

# Sinteza i karakterizacija O-harmicina triazolskog tipa u položaju 7 $\beta$ -karbolinskog prstena

---

Kučević, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:279351>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-26**



Repository / Repozitorij:

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



**Anja Kučević**

**Sinteza i karakterizacija *O*-harmicina triazolskog  
tipa u položaju 7  $\beta$ -karbolinskog prstena**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju *Farmaceutska kemija I* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Zrinke Rajić.

*Veliko hvala mentorici izv.prof.dr.sc. Zrinki Rajić na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na ugodnom društvu i pomoći u laboratoriju, posebice dr.sc. Kristini Pavić, na uvodu u laboratorijski rad te stečenom znanju.*

*Od srca hvala svim prijateljima na nezaboravnim uspominama prilikom našeg studiranja te na nesebičnoj podršci.*

*Najveća zahvala ide mojoj obitelji na razumijevanju, strpljenju, najvećoj podršci i bezuvjetnoj ljubavi.*

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



## KRATICE

A549	humana stanična linija adenokarcinoma alveolarnih bazalnih epitelnih stanica
AchE	acetilkolinesteraza
ADMP	2-azido-1,3-dimetilimidazolinheksafluorofosfat
APP	amiloidni prekursorski protein
ATP	adenozin trifosfat
BCRP	protein rezistencije karcinoma dojke (engl. <i>breast cancer resistance protein</i> )
B16F-10	stanična linija mišjeg melanoma
CAD	derivati cimetine kiseline (engl. <i>cinnamic acid derivatives</i> )
CDK	kinaze ovisne o ciklinima (engl. <i>cyclin-dependent kinases</i> )
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undeka-7-en
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DYRK1A	dvojno specifična serin/treonin i tirozin kinaza 1A
HBL-100	humana stanična linija karcinoma dojke
HCT-116	humana stanična linija karcinoma kolona
HDAC	histonska deacetilaza
HeLa	humana stanična linija karcinoma grlića maternice
HepG2	humana stanična linija hepatocelularnog karcinoma
HIV	virus humane imunodeficijencije
Hsp90	protein toplinskog šoka 90 (engl. <i>heat shock protein 90</i> )

HT-29	humana stanična linija karcinoma kolona
IR	infracrveno zračenje
5-LOX	5-lipooksigenaza
MAO	monoaminooksidaza
MDA-MB-231	humana stanična linija trostruko negativnog karcinoma dojke
MCF-7	humana stanična linija adenokarcinoma dojke
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
<i>PfHsp90</i>	protein toplinskog šoka 90 vrste <i>Plasmodium falciparum</i>
SAR	odnos strukture i djelovanja (engl. <i>structure-activity relationship</i> )
SW480	humana stanična linija karcinoma kolona
THF	tetrahidrofur
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
UV	ultraljubičasto zračenje
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija ( <i>World Health Organisation</i> )
XOD	ksantin oksidaza

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Harmin kao polazni spoj za sintezu hibridnih spojeva</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Harmin kao prirodni produkt $\beta$ -karbolinskog tipa .....	2
1.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva harmina.....	2
1.1.3. Farmakološka djelovanja harmina .....	3
1.1.4. Farmakokinetika svojstva harmina.....	5
1.1.5. SAR derivata harmina.....	5
1.1.6. Derivati harmina i njihovo djelovanje.....	6
<b>1.2. Cimetna kiselina i njeno biološko djelovanje</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3. „Click“ kemija</b> .....	<b>11</b>
1.3.1. Cu (I) katalizirana 1,3-dipolarna alkin-azid cikloadicija .....	11
1.3.2. Mehanizam Cu(I) katalizirane alkin-azid cikloadicije .....	12
<b>1.4. Značaj 1,2,3-triazola u farmaceutskoj kemiji</b> .....	<b>13</b>
1.4.1. Farmakološki učinci 1,2,3-triazola.....	14
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>18</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1. Sinteza etilnih estera CAD (1a-d)</b> .....	<b>23</b>
3.1.1. Sinteza etil (2 <i>E</i> )-3-(3-fluorofenil)prop-2-enoata ( <b>1a</b> ) .....	23
3.1.2. Sinteza etil (2 <i>E</i> )-3-(4-klorofenil)prop-2-enoata ( <b>1b</b> ) .....	23
3.1.3. Sinteza etil (2 <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)prop-2-enoata ( <b>1c</b> ) .....	23
3.1.4. Sinteza etil (2 <i>E</i> )-3-(3,4-metilendioksifenil)prop-2-enoata ( <b>1d</b> ).....	23
<b>3.2. Sinteza (2<i>E</i>)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-enoil klorida (1e)</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3. Sinteza alkohola CAD (2a-e)</b> .....	<b>24</b>
3.3.1. Sinteza (2 <i>E</i> )-3-(3-fluorofenil)prop-2-en-1-ola ( <b>2a</b> ) .....	24
3.3.2. Sinteza (2 <i>E</i> )-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-ola ( <b>2b</b> ) .....	24
3.3.3. Sinteza (2 <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-ola ( <b>2c</b> ).....	25
3.3.4. Sinteza (2 <i>E</i> )-3-(3,4-metilendioksofenil)prop-2-en-1-ola ( <b>2d</b> ) .....	25
3.3.5. Sinteza (2 <i>E</i> )-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-ola ( <b>2e</b> ) .....	25
<b>3.4. Sinteza azida CAD (3a-e)</b> .....	<b>26</b>
3.4.1. Sinteza 1-[(1 <i>E</i> )-3-azidoprop-1-en-1-il]-3-fluorobenzena ( <b>3a</b> ).....	26
3.4.2. Sinteza 1-[(1 <i>E</i> )-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-klorobenzena ( <b>3b</b> ).....	26
3.4.3. Sinteza 1-[(1 <i>E</i> )-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-metoksibenzena ( <b>3c</b> ) .....	27
3.4.4. Sinteza 1-[(1 <i>E</i> )-3-azidoprop-1-en-1-il]-3,4-metilendioksobenzena ( <b>3d</b> ).....	27
3.4.5. Sinteza 1-[(1 <i>E</i> )-3-azidoprop-1-en-1-il]-3,4-difluorobenzena ( <b>3e</b> ).....	28

<b>3.5. Sinteza harmola (4)</b> .....	28
<b>3.6. Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-<i>b</i>]indola (5)</b> .....	29
<b>3.7. Sinteza <i>O</i>-harmicina 6a-e</b> .....	29
3.7.1. Sinteza 1-[(2 <i>E</i> )-3-(3-fluorofenil)prop-2-en-1-il]-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-triazola ( <b>6a</b> ) .....	29
3.7.2. Sinteza 1-[(2 <i>E</i> )-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-il]-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-triazola ( <b>6b</b> ) .....	30
3.7.3. Sinteza 1-[(2 <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-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-triazola ( <b>6c</b> ) .....	31
3.7.4. Sinteza 1-[(2 <i>E</i> )-3-(2 <i>H</i> -1,3-benzodioskso[5,4- <i>d</i> ]pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-7-il)oksi]metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazola ( <b>6d</b> ) .....	32
3.7.5. Sinteza 1-[(2 <i>E</i> )-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-il]-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-triazola ( <b>6e</b> ) .....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>34</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>41</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>43</b>
<b>7. SAŽETAK/ SUMMARY</b> .....	<b>49</b>
<b>8. PRILOZI</b> .....	<b>52</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	



## **1. UVOD**

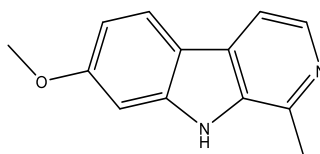
## 1.1. Harmin kao polazni spoj za sintezu hibridnih spojeva

### 1.1.1. Harmin kao prirodni produkt $\beta$ -karbolinskog tipa

Alkaloidi  $\beta$ -karbolinskog tipa čine veliku skupinu spojeva prirodnog i sintetskog podrijetla, a posjeduju prepoznatljiv pirido[3,4-*b*]indolni prsten u strukturi (Cao i sur., 2007.). Harmin ili banisterin, kemijskog naziva 7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol, jedan je od brojnih  $\beta$ -karbolinskih alkaloida, prvotno izoliranih iz sjemenki i korijena biljne vrste *Peganum harmala*, *Nitrariaceae* (sirijska rutvica). Alkaloidi izolirani iz sirijske rutvice nose skupni naziv "harmala" alkaloidi, a osim harmina, biljna vrsta je bogata i harmalinom, harmolom te harmololom (Javeed i sur., 2018.). Sirijska rutvica je višegodišnja zeljasta biljka koja raste u sušnim i stepskim područjima, na pjeskovitom tlu, a porijeklom je iz regija istočnog Mediterana i sjeverne Afrike. Biljna vrsta se koristi kao tradicionalni biljni lijek još od antičkih vremena u Indiji i Kini. Sjemenke sirijske rutvice posjeduju antipiretsko i halucinogeno djelovanje te se koriste kao abortiv, sedativ, emenagog i emetik, a upotrebljavaju se za liječenje sifilisa, vrućice, malarije, neuralgije i parkinsonizma. Također, ekstrakti sjemenki pokazuju i baktericidno, fungicidno te antivirusno djelovanje. Biljna vrsta bogata harminom je i *Banisteriopsis caapi*, *Malphiaceae* (dušna loza), sastojak napitka s halucinogenim djelovanjem, Ayahuasce, koji Amazonka plemena koriste pri tradicionalnim obredima (Moloudizargari i sur., 2013.).

### 1.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva harmina

Harmin je po strukturi triciklički pirido [3,4-*b*] indol (Slika 1). Kristalinična je krutina bijele boje, izrazito slabo topljiva u vodi, a dobro topljiva u različitim organskim otapalima. Postoji i u obliku hidrokloridne soli (<https://go.drugbank.com/>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Harmin fluorescira pod ultraljubičastim svjetlom te je koristan fluorescentni pH indikator, zbog smanjenja fluorescentne emisije s povećanjem pH vrijednosti okolnog medija (<https://www.chemeurope.com/>). Neka od osnovnih fizikalno-kemijskih svojstava harmina navedena su u Tablici 1.



**Slika 1.** Kemijska struktura harmina

**Tablica 1.** Fizikalno- kemijska svojstva harmina

Kemijska formula	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
Relativna molekulska masa	212,25 g/mol
Gustoća	1,3 g/cm <sup>3</sup>
Talište	264-265 °C
log <i>P</i>	3,56

### 1.1.3. Farmakološka djelovanja harmina

Harmin ispoljava brojne biološke učinke, poput antimikrobnog, antimalarijskog, antifungalnog, antioksidativnog, antitumorskog te halucinogenog učinka. Istraživanjem farmakoloških učinaka harmina identificirane su brojne potencijalne mete njegova djelovanja.

Harmin pokazuje antimalarijsko djelovanje, što je vezano uz daljnju problematiku ovog rada. Međudjelovanjem s određenim dijelovima strukture molekularnog šaperona (engl. *chaperones*), harmin inhibira protein toplinskog šoka 90 (engl. *heat shock protein*, Hsp90) vrste *Plasmodium falciparum* (*Pf*Hsp90). Svaki organizam egzistira u stanju homeostaze, a za njeno održavanje prilikom naglih promjena uvjeta okoliša djelovanjem različitih stresnih čimbenika, potreban je evolucijski konzerviran mehanizam molekularnih šaperona. Šaperoni su po strukturi proteini koji stupaju u interakcije s drugim proteinima (tzv. proteinima klijentima) kako bi osigurali da novosintetizirani proteini poprime svoju terciarnu strukturu koja im omogućava funkciju. Hsp90 je molekularni šaperon smješten u staničnom citosolu te mu je ekspresija povećana za vrijeme odgovora organizma na nagli porast temperature okoline, stoga i nosi naziv protein toplinskog šoka (Schopf i sur., 2017.). *Plasmodium falciparum* je vrsta roda *Plasmodium* koja uzrokuje najopasniji oblik malarije zbog mnogobrojnih komplikacija bolesti i visoke stope smrtnosti. *Pf*Hsp90 nužan je za razvoj plazmodija za vrijeme nespolne eritrocitne faze životnog ciklusa parazita. Harmin pokazuje visoki afinitet za N-terminalnu

domenu *PfHsp90*, gdje dolazi do vezanja ATP-a, te tako interferira u životnom ciklusu parazita ometajući njegov razvoj i održavanje homeostaze. Također, neke studije pokazuju da harmin sinergistički djeluje s postojećim antimalaricima, poput klorokina i artemisinina, na koje je parazit već razvio rezistenciju, te tako pojačava njihov učinak uz minimalnu toksičnost. Ta činjenica ukazuje na to da bi kombinacijom harmina i učinkovitih antimalarika u politerapiji došlo do smanjenja rezistencije parazita te bi se posljedično povećala uspješnost liječenja (Shahinas i sur., 2012.).

Potencijalne mete farmakološkog djelovanja harmina su i protein kinaze, poput kinaza ovisnih o ciklinima (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDK). Kinaze ovisne o ciklinima sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa kontrolirajući prijelaz iz jedne faze ciklusa u slijedeću. Harmin selektivno inhibira Cdk1, Cdk2 i Cdk5, kompeticijom s ATP-om te na taj način inhibira proliferaciju tumorskih staničnih linija HeLa (karcinoma grlića maternice), MCF-7 (karcinoma dojke) te SW480 (karcinoma kolona) (Song i sur., 2004.). Usko povezana s CDK je i DYRK porodica kinaza, a harmin pokazuje visoku specifičnost za kinazu DYRK1A. Harmin inhibira dvojnju serin/treonin i tirozin kinazu DYRK1A koja fosforilira amiloidni prekursorski protein (APP) uključen u neurodegenerativne promjene nakupljanja  $\beta$ -amiloidnih plakova u Alzheimerovoj bolesti, pa može poslužiti kao spoj uzor za razvoj novih lijekova koji bi usporili napredovanje te bolesti (Frost i sur., 2011.; Pathak i sur., 2018.).

Harmin stimulira središnji živčani sustav inhibicijom enzima monoaminooksidaze A (MAO A), koja katalizira proces oksidativne deaminacije u metabolizmu monoaminskih neurotransmitera, pa je to mogući mehanizam djelovanja za potencijalne antidepresive ili antipsihotike sintetizirane iz harmina kao početnog spoja (Herraiz i Guillén, 2018.).

U *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima uočeno je citotoksično, genotoksično i mutageno djelovanje harmina u različitim organizmima, uključujući njegovu sposobnost induciranja jednolančanih i dvolančanih lomova DNA u kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Boeira i sur., 2002.), interkalacije u strukturu DNA i inhibicije enzima topoizomeraze I (Cao i sur., 2005.), aktivacije programirane stanične smrti (apoptoze) te regulacije transkripcijskih faktora i lučenja proupalnih citokina u kulturi B16F-10 stanica, kao i njegovo potencijalno antiangiogeno djelovanje u kulturi B16F-10 melanoma stanica u C57BL/6 miševa (Hamsa i Kuttan, 2011.). Harmin inhibira BCRP (engl. *breast cancer resistance protein*) koji staničnu liniju MDA-MB-231 tumora dojke čini rezistentnom na postojeću citostatsku terapiju mitoksantronom i

kamptotecinom (Ma i Wink, 2010.). Navedeni učinci harmina potaknuli su sintezu novih analoga s potencijalnim protutumorskim djelovanjem.

#### **1.1.4. Farmakokinetička svojstva harmina**

Nakon administracije intravenskog bolusa u štakora vrste Sprague-Dawley, harmin se zbog svoje lipofilnosti brzo raspodjeljuje po perifernim tkivima uz veliki klirens iz sistemske cirkulacije. Iako se harmin brzo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta i dostiže u sistemske cirkulaciju, njegova je bioraspoloživost nakon oralne administracije niska, što je moguća posljedica ekstenzivnog metabolizma prvim prolaskom kroz jetru (Guan i sur., 2001.). Harmin prelazi krvno-moždanu barijeru uz posljedični učinak na središnji živčani sustav (<https://go.drugbank.com/drugs/>). Spomenute farmakokinetičke značajke harmina mogu poslužiti kao uzor za srodna istraživanja novosintetiziranih analoga harmina sa potencijalnim farmakološkim djelovanjem u ljudskom organizmu.

#### **1.1.5. SAR derivata harmina**

Harmin je najaktivniji  $\beta$ -karbolinski alkaloid izoliran iz biljne vrste *Peganum harmala* te su provedene raznolike znanstvene studije u kojima je harmin iskorišten kao spoj uzor, a modifikacijom njegove strukture poboljšana su farmakodinamska i farmakokinetička svojstva novonastalih derivata.

Primjerice, pripremljeni su brojni derivati harmina modificirani u položajima 1, 2, 6, 7 i 9  $\beta$ -karbolinskog prstena, koji pokazuju citostatsko djelovanje. Ispitivanjem odnosa strukture i djelovanja (engl. *structure- activity relationship*, SAR) pripremljenih derivata izvedeni su sljedeći zaključci (Slika 2.):

1) Uvođenjem alkoksi supstituenta na položaju 7  $\beta$ -karbolinskog prstena dolazi do povećanja citotoksičnosti molekule. Povećanje citotoksičnosti molekule ovisi o duljini lanca uvedenog alkoksi supstituenta, a osim toga, omogućava specifičnost derivata na određene stanične linije karcinoma (Ayoob i sur., 2017.).

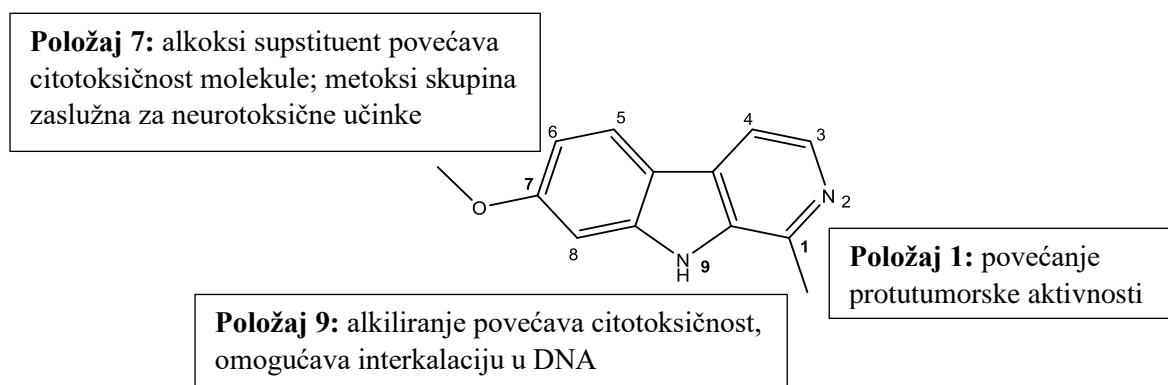
2) Derivati harmina alkilirani na N9 pokazuju značajnu citotoksičnu aktivnost (Ayoob i sur., 2017.).

3) Prikladni supstituenti uvedeni u molekulu na položaju 9 mogu povećati protutumorsko djelovanje harmina kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Tako supstituirani  $\beta$ -karbolinski derivati pokazuju jače protutumorsko djelovanje radi povećane sposobnosti interkalacije u strukturu DNA koja posljedično uzrokuje lomove DNA molekule (Ayoob i sur., 2017.).

4) Metoksi skupina prisutna na položaju 7 u strukturi harmina zaslužna je za njegovo neurotoksično djelovanje. Drastično smanjenje neurotoksičnosti može se postići zamjenom metoksi skupine nekim većim supstituentima (Ayoob i sur., 2017.).

5) Atom ugljika na položaju 1 važan je za protutumorsku aktivnost  $\beta$ -karbolinskih derivata. Prikladan supstituent uveden na ovome mjestu u molekuli može značajno povećati protutumorsko djelovanje (Guo i sur., 2018.).

Neke strukturne modifikacije harmina i posljedice na biološki učinak novonastalih derivata sumirane su na Slici 2.



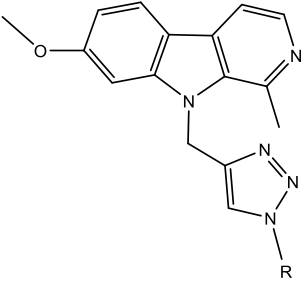
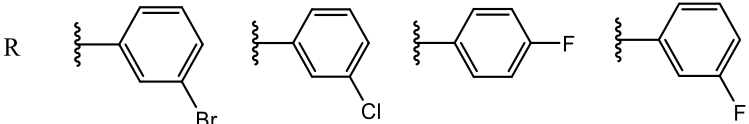
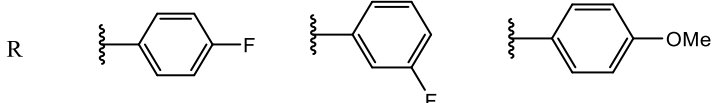
**Slika 2.** Pregled nekih modifikacija harmina koje vode do pojačanja citostatskog djelovanja

### 1.1.6. Derivati harmina i njihovo djelovanje

U radu Ayooba i suradnika pripremljeni su triazolski derivati harmina, korištenjem “click” reakcije, te je ispitano njihovo antiproliferativno djelovanje na nizu humanih tumorskih staničnih linija HBL-100 (karcinom dojke), A549 (karcinom pluća), HT-29 i HCT-116 (karcinom kolona) te HeLa (karcinom grlića maternice). Najučinkovitiji spojevi bili su derivati koji u strukturi posjeduju *m*-brom, *p*-fluor i *m*-fluor supstituent na benzenskom prstenu. Derivat s *m*-fluorfenilnim supstituentom imao je selektivno djelovanje na HBL-100, *p*-metoksifenilni derivat na A549, HT-29 i HCT-116, dok je *p*-fluorfenilni derivat pokazao djelovanje na sve korištene stanične linije. Iz navedenog se može zaključiti da derivati koji posjeduju halogeni

element u strukturi posjeduju jače citotoksično djelovanje. Smatra se da je mehanizam citotoksičnog djelovanja svih novosintetiziranih triazola interkalacija u molekulu DNA, zbog supstitucije  $\beta$ -karbolinskog prstena harmina na položaju 9 (Ayoob i sur., 2017.).

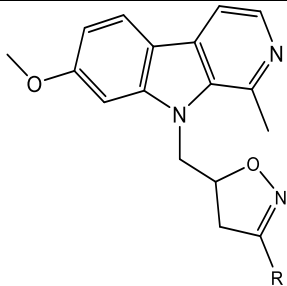
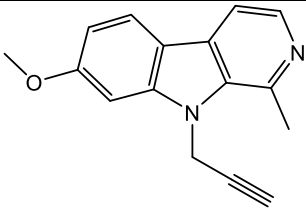
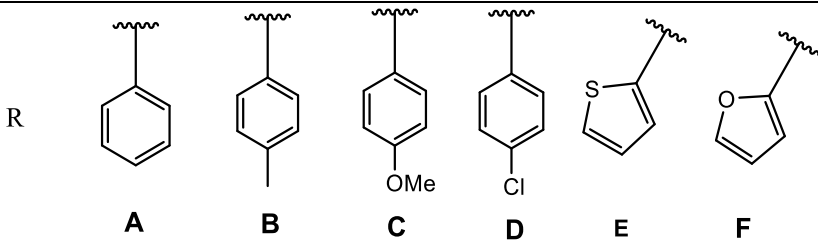
**Tablica 2.** Triazolski derivati harmina

<b>N-TRIAZOLSKI DERIVATI HARMINA: opća formula:</b>	
	
<b>Pojačanje antiproliferativnog učinka uočeno kod derivata:</b>	
R	
<b>Povećanje selektivnosti djelovanja uočeno kod derivata:</b>	
R	

Osim triazolskih derivata, sintetizirani su i izoksazolinski derivati harmina. Filali i suradnici su odabrali harmin kao spoj uzor za sintezu novih izoksazolinskih derivata putem 1,3-dipolarne cikloadicije koristeći različite arilnitrilne okside. Derivatima je zatim ispitano biološko djelovanje na enzime acetilkolinesterazu (AChE), 5-lipooksigenazu (5-LOX) te ksantin oksidazu (XOD). Derivati su prikazani u Tablici 3. Najjače djelovanje na AChE pokazao je međuprodukt u sintezi, nastao propargiliranjem N-9 harmina. Fenilni derivat **A** nešto je slabije inhibirao enzim od harmina, no i dalje je inhibitorski učinak bio značajan, za razliku od derivata sa supstituentima u *p*-položaju (**B** i **D**) koji su pokazivali slabiji učinak. Derivati **C** (*p*-metoksifenil) i **D** (tiofen) nisu pokazali značajno inhibitorsko djelovanje. Derivat **F** umjereno je inhibirao enzim. Protuupalno djelovanje ispitano je inhibicijom 5-lipooksigenaze, enzima uključenog u medijaciju upalnih procesa. Propargilirani međuprodukt sinteze i derivat **C**

pokazali su inhibitorno djelovanje. Pripremljeni spojevi nisu pokazali djelovanje na XOD (Filali i sur., 2016.).

**Tablica 3.** Izoksazolinski derivati harmina

<b>N-IZOKSAZOLINSKI DERIVATI HARMINA: opća formula:</b>	
	
<b>MEĐUPRODUKT U SINTEZI</b>	
	
<b>NOVOSINTETIZIRANI DERIVATI:</b>	
R	

Harmin pokazuje inhibitorno djelovanje i na enzim monoamino oksidazu (MAO). U ljudskom organizmu prisutne su dvije izoforme ovog enzima, MAO-A i MAO-B. Obje izoforme kataliziraju procese oksidativne deaminacije biogenih te ksenobiotskih amina u odgovarajuće aldehide i amonijak. Izoforme MAO se međusobno razlikuju po svojim specifičnim supstratima i inhibitorima, pa tako MAO-A katalizira oksidativnu deaminaciju adrenalina, noradrenalina i serotonina, dok MAO-B oksidativno deaminira dopamin. MAO enzimi su zanimljive potencijalne mete za liječenje brojnih neuroloških poremećaja, jer MAO-A inhibitori pokazuju djelovanje na anksioznost i depresiju, dok selektivni MAO-B inhibitori



pokazuju učinak u Parkinsonovoj bolesti. U istraživanju koje su provodili Haider i suradnici, sintetizirano je ukupno 26 različitih triazolskih derivata harmina na položaju 7, kojima je zatim ispitano inhibitorno djelovanje na obje izoforme enzima MAO. Prije “click” reakcije na položaju 7, harmin je alkiliran na N-9, radi rezultata prijašnjih studija učinaka *N*-alkilacije na enzime MAO i DYRK1A. Kod novosintetiziranih triazolskih derivata uočeno je jače inhibitorno djelovanje naspram MAO-B izoforme enzima nego što je ono u harmina, a djelovanje na MAO-A izoformu je značajno smanjeno. Derivati koji su na položaju N-9 alkilirani 3-fenilpropilnim supstituentom nisu pokazali inhibitorno djelovanje na MAO, dok su oni alkilirani manjim grupama poput *n*-butila, *n*-propila te izobutila zadržali djelovanje. U Tablici 4. prikazani su strukturni obrasci derivata koji su pokazali povećano te smanjeno inhibitorno djelovanje na MAO, a i derivati koji su selektivnije djelovali na pojedinu izoformu (Haider i sur., 2018.).

**Tablica 4.** Triazolski derivati harmina i njihovo djelovanje na enzim MAO

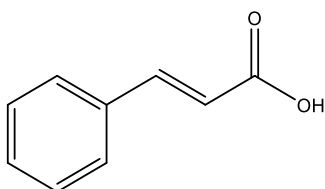
<b>O-TRIAZOLSKI DERIVATI HARMINA: opća formula:</b>	
<b>Jača inhibicija MAO-A</b>	<b>Jača inhibicija MAO-B</b>
<b>Inhibicija MAO</b>	<b>Izostanak inhibicije MAO</b>

## 1.2. Cimetna kiselina i njeno biološko djelovanje

Cimetna kiselina (3-fenilprop-2-enska kiselina) je aromatska nezasićena kiselina zastupljena u biljnim vrstama *Cinnamomum cassia*, *Lauraceae* (kineski cimetovac) i *Panax ginseng*, *Araliaceae* (ginseng), a može se naći i u voću, povrću, cjelovitim žitaricama i medu. Dvostruka veza u strukturi daje cimetnoj kiselini *cis*- ili *trans*-konfiguraciju, od kojih je češće zastupljena *trans*-cimetna kiselina (Slika 3.). Cimetna kiselina sudjeluje kao intermedijer u biosintezi različitih biološki važnih spojeva poput stirena, stilbena, fenilpropanoida i šikimata. Esteri cimetne kiseline (cinamati) široko se koriste u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Sharma, 2011.). Modifikacijom strukture cimetne kiseline moguće je sintetizirati brojne derivate cimetne kiseline (engl. *cinnamic acid derivatives*, CAD) koji imaju potencijal liječenja Alzheimerove bolesti i ostalih neuroloških poremećaja, akutne boli i upale, šećerne bolesti, virusnih infekcija, tuberkuloze i malarije. Biološki učinci derivata usko su vezani uz prirodu i položaj supstituenata uvedenih u strukturu cimetne kiseline.

