

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

Corina Šljubura

Sinteza, biološka aktivnost i interakcija s *ct*-DNK novih amidino-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Hranjec i neposrednim voditeljstvom Ide Boček Pavlinac, mag. appl. chem., u sklopu projekata Hrvatske nacionalne zaklade 4379 *Istraživanje antioksidativnog djelovanja benzazolskog skeleta u dizajnu novih antitumorskih agensa* i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.



Popis kratica:

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

RNK - ribonukleinska kiselina

EWG - *electron withdrawing group*, tj. elektron odvlačeća skupina

ct-DNK - *calf thymus* DNK, tj. DNK izolirana iz *timusa teleta*

UV/Vis - ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija

IR - Infracrvena spektroskopija

CD - cirkularni dikroizam

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

Abs - apsorbancija

ϵ - molarni ekstincijski koeficijent

λ_{em} - valna duljina emisije

λ_{exc} - valna duljina ekscitacije

SAR - odnos strukture i aktivnosti

LiHMDS - litijev bis(trimetilsilil)amid

EtOH - etanol

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO - dimetilsulfoksid

MeOH - metanol

CH₂Cl₂ - diklormetan

BTBA - tetra-*n*-butilamonijev bromid

MgSO₄ - magnezijev sulfat

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Općenito o strukturi amidina.....	4
2.2. Klasifikacija amidina.....	6
2.2.1. Aciklički amidini.....	6
2.2.2. Bciklički amidini.....	8
2.2.3. Ciklički heteroaromatski amidini.....	10
2.3. Sintaza amidina.....	12
2.3.1. Amidini iz nitrila.....	12
2.3.2. Amidini iz amida, tioamida i laktama.....	14
2.3.3. Miješana sintaza amidina.....	16
2.4. Amidini kao strukturne jedinice u sintezi-kemijske reakcije.....	18
2.4.1. Adicija amidina na elektrofile.....	18
2.4.2. Sintaza heterocikličkih derivata.....	19
2.5. Amidini kao prirodni produkti.....	22
2.5.1. Prirodni amidini iz mikroorganizama i gljiva.....	23
2.5.2. Prirodni amidini iz morskih beskralješnjaka.....	24
2.6. Organometalna kemija.....	25
2.6.1. Općenito o organometalnoj kemiji.....	25
2.6.2. Suzuki-Miyaura reakcija.....	26
2.7. Biološka aktivnost amidino-supstituiranih imidazo[4,5- <i>b</i>]piridina.....	31
3. EKSPERIMENTALNI DIO	41
3.1. Opće napomene.....	42
3.2. Priprava amidino-supstituiranih derivata imidazo[4,5- <i>b</i>]piridina.....	43
3.2.6. Opći postupak pripreme spojeva 11-13.....	46
3.2.10. Opći postupak pripreme nesupstituiranih amidina s LiHMDS 14-16.....	47
3.2.14. Opći postupak pripreme amidina Pinnerovom metodom.....	48
3.3. Ispitivanje interakcija nekih priređenih derivata s DNK.....	51
3.3.1. Supstrati.....	51
3.3.2. Spektroskopske metode.....	51

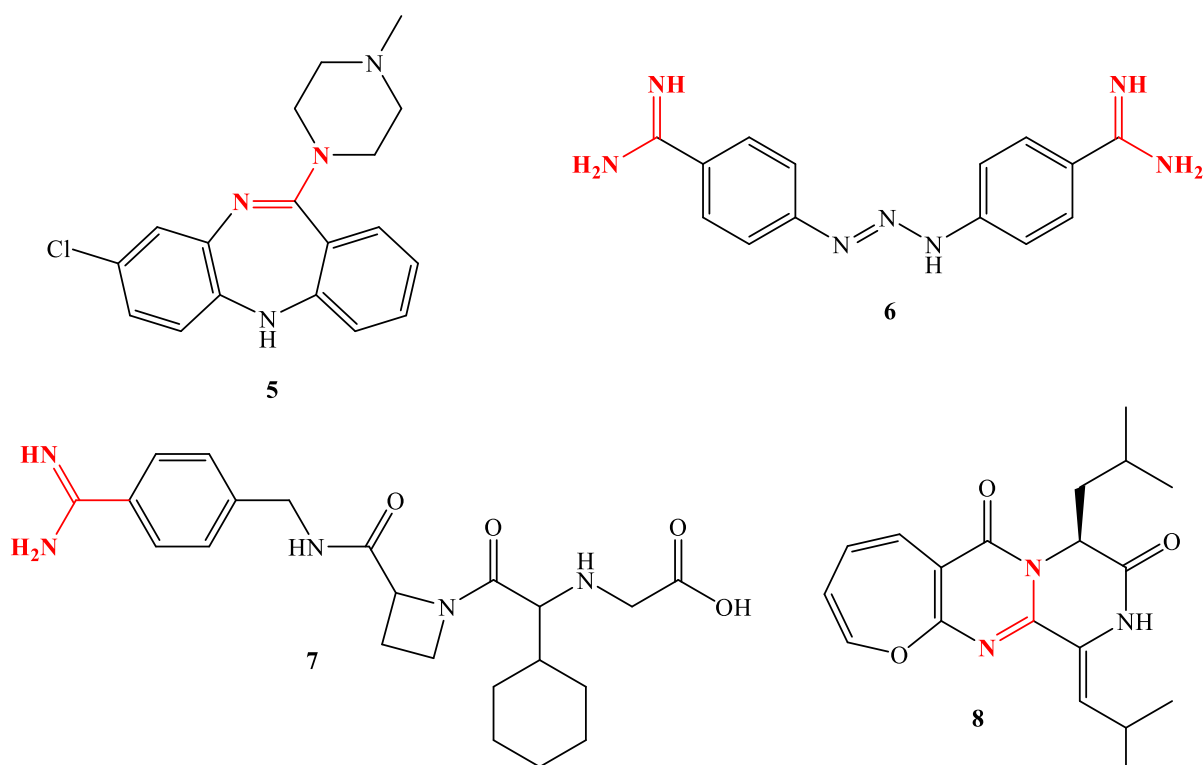
3.3.3. Izvedba titracija	51
4. REZULTATI I RASPRAVA	52
4.1. Cilj rada.....	53
4.2. Sinteza ciljanih spojeva.....	54
4.3. Antiproliferativna aktivnost ispitanih spojeva <i>in vitro</i>	66
4.3.1. Antiproliferativna aktivnost prema odabranim staničnim linijama humanih karcinoma	66
4.3.2. Utjecaj supstituenata na antiproliferativnu aktivnost	69
4.4. Antibakterijska aktivnost ispitanih spojeva <i>in vitro</i>	70
4.5. Vežanje molekula na DNK.....	72
4.5.1. Kovalentni način vežanja.....	72
4.5.2. Nekovalentni način vežanja.....	72
4.5.3. Cirkularni dikroizam.....	73
4.6. Ispitivanje interakcije nekih priređenih derivata s <i>ct</i> -DNK	74
4.6.1. UV/Vis spektroskopske titracije	74
4.6.2. Fluorimetrijska spektroskopija	76
4.6.3. CD spektroskopske titracije.....	78
5. ZAKLJUČAK	80
6. ZAHVALA.....	83
7. LITERATURA	85
8. SAŽETAK	93
9. SUMMARY	95
10. ŽIVOTOPIS	97
11. PRILOZI.....	99

1. UVOD

Amidini se često smatraju jednim od važnih farmakofora u modernom dizajnu lijekova u medicinskoj kemiji. Razlog tomu je opravdan i utemeljen na činjenici da mnogobrojni derivati amidina čine važnu skupinu spojeva koji se koriste u kliničkoj primjeni te pokazuju širok spektar biološke aktivnosti od kojih su najvažnija antitumorska, antivirusna, antibakterijska, antifungalna, antivirusna, i protuupalna. Osim navedenih aktivnosti, svoju primjenu su derivati amidina pronašli i kao strukturne komponente agrokemikalija, pokazalo se da djeluju kao organski katalizatori te se redovno koriste kao sintetski prekursori za dobivanje dušikovih heterocikala i donorskih liganda na bazi *N* u koordinacijskoj kemiji metalnih kompleksa. Vrlo važna i učinkovita metoda za sintezu različitih arilnih i heteroarilnih spojeva u medicinskoj kemiji jest Suzuki-Miyaura reakcija. Ključne prednosti Suzukijeve reakcije su: zabilježena visoka tolerantnost prema različitim funkcijskim skupinama na molekulama, provođenje reakcije pod blagim reakcijskim uvjetima, relativna stabilnost bornih kiselina/estera na vrućinu, kisik i vodu, jednostavnost odvajanja bornih-nusprodukata te izdašna komercijalna dostupnost katalizatora za provođenje reakcije.

2. OPĆI DIO

Amidini su korisni supstrati strukturne podjedinice s različitim primjenama; od područja dizajna katalizatora, znanosti o materijalima, agrokemikalija, sinteze različitih dušikovih heterocikala do medicinske kemije, odnosno farmaceutski aktivnih spojeva čije je klinički aktivno djelovanje prilično heterogeno; od poznatog antipsihotika klozapina⁵ **5**, DNK-RNK vezujućeg spoja diminazena⁵ **6** za liječenje infekcija uzrokovanih određenim protozoama kao što su *Babesia*, *Trypanosoma* i *Cytauxzoon*, antimalarika Janoxepina⁶ **8** do lijeka koji djeluje kao inhibitor trombina, Melagatran⁶ **7**.



Slika 4. Biološki aktivni spojevi koji sadrže amidine^{5,6}

Radi posjedovanja dva dušikova atoma, amidini se smatraju dualnim nukleofilnim molekulama koje daju izvor N-C-N sintona, koji onda lako može reagirati s elektrofilnim ugljikovim atomima i tako formirati različite *N*-heterocikle⁷ kao što su aziridini, piroli, imidazoli, oksazoli, pirimidini, kinazoloni, kinazolinoni, triazoli i benzimidazoli^{8,9}.

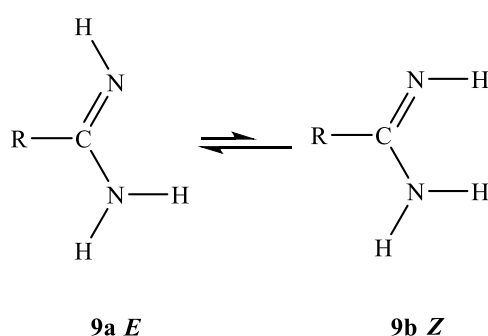
2.2. Klasifikacija amidina

Amidino funkcijska skupina može biti aciklička ili dio različitih heterocikličkih prstenastih sustava.

2.2.1. Aciklički amidini

a) Nesupstituirani amidini

Kao što je prikazano na strukturama **9a** i **9b**, ovi amidini se pojavljuju kao *E* i *Z* (*syn*, *anti* ili *cis*, *trans*) izomeri s obzirom na ravninu C=N dvostruke veze. Općenito, izomer *E* je energetski povoljniji radi bolje delokalizacije elektrona i manjih steričkih smetnji¹.



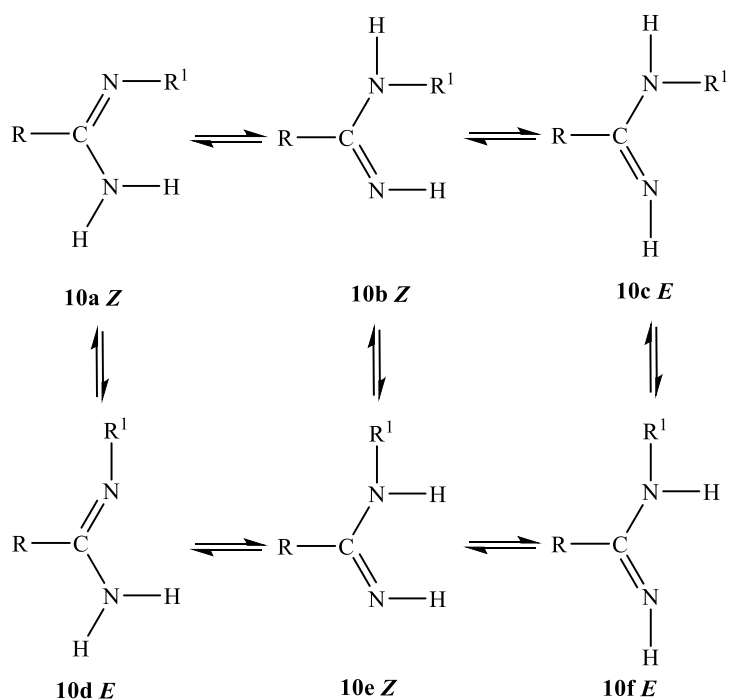
Slika 5. *E* i *Z* izomeri nesupstituiranih amidina¹

U kemijskoj literaturi amidini su nazvani po karboksilnoj kiselini ili amidu koji se iz njih može dobiti hidrolizom; stoga je R = H u **9** formamidin, R = CH₃ je acetamidin i R = Ph je benzamidin. U daljnjem tekstu R, supstituent na amidino ugljiku, može biti vodik ili bilo koji alkil, aril ili heteroarilni supstituent. Supstituenti na dušikovim atomima (R¹ do R³) trebaju biti alkil ili aril¹.

b) *N*- ili *N'*-monosupstituirani amidini

Monosupstituirani amidini mogu se pojaviti kao parovi tautomera kao što je naznačeno formulama **10a** i **10b** te **10d** i **10e**.

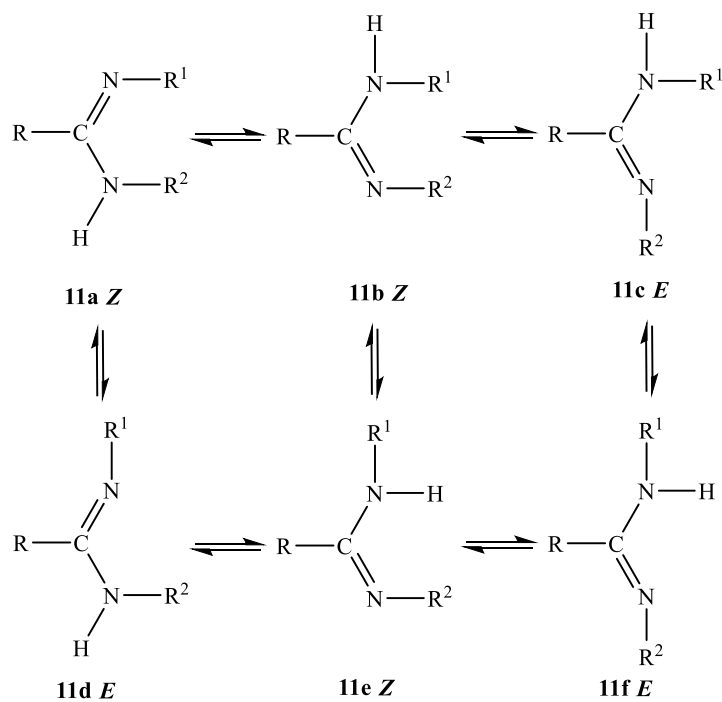
Brojni eksperimentalni pokušaji izolacije ili dokazivanja postojanja oba tautomera u ravnoteži nisu uspjeli. Osim toga, *E,Z* izomerija u odnosu na C-N dvostruku vezu u **10a** i **10d**, **10b** i **10c** te **10e** i **10f** trebala bi biti vidljiva, kao i *s-cis* ili *s-trans* konformeri s obzirom na C-N jednostruku vezu prikazanu u **10b** i **10e** te **10c** i **10f**¹.



Slika 6. Parovi tautomera monosupstituiranih amidina¹

c) N, N'-disupstituirani amidini

Ako su supstituenti R^1 i R^2 na dušicima različiti, ovi N,N' -disupstituirani amidini pokazuju iste vrste izomerije kao oni monosupstituirani tautomera amidina: **11a** i **11b** te **11d** i **11e**; E,Z izomeri: **11a** i **11d**, **11b** i **11c** te **11e** i **11f**; konformeri: **11b** i **11e** te **11c** i **11f**.

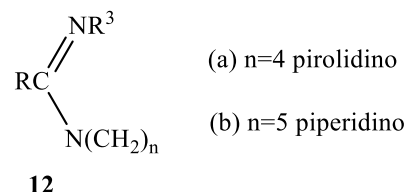


Slika 7. Parovi tautomera disupstituiranih amidina¹

2.2.2. Biciklički amidini

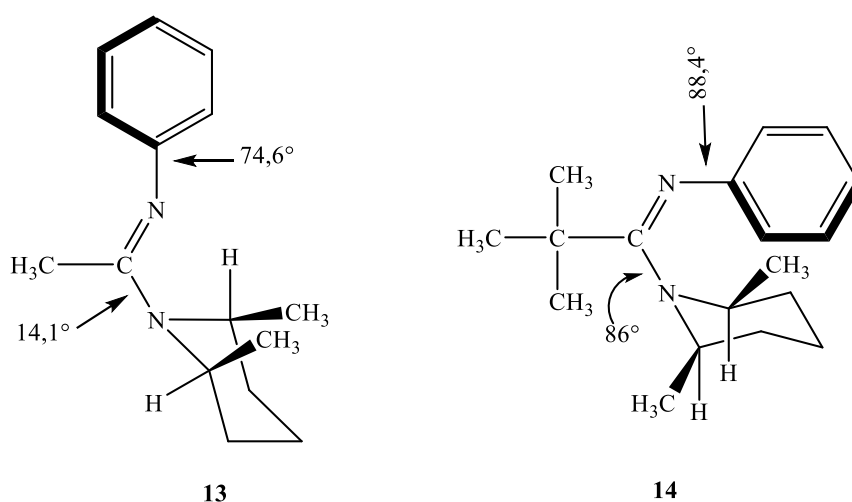
a) Amino skupina kao dio heterocikla

Ovi amidini su poseban slučaj acikličkih derivata.



Slika 8. Različiti supstituenti amidina¹

Na Slici 9 vidljiva su dva derivata ove klase spojeva; 2,6-*cis*-dimetil-piperidil-*N*-fenilacetamidin **13** i 2,6-*cis*-dimetilpiperidil-*N*-fenil-2,2-dimetil-propionamidin **14**. *Tert*-butilni supstituent u **14**, koji je sterički zahtjevan, tjera fenilni supstituent u nepoželjan *Z*-izomer izvan ravnine s kutom savijanja od 88,4°. Diekvatorijalni dimetilpiperidinski prsten je za 86° savijen izvan ravnine amidinske skupine s odgovarajućim povećanjem duljine C-N veze i s kratkom C=N dvostrukom vezom¹.

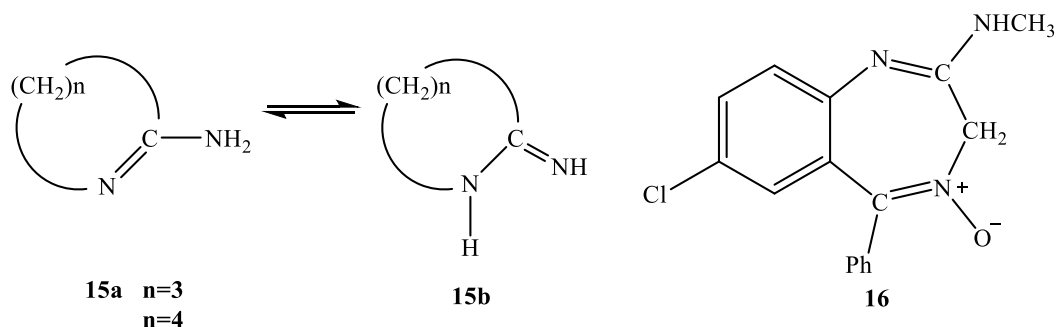


Slika 9. 2,6-*cis*-dimetilpiperidil-*N*-fenilacetamidin **13** i 2,6-*cis*-dimetilpiperidil-*N*-fenil-2,2-dimetilpropionamidin **14**¹

U **13** fenilni supstituent pokazuje poželjnu *E* konfiguraciju i dalje s velikim kutom savijanja od 74,6°. Di-aksijalna dimetilpiperidinska skupina samo je malo izokrenuta iz ravnine amidinske skupine (za 14,1°)¹.

b) Imino skupina kao dio heterocikla

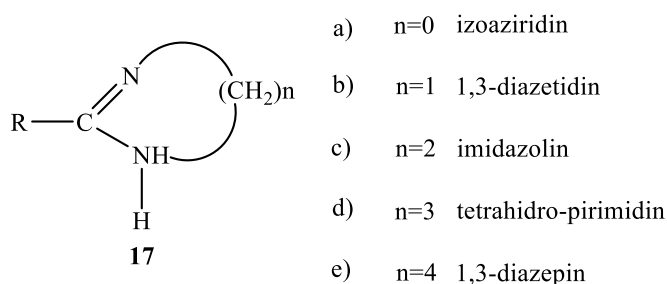
Ovi amidini mogu pokazivati tautomerizam u slučaju kada imino skupina može biti endociklička **15a** ili egzociklička **15b**. Ovaj supstitucijski obrazac prikazan je u dobro poznatom lijeku za smirenje, klordiazepoksidu **16**¹.



Slika 10. Endo **15a** i egzociklička **15b** imino skupina, te klordiazepoksid **16**¹

c) Amidino skupina inkorporirana u jedan heterocikl

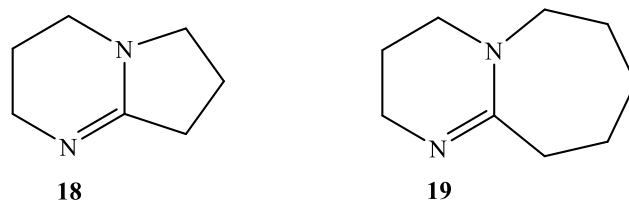
Ako je amidino skupina inkorporirana u jedan prsten, dobiva se niz homolognih spojeva kao što je prikazano u **17a** do **17e**. Tročlani i četveročlani prstenasti sustavi izodiazirina **17a** i 1,3-diazetidina **17b** nisu eksperimentalno poznati. Sustavi prstena s pet, šest i sedam članova **17c** do **17e** eksperimentalno su dobro poznati i mogu se sintetizirati u dobrim iskorištenjima obradom odgovarajućih diamina s HCN ili izonitrila. Kemijski sastavi Δ^2 -imidazolina **17c** i 1,3-diazepina **17e** su pregledani zasebno. Ovi ciklički amidini ponašaju se kao odgovarajući aciklički N,N' -disupstituirani amidini¹.



Slika 11. Heterociklički amidini **17a-17e**¹

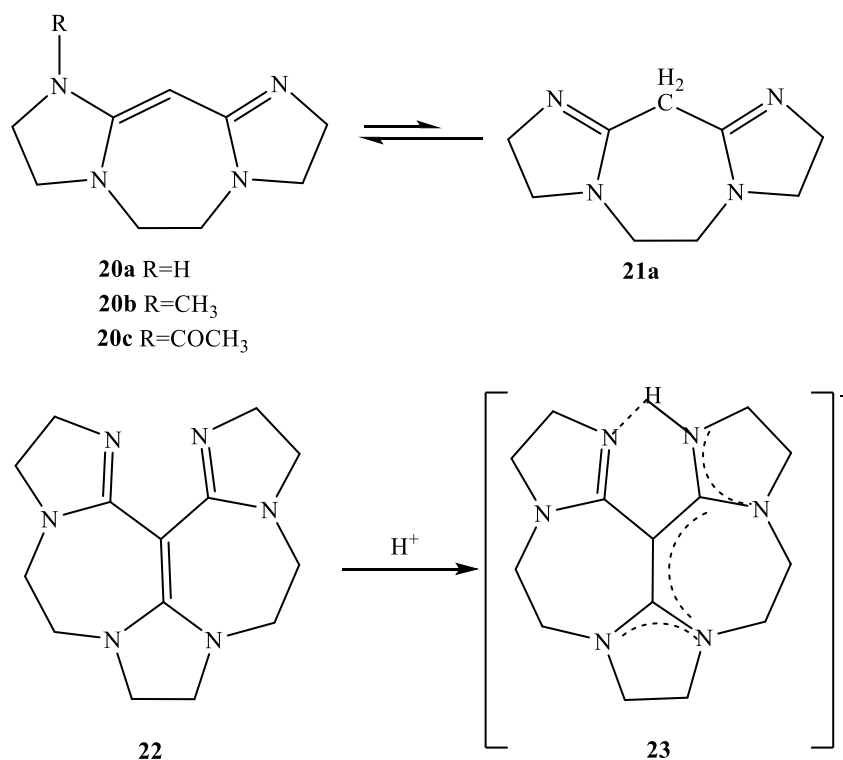
d) Biciklički amidini

Amidino skupina može biti dio dvaju prstenova koji vode do bicikličkih amidina. Od ovih 1,5-diazabiciklo[4.3.0]nonen-5 DBN, **18** i 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undecen-7 DBU, **19** našli su široku primjenu kao nenukleofilne baze za dehidrohalogenacije, aldolne kondenzacije i pripreme Wittigovih reagensa.



Slika 12. DBN **18** i DBU **19**¹

Sintetizirana je druga klasa bicikličkih amidina, niz takozvanih vinamidina **20a-20c**. ¹H NMR spektar **20a** pokazuje da se tautomerni diamidin malonske kiseline **21a** ne može lako detektirati. Modifikacija ove strukture dovodi do **22**, koji može djelovati kao nenukleofilna „protonska spužva“ sa snažnom delokalizacijom pozitivnog naboja u kationu **23**.



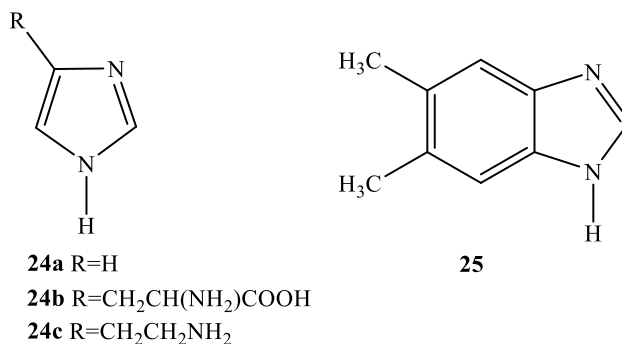
Slika 13. Biciklički amidini¹

2.2.3. Ciklički heteroaromatski amidini

Amidino skupina može biti ugrađena potpuno ili djelomično u ciklički konjugirane nezasićene prstenaste sustave. Heteroaromatski sustavi spomenuti su ovdje kako bi pokazali široku rasprostranjenost i važnost amidino skupine u organskoj kemiji. Strukturna svojstva i bazičnost amidino skupine bit će modificirana cikličkom konjugacijom u aromatskom prstenu.

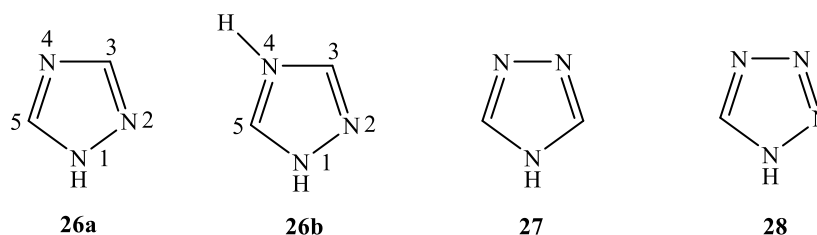
a) Amidino skupina u potpunosti dio prstena

Ovaj strukturni princip pojavljuje se u neparnim heterociklima. Najvažniji primjer je imidazol **24a** koji se pojavljuje u aminokiselini histidin **24b** i u biogenom aminu histaminu **24c**. Dimetilbenzimidazol **25** je dio vitamina B₁₂.



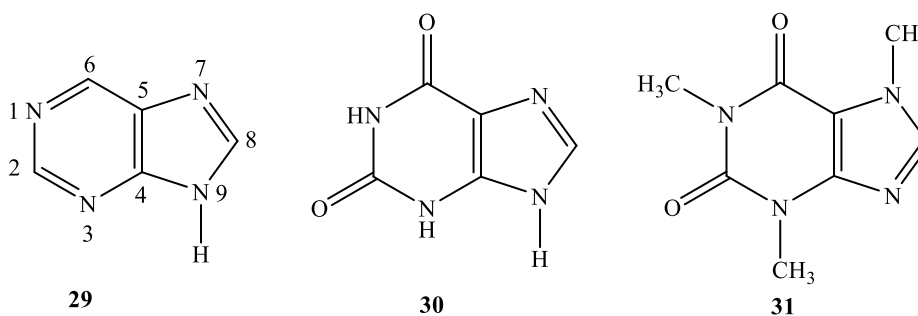
Slika 14. Primjeri heterocikličkih spojeva s inkorporiranom amidinskom funkcijskom skupinom¹

Drugi primjeri azola s amidinskom strukturnom jedinicom su 1*H*- i 4*H*-1,2,4-triazoli **26a** i **26b**, 1,3,4-triazol **27** i 1*H*-tetrazol **28**.



Slika 15. Primjeri tri i tetrazolnih heterocikala¹

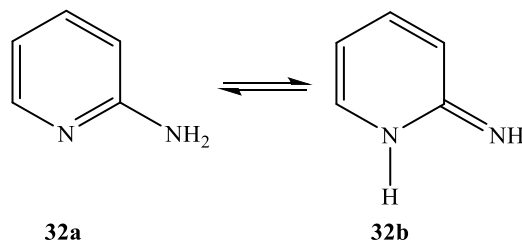
Biciklički heteroaromatski spojevi koji sadrže amidino skupinu biološki su aktivni derivati 9*H*-purina **29**, koji formalno sadrži monocikličku (7,8,9) i bicikličku amidino skupinu (3, 4, 9). Prirodni produkti su ksantin **30** i njegov produkt metiliranja, kofein **31**.



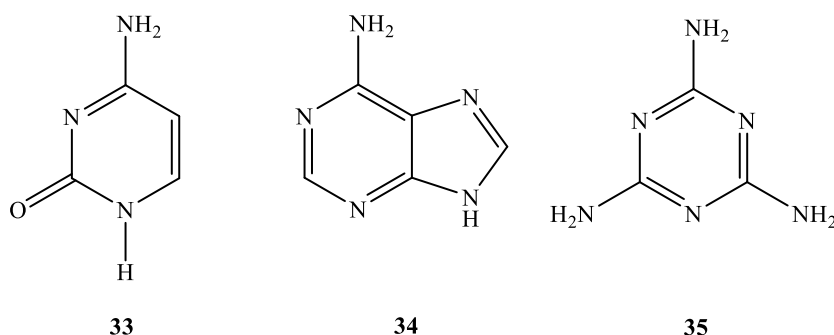
Slika 16. Primjeri bicikličkih heterocikala; derivati 9*H*-purina¹

b) Amidino skupina samo djelomično inkorporirana u prsten

Ova situacija se tipično opaža u α -aminopiridinu **32** u kojem se mora uzeti u obzir mogućnost tautomerije između amino **32a** i imino oblika **32b**.



