik)
<b>trapidil</b> (hipotenziv)	<b>flukonazol, itrakonazol, terkonazol, vorikonazol i posakonazol</b> (antimikotici)
<b>trazodon</b> (anksiolitik)	
<b>Derivati 1,2,3-triazola</b>	
<b>karboksiamidotriazol</b> (CAI) (antitumorski lijek)	<b>tazobaktam</b> ( $\beta$ -laktamski antibiotik)
<b>tert-butildimetilsilil-spiroaminooksatioldioksid</b> (TSAO) (nenuklozidni inhibitor reverzne transkriptaze HIV-a)	<b>cefatrizin</b> (cefalosporin)

### 1.5.1 1,2,3-Triazolski derivati klorokina s antimalarijskim djelovanjem

Rezistencija na najvažnije novije lijekove za liječenje malarije (ACT) snažan je poticaj za razvoj novih antimalarika pa se danas brojne istraživačke skupine bave sintezom spojeva s djelovanjem na rezistentne sojeve. Često primjenjivana metoda u potrazi za novim antimalaricima je molekularna hibridizacija koja podrazumijeva oblikovanje novih kemijskih entiteta kovalentnom fuzijom dva ili više aktivnih spojeva i/ili farmakofora s željenim aktivnostima. Na taj način nastaju nove hibridne molekule koje ciljaju više meta odjednom te imaju veću djelotvornost i smanjen broj neželjenih nuspojava. S druge strane, upravo se click-kemija pokazala korisnom u spajanju dva različita fragmenta u jednu molekulu [38].

U prošlosti je klorokin bio prvi izbor za terapiju zbog svog dobrog sigurnosnog profila, djelotvornosti i jeftine proizvodnje [39,40] te je i dan danas vrlo često ishodišna molekula za razvoj novih alternativnih antimalarika za rezistentne sojeve. U sljedećih nekoliko odlomaka biti će opisani neka od mnogobrojnih istraživanja koja su se bavila ovom tematikom. Treba napomenuti kako je, u gotovo svim navedenim radovima, aktivnost novosintetiziranih molekula bila ispitivana na 3D7 i W2 klorokin-osjetljivim te Dd2 i NF54 klorokin-rezistentnim sojevima *Plasmodium falciparum* uz artesunat i klorokin kao referentne spojeve.

Otprije je poznato kako su se hibridni spojevi koji sadrže 7-klorokinolinsku jezgru i dibenzilne ili velike aromatske amine pokazali kao obećavajući spojevi za inhibiciju rezistentnih sojeva. Na tragu toga, Taleli i suradnici sintetizirali su malu knjižnicu od petnaest kratkolančanih klorokinskih derivata koje su preko triazolske poveznice spojili s malim heterociklima i/ili aromatskim aminima. Glavni prekursor je bio 7-kloro-*N*-(prop-2-in-1-il)kinolin-4-amin na koji su bakrom posredovanom click reakcijom adirani različiti 1,2- i 1,3.-azidoamini. Od petnaest novosintetiziranih klorokinskih derivata s bis-triazolnim motivom, deset njih pokazalo je značajniju vrijednost  $IC_{50}$  naspram klorokin rezistentnih sojeva Dd2 *Plasmodium falciparum*. Šest spojeva bilo je 3-5 puta aktivnije od klorokina, ali, nažalost, i dalje 2-3 puta slabijeg djelovanja od artesunata (Slika 5.).

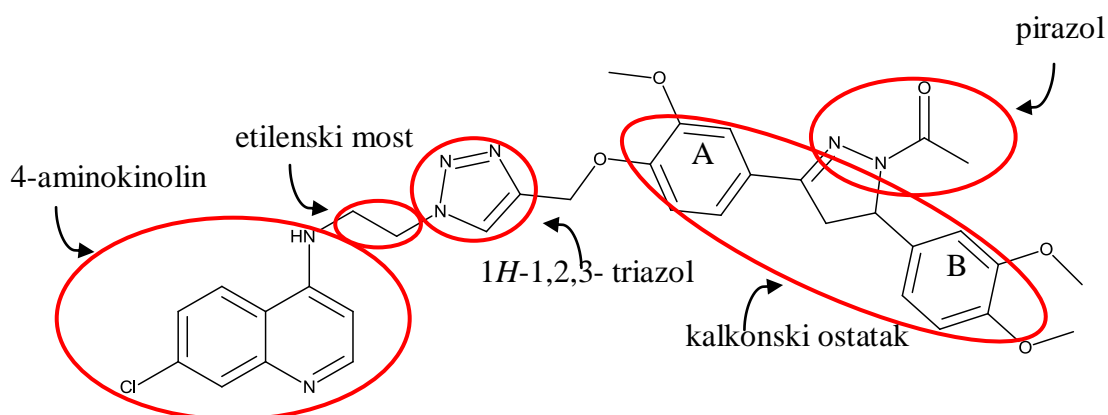


**Slika 5.** Kemijska struktura triazolskih derivata klorokina s izraženim antimalarijskim djelovanjem

Pokazalo se kako hibridni spojevi s distalnom amino skupinom imaju veći stupanj nakupljanja u hranidbenoj vakuoli te podižu osjetljivost klorokin-rezistentnih sojeva *Plasmodium falciparum* na razinu jednaku ili sličnu onoj u klorokin-osjetljivih sojeva. Također, spojevi s većim distalnim amino skupinama imali su povećanu učinkovitost *in vivo*, dok su oni s manjim heterociklima pokazivali povećanu metaboličku stabilnost i znatno poboljšanu antimalarijsku aktivnost. Zaključeno je kako su kinolinska jezgra i varijacije u duljini postraničnog lanca ključne značajke odgovorne za aktivnost, dok triazolska poveznica osigurava strukturnu varijabilnost odgovornu za izbjegavanje rezistencije. Naposljetku, istaknuta je važnost amino skupine na položaju 4 čije je direktno vezanje unutar skupine triazola utjecalo na bazičnost i potentnost spojeva te interakciju s hemom [41].

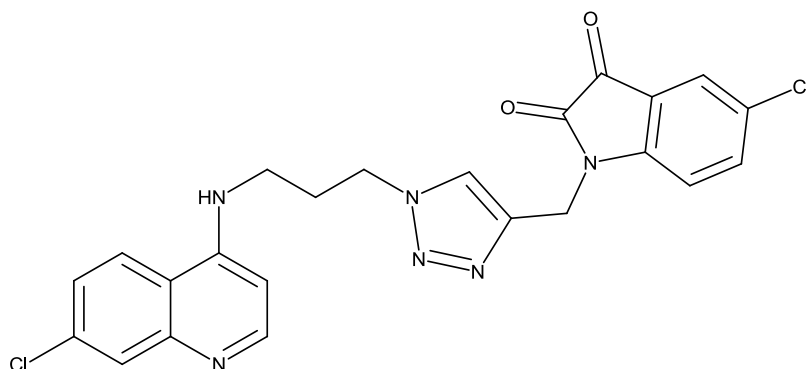
Kumar i suradnici odlučili su na 4-aminokinolinsku jezgru preko 1*H*-1,2,3- triazola adirati kalkon i *N*-acetilpirazolin. Kalkon je prirodni flavonoid s antimalarijskim potencijalom kojeg ispoljava inhibicijom plazmodijske aspartat proteaze, cistein proteaze te ciklin-ovisne protein kinaze. Njihov rad prikazao je ovisnost aktivnosti o duljini alkilnog lanca i prisutnosti metoksi skupine na A, odnosno B lancu kalkona (Slika 6.). *In vitro* ispitivanja su pokazala kako 4-aminokinolin-kalkonski konjugati s etilenskom poveznicom imaju slabije djelovanje kad se na A prsten kalkona veže metoksi skupina neovisno o supstutentima na B lancu. Do znatnog smanjenja aktivnosti došlo je i produživanjem poveznice, tj. uvođenjem propilenskog umjesto etilenskog mosta. Stvaranje 4-aminokinolin-kalkonskog konjugata s pirazolinskim prstenom dovelo je do povećanja aktivnosti. Kod ovih konjugata s etilenskim mostom, metoksi skupina na prstenu A kalkona uzrokovala je pojačanje djelovanja, dok se, kod konjugata s propilenskim mostom, djelovanje smanjilo. Kao najaktivnija molekula istaknuo se 4-

aminokinolin-pirazolinski konjugat s optimalnom kombinacijom metoksi substituenta na prstenu A i 3,4-dimetoksi supstituentom na prstenu B (Slika 6.)[42].



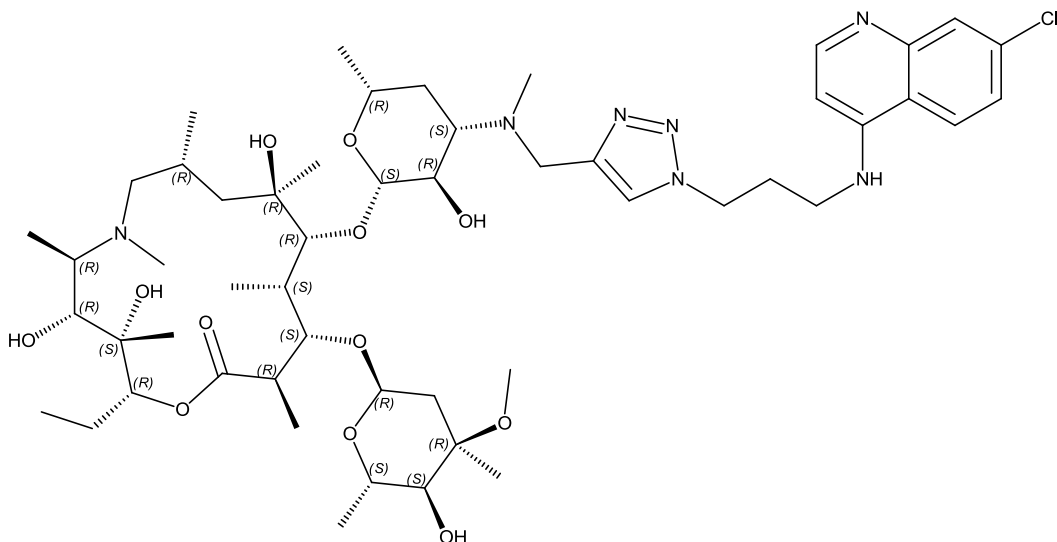
**Slika 6.** 4-Aminokinolin-pirazolinski konjugat s najjačim antimalarijskim djelovanjem *in vitro* na klorokin-rezistentni W2 soj *P. falciparum*

Rad Raja i suradnika donosi deset novosintetiziranih spojeva koji, *in vitro* ispitivanjima na klorokin-rezistentnom W2 soju *P. falciparum*, nisu pokazali poboljšanu aktivnost u odnosu na standardne lijekove (klorokin i artesunat), ali su omogućili novu zanimljivu SAR studiju. Ova istraživačka grupa metodom click kemije sintetizirala je derivate 7-klorokinolina povezane preko 1*H*-1,2,3- triazola na izatin - diketohidroindol koji je pokazao širok spektar aktivnosti i dobru toleranciju kod ljudi. Indolinoni su inhibitori cistein proteaze *P. falciparum* pod nazivom falcipain-2. SAR studijama utvrđeno je da najbolje djelovanje pokazuju bifunkcionalni hibridi s klorom na položaju C-5 izatina, dok hibridi sa snažnim elektron odvlačećim fluoro supstituentom imaju slabije djelovanje. C-5 nesupstituirani hibridi imali su najslabije djelovanje. Također, utvrđeno je da produljenje lanca dovodi do poboljšanja djelovanja kod supstituiranih hibrida. Tako je kao najaktivnija molekula istaknut 5-kloro-1-{1-[3-(7-kloro-kinolin-4-ilamino)-propil]-1*H*-[1,2,3]triazol-4-ilmetil}-1*H*-indol-2,3-dion (Slika 7.), dakle C-5 kloro supstituirani hibrid sa propilenskim mostom [43].



**Slika 7.** Hibridni derivat klorokina i izatina s najjačim antimalarijskim djelovanjem

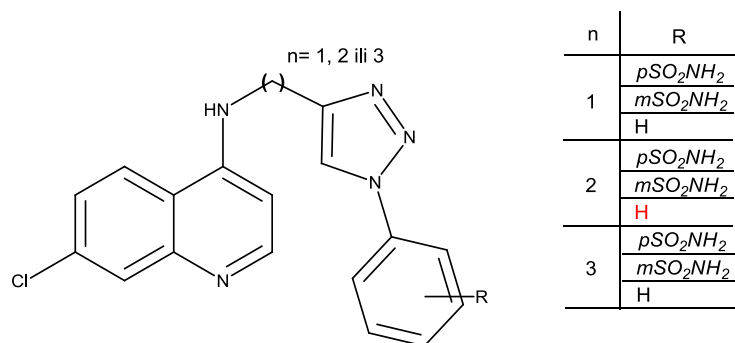
Azitromicin, polusintetski azalidni antibiotik dobiven iz makrolida eritromicina, također je pokazao *in vitro* i *in vivo* antimalarijsko djelovanje te se može koristiti u profilaksi, ili, zajedno sa klorokinom, kininom, artesunatom i sulfadoksin-pirimetaminom, i kao antimalarijski agens. Ipak, glavni nedostatak azitromicina kao antimalarika je činjenica da ima snažno antibakterijsko djelovanje pa svako uzimanje ovog lijeka u profilaktičke svrhe predstavlja rizik za razvoj antibiotske rezistencije te nepotrebno narušava crijevnu floru. Uočeno je da su za vezanje na bakterijske ribosome vrlo važni C-3' dimetilamino skupina na desozaminu te šećer kladinoza. Upravo se uklanjanjem ovih skupina može smanjiti antibakterijsko djelovanje uz istovremeno očuvanje antimalarijskog djelovanja. Na tragu toga, Starčević i suradnici sintetizirali su konjugate azitromicina i 4-aminokinolina koje su spojili preko triazolske poveznice (Slika 8.). Naime, triazolom su spojili C-3' šećera desozamina i dušik 4-aminokinolina. Nažalost, kako je triazolski prsten bioizoster amida, uvođenje ove skupine dovelo je do povećanja antibakterijske aktivnosti zbog čega daljnje *in vitro* studije antimalarijske aktivnosti nije imalo smisla provoditi [44].



**Slika 8.** C-3' supstituirani azitromicin s antimalarijskim potencijalom

Australska grupa pod vodstvom Gillian M. Fishera također se odlučila metodom bakrom (I)-katalizirane alkin-azidne cikloadicije sintetizirati hibride 7-kloro-4-aminokinolina i primarnih benzonsulfonamida povezane triazolskom poveznicom. Primarni sulfonamidi su odabrani zbog dokazane učinkovitosti i sigurnosti s obzirom da se nalaze u strukturi brojnih lijekova koji se primjenjuju u praksi. Osim toga, utvrđeno je kako imaju relativno dobru *in vitro* antimalarijsku aktivnost i dobru selektivnost za *P. falciparum* u odnosu na ljudske stanice. Iako nije poznat točan mehanizam antimalarijskog djelovanja, vrlo vjerojatno je temeljen na inhibiciji metaloenzima karboanhidraze. Nažalost, niti ovim istraživanjem [45] nije otkrivena struktura s značajnijim antimalarijskim potencijalom jer su svi sintetizirani spojevi imali barem 10 puta slabije djelovanje od klorokina. Ipak, rad je iznjedrio zanimljivu studiju odnosa strukture i aktivnosti. Strategija ove istraživačke grupe bila je sintetizirati nove spojeve kojima će biti varirane duljina poveznice između triazola i 4-aminokinolina te položaj (*para*- ili *meta*-) sulfonamidne skupine na benzenskom prstenu. Kontrolni spojevi, umjesto sulfonamidne skupine, imali su vodikov atom. *In vitro* ispitivanjima utvrđeno je kako su upravo kontrolni spojevi imali najpotentnije djelovanje iz čega se dalo zaključiti da je uvođenjem sulfonamidne skupine došlo do smanjenja antimalarijskog potencijala. Ipak, adicijom fenil-1,2,3-triazola na 4-aminokinolin došlo je do smanjenja indeksa rezistencije (omjer  $IC_{50}$  klorokin-rezistentne linije (Dd2) i  $IC_{50}$  vrijednosti klorokin-osjetljive linije (3D7) *P. falciparum* na kojima su provedena *in vivo* ispitivanja) u odnosu na klorokin. To znači da je fenil-1,2,3-triazol vrlo koristan supstituent s velikim potencijalom za daljnja istraživanja. Konačno, utvrđeno je kako su *meta*-regioizomeri potentniji od odgovarajućih *para*-

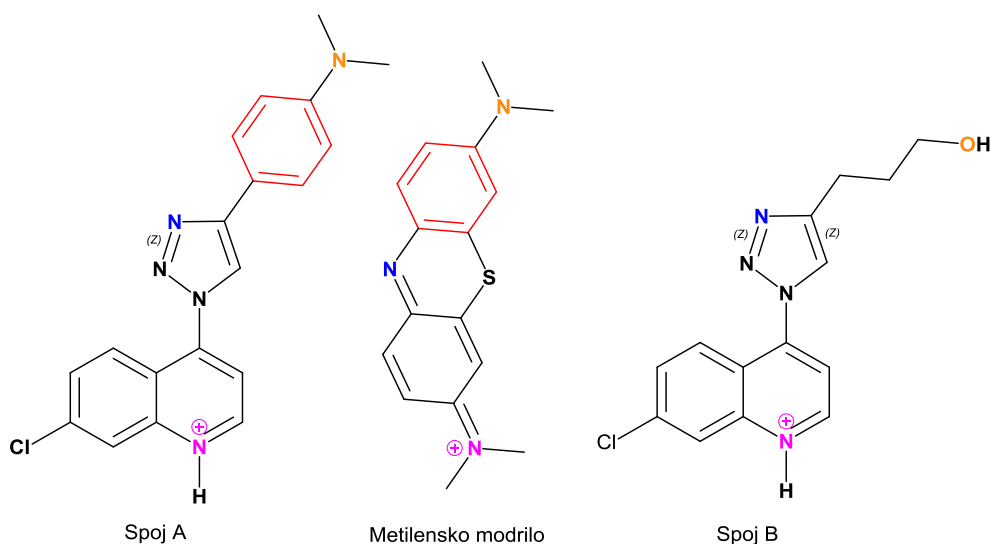
regioizomera, dok variranje duljine alkilnog lanca između triazola i 4-aminokinolina nije dovelo do značajne razlike u  $IC_{50}$  vrijednostima. Kao spoj s najboljim antimalarijskim potencijalom i selektivnošću za *Plasmodium* te najmanjom toksičnošću, pokazao se 7-kloro-*N*-(2-(1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)etil)kinolin-4-amin (Slika 9.).



**Slika 9.** Spojevi koje su Fisher i suradnici sintetizirali adicijom primarnog sulfonamida na 4-aminokinolin sintetskom metodom *CuAAC*. Crvenom bojom istaknut je 7-kloro-*N*-(2-(1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)etil)kinolin-4-amin koji je pokazao najveći antimalarijski potencijal

Konačno, rad Pereira i suradnika donosi vrlo zanimljivu SAR studiju načinjenu na 27 novosintetiziranih spojeva čija je *in vitro* aktivnost ispitana na klorokin-rezistentnom W2 soju *P. falciparum*. Naime, sintetizirane su tri skupine spojeva s različitim supstituentima na triazolskom prstenu koji je bio direktno vezan na položaj C-4 7-klorokinolina. Ustanovili su da umjerenu antimalarijsku aktivnost pokazuju samo derivati koji imaju atom dušika ili kisika kao terminalne atome na postraničnom lancu triazola. Zanimljivo je da je zamjena metilnih skupina na dušiku etilnima dovela do smanjenja djelovanje za 4 puta. Do iste pojave došlo je esterifikacijom terminalne hidroksilne skupine što je ukazalo na važnost slobodne OH skupine na tom položaju. Ipak, ispostavilo se da je jedan od glavnih razloga slabog antimalarijskog karaktera novosintetiziranih triazolskih derivata nedovoljna udaljenost triazolskog prstena od kinolinskog derivata. Naime, zbog premale udaljenosti dolazilo je do rezonantnog doprinosa triazolskog prstena stabilizaciji protoniranog oblika kinolinskog dušika. To je, pak, uzrokovalo značajni pada  $pK_a$  vrijednosti kinolinskog dušika (5.6-5.8) u odnosu na vrijednost koju je imao kinolinski dušik klorokina (7.3). Ovakva promjena rezultirala je nižom koncentracijom spojeva unutar parazita jer je *pH* hranidbene vakuole parazita (5.0 i 5.4) onemogućavao znatniju akumulaciju zbog izostale protonacije. Ona je, naime,

prijekopotrebna kako bi spoj ostao „zatočen“ unutar vakuole. Ako do protonacije ne dođe, dolazi do izlaska aktivne tvari iz vakuole posredstvom difuzije koja je omogućena velikom lipofilnosti spojeva. Daljnjom analizom utjecaja parcijalnog naboja na djelovanje utvrđeno je da spoj koji ima distalni dimetilirani tercijarni amin vezan za triazol (spoj A na Slici 10.) pokazuje nižu antimalarijsku aktivnost u odnosu na ostale spojeve u skupini od pet aktivnih kinolinotriazola. Naime, zbog prisutnog dušika, ukupni naboji kinolina i triazola bili su manje izraženi, tj. kinolinski prsten bio je manje pozitivan, a triazolski prsten manje negativan. To je sugeriralo da za antimalarijsko djelovanje nije važno samo protoniranje dušika u kinolinskom prstenu, već i parcijalni naboj triazola koji bi mogao imati veze s interakcijom spoja s hemom. S obzirom da je glavna meta analoga klorokina feroprotoporfirin IX, velika elektronska gustoća triazolskog prstena mogla bi biti ključna za vezanje na hem. U radu je, također, iznesena i zanimljiva usporedba struktura spoja s najvećim antimalarijskim potencijalom (spoj B na Slici 10.), spoja s distalnim tercijarnim dušikom te metilenskog modrila.



**Slika 10.** Usporedba farmakofora metilenskog modrila s dokazanim antimalarijskim svojstvima i novosintetiziranih molekula A i B s antimalarijskim potencijalom (ljubičasto je obojano središte pozitivnog naboja, plavo akceptor vodikove veze, crveno hidrofobna aromatska skupina, a narančasto središte negativnog parcijalnog naboja)

Metilensko modrilo je sintetski fenotiazin koji pokazuje 20-50 puta jače djelovanje na rezistentne sojeve od klorokina. Ustanovljeno je kako sva tri spoja imaju gotovo identične položaje, udaljenosti i kutove između farmakofora. Vrlo im je slična i udaljenost između akceptora vodika (u novim spojevima nastaje uvođenjem triazolskog prstena) i protoniranog



dušika. Najveći doprinos ovog rada je u razumijevanju SAR svojstava 7-klorokinolinetriazolinskih derivata; eksperimentalno je dokazana potreba za uvođenjem jačih elektron-donorskih skupina na položaju C4 i razmaka između kinolina i triazolnog prstena. Ta saznanja mogla bi poslužiti u budućnosti kod dizajniranja novih spojeva s antimalarijskim djelovanjem.

Dakle, gotovo sve SAR studije jednoznačno su pokazale da je 7-klorokinolinska jezgra optimalna za antimalarijsku *in vivo* i *in vitro* učinkovitost. Ostale modifikacije kinolinskog prstena uzrokuju gubitak antimalarijske aktivnosti, s izuzetkom klorokinin *N*-oksida i 5-azaklorokina, za koje je utvrđeno da imaju snažnije djelovanje u odnosu na klorokin [47]. Osim antimalarijske aktivnosti, neka istraživanja su pokazala su kako triazolnski derivati klorokina mogu imati i antitumorsko, antibakterijsko i antifungalno djelovanje [48, 49].

Sve navedeno dovodi do zaključka kako triazolnski derivati klorokina imaju veliki terapijski potencijal u liječenju mnogih patoloških stanja.

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

Cilj ovoga rada bio je sinteza i karakterizacija novih hibridnih molekula, derivata klorokina i harmina s triazolskom poveznicom koji bi imali antimalarijsko djelovanje. Metoda molekularne hibridizacije istaknula se kao vrlo atraktivna strategija za ostvarivanje ciljeva ovoga rada jer omogućuje povezivanje dva fragmenta koji posjeduju željenu aktivnost u jednu molekulu. Takve nove molekule mogle bi imati veću djelotvornost i smanjen broj nuspojava. Svi spojevi čija je sinteza opisana, u strukturi sadrže 7-klorokinolin, strukturni element antimalarika klorokina., koji djeluje tako što inhibira transformaciju toksičnog hema u netoksičan oblik (hemzoin) te, na taj način, uzrokuje smrt parazita. Harmin je  $\beta$ -karbolin nađen u brojnim biljkama za koje je poznato da posjeduju antimalarijsko djelovanje. Novija istraživanja su pokazala da inhibira *PfHsp90* vežući se na vezno mjesto za ATP. Kao poveznica ova dva fragmenta korišten je 1,2,3-triazolski prsten. On je odabran zbog svoje velike kemijske i biološke stabilnosti te niza korisnih interakcija koje može ostvariti s različitim enzimima i receptorima.