Za daljnju problematiku ovoga rada bitno je spomenuti antimalarijsko djelovanje CAD. Mehanizam antimalarijskog djelovanja CAD je inhibicija transporta laktata, glukoze, sorbitola i glicina u eritrocite inficirane vrstama roda *Plasmodium*, čime je usporen rast parazita. Osim toga, smanjuju produkciju ATP-a u plazmodiju, pa tako interferiraju s novim transportnim putevima koje plazmodij inducira u eritrocitima, radi učinkovitije translokacije hranjivih tvari poput ugljikohidrata i aminokiselina (Silva i sur., 2019.; Ruwizhi i Aderibigbe, 2020.).

Zbog sve češće rezistencije na terapiju te nedostatak učinkovitih lijekova s dobrim profilom nuspojava u liječenju karcinoma, bakterijskih infekcija, neuroloških poremećaja, malarije i mnogih drugih bolesti, cimetna kiselina postala je ishodišni spoj za istraživanje i razvoj novih potencijalnih lijekova.



**Slika 3.** Kemijska struktura *trans*-cimetne kiseline

### 1.3. „Click“ kemija

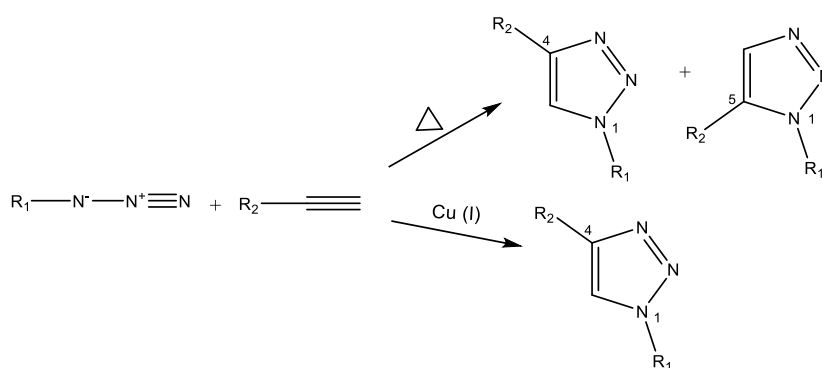
Sinteza knjižnica spojeva tijekom procesa otkrivanja novih lijekova ili optimizacije struktura ranije pripremljenih lijekova omogućuje sintezu brojnih spojeva u relativno kratkom vremenskom periodu. Izuzetno je povoljno korištenje sintetskih puteva koji omogućavaju tvorbu velikog broja novih molekula u kratkom vremenu, a uz to da budu učinkoviti, raznoliki i selektivni. Godine 2001. prvi puta je predstavljena „click“ kemija kao skupni naziv za više reakcijskih puteva kojima se mogu sintetizirati složenije molekule, spajanjem manjih građevnih jedinica. Da bi se reakcija nazvala „click“ reakcijom, mora zadovoljavati slijedeće kriterije: reakcija mora biti izvediva u različitim uvjetima, treba davati velike prinose, generirati samo bezopasne nusprođukte koji se mogu ukloniti nekromatografskim metodama te treba biti stereospecifična, ali ne nužno enantioselektivna. Reakcijski uvjeti trebaju biti jednostavni (u idealnom slučaju reakcije trebaju biti neosjetljive na vodu i kisik), kemikalije trebaju biti lako dostupne, reakcije se trebaju odvijati bez otapala, u otapalu koje je bezopasno (poput vode) ili u otapalu koje se lako uklanja, a izolacija konačnog produkta treba biti jednostavna. Dodatno pročišćavanje produkta, ukoliko je potrebno, treba biti putem nekromatografskih metoda, poput prekrystalizacije ili destilacije, a produkt treba biti stabilan pri fiziološkim uvjetima.

Najčešće korištene „click“ reakcije su one u kojima dolazi do tvorbe novih veza između ugljika i heteroatoma (C-X-C veze), poput cikloadicija (posebice 1,3-dipolarne cikloadicije te Diels-Alderove transformacije), reakcija nukleofilne supstitucije (poput otvaranja prstena epoksida, aziridina, azirdinijevih iona te episulfonijevih iona), formacija urea, tiourea, aromatskih heterocikla, oksima, hidrazona i amida te adicije na višestruke C-C veze poput epoksidacija, dihidroksilacija, aziridinacija, adicija sulfenilnih halida te Michaelovih adicija (Kolb i sur., 2001.; Tron i sur., 2008.; Lauria i sur., 2014.).

#### 1.3.1. Cu (I) katalizirana 1,3-dipolarna alkin-azid cikloadicija

Najučinkovitijom od svih „click“ reakcija smatra se bakrom (I) katalizirana cikloadicija između azida i terminalnog alkina, u kojoj dolazi do tvorbe 1,2,3-triazola. Reakcija se naziva Huisgenovom cikloadicijom jer su Huisgen i suradnici prvi pretpostavili njen mehanizam. Alkini i azidi su pretežito inertni i kinetički stabilni spojevi, što je glavni uzrok njihove izuzetno spore reakcije pri visokim temperaturama. Povoljna regioselektivnost nekatalizirane

Huisgenove cikloadicije uočena je kod reakcija s visoko elektropozitivnim terminalnim alkinima, a u reakcijama s ostalim alkinima uglavnom nastaje smjesa 1,4- i 1,5-regioizomera (Slika 4.). Sharpless, Meldal i suradnici su 2002. godine razjasnili utjecaj Cu (I) soli na tijek Huisgenove cikloadicije. Dodatkom Cu (I) dolazi do znatnog povećanja brzine reakcije (čak  $10^7$  puta), a na sobnoj temperaturi ili uz umjereno zagrijavanje povećava se regioselektivnost, pa pretežito nastaje 1,4-regioizomer. Ova reakcija je primjer skoro idealne „click“ reakcije zbog velikih prinosa, visoke pouzdanosti i specifičnosti (Bock i sur., 2005.; Kolb i sur., 2001.; Lauria i sur., 2014.).

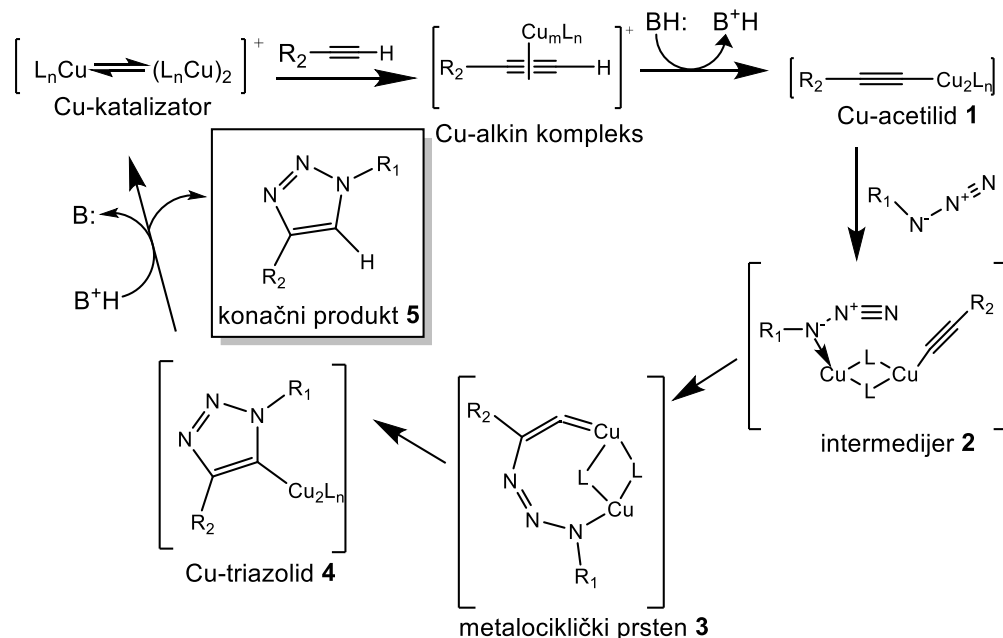


**Shema 1.** Huisgenova alkin-azid cikloadicija

### 1.3.2. Mehanizam Cu (I) katalizirane alkin-azid cikloadicije

Većina cikloadicijskih reakcija odvija se u samo jednom koraku. Jan H. van Maarseveen i suradnici su 2006. godine, kinetičkim studijama i kalkulacijama funkcionalne gustoće, detaljno objasnili da se Cu (I) katalizirana alkin-azid cikloadicija odvija u više koraka, zbog niže aktivacijske energije tog procesa. Reakcija započinje formiranjem kompleksa Cu-alkin iz kojeg nakon deprotonacije nastaje Cu-acetilid **1**. Koordinacija bakra s alkinom povećava kiselost alkinskog protona za 9,7 pH jedinica, što omogućava deprotonaciju i u vodenom mediju, bez prisutstva baze. U sljedećem koraku, dušik iz azida koordinativno veže jedan od liganada vezanih na Cu atom Cu-acetilida te nastaje intermedijer **2**. Tim se procesom zbog blizine atoma te elektrostatskih čimbenika aktivira terminalni dušik azida koji zatim nukleofilno napada unutarnji ugljikov atom alkina formirajući metalociklički prsten **3**, koji potom podliježe kontrakciji prstena, stvarajući Cu-triazolid **4**. Protoniranjem novonastalog triazolskog prstena dolazi do otpuštanja Cu (I) i njegove regeneracije za novi katalitički ciklus te nastaje konačni

produkt reakcije **5**. Mehanizam reakcije prikazan je na Shemi 2 (Bock i sur., 2005.; Hein i Fokin, 2010.; Lauria i sur., 2014.; Ramapanicker i Chauhan, 2016.).



**Shema 2.** Mehanizam Cu (I) katalizirane alkin-azid cikloadicije

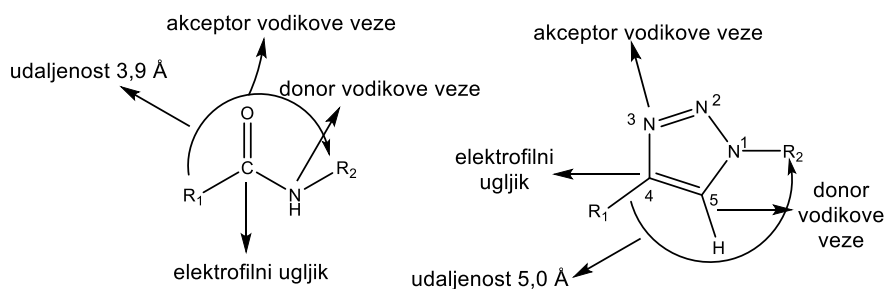
Za učinkovito generiranje potrebnog katalizatora, koriste se Cu(II) soli poput bakrova sulfata pentahidrata ili bakrova acetata uz reducirajući agens, pa se tako Cu(II) reducira u Cu(I) *in situ*. Prednost ove metode je neosjetljivost na kisik, pa se može odvijati i u vodenom mediju. Osim dvovalentnih soli bakra, mogu se koristiti i jednovalentne soli poput CuBr ili CuI, no takva reakcija je osjetljiva na kisik te zahtijeva upotrebu organskog otapala (Lauria i sur., 2014.).

#### 1.4. Značaj 1,2,3-triazola u farmaceutskoj kemiji

Konačan produkt Cu (I) katalizirane alkin-azid cikloadicije je triazolski prsten, koji može služiti kao poveznica između dvije manje podjedinice. Na taj način moguće je sintetizirati mnoštvo hibridnih molekula koje se sastoje od različitih podjedinica. Nastali 1,2,3-triazol je otporan na kiselu i bazičnu hidrolizu te na oksidacijske i redukcijske uvjete zbog aromatske stabilizacije, koja daje otpornost na metaboličku degradaciju. Uz to, jezgra ima visoki dipolni moment od 5 Debya te sudjeluje u tvorbi vodikovih veza te dipolnih interakcija. Vodikove veze

važne su za interakciju s biološkim metama, a isto mogu povećati topljivost molekule. Navedene karakteristike slične su *Z* ili *E* amidnoj vezi ovisno o supstituciji triazola, pa se triazolski prsten smatra bioizosterom amidne veze. Tome u prilog govore sličnosti 1,4-disupstituiranog triazolskog prstena i *Z* konformacije amidne veze. Slobodni elektronski par karbonilnog kisika amidne veze sličan je slobodnom elektronskom paru dušika na položaju 3, polarizirana C-H veza na položaju 5 triazola djeluje kao donor vodikove veze (isto kao i N-H veza amida), a ugljikov atom na položaju 4 triazola po elektrofilnosti je sličan karbonilnom ugljiku. Međutim, postoje i različitosti, poput većeg dipolnog momenta i udaljenosti supstituenata  $R_1$  i  $R_2$  (1,1 Å) te je elektrofilni karbonilni ugljik amidne veze zamijenjen elektronegativnim atomom dušika u triazolskom prstenu (Slika 4) (Agalave i sur., 2011.; Lauria i sur., 2014.; Tron i sur., 2008.).

Triazoli su se pokazali i kao dobri bioizosteri dvostruke veze i heteroaromatskih prstenova. Velika stabilnost 1,2,3-triazola u fiziološkim uvjetima čini ih povoljnim poveznicama različitih ili jednakih farmakofora u heterodimernim i homodimernim molekulama. Također, triazoli mogu biti poveznice u bidentatnim inhibitorima, molekulama koje međudjeluju s dva vezna mjesta na istoj meti, povećavajući afinitet vezanja obje sastavnice (Hou i sur., 2012.; Lauria i sur., 2014.).

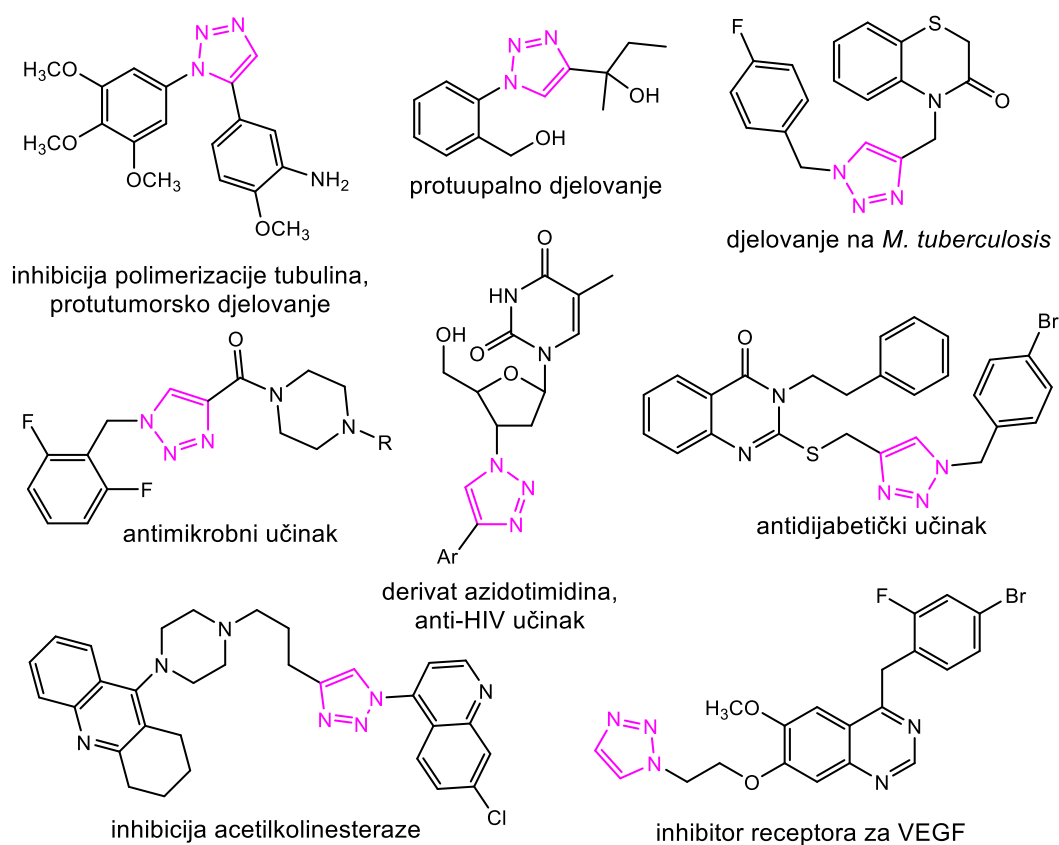


**Slika 4.** Sličnosti amidne veze u *Z*-konfiguraciji i 1,4-disupstituiranog triazolskog prstena

#### 1.4.1. Farmakološki učinci 1,2,3-triazola

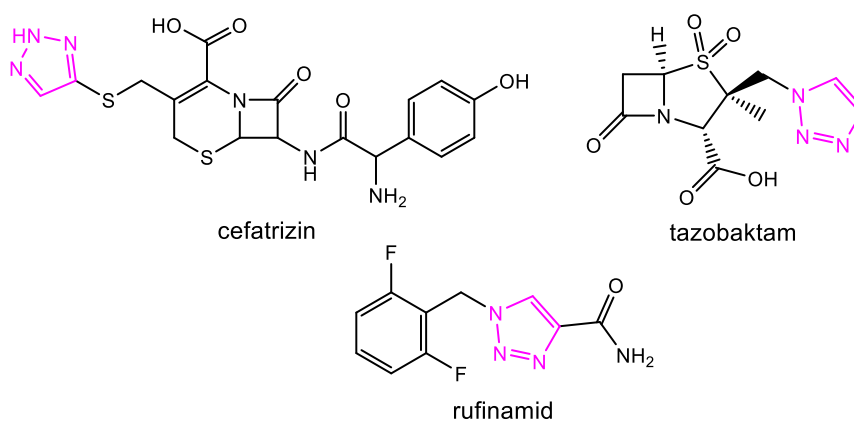
Heterociklički prstenovi pokazali su se kao dobri farmakofori zbog heteroatoma prisutnih u strukturi, koji stupaju u interakcije s biološkim metama te određuju aktivnost i toksičnost molekule. Istraživanja su pokazala da hibridne molekule s 1,2,3-triazolskim prstenom u strukturi pokazuju protutumorske, protuupalne, analgetske, antivirusne, antimikrobne,

antidepresivne, antioksidativne te mnoge druge učinke. Neke od meta na koje ti spojevi djeluju su histonska deacetilaza (HDAC 1/6), acetilkolinesteraza, ciklooksigenaza, lipooksigenaza, HIV-proteaza, topoizomeraza-II i  $\alpha$ -glukozidaza. Slika 5 prikazuje strukture različitih 1,2,3-triazolskih derivata te njihovo potencijalno farmakološko djelovanje (Bozorov i sur., 2019.; Dheer i sur., 2017.). Činjenica da je 1,4-disupstituirani triazolski prsten bioizoster amidne veze korisna je u sintezi novih peptidomimetika. Glavni nedostatak peptida kao lijekova jest njihova loša stabilnost *in vivo* zbog brzog metabolizma endogenim proteazama. Zamjena nestabilnih peptidnih veza sa stabilnijim 1,4-disupstituiranim triazolima sprječava razgradnju peptida, a zadržava njihovu biološku funkciju (Rečnik i sur., 2020.).



**Slika 5.** Derivati 1,2,3-triazola i njihovo potencijalno djelovanje

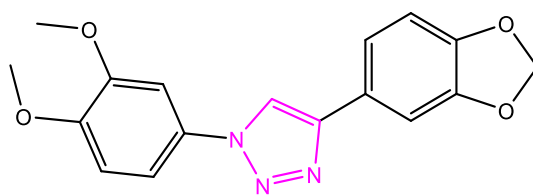
Učinkoviti derivati 1,2,3- triazola koji se već dugo nalaze na tržištu su tazobaktam, cefatrizin i rufinamid (Slika 6.). Tazobaktam je najsnažniji inhibitor  $\beta$ -laktamaze i često se kombinira s  $\beta$ -laktamskim antibiotikom piperacilinom, kako bi proširio spektar djelovanja i pojačao učinak antibiotika. Kombinacija tazobaktama i piperacilina je učinkovita protiv infekcije *Pseudomonas aeruginosa*. Cefatrizin je polusintetski cefalosporin prve generacije s djelovanjem na Gram-pozitivne bakterije. Rufinamid je antiepileptik indiciran u liječenju dječje epileptičke encefalopatije (Lennox-Gastaut sindroma). Neki triazolski derivati nalaze se u završnim fazama kliničkih ispitivanja, poput protutumorskog lijeka karboksiamidotriazola te nenukleozidnog inhibitora reverzne transkriptaze tert-butildimetilsililspiroamino-oksatioldioksida (Agalave i sur., 2011.).



**Slika 6.** Derivati triazola kao učinkoviti lijekovi

Bitno je spomenuti i učinak triazolskih derivata na bolesti koje uzrokuju paraziti, poput malarije, lišmanioze i Chagasove bolesti. Visceralna lišmanioza je smrtonosna infektivna bolest uzrokovana protozoama roda *Leishmania*, a za liječenje se koristi amfotericin B, no ograničenja terapije su toksičnost i visoka cijena. Chagasova bolest je uzrokovana parazitom *Trypanosoma cruzi*, a problem terapije benznidazolom i nifurtimoksom je da lijekovi djeluju samo u akutnoj fazi infekcije. Navedeni problemi postojeće terapije naveli su znanstvenike na sintezu triazolskih derivata prirodnih produkata, poput neolignana, koji pokazuju djelovanje na uzročnike (Slika 7.) (Dheer i sur., 2017.).





**Slika 7.** Triazolski derivat neolignana s potencijalnim djelovanjem na lišmaniozu i Chagasovu bolest

Zbog mnogobrojnih farmakoloških djelovanja 1,2,3-triazolskih derivata, njihove jednostavne i brze sinteze Cu(I) kataliziranom alkin-azid cikloadicijom te visoke stabilnosti i otpornosti na različite fiziološke uvjete, kontinuirano raste broj novosintetiziranih triazolskih molekula s velikim potencijalom liječenja raznih bolesti i poremećaja.

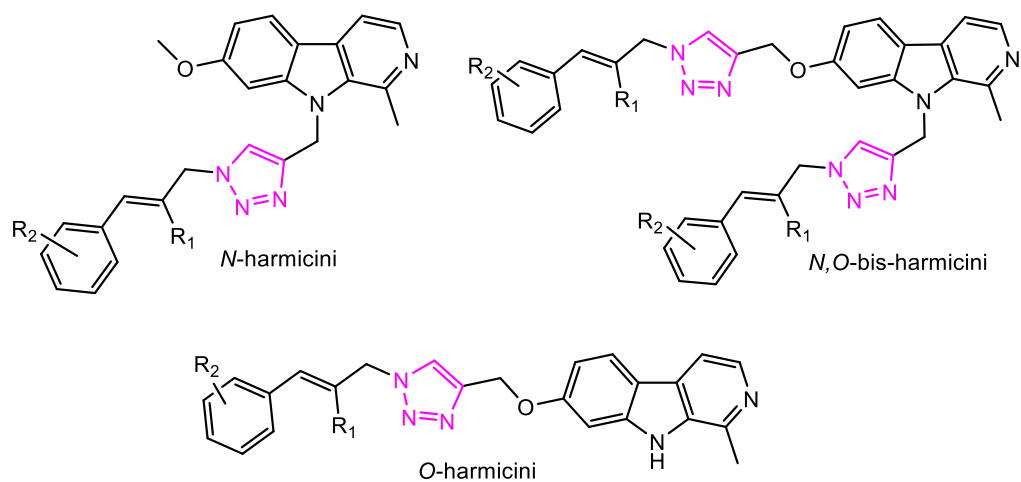
## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Malarija je jedna od najvažnijih i najsmrtonosnijih bolesti koje uzrokuju paraziti roda *Plasmodium*, a najopasniji oblik bolesti uzrokuju vrste *P. falciparum* i *P. vivax*. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije iz 2019. godine, gotovo pola svjetske populacije živi u rizičnim područjima, a najviše slučajeva potječe iz Subsaharske Afrike. Najrizičnija grupa su djeca do 5 godina starosti na koje otpada otprilike dvije trećine smrtnih slučajeva. Rastuća rezistencija parazita na postojeću terapiju antimalaricima, poput klorokina, primakina i artemisininina, te nedostatak učinkovitog cjepiva iziskuje sintezu novih molekula koje pokazuju antimalarijsko djelovanje. Radi pojave rezistentnih sojeva vrste *P. falciparum* na artemisinin, fokus istraživanja postaje sinteza analoga postojećih antimalarika, kao i molekula s potpuno novim mehanizmom djelovanja.

Karcinom, rak i tumor označavaju veliku skupinu bolesti koje mogu zahvatiti bilo koji dio organizma, a karakterizirane su vrlo brzim rastom i širenjem tumorskih stanica. Benigni tumori lokalizirani su u određenom tkivu, dok se zloćudni tumori šire po ostalim dijelovima tijela, stvarajući sekundarne tumore opasne po život. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, u 2020. godini je zabilježeno najviše novih slučajeva karcinoma dojke, pluća te kolona i rektuma, koji su i vodeći uzroci smrtnosti. Iako postoje učinkoviti citostatici, najveći problem u liječenju karcinoma tradicionalnim citostaticima predstavlja neselektivnost lijekova te posljedični neželjeni učinci, stoga se karcinom i dalje smatra „neizlječivom“ bolešću. Brojni antimalarici, poput primakina, klorokina i artemisininina pokazuju citostatsko djelovanje, dok neki citostatici, poput metotreksata, trimetreksata i vorinostata pokazuju antimalarijsko djelovanje. Jedna od strategija u razvoju novih lijekova je upotreba postojećih lijekova u novim indikacijama, pa tako antimalarici mogu služiti kao spojevi uzori za razvoj novih citostatika i obrnuto.

Istraživačka skupina Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu dizajnirala je i sintetizirala harmicine, hibridne molekule  $\beta$ -karbolinskog alkaloida harmina i derivata cimetine kiseline povezanih 1,2,3-triazolskim prstenom. Reakcijom Cu (I) katalizirane alkin-azid cikloadicije sintetizirane su tri vrste harmicina, *N*-harmicini, *O*-harmicini i *N,O*-bis-harmicini (Slika 8.). Većina novosintetiziranih molekula pokazala je djelovanje na eritrocitnu fazu životnog ciklusa vrste *P. falciparum*, jaču od ishodišnog spoja harmina. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja novosintetiziranih spojeva na staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma (HepG2) pokazalo je da su *O*-harmicini najaktivniji spojevi.

Cilj ovog rada je sinteza 4 *O*-harmicina, kako bi se daljnjim ispitivanjima na nizu tumorskih staničnih linija detaljno ispitalo njihovo citostatsko djelovanje radi optimizacije i razvoja novih učinkovitijih hibridnih molekula.



**Slika 8.** Ranije sintetizirani harmicini u Zavodu za farmaceutsku kemiju

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

Tališta ( $t_r$ ) sintetiziranih spojeva određena su na Stuart Melting Point instrumentu (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. IR spektri snimljeni su na FT-IR Paragon 500 spektrometru (Perkin Elmer, SAD).  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR snimljeni su na spektrometru Bruker Avance III HD Ascend (Bruker, SAD) pri 300 ili 400 MHz za  $^1\text{H}$  te pri 75, 101 ili 151 MHz za  $^{13}\text{C}$ . Uzorci su mjereni u otopinama DMSO- $d_6$  na temperaturi od 20 °C u NMR cjevčicama od 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na unutarnji standard tetrametilsilan (TMS) u  $^1\text{H}$  spektrima te u odnosu na rezidualni pik DMSO pri 39,52 ppm kao standard u  $^{13}\text{C}$  spektrima. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (HPLC, Agilent Technologies 1200 series; MS, Agilent Technologies 6410 Triple Quadripole, SAD).