Slika 17. Tautomerija amino i imino forme spoja **32**¹



Slika 18. Molekule dio strukture DNK i RNK (**33** i **34**) te melamin **35**¹

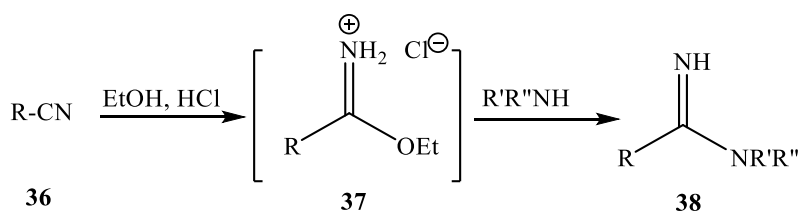
Važni primjeri su sastojci DNK i RNK citozin **33** i adenin **34** kao i melami.

2.3. Sinteza amidina

Opisani su brojni postupci za dobivanje amidina, no najčešće metode sinteze amidina su: iz nitrila, amida, tioamida, laktama te razne miješane sinteze.

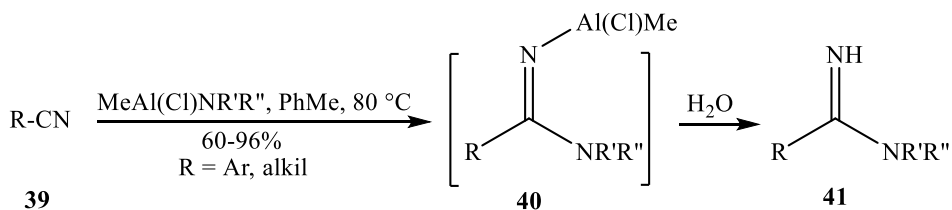
2.3.1. Amidini iz nitrila

Klasična Pinnerova reakcija¹⁰, koju je otkrio Klein Pinner u kasnim 1800-ima, vjerojatno je najkorištenija metoda za stvaranje nesupstituiranih amidina: primarno putem transformacije nitrila u imidinske estere¹¹. Nitrili **36** se aktiviraju u intermedijarne imidne esterske soli **37** u prisutnosti alkohola i klorovodika pod bezvodnim uvjetima. Imidne esterske soli **37** zatim reagiraju s aminima, bilo *in situ* ili nakon izolacije, da bi generirale amidine **38** (Shema 1)¹².



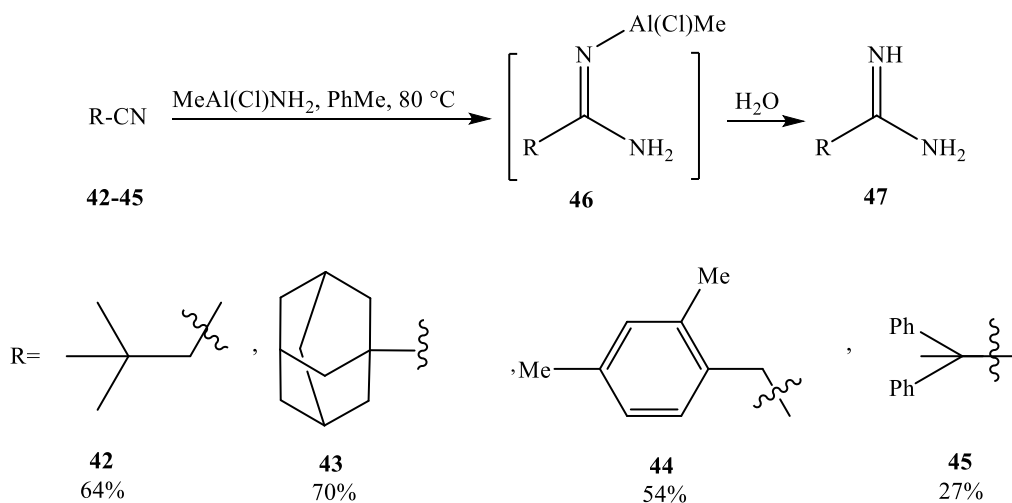
Shema 1. Dobivanje amidina preko soli imidnog estera¹⁰

Izravna sinteza amidina iz nitrila i amina može se postići samo ako su nitrili supstituirani elektron-odvlačećim skupinama (EWG)¹³. Nereaktivni nitrili korišteni su za pripremu amidina u prisutnosti Lewisovih kiselina kao što su AlCl_3 ili ZnCl_2 na povišenim temperaturama od $150\text{-}200\text{ }^\circ\text{C}$ ¹⁴. Nedavno je objavljeno da su alkilkloraluminijevi amidi korisni reagensi za konverziju nitrila u amidine pod blažim uvjetima. Garigipati je otkrio da je dodavanje alkilkloraluminijevih amida, dobivenih iz trimetil-aluminija i amonijevih klorida, nitrilima **39** u toplom toluenu učinkovito dalo željene amidine **41** u razumnim iskorištenjima i to nakon hidrolize aluminijevih vrsta **40** (Shema 2)¹⁵.



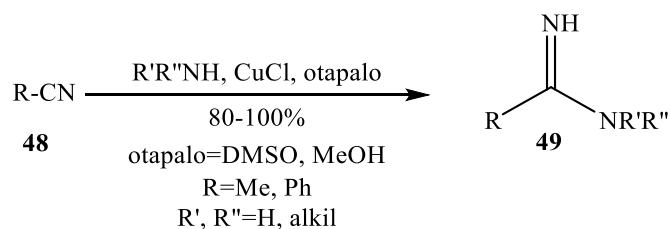
Shema 2. Dodavanje alkilkloroaluminijevih amida nitrilima **39** za dobivanje amidina¹⁰

Moss je pokazao da reakcija s metilkloraluminijevim amidom lako pretvara sterički ometene nitrile **42-45** u amidine **47** (Shema 3)¹⁶.



Shema 3. Reakcija sterički ometenih nitrila **42-45** s metilkloraluminijevim amidom do amidina **47**¹⁰

Capdevielle je objavio opću pripremu amidina iz neaktiviranih nitrila¹⁷. Stehiometrijski bakrov(I) klorid induciran adicijom različitih amina na nitrile **48**, daje amidine **49** u jako dobrim iskorištenjima (Shema 4).

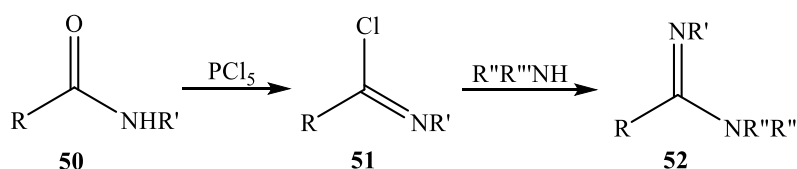


Shema 4. Priprava amidina iz neaktiviranih nitrila¹⁰

2.3.2. Amidini iz amida, tioamida i laktama

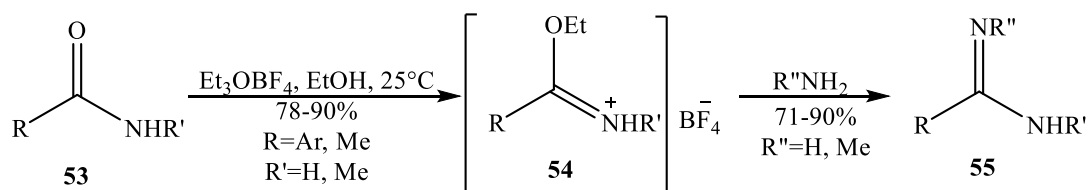
2.3.2.1. Amidini iz amida

Amidi se mogu pretvoriti u imidoilne kloride pomoću PCl_5 . Formirani imidoilni kloridi mogu reagirati s primarnim ili sekundarnim aminima dajući amidine (Shema 5)¹⁸. Ova metoda je općenito loša za pripremu nesupstituiranih amidina iz primarnih amida, ali je izvrsna metoda za pripremu di- i tri-supstituiranih amidina. Drugi reagensi kao što je fosforov oksiklorid ili tionil-klorid mogu se koristiti u sintezi imidoilnih klorida, ali obično se onda postižu niska iskorištenja.



Shema 5. Priprava amidina iz amida pomoću PCl_5 ³

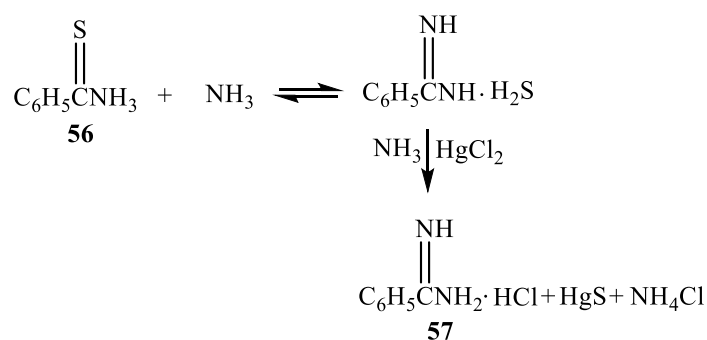
Amidi se mogu *o*-alkilirati trietiloksonijevim fluoroboratom na sobnoj temperaturi kako bi se dobili odgovarajući imidni esterski fluoroborati, koji potom reagiraju s aminima da bi se dobili ciljani amidini (Shema 6)¹⁹.



Shema 6. Priprava amidina iz *o*-alkiliranih amida³

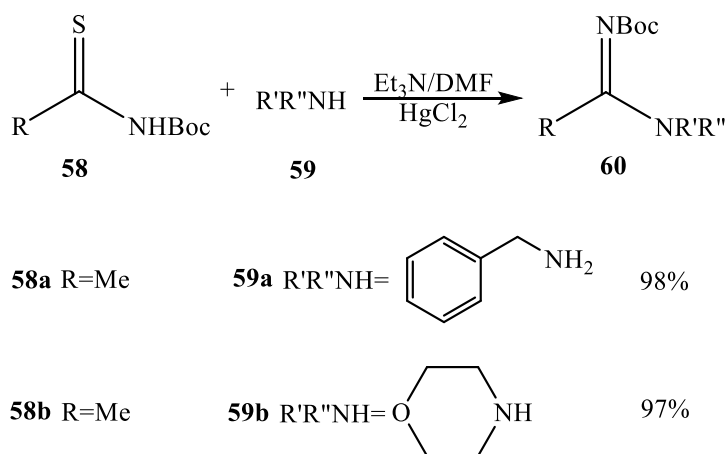
2.3.2.2. Amidini iz tioamida

Bernthsen je prvi govorio o uporabi tioamida za dobivanje amidina²⁰. Nesupstituirani aromatski ili alifatski tioamid reagira s koncentriranim amonijevim hidroksidom, reakcijom koja uspostavlja ravnotežu između tioamida i amidin-hidrosulfida. Dodavanje živinog klorida pomaže u dovođenju reakcije do završetka, zahvaljujući stvaranju netopljivog živinog sulfida. Također je moguće da amonijak i živin-klorid tvore aminoživin-klorid, koji tada reagira s amidinskim hidrosulfidom.



Shema 7. Priprava amidina iz tioamida pomoću HgCl_2 ²⁰

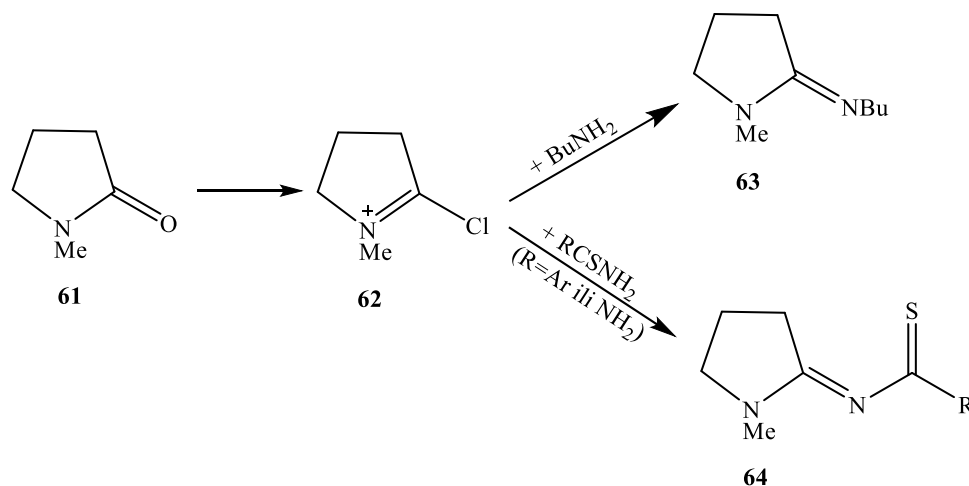
Također, postoji i jednostavna i prikladna metoda za pripremu *N*-*t*-Boc zaštićenih amidina iz *N*-(*t*-Boc) zaštićenih tioamida. Postupak obuhvaća pripravu *N*-(*t*-Boc)tioamida iz tioamida i (*t*-BoC)₂O (NaH/THF, 0 °C) koji su potom ostavljeni da reagiraju s raznim aminima u prisutnosti HgCl_2 i Et_3N u DMF kao otapalu na 0 °C ili na sobnoj temperaturi²¹. Reakcija *N*-(*t*-Boc)tioamida s aminima je pod velikim utjecajem i nukleofilnosti i steričkih smetnji amina, pa su tako najbolja iskorištenja dali supstituenti **59a** i **59b**.



Shema 8. *N*-(*t*-Boc)amidini iz *N*-(*t*-Boc)tioamida i amina²¹

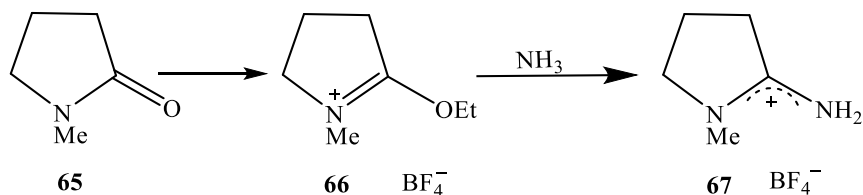
2.3.2.3. Amidini iz laktama

Laktami se aktiviraju fosforim oksikloridom i sličnim reagensima da bi se dobile soli, npr. **62**²², koje reagiraju s aminima²³ i tioamidima, uključujući tioureu²⁴, dajući amidine, odnosno tioacilamidine:



Shema 9. Dobivanje amidina **63** i tioacilamidina **64**¹

Laktami se također mogu pretvoriti u amidinijeve tetrafluorborate^{22,25}.

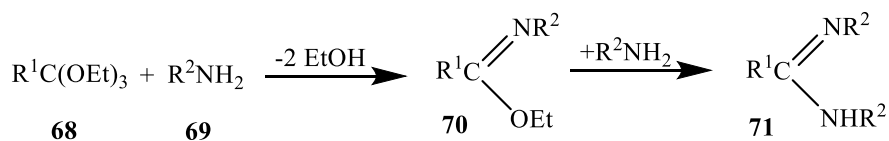


Shema 10. Dobivanje amidinijevih tetrafluorborata¹

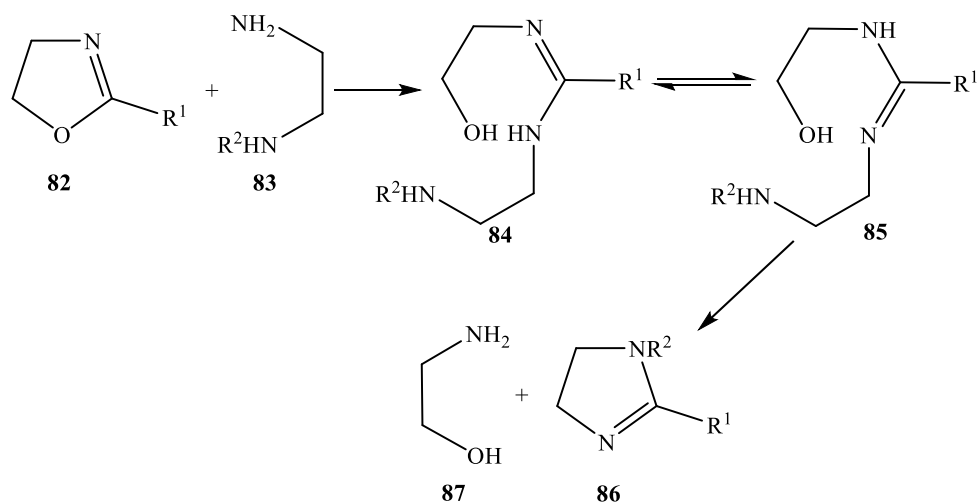
2.3.3. Miješana sinteza amidina

2.3.3.1. Amidini iz ortoestera

Primarni amini reagiraju s ortoesterima dajući simetrično disupstituirane amidine putem imidata. Ako se dodaju katalitičke količine octene kiseline, imidati se mogu izdvojiti^{26,27}.



Shema 11. Dobivanje simetrično disupstituiranih amidina¹

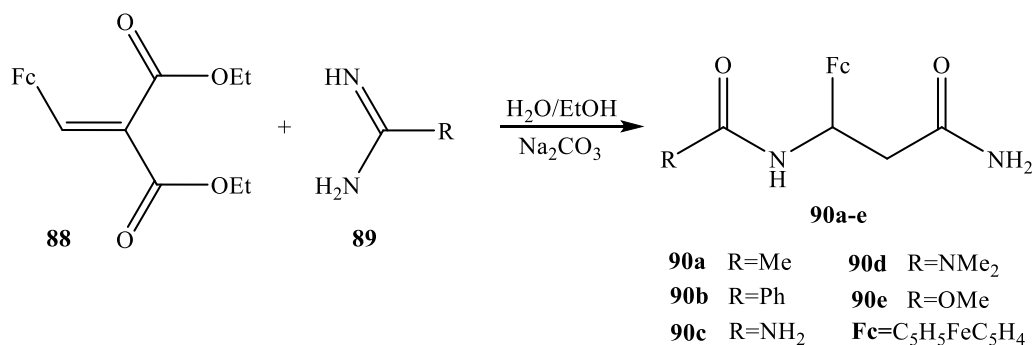


Shema 15. Dobivanje cikličkog amidina **86**¹

2.4. Amidini kao strukturne jedinice u sintezi-kemijske reakcije

2.4.1. Adicija amidina na elektrofile

Amidini mogu poslužiti kao reaktivni dušikovi nukleofili i mogu reagirati s Michaelovim akceptorom kako bi formirali novu C-N vezu³³. Ovisno o supstratima i reakcijskim uvjetima, nastaju ili *N*-alkilamidini ili hidroliza dovodi do stvaranja amida. Primjer spomenutog je reakcija dietil 2-(ferocenilmetiliden)malonata **88** sa suviškom amidina **89** u vodenoj otopini etanola u prisutnosti Na₂CO₃ na 80-85 °C da bi se dobili produkti **90a-e** (Shema 16)³⁴.



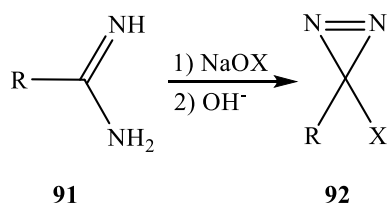
Shema 16. Adicija amidina na elektrofile³³

2.4.2. Sinteza heterocikličkih derivata

Ciklizacija je najvažnija reakcija funkcionaliziranih i nefunkcionaliziranih amidina; time se dobivaju drugačiji heterociklički spojevi koji sadrže $-N=C-N=$ skupinu. U nastavku su poredani prsteni po veličini te su navedeni neki primjeri.

2.4.2.1. Sinteza tročlanih heterocikličkih prstenova

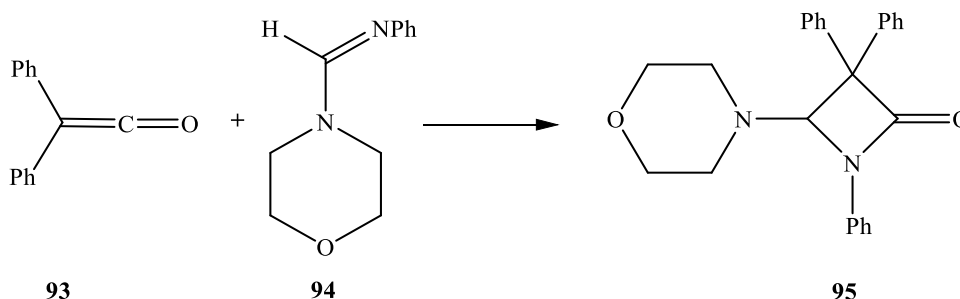
Reakcija alkil- ili aril-amidina **91** s natrijevim hipokloritom u otopini dimetil sulfoksida (DMSO) daje odgovarajuće 3-halodiazirene **92** (Shema 17)³⁵.



Shema 17. Sinteza diaziridina³³

2.4.2.2. Sinteza četveročlanih heterocikličkih prstenova

Reakcija difenilketena **93** s 4-(*N*-fenilformimidinoil) morfolinom **94** dala je 1,3,3-trifenil-4-morfolinoazetidinon **95** (Shema 18)³⁶.

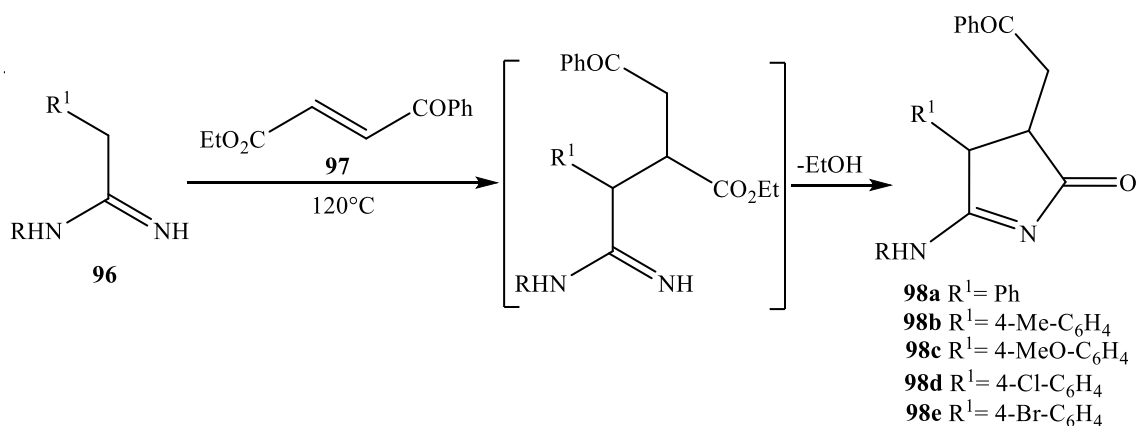


Shema 18. Sinteza azetidinona³³

2.4.2.3. Sinteza peteročlanih heterocikličkih prstenova

2.4.2.3.1. Piroli

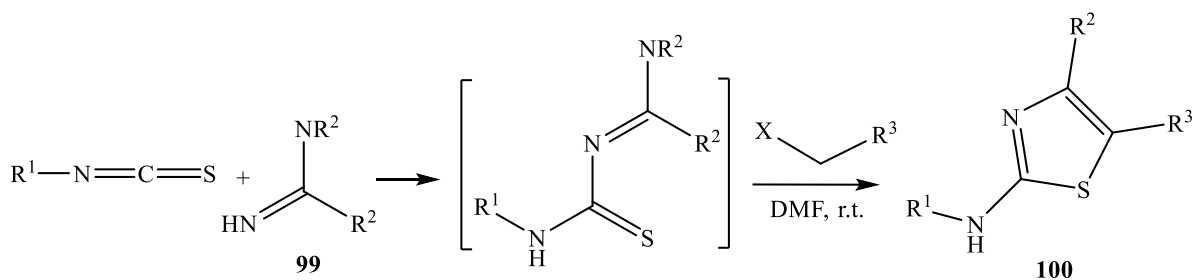
Kada se otopina amidina **96** u 2-metoksietileteru i etil-3-benzoilakrilata **97** zagrijava na 120 °C, nastaju derivati 3,4-dihidropirol-2-ona **98** (Shema 19)³⁷.



Shema 19. Sinteza pirolinona³³

2.4.2.3.2. Tiazoli

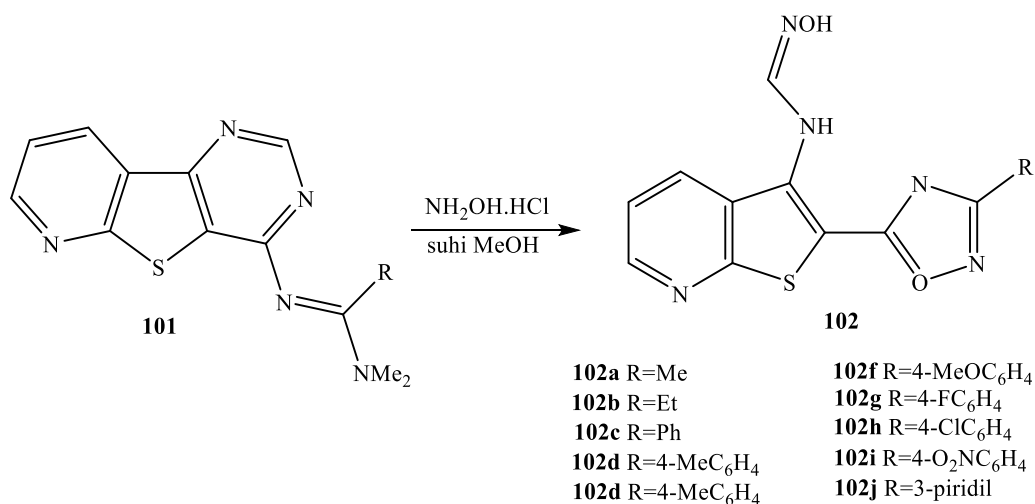
Učinkovita metoda za sintezu 2-aminotiazola **100** uključuje korištenje izotiocijanata, amidina **99** i raznih halometilena. Općenito, to je reakcija nukleofilne adicije-alkiliranja i intramolekularne nukleofilne supstitucije u kojoj amin odlazi kao izlazeća skupina (Shema 20)³⁸.



Shema 20. Sinteza tiazola **100**³³

2.4.2.3.3. Oksadiazoli

Reakcija spoja **101** s 4 ekvivalenta hidroksilamin hidroklorida u metanolu na sobnoj temperaturi dovela je do potpune konverzije **101** i dala 1,2,4-oksadiazole **102** u iskorištenjima od 14-73% (Shema 21)³⁹.

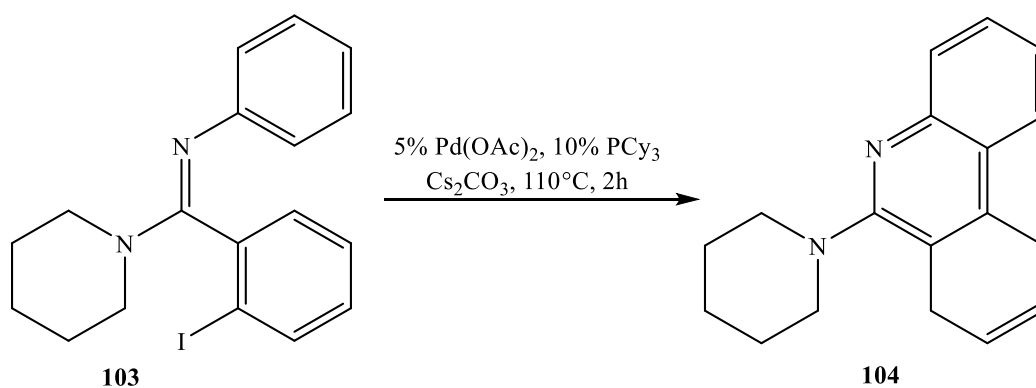


Shema 21. Sinteza 1,2,4-oksadiazola **102**³³

2.4.2.4. Sinteza šesteročlanih heterocikličkih prstenova

2.4.2.4.1. Piridini

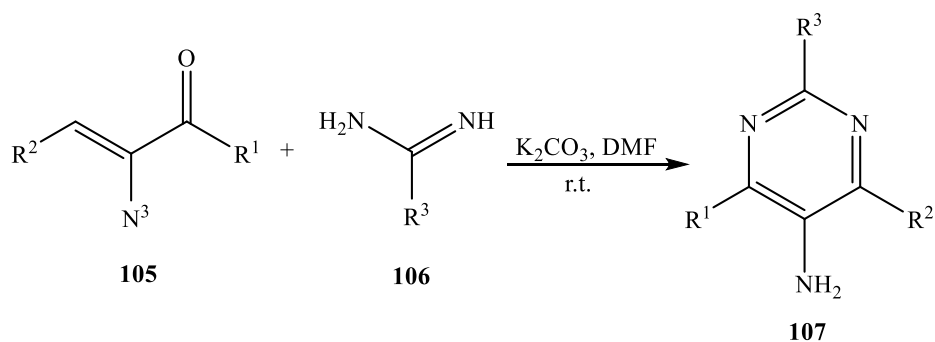
N-arilamidin **103** preveden je u 6-aminofenantridin **104** u izvrsnom iskorištenju reakcijom intramolekularnog spajanja kataliziranog s Pd (Shema 22)⁴⁰.



Shema 22. Sinteza fenantridina **104**³³

2.4.2.4.2. Pirimidini

Razvijena je jednostavna i izravna sinteza polisupstituiranih 5-aminopirimidina **107** iz α -azidovinil ketona **105** i amidina **106** u prisutnosti baze. Reakcija je provedena u bezvodnom DMF-u s 1,2 ekvivalenta amidina i 2,4 ekvivalenta K₂CO₃ u atmosferi N₂ i na sobnoj temperaturi (Shema 23)⁴¹.