Konačni produkti sintetizirani su reakcijom bakrom (I)-katalizirane alkin-azidne cikloadicije koja svojim značajkama udovoljava većini kriterija click-kemije te su potom karakterizirani upotrebom uobičajenih analitičkih i spektroskopskih metoda (NMR, MS, IR,  $t_r$ ). Sintetizirani su azidi koji su sadržavali 7-klorokinolin, dok su harmin i harmol u reakcijama *N*- i *O*-propargiliranja iskorišteni za dobivanje redom *N* i *O*-alkina.

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada ispitat će se antimalarijsko djelovanje novih spojeva i to na eritrocitnu fazu *P. falciparum* (klorokin osjetljivi Pf3D7 i klorokin-rezistentni PfDd2 sojevi) i na jetrenu fazu *P. berghei*. Toksičnost za humane stanice ispitat će se humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma HepG2.

### **3. MATERI JAL I METODE**

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

IR spektri snimljeni su na FTIR PerkinElmer Paragon 500 spektrometru (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na NMR spektrometru Bruker Avance III HD koji radi na 300, odnosno 400 MHz za  $^1\text{H}$  te 75, 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 F<sub>254</sub> (Merck, Njemačka) uz slijedeće pokretne faze: cikloheksan/etil-acetat (1:1) cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) te diklormetan/metanol (80:20, 85:15, 95:5). Mrlje su vizualizirane kratkovalnim UV svjetlom 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 faze korištene su iste smjese diklormetana, etil-acetata, metanola i cikloheksana u istim omjerima kao i u tankoslojnoj kromatografiji. 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.

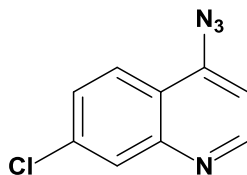
Harmin, 2-aminoetanol, natrijev hidrid, 2-azido-1,3-dimetil-imidazolin heksafluorofosfat (ADMP), 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en (DBU), 4,7-diklorokinolin i trietilamin (TEA) nabavljeni su od tvrtke Sigma Aldrich (SAD), 80% otopina propargil bromida u toluenu i cezijev karbonat od tvrtke TCI (Njemačka), natrijev azid od tvrtke Merck (SAD), amonijev klorid od tvrtke Zorka Šabac (Srbija), a bakrov (II) acetat od tvrtke Alfa Aesar (SAD). Za

potrebe eksperimenata korišten je TELOS<sup>®</sup> fazni separator tvrtke Kinesis (Ujedinjeno Kraljevstvo).

Harmol je pripremljen po prilagođenom literaturnom postupku [50] iz harmina uz korištenje smjese HBr/ledene octene kiseline u mikrovalnom reaktoru.

U eksperimentalnom dijelu korišten je bezvodni DMF, čuvan nad aktiviranim molekulskim sitima. Sve ostale kemikalije bile su *p. a.* čistoće.

### 3.1 Sinteza 4-azido-7-klorokinolina (1)



Spoj **1** pripremljen je po prilagođenom literaturnom postupku [51]. 0,5 g (2,5 mmol) 4,7-diklorokinolina otopljeno je u 3 mL suhog DMF-a. Toj otopini dodano je 0,488 g (7,5 mmol) NaN<sub>3</sub>. Reakcija je praćena TLC-om (cikloheksan/etil-acetat 1:1). Smjesa je 6 sati mješana na kupelji zagrijanoj do temperature od 67°C nakon čega je stavljena na hlađenje pri sobnoj temperaturi. Nakon potpunog hlađenja, reakcijskoj smjesi dodano je 30 mL diklormetana te je spoj ekstrahiran u lijevku za ekstrakciju ispiranjem sa 3 obroka po 30 mL vode. Kako bi uklonili zaostalu vodu, diklormetanska frakcija propuštena je kroz fazni separator. Organsko otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a preostali smeđi talog (**1**) rastrljan u eteru i odsisan.

Iskorištenje: 0,186 g (36,3%)

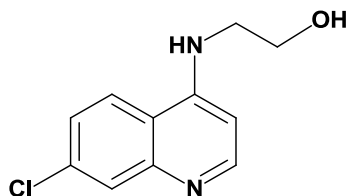
$t_r$  66-68°C

IR (KBr,  $\nu$  cm<sup>-1</sup>): 3036, 2215, 2123, 1608, 1579, 1566, 1491, 1417, 1373, 1351, 1302, 1278, 1200, 1146, 1071, 1011, 880, 840, 819, 769, 671, 633, 610, 537, 485.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$ /Hz)  $\delta$  8,87 (d,  $J$  = 5,0 Hz, 1H); 8,19 – 7,91 (m, 2H); 7,65 (dd,  $J$  = 8,9, 2,2 Hz, 1H); 7,51 (d,  $J$  = 5,0 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$ /Hz)  $\delta$  152,04; 148,91; 145,71; 135,11; 127,56; 127,31; 124,13; 119,41; 110,29.

### 3.2 Sinteza 2-((7-klorokinolin-4-il)amino)etanola (2)



Spoj **2** pripremljen je po prilagođenom literaturnom postupku [52]. 0,198 g (0,001 mol) 4,7-diklorokinolina dodano je 0,122 g (2 mmol) etanolamina i 0,2 mL TEA. Reakcija je praćena TLC-om (diklormetan/metanol 85:15). Smjesa je uz miješanje grijana 1 sat na temperaturi od 120 °C. Nakon toga je u reakcijsku smjesu dodan led i hlađena je 1 sat na 5 °C. Svijetlo narančasti talog je odsisan i ispran s nekoliko obroka vode i etera. Potom je otopljen u vrućem metanolu i ostavljen da se ohladi na sobnoj temperaturi. Nakon hlađenja, odsisan je bijeli talog (**2**).

Iskorištenje: 0,143 g (64,1%)

$t_r$  218-220 °C

ESI-MS:  $m/z$  223,1 (M+1)<sup>+</sup>.

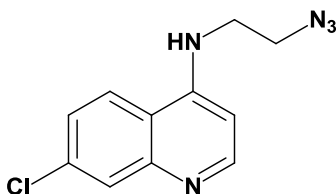
IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3908, 3824, 3746, 3676, 3572, 3314, 3056, 2926, 2820, 2660, 2502, 2430, 2370, 1932, 1834, 1706, 1654, 1584, 1452, 1344, 1222, 1140, 1064, 926, 850, 802, 648, 574.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  8,39 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H); 8,26 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H); 7,79 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H); 7,45 (dd,  $J = 9,0, 2,3$  Hz, 1H); 7,27 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H); 6,50 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H); 4,85 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H); 3,66 (q,  $J = 5,9$  Hz, 2H); 3,36 (q,  $J = 5,8$  Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  151,89; 150,22; 149,10; 133,35; 127,49; 124,06; 124,00; 117,46; 98,69; 58,74; 45,11.



### 3.3 Sinteza *N*-(2-azidoetil)-7-klorokinolin-4-amina (**3**)



Spoj **3** pripremljen je po prilagođenom literaturnom postupku [53]. 0,089 g (0,4 mmol) spoja **2** otopljeno je u 3 mL suhog THF-a. Smjesa je stavljena u ledenu kupelj i ohlađena do 0°C. Nakon toga uz miješanje je dodano 0,228 g (0,8 mmol) ADMP-a i 0,148 mL (1,2 mmol) DBU. Reakcija je praćena TLC-om (cikloheksan/etil-acetat/metanol 1:1:0,5). Reakcija je miješana 1 sat u ledenoj kupelji. Smjesi je dodana zasićena otopina amonijevog klorida te je ekstrahirana diklormetanom (2 × 30 mL). Organski slojevi isprani su zasićenom otopinom natrijevog klorida (2 × 30 mL) i destiliranom vodom (2 × 30 mL). Organski sloj propušten je kroz fazni separator uparen pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i rastrljavanja u smjesi etera i petroletera dobiven je bijeli talog (**3**).

Iskorištenje: 0,077 g (58,3%)

$t_f$  142-145 °C

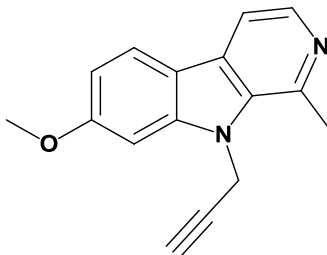
ESI-MS:  $m/z$  220,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3964, 3876, 3822, 3752, 3680, 3226, 3066, 2964, 2488, 2290, 2132, 1908, 1782, 1578, 1446, 1330, 1208, 1144, 1084, 998, 814, 642.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  8,43 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H); 8,26 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H); 7,81 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H); 7,57 – 7,41 (m, 2H); 6,59 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H); 3,61 (dd,  $J = 5,9, 4,7$  Hz, 2H); 3,53 (q,  $J = 5,3$  Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  151,89; 149,78; 149,05; 133,49; 127,53; 124,29; 124,01; 117,47; 98,91; 48,82; 41,88.

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



Spoj **4** pripremljen je po prilagođenom literaturnom postupku [52]. 0.212 g (1 mmol) harmina otopljeno je u 4 mL suhog DMF-a. U atmosferi argona smjesi je dodano 0.108 g (2.7 mmol) 60% natrijevog hidrida dispergiranog u mineralnom ulju. Potom je dokapano 0.284 mL (3 mmol) 80% otopine propargil bromida u toluenu. Reakcija je miješana 2 h sata na sobnoj temperaturi pod atmosferom argona nakon čega je reakcijska smjesa dodana u 50 mL vode. Produkt je ekstrahiran diklormetanom (4 × 30 mL). Organski slojevi su sakupljeni i isprani sa vodom. Voda je uklonjena filtriranjem organskog sloja kroz fazni separator, i organska faza uparena je pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (95:5) i rastrljavanja u dietil-eteru dobiven je konačni produkt (**4**).

Iskorištenje: 0.138 g (55%)

$t_f$  147-149 °C

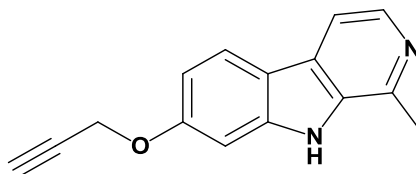
ESI-MS:  $m/z$  251, 2 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu$ /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3270, 3064, 2118, 1616, 1568, 1494, 1450, 1402, 1340, 1294, 1254, 1226, 1192, 1170, 1138, 1042, 976, 1042, 976, 922, 830, 806, 722, 690, 648.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$ /Hz) 8,20 (d, 1H,  $J$ = 5,2 Hz); 8,10 (d, 1H,  $J$ = 8,6 Hz); 7,88 (d, 1H,  $J$ = 5,2 Hz); 7,33 (d, 1H,  $J$ = 2,1 Hz); 6,90 (dd, 1H,  $J$ = 8,6 Hz, 2,1 Hz); 5,45 (d, 2H,  $J$ = 2,3 Hz); 3,91 (s, 3H); 3,37 (t, 1H,  $J$ = 2,3 Hz); 3,05 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$ /Hz) 160,72; 142,60; 141,09; 138,53; 134,40; 128,92; 122,50; 114,42; 112,29; 109,70; 93,83; 80,25; 75,59; 55,68; 34,22; 22,49.

### 3.5 Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-b]indola (5)



Spoj **5** pripremljen je po prilagođenom literaturnom postupku [52]. 0.198 g (1 mmol) harmola otopljeno je u 4 mL suhog DMF-a. U atmosferi argona smjesi je dodano 0.456 g (1.4 mmol) cezijeve karbonata. Potom je dokapano 0.095 mL (1.1 mmol) 80% otopine propargil bromida u toluenu. Reakcija je miješana 2 h sata na sobnoj temperaturi pod atmosferom argona nakon čega je reakcijska smjesa dodana u 50 mL vode. Produkt je ekstrahiran diklormetanom (4 × 30 mL). Organski slojevi su sakupljeni i isprani sa vodom. Voda je uklonjena filtriranjem organskog sloja kroz fazni separator, i organska faza uparena je pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (97:3, 95:5) i rastrljavanja u dietil-eteru dobiven je konačni produkt (**5**).

Iskorištenje: 0.132 g (56%)

$t_f$  159-161 °C

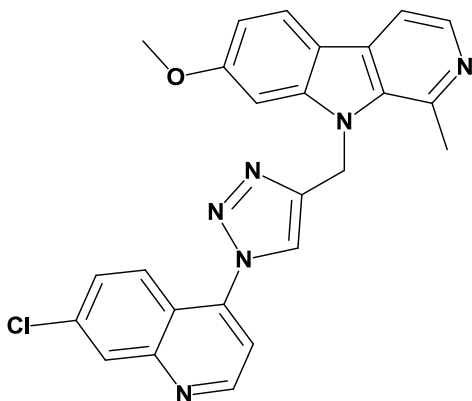
ESI-MS:  $m/z$  237, 2 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu$  cm<sup>-1</sup>): 3272, 3068, 2960, 2868, 2774, 2118, 1632, 1566, 1484, 1454, 1328, 1276, 1166, 1136, 1108, 1070, 1024, 948, 816, 704, 684.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$ /Hz) 11,55 (s, 1H); 8,17 (d, 1H,  $J$ = 5,3 Hz); 8,10 (d, 1H,  $J$ = 8,7 Hz); 7,85 (d, 1H,  $J$ = 5,3 Hz); 7,13 (d, 1H,  $J$ = 2,1 Hz); 6,89 (dd, 1H,  $J$ = 8,7 Hz, 2,3 Hz); 4,93 (d, 2H,  $J$ = 2,3 Hz); 3,64 (t, 1H,  $J$ = 2,3 Hz); 2,74 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$ /Hz) 157,94; 141,67; 141,33; 137,59; 134,60; 127,17; 122,68; 115,35; 112,06; 109,55; 96,00; 78,44; 55,75; 20,22.

### 3.6 Sinteza 9-((1-(7-klorokinolin-4-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indola (6)



U otopinu 0,035 g (0,14 mmol) spoja **4** u 5 mL metanola dodano je 0,07 mmol bakrovog (II) acetata te nakon 10 minuta mješanja 0,032 g (0,154 mmol) spoja **1**. Reakcija je miješana 30 sati na sobnoj temperaturi te potom uparena pod sniženim tlakom. Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i rastrljavanja u dietil eteru i diklormetanu te ponovnim pročišćavanjem kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (95:5) dobiven je konačni produkt **6**.

Iskorištenje: 0,024 g (37,5%)

$t_f$  235-237 °C

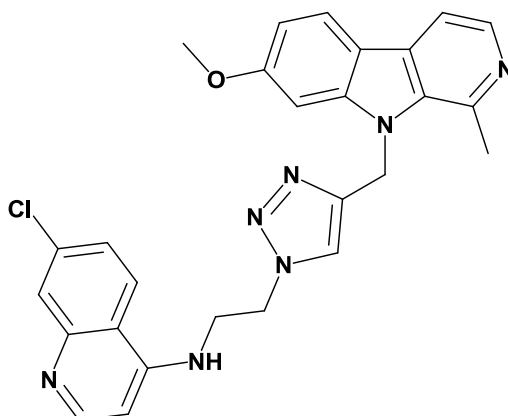
ESI-MS:  $m/z$  455,3 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3142, 1621, 1560, 1498, 1441, 1406, 1372, 1345, 1255, 1223, 1194, 1171, 1138, 1114, 1036, 971, 925, 876, 812, 722, 623, 554.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  9,09 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1H); 8,83 (s, 1H); 8,26 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H); 8,20 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H); 8,11 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H); 7,93 – 7,89 (m, 2H); 7,78 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1H); 7,74 (dd,  $J = 9,1, 2,2$  Hz, 1H); 7,42 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H); 6,90 (dd,  $J = 8,6, 2,1$  Hz, 1H); 6,05 (s, 2H); 3,92 (s, 3H); 3,13 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  160,62; 152,29; 149,31; 144,80; 142,74; 141,17; 140,22; 138,15; 135,28; 134,75; 128,91; 128,62; 128,10; 125,34; 122,40; 120,31; 117,20; 114,51; 112,29; 109,48; 94,13; 55,66; 23,32.

### 3.7 Sinteza 7-kloro-*N*-(2-(4-((7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)kinolin-4-amina (7)



U otopinu 0,038 g (0,152 mmol) spoja 4 u 5 mL metanola dodano je 0,07 mmol bakrovog (II) acetata te nakon 10 minuta mješanja 0,0413 g (0,167 mmol) spoja 3. Reakcija je miješana 24 sata na sobnoj temperaturi te potom uparena pod sniženim tlakom. Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (80:20) i rastrljavanja u dietil eteru i petroleteru dobiven je konačni produkt 7.

Iskorištenje: 0,050 g (66,1%)

$t_r$  244-245 °C

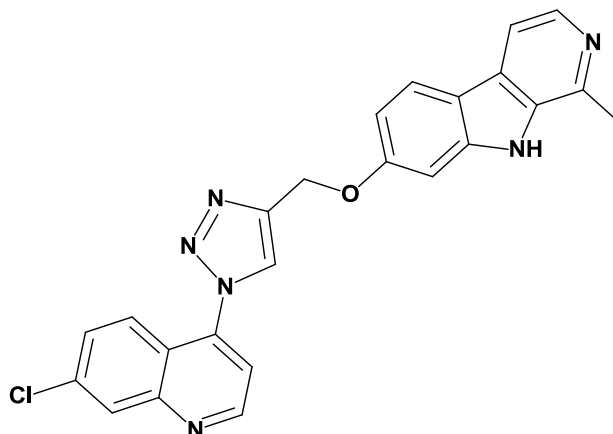
ESI-MS:  $m/z$  496,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 2965, 1619, 1578, 1495, 1441, 1428, 1403, 1369, 1355, 1324, 1252, 1224, 1193, 1170, 1137, 1082, 1044, 972, 926, 910, 875, 814, 764, 732, 641, 593, 552, 482.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  8,32 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H); 8,17 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H); 8,08 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H); 8,05 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H); 7,98 (s, 1H); 7,87 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H); 7,79 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H); 7,45 – 7,36 (m, 2H); 7,26 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H); 6,87 (dd,  $J = 8,6, 2,1$  Hz, 1H); 6,45 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H); 5,83 (s, 2H); 4,57 (t,  $J = 6,0$  Hz, 2H); 3,83 (s, 3H); 3,70 (q,  $J = 5,9$  Hz, 2H); 2,98 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  160,52; 151,63; 149,73; 148,74; 143,88; 142,65; 141,07; 137,98; 134,60; 133,56; 128,49; 127,34; 124,36; 123,78; 123,47; 122,34; 117,33; 114,39; 112,23; 109,36; 98,77; 93,95; 55,53; 47,86; 42,34; 23,11.

### 3.8 Sinteza 7-((1-(7-klorokinolin-4-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-1-metil-9*H*pirido[3,4-*b*]indola (8)



U otopinu 0,033 g (0,14 mmol) spoja **5** u 5 mL metanola dodano je 0,07 mmol bakrovog (II) acetata te nakon 10 minuta mješanja 0,032 g (0,154 mmol) spoja **1**. Reakcija je miješana 24 sata na sobnoj temperaturi te potom uparena pod sniženim tlakom. Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol (95:5) i rastrljavanja u dietil eteru i petroleteru dobiven je konačni produkt **8**.

Iskorištenje: 0,031 g (50%)

$t_r$  236-240 °C

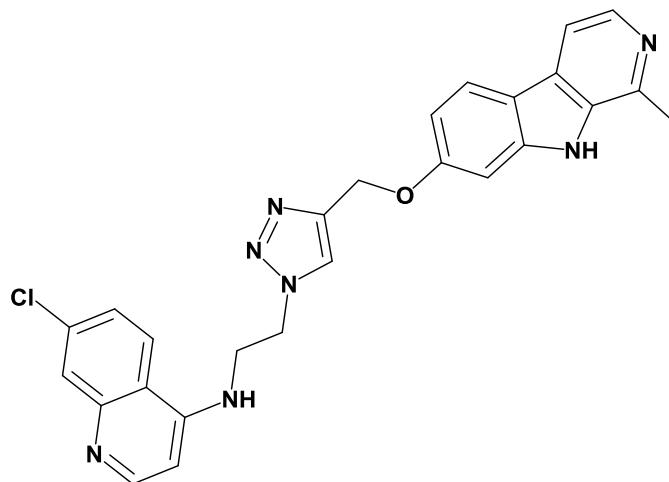
ESI-MS:  $m/z$  441,3 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3049, 1629, 1610, 1564, 1505, 1486, 1440, 1321, 1295, 1278, 1253, 1233, 1215, 1175, 1106, 1071, 1036, 995, 953, 920, 872, 822, 812, 801, 790, 767, 626, 572.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  11,51 (s, 1H); 9,17 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1H); 9,02 (s, 1H); 8,30 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H); 8,17 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H); 8,11 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H); 8,01 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H); 7,90 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1H); 7,83 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H); 7,79 (dd,  $J = 9,1, 2,2$  Hz, 1H); 7,27 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H); 6,99 (dd,  $J = 8,6, 2,2$  Hz, 1H); 5,47 (s, 2H); 2,74 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  158,72; 152,39; 149,39; 143,72; 141,79; 141,37; 140,36; 137,74; 135,39; 134,62; 129,03; 128,17; 127,14; 125,35; 122,73; 120,34; 117,17; 115,31; 111,99; 109,45; 96,03; 61,29; 20,32.

### 3.9 Sinteza 7-kloro-*N*-(2-(4-(((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)kinolin-4-amina (9)



U otopinu 0,038 g (0,1608 mmol) spoja **5** u 5 mL metanola dodano je 0,07 mmol bakrovog (II) acetata te nakon 10 minuta mješanja 0,044 g (0,1769 mmol) spoja **3**. Reakcija je miješana 4 sata na sobnoj temperaturi te potom uparena pod sniženim tlakom. Nakon kromatografije na koloni uz pokretnu fazu sastava cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i rastrljavanja u dietil eteru i petroleteru dobiven je konačni produkt **9**.

Iskorištenje: 0,042 g (53,9%)

$t_r$  238-242 °C

ESI-MS:  $m/z$  482,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ): 3339, 3158, 3065, 2956, 1638, 1610, 1583, 1543, 1485, 1449, 1427, 1371, 1338, 1281, 1251, 1235, 1204, 1175, 1155, 1110, 1056, 873, 850, 813, 799, 761, 647, 858, 531.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  11,48 (s, 1H); 8,41 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H); 8,32 (s, 1H); 8,19-8,15 (m, 2H); 8,05 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H); 7,82-7,81 (m, 2H); 7,54 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H); 7,45 (dd,  $J = 8,9, 2,3$  Hz, 1H); 7,17 (s, 1H); 6,88 (dd,  $J = 8,7, 2,3$  Hz, 1H); 6,57 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H); 5,25 (s, 2H); 4,70 (t,  $J = 6,0$  Hz, 2H); 3,82 (q,  $J = 6,0$  Hz, 2H); 2,73 (s, 3H).

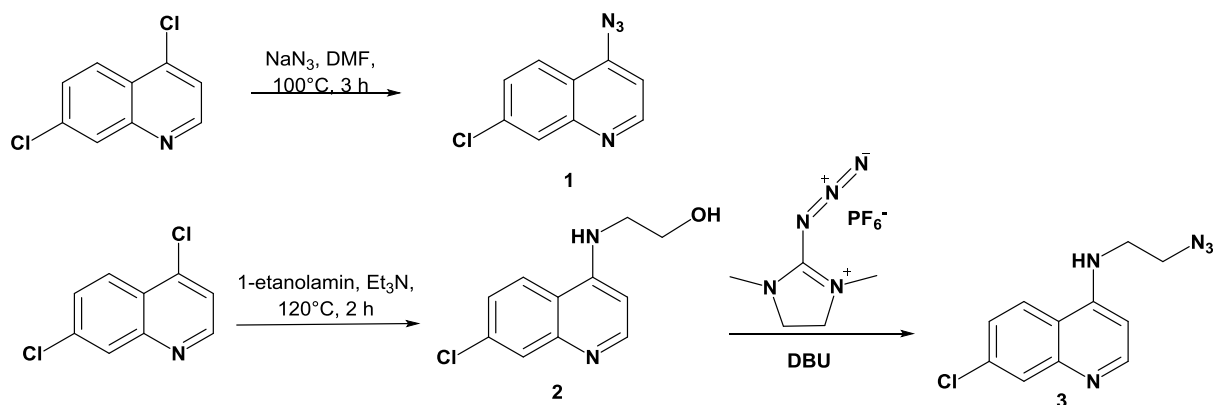
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO-  $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$  158,79; 151,77; 149,82; 148,82; 142,70; 141,82; 141,31; 137,65; 134,59; 133,60; 127,38; 127,18; 125,08; 124,40; 124,00; 122,64; 117,44; 115,10; 111,98; 109,42; 98,91; 95,82; 61,45; 47,90; 42,43; 20,28.