Tijek kemijskih reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC). Kao stacionarna faza korištene su staklene silikagel ploče 60 F<sub>254</sub> (Merck, Njemačka). Za pročišćavanje produkata korištena je kromatografija na koloni na stacionarnoj fazi silikagela visokog stupnja čistoće, veličine čestica 0,063-0,200 mm (Sigma-Aldrich, SAD). Pri pročišćavanju produkata „click“ reakcija kromatografijom na koloni, uz silikagel je na kolonu stavljen i aluminijev oksid veličine čestica 0,063-0,200 mm (Merck, Njemačka). Mobilne faze u tankoslojnoj i kromatografiji na koloni bile su slijedeće: diklorometan/metanol (75:25 i 9:1), cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5 i 1:1:0,5) i cikloheksan/etil-acetat (2:1 i 9:1). Analizirani spojevi detektirani su pod ultraljubičastim svjetlom ( $\lambda = 254$  i 366 nm) i parama joda.

Harmin, 4-klorcimetna kiselina, 3-fluorcimetna kiselina, 4-metoksicimetna kiselina, 3,4-metilendioksicimetna kiselina, litij aluminijski hidrid, 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undeka-7-en (DBU) i glacijalna octena kiselina nabavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD). Propargilbromid, 2-azido-1,3-dimetilimidazolinheksafluorofosfat (ADMP), *N,N*-dimetilformamid, cezijev karbonat i 3,4-difluorcimetna kiselina nabavljeni su od proizvođača TCI Chemicals (Japan). Klorovodična kiselina i tionil-klorid nabavljeni su od proizvođača Honeywell Fluka Chemicals (Njemačka). Bakrov(II) acetat nabavljen je od proizvođača Alfa Aesar (SAD), bromovodična kiselina od proizvođača Merck (Njemačka), a bezvodni natrijev sulfat od proizvođača Gram Mol (Hrvatska). Sve kemikalije bile su *p.a.* čistoće.

### 3.1. Sinteza etilnih estera CAD (1a-d)

U otopinu CAD (1,362 mmol) u apsolutnom etanolu (5 mL) dokapan je tionil-klorid (0,119 mL, 1,635 mmol) pri 0 °C. Reakcijska smjesa je miješana 24 sata na s.t. Nakon završetka reakcije, tionil-klorid je uparen pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja naparen 2 puta suhim toluenom i 1 put diklormetanom, nakon čega je produkt otopljen u diklormetanu i ekstrahiran zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata i vodom. Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt je bez pročišćavanja iskorišten u daljnjim reakcijama.

#### 3.1.1. Sinteza etil (2E)-3-(3-fluorofenil)prop-2-enoata (1a)

CAD: 0,194 g *trans*-3-fluorcimetne kiseline.

#### 3.1.2. Sinteza etil (2E)-3-(4-klorfenil)prop-2-enoata (1b)

CAD: 0,249 g *trans*-4-klorcimetne kiseline.

#### 3.1.3. Sinteza etil (2E)-3-(4-metoksifenil)prop-2-enoata (1c)

CAD: 0,243 g *trans*-4-metoksicimetne kiseline.

#### 3.1.4. Sinteza etil (2E)-3-(3,4-metilendioksifenil)prop-2-enoata (1d)

CAD: 0,262 g *trans*-3,4-metilendioksicimetne kiseline.

### 3.2. Sinteza (2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-enoil klorida (1e)

Otopini 0,182 g (0,987 mmol) *trans*-3,4-difluorcimetne kiseline u suhom toluenu (8 mL) dokapan je tionil-klorid (0,358 mL, 4,936 mmol) i nekoliko kapi DMF-a, nakon čega je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi 1,5 sat. Nakon završetka reakcije, tionil-klorid je uparen na pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja naparen 2 puta suhim toluenom i 1 put suhim eterom. Produkt reakcije je bez dodatnog pročišćavanja iskorišten u daljnjim reakcijama.

### 3.3. Sinteza alkohola CAD (2a-e)

U otopinu odgovarajućeg estera ili klorida CAD **1a-e** (1,208 mmol) u suhom eteru (10 mL) dodan je LiAlH<sub>4</sub> (0,023 g, 0,604 mmol) u inertnoj atmosferi dušika pri -5 °C. Reakcijska smjesa je miješana 1 sat na -5 °C. Reakcijska smjesa je razrijeđena dodatkom destilirane vode (10 mL) i etera. Smjesa je zakiseljena 20% HCl do prestanka pjenjenja i ekstrahirana 1%-tnom HCl te isprana vodom. Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom.

#### 3.3.1. Sinteza (2E)-3-(3-fluorofenil)prop-2-en-1-ola (2a)

Ester **1a**: 0,234 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (2:1).

Iskorištenje reakcije: 0,069 g (38%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7,42 – 7,34 (m, 1H, 6'); 7,28 (dddd, 2H, 2',4', *J* = 10,1, 7,5, 5,2, 3,7 Hz); 7,06 – 7,02 (m, 1H, 5'); 6,57 (dt, 1H, 4, *J* = 15,8, 2,0 Hz); 6,47 (dt, 1H, 3, *J* = 15,9, 4,7 Hz); 4,92 (s, 1H, 1), 4,13 (dd, 2H, 2, *J* = 4,9, 1,8 Hz).

#### 3.3.2. Sinteza (2E)-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-ola (2b)

Ester **1b**: 0,254 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (2:1).

Iskorištenje reakcije: 0,043 g (21%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7,49 – 7,41 (m, 2H, 2',6'); 7,40 – 7,34 (m, 2H, 3',5'); 6,55 (dt, 1H, 4, *J* = 16,0, 1,8 Hz); 6,41 (dt, 1H, 3, *J* = 15,9, 4,9 Hz); 4,90 (t, 1H, 1, *J* = 5,4 Hz); 4,12 (dd, 2H, 2, *J* = 6,1, 2,9 Hz).



### 3.3.3. Sinteza (2E)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-ola (2c)

Ester **1c**: 0,249 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (2:1).

Iskorištenje reakcije: 0,097 g (49%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  ppm 7,41 – 7,29 (m, 2H, 2',6'); 6,94 – 6,85 (m, 2H, 3',5'); 6,48 (d, 1H, 4,  $J = 16,0$  Hz); 6,21 (dt, 1H, 3,  $J = 15,9, 5,3$  Hz); 4,78 (t, 1H, 1,  $J = 5,4$  Hz); 4,08 (dd, 2H, 2,  $J = 5,2, 3,8$  Hz); 3,74 (s, 3H, 7').

### 3.3.4. Sinteza (2E)-3-(3,4-metilendioksofenil)prop-2-en-1-ola (2d)

Ester **1d**: 0,266 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (2:1).

Iskorištenje reakcije: 0,065 g (30%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  ppm 7,08 (s, 1H, 6'); 6,85 (s, 2H, 2',5'); 6,45 (dt, 1H, 4,  $J = 15,9, 1,5$  Hz); 6,23 (dt, 1H, 3,  $J = 15,9, 5,2$  Hz); 6,00 (s, 2H, 7'); 4,80 (s, 1H, 1); 4,07 (s, 2H, 2).

### 3.3.5. Sinteza (2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-ola (2e)

Klorid **1e**: 0,245 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (2:1).

Iskorištenje reakcije: 0,086 g (42%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  ppm 7,54 (ddd, 1H, 6',  $J = 12,3, 7,9, 2,2$  Hz); 7,37 (dt, 1H, 5',  $J = 10,7, 8,5$  Hz); 7,31 – 7,22 (m, 1H, 2'); 6,53 (dt, 1H, 4,  $J = 15,9, 2,0$  Hz); 6,42 (dt, 1H, 3,  $J = 15,9, 4,8$  Hz); 4,92 (s, 1H, 1); 4,11 (dd, 2H, 2,  $J = 4,9, 1,9$  Hz).

### 3.4. Sinteza azida CAD (3a-e)

Otopini odgovarajućeg alkohola CAD **2a-e** (0,354 mmol) u suhom THF-u (3 mL) dodani su 2-azido-1,3-dimetilimidazolinheksafluorofosfat (ADMP) (0,303 g, 1,061 mmol) i 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undeka-7-en (DBU) (0,164 mL, 1,328 mmol) pri 0 °C. Reakcijska smjesa je miješana 30 minuta. Reakcijska smjesa je razrijeđena zasićenom otopinom amonijeva klorida (15 mL) i ekstrahirana 2 puta diklormetanom. Organski slojevi su sjedinjeni i isprani 2 puta zasićenom otopinom natrijeva klorida, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom.

#### 3.4.1. Sinteza 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-3-fluorobenzena (3a)

Alkohol **2a**: 0,054 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (9:1).

Iskorištenje reakcije: 0,050 g (79%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 7,45 – 7,29 (m, 3H, 5, 7, 8); 7,18 – 7,04 (m, 1H, 9); 6,71 (d, 1H, 3, *J* = 15,9 Hz); 6,48 (dt, 1H, 2, *J* = 15,8, 6,4 Hz); 4,06 (dd, 2H, 1, *J* = 6,4, 1,1 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 163,74, 161,33 (6); 138,58, 138,50 (4); 132,28, 132,26 (3); 130,66, 130,57 (8); 125,04 (2); 122,95, 122,93 (9); 114,82, 114,61 (7); 112,89, 112,68 (5); 51,94 (1).

#### 3.4.2. Sinteza 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-klorbenzena (3b)

Alkohol **2b**: 0,059 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (9:1).

Iskorištenje reakcije: 0,057 g (84%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 7,56 – 7,50 (m, 2H, 5, 9); 7,45 – 7,39 (m, 2H, 6, 8); 6,70 (d, 1H, 3, *J* = 15,9 Hz); 6,42 (dt, 1H, 2, *J* = 15,8, 6,5 Hz); 4,05 (dd, 2H, 1, *J* = 6,5, 1,2 Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 134,84 (4); 132,43 (7); 132,27 (3); 128,68, 128,27 (5,6,8,9); 124,23 (2); 52,02 (1).

### 3.4.3. Sinteza 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-metoksibenzena (3c)

Alkohol **2c**: 0,058 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (9:1).

Iskorištenje reakcije: 0,032 g (48%).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 7,44-7,71 (m, 2H, 5, 9); 6,94-6,89 (m, 2H, 6, 8); 6,65 (d, 1H, 3,  $J = 15,8$  Hz); 6,22 (dt, 1H, 2,  $J = 15,8, 6,7$  Hz); 3,99 (d, 2H, 1,  $J = 6,7$  Hz); 3,74-3,76 (m, 3H, 10).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 159,23 (7); 133,69 (3); 128,44 (4); 127,89 (6,8); 120,42 (2); 114,11 (5,9); 55,13 (10); 52,36 (1).

### 3.4.4. Sinteza 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-3,4-metilendioksobenzena (3d)

Alkohol **2d**: 0,063 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (9:1).

Iskorištenje reakcije: 0,066 g (92%).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 7,17 (d, 1H, 9,  $J = 1,3$  Hz); 6,96 – 6,83 (m, 2H, 5, 8); 6,62 (d, 1H, 3,  $J = 15,8$  Hz); 6,25 (dt, 1H, 2,  $J = 15,7, 6,7$  Hz); 6,02 (m, 2H, 10); 3,99 (dd, 2H, 1,  $J = 6,6, 0,8$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 147,82 (6); 147,24 (7); 133,71 (4); 130,28 (3); 121,61 (2); 121,04 (9); 108,29 (8); 105,62 (5); 101,11 (10); 52,25 (1).

### 3.4.5. Sinteza 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-3,4-difluorobenzena (3e)

Alkohol **2e**: 0,060 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat (9:1).

Iskorištenje reakcije: 0,060 g (87%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 7,68-7,62 (m, 1H, 9); 7,48 – 7,27 (m, 2H, 5, 8); 6,68 (d, 1H, 3, *J* = 15,8 Hz); 6,44 (dt, 1H, 2, *J* = 15,8, 6,4 Hz); 4,05 (dd, 2H, 1, *J* = 6,4, 1,0 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 150,95-147,79 (6, 7); 133,85 (4); 131,36 (3); 124,87 (9); 123,74 (8); 117,76-117,10 (2); 115,07, 114,89 (5); 51,90 (1).

### 3.5. Sinteza harmola (4)

Otopina 0,151 g harmina (0,707 mmol) u 3 mL konc. octene kiseline i 1,5 mL 47%- tne bromovodične kiseline miješana je u mikrovalnom reaktoru (MW) 25 minuta pri 140 °C i 75 W. Reakcijska smjesa je razrijeđena vodom (20 mL) i zaljučena 5% otopinom natrijeva hidroksida do pH 9-10. Smjesa je ekstrahirana etil-acetatom (3 × 150 mL). Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt rastrljan je u eteru te je potom odsisan svijetlo-žuti talog **4**, koji je iskorišten u sljedećoj reakciji.

Iskorištenje reakcije: 0,261 g (93%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 11,22 (s, 1H, 10); 9,73 (s, 1H, 14); 8,12 (d, 1H, 7, *J* = 5,3 Hz); 7,94 (d, 1H, 3, *J* = 8,5 Hz); 7,74 (d, 1H, 6, *J* = 5,3 Hz); 6,91 (d, 1H, 12, *J* = 2,0 Hz); 6,71 (dd, 1H, 2, *J* = 8,5, 2,1 Hz); 2,70 (s, 3H, 13).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 158,24 (1); 142,27 (8); 140,89 (11); 137,59 (7); 134,41 (9); 127,51 (4); 122,52 (3); 113,87 (5); 111,64 (6); 109,65 (2); 96,60 (12); 20,24 (13).

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

Suspenzija 0,290 g harmola **4** (1,463 mmol) i 0,667 g (2,048 mmol) cezijeveg karbonata u 5 mL suhog DMF-a miješana je 15 min u inertnoj atmosferi dušika, nakon čega je dokapano 0,196 mL (1,756 mmol) 80%-tne otopine propargil-bromida i miješano 3,5 h na s.t. Reakcijskoj smjesi je potom dodano 50 mL vode, a dobivena otopina je ekstrahirana etil-acetatom (4 × 50 mL) te isprana vodom. Organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran i uparen pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu diklormetan/metanol (9:1) i rastrljavanja produkta u eteru dobiveno je smeđe ulje koje brzo kristalizira u maslinasto-zelene kristale **5**.

Iskorištenje reakcije: 0,114 g (33%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) 11,55 (s, 1H, 10); 8,17 (d, 1H, 7, *J* = 5,3 Hz); 8,10 (d, 1H, 3, *J* = 8,7 Hz); 7,85 (d, 1H, 6, *J* = 5,3 Hz); 7,13 (d, 1H, 12, *J* = 2,1 Hz); 6,89 (dd, 1H, 2, *J* = 8,7 Hz, 2,3 Hz); 4,93 (d, 2H, 1', *J* = 2,3 Hz); 3,64 (t, 1H, 3', *J* = 2,3 Hz); 2,74 (s, 3H, 13).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) 157,94 (1); 141,67 (8); 141,33 (11); 137,59 (7); 134,60 (9); 127,17 (4); 122,68 (3); 115,35 (5); 112,06 (6); 109,55 (2); 96,00 (12); 78,44 (2'); 55,75 (1'); 20,22 (13).

### 3.7. Sinteza *O*-harmicina 6a-e

Otopini azida CAD **3a-e** (0,125 mmol) i alkina **5** (0,027 g, 0,114 mmol) u metanolu (3 mL) dodana je katalitička količina Cu(II) acetata. Reakcijska smjesa miješana je preko noći na s.t. Nakon završetka reakcije, metanol je uparen pod sniženim tlakom.

#### 3.7.1. Sinteza 1-[(*2E*)-3-(3-fluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)metil]-1*H*-1,2,3-triazola (6a)

Azid **3a**: 0,022 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i dodatak Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Dobiveni talog prekrizaliziran je iz 96% etanola te je dobiven spoj **6a** (bijeli kristali).

Iskorištenje reakcije: 0,017 g (32%).

*t*<sub>r</sub> 182-185 °C.

MS (*m/z*) 414.2 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 3187, 3133, 3104, 2877, 1628, 1583, 1569, 1487, 1448, 1387, 1327, 1297, 1276, 1239, 1175, 1141, 1108, 1056, 1033, 1011, 967, 869, 819, 788, 684.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) 11,45 (s, 1H, 10); 8,30 (s, 1H, 3'); 8,15 (d, 1H, 7, *J* = 5,3 Hz); 8,06 (d, 1H, 3, *J* = 8,6 Hz); 7,80 (d, 1H, 6, *J* = 5,3 Hz); 7,40 – 7,28 (m, 2H, 11',12'); 7,24 (d, 1H, 10', *J* = 7,8 Hz); 7,18 (d, 1H, 12, *J* = 2,1 Hz); 7,10 (td, 1H, 8', *J* = 8,2, 1,9 Hz); 6,91 (dd, 1H, 2, *J* = 8,7, 2,2 Hz); 6,62 (t, 2H, 5', 6', *J* = 3,3 Hz); 5,30 (s, 2H, 1'); 5,25 – 5,19 (m, 2H, 4'); 2,72 (s, 3H, 13).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) 162,50 (d, 9', *J* = 243,2 Hz); 158,74 (1); 143,01 (2'); 141,80 (8); 141,37 (11); 138,36 (d, 7', *J* = 7,9 Hz); 137,73 (7); 134,60 (9); 132,35 (5'); 130,58 (d, 11', *J* = 8,5 Hz); 127,13 (4); 125,49 (6'); 124,61 (3'); 123,03 (12'); 122,65 (3); 115,11 (5); 114,82 (d, 10', *J* = 21,3 Hz); 112,78 (d, 8', *J* = 21,9 Hz); 111,96 (6); 109,48 (2); 95,85 (12); 61,46 (1'); 51,20 (4'); 20,34 (13).

### 3.7.2. Sinteza 1-[(2*E*)-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)metil]-1*H*-1,2,3-triazola (**6b**)

Azid **3b**: 0,024 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i dodatak Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Dobiveni talog je prekrizaliziran iz 96% etanola te je dobiven spoj **6b** (bijeli talog).

Iskorištenje reakcije: 0,028 g (52%).

*t*<sub>r</sub> 216-218 °C.

MS ( $m/z$ ) 430.2 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 3135, 3100, 3080, 2959, 2874, 2758, 1627, 1567, 1486, 1438, 1415, 1392, 1325, 1277, 1238, 1222, 1175, 1134, 1104, 1070, 1053, 1033, 1015, 969, 826, 809, 743, 695.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) 11,45 (s, 1H, 10); 8,30 (s, 1H, 3'); 8,15 (d, 1H, 7,  $J = 5,3$  Hz); 8,06 (d, 1H, 3,  $J = 8,6$  Hz); 7,81 (d, 1H, 6,  $J = 5,3$  Hz); 7,46 (d, 2H, 8',12',  $J = 8,5$  Hz); 7,36 (d, 2H, 9', 11',  $J = 8,5$  Hz); 7,18 (d, 1H, 12,  $J = 2,1$  Hz); 6,90 (dd, 1H, 2,  $J = 8,6, 2,2$  Hz); 6,63 – 6,51 (m, 2H, 5',6'); 5,29 (s, 2H, 1'); 5,21 (d, 2H, 4',  $J = 4,9$  Hz); 2,72 (s, 3H, 13).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) 158,79 (1); 143,02 (2'); 141,83 (8); 141,30 (11); 137,61 (7); 134,67, 134,59 (7',9); 132,52 (10'); 132,25 (5'); 128,66, 128,29 (8',9',11',12'); 127,23 (4); 124,74, 124,58 (3',6'); 122,69 (3); 115,11 (5); 112,02 (6); 109,57 (2); 95,87 (12); 61,47 (1'); 51,27 (4'); 20,25 (13).

### 3.7.3. Sinteza 1-[(2*E*)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)metil]-1*H*-1,2,3-triazola (6c)

Azid **3c**: 0,024 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i dodatak Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Dobiveni talog je prekrizaliziran iz 96% etanola te je dobiven spoj **6c** (bijeli talog).

Iskorištenje reakcije: 0,016 g (30%).

$t_r$  215-216 °C.

MS ( $m/z$ ) 426.1 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 3137, 3078, 2961, 2932, 2872, 2840, 1620, 1567, 1510, 1438, 1315, 1281, 1243, 1172, 1142, 1112, 1027, 969, 879, 815, 772, 741, 682, 634.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) 11,46 (s, 1H, 10); 8,28 (s, 1H, 3'); 8,15 (d, 1H, 7,  $J = 5,3$  Hz); 8,06 (d, 1H, 3,  $J = 8,6$  Hz); 7,81 (d, 1H, 6,  $J = 5,3$  Hz); 7,36 (d, 2H, 8',12',  $J = 8,7$  Hz); 7,18 (d, 1H, 12,  $J = 2,0$  Hz); 6,96 – 6,75 (m, 3H, 2,9',11'); 6,56 (d, 1H, 6',  $J = 15,8$  Hz); 6,36 (dt, 1H, 5',  $J = 15,8, 6,5$  Hz); 5,29 (s, 2H, 1'); 5,17 (d, 2H, 4',  $J = 6,3$  Hz); 3,85 – 3,67 (m, 3H, 13'); 2,70 (d, 3H, 13,  $J = 17,3$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) 159,21, 159,07 (1,10'); 142,90 (2'); 142,21 (8); 140,82 (11); 136,55 (7); 133,97 (9); 133,33 (5'); 128,28 (4); 127,88 (8',12'); 127,77 (7'); 124,44 (3'); 122,89 (3); 121,07 (6'); 114,95 (5); 114,04 (9',11'); 112,28 (6); 109,92 (2); 95,83 (12); 61,49 (1'); 55,10 (13'); 51,47 (4'); 19,73 (13).

### 3.7.4. Sinteza 1-[(2*E*)-3-(2*H*-1,3-benzodioskol-5-il)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)metil]-1*H*-1,2,3-triazola (6d)

Azid **3d**: 0,025 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i dodatak Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Dobiveni talog je prekrizaliziran iz 96% etanola te je dobiven spoj **6d** (bijeli talog).

Iskorištenje reakcije: 0,012 g (24%).

*t*<sub>r</sub> 203-204 °C.

MS (*m/z*) 440.1 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 3180, 3103, 2883, 2779, 1626, 1569, 1496, 1447, 1385, 1331, 1258, 1173, 1138, 1107, 1038, 1006, 968, 927, 816.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) 11,45 (s, 1H, 10); 8,27 (s, 1H, 3'); 8,15 (d, 1H, 7, *J* = 5,2 Hz); 8,06 (d, 1H, 3, *J* = 8,7 Hz); 7,80 (d, 1H, 6, *J* = 5,2 Hz); 7,23 – 7,09 (m, 2H, 12, 12'); 6,90 (dd, 1H, 2, *J* = 8,7, 2,2 Hz); 6,83 (s, 2H, 8',11'); 6,56 (d, 1H, 6', *J* = 15,8 Hz); 6,38 (dt, 1H, 5', *J* = 15,8, 6,5 Hz); 6,01 (s, 2H, 13'); 5,29 (s, 2H, 1'); 5,16 (d, 2H, 4', *J* = 6,1 Hz); 2,72 (s, 3H, 13).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm) 158,86 (1); 147,82 (11'); 147,28 (10'); 142,96 (2'); 141,91 (8); 141,19 (11); 137,39 (7); 134,56 (9); 133,56 (5'); 130,15 (7'); 127,33 (4); 124,43 (3'); 122,72 (3); 121,70, 121,62 (6',12'); 115,07 (5); 112,05 (6); 109,61 (2); 108,24 (9'); 105,59 (8'); 101,12 (13'); 95,82 (12); 61,47 (1'); 51,42 (4'); 20,14 (13).

### 3.7.5. Sinteza 1-[(2*E*)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi)metil]-1*H*-1,2,3-triazola (6e)



Azid **3e**: 0,024 g.

Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu cikloheksan/etil-acetat/metanol (1:1:0,5) i dodatak Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Dobiveni talog je prekrizaliziran iz 96% etanola te je dobiven spoj **6e** (bijeli talog).

Iskorištenje reakcije: 0,019 g (36%).

*t*<sub>r</sub> 172-173 °C.

MS (*m/z*) 432.2 (M+1)<sup>+</sup>.

IR (KBr, *ν*/cm<sup>-1</sup>) 3400, 3274, 3052, 3014, 2934, 2876, 1630, 1568, 1514, 1432, 1272, 1238, 1172, 1110, 1056, 1010, 962, 868, 816, 634.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) 11,45 (s, 1H, 10); 8,30 (s, 1H, 3'); 8,15 (d, 1H, 7, *J* = 5,3 Hz); 8,06 (d, 1H, 3, *J* = 8,6 Hz); 7,80 (d, 1H, 6, *J* = 5,3 Hz); 7,69 – 7,57 (m, 1H, 12'); 7,36 (dt, 1H, 11', *J* = 10,6, 8,4 Hz); 7,27 (t, 1H, 8', *J* = 6,7 Hz); 7,18 (d, 1H, 12, *J* = 2,2 Hz); 6,90 (dd, 1H, 2, *J* = 8,6, 2,3 Hz); 6,65 – 6,50 (m, 2H, 5',6'); 5,29 (s, 2H, 1'); 5,21 (d, 2H, 4', *J* = 4,8 Hz); 2,72 (s, 3H, 13).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm) 158,73 (1); 150,59 (dd, 9', *J* = 52,7, 12,4 Hz); 148,16 (dd, 10', *J* = 54,5, 12,4 Hz); 143,01 (2'); 141,76 (8); 141,34 (11); 137,74 (7); 134,58 (9); 133,67 (7'); 131,50 (5'); 125,28 (4); 124,55 (3'); 123,84 (6'); 123,83 (d, 12', *J* = 3,1 Hz); 122,63 (3); 117,63 (d, 11', *J* = 17,2 Hz); 115,12 (5); 115,00 (d, 8', *J* = 17,4 Hz); 127,23 (12); 111,94 (6); 109,46 (2); 95,82 (12); 61,45 (1'); 51,14 (4'); 20,31 (13).

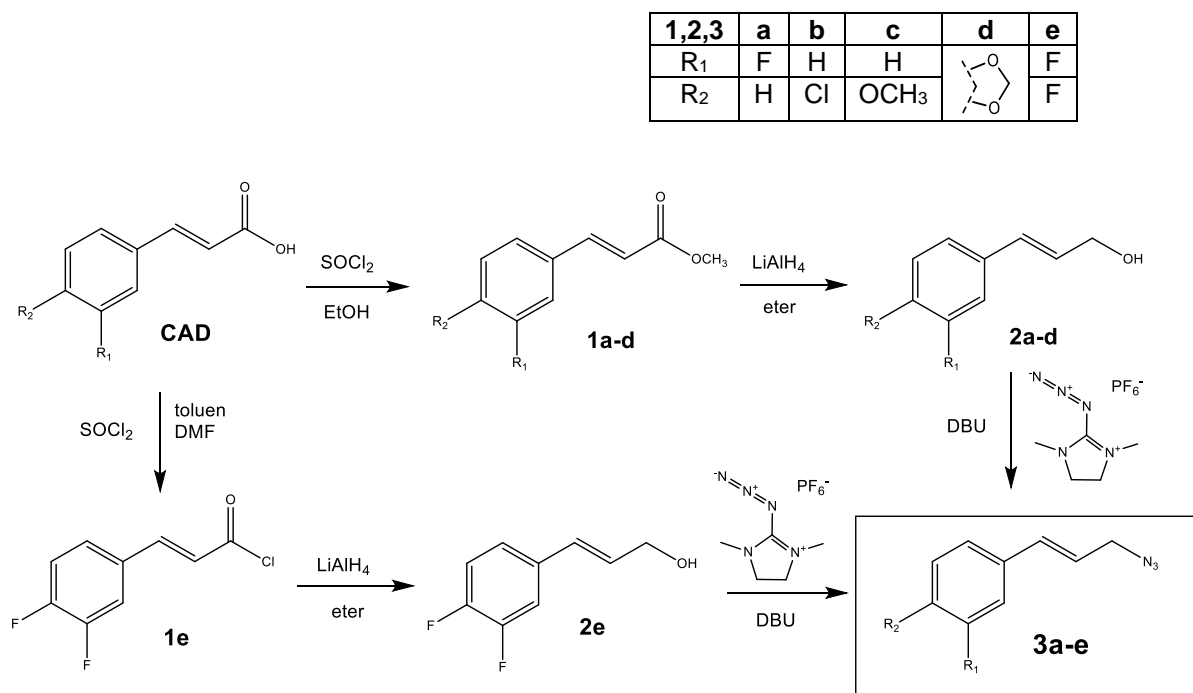
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Dizajn lijekova temeljen na sintezi hibridnih spojeva podrazumijeva vezanje dvije ili više bioaktivnih molekula u jedan novi kemijski entitet. Ova strategija se upotrebljava radi poboljšanja svojstava hibridne molekule u odnosu na ishodišne spojeve. Sintezom hibridnih molekula moguće je postići djelovanje na dvije ili više farmakoloških meta, smanjenje neželjenih učinaka i stupanja u interakcije s drugim lijekovima. Također, upotrebom hibridnih lijekova može se, zbog njihovog učinkovitijeg i selektivnijeg djelovanja, savladati rezistencija na postojeću farmakoterapiju (Li i sur., 2019.).