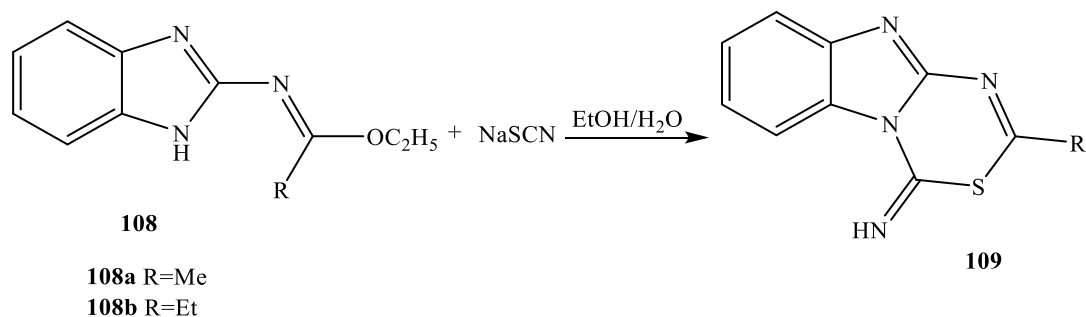


- 107a** R¹= Ph, R²=4-BrC₆H₄, R³=H
107b R¹= 4-MeC₆H₄, R²=4-BrC₆H₄, R³=CH₃
107c R¹= 4-MeC₆H₄, R²=4-BrC₆H₄, R³=Ph
107d R¹= Ph, R²=4-BrC₆H₄, R³=H
107e R¹= 4-MeOC₆H₄, R²=2-BrC₆H₄, R³=H
107f R¹= 2-tienil, R₂=FC₆H₄, R₃=CH₃

Shema 23. Sinteza 5-aminopirimidina **107**³³

2.4.2.4.3. Tiadiazini

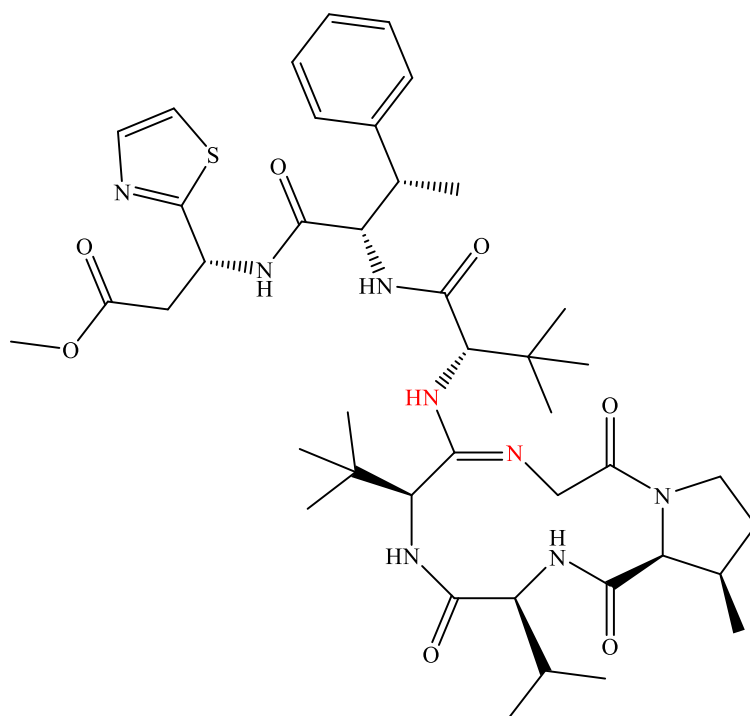
Pokazalo se da je obrada [1,2-*a*]benzimidazol-2-ila kao derivata iminoestera **108** s NaSCN u dioksanu/H₂O pod reflusom dala samo kondenzirane tiadiazinske produkte **109** (Shema 24)⁴².



Shema 24. Sinteza kondenziranih imidazotiadiazina **109**³³

2.5. Amidini kao prirodni produkti

Derivati amidina su uglavnom izolirani kao produkti fermentacije aktinomicete. Primjerice, izolacija botromicina **110**^{44,45,46} i koformicina^{47,48} zabilježena je iz *Streptomyces* sp. Ostali amidini izolirani su iz gljiva, morskih beskralješnjaka i biljaka⁴³.

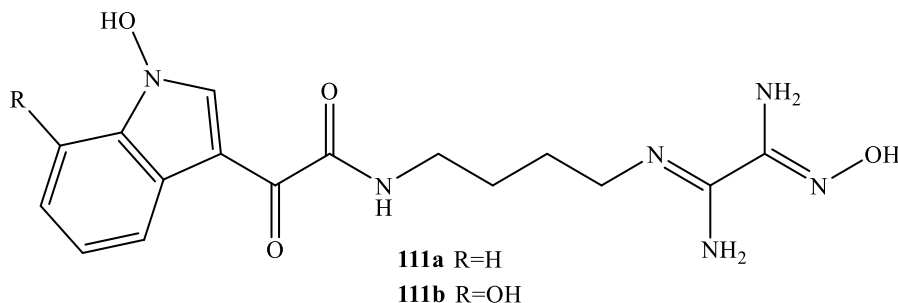


Slika 19. Botromicin A2⁴³

2.5.1. Prirodni amidini iz mikroorganizama i gljiva

2.5.1.1. Birnbaumins

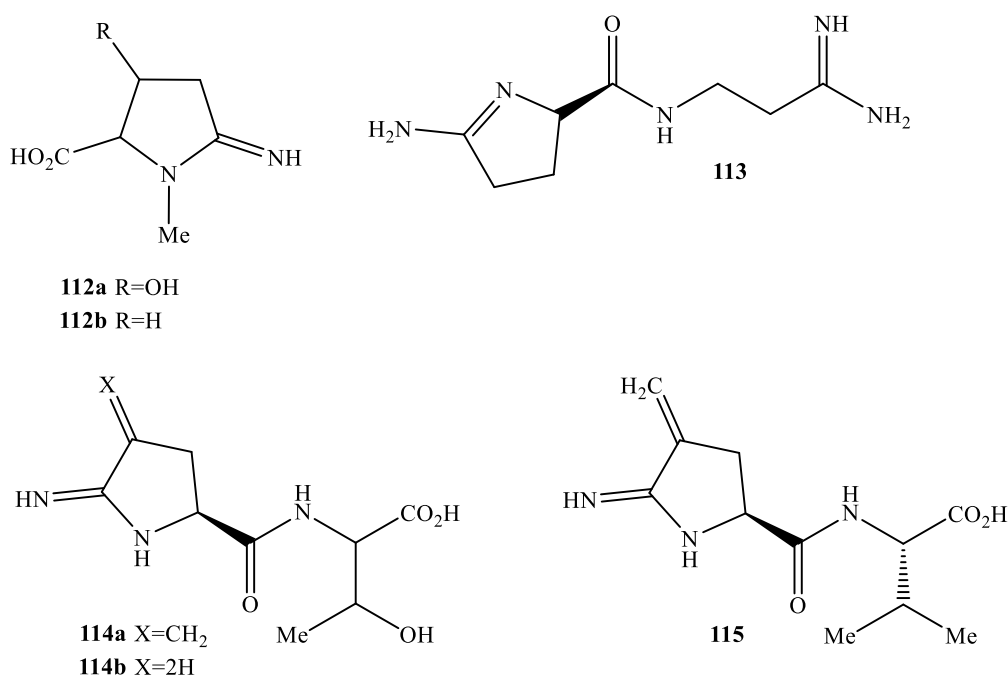
Znanstvenik Bartsch i suradnici proučavali su izolaciju birnbaumina A i B, neobičnog 1-hidroksiindolnog pigmenta iz gljivica⁴⁹. Struktura birnbaumina A **111a** sastoji se od 1-hidroksiindolegliksil amida s bočnim lancem koji sadrži vrlo rijetku *N*-hidroksibisamidinsku skupinu, koju je odredila permetilacija s diazometanom i usporedba spektralnih podataka s izračunatom vrijednosti drugog strukturnog kandidata (Slika 20).



Slika 20. Struktura birnbaumina A **111a** i birnbaumina B **111b**⁴³

2.5.1.2. Pirostatini

Imada i suradnici objavili su istraživanje vezano uz izolaciju pirostatina A i B iz bujona kulture soja *Streptomyces sp.* SA-3501 izoliranog iz morskog sedimenta^{50,51}. Strukture su određene kao derivati 2-iminopirolidinske karboksilne kiseline **112a** i **112b**. Ovi spojevi su pokazali specifično inhibitorno djelovanje prema *N*-acetilglukozaminidazi, ali ne i antimikrobno djelovanje. Također su zabilježene izolacije noformicina **113**⁵² s antivirusnim djelovanjem⁵³; inhibicijskim učinkom prema inducibilnoj sintazi dušikovog oksida⁵⁴. Drugi derivati iminopiroglutaminske kiseline **114-115** su aktivnost pokazali u inhibiciji bakterije *Erwinia amylovora*, koja je odgovorna za gljivičnu bolest plamenjaču stabala jabuke i kruške⁵⁵ (Slika 21).



Slika 21. Strukture pirostatina A **112a** i B **112b**, noformicina **113**, te derivati iminopiroglutaminske kiseline **114-115** kao prirodni produkti

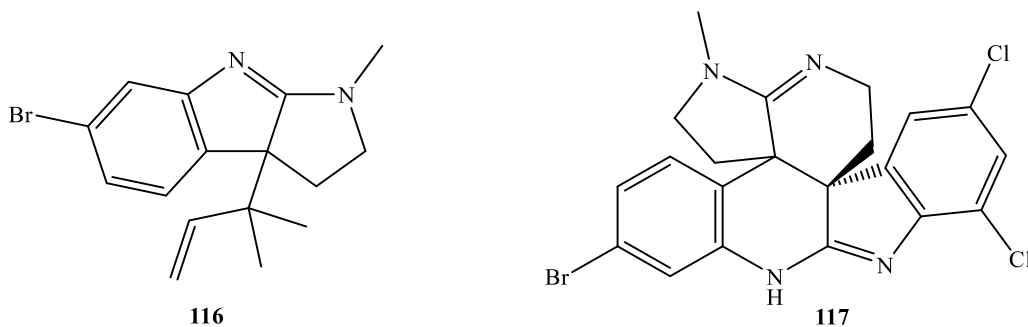
2.5.2. Prirodni amidini iz morskih beskralješnjaka

2.5.2.1. Flustramin C

Flustramin C **116** izoliran je iz mahovnjaka *Flustra foliacea* (L.)^{56,57}. Ovaj spoj posjeduje amidinski dio u strukturi bromiranog pirolindola s 1,1-dimetilalilnom skupinom (Slika 22). Pretpostavlja se da su alkaloidi Flustra važni za mahovnjake kontroliranjem rasta bakterija na njihovoj površini⁵⁸.

2.5.2.2. Peroforamidin

Peroforamidin **117** (Slika 22), halogenirani alkaloid, izoliran je iz filipinske ascidije *Perophora namei* Hartmeyer i Michaelson (Perophoridae)⁵⁹. Ovaj spoj sadrži kondenzirani heksahidropirolpiridin, indol i dihidrokinolin prstenovi. Amidinski dijelovi postoje na fuzijski dio indolnog i kinolinskog prstena.



Slika 22. Strukture flustramina C **116** i peroforamidina **117**

2.6. Organometalna kemija

2.6.1. Općenito o organometalnoj kemiji

Organometalna kemija zasnovana je na reakcijama klase spojeva (R-M) koje sadrže kovalentnu vezu između ugljikova atoma i metala. Takvi se spojevi priređuju ili direktnom reakcijom metala s organskim spojem ili putem zamjene metala nekom drugom organometalnom tvari. Organometalna kemija je također poznata po mnogim istraživanjima poput sinteze klastera, derivata glavne skupine elemenata u neobičnim oksidacijskim stanjima, organometalnih polimera, nestabilnih organometalnih spojeva i intermedijera u matricama, a zatim po određivanju strukture organometalnih spojeva u čvrstom i plinovitom stanju pomoću rendgenske difrakcije, odnosno elektronske difrakcije, mehanizmima reakcija prijelaznih sililena i sličnih vrsta. Osim tradicionalnih metala i polumetala, elementi poput selena, litija i magnezija tvore organometalne spojeve, npr. organomagnezijevi spojevi poput MeMgI, jod (metil)magnezij i dietilmagnezij koji su Grignardovi reagensi ili organo-litijev spoj BuLi, butillitij. Općenito, organometalni spojevi nalaze praktičnu primjenu i kao katalizatori, te u preradi naftnih proizvoda ili u proizvodnji organskih polimera⁶⁰.

2.6.1.1. Nastajanje nove C-C veze

Prijelazni metali i njihovi kompleksi značajno utječu na odvijanje organskih reakcija pa je tako bitno istaknuti reakciju stvaranja nove C-C veze putem reakcije križnog spajanja koja je nedvojbeno najvažnija i najčešće korištena reakcija posljednjih godina.

Paladij omogućuje sintezu složenih i funkcionaliziranih organskih molekula i njegova kemija posjeduje različite zanimljive aspekte kao što su heterogena i homogena kataliza pod blagim eksperimentalnim uvjetima kompatibilna s mnogim funkcionalnim skupinama. Poznato je i tijekom zadnjih godina razvijeno nekoliko reakcija križnog spajanja koje su katalizirane paladijem, kao što su Heckova reakcija, Suzuki-Miyaura reakcija, Sonogashira reakcija, Stilleova reakcija, Hiyama reakcija, Negishi reakcija, Kumada reakcija, Murahashi reakcija i Buchwald-Hartwigova reakcija⁶¹.

Tri specifične reakcije koje karakteriziraju reakciju križnog spajanja kataliziranu paladijem jesu: a) oksidativna adicija (OA) organskog halida na paladij (0) kako bi se formirao kompleks paladija (II); b) transmetaliranje (TM), tj. prijenos organskog dijela organometalnog reagensa u središte paladija (II); i c) reduktivna eliminacija (RE) da se formira nova veza ugljik-ugljik i regenerira paladij (0) katalizator⁶².

2.6.2. Suzuki-Miyaura reakcija

Od svog otkrića 1979. godine, Suzuki-Miyaura reakcija, koja uključuje spajanje organoborovog reagensa i organskog halida ili pseudo-halida u prisutnosti paladija ili nikla kao katalizatora i baze, postala je jedna od najčešće korištenih metoda za konstrukciju nove C-C veze⁶³.

U tom kontekstu, Suzuki-Miyaura križno spajanje uz korištenje organoborovih spojeva pokazala se kao važna metoda prvenstveno radi svoje operativne jednostavnosti, ekološki benigne prirode i toplinske stabilnosti spojeva za transmetaliranje. Iako su organoborovi spojevi jako elektrofilni, organski supstituenti na boru su slabo nukleofilni. Također, koordinacija s negativno nabijenom bazom na atomu bora može povećati nukleofilnost organskog supstituenta na boru. Suzuki i Miyaura su istodobno shvatili da organoborovi spojevi, čak organoborne kiseline i esteri, imaju dovoljnu reaktivnost za transmetaliranje u razne metale kao što su srebro(I), magnezij(II), cink(II), aluminij(II), kositar(IV), bakar(I) i živa(II)⁶⁴.

2.6.2.1. Katalizatori za Suzuki-Miyaura reakciju križnog spajanja

Dominantni katalizatori u Suzuki-Miyaura križnom spajanju s arilnim, alkenilnim, benzilnim i alilnim halidima i triflatima su PdCl₂ i Pd(PPh₃)₄⁶⁵, no međutim, postoje i neke mane u korištenju samog paladija u ovoj reakciji križnog spajanja.

Mogu se koristiti samo arilni bromidi i jodidi jer kloridi sporo reagiraju. Često se formiraju nusprodukti kao što su tzv. „*self-coupling products*“ te produkti koji imaju fosfin vezan za arilnu skupinu. To se upravo odnosi na spomenuti najčešće korišteni katalizator, Pd(PPh₃)₄, gdje se fenilna skupina PPh₃ „ugradi“ u produkte dajući miješane derivate. Za izbjegavanje ove vrste sporednih reakcija te dobivanje željenih produkata često se koristi glomazni fosfinski ligand (*o*-MeOC₆H₄)₃P u uvjetima bez kisika-pri čemu se izbjegava dobivanje „homocoupling“ produkata⁶⁶.

Ni(0) katalizatori su bili uspješno korišteni za Suzuki-Miyaura reakciju u slučaju manje reaktivnog arilnog klorida i mesilata. Ni katalizatori imaju prednosti u odnosu na Pd/fosfinske komplekse; reaktivniji su i često jeftiniji od Pd kompleksa. Ni-katalizirane reakcije općenito karakterizira visoka stabilnost na zraku, lakoća pripreme i odvajanje katalizatora od produkta iz reakcijske smjese. Utvrđeno je da su Ni kompleksi bolji katalizatori nego njihovi pripadajući Pd kompleksi jer je Ni manji atom u usporedbi s Pd, pri čemu je vrlo praktičan za pripravu sterički ometenih bis-arila koji su korisni za sintezu prirodnih produkata jer se Ni kompleksi mogu približiti arilnom halogenidu lakše nego Pd u koraku oksidativne adicije⁶⁶. Kompleks Ni(0); Ni(PPh₃)₄, je vrlo osjetljiv i nestabilan na zraku, toksičan, stoga se obično ne koristi u Suzuki-Miyaura reakciji križnog spajanja. Ni(0) kompleks pripremljen *in situ* iz NiCl₂(dppf) ili NiCl₂(PPh₃)₂/2PPh₃ i *n*-BuLi (4 ekv.) je učinkovit katalizator^{67,68,69}. Upotreba dodatnih fosfinskih liganada s NiCl₂(dppf) ili NiCl₂(PPh₃)₂ često je bila korisna za dobivanje visokih iskorištenja produkata reakcije križnog spajanja⁶⁶.

2.6.2.2. Baze za Suzuki-Miyaura reakciju križnog spajanja

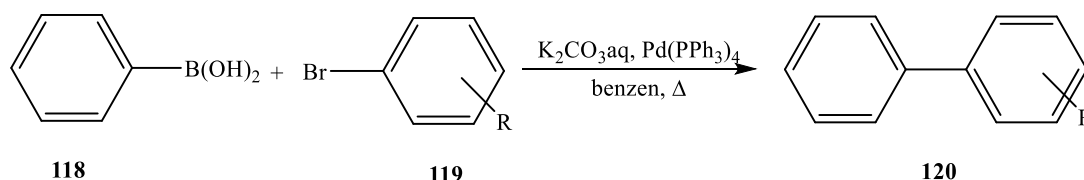
Najčešće korištena baza u Suzuki-Miyaura reakciji križnog spajanja je Na₂CO₃, ali je često neučinkovita za sterički ometene supstrate. U takvim slučajevima, baze Ba(OH)₂ ili K₃PO₄ korištene su za dobivanje visokih iskorištenja produkata. Ostale korištene baze su Cs₂CO₃, K₂CO₃, TIOH, KF i NaOH⁶⁶. Jače baze kao što su NaOH, TIOH i NaOMe se dobro ponašaju u sustavima otapala THF/H₂O, dok su K₂CO₃ i K₃PO₄ učinkovitiji u DMF-u⁶⁴.

Poznato je da je baza uključena u koordinacijsku sferu paladija i za stvaranje $\text{Ar-PdL}_2\text{-OR}$ iz $\text{Ar-PdL}_2\text{-X}$ za koji je poznato da ubrzava korak transmetaliranja⁶⁶.

2.6.2.3. Mehanistički aspekt Suzukijeve reakcije

Kao i druge reakcije unakrsnog spajanja, ova reakcija tipično se odvija kroz:

- 1) *oksidativnu adiciju* aril, alkenil ili alkil halogenida ili pseudohalogenida na niskovalentni metalni kompleks,
- 2) *transmetaliranje* s alkilbornom komponentom i
- 3) *reduktivna eliminacija* da bi se dobio produkt reakcije križnog spajanja i metalni kompleks za ponovno korištenje u sljedećem katalitičkom ciklusu. U većini slučajeva, oksidativna adicija je najsporiji stupanj-određuje brzinu reakcije. Elektronski karakter alkilnih skupina kao i priroda halida ili pseudohalida uvelike utječe na brzinu oksidativne adicije. Najčešće korišteni katalizatori u Suzuki Miyaura križnom spajanju s aril, alkenil, benzil i alil halidima i triflatima su PdCl_2 i $\text{Pd(PPh}_3)_4$, ali je utvrđeno da su neuspješni za stvaranje alkil-alkil veze⁶⁴.

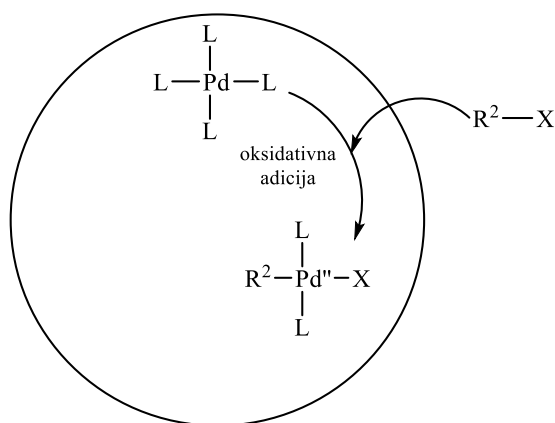


Shema 25. Klasična Suzuki-Miyaura reakcija⁷⁰

U Suzukijevom (Shema 29) kao i u Stilleovom mehanizmu potrebna je aktivacija, pa se tako u Suzuki-Miyaura reakciji borna kiselina mora aktivirati, primjerice s bazom. Aktivaciju atoma bora karakterizira polarizacija organskog liganda koja i olakšava transmetaliranje⁷⁰.

2.6.2.3.1. Oksidativna adicija

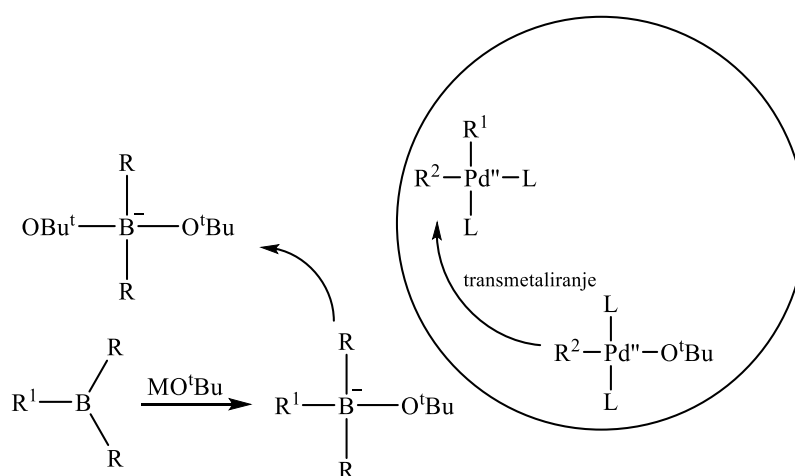
Spajanjem paladijevog katalizatora na alkil-halid u početku nastaje organopaladijev kompleks (Shema 26). Kompleks je na početku u *cis* konfiguraciji, ali izomerizira u *trans* konfiguraciju. Stereokemija je u reakcijama s vinil-halidima zadržana, ali inverzija stereokemije se javlja kod alilnih ili benzilnih halogenida⁷⁰.



Shema 26. Oksidativna adicija u katalitičkom ciklusu⁷⁰

2.6.2.3.2. Transmetaliranje

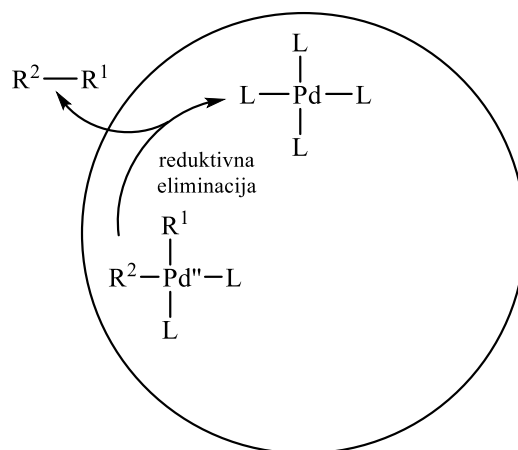
Uloga baze u Suzuki-Miyaura reakciji je aktiviranje reagensa koji sadrži bor, ali i olakšava formiranje R^1Pd-OR iz R^1Pd-X (Shema 27). Reakcija se ne odvija bez prisutnosti baze. Točan mehanizam nije u potpunosti razjašnjen⁷⁰.



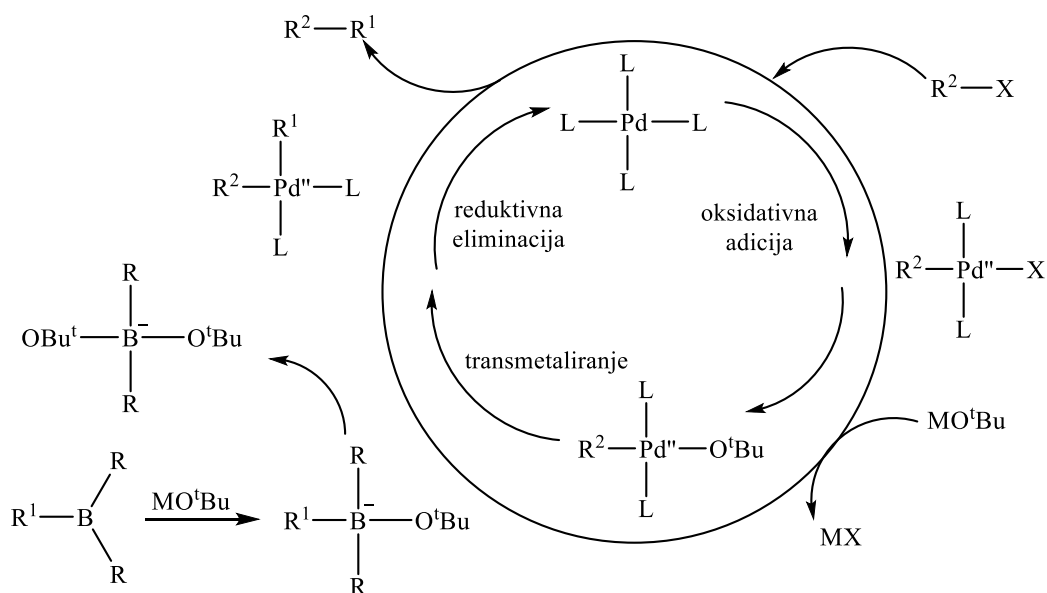
Shema 27. Mehanizam transmetaliranja⁷⁰

2.6.2.3.3. Reduktivna eliminacija

Ovaj završni korak katalitičkog ciklusa daje željeni produkt, ali i regenerira paladijev katalizator tako da on može ponovno sudjelovati u katalitičkom ciklusu (Shema 28). Kompleks se obavezno vraća natrag u *cis* konfiguraciju prije nego što dođe do reduktivne eliminacije⁷⁰.



Shema 28. Mehanizam reduktivne eliminacije⁷⁰

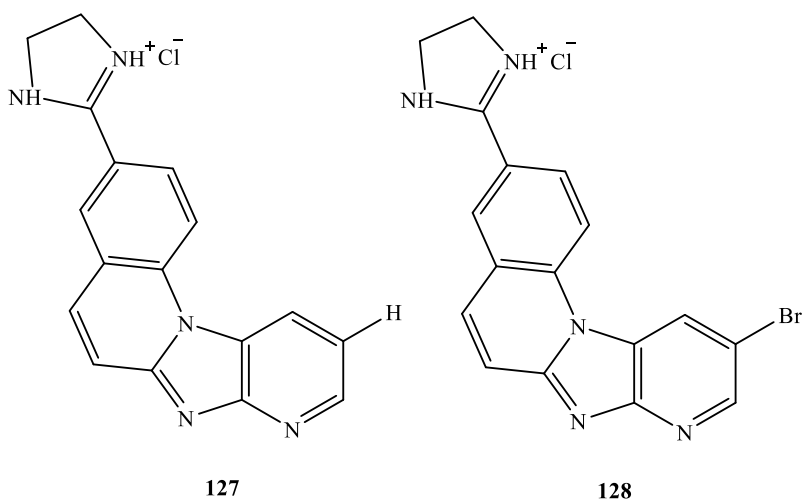


Shema 29. Cjeloviti mehanizam reakcije Suzukijevog križnog spajanja⁷⁰

2.7. Biološka aktivnost amidino-supstituiranih imidazo[4,5-*b*]piridina

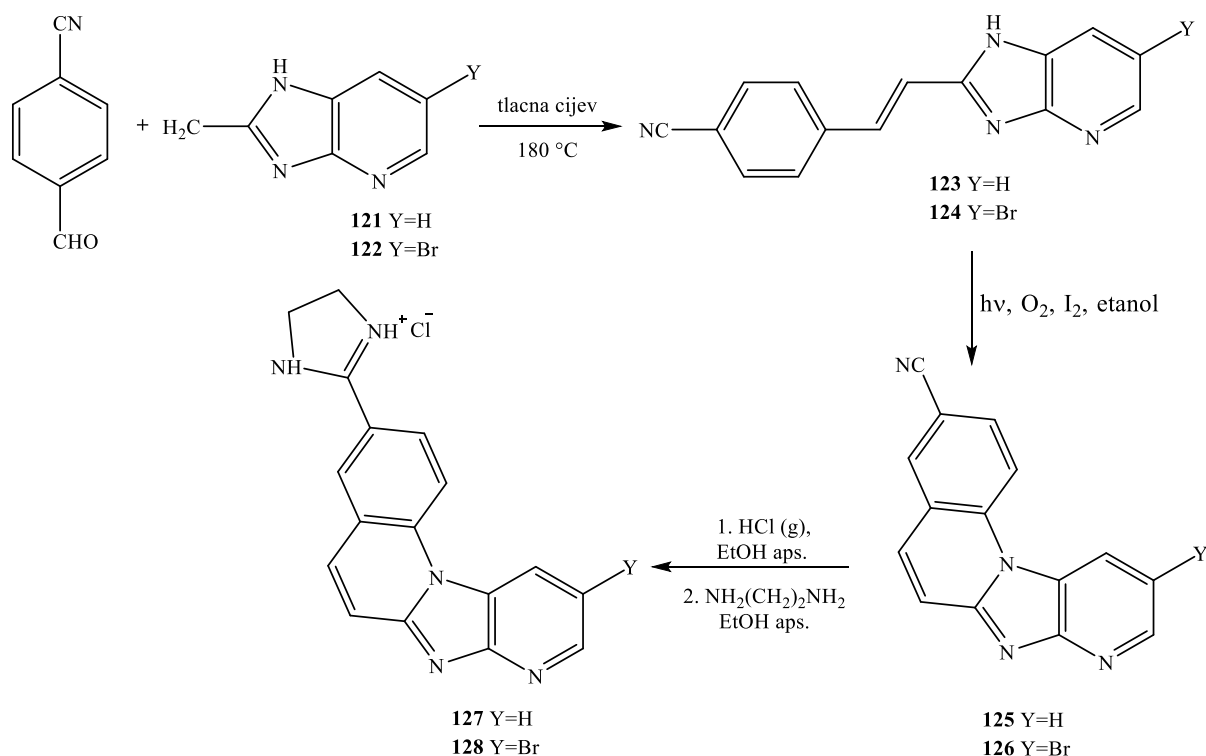
Imidazo[4,5-*b*]piridini su temeljna strukturna jedinica mnogih medicinskih i biokemijskih agenasa koji posjeduju različita kemijska i fizikalna svojstva, a budući je jedna od važnijih farmakofornim skupina, poboljšava i farmakološka svojstva te takvi derivati imaju značajnu biološke aktivnost poput^{71,72} antitumorske, antivirusne, antimitotske, protuupalne ili tuberkulostatske^{73,74,75}. Osim toga, mogu djelovati i kao antagonisti različitih bioloških receptora, npr. angiotenzina-III, faktora aktivacije trombocita (PAF)², metabotropnog glutamata podtipa V3 i AT1 receptora^{76,77,78,79}.