#### **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu metodom bakrom (I)-katalizirane alkin-azidne cikloadicije sintetizirani su novi spojevi, koji prethodno nisu bili opisani u literaturi. Konačni produkti su spojevi **6-9**, nastali povezivanjem kinolinskog dijela klorokina i harmina/harmola u jednu molekulu preko 1,2,3-triazolskog prstena koji predstavlja poveznicu.

Shema 1. predstavlja sintetski put dobivanja azida **1** i **3** koji u svojoj strukturi sadrže 7-klorokinolin te predstavljaju strukturne analoge klorokina.

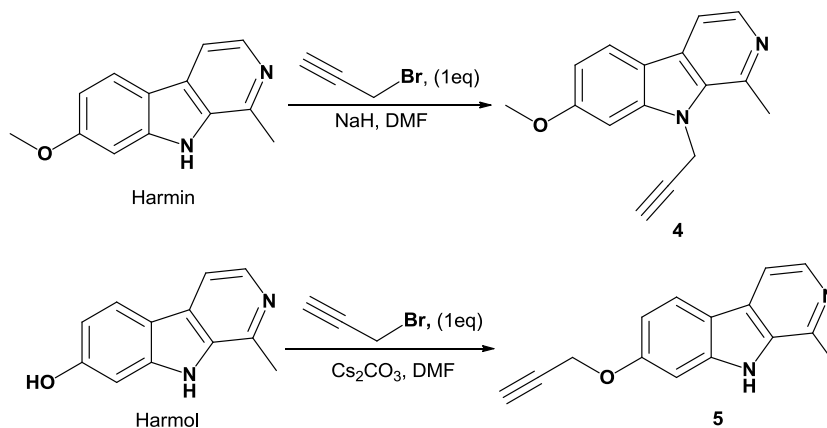


**Shema 1.** Sinteza azida **1** i **3**

Azid **1** kod kojeg je azido skupina direktno vezana na kinolinski prsten dobiven je u jednom reakcijskom koraku iz 4,7-diklorokinolina u reakciji nukleofilne supstitucije s natrijevim azidom koja ujedno predstavlja i najčešći način dobivanja azida [51]. Azid **3** ima azido skupinu vezanu na kinolinski prsten preko etilenske poveznice te je sintetiziran u dva reakcijska koraka. U prvom koraku se 4,7-diklorokinolin pomoću etanolamina prevodi u kinolinski aminoalkohol (**2**) u prisutnosti trietilamina (TEA), pri čemu nastaju željeni amin i klorovodična kiselina kao nusprodukt. Potonji spoj s trietilaminom stvara sol trietilamin hidroklorida (trietilamonijev klorid) čime se slobodna klorovodična kiselina uklanja iz reakcijske smjese. Dobiveni alkohol **2** u reakciji s 2-azido-1,3-dimetil-imidazolin heksafluorofosfatom (ADMP) kao donorom azido skupine u prisutnosti baze 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-ena (DBU) dao je odgovarajući azid **3**. Ova reakcija sinteze azida pokazala se uspješnom u prethodnom istraživanju Zavoda za farmaceutsku kemiju gdje je poslužila za sintezu velikog broja azida iz derivata cimetne kiseline [53] te je zato korištena i u ovom radu. Glavne prednosti ove reakcije pokazane su i u izvornom radu gdje su uspješnost reakcije i optimalni reakcijski uvjeti ispitani na različitim arilnim i alkilnim alkoholima. Prednosti su: a) korištenje ADMP-a, sigurnog i relativno stabilnog donora azidne skupine, b)

nastajanje azida u blagim reakcijskim uvjetima i c) korištenje baze DBU (1,8-diazabicyklo[5,4,0]undeka-7-en) s kojom je reakcija prijenosa azida moguća na sobnoj temperaturi ili 0°C u THF-u za 10 minuta uz visoko iskorištenje [54]. Reakcija se i u ovom radu pokazala uspješnom, te je dobiven azid **3**.

Shema 2. pokazuje prevođenje harmina i harmola u njihove propargilirane derivate, *N*-propargilirani derivat harmina (**4**) i *O*-propargilirani derivat harmola (**5**).

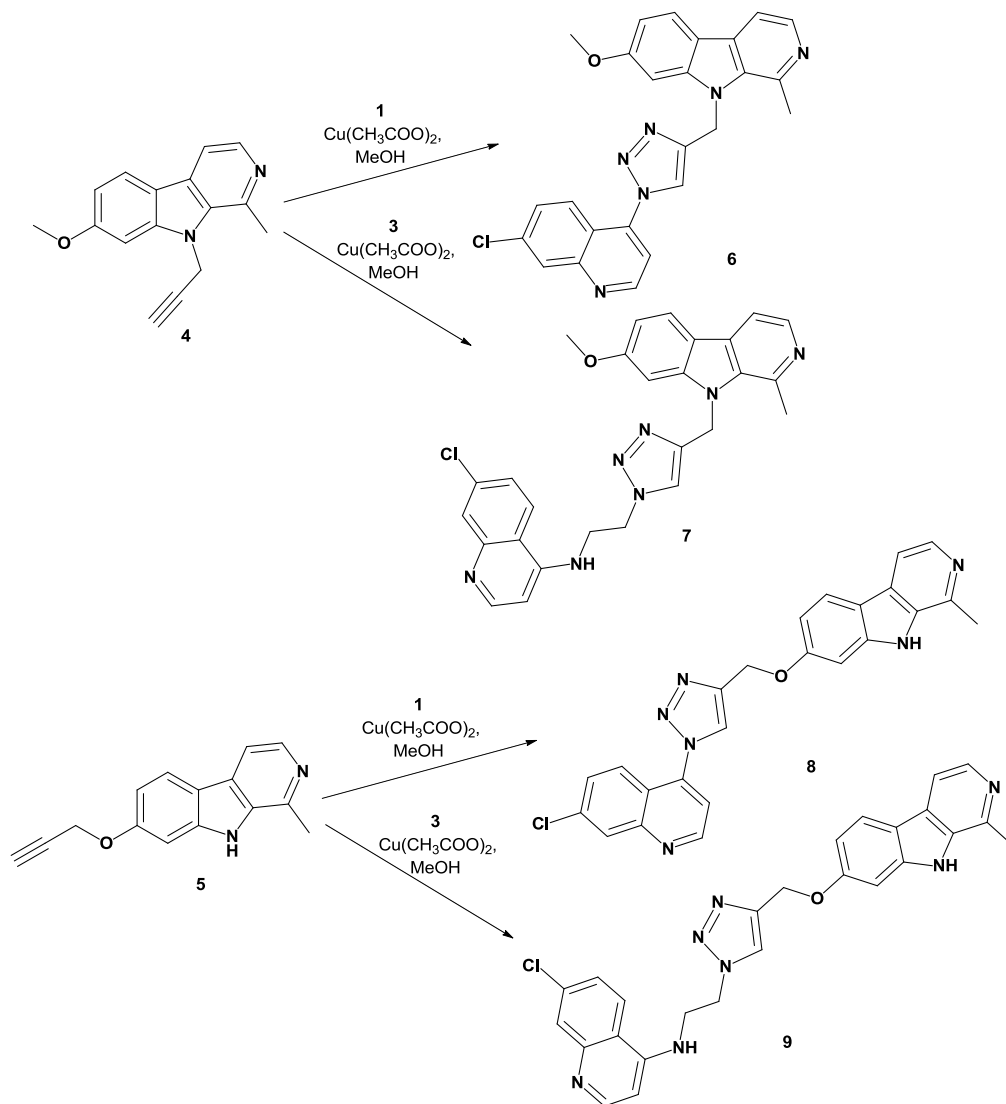


**Shema 2.** Sinteza *N*-propargiliranog derivata harmina (**4**) i *O*-propargiliranog derivata harmola (**5**)

Harmin je preveden u *N*-propargilirani oblik (spoj **4**) u reakciji *N*-alkiliranja uz primjenu natrij hidrida (NaH) kao baze. Indolski dušik u neutralnom stanju je slab nukleofil te ga je potrebno aktivirati jakom bazom poput NaH čime dolazi do deprotonacije i postaje jaki nukleofil. Početni spoj u sintezi *O*-propargiliranog derivata bio je harmol koji je dobiven modifikacijom opisanog postupka [50], reakcijom *O*-demetilacije harmina, uz ledenu octenu kiselinu i 47 % otopinu HBr u mikrovalnom reaktoru na 130 °C (trajanje reakcije: 20 minuta). Korištenjem mikrovalnog reaktora vrijeme trajanja ove reakcije je značajno skraćeno; bez primjene mikrovalnog reaktora reakcija traje 48 sati. Reakcija propargiliranja harmola provodi se u suhom DMF-u. Bazični cezijev karbonat (1,4 eq) služi za deprotoniranje fenolne skupine čime nastaje fenoksidni međuprodukt koji je jači nukleofil od sekundarnog amina u heterocikličkom prstenu. Otopina alkilirajućeg agensa, propargil bromida (1 eq) dokapava se poslijednja u atmosferi inertnog plina (argona). U ovom slučaju je jako važno da se otopina propargil bromida ne doda u suvišku jer u tom slučaju dolazi do supstitucije i na indolskom prstenu harmola. Dobiveni *O*-propargilirani harmol (**5**) je nakon izolacije i pročišćavanja iskorišten u daljnjim reakcijama sinteze. *N*-propargilirani harmin **4** i *O*-propargilirani harmol

(5) su nakon izolacije i pročišćavanja iskorišteni u daljnjim sintezama. Dobiveni klorokinski azidi **1** i **3** i propargilirani derivati **4** i **5** predstavljaju građevne elemente u sintezi konačnih produkata **6-9**.

Shema 3. pokazuje prevođenje *N*-propargilirani derivat harmina (**4**) i *O*-propargilirani derivat harmola (**5**) u njihove *N*- i *O*-heterociklične hibride (**6-9**).



**Shema 3.** Sinteza *N*- i *O*-heterocikličnih hibrida (**6-9**).

*N*-propargilirani harmin (**4**) i *O*-propargilirani harmol (**5**) su potom podvrgnuti Cu (I) kataliziranoj 1,3-dipolarnoj cikloadiciji s odgovarajućim nesupstituiranim aromatskim azidima **1** i **3** kako bi se dobili ciljani *N*- i *O*-heterociklični hibridi (**6-9**) koji sadrže kinolin i 1,2,3-triazolski most. Kao katalizator, korišten je bakrov (II) acetat monohidrat, a reakcija je provedena u metanolu. Prilikom *CuAAC* nastaje koordinacijski intermedijer azidnog reaktanta

s bakar-alkinskim kompleksom koji se koordiniraju kroz najnegativniji dušik (onaj najbliži fenilnom prstenu). Konačno, slijedi ciklizacija s koordiniranim alkinom i formiranje ciljanih regioselektivnih produkata. Ovaj tip reakcije predstavlja brzu i jeftinu metodu s dobrim iskorištenjem [55].

Sintetizirani su sljedeći spojevi:

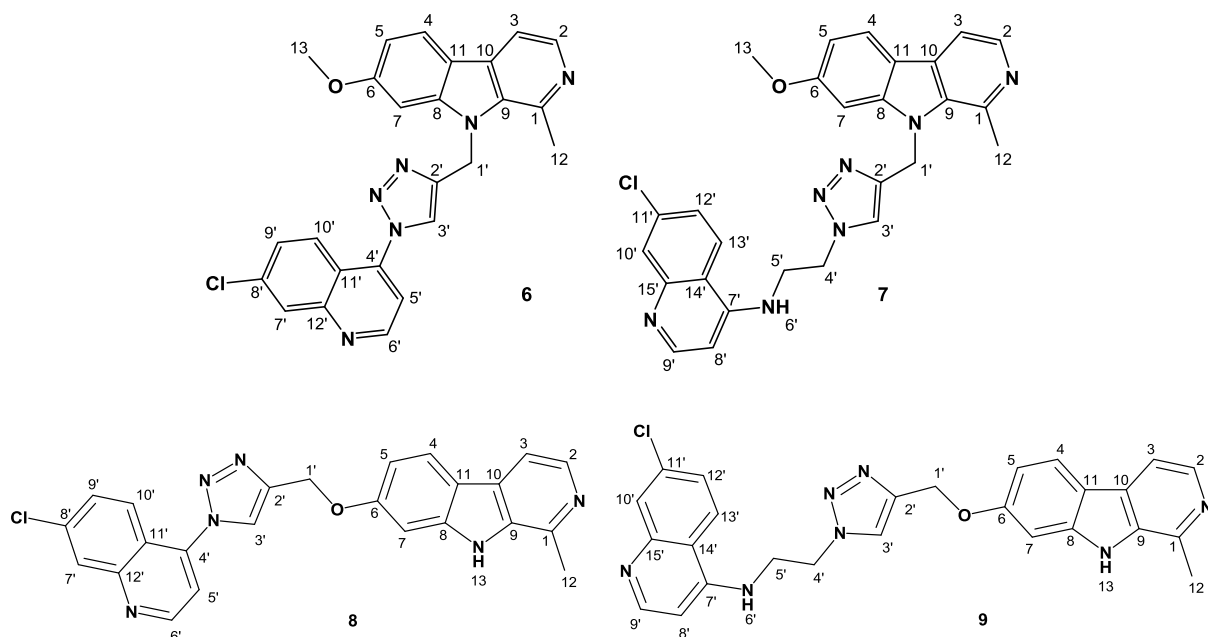
- a) 9-((1-(7-klorokinolin-4-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**6**)
- b) 7-kloro-*N*-(2-(4-((7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)kinolin-4-amin (**7**)
- c) 7-((1-(7-klorokinolin-4-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**8**)
- d) 7-kloro-*N*-(2-(4-(((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)kinolin-4-amin (**9**)

Strukture novih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS). Novim spojevima određene su i temperature tališta. U Tablicama 4. i 5. dani su njihovi analitički i spektroskopski podaci, dok se IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR i MS spektri nalaze u Prilogu.

**Tablica 4.** Analitički i spektroskopski podaci za triazolske derivate klorokina i harmina 6-9

Spoj	$t_f$ (°C)	Molekulska formula	$M_r$	IR (ATR) $\nu_{\max}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	MS ( $m/z$ )
6	235-237	$\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{ClN}_6\text{O}$	454,91	3142, 1621, 1560, 1498, 1441, 1406, 1372, 1345, 1255, 1223, 1194, 1171, 1138, 1114, 1036, 971, 925, 876, 812, 722, 623, 554	455,3 ( $\text{M}+1$ ) <sup>+</sup>
7	244-245	$\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{ClN}_7\text{O}$	497,98	2965, 1619, 1578, 1495, 1441, 1428, 1403, 1369, 1355, 1324, 1252, 1224, 1193, 1170, 1137, 1082, 1044, 972, 926, 910, 875, 814, 764, 732, 641, 593, 552, 482	498,5 ( $\text{M}+1$ ) <sup>+</sup>
8	236-240	$\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{ClN}_6\text{O}$	440,88	3049, 1629, 1610, 1564, 1505, 1486, 1440, 1321, 1295, 1278, 1253, 1233, 1215, 1175, 1106, 1071, 1036, 995, 953, 920, 872, 822, 812, 801, 790, 767, 626, 572	441,3 ( $\text{M}+1$ ) <sup>+</sup>
9	238-242	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{ClN}_7\text{O}$	483,95	3339, 3158, 3065, 2956, 1638, 1610, 1583, 1543, 1485, 1449, 1427, 1371, 1338, 1281, 1251, 1235, 1204, 1175, 1155, 1110, 1056, 873, 850, 813, 799, 761, 647, 858, 531	484,5 ( $\text{M}+1$ ) <sup>+</sup>

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



Spoj	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm, J/Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm, J/Hz)
6	9,09 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, 6'); 8,83 (s, 1H, 3'); 8,26 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 2); 8,20 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 10'); 8,11 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 7'); 7,93 – 7,89 (m, 2H, 4, 9'); 7,78 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, 5'); 7,74 (dd, $J = 9,1, 2,2$ Hz, 1H, 7); 7,42 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 3); 6,90 (dd, $J = 8,6, 2,1$ Hz, 1H, 5); 6,05 (s, 2H, 1'); 3,92 (s, 3H, 13); 3,13 (s, 3H, 12).	160,62 (6); 152,29 (6'); 149,31 (12'); 144,80 (1); 142,74 (2'); 141,17 (8); 140,22 (9); 138,15 (2); 135,28 (8'); 134,75 (4'); 128,91 (7'); 128,62 (11); 128,10 (9'); 125,34 (10'); 122,40 (4); 120,31 (11'); 117,20 (3'); 114,51 (10); 112,29 (3); 109,48 (5); 94,13 (7); 55,66 (13); 23,32 (12)
7	8,32 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 9'); 8,17 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 2); 8,08 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 13'); 8,05 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 8'); 7,98 (s, 1H, 3'); 7,87 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, 11'); 7,79 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 12'); 7,45 – 7,36 (m, 2H, 6', 7); 7,26 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 3); 6,87 (dd, $J = 8,6, 2,1$ Hz, 1H, 5); 6,45 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 4); 5,83 (s, 2H, 1'); 4,57 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, 4'); 3,83 (s, 3H, 13); 3,70 (q, $J = 5,9$ Hz, 2H, 5'); 2,98 (s, 3H, 12).	160,52 (6); 151,63 (9'); 149,73 (15'); 148,74 (7'); 143,88 (1); 142,65 (8); 141,07 (9); 137,98 (2); 134,60 (11'); 133,56 (2'); 128,49 (11); 127,34 (10'); 124,36 (12'); 123,78 (13'); 123,47 (8'); 122,34 (4); 117,33 (14'); 114,39 (10); 112,23 (3); 109,36 (5); 98,77 (3'); 93,95 (7); 55,53 (13); 47,86 (4'); 42,34 (5'); 23,11 (12).
8	11,51 (s, 1H, 13); 9,17 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, 6'); 9,02 (s, 1H, 3'); 8,30 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 2); 8,17 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, 10'); 8,11 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 7'); 8,01 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 4); 7,90 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, 5'); 7,83 (d, $J = 5,3$ Hz,	158,72 (6); 152,39 (6'); 149,39 (12'); 143,72 (1); 141,79 (2'); 141,37 (8); 140,36 (9); 137,74 (2); 135,39 (8'); 134,62 (4'); 129,03 (7'); 128,17 (9'); 127,14 (11); 125,35 (10'); 122,73 (4); 120,34 (11'); 117,17 (3'); 115,31 (10); 111,99 (3); 109,45 (5); 96,03 (7); 61,29

	1H, 9'); 7,79 (dd, $J = 9,1, 2,2$ Hz, 1H, 5); 7,27 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 3); 6,99 (dd, $J = 8,6, 2,2$ Hz, 1H, 7); 5,47 (s, 2H, 1'); 2,74 (s, 3H, 12).	(1'); 20,32 (12)
9	11,48 (s, 1H, 13); 8,41 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 9'); 8,32 (s, 1H, 2); 8,19-8,15 (m, 2H, 13', 8'); 8,05 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, 10'); 7,82-7,81 (m, 2H, 12', 3'); 7,54 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, 6'); 7,45 (dd, $J = 8,9, 2,3$ Hz, 1H, 7); 7,17 (s, 1H, 3); 6,88 (dd, $J = 8,7, 2,3$ Hz, 1H, 5); 6,57 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, 4); 5,25 (s, 2H, 1'); 4,70 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, 4'); 3,82 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H, 5'); 2,73 (s, 3H, 12).	158,79 (6); 151,77 (9'); 149,82 (15'); 148,82 (7'); 142,70 (1); 141,82 (8); 141,31 (9); 137,65 (2); 134,59 (11'); 133,60 (2'); 127,38 (10'), 127,18 (11); 125,08 (12'); 124,40 (13'); 124,00 (8'); 122,64 (4); 117,44 (14'); 115,10 (10); 111,98 (3); 109,42 (5); 98,91 (3'); 95,82 (7); 61,45 (1'); 47,90 (4'); 42,43 (5'); 20,28 (12).

U ranim fazama istraživanja lijekova jedan od ključnih koraka je dizajniranje molekula s poželjnim fizikalno-kemijskim svojstvima koja su garancija dobre oralne bioraspoloživosti. Proučavanjem velikih baza lijekova, znanstvenici su otkrili neke strukturne motive koji se pojavljuju kod gotovo svih registriranih ljekovitih tvari, a koji imaju znatan utjecaj na njihovu bioraspoloživost. Iz tih su istraživanja izvedena pravila koja omogućuju kemičarima da već prilikom dizajniranja novih potencijalnih kandidata evaluiraju zamišljene molekule i *in silico* metodama predvide potencijal molekule da posjeduje dobru oralnu bioraspoloživost te da nalikuje oralno primjenjivim lijekovima iz prakse (*drugability*). Nepoštivanje nekih od tih pravila, odražava se na njihovu apsorpciju, distribuciju, metabolizam, eliminaciju ili toksičnost. Dakle, nove molekule trebaju biti čim sličnije dasadašnjim lijekovima (*drug-like*) jer im se time šanse da jednoga dana postanu lijekovi povećava. Najpoznatije pravilo je Lipinskijevo pravilo broja 5 [56] koje zahtjeva da molekula ima  $M_r \leq 500$ ,  $\log P \leq 5$ , broj donora vodikove veze  $\leq 5$  i broj akceptora vodikove veze  $\leq 10$ . Međutim, s ciljem poboljšanja predviđanja oralne bioraspoloživosti molekule na temelju njene strukture i fizikalno-kemijskih svojstava (*druglikness*), ovo pravilo doživjelo je mnoge modifikacije pa tako danas postoji niz drugih pravila s preciznijim zahtjevima [57, 58, 59, 60]. Veber i suradnici 2002. godine objavili su rad u kojem predlažu pravila koja uzimaju u obzir fleksibilnost i polarnost molekule te zahtjevaju da molekula ima 10 ili manje veza koje mogu slobodno rotirati, manje od 12 donora i akceptora vodikove veze te polarnu površinu manju od  $140 \text{ \AA}^2$  [58]. Luzina i Popov predlažu Gelovanijeva pravila [61] koja zahtijevaju da topološka polarna površina



(TPSA) bude manja od  $140 \text{ \AA}^2$ , moralna refraktivnost (*MR*) između 40 i  $130 \text{ cm}^3/\text{mol}$  te broj atoma u molekuli između 20 i 70.

Kao što je vidljivo iz tablica 6.-8. svi novosintetizirani spojevi (**6-9**) u potpunosti zadovoljavaju Lipinskijeva, Veberova i Gelovanijeva pravila. Svi parametri izračunati su pomoću programa SwissADME.