Ovaj pristup iskorišten je i u sintezi *O*-harmicina, hibridnih molekula harmina i derivata cimetine kiseline. Harmin je prirodni  $\beta$ -karbolinski alkaloid koji pokazuje antimalarijsko djelovanje inhibicijom Hsp90 kod vrsta roda *Plasmodium*, kao i citostatski učinak, djelovanjem na brojne farmakološke mete. Cimetna kiselina i njeni derivati su biološki aktivni spojevi koji pokazuju brojne farmakološke učinke, uključujući antimalarijsko i citostatsko djelovanje. Sukladno navedenom, obje ishodišne molekule pokazuju željena djelovanja, pa je moguće da će hibridna molekula, nastala njihovim kovalentnim povezivanjem, imati pojačano farmakološko djelovanje. Kao poveznica između dva farmakofora upotrijebljen je 1,2,3-triazolski prsten, radi njegove jednostavne sinteze Cu(I) kataliziranom alkin-azid cikloadicijom, visoke stabilnosti te otpornosti na fiziološke uvjete.

Budući da je navedena cikloadicija odabrana kao metoda povezivanja harmina i CAD, prvo je bilo potrebno sintetizirati cimetne azide (Shema 3.) i alkin u položaju 7  $\beta$ -karbolinskog prstena harmina (Shema 4.). Prvi korak u sintezi azida je prevođenje CAD u reaktivnije estere ili kiselinski klorid (**1a-e**), nakon koje slijedi redukcija u cimetne alkohole (**2a-e**). Reakcija esterifikacije CAD provođena je dokapavanjem tionil-klorida otopini CAD u apsolutnom etanolu te je tako preko kiselinskog klorida došlo do supstitucijske reakcije pripreve estera (**1a-d**). Izolirani esteri su zatim korišteni za reakciju redukcije u cimetne alkohole **2a-d** uz  $\text{LiAlH}_4$  u suhom dietil-eteru i u inertnoj atmosferi dušika, kako bi se spriječili oksidativni procesi pod utjecajem kisika iz zraka. Za prevođenje *m,p*-difluorcimetine kiseline u cimetni alkohol prvo je pripravljen kiselinski klorid (**1e**) reakcijom CAD i tionil-klorida u suhom toluenu uz dodatak katalitičke količine suhog DMF-a. Nastali kiselinski klorid **1e** je zatim uz  $\text{LiAlH}_4$  reduciran u odgovarajući cimetni alkohol **2e**. Reakcije redukcije estera i klorida izvedene su uz  $\text{LiAlH}_4$  kao reducirajući agens, pri  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ , kako ne bi došlo do redukcije dvostruke veze CAD. U posljednjem koraku sinteze azida, reakcijom alkohola **2a-e** i donora azidne skupine, ADMP-a, nastaju azidi CAD (**3a-e**), koji su korišteni kao građevni elementi za reakciju Cu (I)-katalizirane alkin-azid cikloadicije. Reakcija dobivanja azida provođena je pri  $0^\circ\text{C}$  uz dodatak

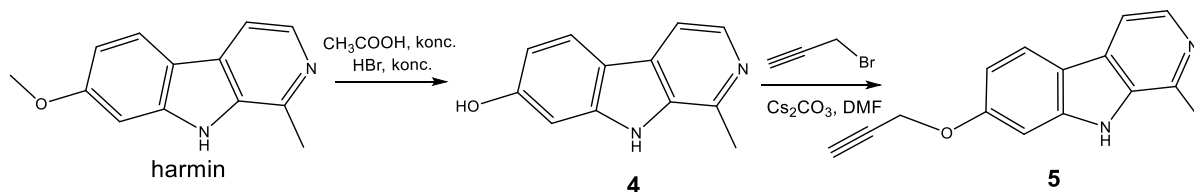
baze DBU, koja se pokazala najpogodnijom za ovu reakciju, čime je u jednom koraku došlo do transformacije alkohola u azide (Kitamura i sur., 2012.).



**Shema 3.** Sinteza azida CAD (**3a-e**)

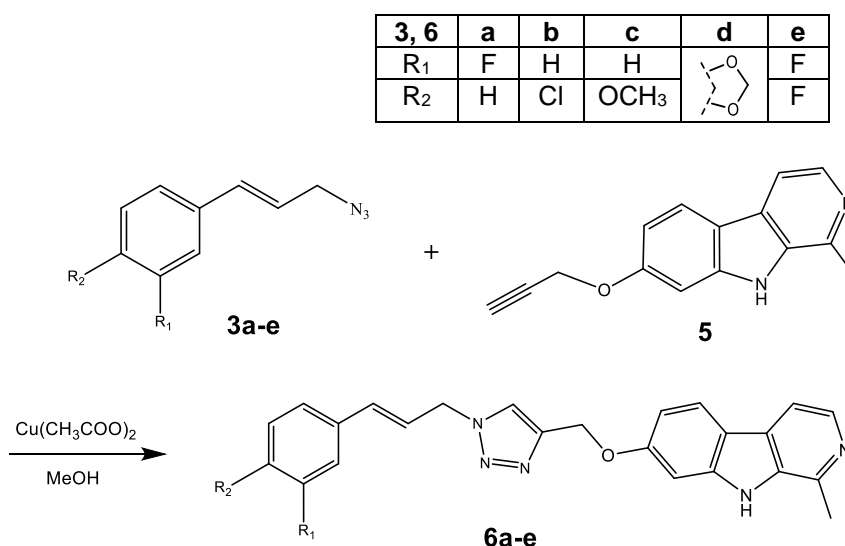
Kao drugi građevni element za Cu (I)-kataliziranu alkin-azid cikloadiciju pripremljen je alkin **5** iz harmina. U prvom koraku, harmin je *O*-demetilacijom na položaju 7 preveden u harmol (**4**). Reakcija *O*-demetilacije odvijala se u kiselim uvjetima uz bromovodičnu i koncentriranu octenu kiselinu, u mikrovalnom reaktoru na 140°C. Kiseli uvjeti su nužni kako bi se protonirao kisikov atom etera, čime se omogućava odvijanje S<sub>N</sub>2 reakcije nukleofilne supstitucije, u kojoj dolazi do cijepanja eterske veze nukleofilnim napadom halogenida te se metilna izlazna skupina veže na halogenid uz nastajanje alkohola. U kiselim uvjetima je harmol u obliku soli, pa zaluzivanjem 5% otopinom NaOH do pH 9-10 prelazi u oblik baze, koja je topljiva u organskom otapalu, zbog čega ga je moguće izolirati ekstrakcijom. Nakon izolacije, harmol se postupkom Williamsonove sinteze prevodi u alkin **5**. U Williamsonovoj sintezi etera alkil-halogenid mora biti primarni tako da napad nije sterički ometen te kako ne bi došlo do eliminacije, a alkosid/fenoksid se obično pripremlja iz skupine koja je više sterički ometena (Wade, 2017.). U ovom slučaju, dodatkom cezijevog karbonata u reakcijsku smjesu dolazi do deprotoniranja fenola harmola, pri čemu nastaje fenoksid koje je jak nukleofil i vrlo jaka baza te nukleofilno napada propargil-bromid, dajući eter **5**. Reakcija je provođena uz 1,4

ekvivalenata cezijeovog karbonata, kako bi kao većinski produkt nastao *O*-propargilirani derivat. Kako do alkiliranja može doći i na dušiku N9, kao nusprodukt ove reakcije nastaje i mala količina *N,O*-bis-propargiliranog derivata (Perković i sur., 2019.). Dobiveni sirovi produkt **5** pročišćen je kromatografijom na koloni te rastrljavanjem u eteru. Time je dobiven alkinski građevni element za Cu(I) kataliziranu alkin-azid cikloadiciju.



**Shema 4.** Sinteza alkina **5**

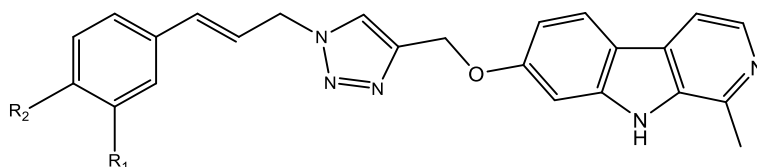
Dobiveni azidi **3a-e** i alkin **5** u reakciji Cu(I) katalizirane alkin-azid cikloadicije dali su konačne produkte, *O*-harmicine **6a-e** (Shema 5). Metanol kao reducens dovodi do generiranja Cu(I) *in situ* iz Cu(II) acetata. Iskorištenja reakcija bila su od 30 do 52%. Dobiveni sirovi produkti pročišćeni su kromatografijom na koloni, uz dodatak sloja aluminijevog oksida, koji je zadržavao soli bakra na koloni.



**Shema 5.** Cu(I)-katalizirana alkin-azid cikloadicija u sintezi *O*-harmicina **6a-e**

Tijek svih kemijskih reakcija i čistoća dobivenih produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom. Strukture dobivenih alkohola **2a-e**, azida **3a-e**, harmola **4** i alkina **5** potvrđene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom (kemijski pomaci navedeni su u Materijalima i Metodama, a spektri priloženi u Prilozima). Konačni spojevi, *O*-harmicini, karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (talište, IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS). Pojavom novog pika u <sup>1</sup>H NMR spektru na 8,3 ppm potvrđena je prisutnost triazolskog prstena u strukturi *O*-harmicina. Novonastali pik u spektru potječe od jedinog prisutnog vodika u prstenu. Analitički i spektroskopski podaci *O*-harmicina **6a-e** navedeni su u tablicama 5 i 6, a spektri su priloženi u Prilozima.

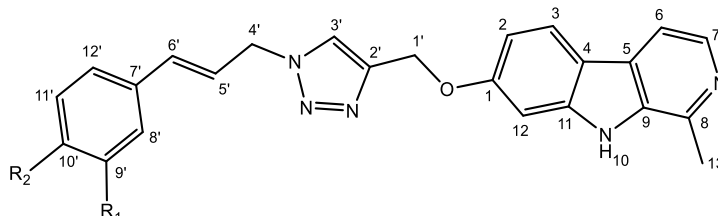
**Tablica 5. Analitički, MS i IR spektroskopski podaci *O*-harmicina 6a-e**



Spoj	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	<i>t</i> <sub>f</sub> (°C)	Molekulska formula	<i>M</i> <sub>r</sub>	MS ( <i>m/z</i> )	IR (KBr, ν/cm <sup>-1</sup> )
<b>6a</b>	F	H	182-185	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>5</sub> O	413,46	414,2 (M+1) <sup>+</sup>	3187, 3133, 3104, 2877, 1628, 1583, 1569, 1487, 1448, 1387, 1327, 1297, 1276, 1239, 1175, 1141, 1108, 1056, 1033, 1011, 967, 869, 819, 788, 684
<b>6b</b>	H	Cl	216-218	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>5</sub> O	429,91	430,2 (M+1) <sup>+</sup>	3135, 3100, 3080, 2959, 2874, 2758, 1627, 1567, 1486, 1438, 1415, 1392, 1325, 1277, 1238, 1222, 1175, 1134, 1104, 1070, 1053, 1033, 1015, 969, 826, 809, 743, 695
<b>6c</b>	H	OCH <sub>3</sub>	215-216	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	425,49	426,1 (M+1) <sup>+</sup>	3137, 3078, 2961, 2932, 2872, 2840, 1620, 1567, 1510, 1438, 1315, 1281, 1243, 1172, 1142, 1112, 1027, 969, 879, 815, 772, 741, 682, 634
<b>6d</b>			203-204	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	439,48	440,1 (M+1) <sup>+</sup>	3180, 3103, 2883, 2779, 1626, 1569, 1496, 1447, 1385, 1331, 1258, 1173, 1138, 1107, 1038, 1006, 968, 927, 816
<b>6e</b>	F	F	172-173	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O	431,45	432,2 (M+1) <sup>+</sup>	3400, 3274, 3052, 3014, 2934, 2876, 1630, 1568,

1514, 1432, 1272, 1238,  
1172, 1110, 1056, 1010,  
962, 868, 816, 634

Tablica 6.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopski podaci *O*-harmicina 6a-e



Spoj	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , $\delta$ / ppm)	$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , $\delta$ / ppm)
6a	F	H	11,45 (s, 1H, 10), 8,30 (s, 1H, 3'), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 8,06 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,80 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,40 – 7,28 (m, 2H, 11', 12'), 7,24 (d, 1H, 10', $J = 7,8$ Hz), 7,18 (d, 1H, 12, $J = 2,1$ Hz), 7,10 (td, 1H, 8', $J = 8,2; 1,9$ Hz), 6,91 (dd, 1H, 2, $J = 8,7; 2,2$ Hz), 6,62 (t, 2H, 5', 6', $J = 3,3$ Hz), 5,30 (s, 2H, 1'), 5,25 – 5,19 (m, 2H, 4'), 2,72 (s, 3H, 13)	162,50 (d, 9', $J = 243,2$ Hz), 158,74 (1), 143,01 (2'), 141,80 (8), 141,37 (11), 138,36 (d, 7', $J = 7,9$ Hz), 137,73 (7), 134,60 (9), 132,35 (5'), 130,58 (d, 11', $J = 8,5$ Hz), 127,13 (4), 125,49 (6'), 124,61 (3'), 123,03 (12'), 122,65 (3), 115,11 (5), 114,82 (d, 10', $J = 21,3$ Hz), 112,78 (d, 8', $J = 21,9$ Hz), 111,96 (6), 109,48 (2), 95,85 (12), 61,46 (1'), 51,20 (4'), 20,34 (13)
6b	H	Cl	11,45 (s, 1H, 10), 8,30 (s, 1H, 3'), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 8,06 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,81 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,46 (d, 2H, 8', 12', $J = 8,5$ Hz), 7,36 (d, 2H, 9', 11', $J = 8,5$ Hz), 7,18 (d, 1H, 12, $J = 2,1$ Hz), 6,90 (dd, 1H, 2, $J = 8,6; 2,2$ Hz), 6,63 – 6,51 (m, 2H, 5', 6'), 5,29 (s, 2H, 1'), 5,21 (d, 2H, 4', $J = 4,9$ Hz), 2,72 (s, 3H, 13)	158,79 (1), 143,02 (2'), 141,83 (8), 141,30 (11), 137,61 (7), 134,67, 134,59 (7', 9), 132,52 (10'), 132,25 (5'), 128,66, 128,29 (8', 9', 11', 12'), 127,23 (4), 124,74, 124,58 (3', 6'), 122,69 (3), 115,11 (5), 112,02 (6), 109,57 (2), 95,87 (12), 61,47 (1'), 51,27 (4'), 20,25 (13)
6c	H	OCH <sub>3</sub>	11,46 (s, 1H, 10), 8,28 (s, 1H, 3'), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 8,06 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,81 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,36 (d, 2H, 8', 12', $J = 8,7$ Hz), 7,18 (d, 1H, 12, $J = 2,0$ Hz), 6,96 – 6,75 (m, 3H, 2, 9', 11'), 6,56 (d, 1H, 6', $J = 15,8$ Hz), 6,36 (dt, 1H, 5', $J = 15,8; 6,5$ Hz), 5,29 (s, 2H, 1'), 5,17 (d, 2H, 4', $J = 6,3$ Hz), 3,85 – 3,67 (m, 3H, 13'), 2,70 (d, 3H, 13, $J = 17,3$ Hz)	159,21, 159,07 (1, 10'), 142,90 (2'), 142,21 (8), 140,82 (11), 136,55 (7), 133,97 (9), 133,33 (5'), 128,28 (4), 127,88 (8', 12'), 127,77 (7'), 124,44 (3'), 122,89 (3), 121,07 (6'), 114,95 (5), 114,04 (9', 11'), 112,28 (6), 109,92 (2), 95,83 (12), 61,49 (1'), 55,10 (13'), 51,47 (4'), 19,73 (13)
6d			11,45 (s, 1H, 10), 8,27 (s, 1H, 3'), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,2$ Hz), 8,06 (d, 1H, 3, $J = 8,7$ Hz), 7,80 (d, 1H, 6, $J = 5,2$ Hz), 7,23 – 7,09 (m, 2H, 12, 12'), 6,90 (dd, 1H, 2, $J = 8,7; 2,2$ Hz), 6,83 (s, 2H, 8', 11'), 6,56 (d, 1H, 6', $J = 15,8$ Hz), 6,38 (dt, 1H, 5', $J = 15,8; 6,5$ Hz), 6,01	158,86 (1), 147,82 (11'), 147,28 (10''), 142,96 (2'), 141,91 (8), 141,19 (11), 137,39 (7), 134,56 (9), 133,56 (5'), 130,15 (7'), 127,33 (4), 124,43 (3'), 122,72 (3), 121,70, 121,62 (6', 12'), 115,07 (5), 112,05 (6), 109,61 (2), 108,24 (9'), 105,59 (8'), 101,12 (13'),

			(s, 2H, 13'), 5,29 (s, 2H, 1'), 5,16 (d, 2H, 4', $J = 6,1$ Hz), 2,72 (s, 3H, 13)	95,82 (12), 61,47 (1'), 51,42 (4'), 20,14 (13)
<b>6e</b>	F	F	11,45 (s, 1H, 10), 8,30 (s, 1H, 3'), 8,15 (d, 1H, 7, $J = 5,3$ Hz), 8,06 (d, 1H, 3, $J = 8,6$ Hz), 7,80 (d, 1H, 6, $J = 5,3$ Hz), 7,69 – 7,57 (m, 1H, 12'), 7,36 (dt, 1H, 11', $J = 10,6; 8,4$ Hz), 7,27 (t, 1H, 8', $J = 6,7$ Hz), 7,18 (d, 1H, 12, $J = 2,2$ Hz), 6,90 (dd, 1H, 2, $J = 8,6; 2,3$ Hz), 6,65 – 6,50 (m, 2H, 5', 6'), 5,29 (s, 2H, 1'), 5,21 (d, 2H, 4', $J = 4,8$ Hz), 2,72 (s, 3H, 13)	158,73 (1), 150,59 (dd, 9', $J = 52,7; 12,4$ Hz), 148,16 (dd, 10', $J = 54,5; 12,4$ Hz), 143,01 (2'), 141,76 (8), 141,34 (11), 137,74 (7), 134,58 (9), 133,67 (7'), 131,50 (5'), 125,28 (4), 124,55 (3'), 123,84 (6'), 123,83 (d, 12', $J = 3,1$ Hz), 122,63 (3), 117,63 (d, 11', $J = 17,2$ Hz), 115,12 (5), 115,00 (d, 8', $J = 17,4$ Hz), 127,23 (12), 111,94 (6), 109,46 (2), 95,82 (12), 61,45 (1'), 51,14 (4'), 20,31 (13)



## **5. ZAKLJUČCI**

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija *O*-harmicina **6a-e**, hibridnih molekula harmina i derivata cimetine kiseline:

- 1-[(2*E*)-3-(3-fluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi]metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**6a**)
- 1-[(2*E*)-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi]metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**6b**)
- 1-[(2*E*)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi]metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**6c**)
- 1-[(2*E*)-3-(2*H*-1,3-benzodioxol-5-il)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi]metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**6d**)
- 1-[(2*E*)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi]metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**6e**).

Kao metoda povezivanja korištena je Cu(I) katalizirana alkin-azid cikloadicija te su sintetizirani i polazni spojevi, azidi derivata cimetine kiseline **3a-e** te alkin **5**.

Svim konačnim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta.

U daljnjim ispitivanjima, koja nadilaze okvir ovog rada, sintetiziranim spojevima ispitat će se citostatsko djelovanje na nizu tumorskih staničnih linija.

## **6. LITERATURA**

Agalave SG, Maujan SR, Pore VS. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem Asian J*, 2011, 6, 2696–2718.

Ayoob I, Hazari YM, Lone SH, Shakeel-u-Rehman Khuroo MA, Fazili KM, Bhat KA. Phytochemical and Cytotoxic Evaluation of Peganum Harmala: Structure Activity Relationship Studies of Harmine. *ChemistrySelect*, 2017, 2, 2965–2968.

Bock VD, Hiemstra H, Van Maarseveen JH. CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur J Org Chem*, 2006, 51–68.

Boeira JM, Viana AF, Picada JN, Henriques JAP. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 2002, 500, 39–48.

Bozorov K, Zhao J, Aisa HA. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27, 3511–3531.

Cancer, 2021., <https://www.who.int/>, pristupljeno 13.5.2021.

Cao R, Peng W, Wang Z, Xu A. Beta-Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. *Curr Med Chem*, 2007, 14, 479–500.

Cao R, Peng W, Chen H, Ma Y, Liu X, Hou X, Guan H, Xu A. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338, 1557–1563.

Dheer D, Singh V, Shankar R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg Chem*, 2017, 71, 30–54.

Filali I, Bouajila J, Znati M, Garah FBE, Jannet HB. Synthesis of new isoxazoline derivatives from harmine and evaluation of their anti-Alzheimer, anti-cancer and anti-inflammatory activities. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2015, 30, 371–376.

Frost D, Meechoovet B, Wang T, Gately S, Giorgetti M, Shcherbakova I, Dunckley T.  $\beta$ -carboline compounds, including harmine, inhibit DYRK1A and tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS One*, 2011, 6, e19264.

Guan Y, Louis ED, Zheng W. Toxicokinetics of tremorogenic natural products, harmine and harmine, in male Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Env Health Dio A*, 2001, 64, 645–660.

Guo L, Chen W, Cao R, Fan W, Ma Q, Zhang J, Dai B. Synthesis and structure-activity relationships of asymmetric dimeric  $\beta$ -carboline derivatives as potential antitumor agents. *Eur J Med Chem*, 2018, 147, 253–265.

Haider S, Alhusban M, Chaurasiya ND, Tekwani BL, Chittiboyina AG, Khan IA. Isoform selectivity of harmine-conjugated 1,2,3-triazoles against human monoamine oxidase. *Future Med Chem*, 2018, 10, 1435–1448.

Hamsa TP, Kuttan G. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. *Chin Med*, 2011, 6, 11.

Harmine, <https://www.chemurope.com/en/>, pristupljeno 4.3.2021.

Harmine, 2010., <https://go.drugbank.com/>, pristupljeno 4.3.2021.

Harmine, 2005., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 4.3.2021.

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

Herraiz T, Guillén H. Monoamine Oxidase-A Inhibition and Associated Antioxidant Activity in Plant Extracts with Potential Antidepressant Actions. *Biomed Res Int*, 2018, 4810394.

Hou J, Liu X, Shen J, Zhao G, Wang PG. The impact of click chemistry in medicinal chemistry. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7, 489–501.

Javeed M, Rasul A, Hussain G, Jabeen F, Rasool B, Riaz A, Kaukab G, Ali M. Harmine and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in human diseases. *Bangladesh J of Pharmacol*, 2018, 13, 203–213.

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.

Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem – Int Ed*, 2001, 40, 2004–2021.

Lauria A, Delisi R, Mingoia F, Terenzi A, Martorana A, Barone G, Almerico AM. 1,2,3-Triazole in Heterocyclic Compounds, Endowed with Biological Activity, through 1,3-Dipolar Cycloadditions: 1,2,3-Triazole Units in Biologically Active Heterocycles. *Eur J Org Chem*, 2014, 3289–3306.

Li Y, Zhao C, Zhang J, Zhai S, Wei B, Wang L. HybridMolDB: A Manually Curated Database Dedicated to Hybrid Molecules for Chemical Biology and Drug Discovery. *J Chem Inf Model*, 2019, 59, 4063–4069.

Ma Y, Wink M. The beta-carboline alkaloid harmine inhibits BCRP and can reverse resistance to the anticancer drugs mitoxantrone and camptothecin in breast cancer cells. *Phytother Res*, 2010, 24, 146–149.

Malaria, 2021., <https://www.who.int/>, pristupljeno 12.3.2021.

Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, Asghari M, Shayegh J. Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. *Phcog Rev*, 2013, 7, 199.

Pathak A, Rohilla A, Gupta T, Akhtar MJ, Haider MR, Sharma K, Haider K, Yar MS. DYRK1A kinase inhibition with emphasis on neurodegeneration: A comprehensive evolution story-cum-perspective. *Eur J Med Chem*, 2018, 158, 559–592.

Perković I, Raić-Malić S, Fontinha D, Prudêncio M, Pessanha de Carvalho L, Held J, Tandarić T, Vianello R, Zorc B, Rajić Z. Harmicines – harmine and cinnamic acid hybrids as novel antiplasmodial hits. *Eur J Med Chem*, 2019, 187, 111927.

Ramapanicker R, Chauhan P. Click Chemistry: Mechanistic and Synthetic Perspectives. U: Chandrasekaran, S. (Ed.), Click Reactions in Organic Synthesis. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Njemačka, 2016, str. 1–24.

Rečnik LM, Kandioller W, Mindt TL. 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles as Amide Bond Surrogates for the Stabilisation of Linear Peptides with Biological Activity. *Molecules*, 2020, 25.

Ruwizhi N, Aderibigbe BA. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. *Inter J Mol Sci*, 2020, 21, 5712.

Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18, 345–360.

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.

Sharma P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities, 2011, 21.

Silva AT, Bento CM, Pena AC, Figueiredo LM, Prudêncio C, Aguiar L, Silva T, Ferraz R, Gomes MS, Teixeira C, Gomes P. Cinnamic Acid Conjugates in the Rescuing and Repurposing of Classical Antimalarial Drugs. *Molecules*, 2019, 25, 66.

Song Y, Kesuma D, Wang J, Deng Y, Duan J, Wang JH, Qi RZ. Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317, 128–132.

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.

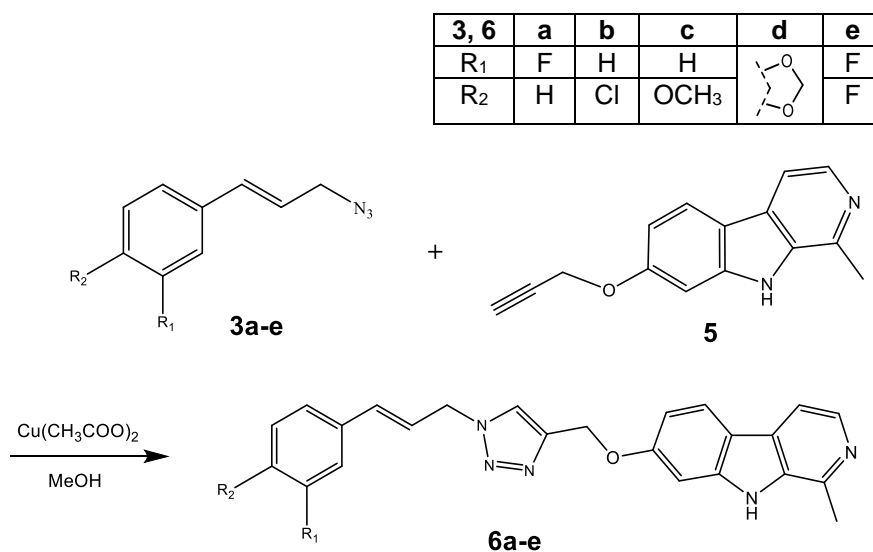
Wade, L. G. *Organska kemija*, Zagreb, Školska knjiga, 2017, str. 497.