M. Hranjec i suradnici⁸⁰ su 2011. godine sintetizirali 2-imidazolinil-supstituirane tetracikličke derivate imidazo[4,5-*b*]piridina **127-128** kojima je ispitana antiproliferativna aktivnosti na sedam staničnih linija humanih tumorskih stanica.



Slika 121. Strukture 2-imidazolinil supstituiranih triaza-benzo[*c*]fluorena **127-128**⁸⁰

Cijano-supstituirani *E*-2-stiril-imidazo[4,5-*b*]piridini **123-124** priređeni su u vrlo dobrim iskorištenjima reakcijama kondenzacije između odgovarajućih 2-metilimidazo[4,5-*b*]piridina **121-122** i *p*-cijanobenzaldehida u tlačnim cijevima na 180 °C. Cijano-supstituirani triaza-benzo[*c*]fluoreni **125-126** priređeni su fotokemijski izlaganjem etanolnih otopina spojeva **123-124** isijavanju visokotlačne živine lampe. Tijek reakcija praćen je UV/Vis spektroskopijom. 2- imidazolinil-supstituirani triaza-benzo[*c*]fluoreni **127-128** pripremljeni su kao hidrokloridne soli Pinnerovom reakcijom sinteze amidina.

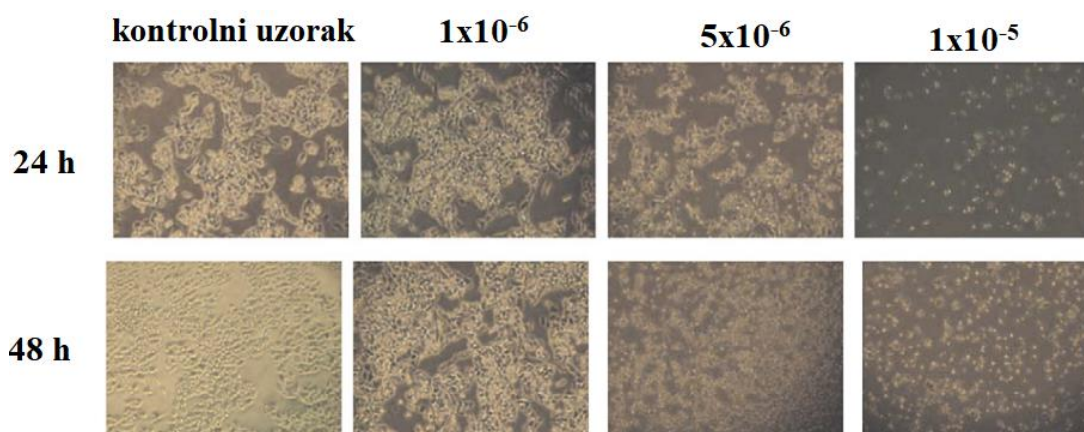


Shema 30. Sinteza 2-imidazolininih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina⁸⁰

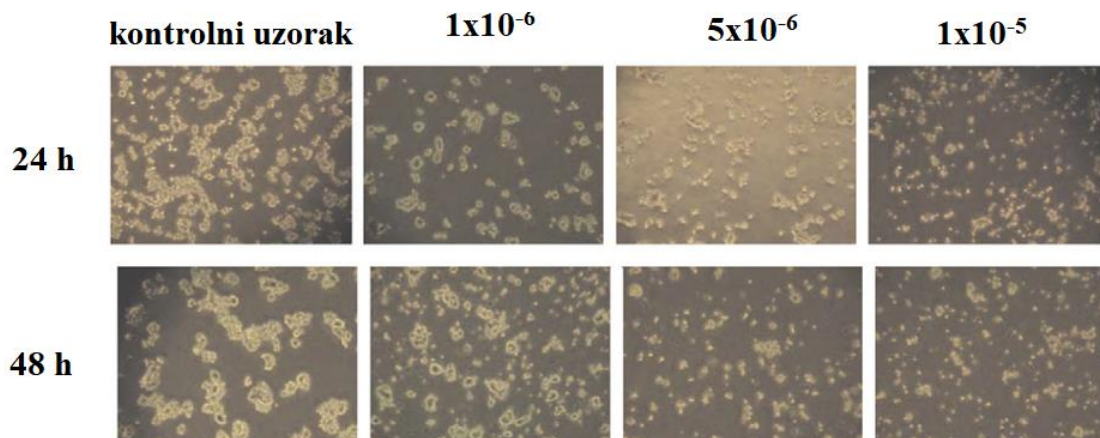
Novosintetiziranim imidazo[4,5-*b*]piridinima **127-128** testirano je njihovo antiproliferativo djelovanje *in vitro* na sedam humanih staničnih linija izvedenih iz različitih tipova tumora; HeLa (karcinom grlića maternice), SW620 (kolorektalni adenokarcinom, metastatski), MiaPaCa-2 (karcinom gušterače), MCF-7 (epitel dojke adenokarcinom, metastatski), HEP-2 (epidermoidni karcinom larinksa) i SK-BR-3 (adenokarcinom dojke, metastatski) kao i normalni diploidni humani fibroblasti (WI38). Među triaza-benzo[*c*]fluorenima, otkriven je najjači nespecifični učinak na sve stanične linije pri mikromolarnim koncentracijama (0,1-10 mM) za triaza-benzo[*c*]fluorene **127** i **128** koji nose 2-imidazolinilni amidinski supstituent. Uočeno je izraženo antitumorsko djelovanje spoja **127** na adenokarcinom dojke (SK-BR-3) i kolorektalni adenokarcinom (SW620). Ispitan je morfološki izgled stanica MiaPaCa-2 i SW620 tretiranih spojem **127** (Slike 122 i 123). Promjene u staničnoj morfologiji tipične za apoptozu, kao što su skupljanje stanica i kondenzacija kromatina u stanicama SW620 tretiranim sa spojem **127** (5 i 10 mM), kao i u stanicama MiaPaCa-2 tretiranim s najvećom testiranom koncentracijom (10 mM) istog spoja.

Kada su tretirane nižim koncentracijama spoja **127**, većina stanica MiaPaCa-2 postala je vidljivo povećana, što odgovara zaustavljanju S-faze staničnog ciklusa.

Osim toga, izlaganje stanica SW620 najnižoj testiranoj koncentraciji (1 mM) ovog spoja rezultiralo je staničnom morfologijom koja podsjeća na onu pronađenu u stanicama koje su podvrgnute zaustavljanju staničnog ciklusa, što je u korelaciji sa zaustavljanjem S-faze otkrivenim nakon 24 i 48 sati tretmana. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da spoj **127** potaknuo apoptozu u stanicama MiaPaCa-2 i SW620 ovisno o dozi, što bi se moglo pripisati njegovoj sposobnosti da interkalira u DNK⁸⁰.



Slika 122. MiaPaCa-2 stanice tretirane sa spojem **127** 24 i 48 h⁸⁰

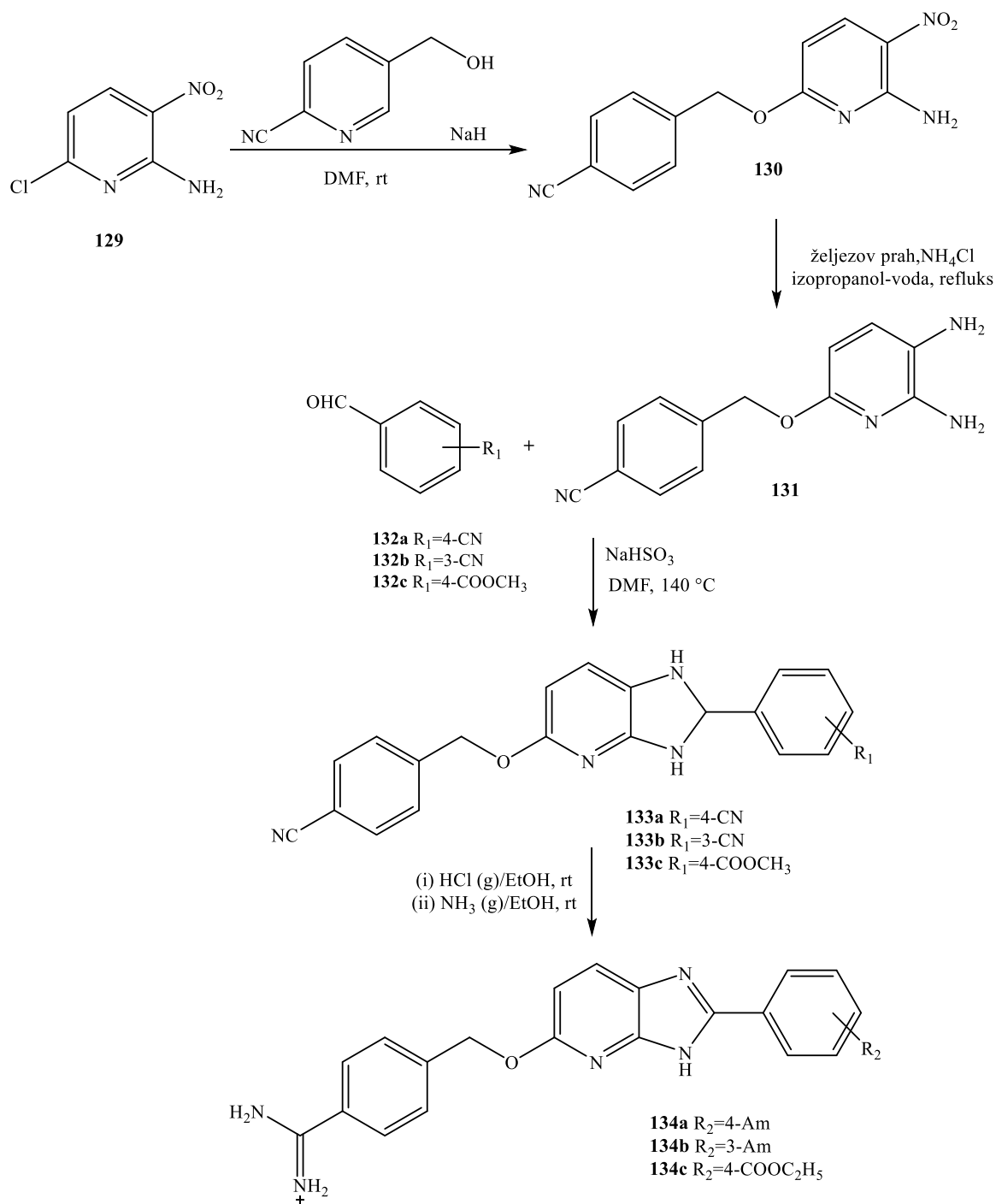


Slika 123. SW620 stanice tretirane sa spojem **127** 24 i 48 h⁸⁰

Spojeve koji su kandidati za klinička ispitivanja, od kojih su već neki i ušli u sama ispitivanja, sintetizirala je grupa znanstvenika sa Sveučilišta u Georgiji predvođenih Yun Chai-em 2014. godine⁸¹. Vođeni izvrsnim rezultatima bioloških aktivnosti prethodno sintetiziranih spojeva, počeli su razmišljati o potencijalnim modifikacijama istih kako bi dobili mogućnost prepoznavanja specifičnih DNK sekvenci.

Heterocikličkih kationi supstituirani s azabenzimidazolskim prstenom sintetizirani u ovom istraživanju dizajnirani su s ciljem uspostavljanja specifičnog prepoznavanja miješanih parova baza u DNK sekvenci. Najuspješniji spoj, **134a**, imao je azabenzimidazol za prepoznavanje G i dodatne modifikacije za uspostavljanje interakcija s malim utorom u DNK. Spoj se veže se za DNK –AAAGTTT– jače od čistog –AAATTT– područja bez G-C a, što ukazuje na uspjeh ovakvog dizajna spoja. Interakcije spojeva s različitim sljedovima DNK s i bez G-C parova baza procijenjeni su analizom toplinskog taljenja, cirkularnim dikroizmom, fluorescencijom emisijskom spektroskopijom, rezonancijom površinskih plazmona i molekularnim modeliranjem⁸¹. Proširenje sposobnosti prepoznavanja DNK sekvenci spojevima koji se vežu u mali utor moglo bi proširiti terapijske mete i imati utjecaj u mnogim područjima, kao što je modulacija faktora transkripcije. Dizajn i priprava spojeva koja mogu prepoznati sekvence miješanih parova baza u DNK koji sadrže kombinacije A-T i G-C parova baza bili su od dugoročnog interesa. Počevši od sredine 1980-ih, napravljen je korak naprijed s radom u laboratorijima Dickersona i Lowna na redizajniranju poliamida koji se vežu u mali utor DNK - netropsin i distamicin, koji specifično prepoznaju i vežu A-T parove baza u sintetske spojeve koji bi se također mogli vezati na G-C parove baza u malom utoru^{82,83}.

Za razliku od netropsina i distamicina, druge vrste A-T specifičnih veznih heterocikličkih kationa, kao što su furamidin, DAPI, pentamidin i ostali, ostvaruju kovalentne interakcije s malim utorom u DNK, imali su velike uspjehe kao terapijska sredstva^{84,85}. Zanimljivo je da nije postignut redizajn spomenutih spojeva za njihovo prepoznavanje mješovitih parova baza, pa je ujedno to i bila motivacija znanstvenog tima Yun Chai-ja⁸¹ jer bi takvi novi agensi imali potencijalnu primjenu primjerice u usmjeravanju transkripcijskih faktora (TF) za modulaciju ekspresije gena⁸⁶. S obzirom da su različite funkcije i bolesti kontrolirane od strane transkripcijskih faktora, postoji problem što su oni evoluirali da se vežu na nukleinske kiseline velike molekulske mase, a ne na male organske molekule^{87,88}. Zanimljivo je da je, ukoliko se sintetizirani spojevi preferirano vežu u A-T područje DNK koje također sadrži jedan ili dva G-C para baza moguće je ciljati PU.1 TF-DNK kompleks koji ima ključnu važnost u razvoju akutne mijeloične leukemije (AML)⁸⁹. Sinteza spoja **134a** koji značajno prepoznaje i veže se na G-C par baza u A-T sekvenci prikazana je na Shemi 31⁸¹.

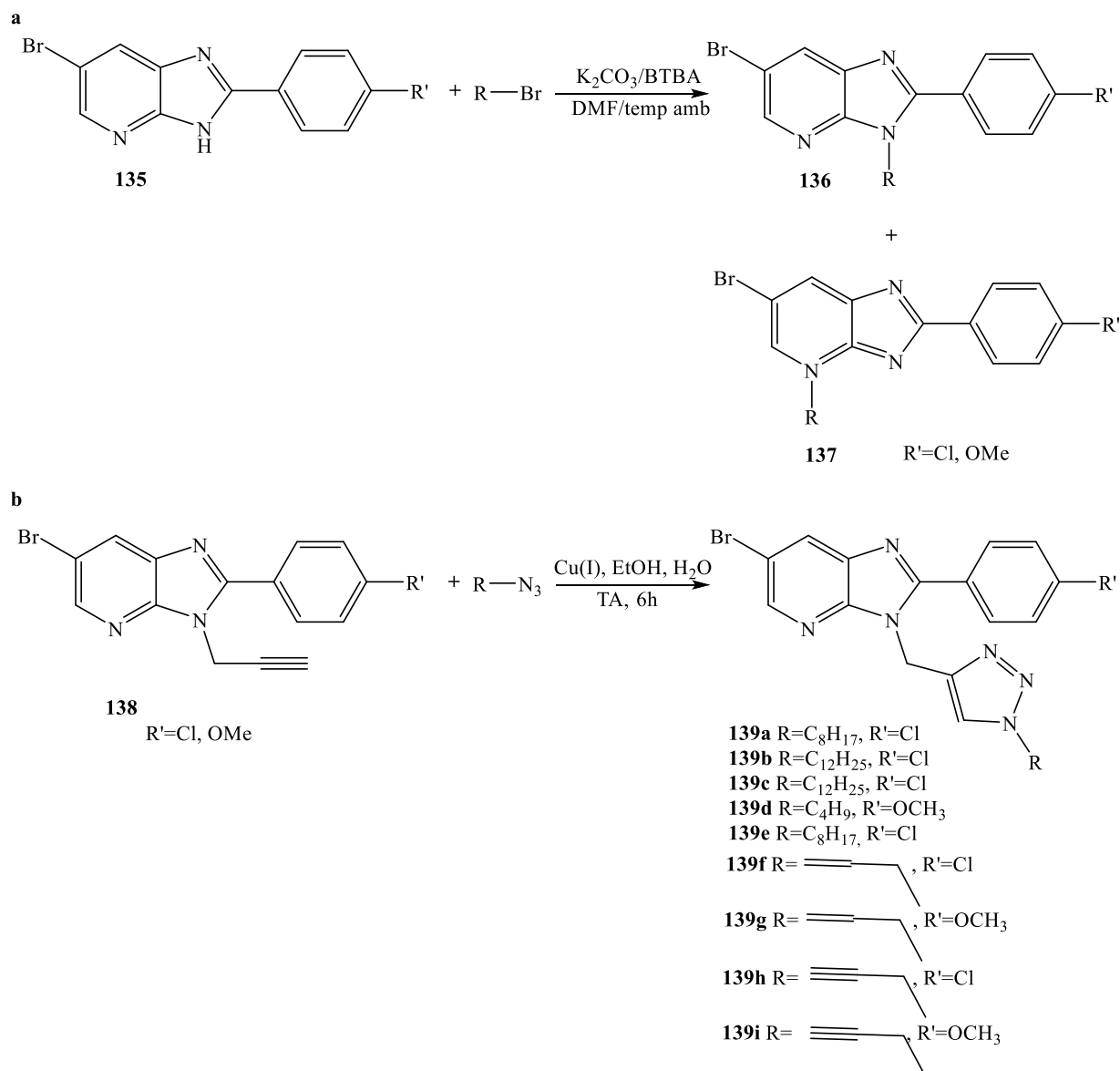


Shema 31. Sinteza spoja 134a⁸¹

Amino-6-klor-3-nitropiridin **129** reagira s 4-hidroksimetilbenzonitrilom u prisutnosti natrijevog hidrida u suhom DMF-u kako bi se dobio spoj **130**. Nakon toga, redukcijom nitro skupine **130** sa željeznom prašinom u smjesi 2-propanol/voda na refluksu dobije se diamin **131**. Komercijalno dostupna zamjena benzaldehidima, **132a-c** reagira s diaminom **131** uz natrijev bisulfit u bezvodnom DMF-u na temperaturi refluksa pri čemu su priređeni azabenzimidazolni međuprodukti **133a-c**, odnosno intermedijeri bis-nitrila.

Oni su Pinnerovom metodom prevedeni u bis-imidatne estere hidrokloride koji su zatim prevedeni u hidrokloridnu sol diamidina **134a-c** miješanjem s etanolom zasićenim plinovitim amonijakom⁸¹.

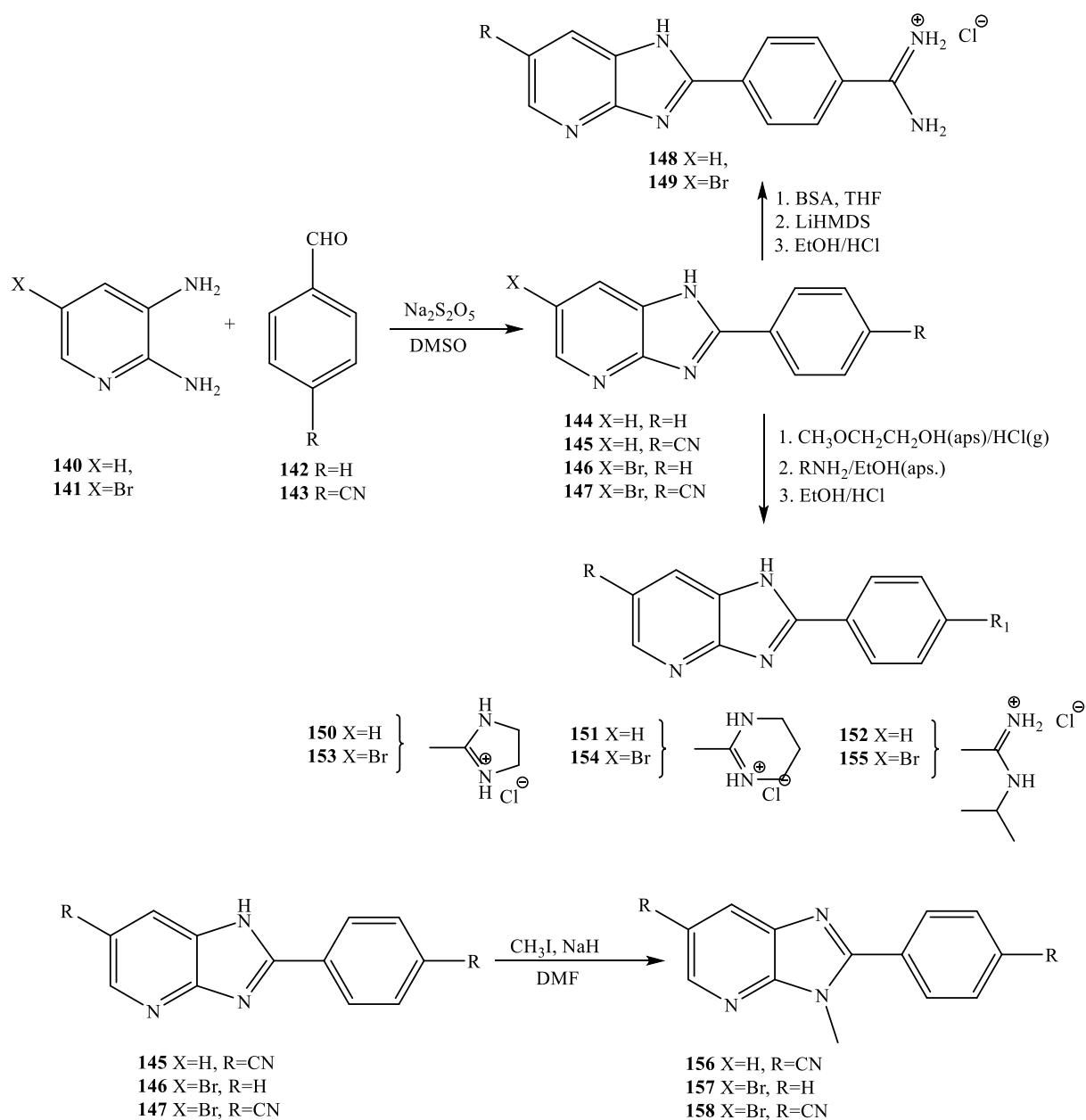
Skupina znanstvenika⁹⁰ sintetizirala je seriju od 9 novih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina kojima je ispitana biološka aktivnost *in vitro* korištenjem parentalnih (PAR) i multirezistentnih (MDR; ABCB1-prekomjerno izražen) stanica mišjeg T-limfoma. Ispitani derivati imidazo[4,5-*b*]piridina sintetizirani su alkiliranjem (Shema 32 a) i 1,3-dipolarnom cikloadicijom (Shema 32 b). Kondenzacijom 5-brom-2,3-diaminopiridina s 4-klorbenzaldehydom ili 4-metoksi-benzaldehydom u vodi 48 h na 100°C u prisutnosti I₂ dobiven je spoj **135**⁹¹. Derivati **136**, **137**, **138** dobiveni su reakcijom spoja **135** s monohalogeniranim reagensima pod uvjetima katalitičkog prijenosa faze, korištenjem tetra-*n*-butilamonijevog bromida (BTBA) kao katalizatora, K₂CO₃ kao baze i *N,N*-dimetilformamida kao otapala⁹². Spoj **139** dobiven je kondenzacijom azida s acetilenskim spojevima, 1,3-dipolarnom cikloadicijom. Rezultati su pokazali da pet spojeva (**139c**, **139b**, **139f**, **139d** i **139h**) imaju umjerenu citotoksičnost na MDR staničnoj liniji, dok derivat **139i** postiže vrlo nisku IC₅₀ vrijednost. Spojevi s dugim ugljikovim lancem ($n > 4C$) nemaju izraženu modulacijsku aktivnost efluksne pumpe⁹⁰. Spojevi **139h** i **139i** alkilirani su s propargilnom skupinom, međutim, **139i** ima metoksi, a **139h** klor kao supstituent. Usporedbom njihove inhibitorne aktivnosti ABCB1 pumpe, može se zaključiti da je metoksi skupina najpovoljnija za aktivnost. No, aktivnost spoja **139f** veća je od spoja **139g**. Poboľšanje aktivnosti za spoj koji sadrži klor kao supstituent može se pripisati položaju ugljikovog lanca (kod spoja **139f** na položaju 4, a kod **139g** na položaju 3), to znači alkiliranje na položaj 4- doprinosi poboljšanoj aktivnosti MDR-a. Isto tako, spojevi **139a** i **139e** oba imaju dugi bočni lanac, ali spoj **139a** sadrži triazolnu skupinu kao supstituent. Prisutnost heteroatoma na bočnom lancu, a posebice dušika, ima velik utjecaj na MDR kod ovakvih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina⁹⁰.



Shema 32. Sinteza ciljanih spojeva⁹⁰

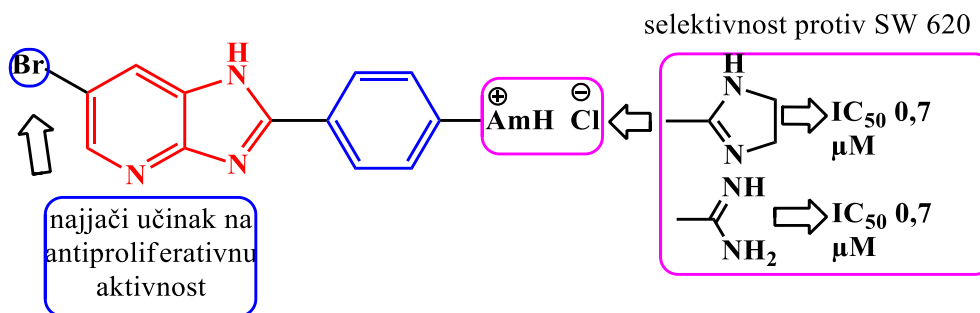
2023. sintetizirana je i ispitana biološka aktivnost serije cijano- i amidino-supstituiranih imidazo[4,5-*b*]piridina⁹³ prema Shemi 33. Ispitivanje biološke aktivnosti spojeva uključivalo je procjenu antiproliferativnog učinka na različite linije humanih tumorskih stanica, antibakterijsku aktivnost protiv izabranih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija i antivirusnu aktivnost prema raznim vrstama DNK i RNK virusa. Najistaknutija antiproliferativna aktivnost opažena je za spoj **149** koji sadrži nesupstituiranu amidino-skupinu i spoj **153** koji sadrži 2-imidazolinilnu amidino skupinu, a oba su pokazala selektivnu i jaku aktivnost u submikromolarnom koncentracijskom rasponu protiv stanica karcinoma debelog crijeva (IC₅₀ 0.4 i 0.7 μM). Gotovo svi spojevi nisu pokazali antibakterijsku aktivnost, a iznimka je spoj **153**, koji je pokazao umjerenu aktivnost protiv *E. Coli* (MIC 32 μM).

Brom-supstituirani derivat **146** s nesupstituiranim fenilnim prstenom (EC_{50} 21 μ M) i *para*-cijano-supstituirani derivat **156** (EC_{50} 58 μ M) pokazali su selektivnu, ali umjerenu aktivnost protiv respiratornog sincicijskog virusa. Prekursori **144-147** pripremljeni su iz odgovarajućih 2,3-diaminopiridina **140-141** i benzaldehida **142-143** u umjerenim do visokim iskorištenjima (58–94%), u reakciji ciklokonenzacije u DMSO s $Na_2S_2O_5$. Ciljani spojevi **148** i **149** koji sadrže nesupstituiranu amidino skupinu sintetizirani su s LiHMDS.