**Tablica 6.** Lipinskijevi parametri za novosintetizirane spojeve (**6-9**) računati programom SwissADME.ch [62]

Spoj	Molekulska formula	$M_r$	$\log P$	Donori vodikovih veza	Akceptori vodikovih veza	Lipinski <sup>a</sup>
6	$C_{25}H_{19}ClN_6O$	454,91	4,22	0	5	4
7	$C_{27}H_{24}ClN_7O$	497,98	4,12	1	6	4
8	$C_{24}H_{17}ClN_6O$	440,88	4,15	1	5	4
9	$C_{26}H_{22}ClN_7O$	483,95	4,09	2	6	4

<sup>a</sup> broj parametara (od 4) koji odgovaraju Lipinskijevim parametrima

**Tablica 7.** Veberovi parametri za novosintetizirane spojeve (**6-9**) računati programom SwissADME.ch

Spoj	Broj rotirajućih veza	TPSA ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>a</sup>	Veber <sup>b</sup>
6	4	70,65	+
7	7	82,86	+
8	4	81,51	+
9	7	93,54	+

<sup>a</sup> TPSA – topološka polarna površina molekule, <sup>b</sup> slaganje s Veberovim pravilima

**Tablica 8.** Gelovanijevi parametri za novosintetizirane spojeve (6-9) računati programom SwissADME.ch

Spoj	MR (cm <sup>3</sup> /mol) <sup>a</sup>	Broj atoma	Gelovani <sup>b</sup>
6	129,67	52	+
7	143,23	60	+
8	124,77	49	+
9	138,33	57	+

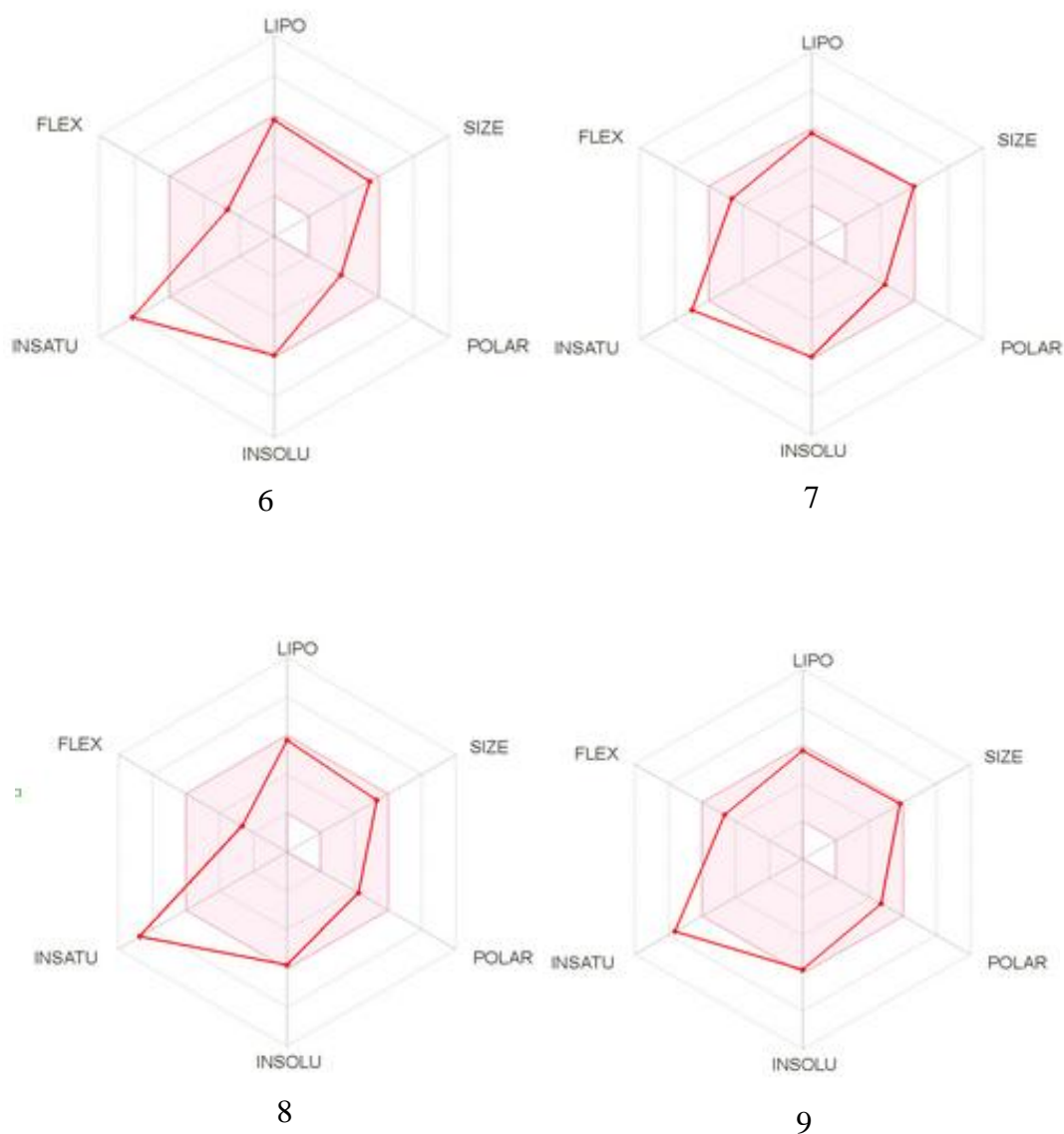
<sup>a</sup> molekularna refraktivnost, <sup>b</sup> slaganje s Gelovanijevim pravilima

Bioavailability radar [63] je alat programa SwissADME koji na slikovit i jednostavan način omogućuje brzu procjenu oralne bioraspodivnosti. Naime, alat u obzir uzima šest fizikalno-kemijskih svojstava molekule: lipofilnost, veličinu, polarnost, topljivost, fleksibilnost i zasićenost, te iscrtava polarni grafikon s pravilnim ružičastim šesterokutom koji predstavlja područje vrijednosti idealnih za dobru bioraspodivnost. Svaki analizirani spoj s obzirom na vrijednosti parametara opisuje vlastiti šesterokut čije su stranice crvene boje. Ukoliko se neki vrh šesterokuta nalazi izvan ružičastog šesterokuta znači da u tom parametru analizirani spoj odstupa od kriterija. Vrijednosti parametara za novosintetizirane spojeve (6-9) dane su u Tablici 9., a grafički prikaz dan je na Slici 11.

**Tablica 9.** Bioavailability radar parametri za novosintetizirane spojeve (6-9) računati programom SwissADME.ch

Spoj	XLOG P3 <sup>a</sup>	Log S <sup>b</sup>	Csp3 <sup>c</sup>
6	4,59	-5,92	0,12
7	4,55	-5,91	0,19
8	4,54	-5,82	0,08
9	4,49	-5,80	0,15

<sup>a</sup> XLOG P3 – metoda izračuna log P programom XLOGP, v. 3.2.2.; <sup>b</sup> log S – mjera topljivosti spoja u vodi: netopljivo < -10 < slabo topljivo < -6 < osrednje topljivo < -4 < topljivo < -2 < dobro topljivo < 0 < visoko topljivo; <sup>c</sup> Csp3 – udio sp<sup>3</sup> hibridiziranih atoma ugljika u ukupnom broju atoma ugljika u strukturi



**Slika 11.** Prikaz *Bioavailability radar* modela za predviđanje oralne bioraspoloživosti novosintetiziranih spojeva (6-9). Ružičasto područje predstavlja optimalni raspon za svako svojstvo (lipofilnost (**LIPO**): XLOGP3 između -0,7 i +5,0; veličina (**SIZE**): MW između 150 i 500 g/mol; polaritet (**POLAR**): TPSA između 20 i 130 Å<sup>2</sup>; topljivost (**INSOLU**): log S ne veći od 6; zasićenost (**INSATU**): udio ugljika u sp<sup>3</sup> hibridizaciji ne manji od 0,25; fleksibilnost (**FLEX**): ne više od 9 rotirajućih veza).

Grafikoni na Slici 11. pokazuju kako svi sintetizirani spojevi zadovoljavaju pet od šest kriterija. Problematičan je parametar zasićenosti – svi spojevi imaju udio ugljika u sp<sup>3</sup> hibridizaciji manji od 0,25. Najmanje odstupanje od tog kriterija pokazuje spoj 7 kojeg bi se u budućnosti valjalo optimirati ukoliko pokaže dobro antimalarijsko djelovanje.

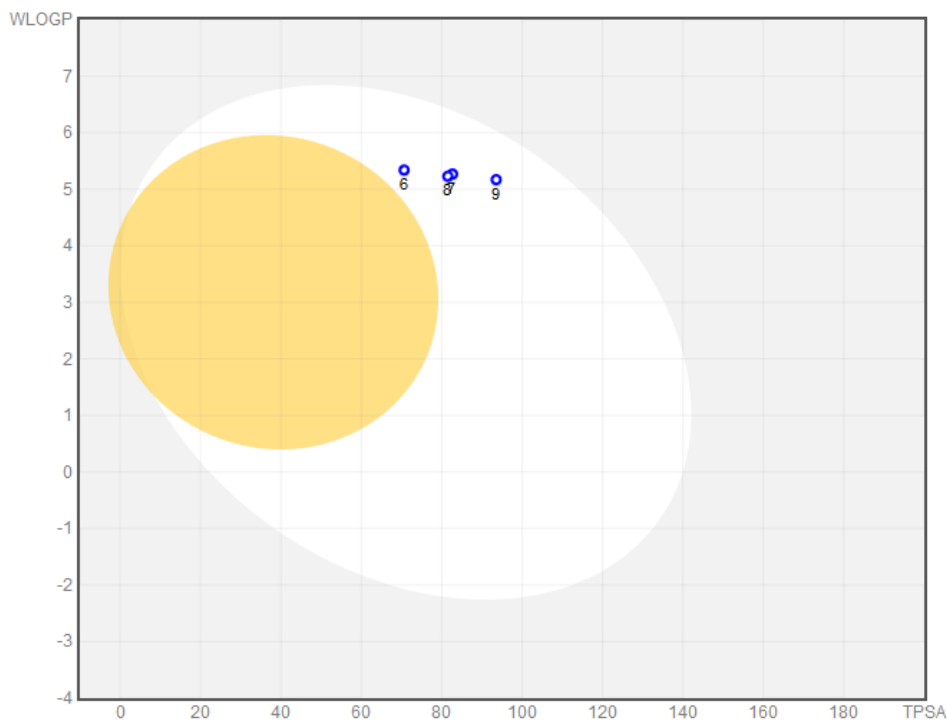
Osim oralne bioraspoloživosti, veliku važnost za farmakokinetiku ima i metabolizam. Razvijeni su računalni modeli koji prema strukturi predviđaju interakcije spojeva s enzimima uključenim u metabolizam ksenobiotika. Tako već spomenuti program SwissADME može dati preliminarne odgovore na pitanja dovodi li ispitivani spoj do inhibicije različitih CYP enzima, je li neka molekula supstrat P-glikoproteina te prelazi li krvno-moždanu barijeru. U Tablici 10. prikazano je predviđanje farmakokinetike za novosintetizirane spojeve (6-9).

**Tablica 10.** Farmakokinetički parametri za novosintetizirane spojeve (6-9) računati programom SwissADME.ch

Spoj	GI aps. <sup>a</sup>	Prolazak KMB-e <sup>b</sup>	Supstrat PGP <sup>c</sup>	CYP1A2 inh. <sup>d</sup>	CYP2C9 inh.	CYP2C19 inh.	CYP2D6 inh.	CYP3A4 inh.
6	visoka	-	+	-	-	+	-	+
7	visoka	-	+	+	+	+	+	+
8	visoka	-	+	+	-	+	+	+
9	visoka	-	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> GI aps. – gastrointestinalna apsorpcija; <sup>b</sup> KMB – krvno-moždana barijera; <sup>c</sup> PGP – P-glikoprotein; <sup>d</sup> inh. – inhibitor

Uočavamo da sve molekule imaju visoku GI apsorpciju te ne prolaze krvno-moždanu barijeru. To je ilustrativno prikazano tzv. *Boiled-Egg* dijagramom [64], grafikonom kreiranim programom SwissADME koji opisuje prolazak lijekovite tvari kroz tjelesne barijere. Uzima u obzir TPSA i WLOGP te je podijeljen u tri zone. Ukoliko se lijekovi (na slici označeni plavim krugovima) nalaze unutar žutog područja, „žumanjak jajeta“, to znači da oni prelaze krvno-moždanu barijeru. Bijela zona, „bjelanjak“, označava lijekove koji se pasivno apsorbiraju u probavnom traktu. Siva zona predstavlja lijekove koji ne spadaju niti u jedno od ove dvije kategorije. Na Slici 12. prikazan je *Boiled-Egg* dijagram za spojeve 6-9.



**Slika 12.** *Boiled-Egg* dijagram za spojeve 6-9 kreiran alatom SwissADME

Naši spojevi mogu se primjenjivati oralno zbog dobre apsorpcije te neće izazivati nuspojave povezane sa središnjim živčanim sustavom jer ne prelaze KMB. Ono što je zabrinjavajuće je da svi spojevi uzrokuju inhibiciju gotovo svih glavnih enzima iz CYP porodice što znači da bi mogli ulaziti u interakciju s mnogim lijekovima danas korištenima u praksi. Ukoliko ne bi bili kontraindicirani, njihovo doziranje bilo bi komplicirano te bi zahtjevalo farmakogenetsku obradu pacijenata prije terapije. Stoga bi daljnje modifikacije strukture trebale bi ići i u smjeru optimiranja metabolizma. Spoj **6** je pokazao najslabiju inhibiciju enzima iz porodice CYP.

## **5. ZAKLJUČCI**

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolskih derivata harmina i klorokina. Ovo istraživanje provedeno je u okviru istraživanja derivata harmina kao potencijalnih antimalarijskih lijekova koje se provodi proteklih nekoliko godina na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

- a) 9-((1-(7-klorokinolin-4-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**6**),
- b) 7-kloro-*N*-(2-(4-((7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)kinolin-4-amin (**7**),
- c) 7-((1-(7-klorokinolin-4-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**8**),
- d) 7-kloro-*N*-(2-(4-(((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)kinolin-4-amin (**9**).

Svi novosintetizirani spojevi zadovoljavaju Lipinskijeva, Gelovanijeva i Veberova pravila za male molekule lijekova te, s obzirom na tako predviđena fizikalno-kemijska svojstva, predstavljaju dobre kandidate za nove lijekove. Pomoću alata SwissADME napravljena su računalna predviđanja farmakokinetike. Svi spojevi se pasivno apsorbiraju u GIT-u, potencijalni su supstrati P-glikoproteina te ne prelaze KMB. Prema predviđanjima pomoću alata *Bioavailability radara* novosintetizirani spojevi zadovoljavaju 5 od 6 kriterija te bi mogli imati vrlo dobru oralnu bioraspoloživost. Problematična je jedino zasićenost na kojoj bi trebalo poraditi na svim spojevima prilikom buduće optimizacije. Što se tiče metabolizma, predviđeno je da će svi spojevi biti inhibitori CYP 3A4 i CYP2C19, dok će enzime CYP1A2 i CYP2D6 inhibirati svi osim spoja **6**. Konačno, enzim CYP2C9 inhibiraju samo spojevi **7** i **9**.

Konačni produkti karakterizirani su upotrebom uobičajenih analitičkih i spektroskopskih metoda (NMR, MS, IR,  $t_r$ ).

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada ispitat će se antimalarijsko djelovanje novih spojeva i to na eritrocitnu fazu *P. falciparum* (klorokin osjetljivi Pf3D7 i klorokin-rezistentni PfDd2 sojevi) i na jetrenu fazu *P. berghei*. Toksičnost za humane stanice ispitat će se humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma HepG2.

## **6. ZAHVALE**



Zahvaljujem se svim članovima Zavoda za farmaceutsku kemiju, a prije svega doc. dr. sc. Ivani Perković na vodstvu prilikom izrade ovoga rada te prof. dr. sc. Zrinki Rajić na pruženoj prilici da budem dio istraživačkog tima na njezinom projektu.

Veliko hvala asistentima Marini Marinović, mag.appl.chem. i Goranu Poje, mag. pharm. na svesrdnoj pomoći, podršci i prekrasnom prijateljstvu koje je ispunilo moj rad u laboratoriju. Neka mi ne zamjere na bezbrojnim pitanjima i pogreškama .

Zahvaljujem i Maji Beus, mag. pharm. te Kristini Pavić, dr. sc. pharm. na ugodnom društvu u laboratoriju te svim savjetima, podršci i pomoći.

Konačno, zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na iznimnoj podršci, razumijevanju i strpljenju.

## **7. POPIS LITERATURE**

## LITERATURA

1. Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med*, 2010, 30 (1), 93–129.
2. Mullard A. Malaria medicine box expands. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 693-695.
3. Malarija, 2019., <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>, pristupljeno 8.3.2020.
4. World malaria report 2019, 2019, Geneva, World Health Organization.
5. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016, 2018, Geneva, World Health Organization.
6. Lou J, Ralf L, Georges EG. Pathogenesis of Cerebral Malaria: Recent Experimental Data and Possible Applications for Humans. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14, 810-820.
7. *Guidelines for the treatment of malaria*, 2015, Geneva, World Health Organization.
8. Tilley L, Judith S, Nina FG, Stuart AR, David AF. Artemisinin action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*, 2016, 32, 682-696.
9. Blasco B, Didier L, David AF. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nat Med*, 2017, 23, 917-928.
10. Dondorp AM, François N, Poravuth Y, Debashish D, Aung PP, Joel T. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*, 2009, 361, 455-467.
11. Straimer J, Gnadig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science*, 2014, 347, 428-431.
12. Fiot J, Sanon S, Azas N, Mahiou V, Jansen O, Angenot L, Balansard G, Ollivier E. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). *J Ethnopharmacol*, 2006, 106, 173-178.
13. Ancolio C, Azas N, Mahiou V, Ollivier E, Giorgio DC, Keita A, Timon-David P, Balansard G. Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. *Phytother Res*, 2002, 16, 646-649.

14. 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.
15. Cowen LE, Lindquist S. Hsp 90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science*, 2005, 309, 2185-2189.
16. Pavithra SR, Kumar R, Tatu U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite Plasmodium falciparum. *PLoS Comput Biol*, 2007, 3, 1701-1715.
17. El Gendy MAM, El-Kadi AOS. Harman induces CYP1A1 enzyme through an aryl hydrocarbon receptor mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 249, 55-64.
18. Picada JN, da Silva KV, Erdtmann B, Henriques AT, Henriques JA. Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. *Mutat Res*, 1997, 379, 135-149.
19. Shahinas D, MacMullin G, Benedict C, Crandall I, Pillai DR. Harmine is a potent antimalarial targeting Hsp90 and synergizes with chloroquine and artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56, 4207-4213.
20. Slater AF. Chloroquine: Mechanism of drug action and resistance in plasmodium falciparum. *Pharmacol Ther*, 1993, 57, 203-235.
21. Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *International J Parasitol*, 2002, 32, 1645-1653.
22. Gao J, Tian Z, Yang X. Breakthrough: Chloroquine Phosphate Has Shown Apparent Efficacy in Treatment of COVID-19 Associated Pneumonia in Clinical Studies. *Biosci Trends*, 2020, 14, 72-73.
23. Krishna S, White NJ. Pharmacokinetics of Quinine, Chloroquine and Amodiaquine. *Clin Pharmacokinet*, 1996, 30, 263-299.
24. Rainsford, KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, Kean WF. Therapy and Pharmacological Properties of Hydroxychloroquine and Chloroquine in Treatment of Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis and Related Diseases. *Inflammopharmacology*, 2015, 5, 231-269.

25. Wang M, Cao, R., Zhang, L, Yang X, Liu J, Xu M, Shi Z, Hu Z, Zhong W. Xiao G. Remdesivir and Chloroquine Effectively Inhibit the Recently Emerged Novel Coronavirus (2019-nCoV) in Vitro. *Cell Res*, 2020, 30 269-271.
26. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40, 2004-2021.
27. Huisgen R. 1,3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick. *Angew Chem*, 1963, 75, 604-637.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Dheer D, Singh V, Shankar R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg Chem*, 2017, 71, 30-54.

35. Kharb R, Sharma PC, Yar MS. Pharmacological significance of triazole scaffold. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2010, 26, 1-21.
36. Sztanke K, Tuzimski T, Rzymowska J, Pasternak K, Kandefer-Szerszeń M. Synthesis, determination of the lipophilicity, anticancer and antimicrobial properties of some fused 1,2,4-triazole derivatives. *Eur J Med Chem*, 2008, 43, 404-419.
37. Agalave SG, Maujan SR, Pore VS. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem Asian J*, 2011, 6, 2696-2718.
38. Egan T. Structure-Function Relationships in Chloroquine and Related 4-Aminoquinoline Antimalarials. *Mini Rev Med Chem*, 2001, 1, 113-123.
39. Muregi FW, Kirira PG, Ishih A. Novel Rational Drug Design Strategies with Potential to Revolutionize Malaria Chemotherapy. *Curr Med Chem*, 2011, 18, 113-143.
40. Kouznetsov VV, Gómez-Barrio A. Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation. *Eur J Med Chem*, 2009, 44, 3091-3113.
41. Taleli L, de Kock C, Smith PJ, Pelly SC, Blackie MAL, van Otterlo WAL. In vitro antiplasmodial activity of triazole-linked chloroquinoline derivatives synthesized from 7-chloro-N-(prop-2-yn-1-yl)quinolin-4-amine. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23, 4163-4171.
42. Kumar S, Saini A, Gut J, Rosenthal PJ, Raj R, Kumar V. 4-Aminoquinoline-chalcone/-N-acetylpyrazoline conjugates: Synthesis and antiplasmodial evaluation. *Eur J Med Chem*, 2017, 138, 993-1001.
43. Raj R, Singh P, Singh PJ, Rosenthal Gut PJ, Kumar V. Azide-alkyne cycloaddition en route to 1 H -1,2,3-triazole-tethered 7-chloroquinoline-isatin chimeras: Synthesis and antimalarial evaluation. *Eur J Med Chem*, 2013, 62, 590-596.
44. Starčević K, Pešić D, Toplak A, Landek G, Alihodžić S, Herreros E, Perić M. Novel hybrid molecules based on 15-membered azalide as potential antimalarial agents. *Eur J Med Chem*, 2012, 49, 365-378.

45. Fisher GM, Tanpure RP, Douchez A, Andrews KT, Poulsen S.nA.. Synthesis and Evaluation of Antimalarial Properties of Novel 4-Aminoquinoline Hybrid Compounds. *Chem Biol Drug Des*, 2014, 84, 462-472.
46. Pereira GR, Brandão GC, Arantes LM, de Oliveira HA, de Paula RC, do Nascimento MFA, de Oliveira AB. 7-Chloroquinolinotriazoles: Synthesis by the azide–alkyne cycloaddition click chemistry, antimalarial activity, cyto. *Eur J Med Chem*, 2014, 73, 295-309.
47. O’Neill PM, Bray PG., Hawley SR., Ward SA, Park BK. 4-Aminoquinolines—Past, present, and future: A chemical perspective. *Clin Pharmacol Ther*, 1998, 77, 29-58.
48. Aboelnaga A, EL-Sayed TH. Click synthesis of new 7-chloroquinoline derivatives by using ultrasound irradiation and evaluation of their biological activity. *Green Chem Lett Rev*, 2018, 11, 254-263.
49. Frédérick R, Bruyère C, Vancraeynest C, Reniers J, Meinguet C, Pochet L, Wouters J. Novel Trisubstituted Harmine Derivatives with Original in Vitro Anticancer Activity. *J Med Chem*, 2012, 55, 6489-6501.
50. Guantai EM, Ncokazi K, Egan TJ, Gut J, Rosenthal PJ, Smith PJ, Chibale K. Design, synthesis and in vitro antimalarial evaluation of triazole-linked chalcone and dienone hybrid compounds. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18, 8243-8256.
51. De Souza MVN, Pais KC, Kaiser CR, Peralta MA, de Ferreira LM, Lourenço MCS. Synthesis and in vitro antitubercular activity of a series of quinoline derivatives. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17, 1474-1480.
52. Perković I, Raić-Malić S, Fontinha D, Prudêncio M, Pessanha de Carvalho L, Held J, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić . Harmicines – harmine and cinnamic acid hybrids as novel antiplasmodial hits. *Eur J Med Chem*, 2019, 187, 111927.
53. Kitamura M, Koga T, Yano M, Okauchi T. Direct Synthesis of Organic Azides from Alcohols Using 2-Azido-1,3-dimethylimidazolium Hexafluorophosphate. *Synlett*, 2012, 23, 1335-1338.

54. Tireli M, Maračić S, Lukin S, Kulcsár MJ, Žilić D, Cetina M, Užarević K. Solvent-free copper-catalyzed click chemistry for the synthesis of N-heterocyclic hybrids based on quinoline and 1,2,3-triazole. *Beilstein J Org Chem*, 2017, 13, 2352–2363.
55. Kategaonkar AH, Shinde PV, Kategaonkar AH, Pasale SK, Shingate BB, Shingare MS. Synthesis and biological evaluation of new 2-chloro-3-((4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)quinoline derivatives via click chemistry approach. *Eur J Med Chem*, 2010, 45, 3142-3146.
56. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23, 3–25.
57. 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, 1, 55-68.
58. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615-2623.
59. Congreve M, Carr R, Murray C, Jhoti H. A “Rule of Three” for fragment-based lead discovery? *Drug Discov Today*, 2003, 8, 876-877.
60. Luzina EL, Popov AV. Synthesis, evaluation of anticancer activity and COMPARE analysis of *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-substituted ureas with pharmacophoric moieties. *Eur J Med Chem*, 2012, 53, 364-373.
61. <http://www.swissadme.ch/>. pristupljeno 21.7. 2020.
62. 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.
63. Daina A, Zoete V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 2016, 11, 1117-1121.