## **7. SAŽETAK/ SUMMARY**

## Sinteza i karakterizacija *O*-harmicina triazolskog tipa u položaju 7 $\beta$ -karbolinskog prstena

Harmin i derivati cimetine kiseline su prirodni produkti koji pokazuju širok spektar bioloških djelovanja, među kojima su antimalarijsko i citostatsko djelovanje. Njihovim kovalentnim povezivanjem u hibridne spojeve, harmicine, nastoji se postići poboljšano djelovanje, smanjenje neželjenih učinaka i interakcija te smanjenje rezistencije na postojeću farmakoterapiju. U okviru ovog diplomskog rada sintetizirani su *O*-harmicini triazolskog tipa, **6a-e**, korištenjem Cu (I) katalizirane alkin-azid cikloadicije. Usto, sintetizirani su i polazni spojevi, azidi derivata cimetine kiseline **3a-e** i alkin **5**. *O*-harmicini **6a-e** su karakterizirani uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (talište, IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, MS). U daljnjim istraživanjima sintetiziranim spojevima će biti ispitano citostatsko djelovanje na nizu tumorskih staničnih linija.

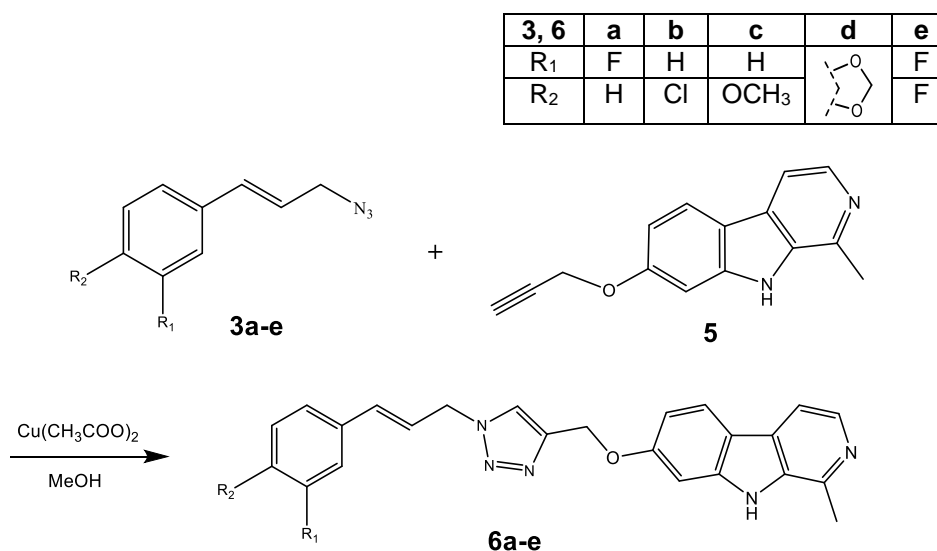


Shema. Sinteza *O*-harmicina **6a-e**.

Ključne riječi: harmin, cimena kiselina, triazol, *O*-harmicini, sinteza

## Synthesis and characterization of triazole type *O*-harmicines at the position 7 of the $\beta$ -carboline ring

Harmine and cinnamic acid derivatives are natural products with a broad spectrum of biological activities, which includes antimalarial and cytotoxic effects. By their covalent binding to hybrid molecules, harmicines, improved action, reduction of side effects, drug interactions and resistance to existing pharmacotherapy might be achieved. In this thesis, *O*-harmicines of the triazole type **6a-e** were synthesised using the Cu (I)-catalyzed dipolar alkyne-azide cycloaddition. Starting compounds, cinnamyl azides **3a-e** and alkyne **5** were synthesized as well. Structures of *O*-harmicines were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (melting point, IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, MS). Further studies will focus on the evaluation of their cytotoxic activity against several cancer cell lines.



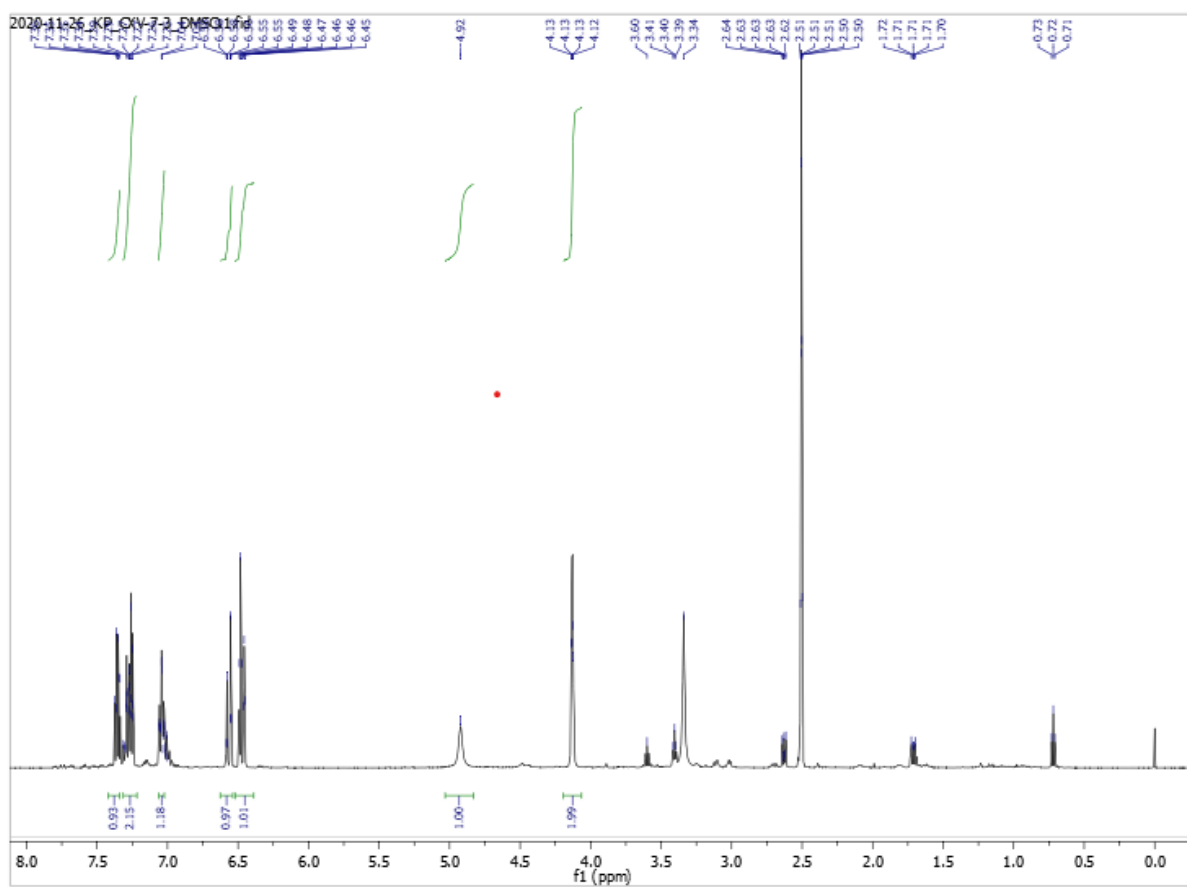
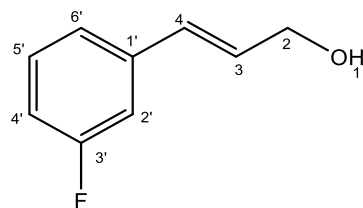
Scheme. Synthesis of *O*-harmicines **6a-e**.

Keywords: harmine, cinnamic acid, triazole, *O*-harmicines, synthesis

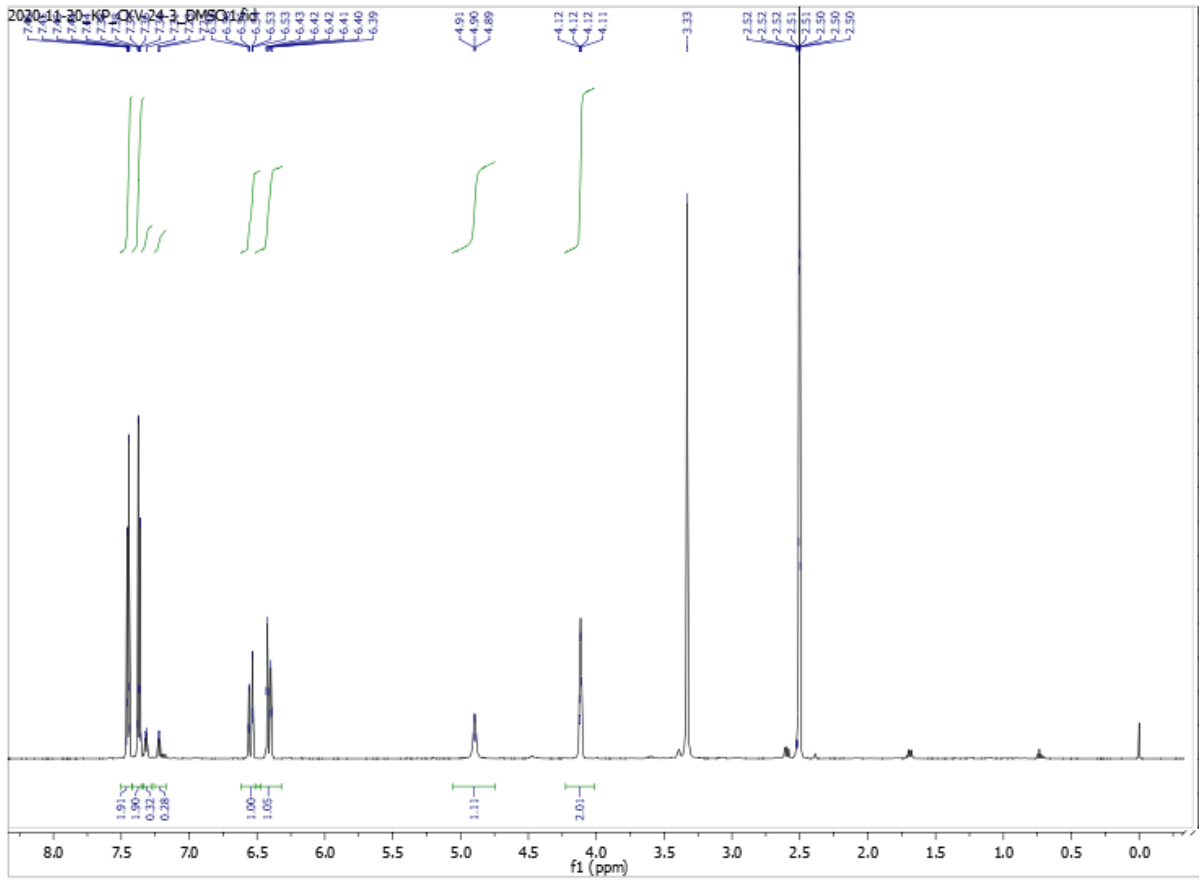
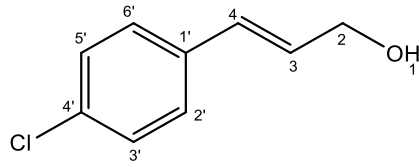
## **8. PRILOZI**

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

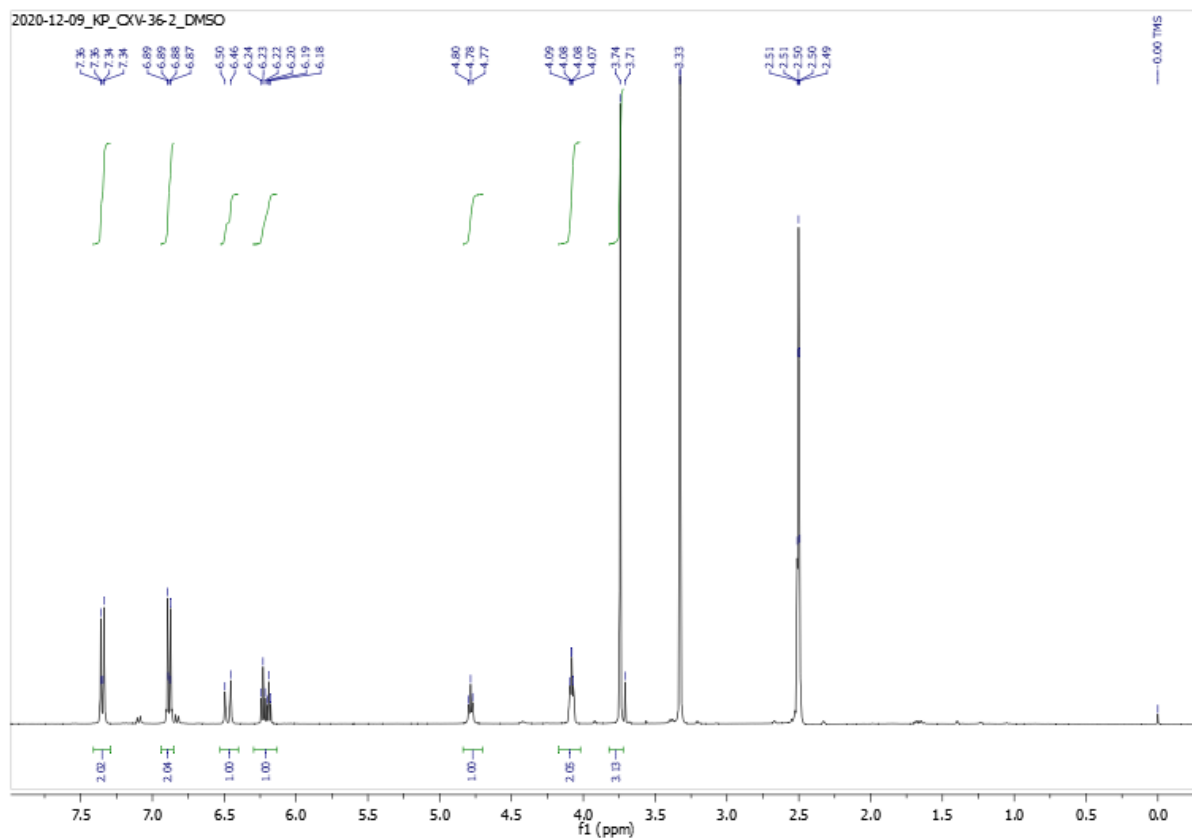
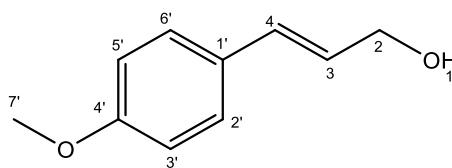
**2a**



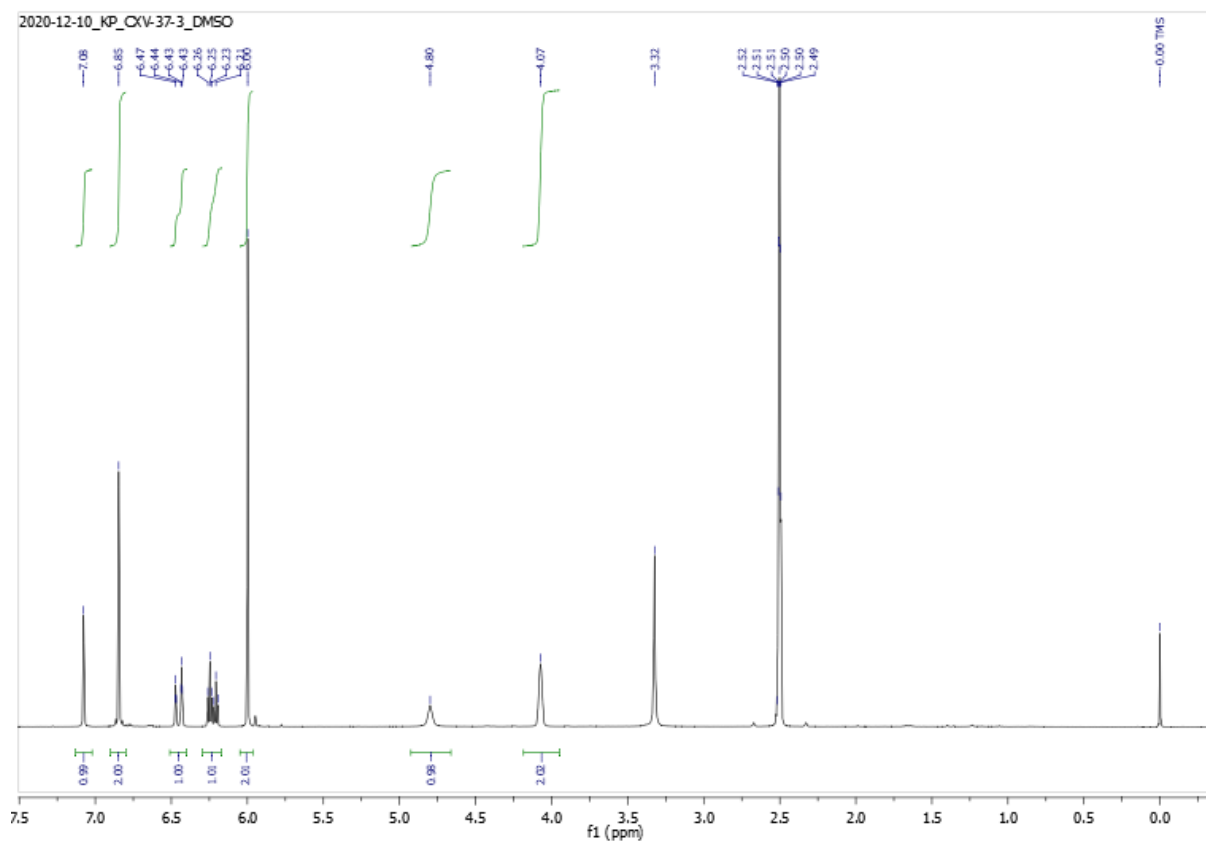
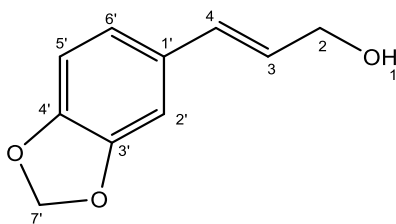
2b



2c

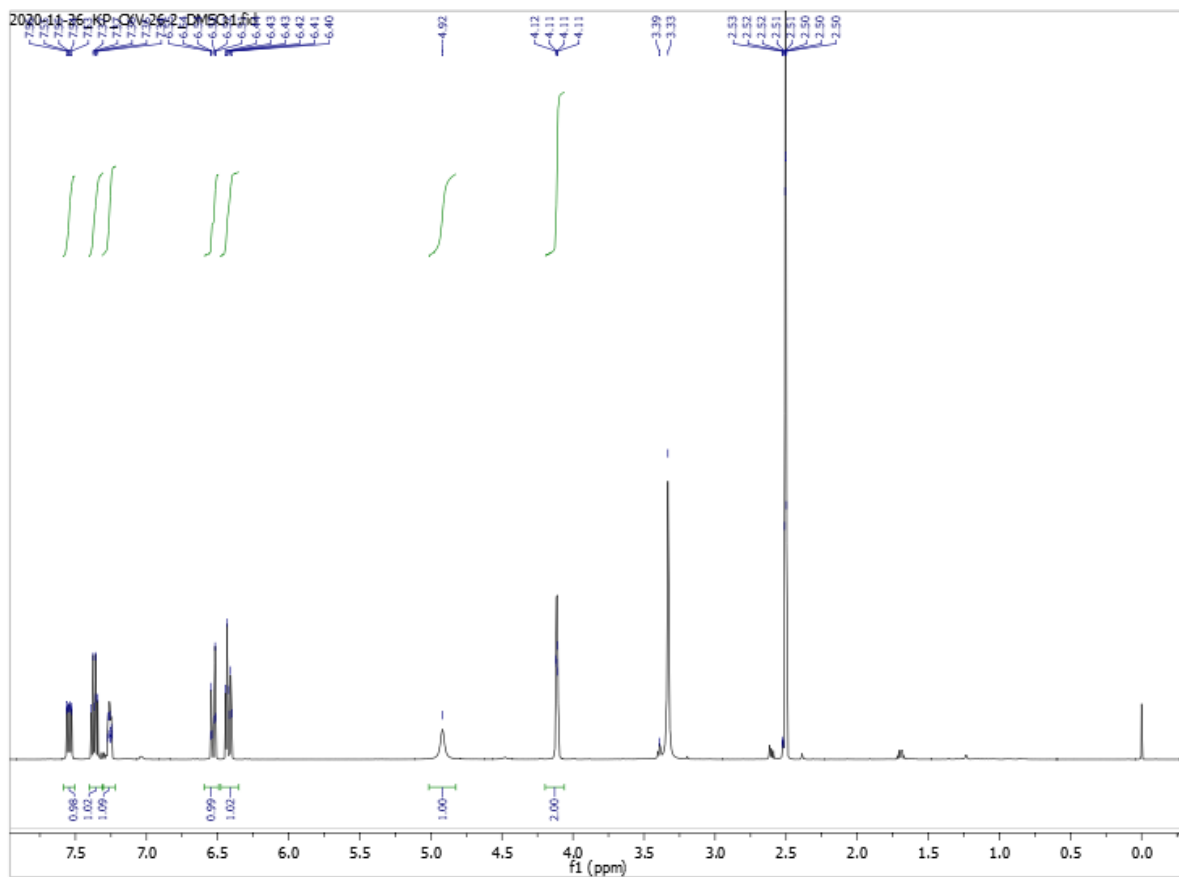
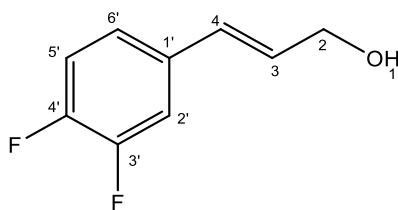


**2d**

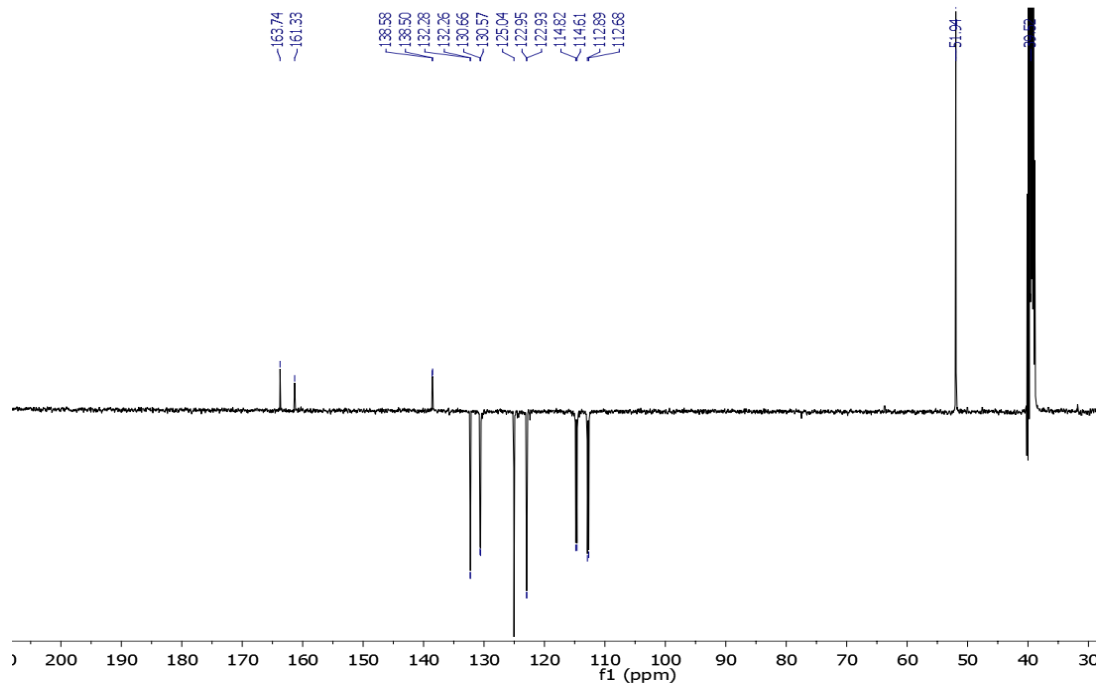
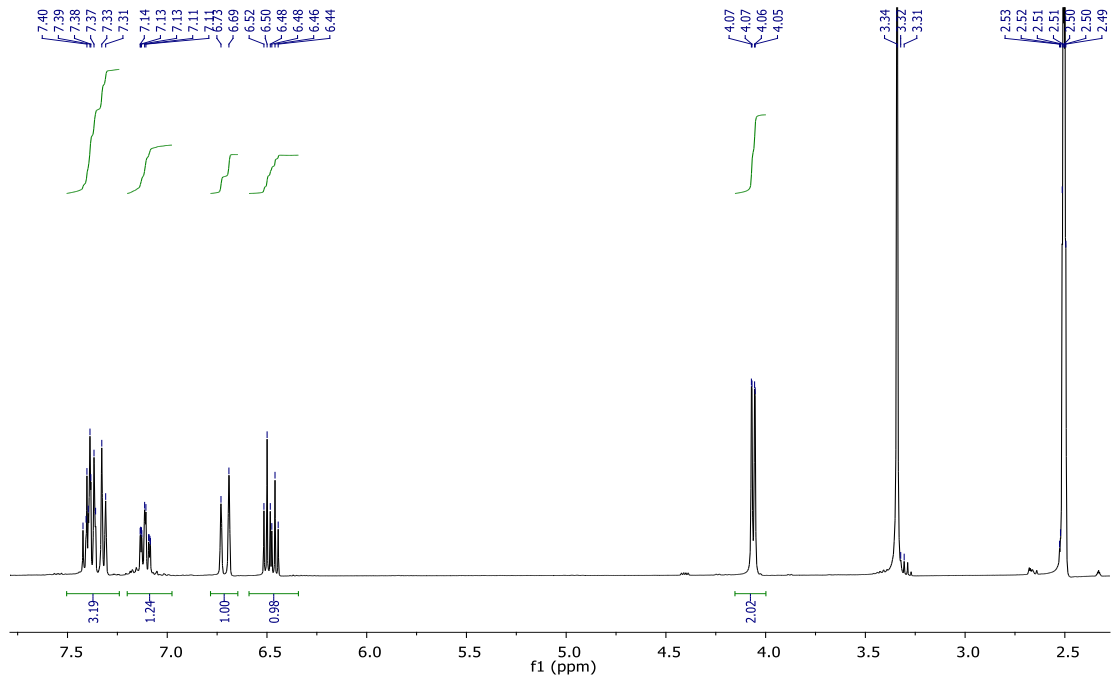
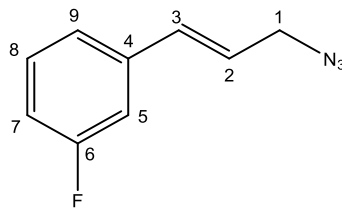