Shema 33. Sinteza amidino-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **148-149** i **150-155**⁹³

Supstituirani amidino spojevi **150-155** pripremljeni su pomoću Pinnerove reakcije u dva stupnja u 2-metoksietanolu. Tijek stupnja reakcije praćen je IR spektroskopijom kako bi se potvrdila konverzija cijano-supstituiranih analoga **145** i **147** u međuprodukt imino-ester. Ciljani amidini sintetizirani su u drugom stupnju iz imino-estera i odgovarajućih amina, pri čemu su dobivena umjerena iskorištenja (42–70%). Kako bi se istražio biološki potencijal amidino-supstituiranih spojeva **148-149** i **150-155**, i *N*-metil-supstituiranih derivata **156-158** imidazo[4,5-*b*]piridina, *in vitro* je određeno antiproliferativno, antibakterijsko i antivirusno djelovanje. Prekursorima **144-147** (osim derivata **146** radi smanjene topljivosti) i svi sintetiziranim imidazo[4,5-*b*]piridinima **148-149**, **150-155** i **156-158** je *in vitro* testirana antiproliferativna aktivnost na stanične linije raka: LN-229—glioblastom, Capan-1—adenokarcinom gušterače, HCT-116—kolorektalni karcinom, NCI-H460—karcinom pluća, DND-41—akutna limfoblastična leukemija, HL-60—akutna mijeloična leukemija, K-562—kronična mijeloična leukemija i Z-138—stanice raka non-Hodgkinovog limfoma. Brom-supstituirani spoj **153** koji u strukturi sadrži 2-imidazolinilnu skupinu pokazao je najjači učinak (IC_{50} od 8,0 do 49,7 μM). Najizraženiji učinak je taj spoj pokazao protiv glioblastoma (IC_{50} 8,0 μM), non-Hodgkinovog limfoma (IC_{50} 8,4 μM), adenokarcinoma gušterače (IC_{50} 9,4 μM) i stanica akutne mijeloične leukemije (IC_{50} 9,5 μM). Spoj **154** supstituiran s šesterocikličkom amidino skupinom pokazao selektivno djelovanje protiv akutne limfoblastične leukemije (IC_{50} 17,0 μM). Među amidino- i brom- supstituiranim imidazo[4,5-*b*]piridinima, spoj **149** koji u strukturi sadrži nesupstituiranu amidino skupinu nije pokazao nikakvu aktivnost, dok izopropil-amidino supstituirani derivat **155** pokazao aktivnost protiv akutne limfoblastične leukemije (IC_{50} 11,9 μM) i non-Hodgkinovog limfoma (IC_{50} 12,1 μM). Nesupstituirani derivati s bromom **150-152** pokazali su se znatno manje aktivnima u usporedbi s brom-supstituiranim derivatima **153-155**. Općenito, može se zaključiti da je obećavajuća aktivnost primijećena brom supstituirani derivat **149** s nesupstituiranom amidino skupinom na fenilnom prstenu i spoj **153**, brom-supstituirani derivat koji sadrži 2-imidazolinilnu skupinu na fenilnom prstenu. Oba derivata pokazala su inhibitorno djelovanje u submikromolarnim koncentracijama protiv karcinoma debelog crijeva (SW 620), s IC_{50} vrijednostima 0,4 odnosno 0,7 μM . *N*-metil supstituirani derivat **157** pokazao je smanjeno antiproliferativno djelovanje u usporedbi s *N*-nesupstituiranim analogima **145–147**. Svim sintetiziranim derivatima određena je antibakterijska aktivnost na četiri različite vrste bakterija. Ispitivanje Gram-pozitivnih bakterija uključivalo je *S. aureus* i *S. Pneumoniae*, a Gram-negativnih dvije vrste *E. coli*.



Slika 124. SAR vezan za *in vitro* antiproliferativnu aktivnost⁹³

Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da su svi derivati imidazo[4,5-*b*]piridina ne pokazuju antibakterijsku aktivnost, s MIC vrijednostima > 64 μM. Spoj **153** supstituiran s bromom na piridinskoj jezgri koji sadrži 2-imidazolinilnu skupinu na fenilnom prstenu pokazao je umjerenu aktivnost protiv *E. Coli* (MIC 32 μM). Svim priređenim imidazo [4,5-*b*]piridinima **144-158** također je testirana je njihova citotoksičnost na tri virusne stanične linije domaćina (HEL 299, Huh7 i MDCK) kao i antivirusna aktivnost protiv nekoliko virusa (humani koronavirus 229E, NL63 i OC43; virus influence A i B; respiratorni sincicijski virus; herpes simplex virus-1; virus žute groznice; Zika virus i sindbis virus). Rezultati su izraženi kao CC₅₀ (50% citotoksična koncentracija) i EC₅₀ (50% učinkovita koncentracija). Za procjenu mogućeg antivirusnog djelovanja sintetiziranih derivata, njihov citotoksični učinak na stanične linije domaćina virusa prvo je određen korištenjem kolorimetrijski s MTS testom. Derivati **144**, **150**, **152** i **154** bili su blago citotoksični, s vrijednostima CC₅₀ iznad 30 μM na jednoj ili dvije testirane stanične linije domaćina. Najizraženija citotoksičnost uočena je za brom-supstituirani spoj **153** koji nosi 2-imidazolinilnu amidino skupinu. Slično antiproliferativnim rezultatima, među amidino- i brom-supstituiranim imidazo [4,5-*b*]piridinima, spoj **149** koji nosi nesupstituiranu amidino skupinu nije pokazao nikakvu citotoksičnost, dok je izopropil-amidino-supstituirani derivat **155** pokazao je blagu toksičnost na MDCK (CC₅₀ 71,2 μM) i izraženiji citotoksični učinak na Huh7 stanicama (CC₅₀ 3,0 μM). Ispitana je cijela skupina novosintetiziranih spojeva *in vitro* protiv DNK i RNK virusa. Sve u svemu, nije pokazano značajno antivirusno djelovanje novosintetiziranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina. Antivirusna aktivnost koja najviše obećava zapažena je za brom-supstituirani derivat **146** s nesupstituiranim fenilnim prstenom koji pokazuje selektivnu aktivnost protiv RSV (EC₅₀ 21,0 μM) kao i za *para*-cijano-supstituirani derivat **156** (EC₅₀ 79,0 μM).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker AV300, Bruker AV600 i Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend. ^1H NMR spektri snimani su pri 300, 400 i 600 MHz, dok su ^{13}C NMR spektri snimani pri 75 i 150 MHz. Svi NMR spektri snimani su u DMSO- d_6 kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (J) u Hz.

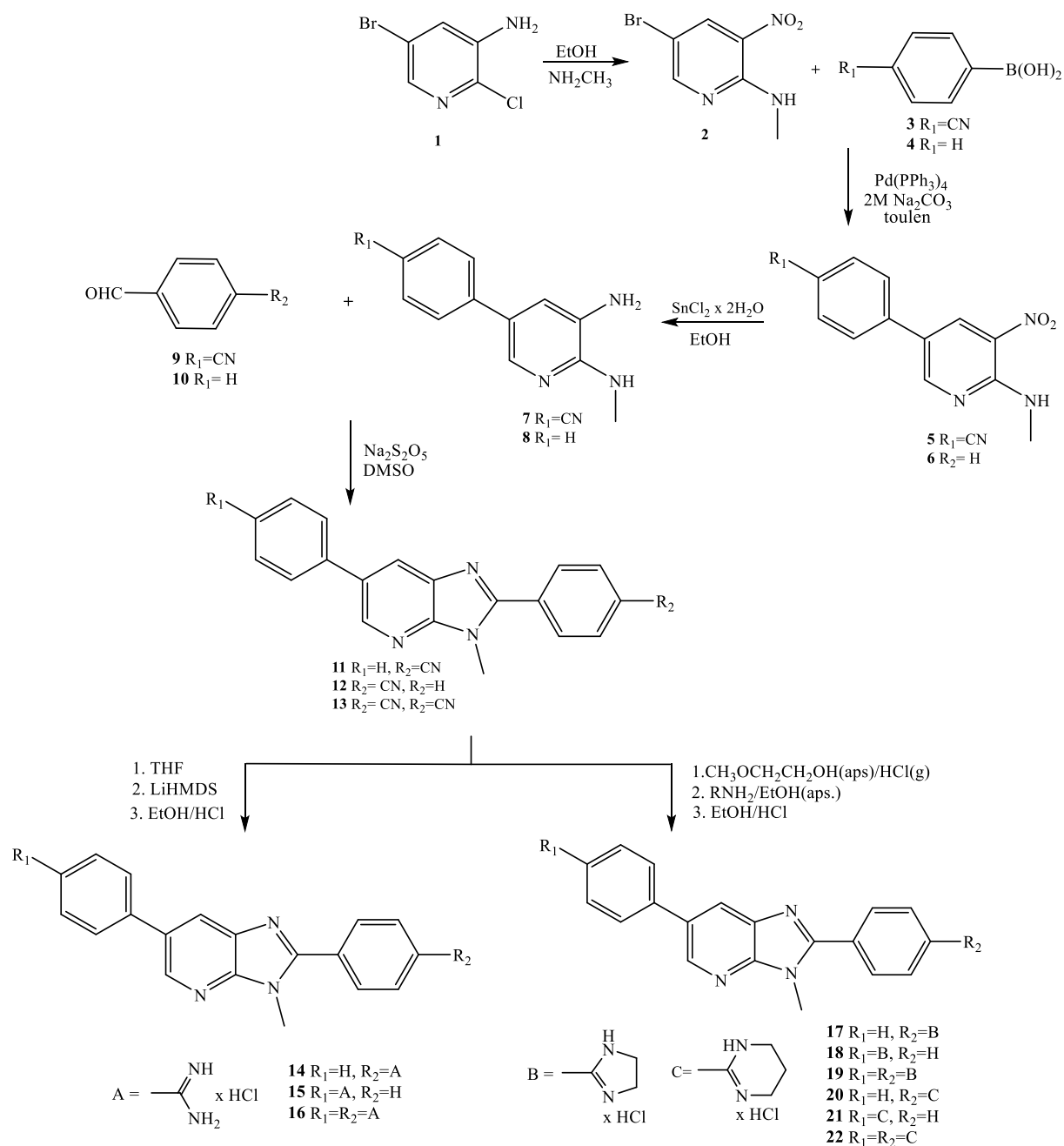
Tališta priređenih spojeva određena su na SMP10 Bibby aparatu te nisu korigirana.

UV/Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 50 spektrofotometru. Fluorescencijski emisijski spektri snimljeni su na Cary Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 0,5 cm te volumena 3 cm³.

Kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama punjenim silikagelom 0,063–0,2 nm (Kemika, Merck).

Svi spojevi provjeravani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) prilikom čega su upotrebene pločice presvučene silikagelom Merck 60F-254, a detektirani su pod UV svjetlom (254 i 366 nm).

3.2. Priprava amidino-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina



Shema 34. Priprava amidino-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

3.2.1. Priprava 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina 2

U okruglu tikvicu stavi se 3,000 g (12,60 mmol) početnog spoja 5-brom-2-klor-3-nitropiridina **1** koji se otopi u 120,00 mL etanola uz suvišak metilamina (4,72 mL; 37,90 mmol). Nakon 3 h miješanja na sobnoj temperaturi nastali talog se profiltrira preko Büchnerovog lijevka. Dobiveno je 2,650 g (90,9%) žutog kristaliničnog produkta 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **2**. T.t. = 150-152 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 8,59 (d, 1H, *J* = 2,34 Hz, H_{arom}), 8,56 (d, 1H, *J* = 3,90 Hz, NH_{amin}), 8,54 (d, 1H, *J* = 2,34 Hz, H_{arom}), 3,02 (d, 3H, *J* = 4,74 Hz, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 155,60, 150,52, 135,77, 127,36, 102,48, 27,85.

3.2.2. Priprava 4-(6-(metilamino)-5-nitropiridin-3-il)benzonitrila 5

U kivetu za reakcije pod tlakom odvaži se 0,500 g (2,15 mmol) 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **2** koji se otopi u 6,25 mL toluena te se doda tetrakis(trifenilfosfin)paladij (Pd(PPh₃)₄, (0,053 g; 0,05 mmol), suvišak 4-cijanofenilborne kiseline (0,380 g; 2,59 mmol), te 2,50 mL 2M vodene otopine natrijevog karbonata. Reakcijska smjesa miješa se 5 h na temperaturi od 150 °C. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Ohlađena reakcijska smjesa ekstrahira se etil-acetatom. Organski sloj suši se 30 minuta iznad bezvodnog MgSO₄, profiltrira i upari do suha. Nastali produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂ kao eluens. Dobiveno je 0,731 g (66,7%) žutog kristaliničnog produkta spoja **5**. T.t. = 225-227 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 8,97 (d, 1H, *J* = 2,28 Hz, H_{arom}), 8,73 (d, 1H, *J* = 2,28 Hz, H_{arom}), 8,68 (d, 1H, *J* = 4,62 Hz, NH_{amin}), 7,97 (d, 2H, *J* = 8,34 Hz, H_{arom}), 7,92 (d, 2H, *J* = 8,40 Hz, H_{arom}), 3,10 (d, 3H, *J* = 4,74 Hz, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 154,80, 152,40, 140,62, 133,41, 133,25, 128,12, 127,13, 122,11, 119,30, 110,28, 29,00.

3.2.3. Priprava *N*-metil-3-nitro-5-fenilpiridin-2-amina 6

U kivetu za reakcije pod tlakom odvaži se 0,450 g (1,93 mmol) 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **2** koji se otopi u 6,00 mL toluena te se doda tetrakis(trifenilfosfin)paladij (Pd(PPh₃)₄, (0,048 g; 0,04 mmol), suvišak fenilborne kiseline (0,283 g; 2,32 mmol) te 3,00 mL 2M vodene otopine natrijevog karbonata. Reakcijska smjesa se miješa 5 h na temperaturi od 150 °C. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Ohlađena reakcijska smjesa ekstrahira se etil-acetatom. Organski sloj suši se 30 minuta iznad bezvodnog MgSO₄, profiltrira se i upari do suha. Nastali produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂ kao eluens. Dobiveno je 0,655 g (73,7%) crvenog kristaliničnog

produkta spoja **6**. T.t. = 238-241 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 8,89 (d, 1H, J = 2,40 Hz, H_{arom}), 8,60 (d, 1H, J = 2,40 Hz, H_{arom}), 8,57 (d, 1H, J = 4,56 Hz, NH_{amin}), 7,72 – 7,70 (m, 2H, H_{arom}), 7,47 (t, 2H, J = 7,74 Hz, H_{arom}), 7,38 (t, 1H, J = 7,38 Hz, H_{arom}), 3,10 (d, 3H, J = 4,74 Hz, CH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 153,56, 150,96, 134,89, 131,40, 128,53, 126,93, 125,38, 123,14, 27,86.

3.2.4. Priprava 4-(5-amino-6-(metilamino)piridin-3-il)benzonitrila **7**

U okruglu tikvicu stavi se 0,731 g (2,87 mmol) početnog spoja 4-(6-(metilamino)-5-nitropiridin-3-il)benzonitrila **5**, 2,590 g (11,57 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 50,00 mL etanola. Reakcijska smjesa se zagrijava u uljnoj kupelji 1 h na temperaturi vrenja. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Nakon hlađenja, reakcijska smjesa se upari do suha pri čemu zaostaje žuto ulje. Doda se 10,00 mL destilirane vode, zaluži s 20% otopinom NaOH do pH 14, te se ekstrahira etil-acetatom. Organski sloj suši se 30 minuta iznad bezvodnog MgSO_4 , profiltrira se i upari do suha. Dobiveno je 0,551 g (85,4%) žuto-zelenog kristaliničnog produkta **7**. T.t. = 135-137 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 7,86 (d, 1H, J = 2,16 Hz, H_{arom}), 7,82 – 7,80 (m, 2H, H_{arom}), 7,70 (d, 2H, J = 8,40 Hz, H_{arom}), 7,04 (d, 1H, J = 2,16 Hz, H_{arom}), 6,03 (d, 1H, J = 4,62 Hz, H_{arom}), 4,86 (s, 2H, NH_{amin}), 2,90 (d, 3H, J = 4,62 Hz, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ/ppm = 149,46, 144,10, 134,42, 133,19, 130,98, 126,20, 122,67, 119,68, 114,97, 108,53, 28,61.

3.2.5. Priprava N^2 -metil-5-fenilpiridin-2,3-diamina **8**

U okruglu tikvicu stavi se 0,609 g (2,83 mmol) početnog spoja *N*-metil-3-nitro-5-fenilpiridin-2-amina **6**, 2,550 g (11,32 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 40,00 mL etanola. Reakcijska smjesa se zagrijava u uljnoj kupelji 1 h na temperaturi vrenja. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Nakon hlađenja, reakcijska smjesa se upari do suha pri čemu zaostaje žuto ulje. Doda se 10,00 mL destilirane vode, zaluži s 20% otopinom NaOH do pH 14 te se ekstrahira etil-acetatom. Organski sloj suši se 30 minuta iznad bezvodnog MgSO_4 , profiltrira se i upari do suha. Dobiveno je 0,444 g (84,7%) tamnog uljevitog produkta **8**. ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 7,73 (d, 1H, J = 2,16 Hz, H_{arom}), 7,49 (dd, 2H, J_1 = 8,28, J_2 = 1,20 Hz, H_{arom}), 7,38 (t, 2H, J = 7,80 Hz, H_{arom}), 7,24 (t, 1H, J = 7,35 Hz, H_{arom}), 6,98 (d, 1H, J = 2,16 Hz, H_{arom}), 5,78 (d, 1H, J = 4,62 Hz, NH_{amin}), 4,78 (s, 2H, NH_2), 2,88 (d, 3H, J = 4,68 Hz, CH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 148,63, 139,44, 133,41, 130,84, 129,25, 126,50, 125,91, 124,88, 115,77.

3.2.6. Opći postupak pripreve spojeva 11-13

Spojevi **11-13** pripremljeni su zagrijavanjem ekvimolarnih količina 2,3-diaminopiridina **7-8** i benzaldehida **9-10** dodatkom 0,55 ekvivalenta $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ u DMSO na 165 °C u uljnoj kupelji. Nakon 15 minuta, reakcijska se smjesa ohladi na sobnu temperaturu te se doda voda. Nakon 10 minuta, nastali talog se profiltrira i dobro ispere vodom.

3.2.7. Priprava 4-(3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzonitrila **11**

Spoj **11** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **8** (0,505 g, 2,53 mmol), **9** (0,331 g, 2,53 mmol) i $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0,265 g, 1,39 mmol) u DMSO (2,53 mL). Dobiveno je 0,327 g (41,6%) bež praškastog produkta. T.t. = 251-254 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 8,77 (d, 1H, J = 1,38 Hz, H_{arom}), 8,42 (d, 1H, J = 1,26 Hz, H_{arom}), 8,18 (d, 2H, J = 8,22 Hz, H_{arom}), 8,10 (d, 2H, J = 8,22 Hz, H_{arom}), 7,80 (d, 2H, J = 7,56 Hz, H_{arom}), 7,52 (t, 2H, J = 7,62 Hz, H_{arom}), 7,42 (t, 1H, J = 7,35 Hz, H_{arom}), 4,01 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 152,32, 147,72, 142,69, 137,38, 134,13, 133,51, 132,12, 131,09, 129,34, 128,49, 126,92, 126,64, 124,41, 117,83, 112,03, 29,91.

3.2.8. Priprava 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzonitrila **12**

Spoj **12** priređen prema općem postupku pripreve, iz spoja **7** (0,551 g, 2,46 mmol), **10** (0,20 mL, 2,46 mmol) i $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0,207 g, 1,09 mmol) u DMSO (2,46 mL). Dobiveno je 0,375 g (49,2%) bijelog praškastog produkta. T.t. = 243-245 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 8,81 (d, 1H, J = 1,98 Hz, H_{arom}), 8,51 (d, 1H, J = 1,98 Hz, H_{arom}), 8,04 (d, 2H, J = 8,34 Hz, H_{arom}), 7,99 – 7,96 (m, 4H, H_{arom}), 7,63 (dd, 3H, J_1 = 4,98 Hz, J_2 = 1,80 Hz, H_{arom}), 3,98 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 154,61, 148,50, 142,12, 134,15, 132,32, 129,78, 129,02, 128,80, 128,60, 128,23, 127,36, 124,49, 118,29, 109,35, 29,91.

3.2.9. Priprava 4,4'-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzonitrila **13**

Spoj **13** priređen prema općem postupku pripreve, iz spoja **7** (0,600 g, 2,67 mmol), **9** (0,351 g, 2,67 mmol) i $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0,280 g, 1,47 mmol) u DMSO (2,67 mL). Dobiveno je 0,207 g (23,13%) bijelog praškastog produkta. T.t. > 300 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 8,86 (d, 1H, J = 1,50 Hz, H_{arom}), 8,57 (d, 1H, J = 1,50 Hz, H_{arom}), 8,19 (d, 2H, J = 8,22 Hz, H_{arom}), 8,10 (d, 2H, J = 8,22 Hz, H_{arom}), 8,05 (d, 2H, J = 8,16 Hz, H_{arom}), 7,98 (d, 2H, J = 8,16 Hz, H_{arom}), 4,01 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 149,57, 143,94, 143,22, 134,53, 133,35, 133,15, 130,47, 130,35, 128,52, 126,03, 119,22, 118,77, 113,34, 110,68, 31,02.

3.2.10. Opći postupak pripreve nesupstituiranih amidina s LiHMDS 14-16

Cijano supstituirani derivati **11-13** otope se u bezvodnom THF-u te se reakcijska smjesa propuše argonom 30 minuta. Reakcijska smjesa ohladi se na 0 °C te se dokapa 15 ekvivalenata LiHMDS po cijano skupini. Nakon završetka dodavanja, reakcijska smjesa se miješa 6 sati na sobnoj temperaturi, potom se hladi na 0 °C te joj se doda ekvimolarna količina 4 M HCl u etanolu. Otapalo se ukloni pod sniženim tlakom, a talogu se doda etanol i 4 M HCl u etanolu do pH 2. Nakon uklanjanja otapala pod sniženim tlakom, dodaje se eter i dobiveni talog se profiltrira. Talog se suspendira u vodi i zaluži se 20% NaOH do pH 9. Smjesa se profiltrira, a na zraku osušen talog se suspendira u etanolu i tretira s ekvimolarnom količinom 4 M etanolne otopine HCl. Dodaje se dietil-eter, talog se odvaja filtriranjem te se produkt izolira u obliku hidrokloridne soli.

3.2.11. Priprava 4-(3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzimidamid hidroklorida **14**

Spoj **14** sintetiziran je prema prethodno opisanom općem postupku pripreve iz spoja **11** (0,150 g, 0,48 mmol), u 1,00 mL THF i LiHMDS (7,25 mL, 7,25 mmol) pri čemu je dobiveno 0,040 g (47,1%) praškastog bež produkta koji je izoliran kao smjesa baze i soli. T.t. = 250-252 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 9,75 (s, 2H, NH_{amidin}), 9,57 (s, 2H, NH_{amidin}), 8,84 (d, 1H, *J* = 1,86 Hz, H_{arom}), 8,46 (d, 1H, *J* = 1,86 Hz, H_{arom}), 8,24 (d, 2H, *J* = 8,46 Hz, H_{arom}), 8,11 (d, 2H, *J* = 8,40 Hz, H_{arom}), 7,83 (m, 1H, H_{arom}), 7,54 (m, 2H, H_{arom}), 7,45 (m, 2H, H_{arom}), 4,05 (s, 3H, CH₃); ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 8,88 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H_{arom}), 8,46 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H_{arom}), 8,30 (s, 2H, NH), 8,15 (m, 3H, H_{arom}), 8,11 (m, 1H, H_{arom}), 7,83 (m, 3H, H_{arom}), 7,54 (m, 2H, H_{arom}), 7,63 (s, 1H, NH), 4,05 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 166,42, 164,56, 152,47, 152,18, 147,12, 146,49, 143,34, 143,10, 137,13, 136,92, 135,76, 131,96, 131,56, 129,09, 128,89, 128,56, 128,54, 128,09, 127,38, 127,22, 127,08, 126,75, 126,70, 123,76, 122,93, 30,15, 30,03.

3.2.12. Priprava 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzimidamid hidroklorida **15**

Spoj **15** sintetiziran je prema prethodno opisanom općem postupku pripreve iz spoja **12** (0,080 g, 0,26 mmol), u 1,00 mL THF i LiHMDS (3,78 mL, 3,78 mmol) pri čemu je dobiveno 0,040 g (48,6%) smeđeg praškastog produkta. T.t. = 291-294 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 9,47 (s, 2H, NH_{amidin}), 9,21 (s, 2H, NH_{amidin}), 8,87 (d, 1H, *J* = 1,86 Hz), 8,55 (d, 1H, *J* = 1,86 Hz, H_{arom}), 8,10 (d, 2H, *J* = 8,40 Hz, H_{arom}), 8,01 – 7,98 (m, 4H,

H_{arom}), 7,66 – 7,63 (m, 3H, H_{arom}), 4,00 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 164,52, 154,45, 148,27, 142,71, 142,29, 133,67, 129,96, 129,03, 128,66, 128,28, 126,82, 126,06, 124,25, 29,97.

3.2.13. Priprava 4,4'-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzimidamid dihidroklorida 16

Spoj **16** sintetiziran je prema općem postupku pripreme iz spoja **13** (0,060 g, 0,18 mmol), u 1,00 mL THF i LiHMDS (5,36 mL, 5,36 mmol) pri čemu je dobiveno 0,020 g (27,9%) praškastog bež produkta. T.t. > 300 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 9,43 (s, 8H, NH_{amidin}), 8,89 (d, 1H, *J* = 1,68 Hz, H_{arom}), 8,59 (d, 1H, *J* = 1,68 Hz, H_{arom}), 8,21 (d, 2H, *J* = 8,22 Hz, H_{arom}), 8,10 (dd, 4H, *J*₁ = 8,49, *J*₂ = 2,49 Hz, H_{arom}), 8,03 (d, 2H, *J* = 8,28 Hz, H_{arom}), 4,04 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 165,51, 165,22, 154,25, 149,46, 143,81, 143,53, 135,25, 134,39, 130,30, 129,94, 129,30, 128,94, 127,88, 127,52, 125,87, 31,08.

3.2.14. Opći postupak pripreme amidina Pinnerovom metodom

Cijano supstituirani spojevi **11-13** suspendiraju se u bezvodnom 2-metoksietanolu te se reakcijska smjesa ohladi na 0 °C. Plinoviti HCl uvodi se u ohlađenu suspenziju do zasićenja. Tijek reakcije se prati IR spektroskopijom i miješa na sobnoj temperaturi sve do nestanka -CN vrpce na 2200 cm⁻¹ pri čemu se dobiva međuprodukt imino-ester. U suspenziju se dodaje bezvodni dietil-eter, talog se profiltrira i osuši na vakuumu. Suhi produkt se suspendira u bezvodnom etanolu te se dodaje odgovarajući amin u suvišku. Sirovi produkt se profiltrira i ispere dietil-eterom pri čemu se dobiju praškasti produkti, koji se suspendiraju u bezvodnom etanolu i konc. HCl.

Za sintezu imidazolinil supstituiranih amidina, 3,5 ekvivalenata etilendiamina dodaje se u suspenziju imidatnog estera i reakcija se zagrijava na temperaturi vrenja 24 sata. Za sintezu 1,4,5,6-tetrahidropirimidin-supstituiranih amidina, 2 ekvivalenta 1,3-propilendiamina dodaju se u suspenziju imidatnog estera i reakcija se zagrijava na temperaturi vrenja 24 sata.

3.2.15. Priprava 2-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin hidroklorida 17

Spoj **17** sintetiziran je iz spoja **11** (0,122 g, 0,29 mmol) i etilendiamina (67,80 μL, 1,01 mmol) pri čemu je dobiveno 0,050 g (45,9%) svijetlo-žutog praškastog produkta. T.t. > 300°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 11,06 (s, 2H, NH_{amidin}), 8,79 (d, 1H, *J* = 1,98

Hz, H_{arom}), 8,43 (d, 6H, $J = 1,92$ Hz, H_{arom}), 8,31 (d, 2H, $J = 8,46$ Hz, H_{arom}), 8,27 (d, 2H, $J = 8,52$ Hz, H_{arom}), 7,81 (d, 2H, $J = 7,26$ Hz, H_{arom}), 7,53 (t, 2H, $J = 7,71$ Hz, H_{arom}), 7,43 (t, 1H, $J = 7,38$ Hz, H_{arom}), 4,06 (s, 4H, CH₂), 4,04 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ /ppm = 163,57, 152,27, 147,57, 142, 86, 137,30, 134,23, 133,77, 131,24, 129,19, 128,58, 128,51, 128,49, 127,29, 126,98, 126,67, 124,24, 122,91, 43,86, 35,88, 30,00.

3.2.16. Priprava 6-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida 18

Spoj **18** sintetiziran je iz spoja **12** (0,123 g, 0,29 mmol) i etilendiamina (68,00 μ L, 1,01 mmol) pri čemu je dobiveno 0,060 g (56,2%) bijelog praškastog produkta. T.t. = 296-299 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ /ppm = 11,00 (s, 2H, NH_{amidin}), 8,97 (s, 1H, H_{arom}), 8,61 (s, 1H, H_{arom}), 8,48 (s, 2H, H_{arom}), 8,26 (d, 2H, $J = 5,22$ Hz, H_{arom}), 8,16 (d, 2H, $J = 5,22$ Hz, H_{arom}), 8,02 (s, 2H, H_{arom}), 7,69 (s, 3H, H_{arom}), 4,04 (s, 4H, CH₂), 4,02 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ /ppm = 163,60, 153,82, 147,36, 143,25, 142,75, 130,65, 129,65, 128,95, 128,87, 128,39, 127,17, 123,48, 120,50, 43,70, 35,86, 30,16.

3.2.17. Priprava 2,6-bis(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin dihidroklorida 19

Spoj **19** sintetiziran je iz spoja **13** (0,070 g, 0,13 mmol) i etilendiamina (58,00 μ L, 0,87 mmol) pri čemu je dobiveno 0,012 g (19,4%) svijetlo-žutog praškastog produkta. T.t. > 300 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ /ppm = 11,03 (s, 2H, NH_{amidin}), 10,88 (s, 2H, NH_{amidin}), 8,94 (s, 1H, H_{arom}), 8,63 (s, 1H, H_{arom}), 8,37 (s, 2H, H_{arom}), 8,28 (d, 4H, $J = 6,36$ Hz, H_{arom}), 8,19 (dd, 6H, $J_1 = 29,31$, $J_2 = 7,65$ Hz, H_{arom}), 4,06 (s, 4H, CH₂), 4,05 (s, 4H, CH₂), 4,04 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ /ppm = 164,81, 164,71, 153,94, 149,51, 144,23, 144,14, 135,37, 135,13, 130,31, 130,13, 129,85, 129,62, 129,56, 128,19, 126,02, 124,06, 121,38, 44,97, 44,81, 36,99, 31,15.

3.2.18. Priprava 3-metil-6-fenil-2-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida 20

20 je sintetiziran je iz spoja **11** (0,118 g, 0,27 mmol) i 1,3-propilendiamina (47,10 μ L, 0,55 mmol) pri čemu je dobiveno 0,057 g (50,7%) bijelog praškastog produkta. T.t. > 300 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ /ppm = 10,32 (s, 2H, NH_{amidin}), 8,82 (d, 1H, $J = 1,92$ Hz, H_{arom}), 8,44 (d, 1H, $J = 2,04$ Hz, H_{arom}), 8,23 (d, 2H, $J = 8,52$ Hz, H_{arom}), 8,03 (d, 2H, $J = 8,34$ Hz, H_{arom}), 7,82 (d, 2H, $J = 7,14$ Hz, H_{arom}), 7,54 (t, 2H, $J = 7,74$ Hz, H_{arom}), 7,44 (t, 1H, $J = 7,38$

Hz, H_{arom}), 4,04 (s, 3H, CH₃), 3,54 (s, 4H, CH₂), 2,04 – 2,00 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 157,96, 152,24, 147,15, 143,07, 137,14, 131,56, 129,53, 129,13, 128,54, 127,69, 127,09, 126,71, 123,77, 35,39, 30,04, 24,43, 16,99.