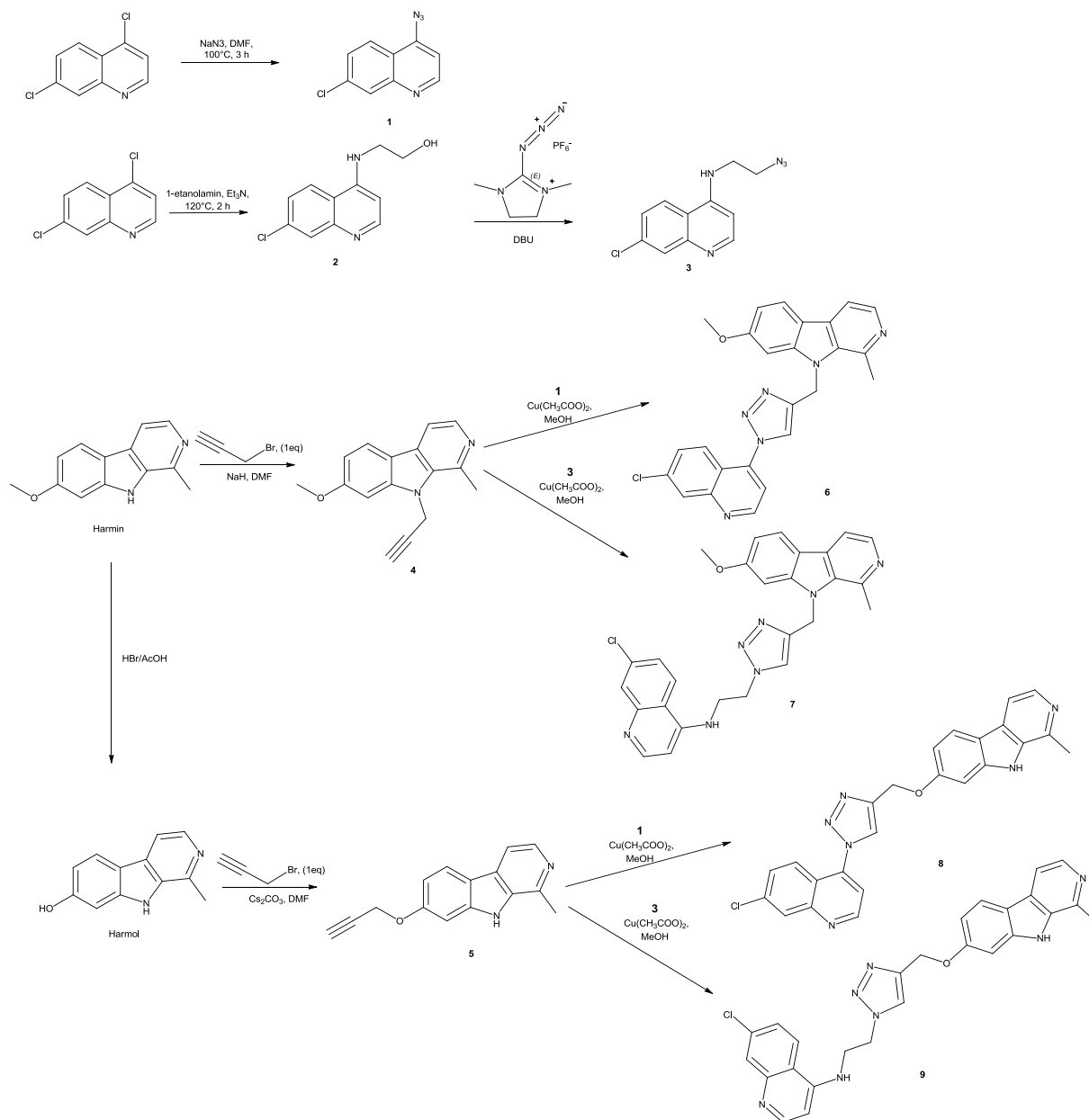


## **8. SAŽETAK**

**Marko Dužević**

**Sinteza i karakterizacija click-derivata klorokina s potencijalnim antimalarijskim djelovanjem**

Malarija je jedna od najraširenijih parazitskih bolesti na svijetu koju je WHO 2016. svrstala na 6. mjesto 10 najčešćih uzroka smrti u zemljama s niskim stupnjem razvoja. Iako je u proteklom desetljeću došlo do pozitivnog napretka po pitanju njezinog liječenja i prevencije, i dalje postoji velika potreba za razvojem novih antimalarika zbog pojave i širenja sojeva rezistentnih na konvencionalne lijekove. Do pojave novijih molekula, u prošlosti se, zbog svog dobrog sigurnosnog profila, djelotvornosti i isplative sinteze, vrlo često primjenjivao klorokin koji je i dan danas koristi kao lijek uzor za razvoj novih alternativnih antimalarika. S ciljem pojačavanja njegove antiplazmodijske aktivnosti na rezistentne sojeve, metodom *click*-kemije sintetizirana su četiri nova kinolin-1*H*-1,2,3-triazolska hibrida s harminom/harmolom, alkaloidom biljnog podrijetla koji također ima antimalarijsko djelovanje. U radu su detaljno opisani postupci njihove sinteze te rezultati strukturne karakterizacije spektroskopskim i analitičkim metodama. Svi sintetizirani spojevi pokazali su potencijal za dobru oralnu bioraspoloživost, a daljnjim istraživanjima, koja nadilaze okvire ovog rada, biti će ispitano njihovo antiplazmodijsko djelovanje na vrste roda *Plasmodium* i citotoksičnost na humanu staničnu liniju.



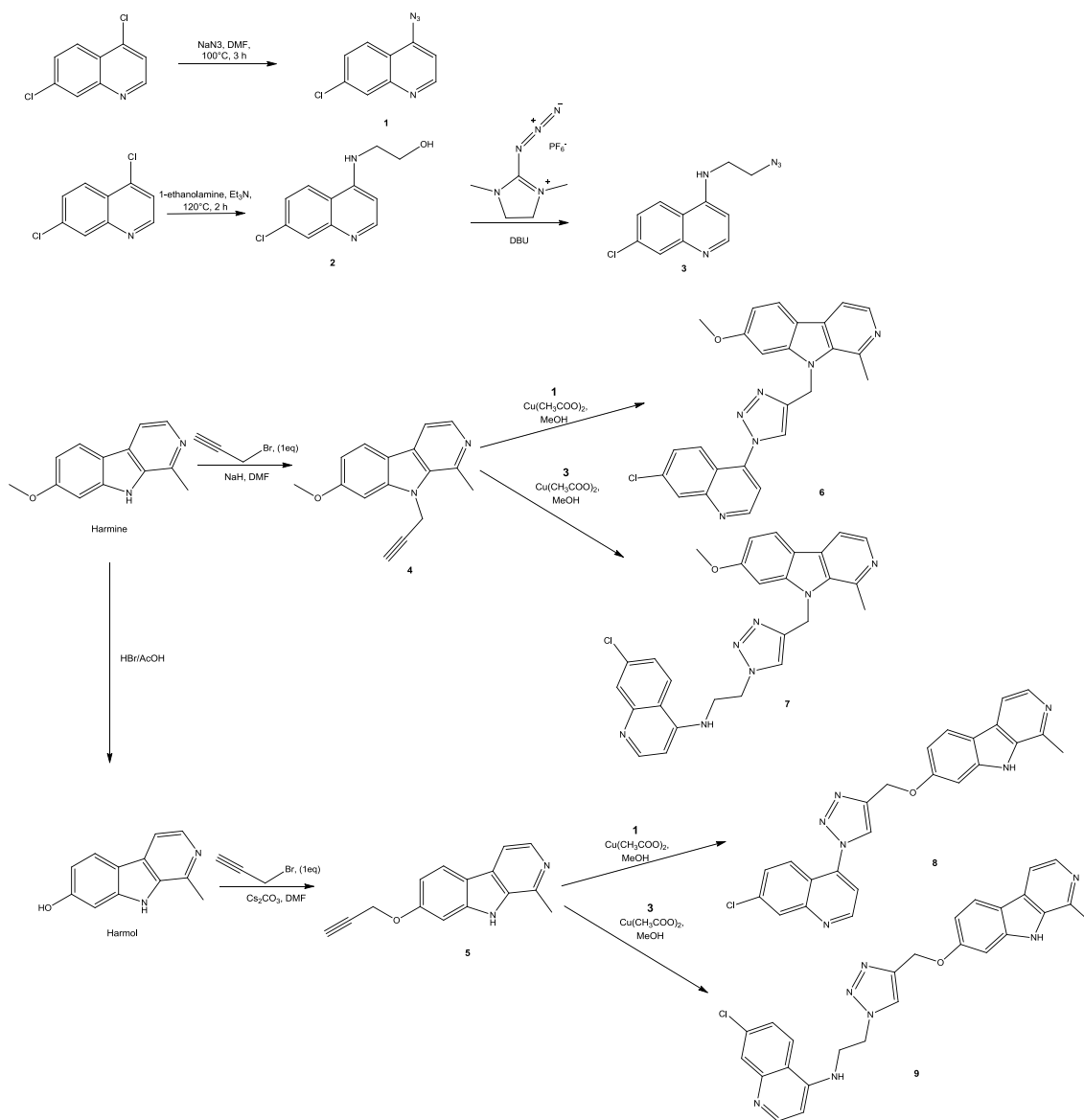
**Ključne riječi:** klorokin, harmin, *click*-kemija, alkin-azidna cikloadicija, antiplazmodijska aktivnost, 1,2,3-triazol

## **9. SUMMARY**

**Marko Dužević**

**Synthesis and characterization of chloroquine click derivatives with potential antimalarial activity**

Malaria is one of the most prevalent parasitic diseases in the world, ranked by the WHO in 2016 as the 6<sup>th</sup> most common cause of death in low-developed countries. Although positive progress has been made in its treatment and prevention over the past decade, there is still a great need for the development of new antimalarials due to the emergence and spread of strains resistant to conventional drugs. Until the advent of newer molecules, in the past, due to its good safety profile, efficacy, and cost-effective synthesis, chloroquine was used very often and is still used today as a model drug for the development of new alternative antimalarials. To enhance its antiplasmodial activity on resistant strains, four new quinoline-1*H*-1,2,3-triazole hybrids with harmine, an alkaloid of plant origin that also has antimalarial activity, were synthesized using click chemistry. The paper presents the procedures for their synthesis and the results of structural characterization by analytical and spectroscopic techniques. All synthesized compounds have shown the potential for good oral bioavailability, and further research, which goes beyond the scope of this paper, will examine their antiparasitic effects on species of the genus *Plasmodium*.

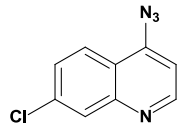


**Keywords:** chloroquine, harmine, click chemistry, alkyne azide cycloaddition, antiplasmodic activity, 1,2,3-triazole

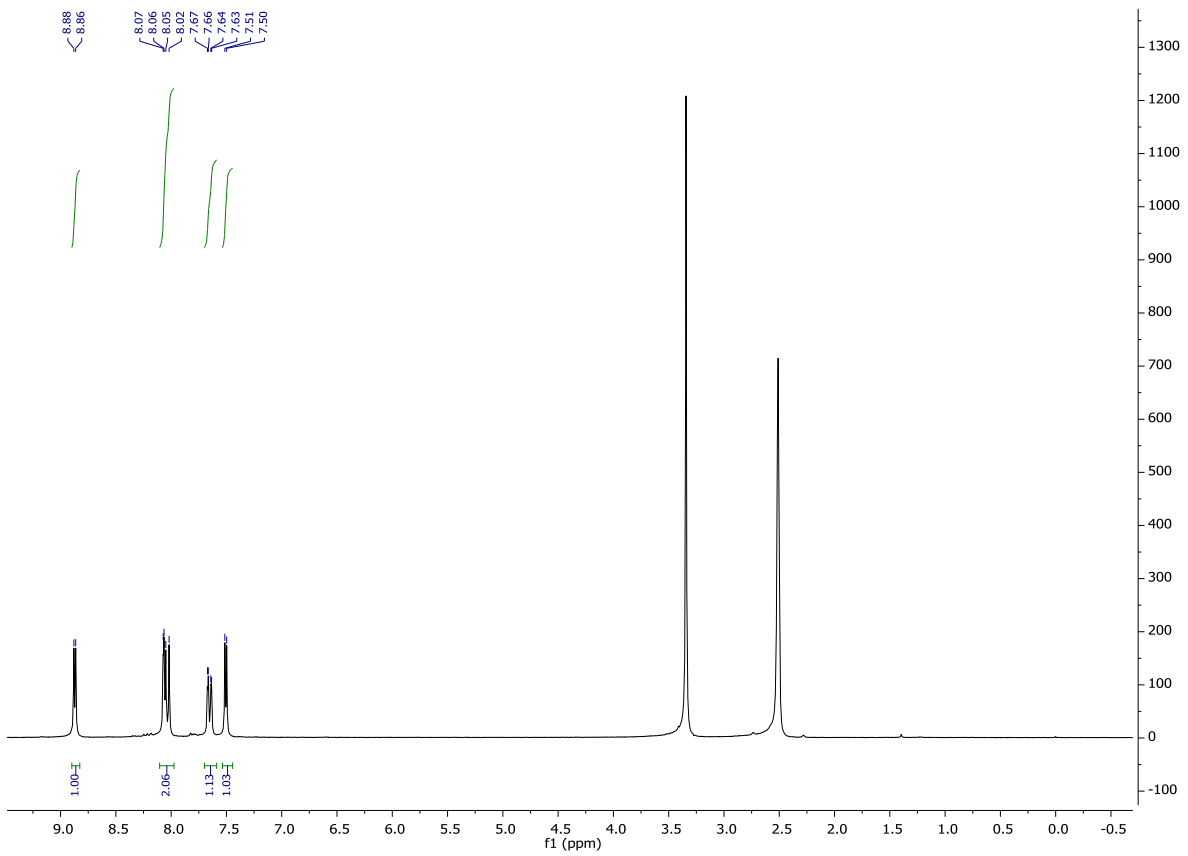
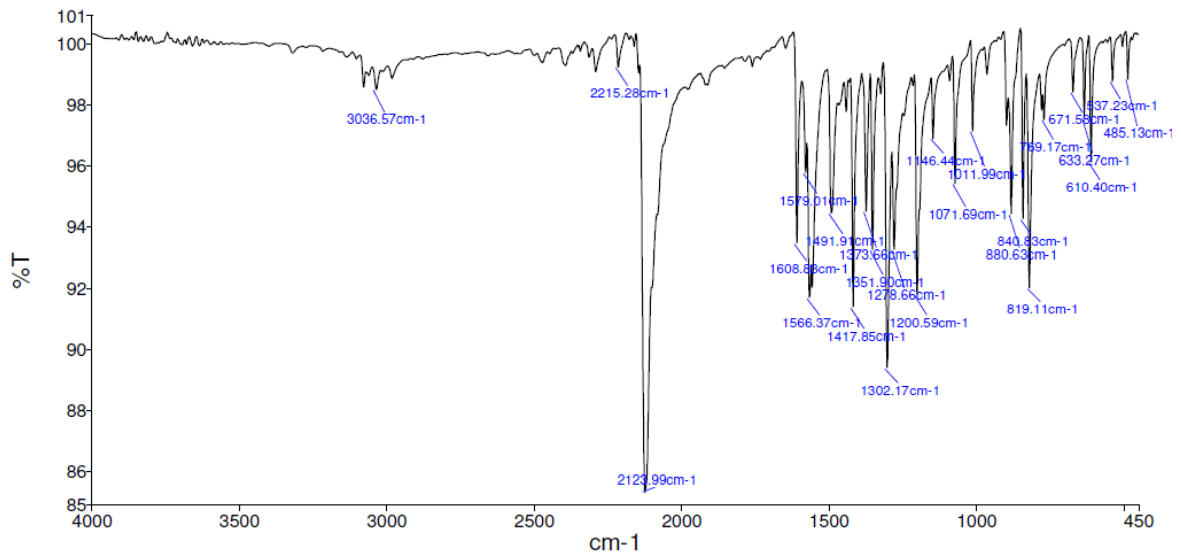
## **10. PRILOZI**

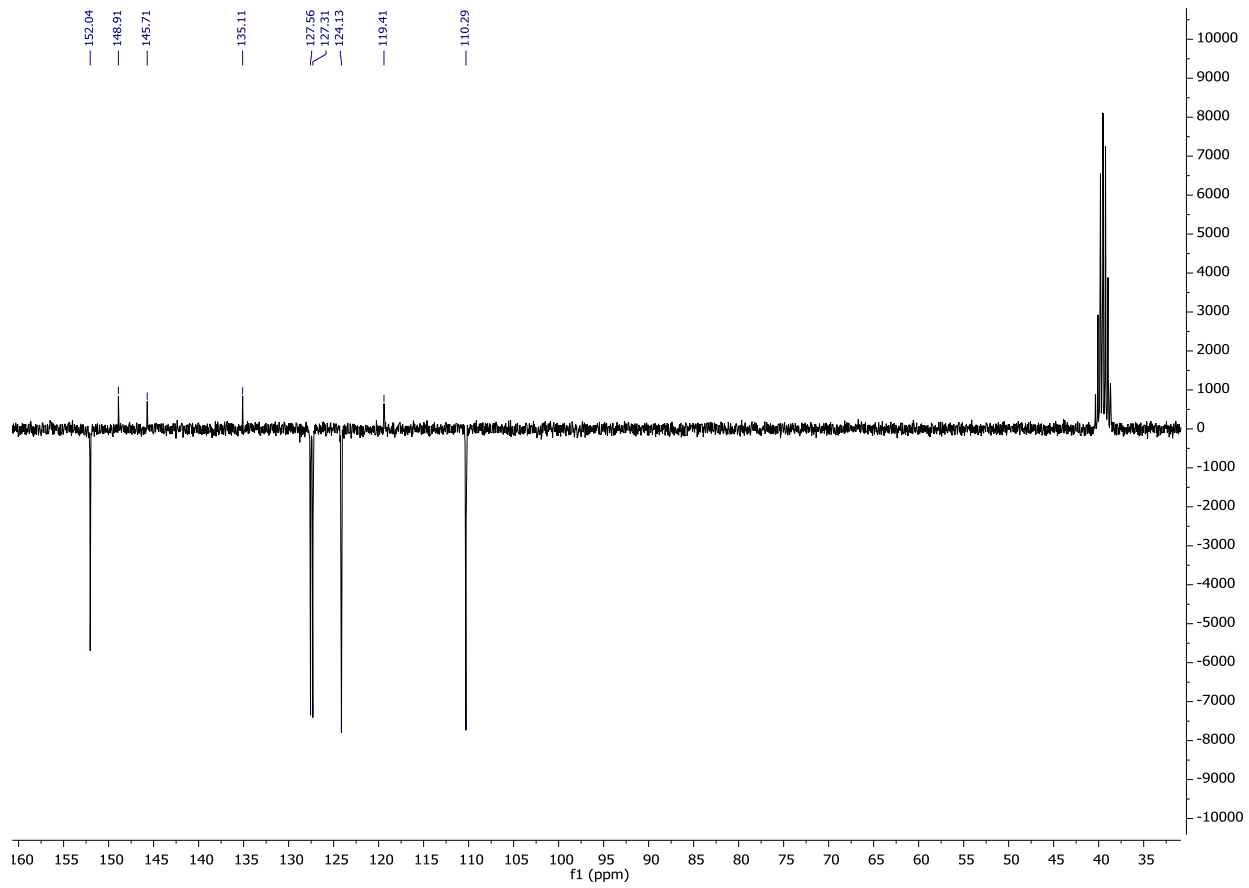
Prilozi sadrže IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR i MS spektre novosintetiziranih spojeva u ovom radu.

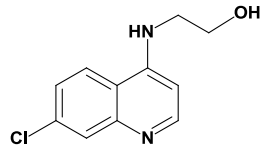




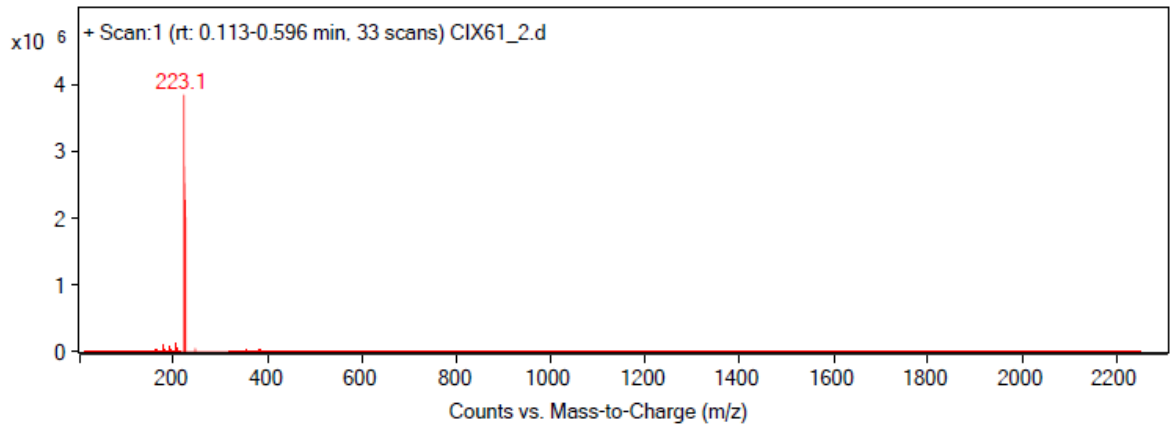
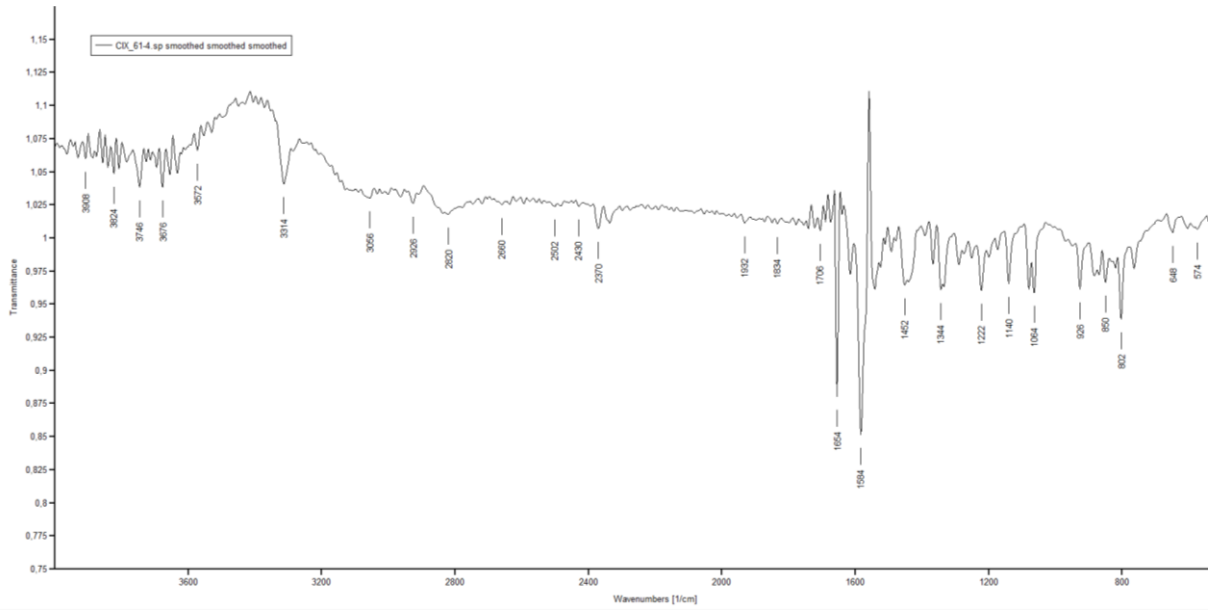
1