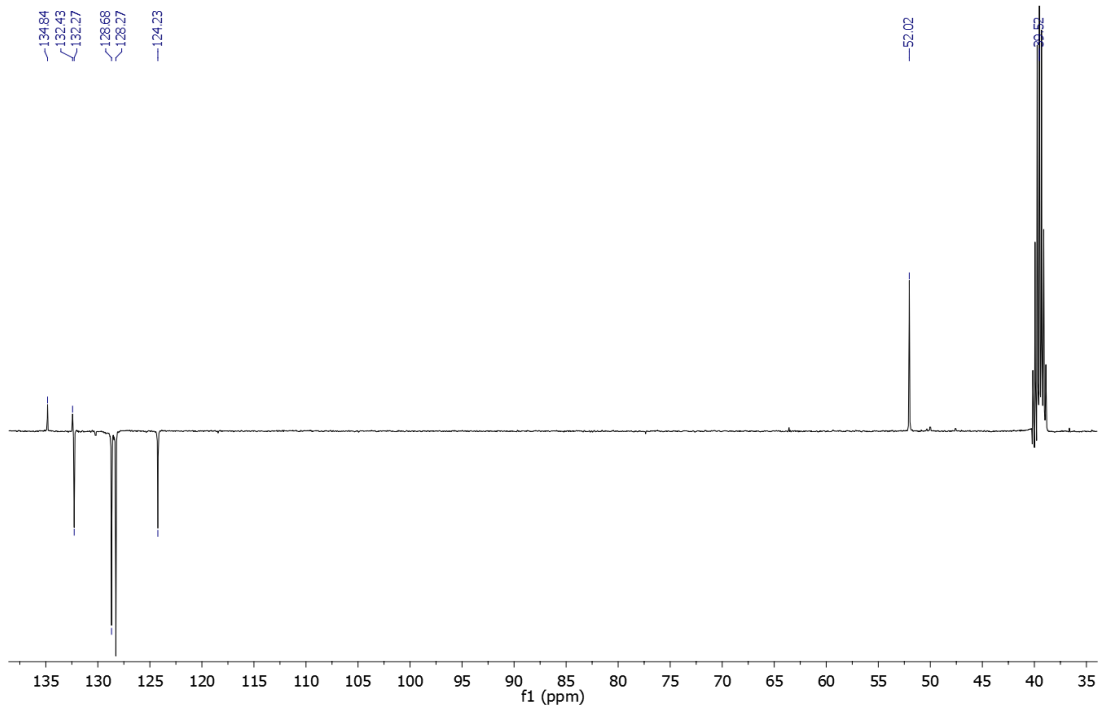
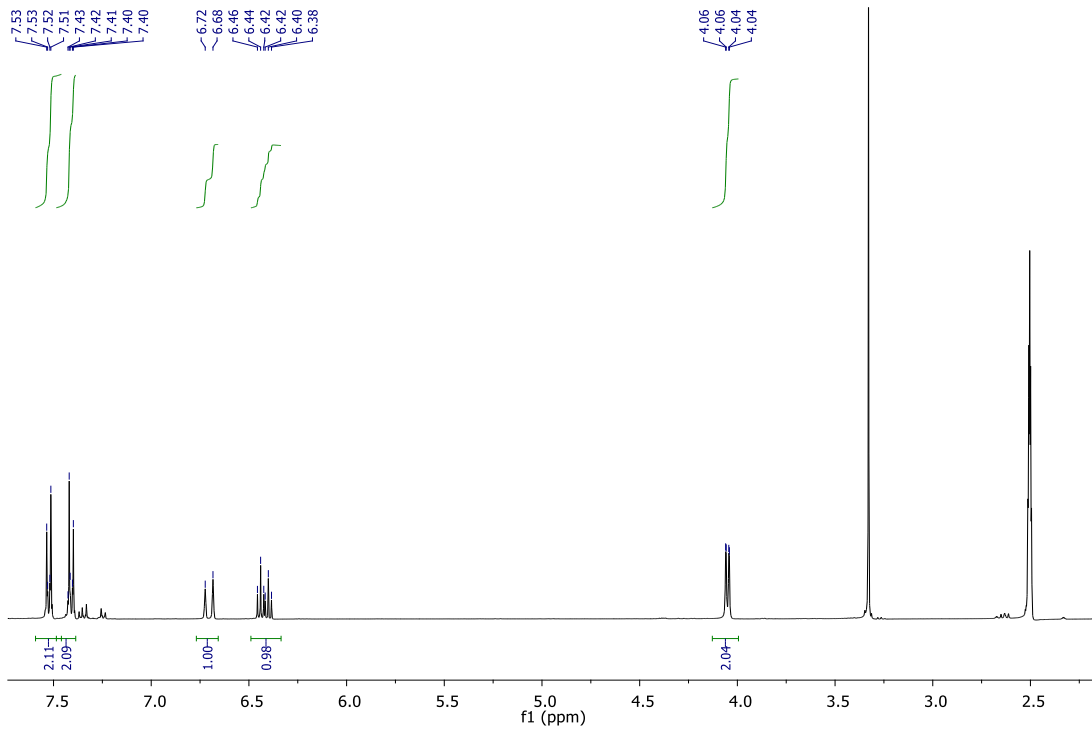
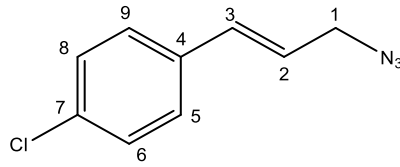
2e



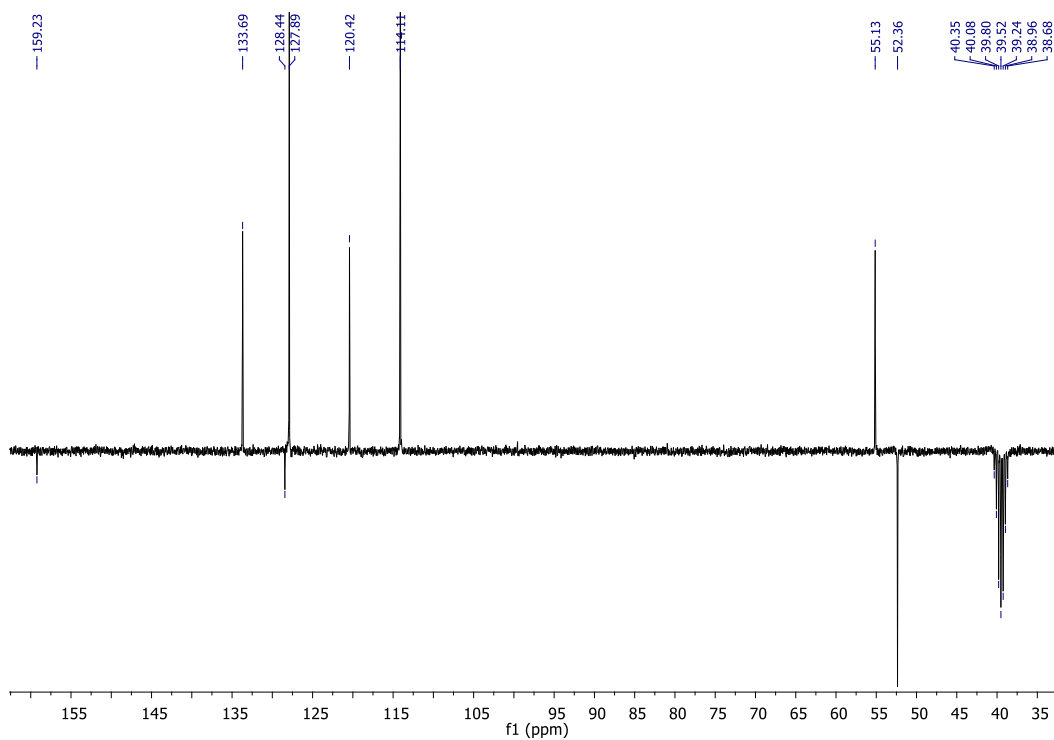
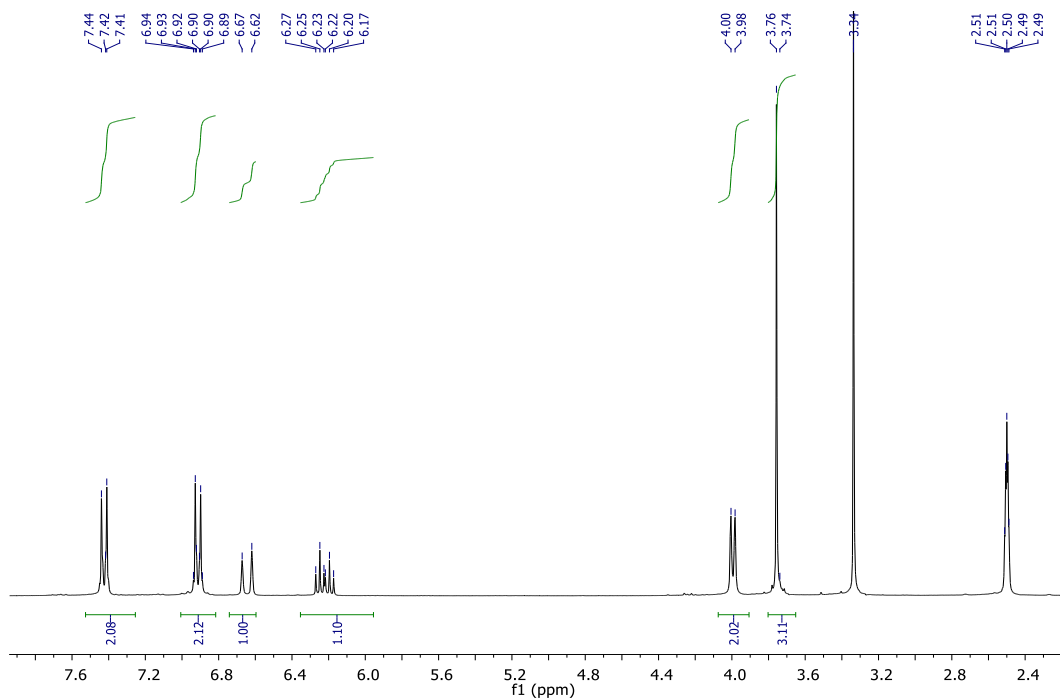
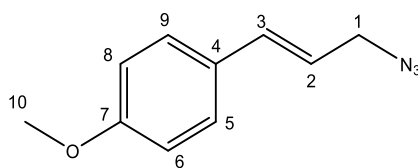
### 3a



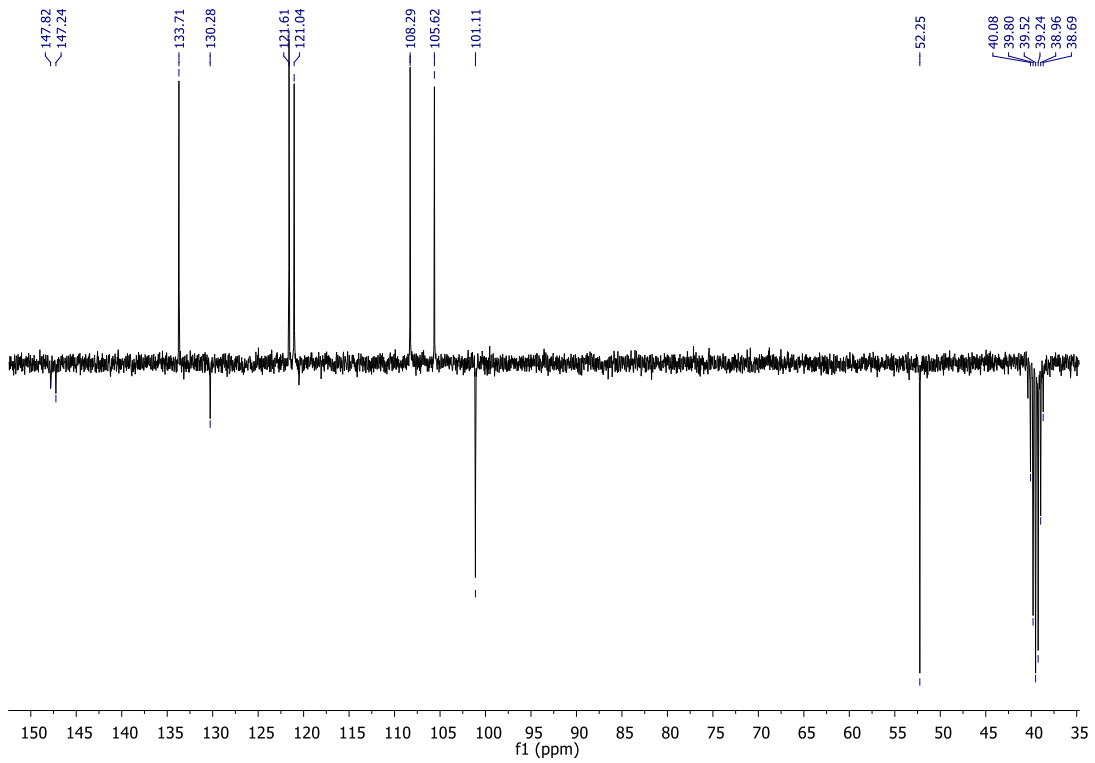
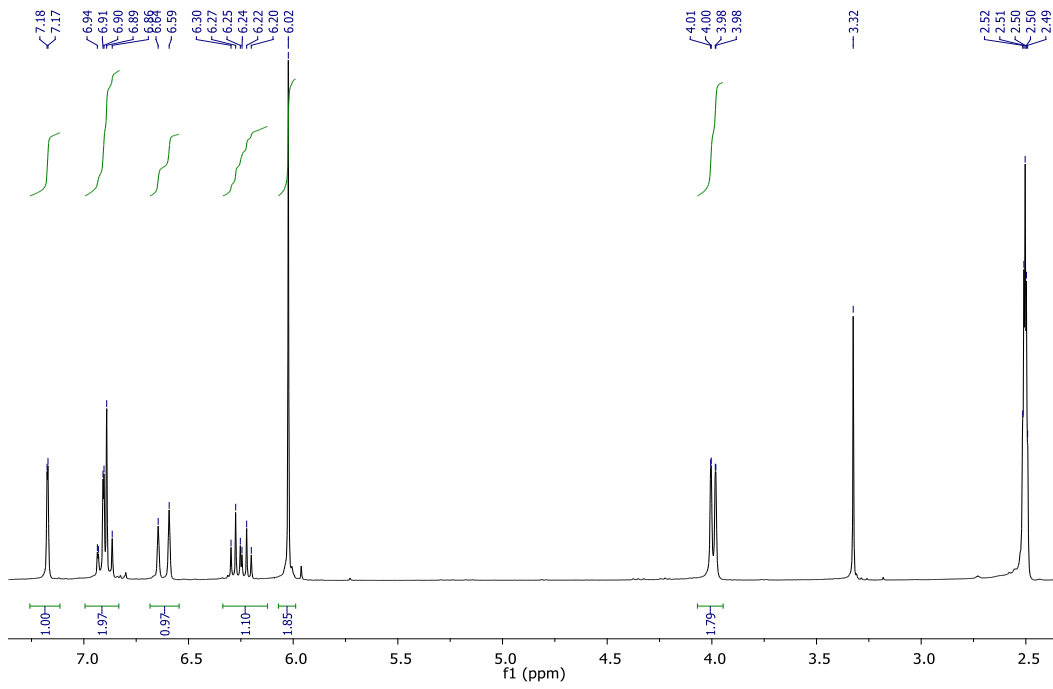
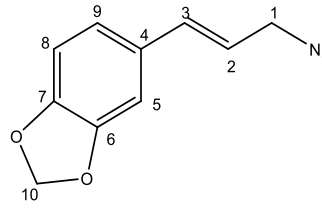
### 3b



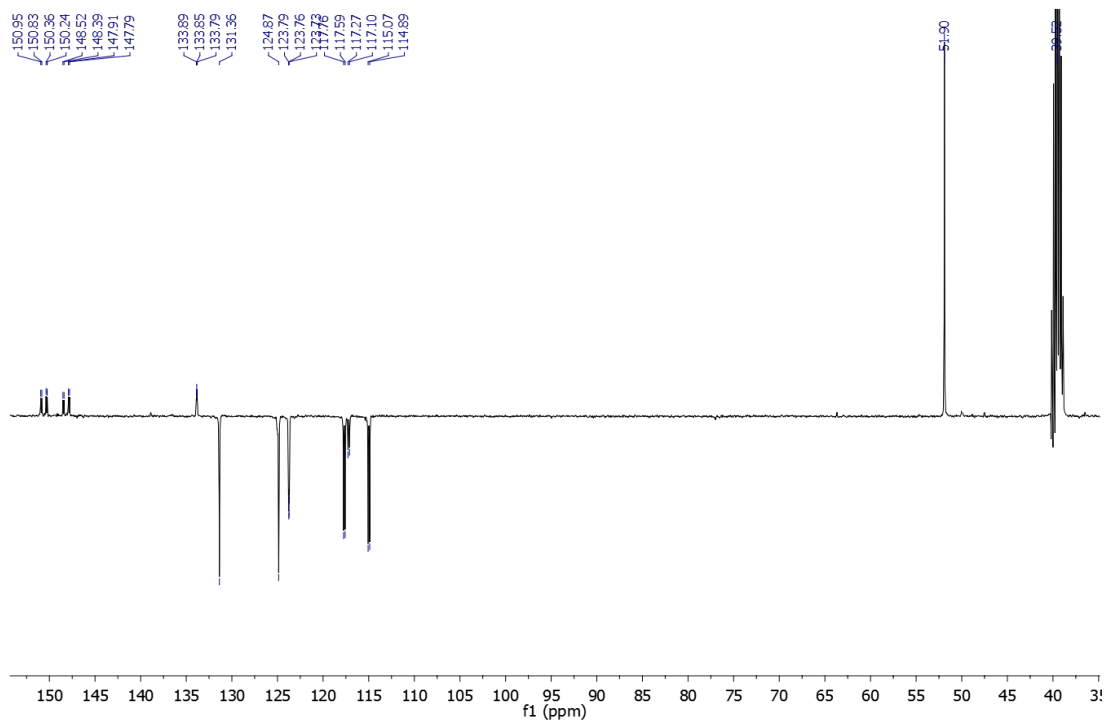
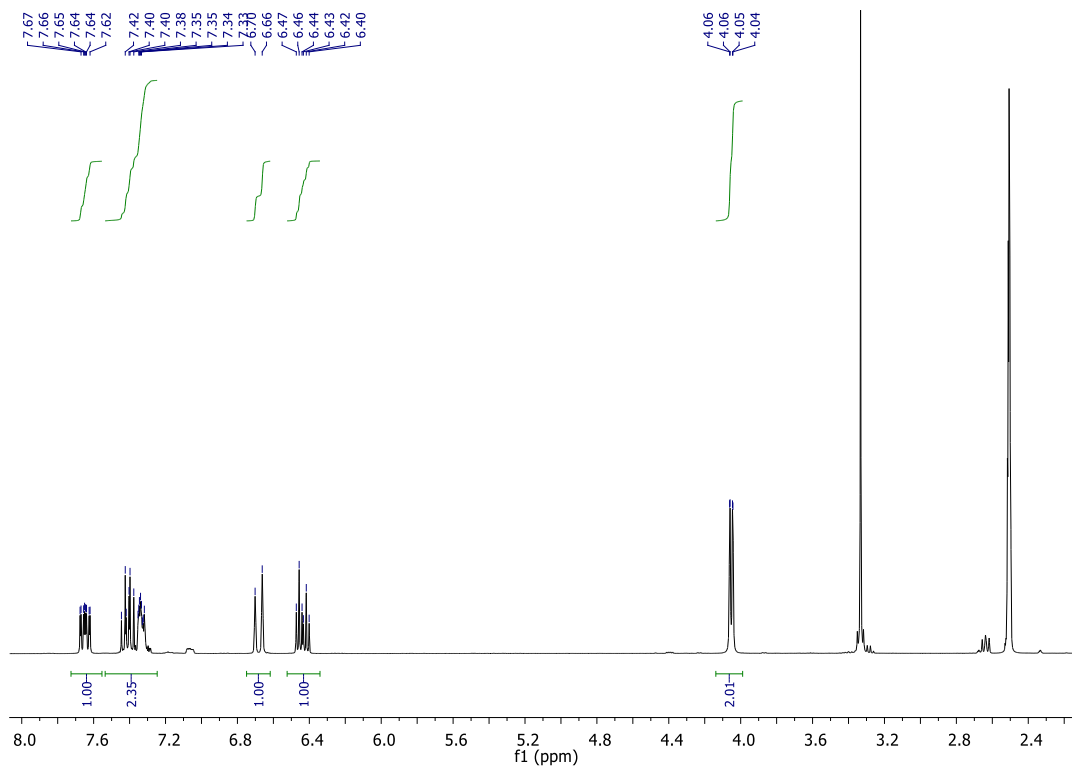
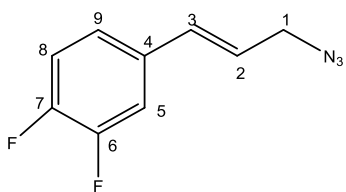
### 3c



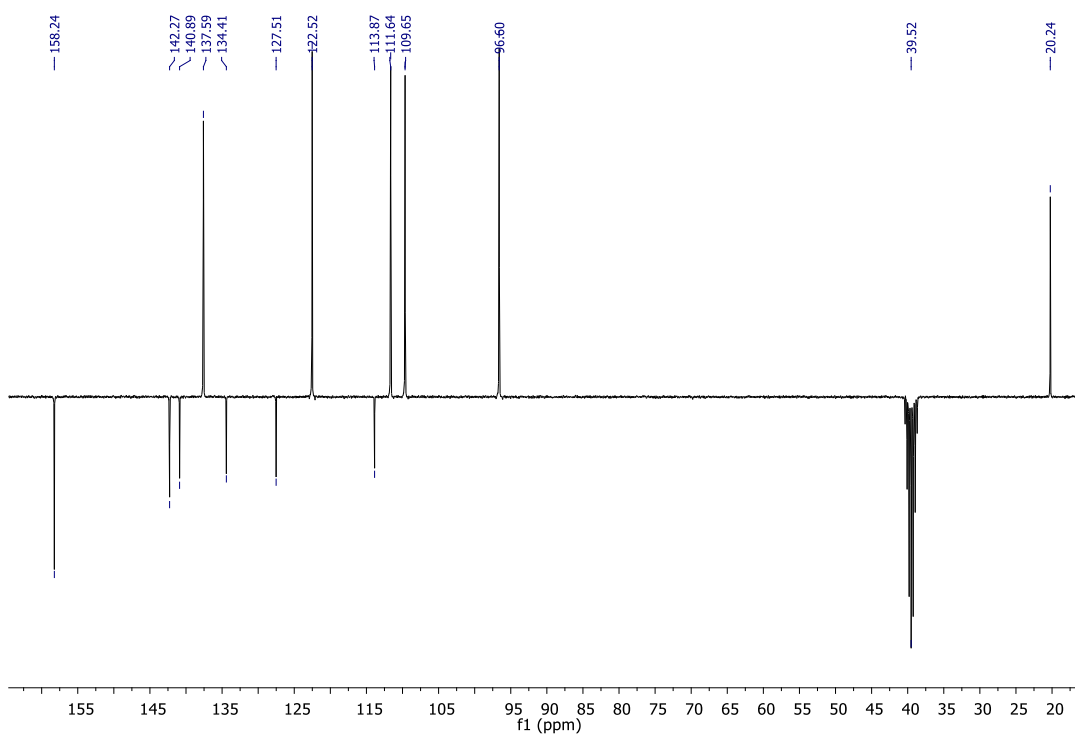
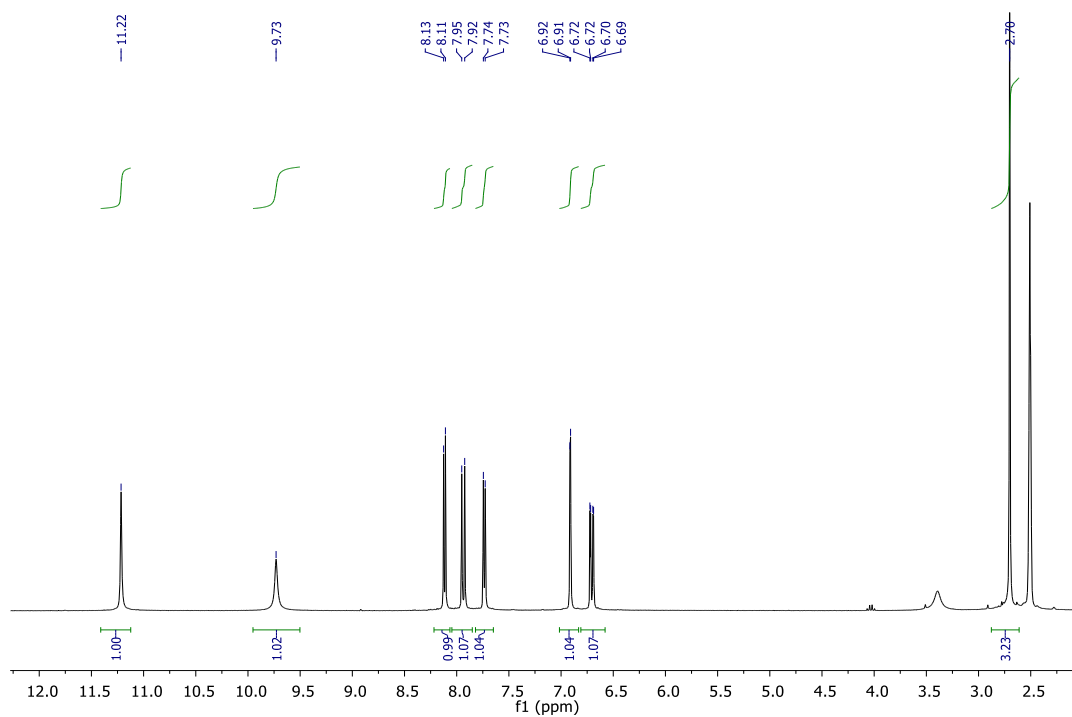
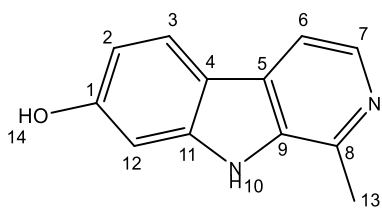
### 3d



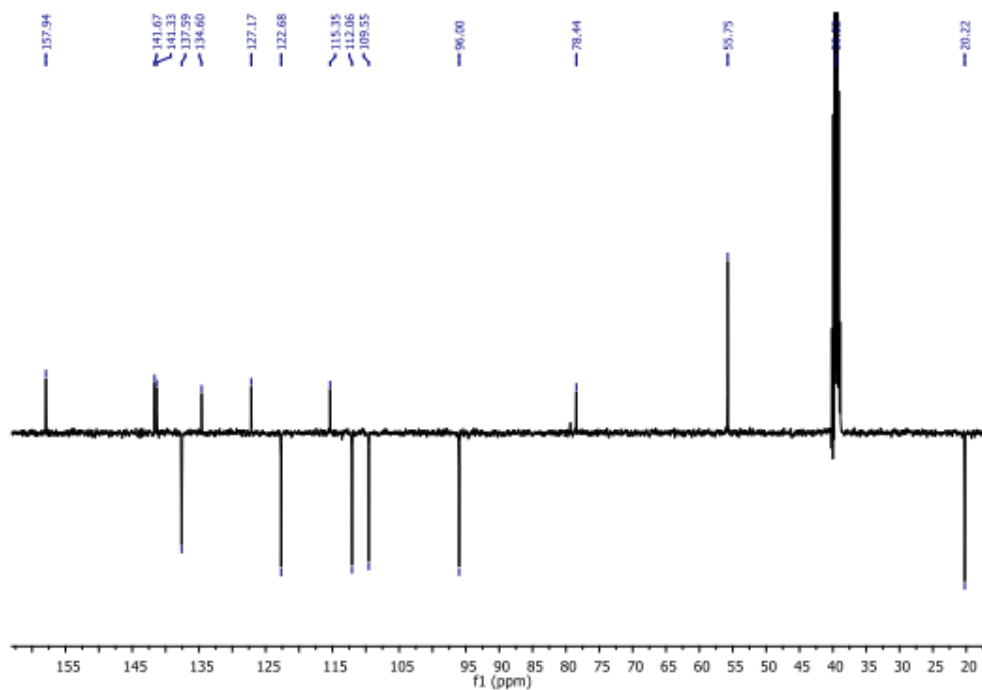
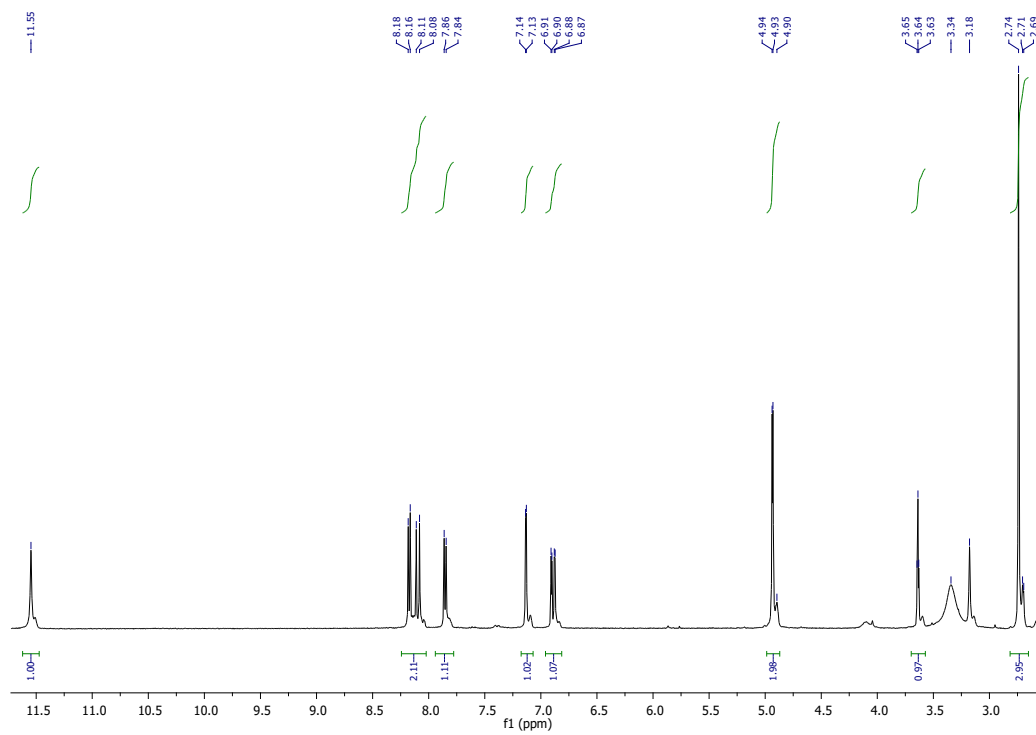
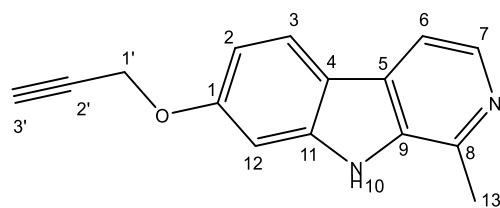
3e