3.2.19. Priprava 3-metil-2-fenil-6-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida 21

21 je sintetiziran iz spoja **12** (0,131 g, 0,30 mmol) i 1,3-propilendiamina (52,00 μL, 0,62 mmol) pri čemu je dobiveno 0,072 g (58,3%) bijelog praškastog produkta. T.t. > 300 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 10,15 (s, 2H, NH_{amidin}), 8,84 (d, 1H, *J* = 1,98 Hz, H_{arom}), 8,54 (d, 1H, *J* = 1,98 Hz, H_{arom}), 8,09 (d, 2H, *J* = 8,40 Hz, H_{arom}), 7,98 (dd, 2H, *J*₁ = 6,45, *J*₂ = 3,09 Hz, H_{arom}), 7,91 (d, 2H, *J* = 8,40 Hz, H_{arom}), 7,64 (dd, 3H, *J*₁ = 4,95, *J*₂ = 1,77 Hz, H_{arom}), 3,99 (s, 3H, CH₃), 3,53 (s, 4H, CH₂), 2,03 – 1,99 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 159,21, 155,64, 149,51, 143, 23, 143,15, 135,25, 130,89, 130,08, 129,97, 129,68, 129,33, 128,84, 127,88, 127,62, 125,43, 31,02, 18,20.

3.2.20. Priprava 3-metil-2,6-bis(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-*b*]piridin dihidroklorida 22

Spoj **22** sintetiziran je iz spoja **13** (0,069 g, 0,12 mmol) i etilendiamina (41,00 μL, 0,49 mmol) pri čemu je dobiveno 0,027 g (40,3%) bijelog praškastog produkta. T.t. > 300 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 10,31 (s, 2H, NH_{amidin}), 10,19 (s, 2H, NH_{amidin}), 8,90 (d, 1H, *J* = 2,04 Hz, H_{arom}), 8,59 (d, 1H, *J* = 2,04 Hz, H_{arom}), 8,22 (s, 2H, H_{arom}), 8,10 (s, 2H, H_{arom}), 8,02 (d, 2H, *J* = 8,16 Hz, H_{arom}), 7,93 (d, 2H, *J* = 8,16 Hz, H_{arom}), 4,04 (s, 3H, CH₃), 3,54 (d, 8H, *J* = 6,30 Hz, CH₂), 2,91 – 2,87 (m, 4H, CH₂); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 158,13, 153,01, 148,29, 142,79, 141,93, 134,00, 129,35, 129,25, 129,01, 127,77, 127,65, 126,86, 126,68, 124,68, 35,41, 30,01, 24,46, 17,11, 16,99.

3.3. Ispitivanje interakcija nekih priređenih derivata s DNK

3.3.1. Supstrati

Nukleotid čistoće veće od 99% kupljen od Aldrich-a te je korišten bez daljnjeg čišćenja na način da su otopljeni u NaCaCo puferu (pH 7) u koncentraciji reda veličine 10^{-2} mol dm^{-3} . Otopljen je prema tvornički priloženim uputstvima odnosno katalogu proizvođača te je koncentracija fosfata polinukleotida određena na osnovu absorbancije u puferu pH = 7; 0,01 M prema slijedećim vrijednostima:

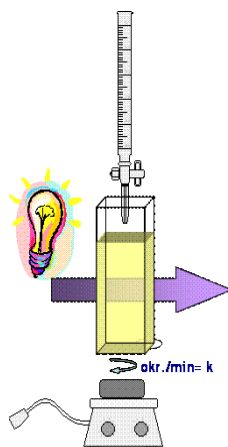
➤ *ct*-DNK na 260 nm, $\epsilon = 6600$

3.3.2. Spektroskopske metode

Kod fluorescencijskih titracija praćene su promjene intenziteta fluorescencije ispitivanog spoja na valnim duljinama ($\lambda_{\text{em.}} = 400\text{--}600$ nm) gdje niti jedan sastojak u otopini nema UV/Vis spektar te su korištene valne duljine pobude kod kojih *ct*- nema UV/Vis spektar ($\lambda_{\text{eksc.}} > 320$ nm). Ukoliko je bilo potrebno, fluorescencijski spektri korigirani su za baznu liniju pufera.

3.3.3. Izvedba titracija

Promjene spektara ispitivanih spojeva po dodatku polinukleotida korigirane su za razrjeđenje. Korištena je metoda titracije pri kojoj je korišteno relativno kratko vrijeme (2-3 min) potrebno da se uspostavi ravnotežno stanje po dodatku supstrata u otopinu ispitivanog spoja. U kivetu s puferiranom vodenom otopinom ispitivanog spoja dodavani su alikvoti otopine supstrata priređeni u DMSO-u. Po svakom dodatku nakon navedenog vremena uravnoteženja uz miješanje magnetskim mješačem snimljen je spektar ispitivanog spoja.

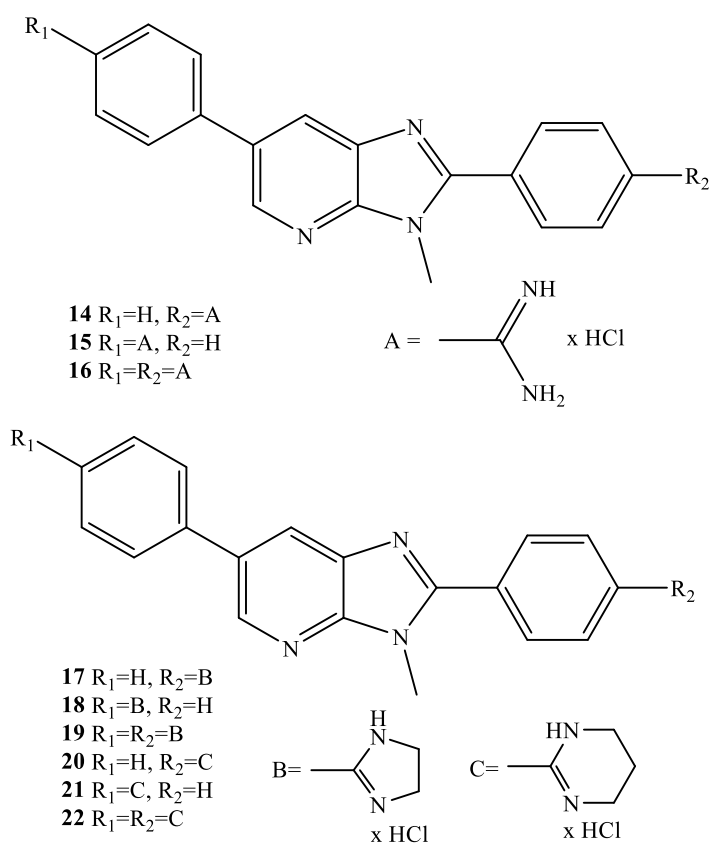


Slika 125. Izvedba spektroskopskih titracija

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Cilj rada

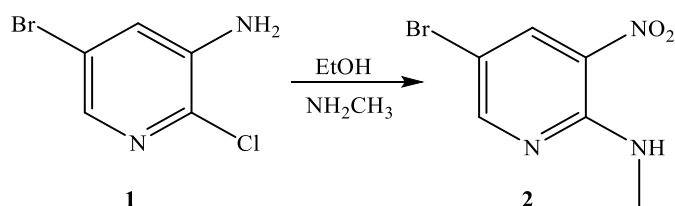
Cilj ovog rada bio je linearnom višestupnjevitom sintezom pripremiti, korištenjem ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije strukturno okarakterizirati, ispitati interakciju s DNK te procijeniti biološku aktivnost novih amidino-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **14-22** čije su strukture prikazane na Slici 126. Svi amidino supstituirani spojevi priređeni su kao hidrokloridne soli radi bolje topljivosti. Iz odgovarajućih cijano supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **11-13** Pinnerovom reakcijom u dva stupnja u 2-metoksietanolu, priređeni su supstituirani 2-imidazolinski **17-19** i 1,4,5,6-tetrahidropirimidinski amidino spojevi **20-22**, dok su spojevi **14-16** koji sadrže nesupstituiranu amidinsku skupinu priređeni reakcijom s LiHMDS.



Slika 126. Priređeni amidino-supstituirani derivati imidazo[4,5-*b*]piridina

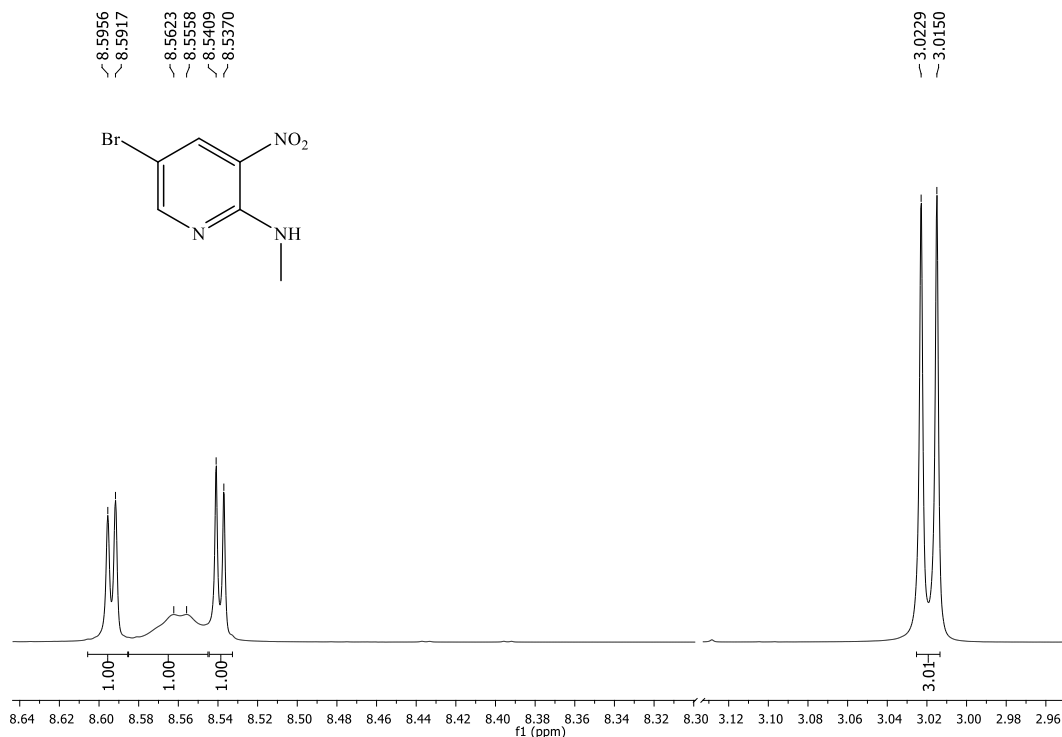
4.2. Sinteza ciljanih spojeva

U prvom koraku sinteze provedena je reakcija aminacije⁹⁴, odnosno nukleofilne aromatske supstitucije na položaju C-2 piridina pri čemu je dobiven 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amin **2** u iskorištenju od 90,9% (Shema 35.) Za provedbu ove reakcije zadovoljeni su strukturni kriteriji na piridinu: prisutnost elektron-odvlačeće NO₂ skupine, mezomerni efekt N atoma te induktivni efekt halogena koji se nalazi na α - i γ - položaju piridinskog prstena. Ovaj mehanizam odvija se adicijom metilamina, a zatim eliminacijom Cl atoma na položaju α koja se tu događa preferirano jer se u nastalim rezonantno stabiliziranim međuproduktima, negativni naboj nalazi uglavnom na elektronegativnom atomu dušika.



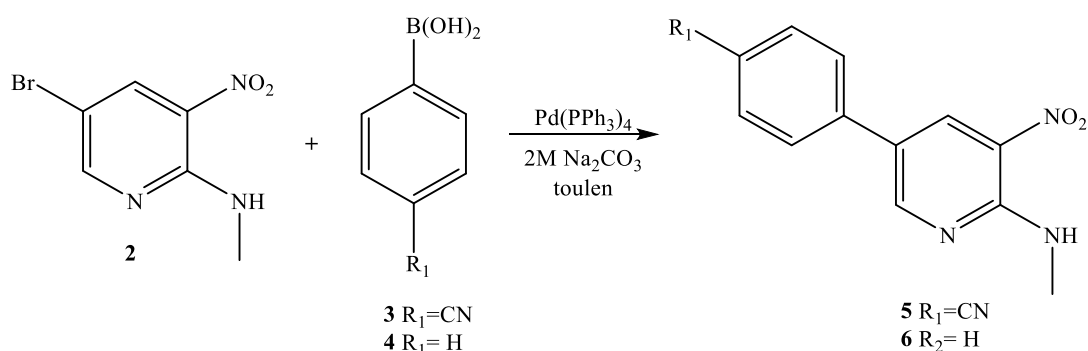
Shema 35. Priprava 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **2**

Na Slici 127. prikazan je ¹H NMR spektar spoja **2**.



Slika 127. ¹H NMR spektar 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **2**

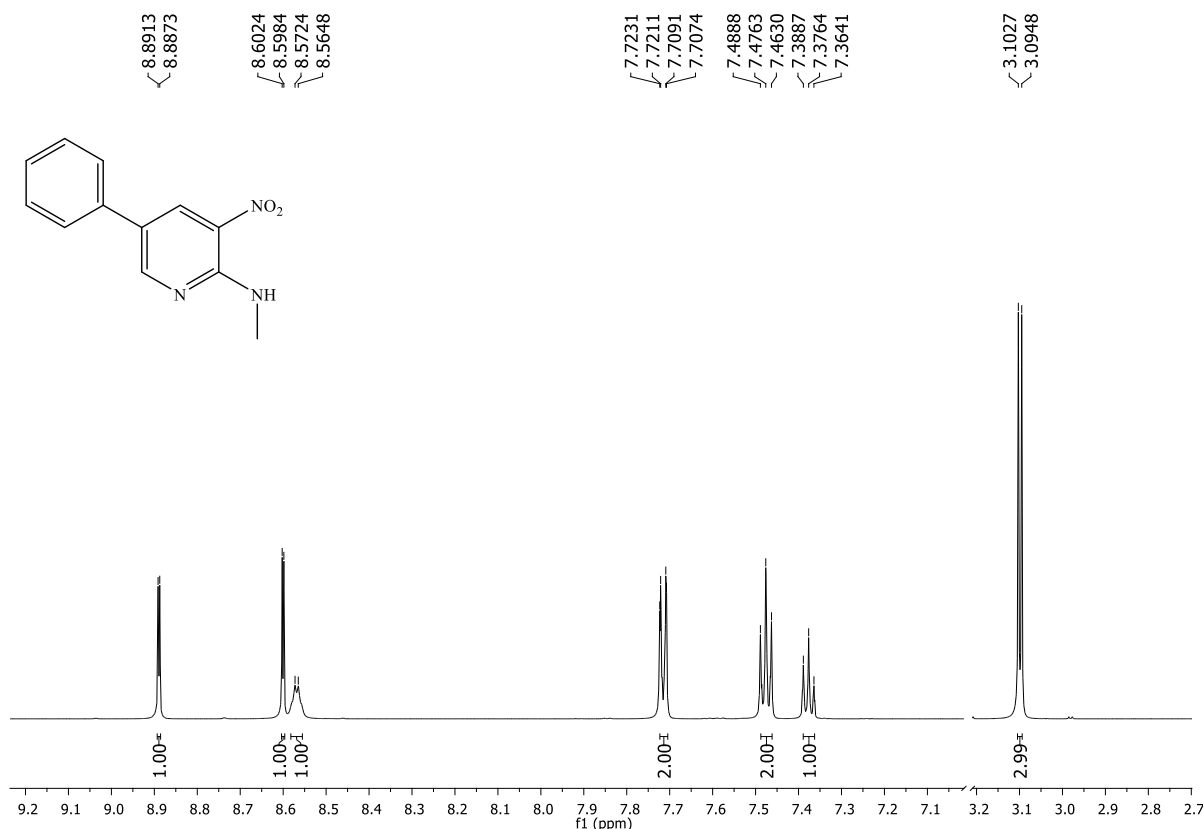
U prikazanom spektru su u nezasjenjenom dijelu vidljiva ukupno tri signala pri čemu dubleti na 8,54 i 8,59 ppma odgovaraju signalima piridinskih H atoma, dok je široki dublet na 8,56 ppm dokaz uspješne aminacije jer pripada H atomu NH skupine. U zasjenjenom dijelu spektra na 3,01 ppm nalazi se signal H atoma CH₃ skupine. Suzukijevom reakcijom križnog spajanja⁹⁵ 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **2** s (4-cijanofenil)bornom kiselinom **3**, odnosno fenilbornom kiselinom **4** uz korištenje tetrakistrifenilfosfinpaladija Pd(PPh₃)₄ kao katalizatora i 2 M otopine natrijevog karbonata kao baze, u toluenu, pripremljeni su spoj **6** u iskorištenju od 73,7%, te spoj **5** u iskorištenju od 66,7%, prema Shemi 36.



Shema 36. Priprava *N*-metil-3-nitro-5-fenilpiridin-2-amina **6**

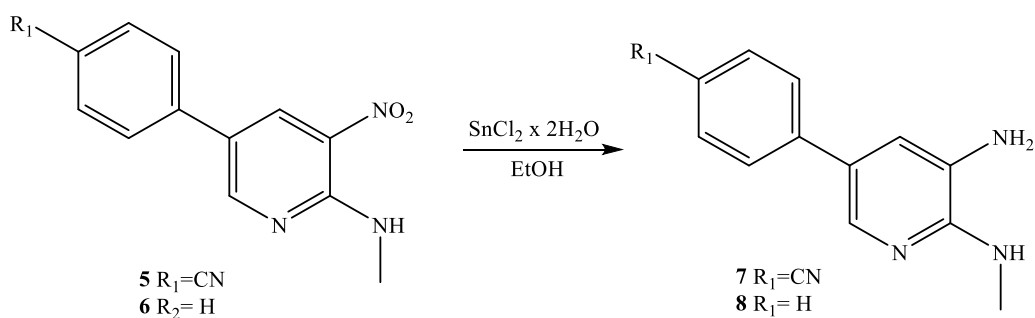
Katalitički ciklus Suzukijeve reakcije katalizirane paladijem započinje procesom oksidativne adicijom aril halida **2** na Pd(0) kompleks pri čemu nastaje arilpaladijev (II) halidni intermedijer. Transmetaliranje s fenilbornom kiselinom **4** i reduktivna eliminacija dovršavaju katalitički ciklus. Uloga 2M otopine Na₂CO₃ kao baze u ovim reakcijama je olakšati transmetaliranje fenilborne kiseline stvaranjem reaktivnije vrste: boronata koji se upravo formiraju pri uvjetima pH 11-12.

Struktura priređenog spoja **6** potvrđena je ¹H NMR spektroskopijom pri čemu je odgovarajući NMR spektar prikazan na Slici 128. Vidljiv je veći broj signala u nezasjenjenom dijelu spektra u usporedbi sa spektrom spoja **2** prikazanog na Slici 127. Signali H protona na piridinskoj jezgri nalaze se na 8,89 i 8,60 ppm, dok se široki singlet NH skupine nalazi na 8,57 ppm. Dodatni signali H atoma na području od 7,38 do 7,72 ppm potječu od H atoma na fenilnoj jezgri kao supstituentu uvedenom Suzukijevom reakcijom križnog spajanja.



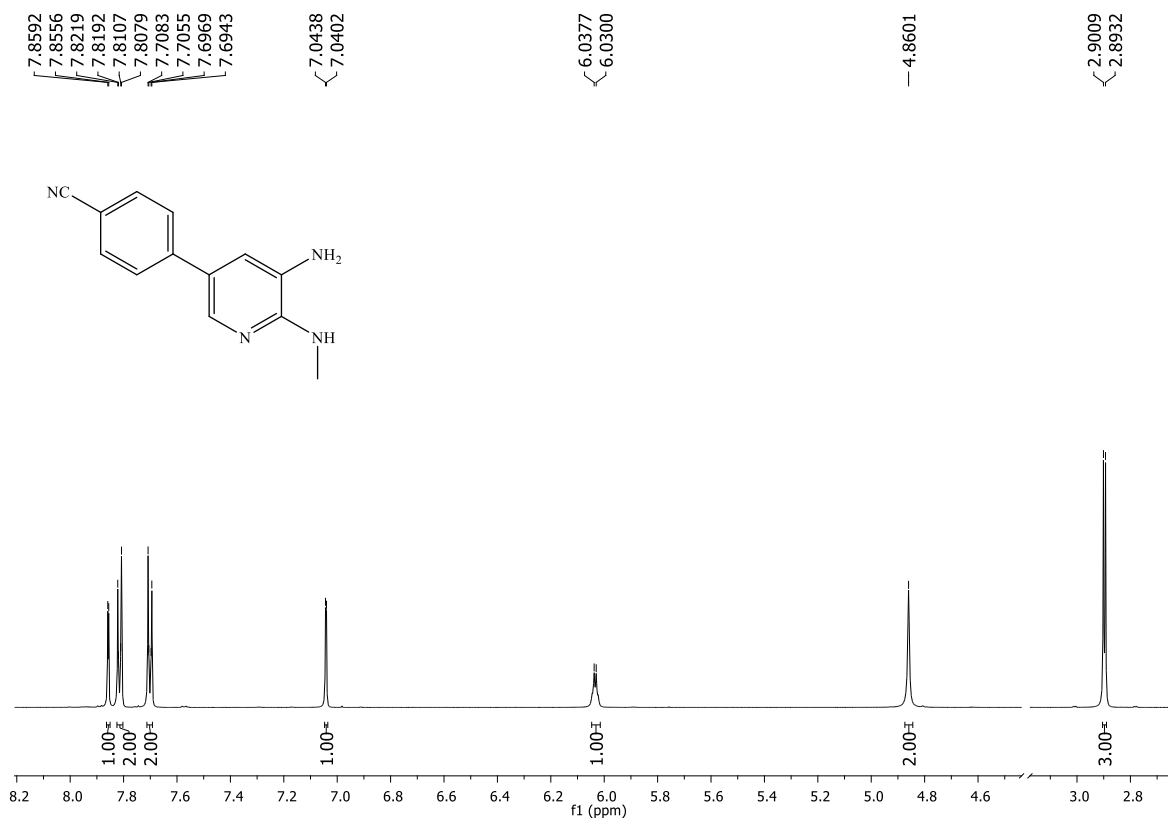
Slika 128. ^1H NMR spektar *N*-metil-3-nitro-5-fenilpiridin-2-amina **6**

Na Shemi 37. prikazana je reakcija redukcije 4-(6-(metilamino)-5-nitropiridin-3-il)benzonitrila **5** i *N*-metil-3-nitro-5-fenilpiridin-2-amina **6** sa $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pri čemu su priređeni 4-(5-amino-6-(metilamino)piridin-3-il)benzonitril **7** u iskorištenju od 85,4% te *N*-metil-5-fenilpiridin-2,3-diamin **8** u iskorištenju od 84,7%.



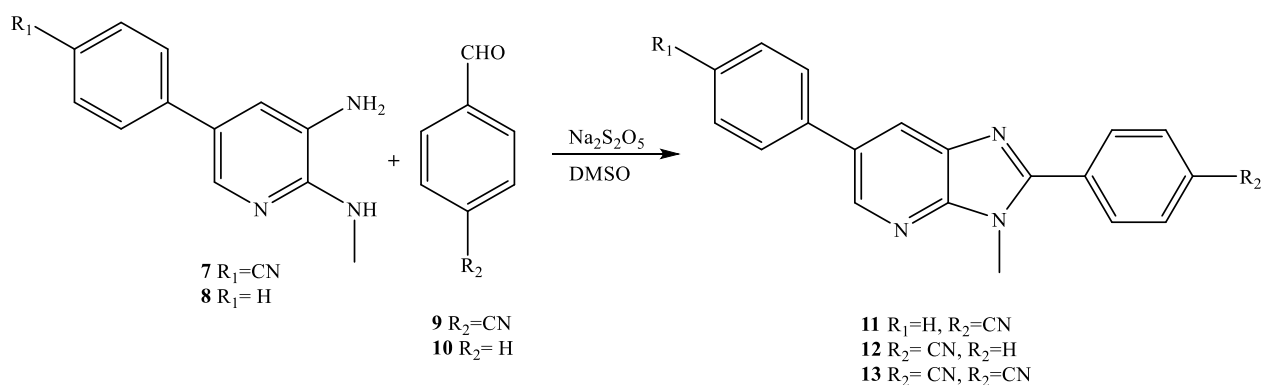
Shema 37. Priprava 4-(5-amino-6-(metilamino)piridin-3-il)benzonitrila **7**

Na Slici 129. prikazan je ^1H NMR spektar spoja **7** pri čemu se osim svih signala H atoma na fenilnoj i piridinskoj jezgri u području od 6,03 do 7,86 ppm uočava singlet integrala 2H od NH_2 skupine na 4,86 ppm kao potvrda uspješne redukcije.



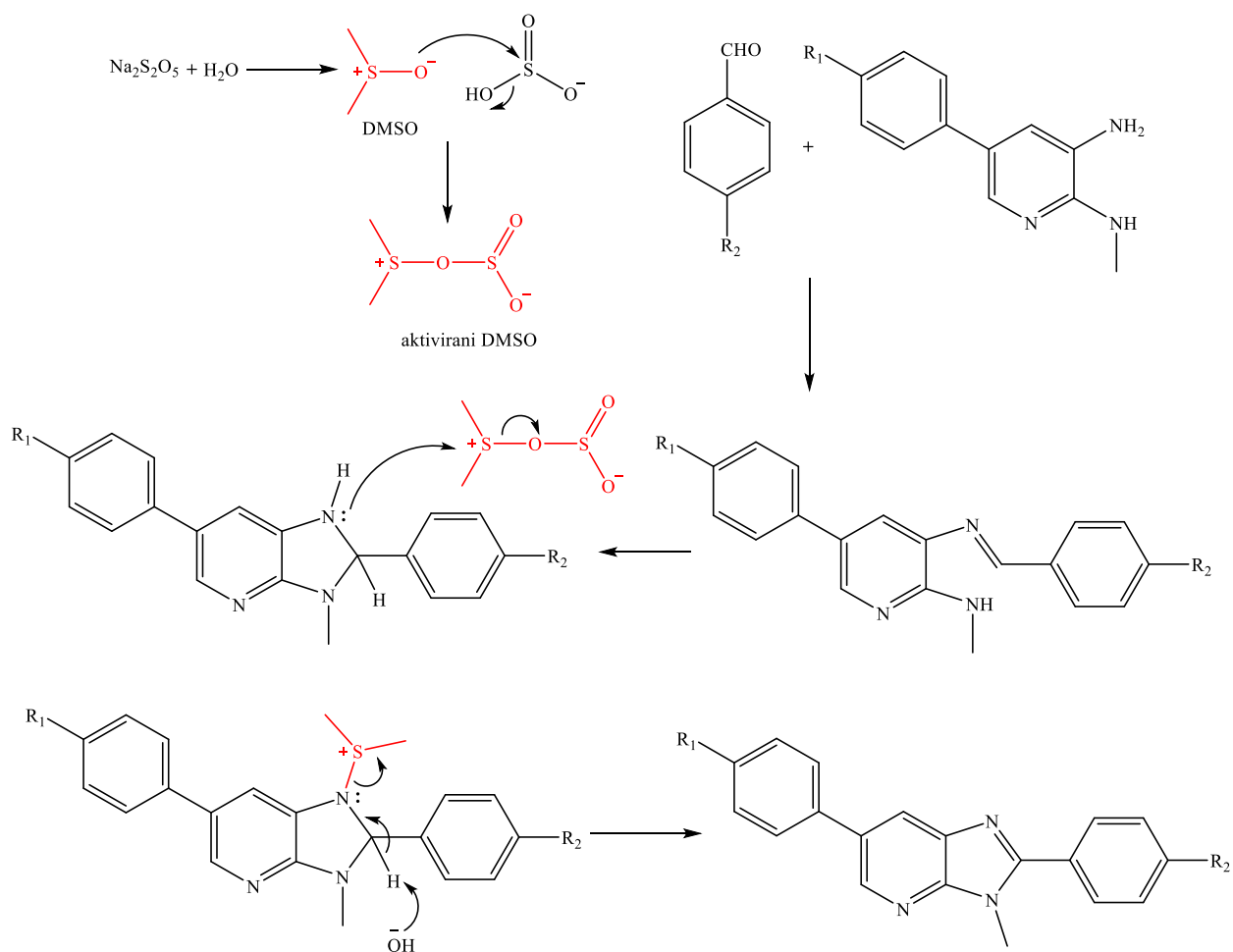
Slika 129. ^1H NMR spektar 4-(5-amino-6-(metilamino)piridin-3-il)benzonitrila **7**

U sljedećem koraku u reakciji ciklokondenzacije pripremljeni su glavni prekursori čija je sinteza prikazana na Shemi 38.