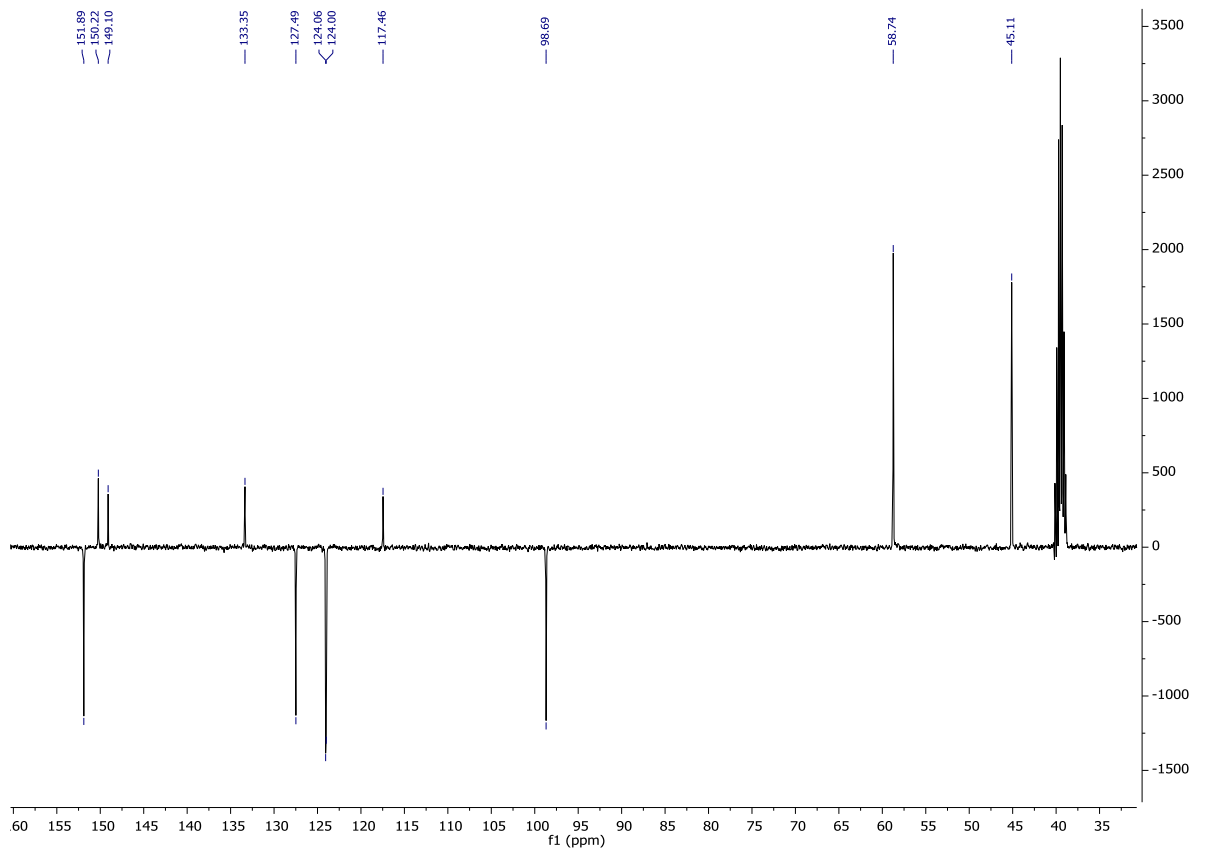
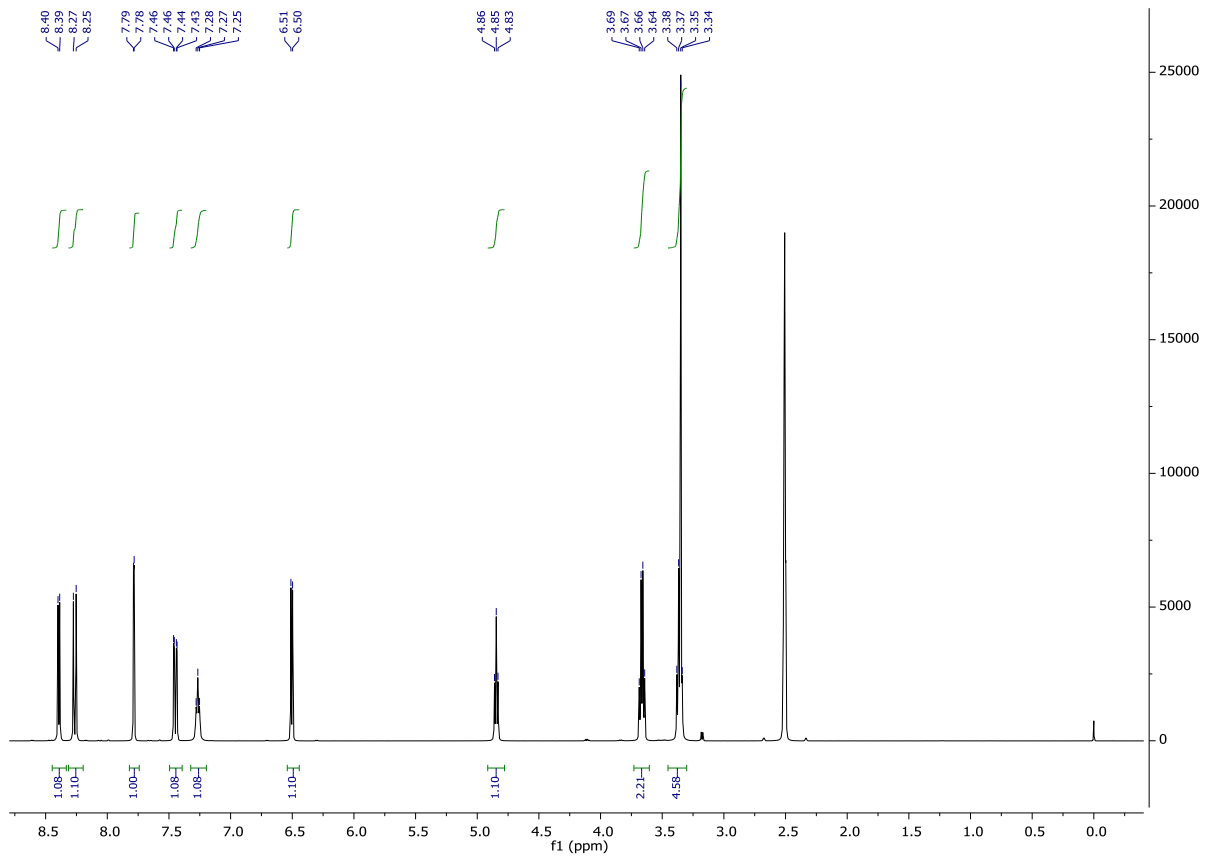


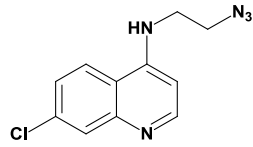




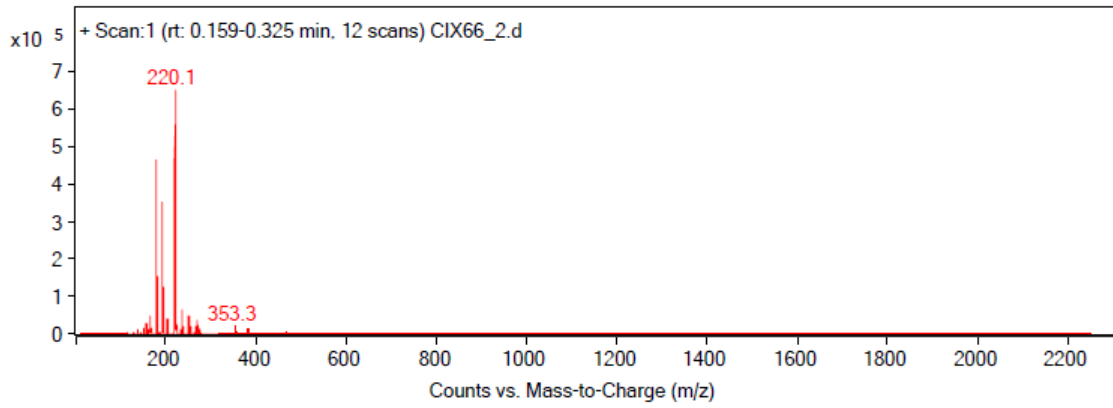
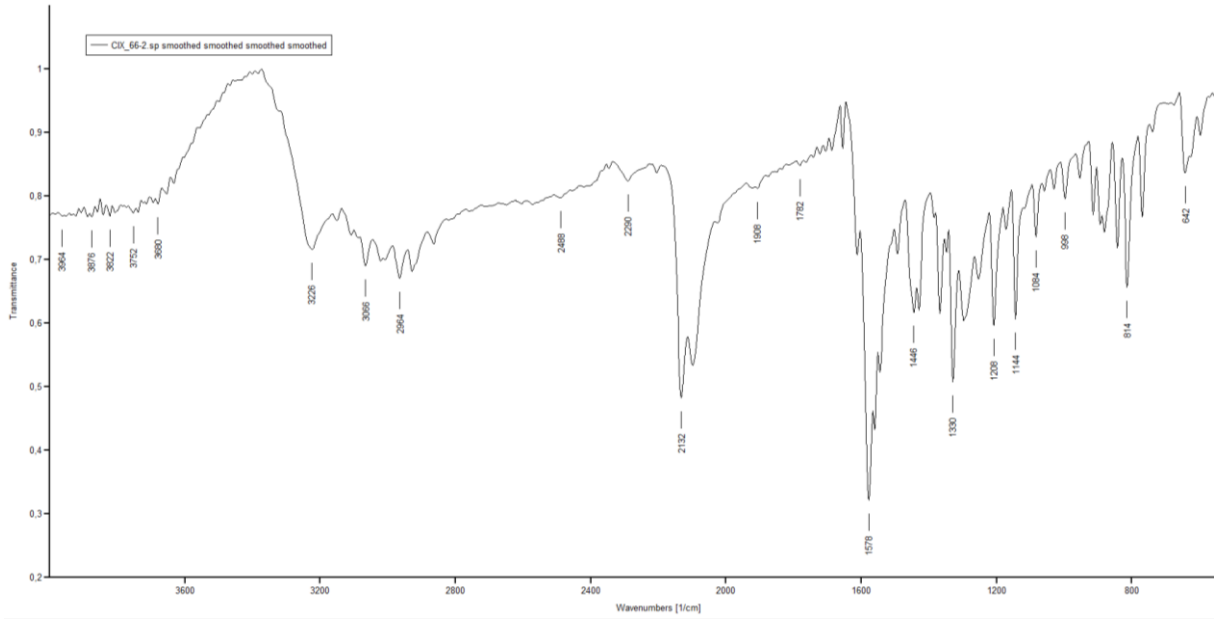
2

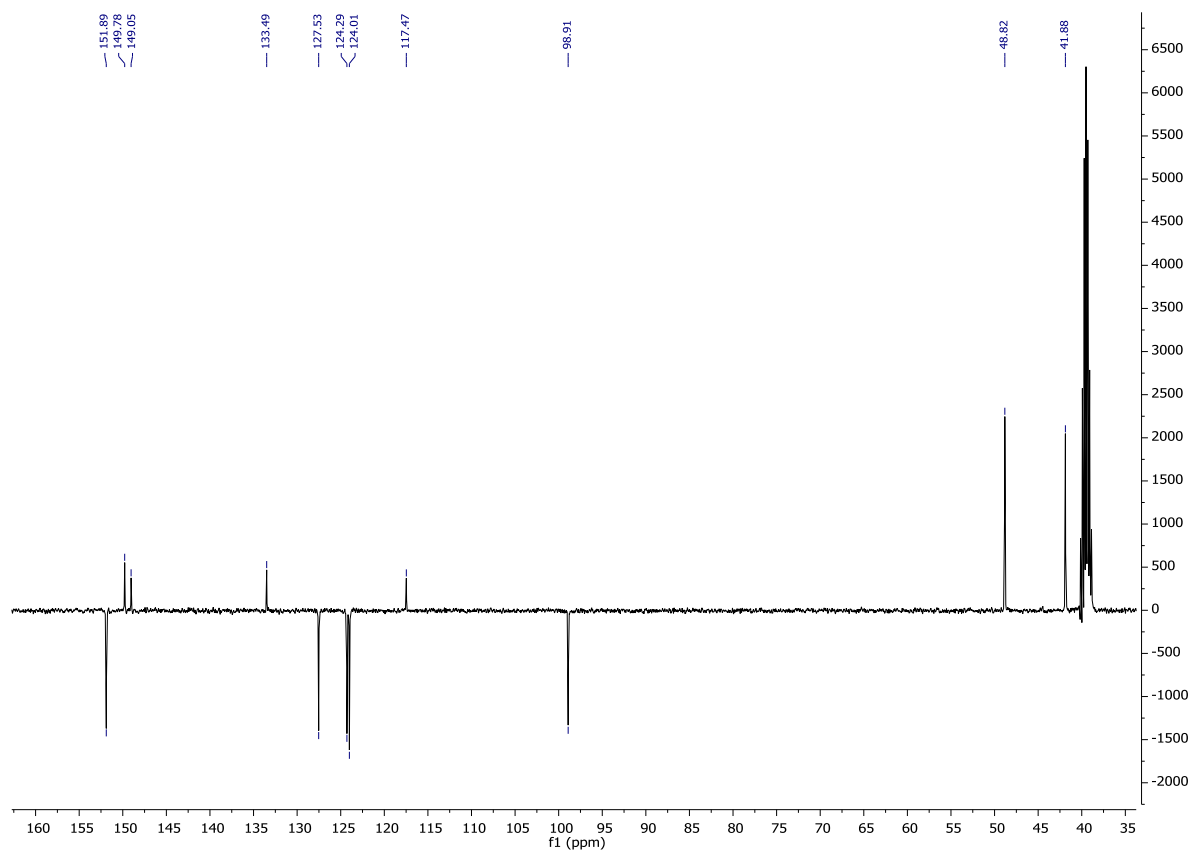
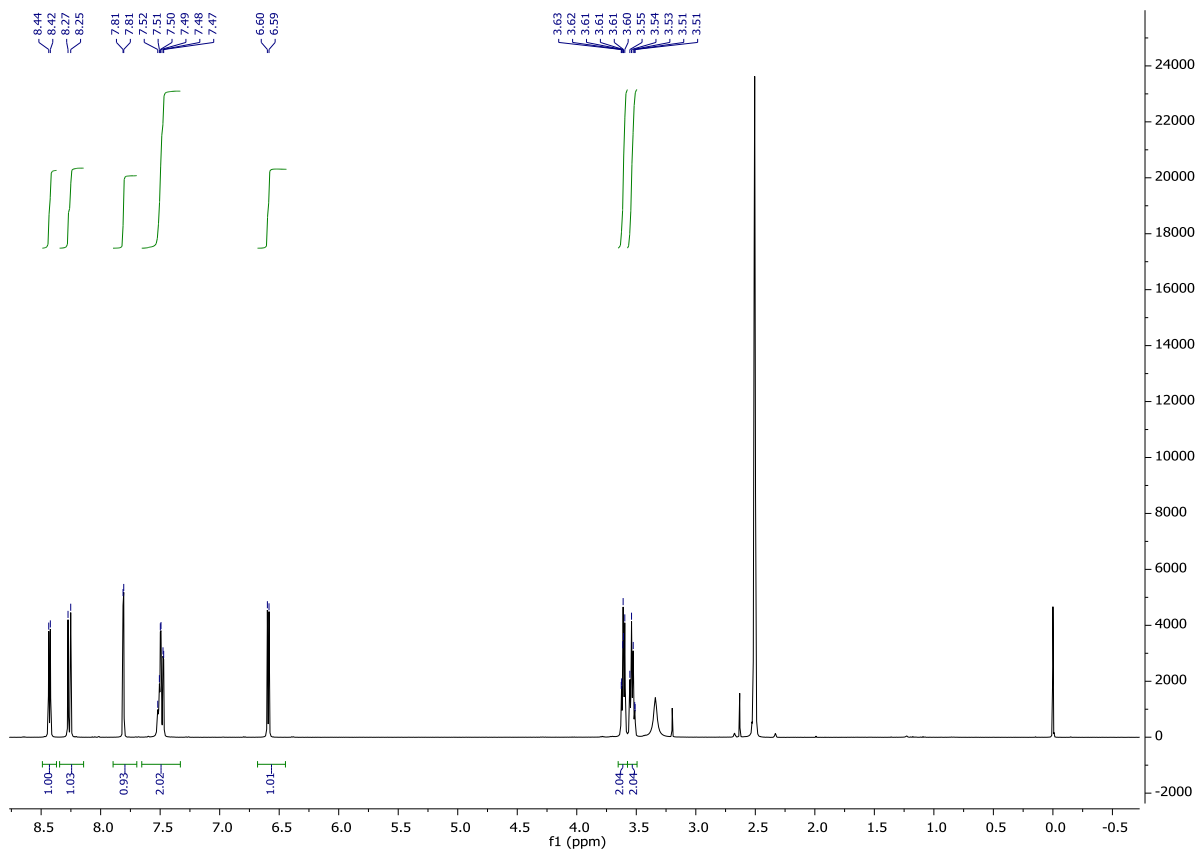


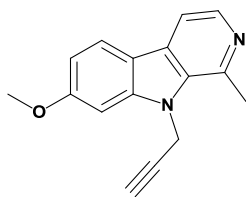




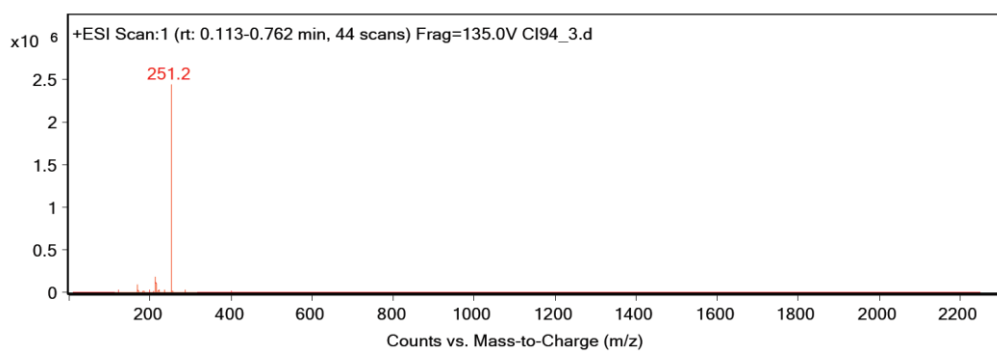
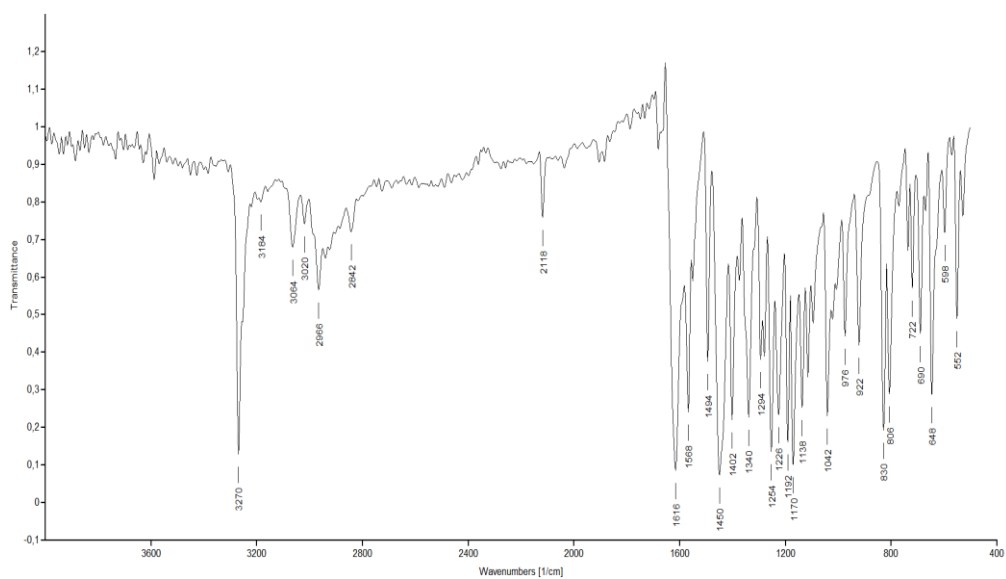
3

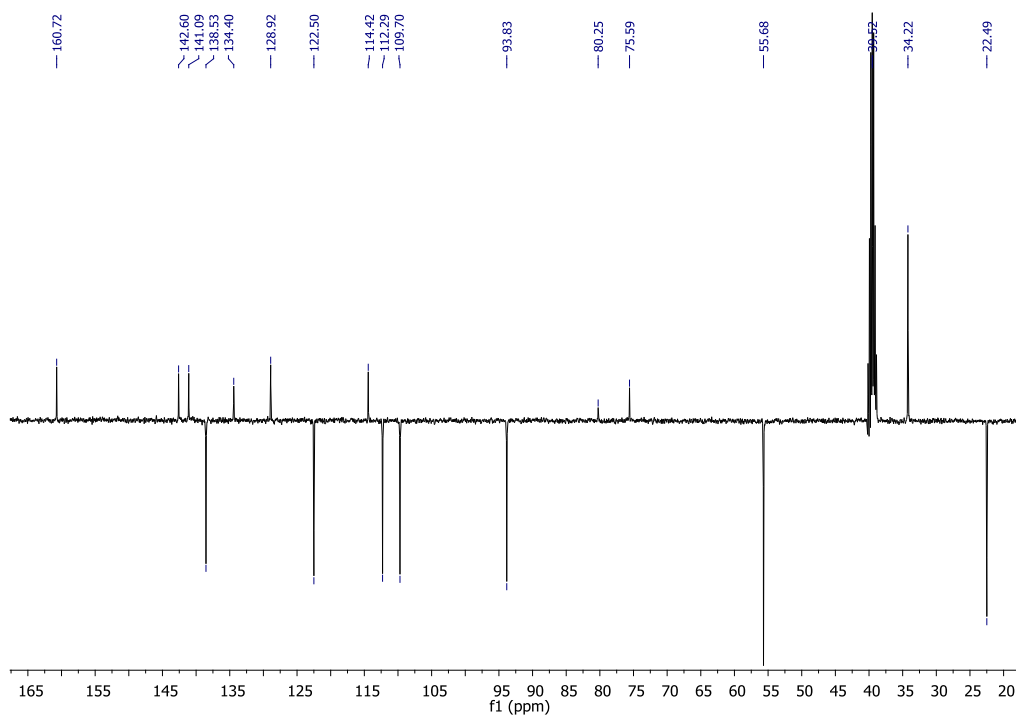
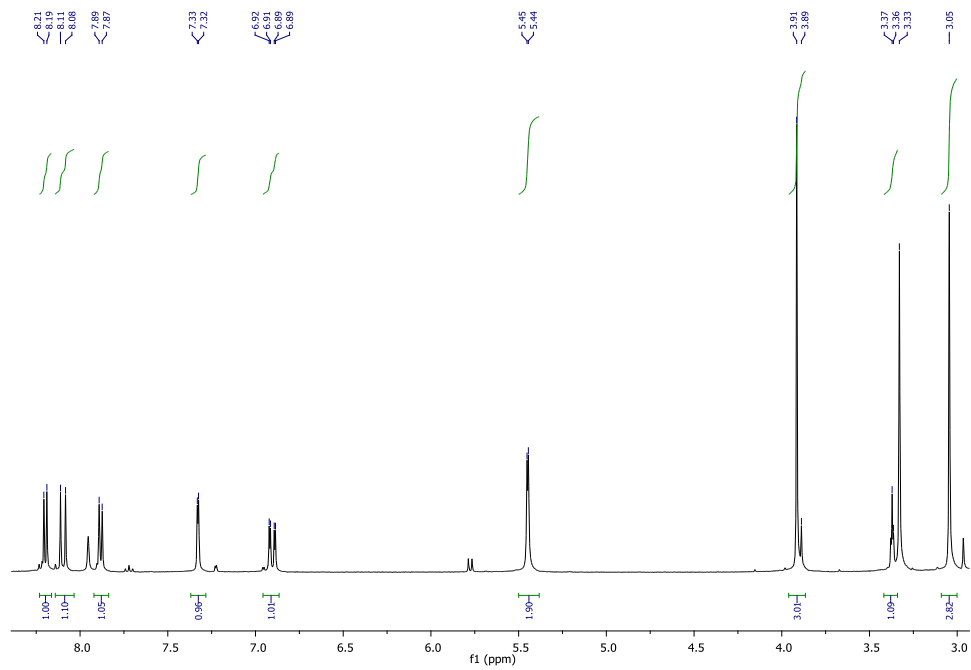