4

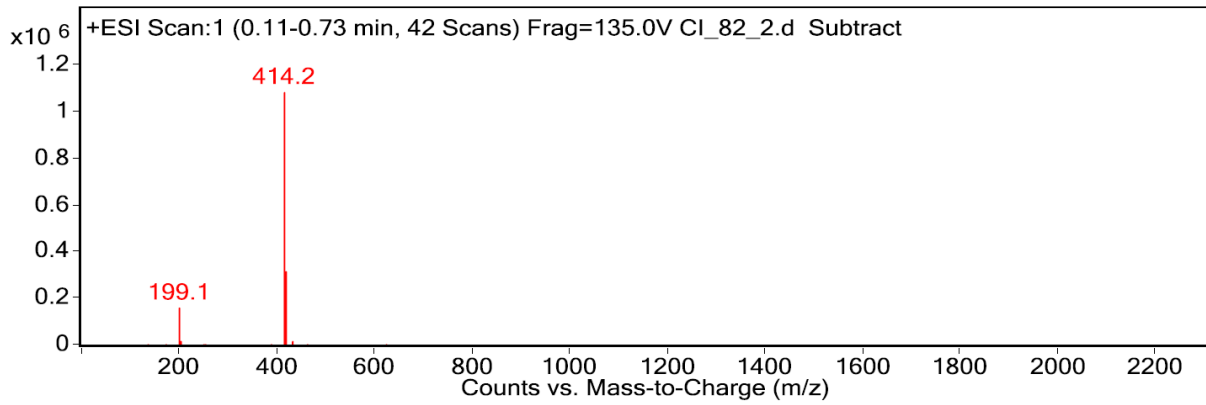
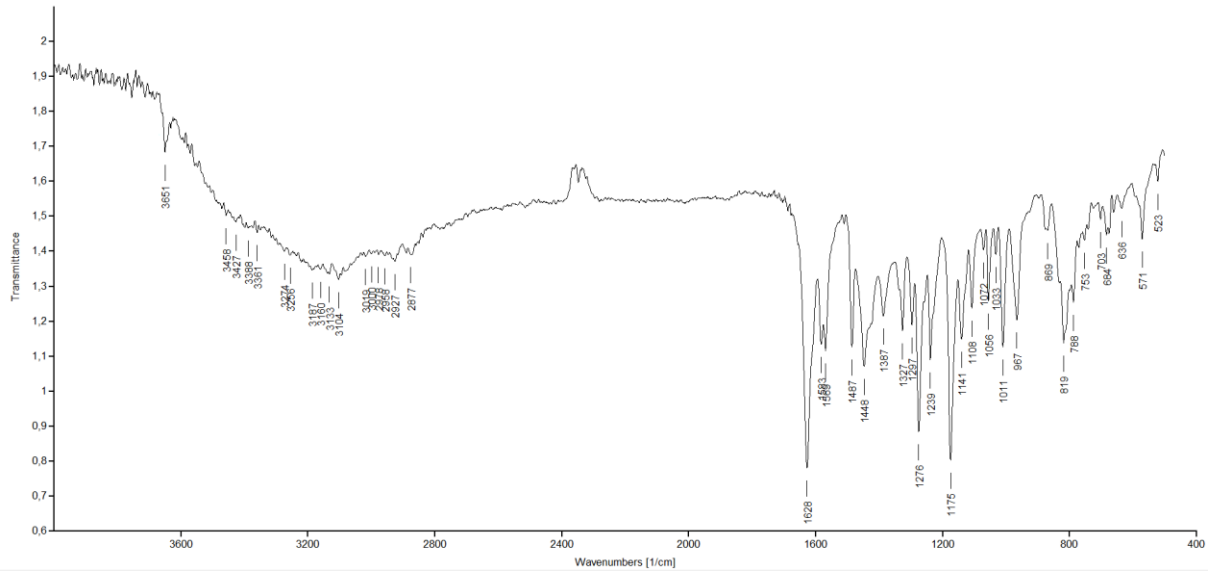
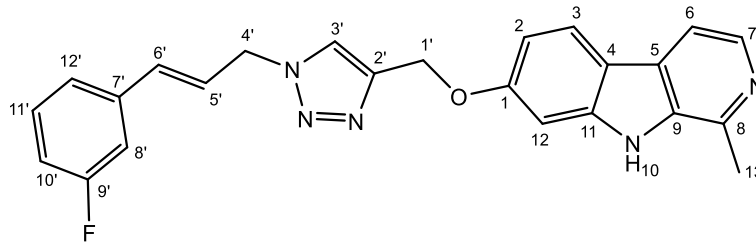


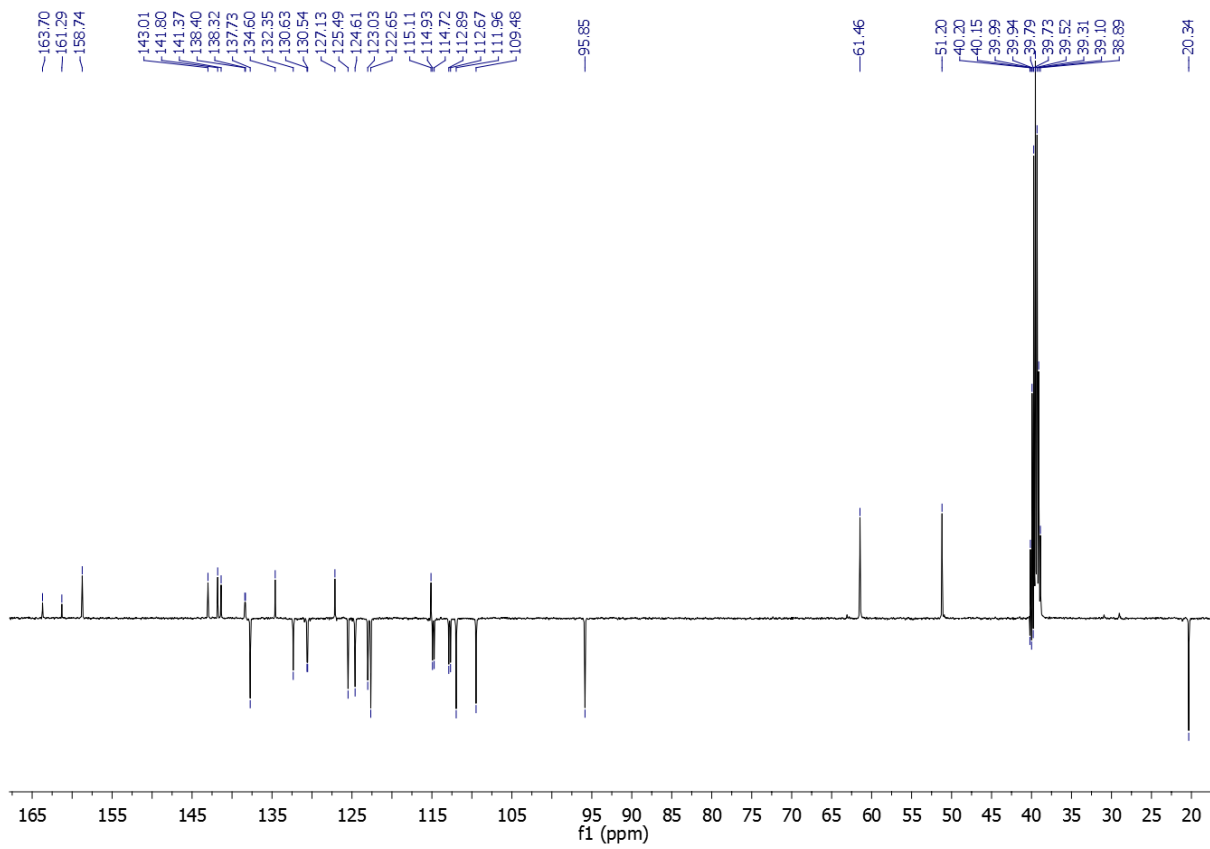
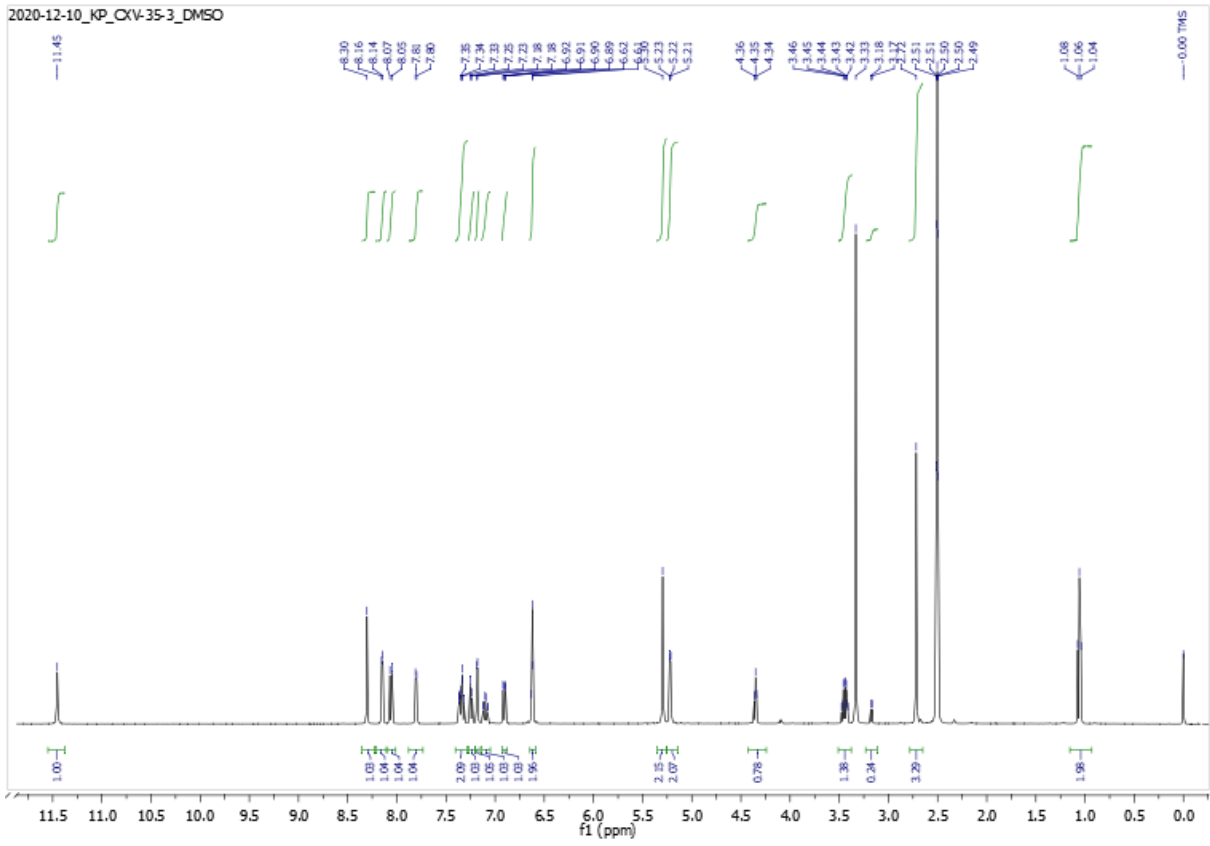
5



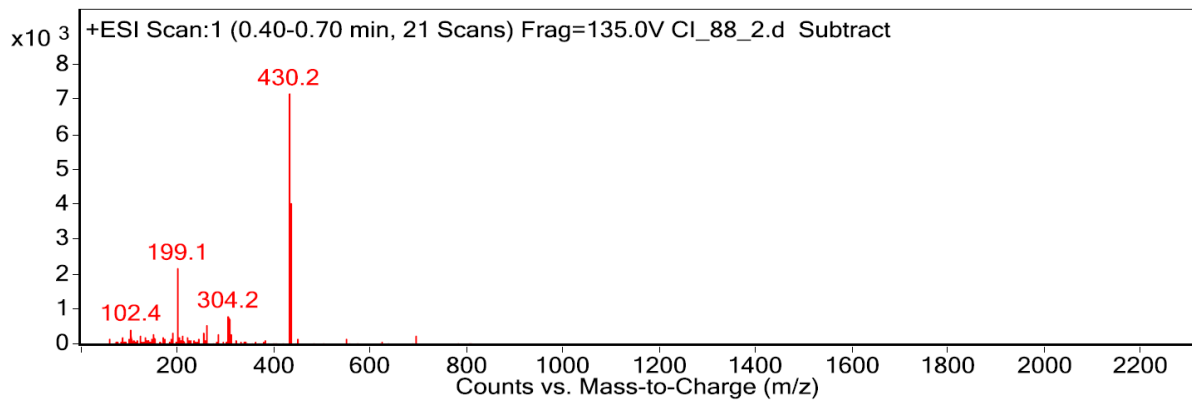
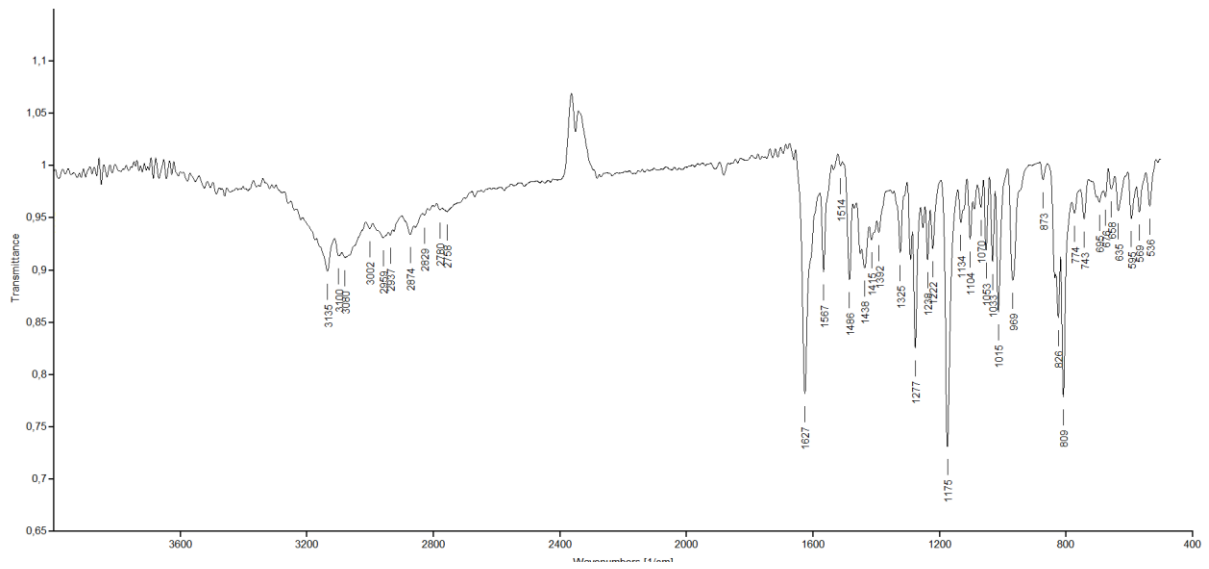
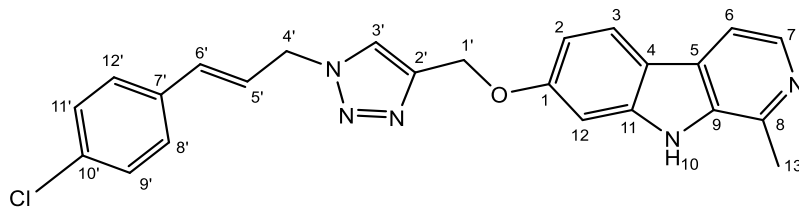


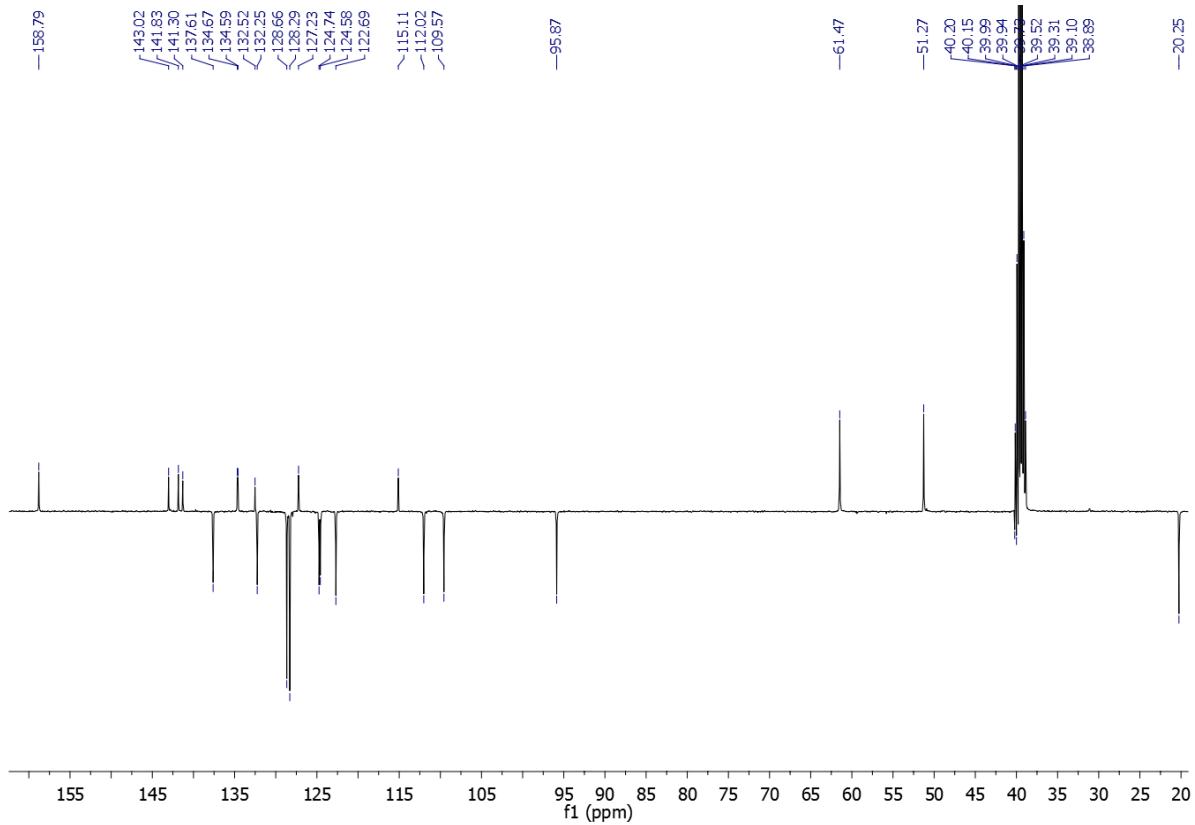
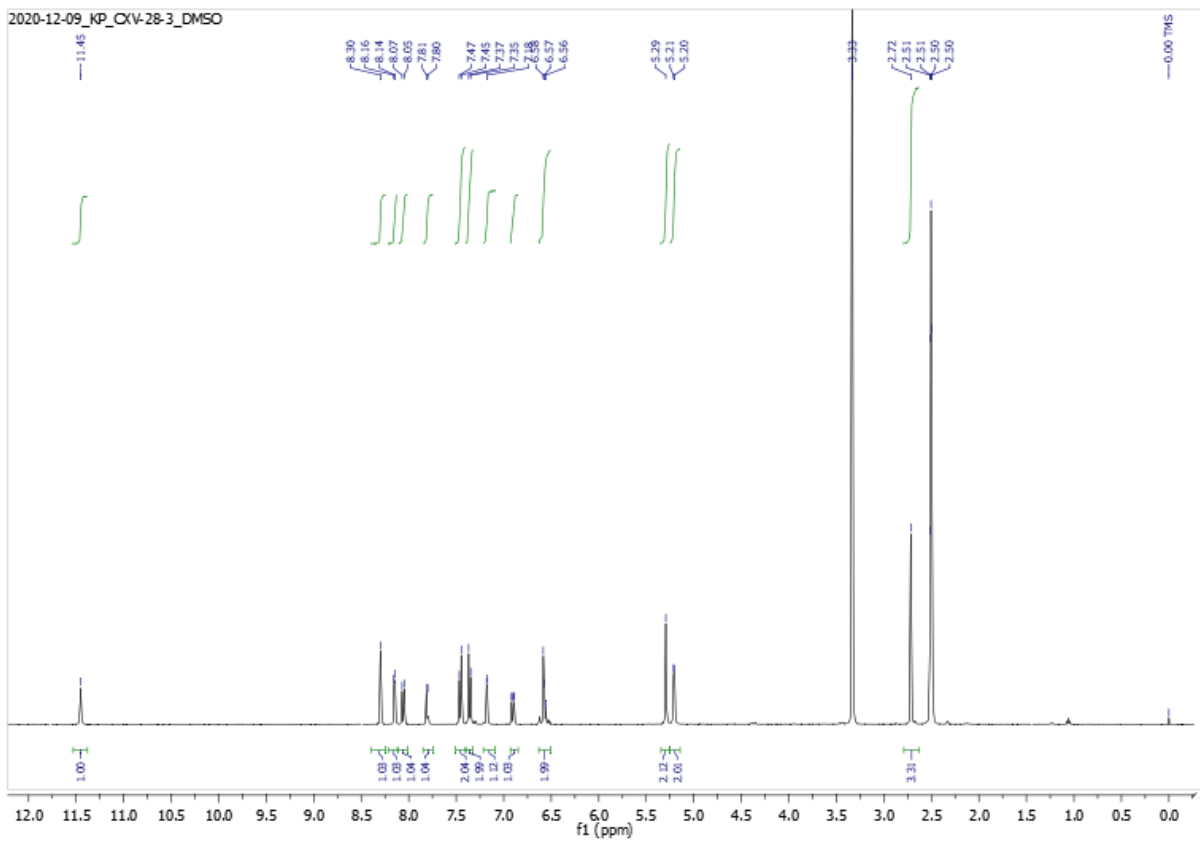
**6a**



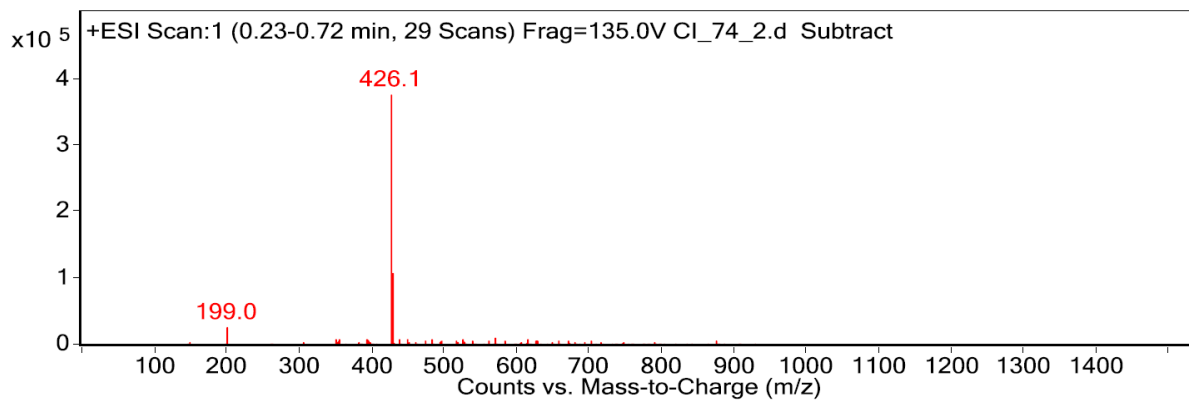
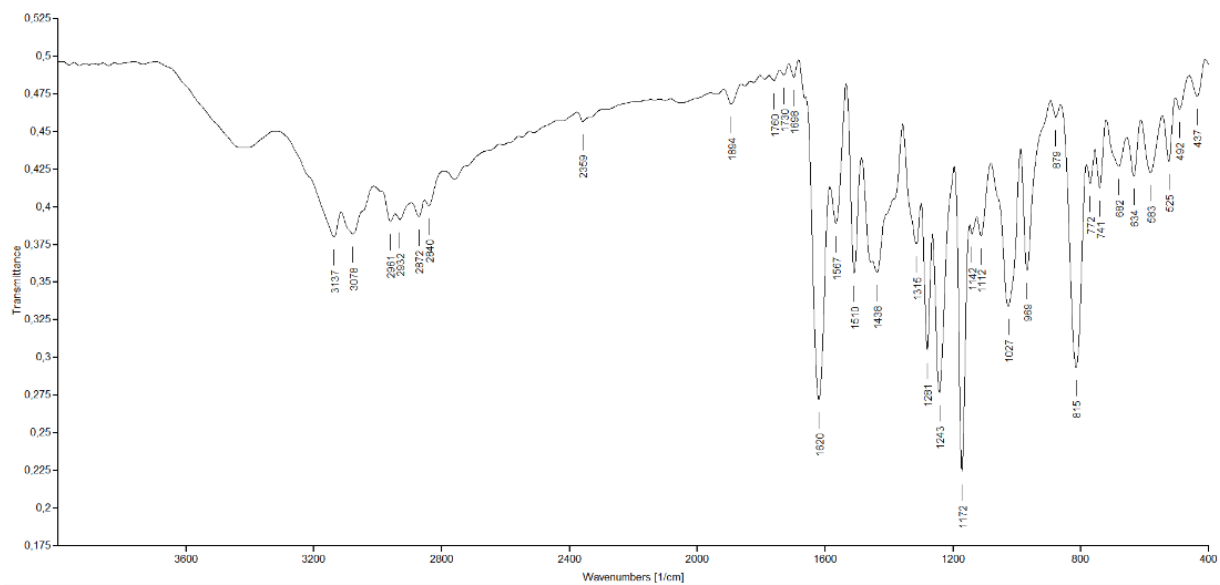
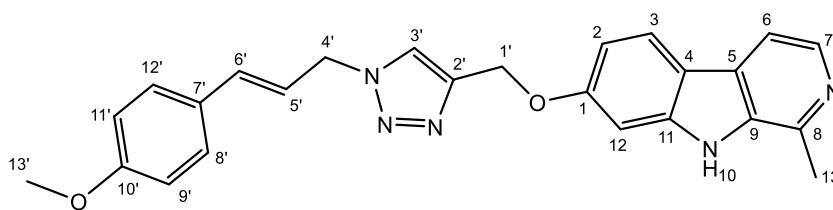