Shema 38. Priprava 2,6-disupstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

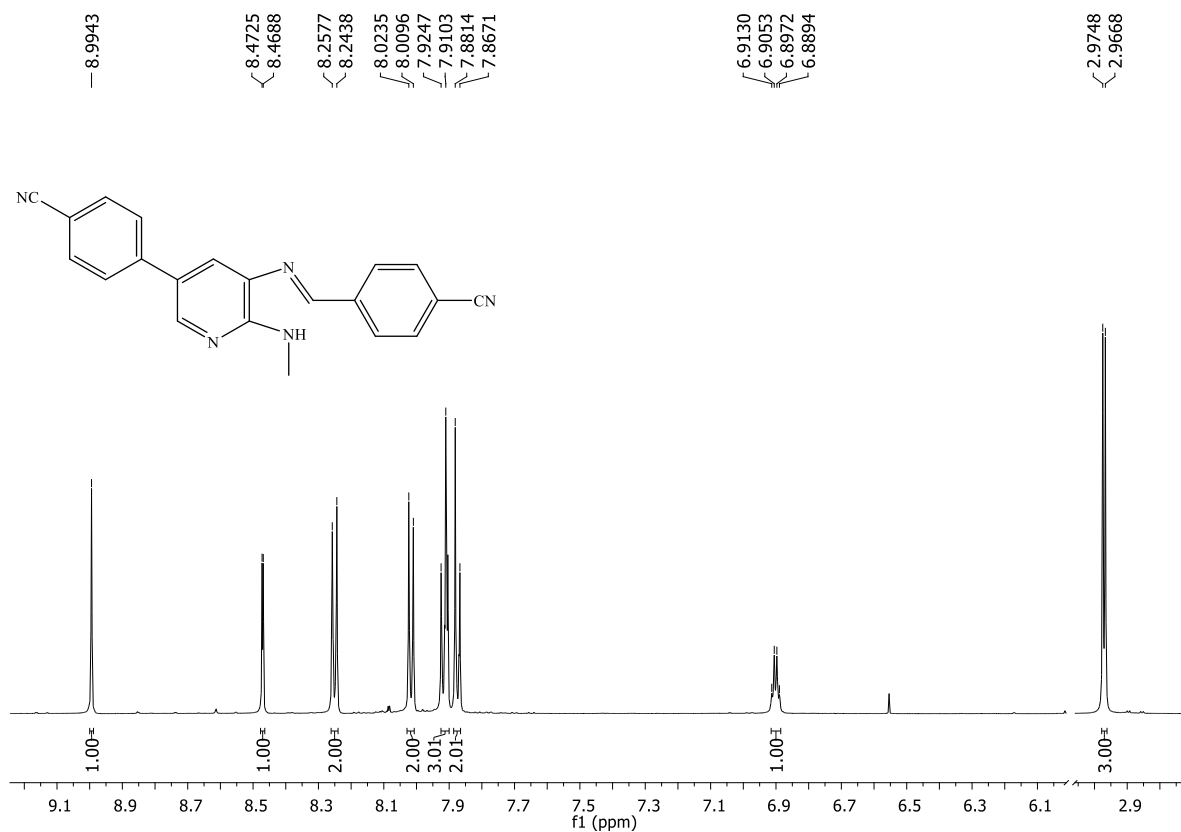
Proučavanjem mehanizma reakcije, utvrđeno je da u prvom koraku reakcije dolazi do reakcije između aldehida i amino skupine u položaju N-3 prema Shemi 39.



Shema 39. Mehanizam reakcije ciklizacije⁹⁶

Taj mehanizam i struktura spoja potvrđeni su ^1H NMR spektroskopijom prema Slici 130., na temelju sljedećih karakterističnih signala koji mu idu u prilog:

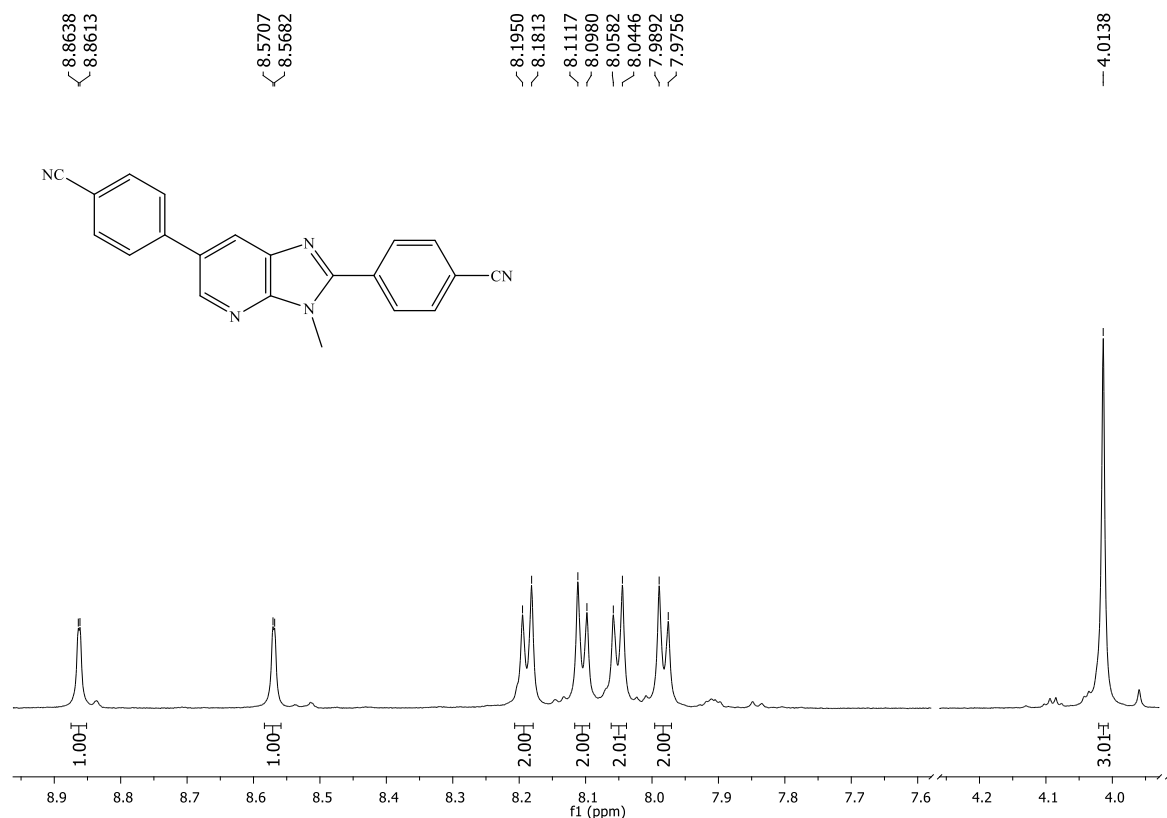
1. signali H atoma CH_3 skupine nalaze se na 2,97 ppm te su prema multiplicitetu dublet, dok, kao što se može vidjeti na Slici 131. u ^1H NMR spektru konačnog spoja oni nalaze na oko 4,01 ppm te su spregnuti u singlet
2. signal singleta integrala 1H na 8,99 ppm odgovara protonu Schiffove baze ($-\text{CH}=\text{N}-$)
3. prisutnost signala NH protona na 6,99 ppm u obliku kvarteta jer se spreže s tri H atoma CH_3 skupine



Slika 130. ¹H NMR spektar acikličkog prekursora

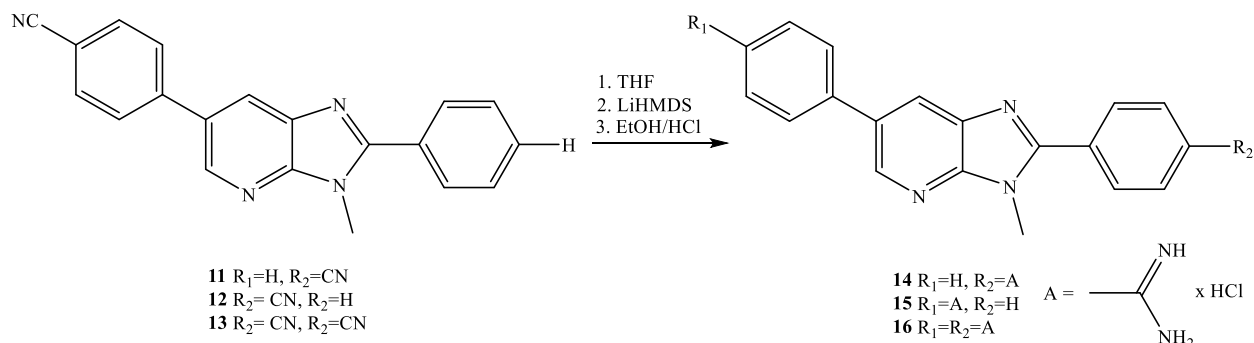
Da se reakcija zaista odvijala prema mehanizmu prikazanom na Shemi 39, (DMSO reagira s $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ⁹⁷ stvarajući aktivirani intermedijer koji sudjeluje u oksidaciji pri čemu prvo dolazi do formiranja imina, nakon čega slijedi ciklički aminal, koji se zatim oksidira u imidazolni prsten, pri 165 °C) vidi se prema ¹H NMR spektru prikazanog na Slici 131. a u kojem se uočava pomak protona CH_3 skupine na 4,01 ppm koji je sada postao singlet te nestanak signala protona na Schiffovoj bazi ($-\text{CH}=\text{N}-$) i NH protona vezanog na CH_3 skupinu.

Sintetizirani spojevi **11**, **12** i **13** pripremljeni su u iskorištenjima od 41,6%, 49,2% te 23,13%.

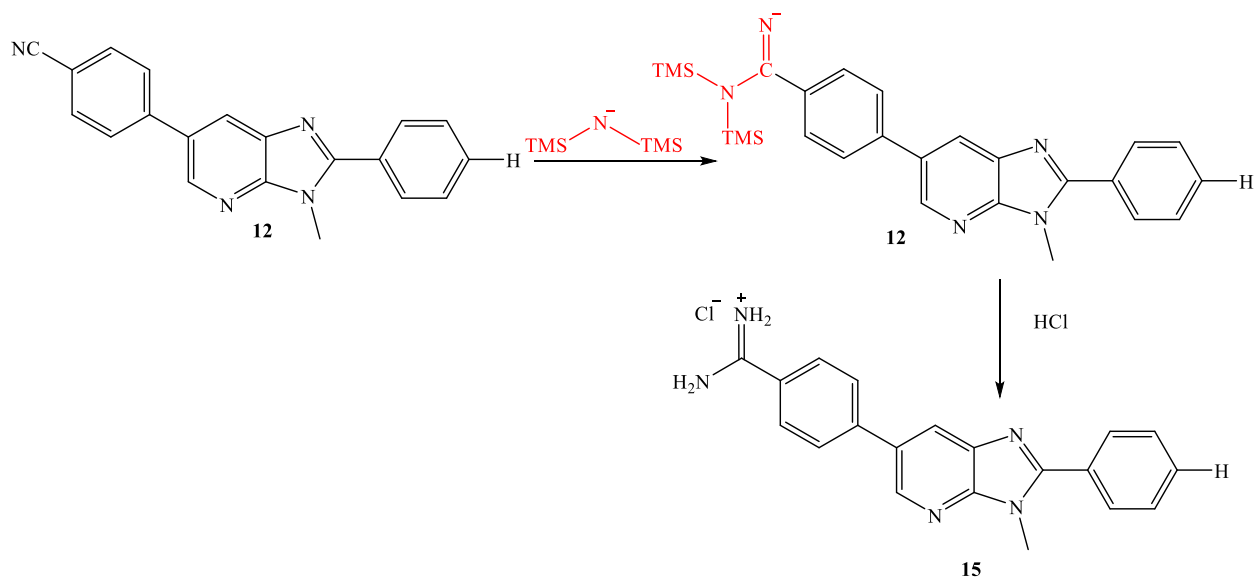


Slika 131. ^1H NMR spektar 4,4'-(3-metil-3H-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzonitrila **13**

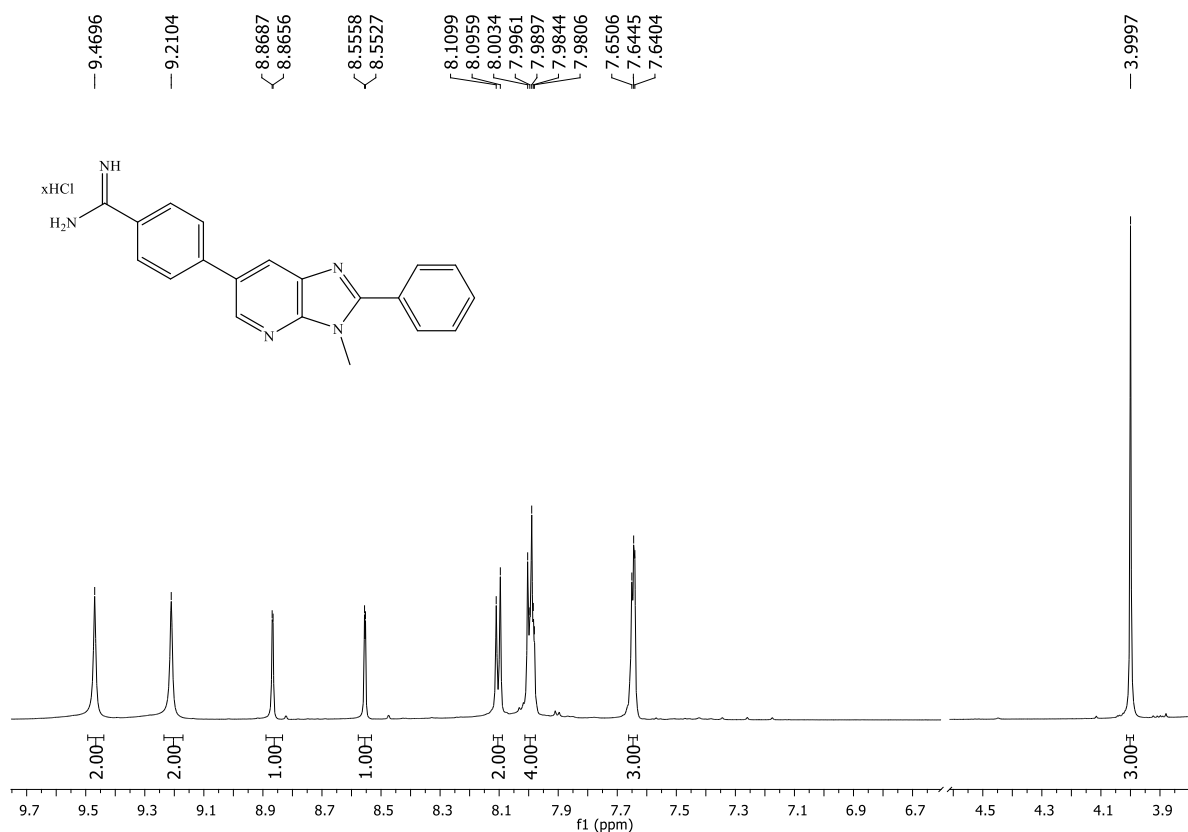
Ciljani spojevi **14**, **15** i **16** koji u svojoj strukturi sadrže nesupstituiranu amidinsku skupinu sintetizirani su u umjerenim iskorištenjima od 47,1%, 48,6% te 27,9% metodom koja je uključivala korištenje litijevog heksametildisilazana (LiHMDS) (Shema 41.) Produkt je izoliran u obliku hidrokloridne soli te su u ^1H NMR spektru uočena dva singleta protona amidinskih skupina na 9,21 i 9,47 ppm dok je u aromatskom dijelu spektra u području od 7,65 do 8,87 ppm vidljiv odgovarajući broj signala protona aromatskog prstena (Slika 132.).



Shema 40. Sinteza derivata s nesupstituiranim amidinom **14-16**

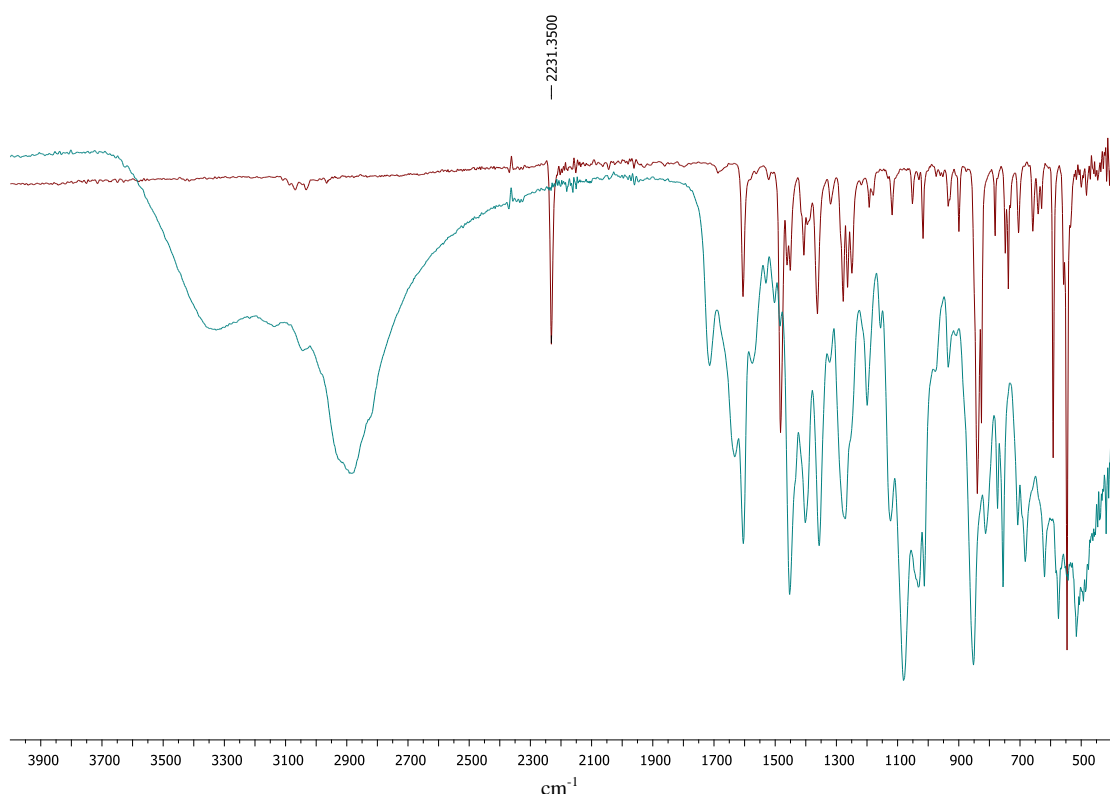


Shema 41. Mehanizam reakcije⁹⁶ s LiHMDS na primjeru nastajanja spoja 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzimidamid hidroklorida **15**



Slika 132. ¹H NMR spektar 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzimidamid hidroklorida **15**

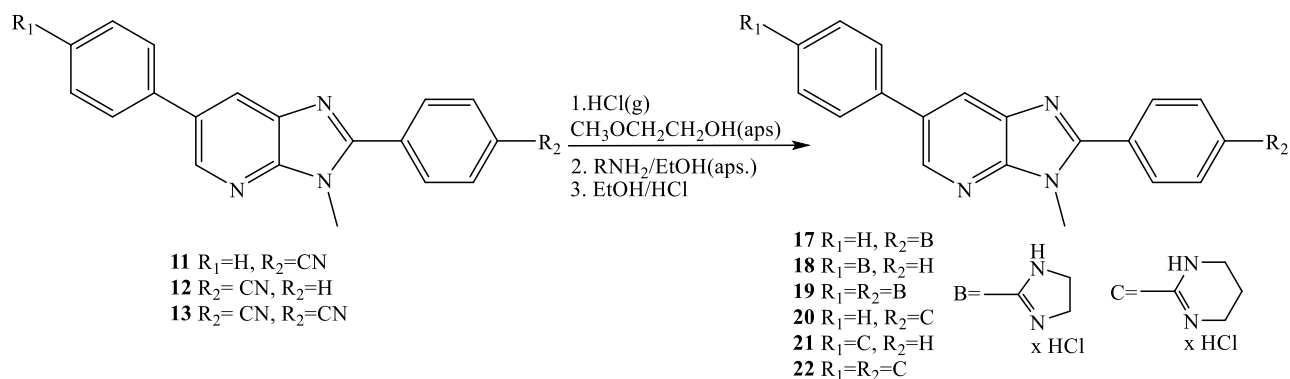
Supstituirani amidino spojevi **17-22** priređeni su kiselim Pinnerovom reakcijom⁸¹ koja se provodi u dva stupnja. Prvi stupanj sadrži uvođenje plinovitog HCl u otopinu cijano supstituiranih spojeva **11-13** u 2-metoksietanolu do zasićenja reakcijske smjese. Nakon toga, smjesa se miješa nekoliko dana na sobnoj temperaturi, a tijek reakcije praćen je IR spektroskopijom do nestanka -CN vrpce na 2200 cm^{-1} što upućuje na nastanak međuproducta imino-estera (Slika 133).



Slika 133. IR di-cijano supstituiranog spoja **13** (crveno) i IR spektar pripadajućeg međuproducta imino-estera (zeleno)

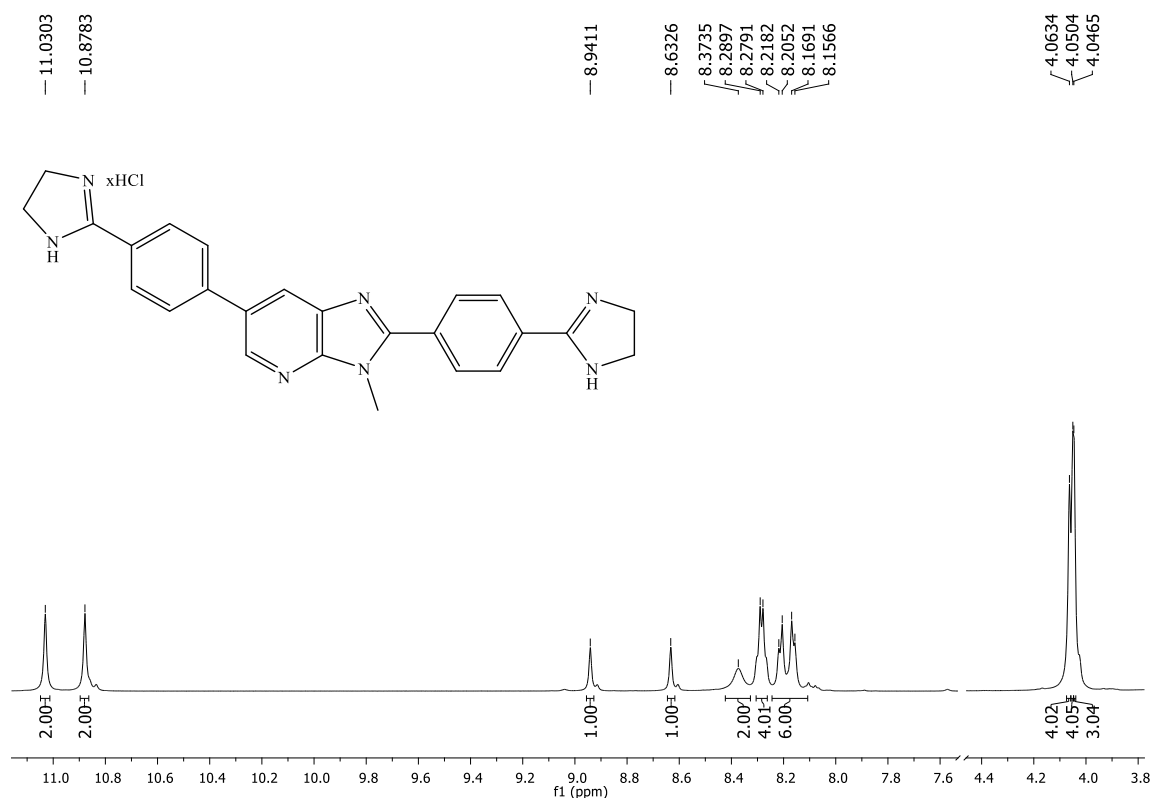
U drugom stupnju reakcije se dobivenom imino-esteru dodaje u suvišku etilendiamin za sintezu cijanih amidina **17-19**, odnosno 1,3-propilendiamin za sintezu spojeva **20-22** u apsolutnom etanolu.

2-imidazolinski derivati **17-19** priređeni su u iskorištenjima od 45,9%, 56,2% te 19,4%, dok su 1,4,5,6-tetrahidropirimidinski amidino spojevi **20-22** priređeni u iskorištenjima od 50,7%, 58,3% te 40,2%.

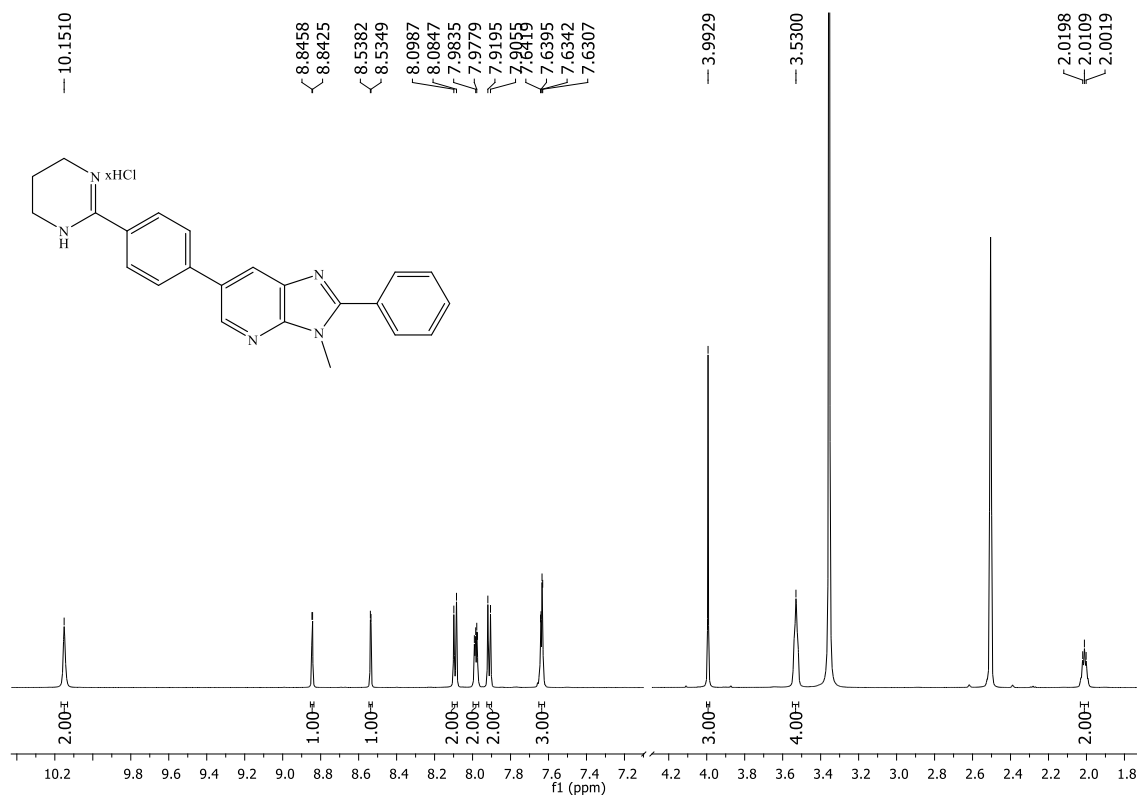


Shema 42. Priprava supstituiranih derivata amidina 17-22

Na Slici 134. prikazan je ¹H NMR spektar spoja **19** pri čemu se na 4,05 i 4,06 ppm mogu uočiti dva signala integrala 4H koji odgovaraju dvjema CH₂ skupinama na dva imidazolinska prstena. Također, među tim signalima nalazi se i signal integrala 3H koji odgovara protonima CH₃ skupine. Signali amidinskih NH protona integrala 2H nalaze se na 10,88 i 11,03 ppm, dok se na području 8,19 do 8,94 ppm nalazi odgovarajući broj signala protona aromatskih jezgri.

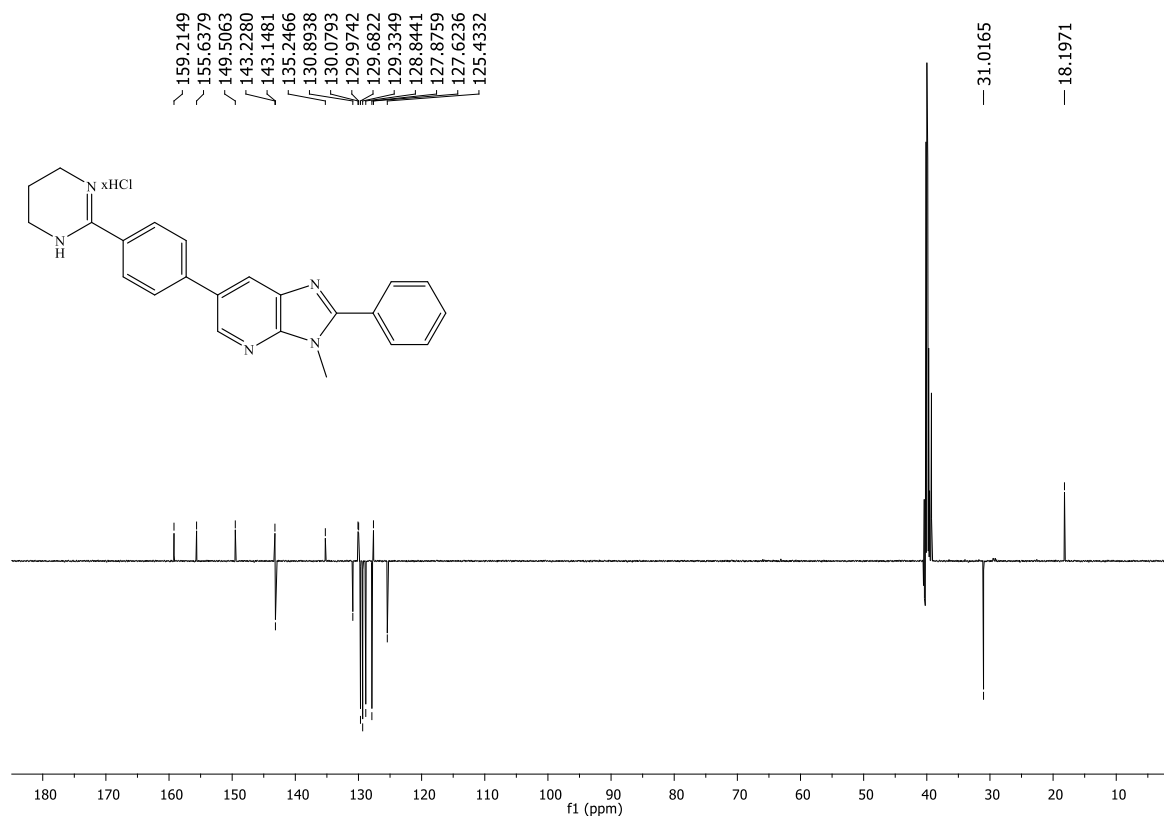


Slika 134. ¹H NMR spektar 2,6-bis(4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-3H-imidazo[4,5-b]piridin dihidroklorida **19**



Slika 135. ^1H NMR spektar 3-metil-2-fenil-6-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **21**

Na Slici 135. prikazan je ^1H NMR spektar spoja **21** pri čemu se zapaža signal singleta integrala 2H na 10,15 ppm koji odgovara NH protonima amidina, u području od 7,64 do 8,84 ppm odgovarajući broj signala karakterističnih za aromatske protone te se u zasjenjenom dijelu spektra na 3,53 ppm i 2,01 ppm nalaze signali za četiri, odnosno dva protona CH_2 skupine.