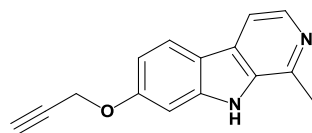


4

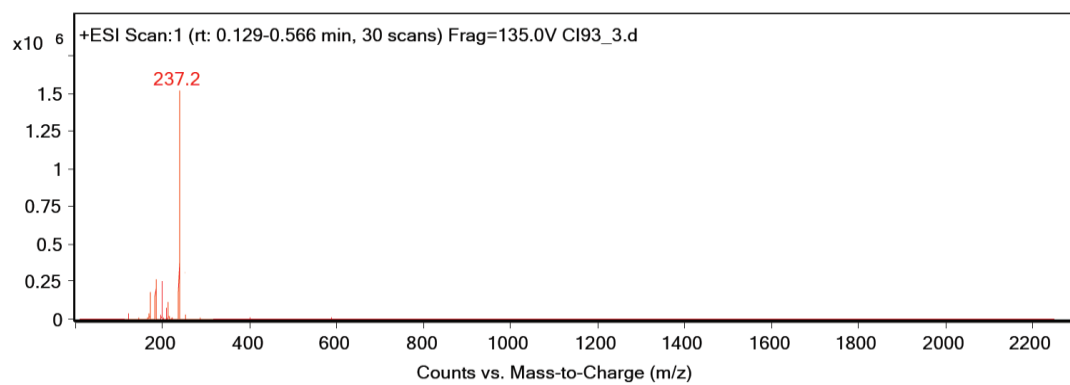
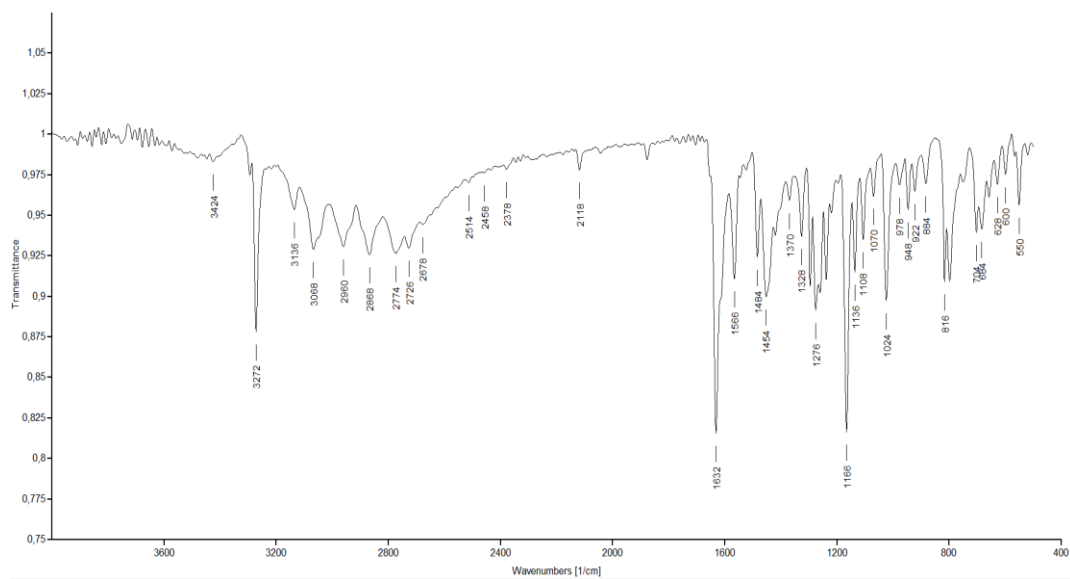


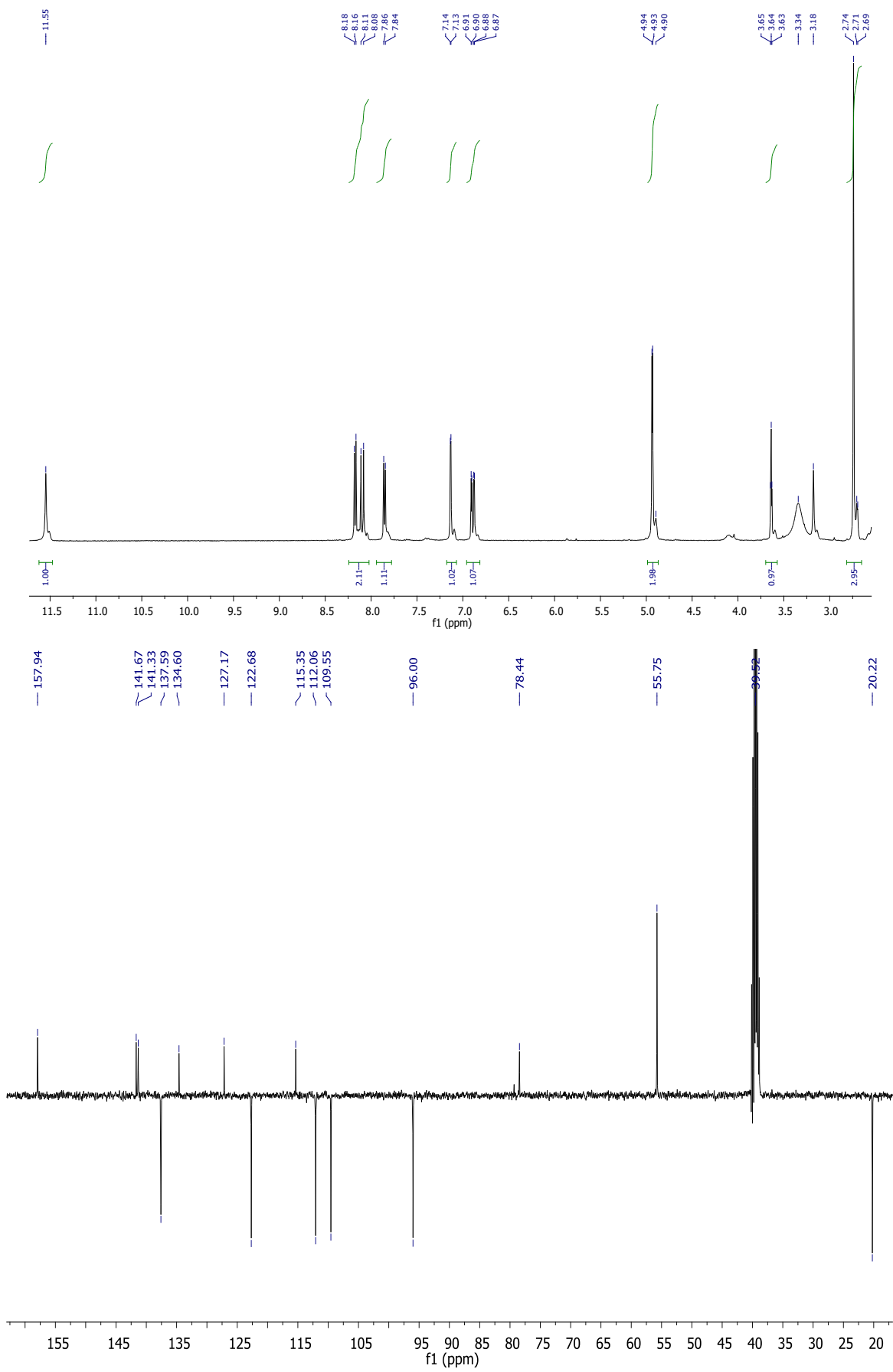


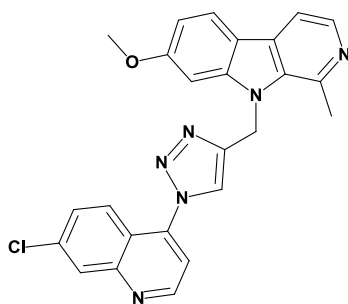




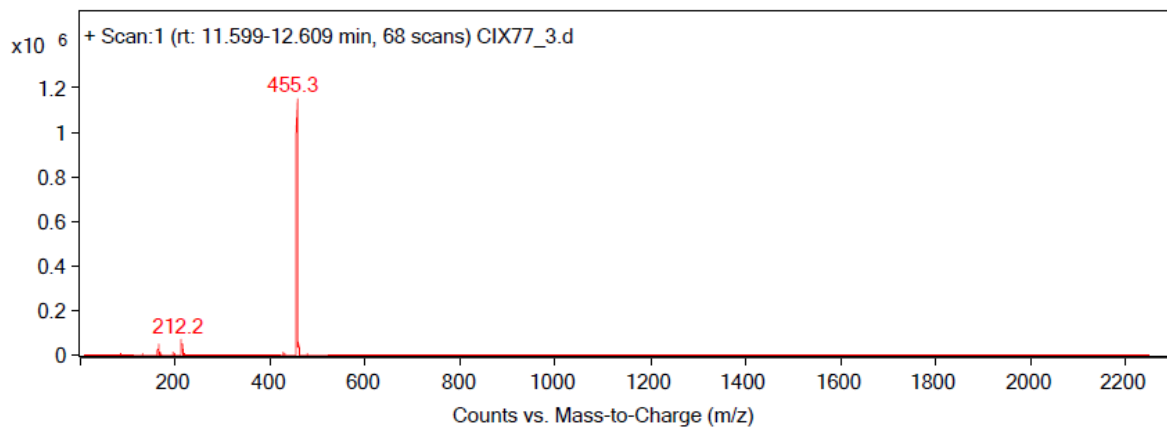
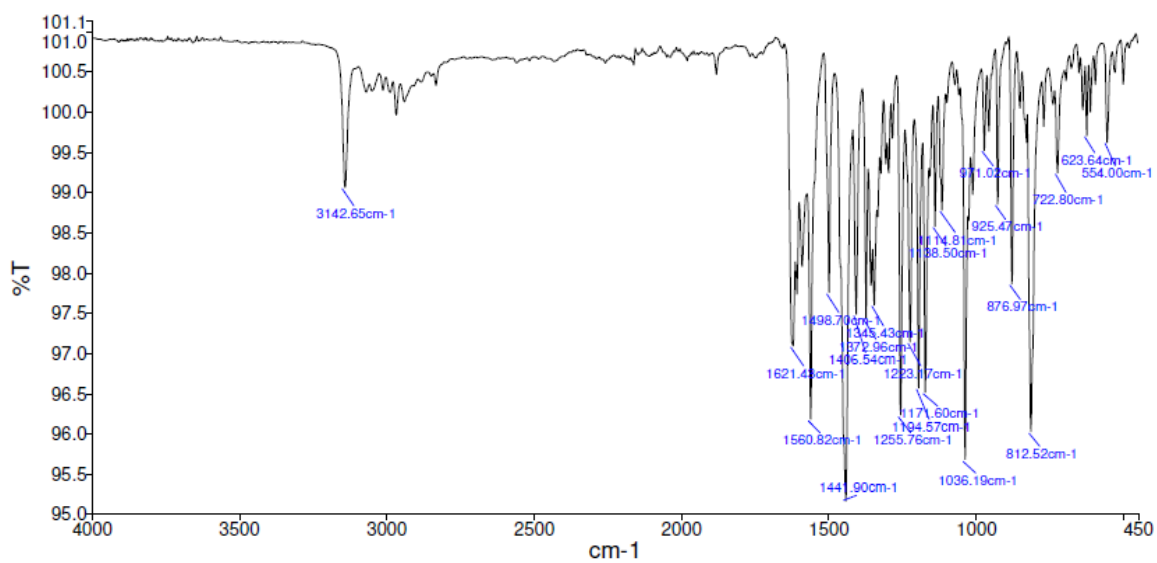
5

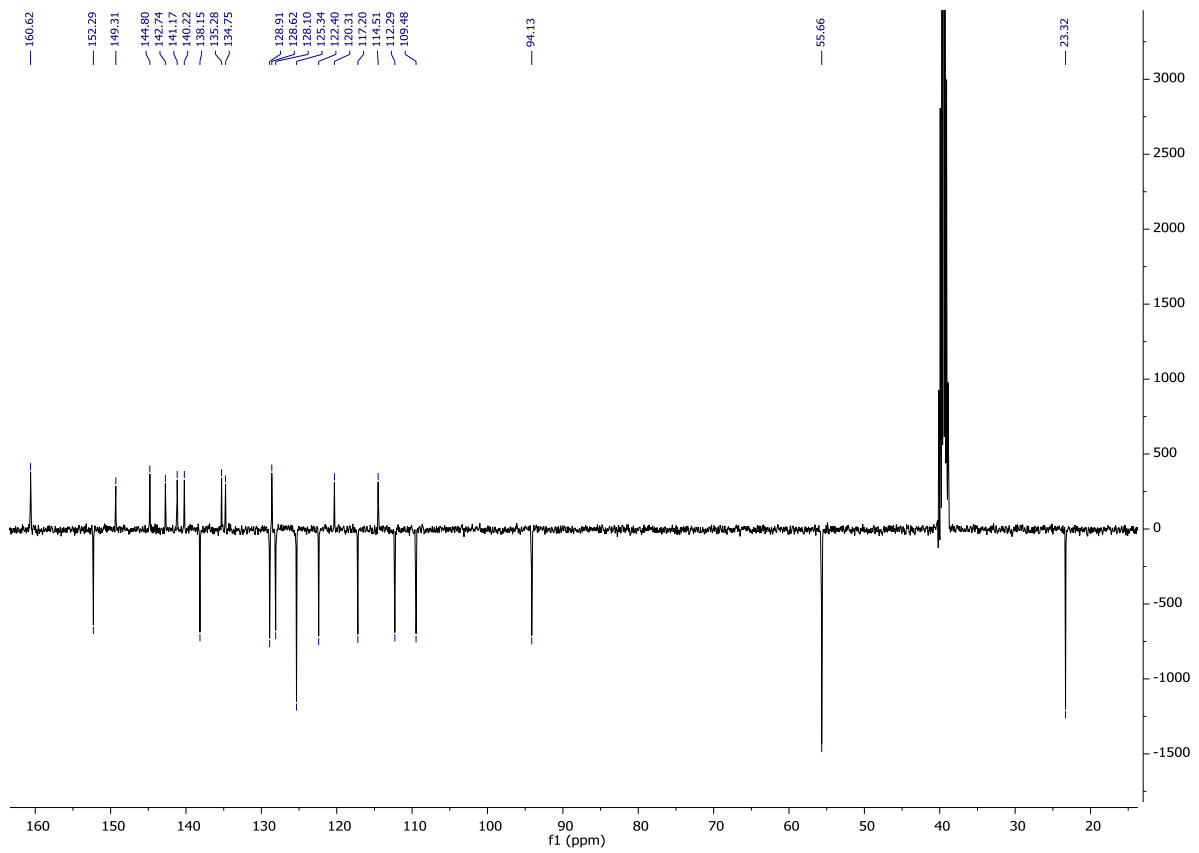
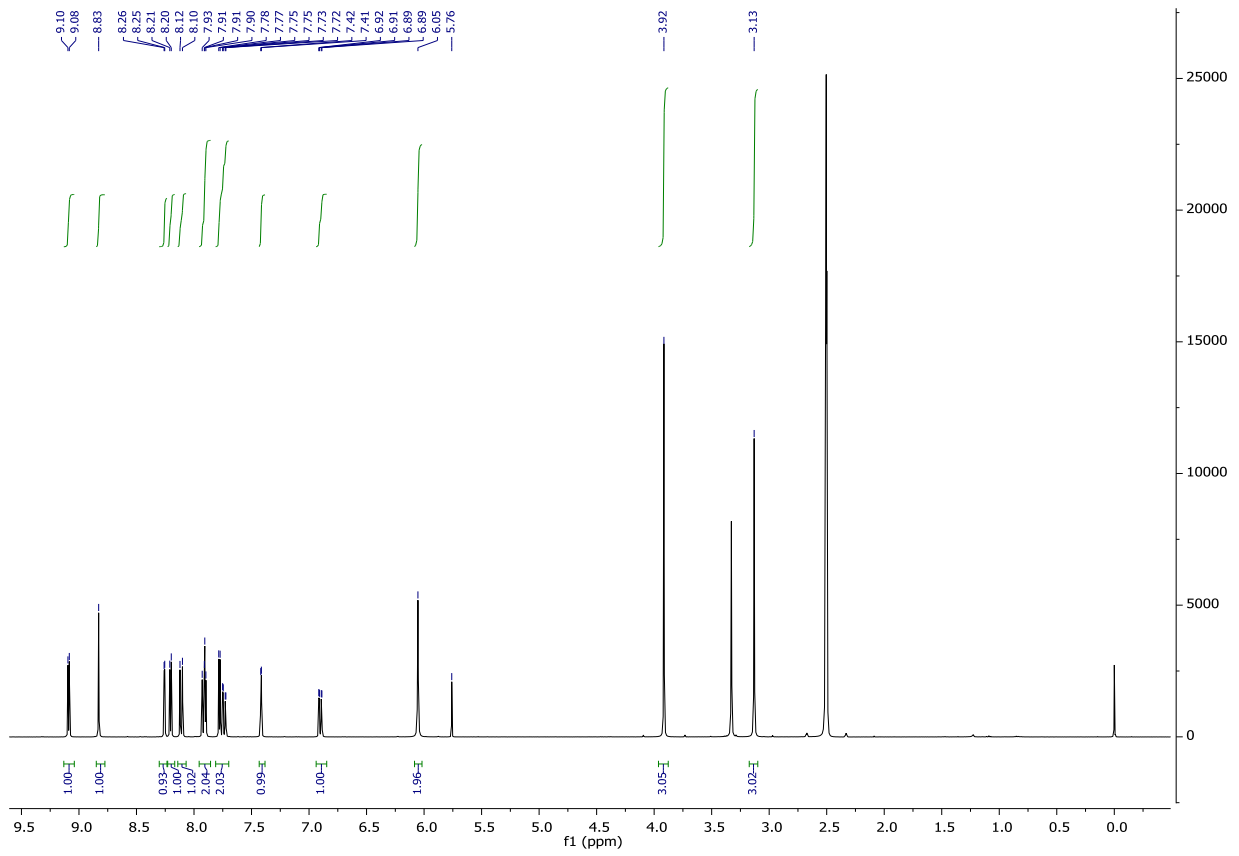


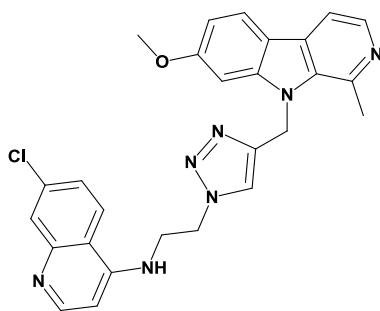




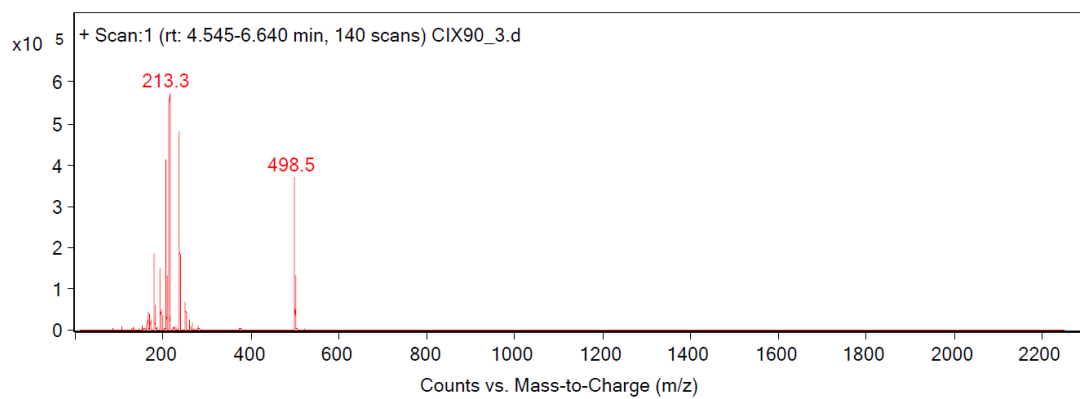
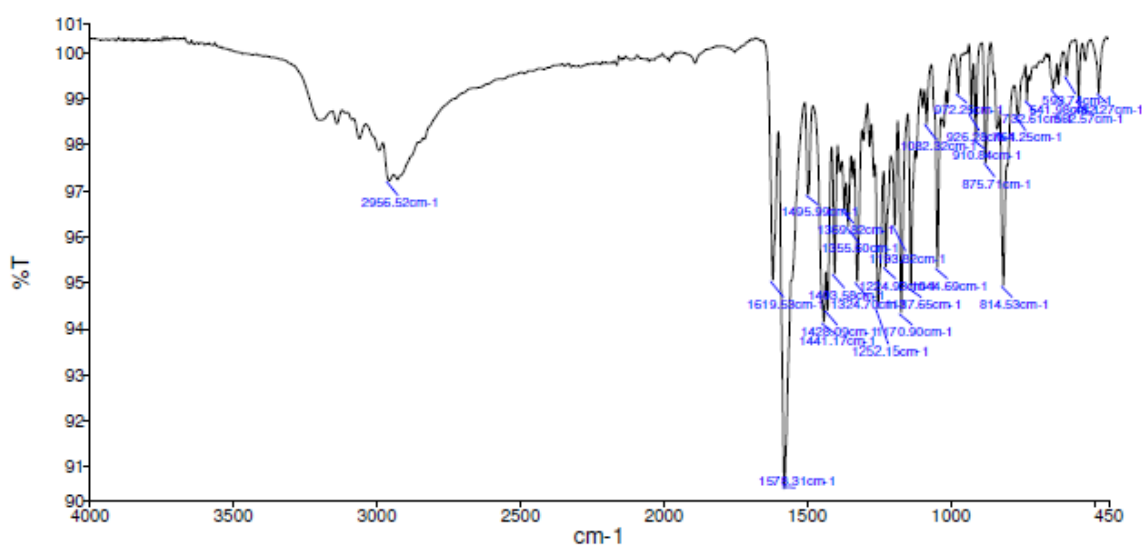
6

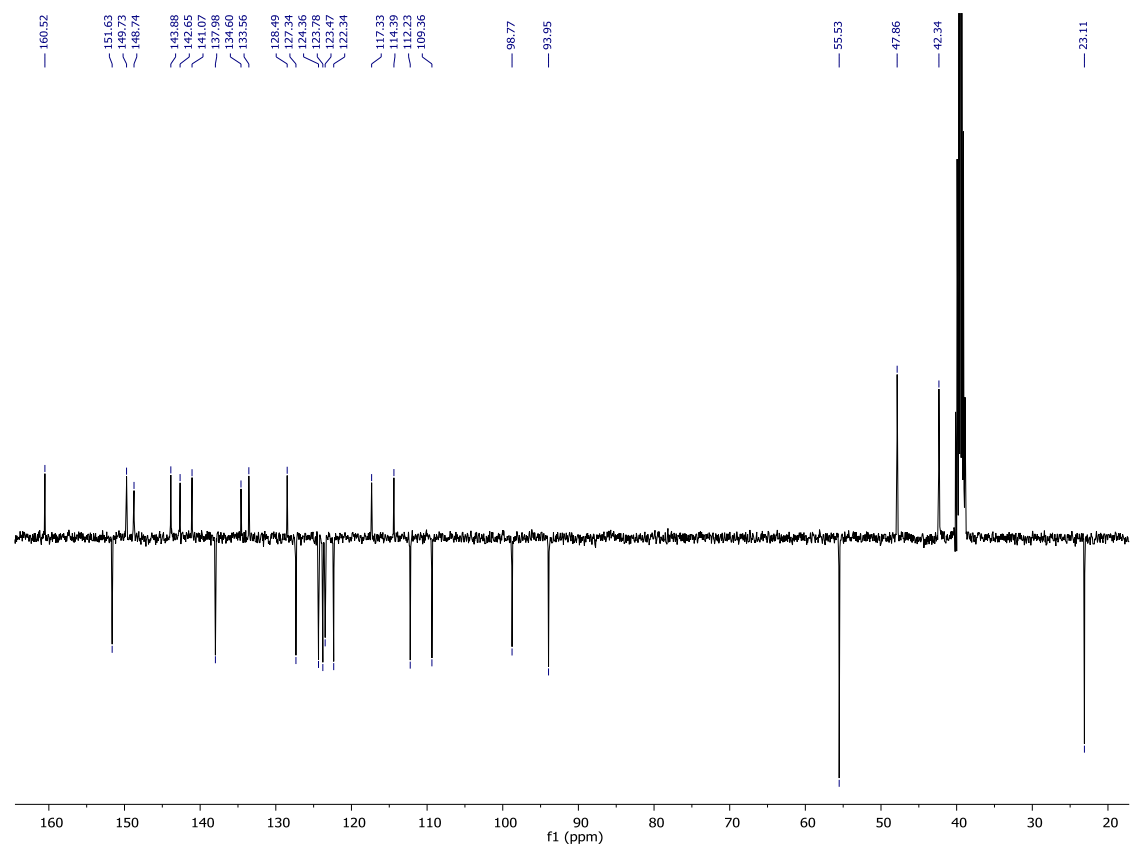
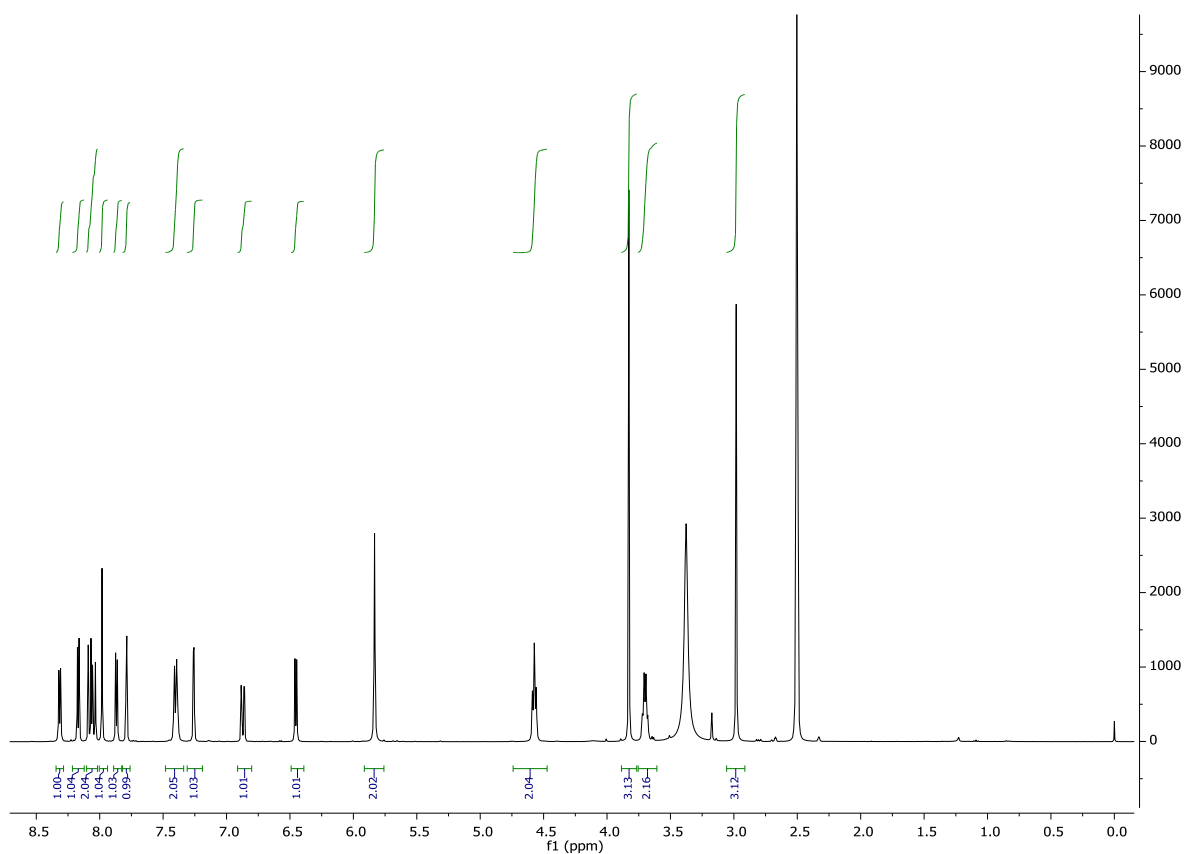