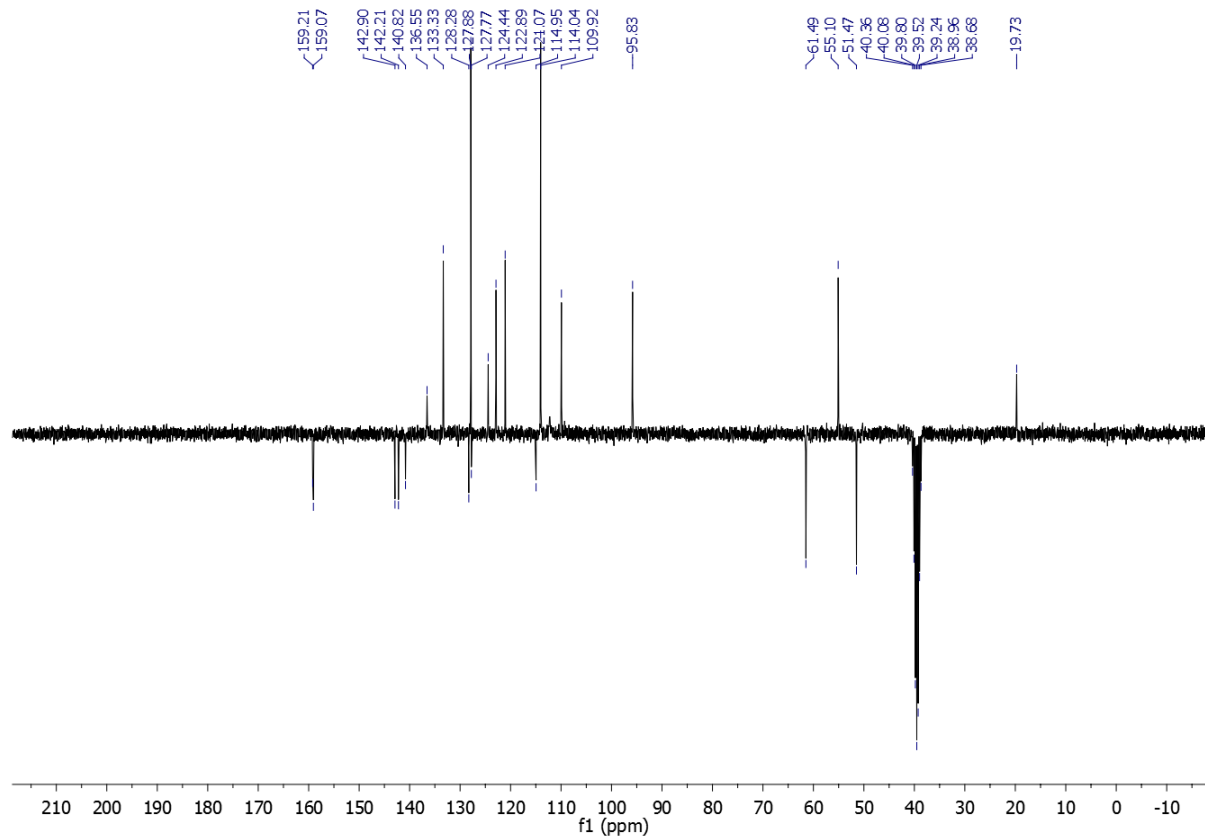
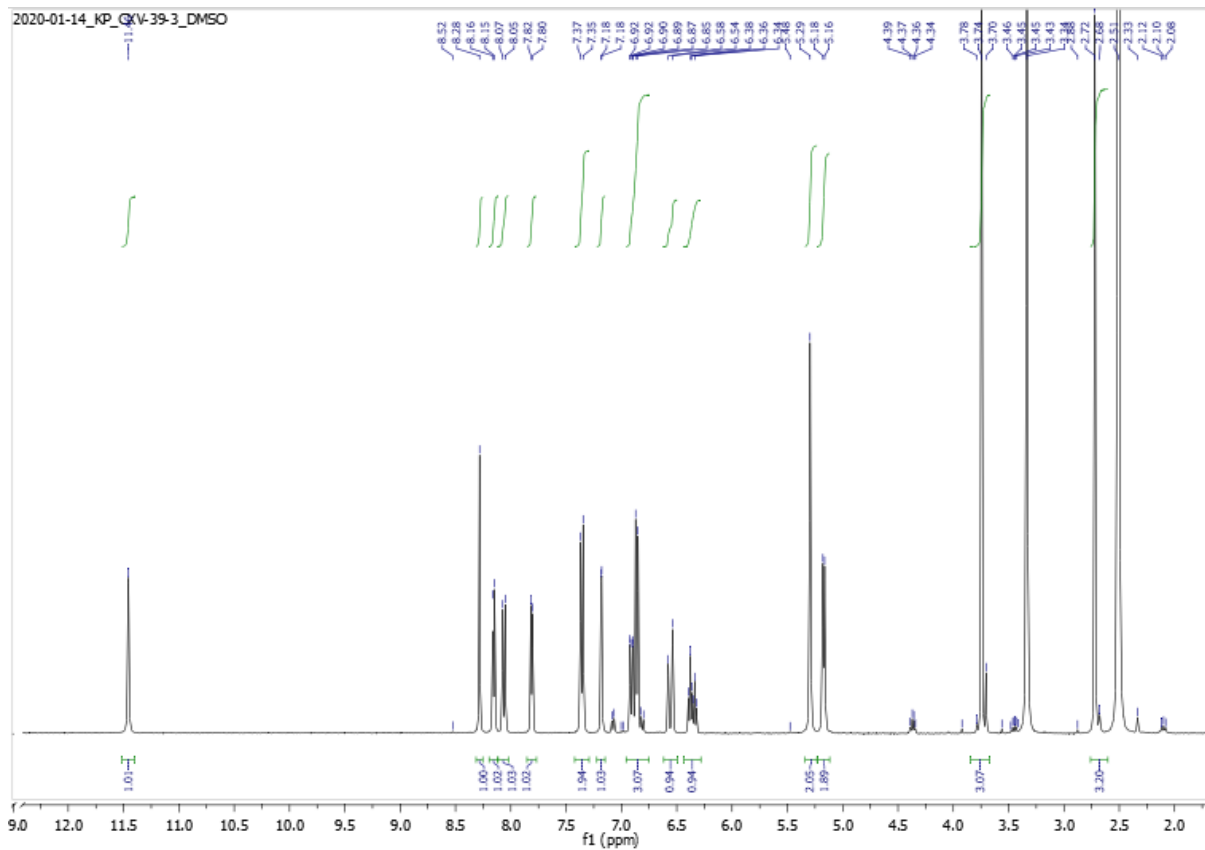
# 6b



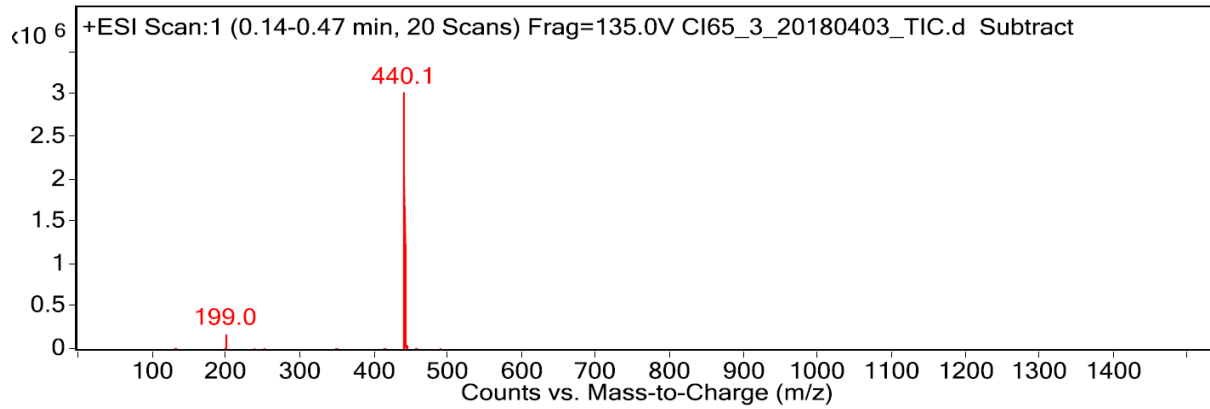
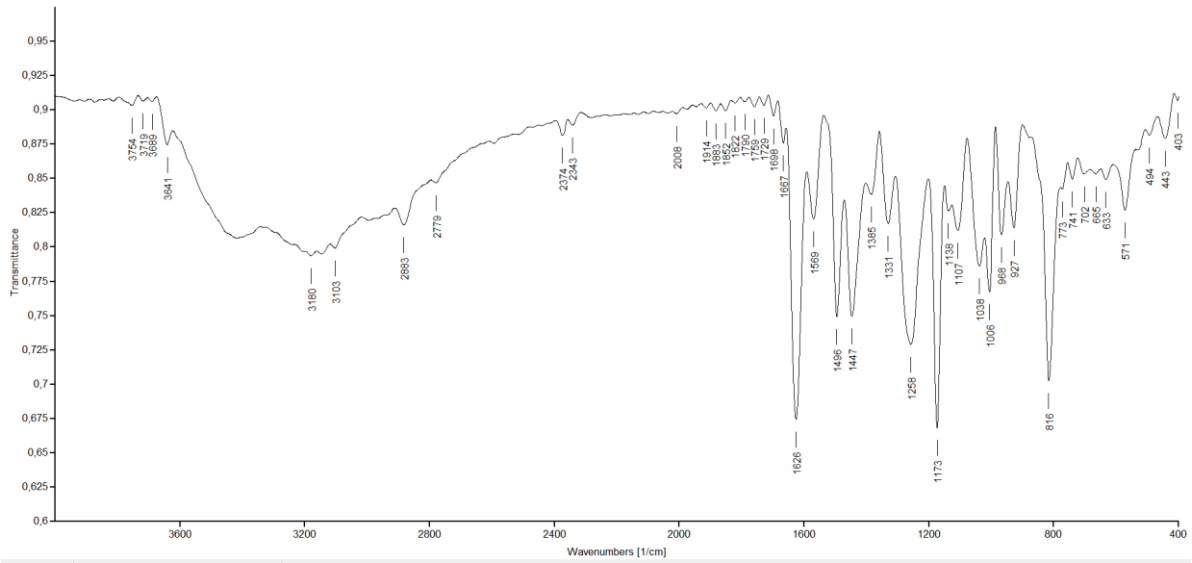
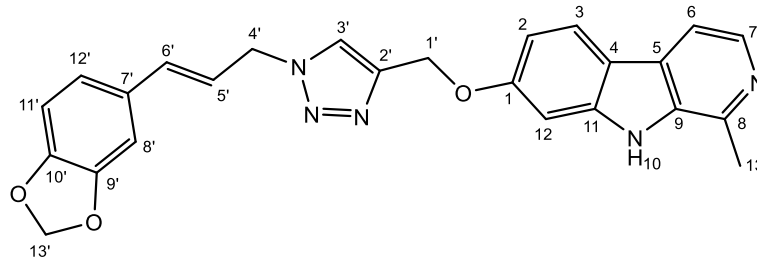


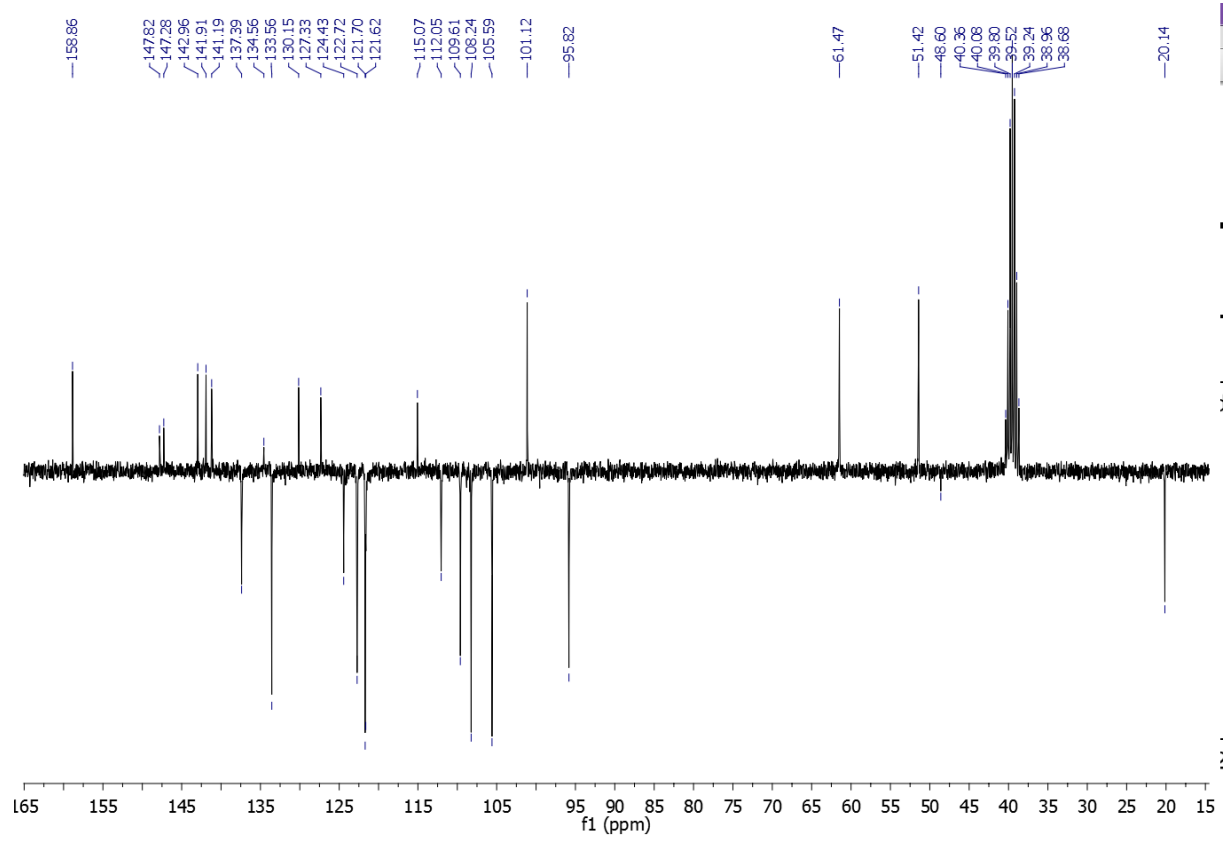
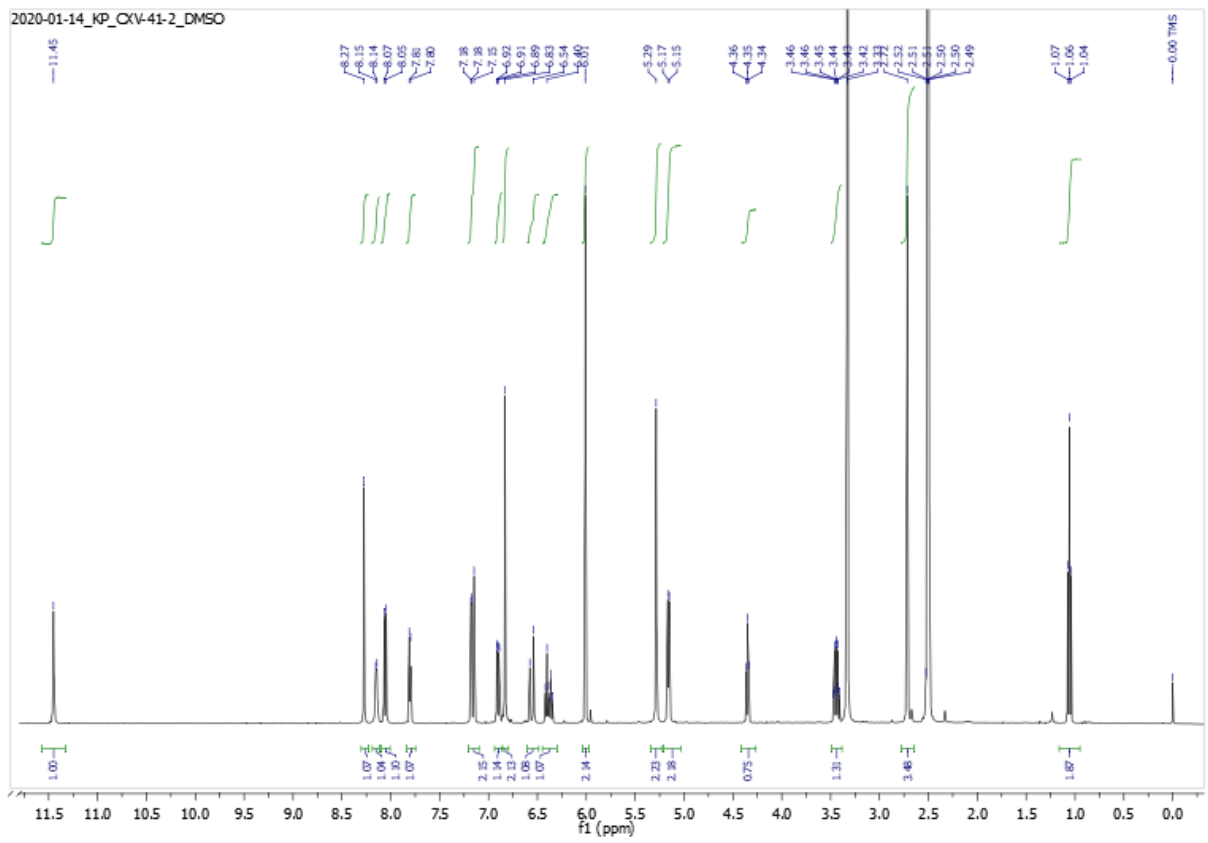
### 6c





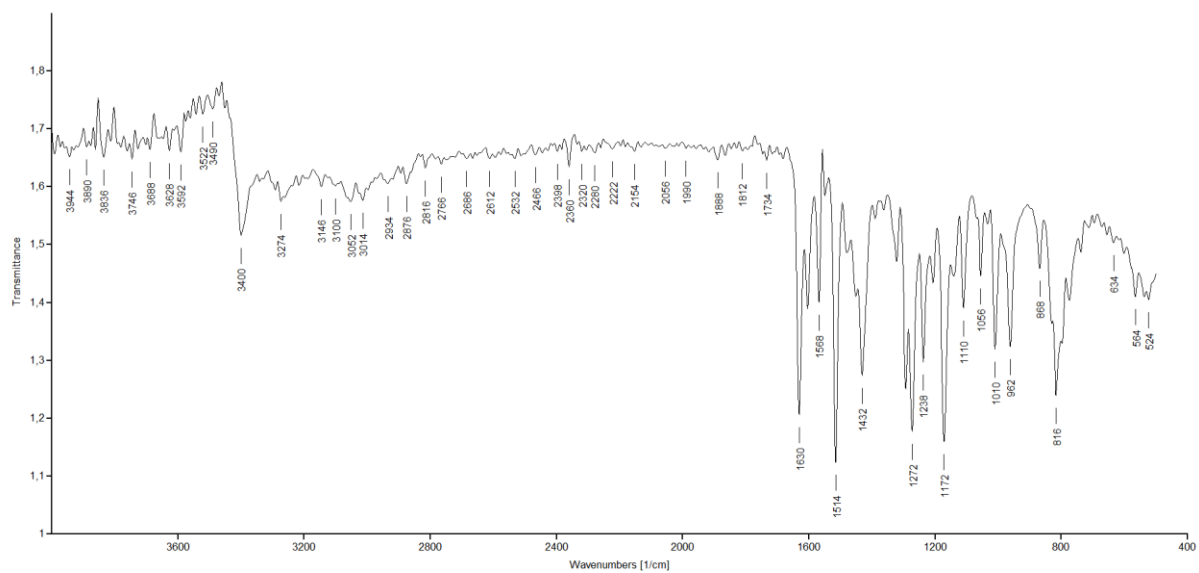
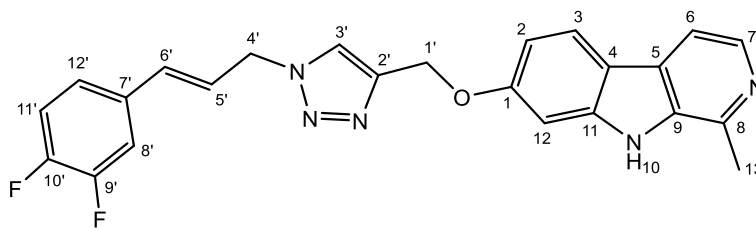
# 6d







6e



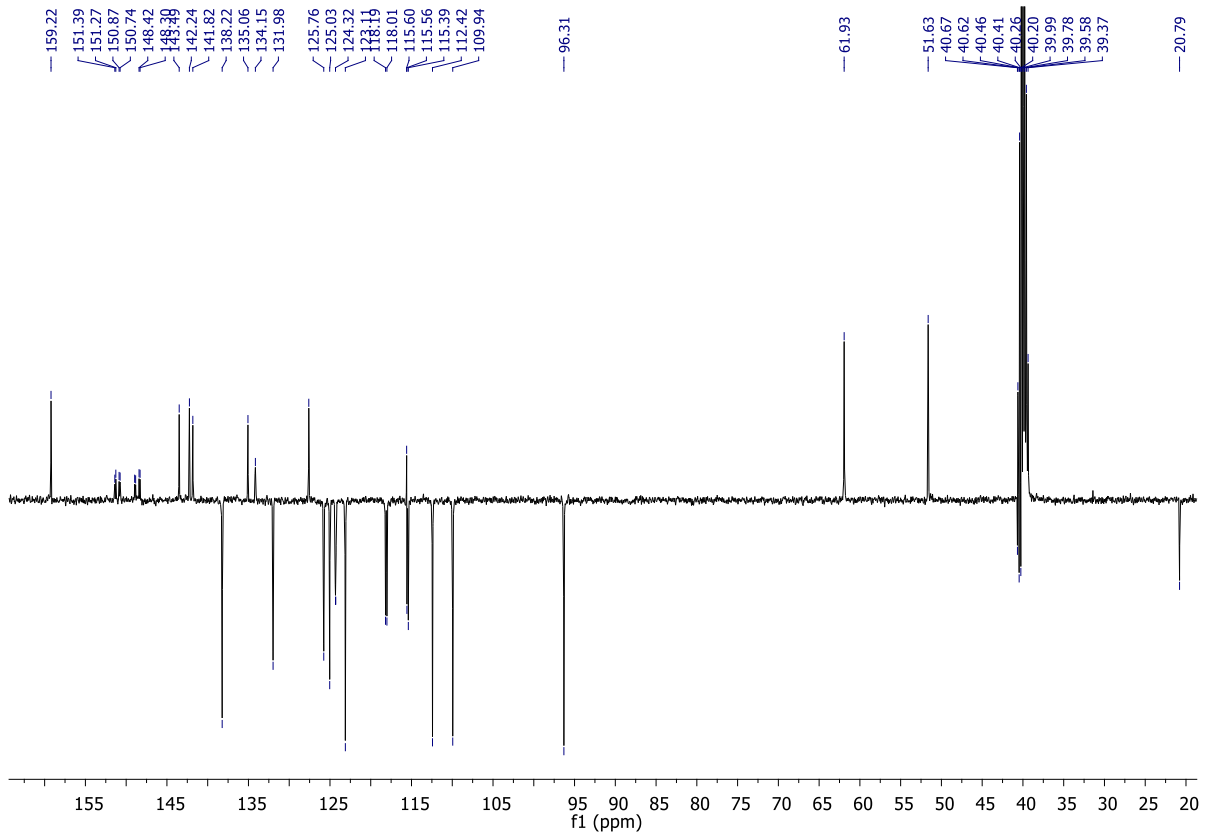
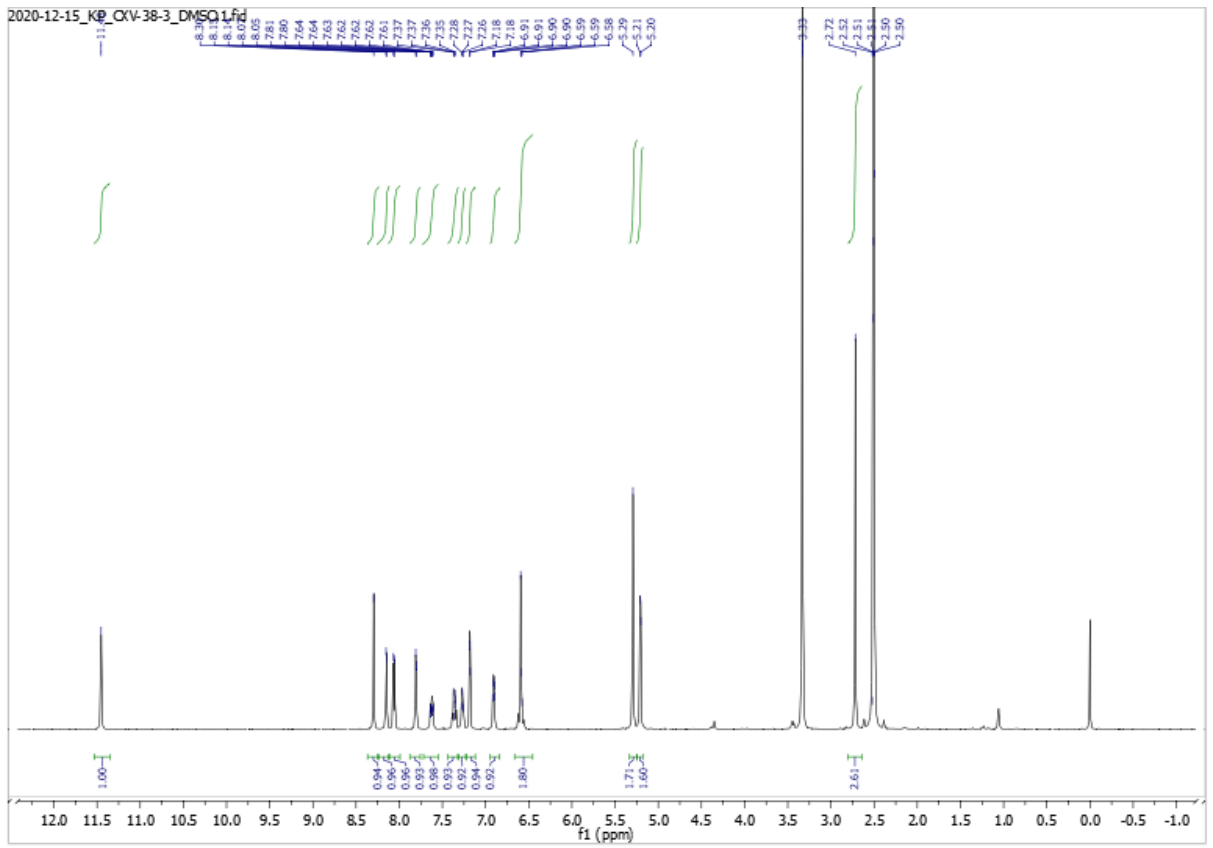
20181029\_CV111\_2\_18 (0.321) Cm (1:58)

Waters Synapt G2-Si, S/N: UGA365

29-Oct-2018 15:26:25

TOF MS ES+  
3.48e8





## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Sinteza i karakterizacija *O*-harmicina triazolskog tipa u položaju 7 $\beta$ -karbolinskog prstena

Anja Kučević

#### SAŽETAK

Harmin i derivati cimetine kiseline su prirodni produkti koji pokazuju širok spektar bioloških djelovanja, među kojima su antimalarijsko i citostatsko djelovanje. Njihovim kovalentnim povezivanjem u hibridne spojeve, harmicine, nastoji se postići poboljšano djelovanje, smanjenje neželjenih učinaka i interakcija te smanjenje rezistencije na postojeću farmakoterapiju. U okviru ovog diplomskog rada sintetizirani su *O*-harmicini triazolskog tipa, **6a-e**, korištenjem Cu(I) katalizirane alkin-azid cikloadicije. Usto, sintetizirani su i polazni spojevi, azidi derivata cimetine kiseline **3a-e** i alkin **5**. *O*-harmicini **6a-e** su karakterizirani uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (talište, IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, MS). U daljnjim istraživanjima sintetiziranim spojevima će biti ispitano citostatsko djelovanje na nizu tumorskih staničnih linija.

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

Rad sadrži: 74 stranice, 8 grafičkih prikaza, 6 tablica i 41 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: harmin, cimetna kiselina, triazol, *O*-harmicini, sinteza

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

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

**Dr. sc. Ivana Perković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Synthesis and characterization of triazole type *O*-harmicines at the position 7 of the $\beta$ -carboline ring

Anja Kučević

#### SUMMARY

Harmine and cinnamic acid derivatives are natural products with a broad spectrum of biological activities, which includes antimalarial and cytotoxic effects. By their covalent binding to hybrid molecules, harmicines, improved action, reduction of side effects, drug interactions and resistance to existing pharmacotherapy might be achieved. In this thesis, *O*-harmicines of the triazole type **6a-e** were synthesised using the Cu(I)-catalyzed dipolar alkyne-azide cycloaddition. Starting compounds, cinnamyl azides **3a-e** and alkyne **5** were synthesized as well. Structures of *O*-harmicines were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (melting point, IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, MS). Further studies will focus on the evaluation of their cytotoxic activity against several cancer cell lines.

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

Thesis includes: 74 pages, 8 figures, 6 tables and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: harmine, cinnamic acid, triazole, *O*-harmicines, synthesis

Mentor: **Zrinka Rajić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Zrinka Rajić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivana Perković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.