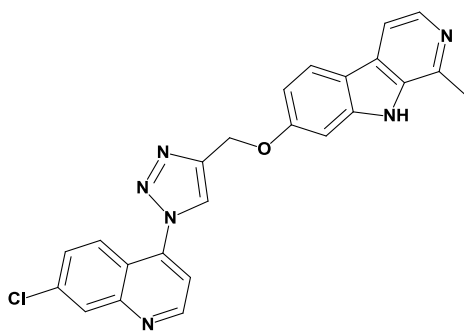




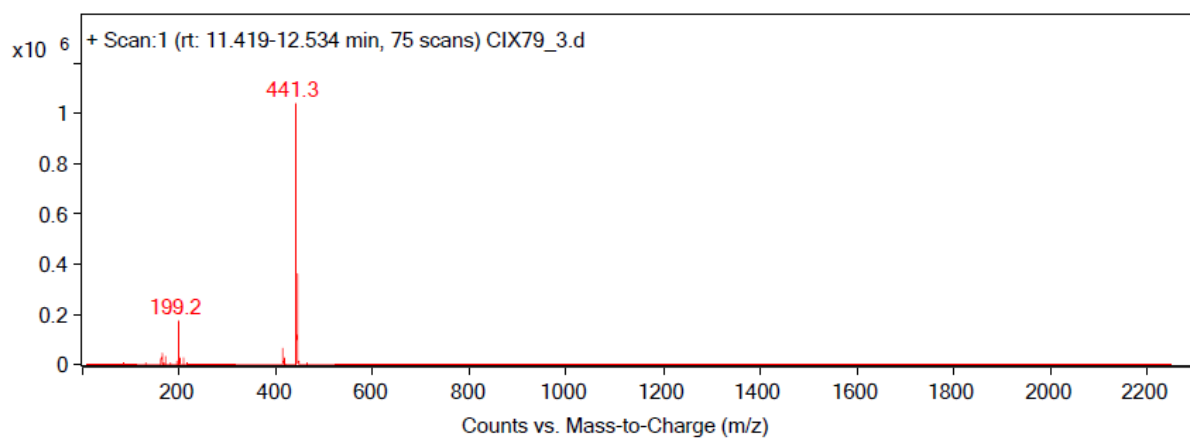
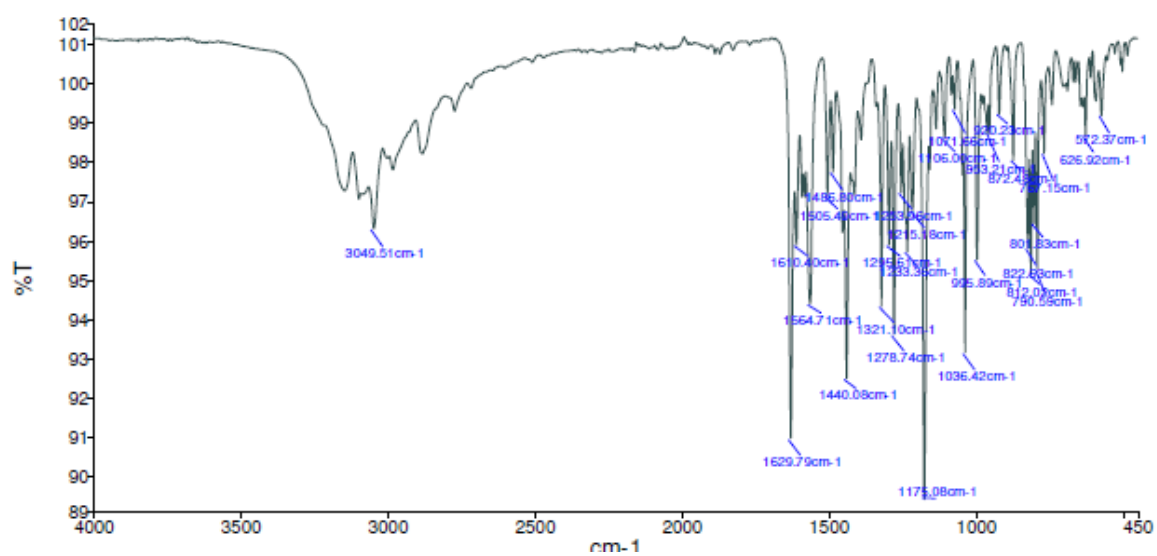
7

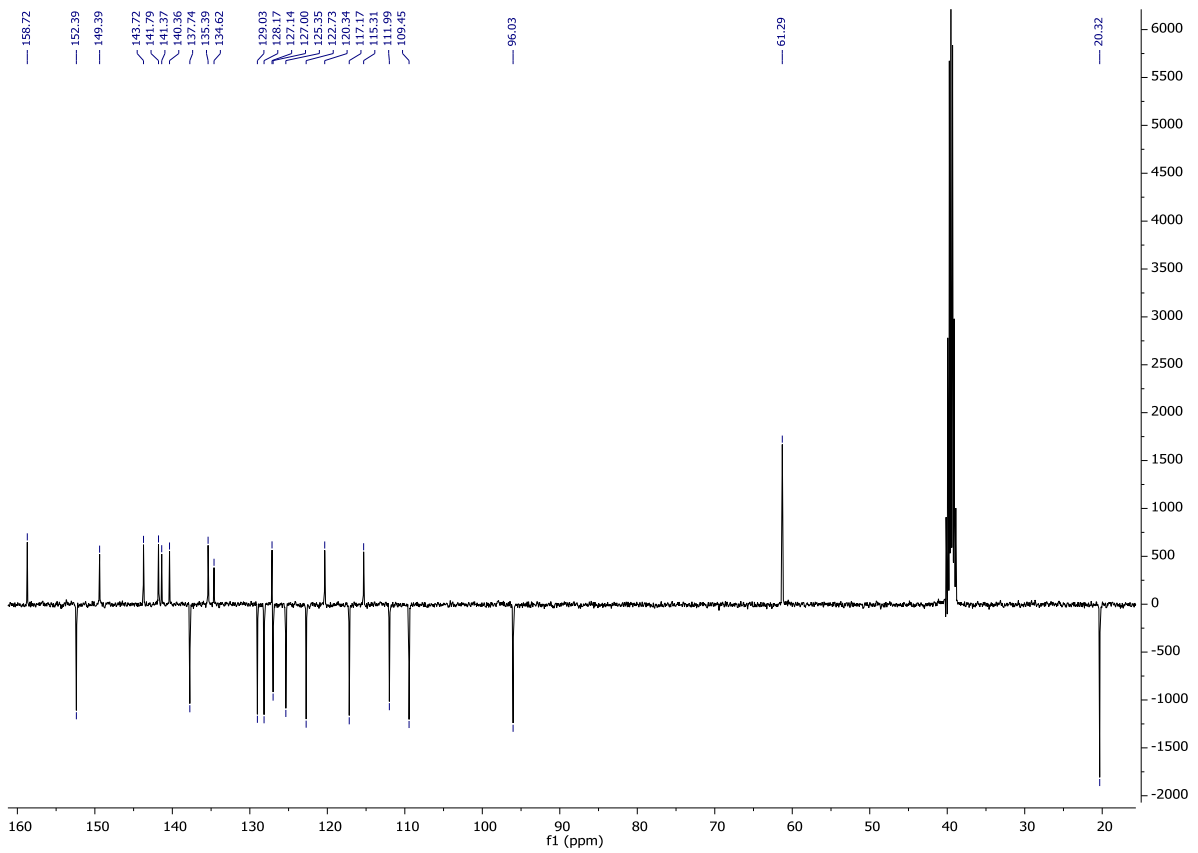
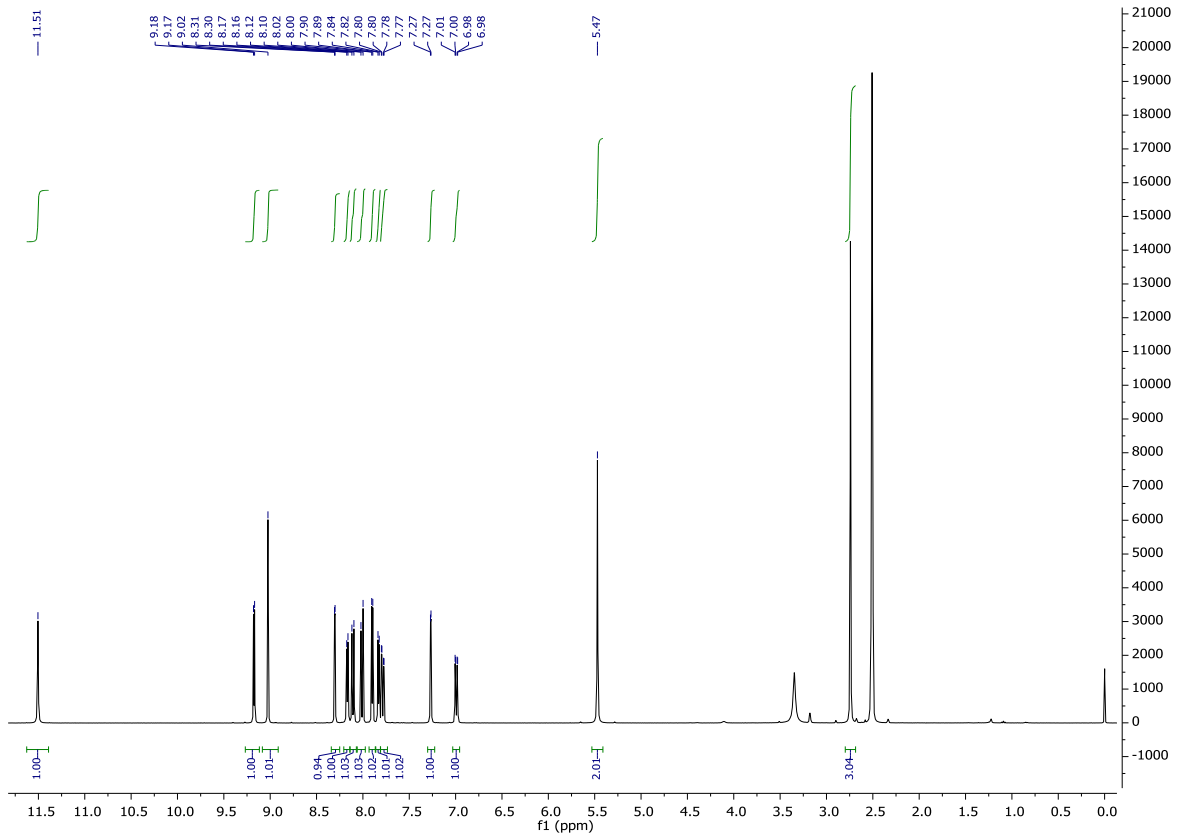




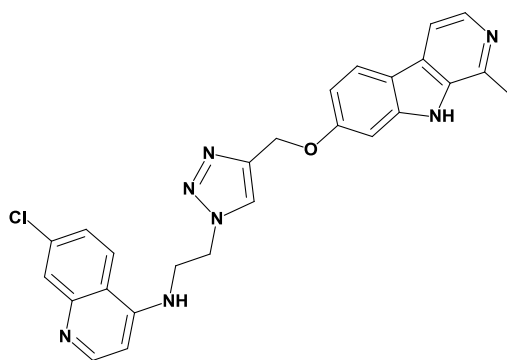


8

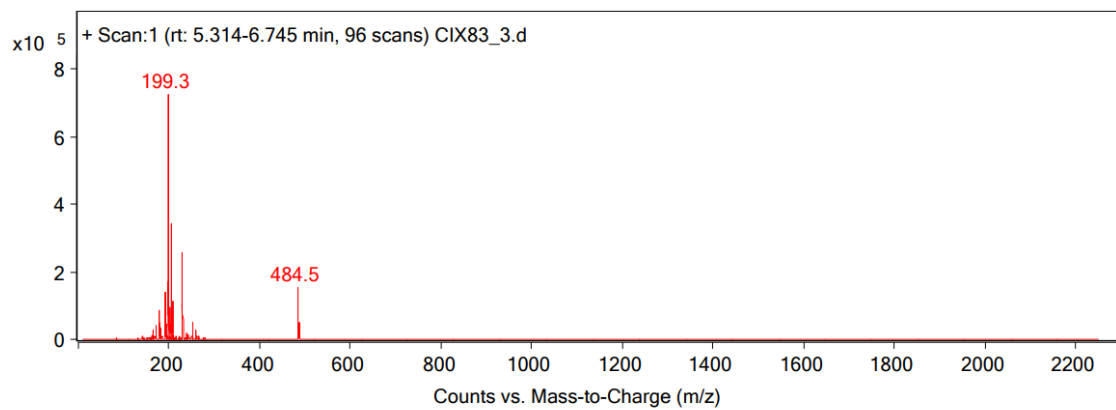
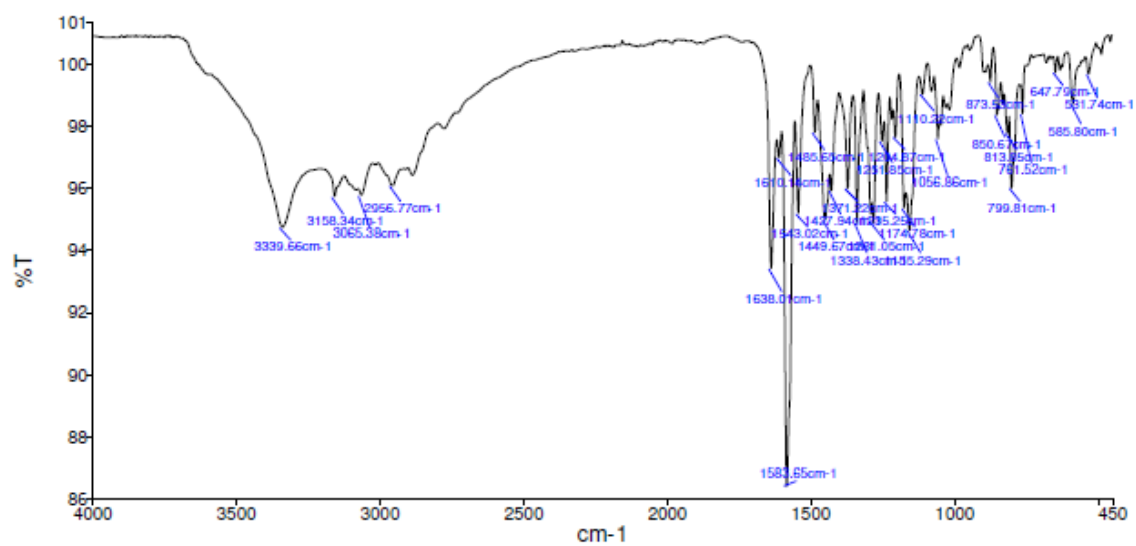


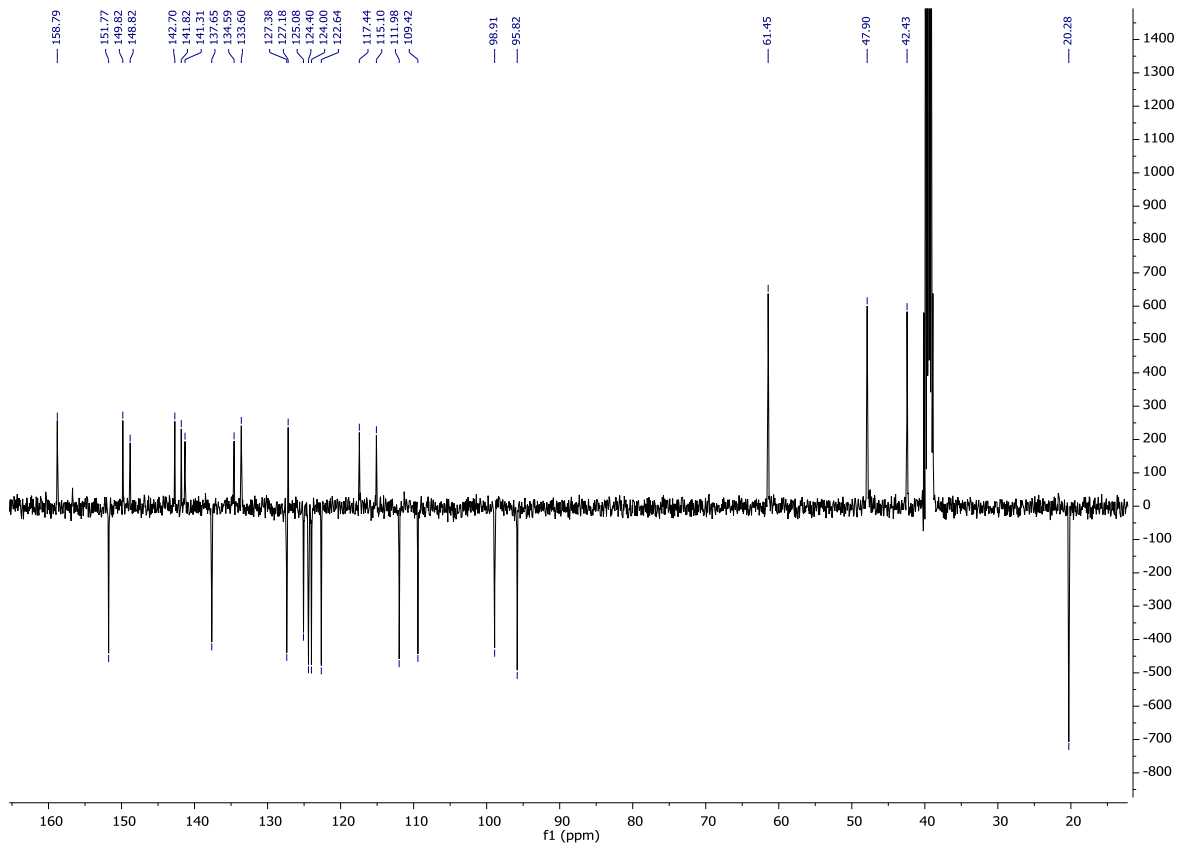
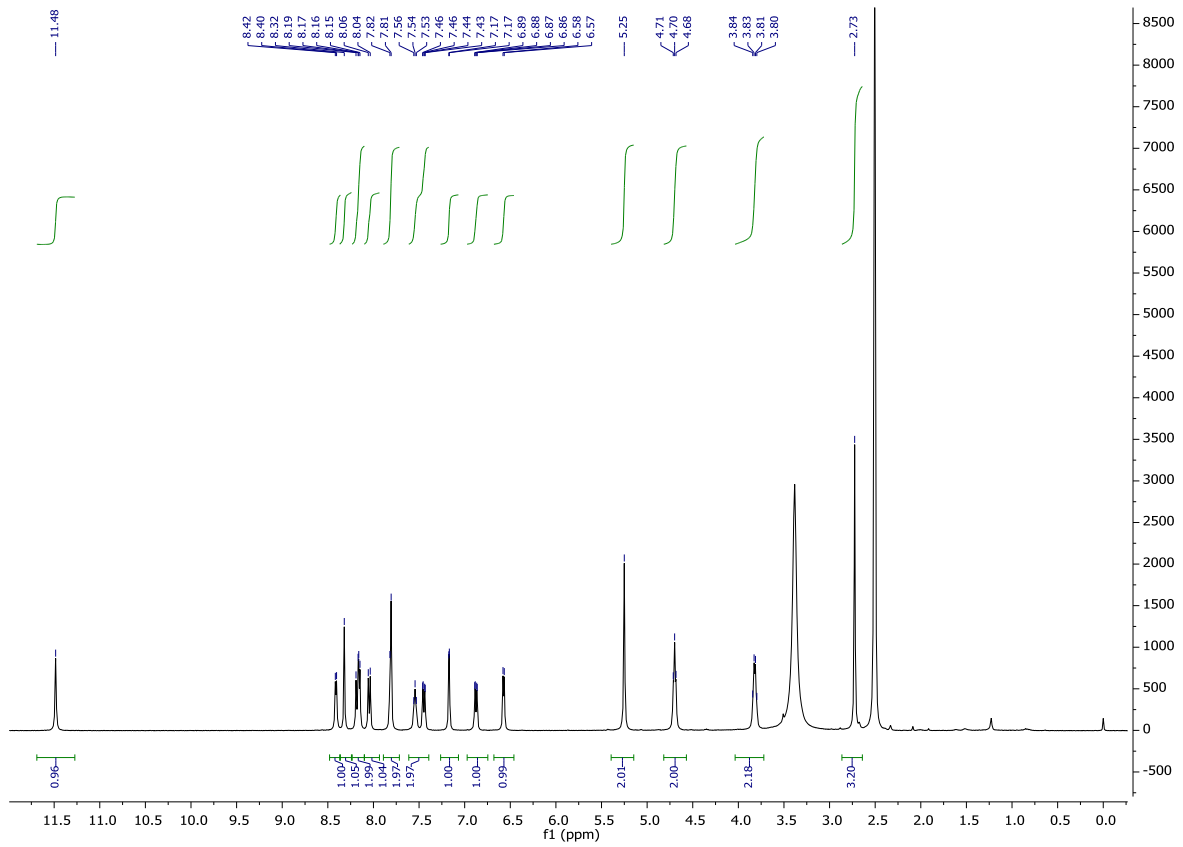






9





## **11. ŽIVOTOPIS**

Marko Dužević rođen je 29. ožujka 1998. godine u Zagrebu. 2016. završio je II. gimnaziju u Zagrebu, s odličnim uspjehom. Iste godine upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te je sada vrlo dobar student četvrte godine. Odmah na početku studija postaje članom Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA) u sklopu koje redovito sudjeluje na aktivnostima i događajima povezanim s farmaceutskom strukom. U akademskoj godini 2018./19. biva odabran za tajnika CPSA-e na mandat u trajanju od jedne godine. Iste godine postaje demonstratorom na Zavodu za organsku kemiju te organizatorom nacionalnog Kongresa Udruge na funkciji edukacijskog koordinатора koji sudjeluje u odabiru teme i pronalasku predavača. Na četvrtoj godini odlučuje se kandidirati za člana Studenskog zbora Sveučilišta u Zagrebu s ciljem zastupanja studentske populacije, borbe za njihova prava i podizanja studentskog standarda. Na tu funkciju biva odabran za mandat u trajanju od 2 godine. Iste godine priključuje se izradi ovoga rada zbog zainteresiranosti za razvoj i sintezu novih lijekova. Glavni motivi za priključivanje istraživačkoj grupi prof. Rajić bili su mu želja za stjecanjem novih znanja i vještina u području sintetske farmaceutske kemije te započinjanje znanstvene karijere.