Slika 136. ¹³C NMR spektar 3-metil-2-fenil-6-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **21**

Na Slici 136. prikazan je i pripadajući ¹³C NMR spektar spoja **21** na kojem se u području od 125-159 ppm nalazi odgovarajući broj signala ugljika na aromatskim jezgrama (CH), dok se u alifatskom dijelu spektra nalazi karakterističan signal ugljikovog atoma CH₃ skupine te na 18 ppm signal koji odgovara metilenskim ugljicima na jezgri 1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il-a kao supstituenta.

4.3. Antiproliferativna aktivnost ispitanih spojeva *in vitro*

Svim ciljanim spojevima ispitana je antiproliferativna aktivnost *in vitro* na šest staničnih linija humanih karcinoma: HCT116 i SW620 kolorektalni karcinom, H460 karcinom pluća, MCF7 karcinom dojke, PC3 karcinom prostate, HeLa karcinom grlića maternice te HEK293 stanice humanog embrionalnog bubrega, u suradnji s dr. sc. Marijetom Kralj i dr. sc. Katarinom Zlatić s Instituta Ruđer Bošković. Rezultati su iskazani kao GI_{50} (koncentracija inhibicije rasta) što odgovara koncentraciji spoja koja inhibira rast stanica za 50%. Rezultati su uspoređeni s dobro poznatim antitumorskim lijekovima Doksorubicinom i Etopozidom. Svi testirani spojevi pokazali su značajnu antiproliferativnu aktivnost, uz slabiju aktivnost prema staničnim linijama PC3 i H460, a rezultati su prikazani u Tablici 1.

4.3.1. Antiproliferativna aktivnost prema odabranim staničnim linijama humanih karcinoma

Stanične linije humanog kolorektalnog karcinoma HCT116 i SW620

Monosupstitucija u položajima R_1 i R_2 s cijano (**11** $GI_{50} = 3,0 \mu\text{M}$, **12** $GI_{50} = 2,2 \mu\text{M}$) i imidazolinilnom skupinom (**17** $GI_{50} = 1,9 \mu\text{M}$, **18** $GI_{50} = 2,3 \mu\text{M}$) povoljno utječe na poboljšanje antiproliferativne aktivnosti. Uvođenje nesupstituiranog ili šesterocikličkog amidinskog supstituenta, kao i disupstitucija, nepovoljno utječu na antiproliferativnu aktivnost ($GI_{50} \geq 10 \mu\text{M}$), osim u slučaju spoja **19** koji pokazuje značajnu ($GI_{50} = 4,8 \mu\text{M}$), ali slabiju antiproliferativnu aktivnost u odnosu na monosupstituirane analoge.

Stanična linija karcinoma pluća H460

Spojevi **11-13** supstituirani cijano skupinom nisu pokazali antiproliferativnu aktivnost prema ovoj staničnoj liniji. Monosupstituirani derivati s imidazolinilskom skupinom **17** i **18** pokazali su najbolju aktivnost prema ovoj staničnoj liniji ($GI_{50} = 2,2 \mu\text{M}$). Uvođenje šesterocikličkog supstituenta, osobito u oba položaja, smanjuje antiproliferativnu aktivnost ($GI_{50} \geq 15 \mu\text{M}$).

Stanična linija karcinoma dojke MCF7

Prema ovoj staničnoj liniji spojevi **12** ($R_1 = \text{CN}$) i **19** ($R_1 = R_2 = \text{imidazolinil}$) pokazali su aktivnost u submikromolarnom rasponu inhibitornih koncentracija ($GI_{50} = 0,6 \mu\text{M}$). Monosupstituirani spojevi **11**, **17** i **18** pokazali su značajnu ($GI_{50} < 2,0 \mu\text{M}$) antiproliferativnu aktivnost dok ostali derivati pokazuju značajan pad u aktivnosti ($GI_{50} > 10 \mu\text{M}$).

Stanična linija karcinoma prostate PC3

Prema ovoj staničnoj liniji većina spojeva pokazuje slabiju aktivnost, osim spoja **13** ($GI_{50} = 4,1 \mu\text{M}$). Spoj **17** ($GI_{50} = 5,9 \mu\text{M}$) koji u svojoj strukturi sadrži dvije cijano skupine pokazao je najbolju i selektivnu antiproliferativnu aktivnost prema staničnoj liniji karcinoma prostate.

Stanična linija karcinoma grlića maternice HeLa

Većina testiranih spojeva pokazuje najbolju aktivnost prema staničnoj liniji karcinoma grlića maternice. Osobito se ističe spoj **12** ($R_1 = \text{CN}$) s aktivnošću u submikromolarnom području. ($GI_{50} = 0,7 \mu\text{M}$). Najslabiju antiproliferativnu aktivnost pokazao je dicijanosupstituiran spoj **13** ($GI_{50} = 28,3 \mu\text{M}$).

Stanice humanog embionalnog bubrega HEK293

Najveća inhibicija rasta stanične linije uočena je kod spojeva **17–19** ($GI_{50} = 1,3 - 2,1 \mu\text{M}$) te u slučaju R_2 cijano supstituiranog derivata **12** ($GI_{50} = 2,72 \mu\text{M}$).

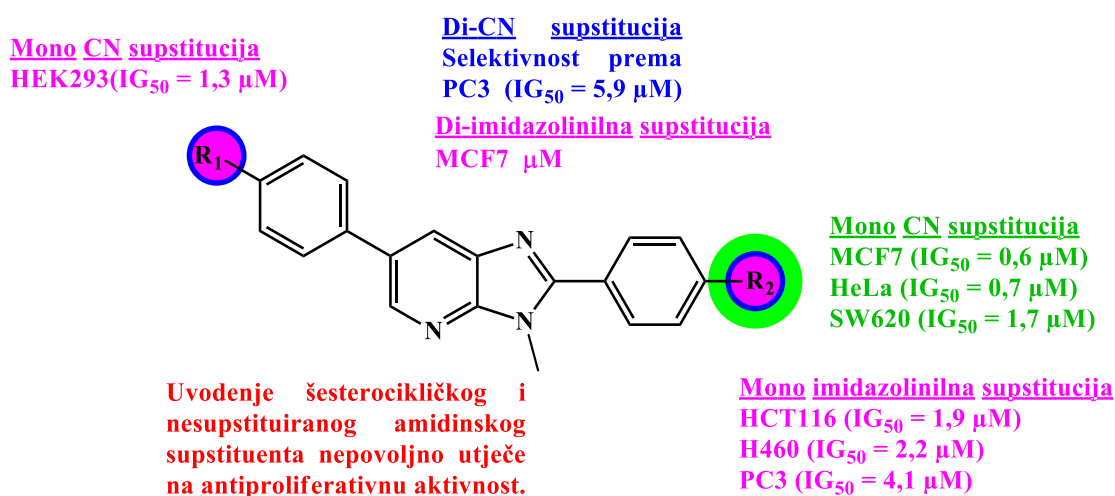
Tablica 1. *In vitro* antiproliferativna aktivnost prema odabranim staničnim linijama humanih karcinoma GI₅₀ (μM)

Spoj	Struktura	Stanična linija						
		HCT116	SW620	H460	MCF7	PC3	HeLa	HEK293
11		3,0±1,1	4,3±0,9	≥100	1,7±0,4	14,2±3,0	1,9±0,5	8,9±0,3
12		2,2±1,1	1,7±0,7	>100	0,6±0,3	7,9±0,7	0,7±0,3	2,72±0,01
13		23,7±10,9	≥100	≥100	20,9±7,1	5,9±0,4	28,3±0,4	16,1±3,5
14		11,5±2,1	16,0±3,5	16,1±2,0	12,5±2,1	14,3±0,3	6,9±0,2	16,6±2,8
15		11,9±2,5	7,8±3,0	13,5±1,7	12,1±0,5	19,8±5,6	5,4±1,0	11,4±0,9
16		10,9±1,1	4,1±1,0	14,3±6,0	11,6±0,3	16,2±4,9	4,1±0,6	10,9±0,9
17		1,9±0,2	2,2±0,3	2,2±0,5	1,6±0,4	4,1±0,1	1,5±0,1	2,1±0,3
18		2,3±0,8	2,7±0,3	2,2±0,2	1,8±0,1	4,9±1,7	1,43±0,01	1,3±0,2
19		4,8±0,3	5,5±0,7	15,3±3,0	0,6±0,1	9,0±3,7	1,5±0,2	2,0±1,0
20		9,74±0,04	11,1±4,7	16,3±0,5	12,1±1,3	13,1±0,9	7,1±1,9	14,0±3,3
21		12,5±0,4	15,0±2,4	18,5±0,7	11,8±2,2	24,1±5,0	10,4±0,2	14,6±0,8
22		34,3±7,9	26,5±8,6	63,8±17,1	21,8±3,4	32,7±5,7	12,7±1,1	20,1±6,6
Std1	Doksorubicin	0,04±0,01	0,003±0,001	0,04±0,01	0,009±0,004	0,09±0,02	0,13±0,02	0,02±0,01
Std2	Etopozid	2,2±0,4	0,14±0,05	2,2±0,4	0,6±0,1	9,3±0,9	11,6±1,9	0,65±0,02

4.3.2. Utjecaj supstituenata na antiproliferativnu aktivnost

Monosupstituirani derivati pokazali su bolju antiproliferativnu aktivnost od disupstituiranih derivate imidazo[4,5-*b*]piridina. Za većinu testiranih staničnih linija supstitucija cijano skupinom i imidazolinilskom doprinosi poboljšanju antiproliferativne aktivnosti, dok derivati s nesupstituiranim amidinom, kao i supstituirani šesterocikličkim amidinom, pokazuju slabiju aktivnost. Cijano supstituirani derivati **11-13** nisu pokazali aktivnost prema staničnoj liniji H460. Disupstituirani derivat **13** pokazao je bolju aktivnost od monosupstituiranih **11** i **12** samo u slučaju stanične linije PC3 ($IG_{50} = 5,9 \mu\text{M}$). Supstitucija cijano skupinom u položaju R_1 pokazuje snažnije antiproliferativno djelovanje od položaja R_2 . Izrazito snažno antiproliferativno djelovanje ostvario je derivat **12** prema staničnim linijama MCF-7 ($IG_{50} = 0,6 \mu\text{M}$) te HeLa ($IG_{50} = 0,7 \mu\text{M}$). Kod derivata **14-16** s nesupstituiranim amidinom, najbolju aktivnost pokazuje derivat **16** s dvije amidinske skupine, osim u slučaju stanične linije H460 prema kojoj je snažnije antiproliferativno djelovanje pokazao spoj **15** ($IG_{50} = 13,5 \mu\text{M}$). Imidazolinilski derivati **17-19** pokazali su izuzetno snažno antiproliferativno djelovanje u inhibitornim koncentracijama $IG_{50} < 10 \mu\text{M}$, uz iznimku spoja **19** koji slabije djeluje prema staničnoj liniji H460 ($IG_{50} = 15,3 \mu\text{M}$). Derivati **20-22** sa šesterocikličkim amidinom pokazali su najslabije antiproliferativno djelovanje u odnosu na derivate supstituirane s drugim supstituentima. U većini slučajeva derivat **20** sa supstituentom u položaju R_2 pokazuje bolju aktivnost od derivata **21**, dok disupstitucija dovodi do značajnog pada aktivnosti.

Na Slici 137 prikazan je sumirani rezultat proučavanja strukture i aktivnosti (SAR).



Slika 137. Odnos strukture i antiproliferativne aktivnosti

4.4. Antibakterijska aktivnost ispitanih spojeva *in vitro*

Antibakterijska aktivnost *in vitro* testirana je prema 4 soja Gram negativnih bakterija (*Acinetobacter baumannii* ATCC 17478, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* efflux del) te prema 3 soja Gram pozitivnih bakterija (*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), u suradnji s dr. sc. Mihailom Banjancem iz Selvite d.o.o.. Kao standardi korišteni su poznati antibiotici Ampicilin, Ceftazidim, Ciprofloksacin te Meropenem. Rezultati su izraženi kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC μM) što odgovara najmanjoj koncentraciji spoja koja sprječava vidljiv rast bakterija.

Većina testiranih spojeva nije pokazala antibakterijsku aktivnost, a rezultati su prikazani u Tablici 2. Umjerenu antibakterijsku aktivnost pokazali su derivati **15** i **16** s nesupstituiranim amidinom. Spoj **15** pokazao je djelovanje prema Gram pozitivnim bakterijama *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (MIC = 16 μM), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (MIC = 32 μM) te prema Gram negativnoj bakteriji *Escherichia coli* efflux del (MIC = 32 μM). Spoj **16** pokazao je djelovanje prema Gram pozitivnoj bakteriji *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (MIC = 32 μM), te prema Gram negativnoj bakteriji *Escherichia coli* efflux del (MIC = 32 μM). Disupstituirani šesterociklički derivat **22** pokazao je umjerenu aktivnost također prema Gram negativnoj *Escherichia coli* efflux del (MIC = 32 μM).

Mono supstituiran derivat **15**

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 (MIC = 16 μM)

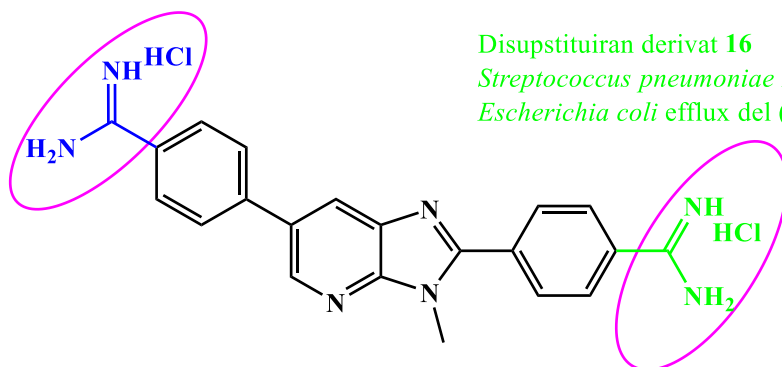
Enterococcus faecalis ATCC 29212 (MIC = 32 μM)

Escherichia coli efflux del (MIC = 32 μM).

Disupstituiran derivat **16**

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 (MIC = 32 μM)

Escherichia coli efflux del (MIC = 32 μM)



Disupstitucija sesterocikličkim amidinskim skupinama **22**

Escherichia coli efflux del (MIC = 32 μM)

Slika 138. Odnos strukture i antibakterijske aktivnosti

Tablica 2. *In vitro* antibakterijska aktivnost prema odabranim bakterijskim sojevima MIC (μM)

Spoj	Struktura	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> efflux del	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>A. baumannii</i> ATCC 17478
11		>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
12		>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
13		>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
14		>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15		16	64	32	>64	32	>64	>64
16		32	>64	>64	>64	32	64	>64
17		>64	>64	>64	>64	64	>64	>64
18		>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
19		>64	>64	>64	>64	64	>64	>64
20		>64	>64	>64	>64	64	>64	>64
21		>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
22		>64	>64	>64	>64	32	>64	>64
Std1	Ampicillin	<0,125	2	1	2	2	>64	16
Std2	Ceftazidime	0,25	8	>64	0,25	<0,125	1	4
Std3	Ciprofloxacin	0,25	0,25	1	<0,125	<0,125	0,25	0,25
Std4	Meropenem	<0,125	<0,125	4	<0,125	<0,125	1	0,5

4.5. Vežanje molekula na DNK

Kada se male organske molekule vežu na DNK, ona podliježe različitim strukturnim promjenama koje značajno utječu na stanični ciklus na način da ometaju aktivnost enzima i transkripcijskih faktora koji su u interakciji s DNK. Ovi efekti mogu poremetiti stanični ciklus i inhibirati replikaciju DNK, staničnu diobu i diferencijaciju stanica⁹⁸. Dakle, spojevi koje se mogu vezati na DNK imaju potencijal da se koriste kao lijekovi⁹⁹. Da bismo razumjeli mehanizam djelovanja takvih potencijalnih lijekova i dizajnirali nove, prvo je potrebno razumjeti način na koji oni stupaju u interakciju s DNK. Sukladno tomu, dva glavna načina vežanja spojeva na DNK jesu kovalentno i nekovalentno vežanje. Kovalentne interakcije podrazumijevaju da molekule provode alkiliranje DNK pri čemu stvaraju kemijsku vezu. Nekovalentne interakcije uključuju vežanje u veliki (eng. *major groove binding*) i u mali utor (eng. *minor groove binding*) DNK, te interkaliranje između parova baza. U nekim slučajevima, interakcija spojeva s DNK može rezultirati oštećenjem DNK i dovesti do, primjerice, pucanja jednog ili oba lanca dvosturke uzvojnice. Sve će te interakcije vjerojatno utjecati na enzime (npr. polimeraze, topoizomeraze) i bitne procese transkripcije, replikacije i popravka, što dovodi do stanične smrti¹⁰⁰.

4.5.1. Kovalentni način vežanja

Za ovaj način vežanja karakteristični su alkilirajući agensi koji mogu biti definirani kao spojevi koji su pod fiziološkim uvjetima (vodena otopina, 37 °C, pH 7,4) sposobni kovalentno vezati alkilni supstituent na biomakromolekulu (DNK). U kemijskom smislu, riječ je o reakciji nukleofilne supstitucije između dušikovih atoma na purinskim/pirimidinskim bazama ili kisikovih atoma fosfodieterskoj okosnici DNK kao nukleofila te alkilnih skupina kao elektrofila. Efekti alkiliranja su: sprječavanje DNK replikacije i RNK transkripcije, fragmentacija DNK hidrolitičkim reakcijama, sparivanje pogrešnih parova baza (nespecifične baze) te pojava DNK-protein „*cross-linking-a*“ pri čemu se dobiva nefunkcionalna DNK i nefunkcionalni protein¹⁰¹.

4.5.2. Nekovalentni način vežanja

Groove binderi: Zbog razlika u elektrostatskom potencijalu, sposobnosti stvaranja vodikovih veza i steričkoj smetnji, veliki i mali utor razlikuju se u svojim svojstvima molekularnog prepoznavanja. Općenito groove binderi pokazuju veći afinitet prema A-T području u velikom i malom utoru jer je tamo veći elektrostatski potencijal.

Veliki utor ima specifičnija donorska i akceptorska mjesta vodikove veze nego mali utor te se u njega vežu oligonukleotidi (enzimi i proteini), a u mali utor, s vanjske strane vežu se različiti lijekovi i organske molekule¹⁰².

Interkalatori: Naziv interkalatori potječe od latinske riječi „*intercalare*“ što znači umetnuti te se referira na specifično ponašanje u kojem se određene tvari vežu na DNK. Tipični interkalatori su spojevi koji imaju 3-4 kondenzirane aromatske jezgre koja se naziva kromofor te dovoljno veliku planarnu aromatsku površinu kojom se umetnu okomito na ravninu dvostruke uzvojnice između odgovarajućih parova baza u DNK¹⁰³. Interkalacija DNK-organska molekula stabilizirana je π - π , hidrofobnim i polarnim interakcijama te elektrostatskim u slučaju kationskih interkalatora s polianionskom nukleinskom kiselinom. Umetanje interkalatora između susjednih parova baza rezultira značajnom promjenom u strukturi DNK; produljenje, ukrućenje i odmotavanje DNK¹⁰⁴.

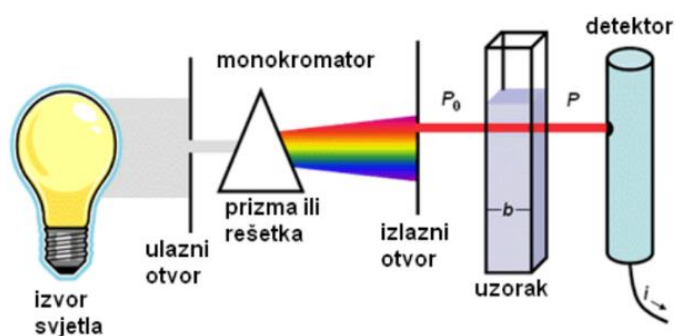
4.5.3. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda, odnosno optička tehnika koja mjeri razliku u apsorpciji lijevog i desnog cirkularno polariziranog svjetla¹⁰⁵. Molekule koje ostvaruju interakciju s cirkularno polariziranim elektromagnetskim zrakama jesu kiralne¹⁰⁶. CD se općenito smatra vrijednim biofizičkim alatom čija je svrha proučavanje interakcija protein-ligand, DNK-ligand, protein-DNK i strukture proteina ili DNK, u otopini^{107,108}. Veličina koja se koristi za opisivanje ovog fenomena naziva se eliptičnost, Θ i izražena je u stupnjevima, a prikladnija karakterizacija CD jest preko razlike u molarnim ekstinkcijskim koeficijentima $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]¹⁰⁹. Teorijski (tj. kvantno kemijski) opisi CD spektara velikih molekula poput DNK su vrlo složeni, tako da metoda ne može dati strukturne informacije o molekulama na atomskoj razini. CD spektroskopija ima mnoge prednosti u odnosu na druge metode konformacijske analize. Prvo, tehnika je izuzetno osjetljiva te dopušta rad s masama DNK već od 25 μg . Koncentracija DNK također može biti vrlo niska (20 $\mu\text{g/ml}$). Ovo je korisno za ispitivanje uzoraka niske topljivosti (npr. dugi fragmenti DNK bogati G-područjem) ili onih koji imaju tendenciju agregacije pod ekstremnim uvjetima otapala (npr. visoka koncentracija¹¹⁰ soli ili organske otopine, koje se koriste za oponašanje interakcija s proteinima ili drugih molekula u stanicama)¹⁰¹. Drugo, proučavane molekule ne moraju biti samo kratke (oligonukleotidi) već i duge, što je posebno važno kod DNK. Treće, uzorci se lako mogu titrirati različitim sredstvima (poput soli, alkohola ili kiselina) koji induciraju konformacijske izomerizacije u DNK¹¹¹.

4.6. Ispitivanje interakcije nekih priređenih derivata s *ct*-DNK

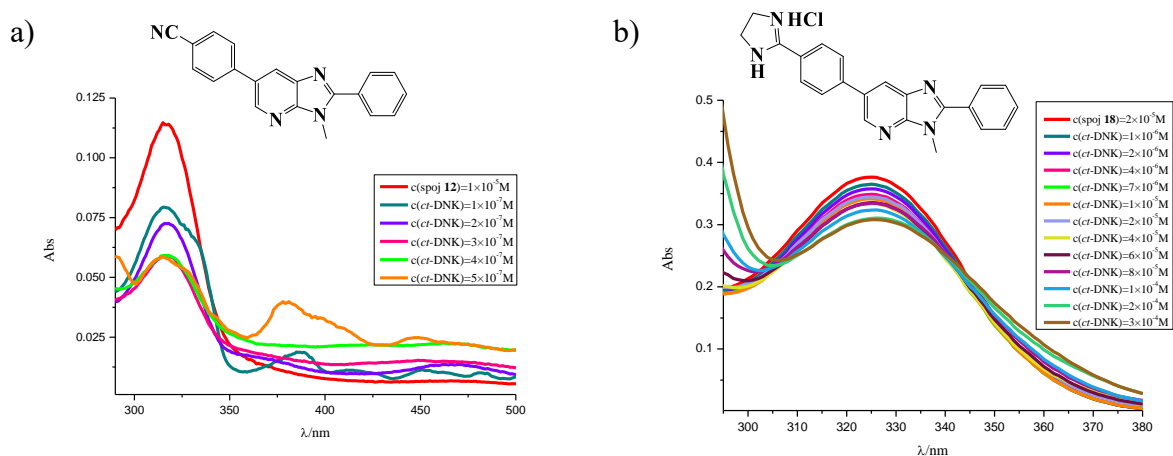
4.6.1. UV/Vis spektroskopske titracije

Poznato je da se struktura DNK mijenja u interakciji s malim organskim molekulama, što dovodi do promjene u apsorpcijskom spektru. Te se promjene manifestiraju u pomicanju apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama-batokromni pomak, odnosno crveni pomak ili prema kraćim valnim duljinama-hipsokromni pomak, odnosno plavi pomak. Često su praćene hiperkromnim-povećanjem intenziteta apsorpcije ili hipokromnim efektom-smanjenjem intenziteta apsorpcije. Ispitivanja UV/Vis spektroskopijom su provedena u puferu NaCaCo pri početnim koncentracijama ispitivanih spojeva $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ za spoj **12**, $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ za spoj **18**, $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ za spoj **17** i $2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ za spoj **19**.



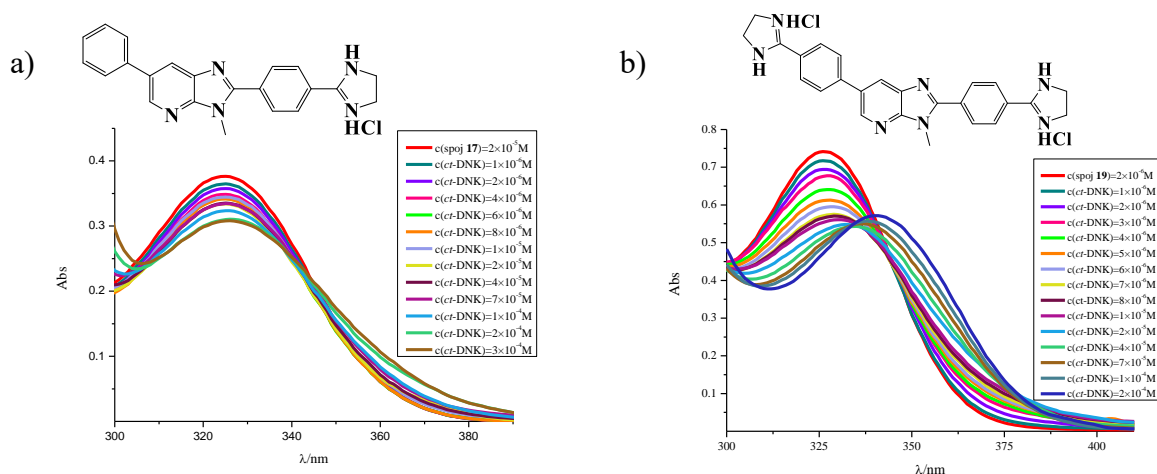
Slika 139. Shematski prikaz spektrofotometra

Na Slikama 140 i 141. prikazane su titracijske krivulje ispitivanja interakcije spojeva **12** i **18**, odnosno **17** i **19** praćene UV/Vis spektroskopijom.



Slika 140. UV/Vis spektroskopske titracije spojeva **12** a) i **18** b) s *ct*-DNK

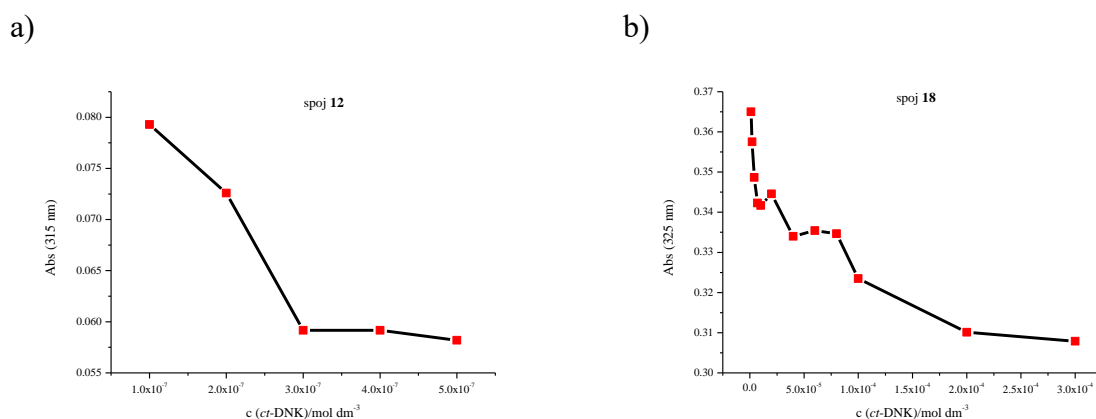
Na temelju Slike 140. vidljivo je kako je dodatak *ct*-DNK u otopinu spoja **12** uzrokovao taloženje spoja uslijed smanjenja topljivosti, dok je kod spoja **18** rezultirao hipokromnim efektom intenziteta apsorpcije bez pomaka apsorpcijskog maksimuma.



Slika 141. UV/Vis spektroskopske titracije spojeva **17** a) i **19** b) s *ct*-DNK

Povećanjem koncentracije *ct*-DNK na UV/Vis spektru spoja **17** vidljiv je hipokromni efekt intenziteta apsorpcije bez pomaka apsorpcijskog maksimuma, dok dodatak *ct*-DNK u otopinu spoja **19** pokazuje uz izraženiji hipokromni efekt intenziteta apsorpcije, i postupni batokromni pomak maksimuma apsorpcije u apsorpcijskom spektru početnog spoja **19**. U titracijskoj krivulji može se uočiti izozbestična točka koja upućuje na jedinstveni način interakcije s *ct*-DNK.

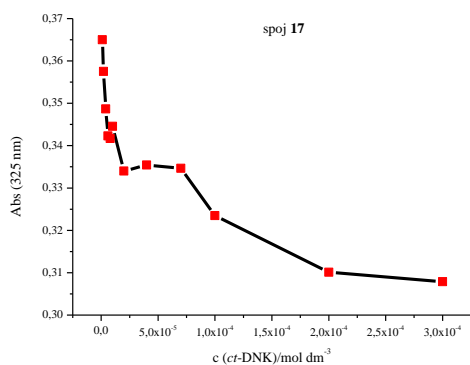
Na Slici 142. a) i b) prikazana je ovisnost intenziteta apsorpcije spoja **12** na 315 nm, odnosno spoja **18** na 325 nm o koncentraciji *ct*-DNK.



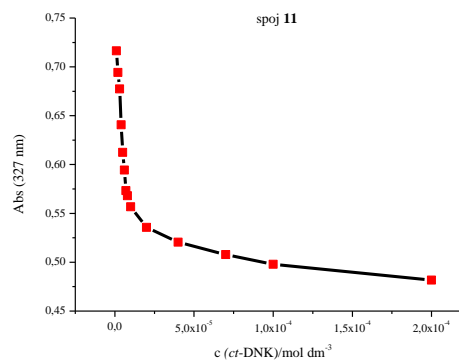
Slika 142. Ovisnost apsorpcije spojeva **12** a) o koncentraciji dodane *ct*-DNK na 315 nm i b) **18** 325 nm

Iz krivulja je vidljivo kako dodatkom otopine *ct*-DNK u otopinu ispitivanih spojeva dolazi do pada apsorbancije. Na 143. a) i b) prikazana je ovisnost intenziteta apsorbancije spoja **17** na 325 nm, odnosno spoja **19** na 327 nm o koncentraciji dodane *ct*-DNK.

a)



b)



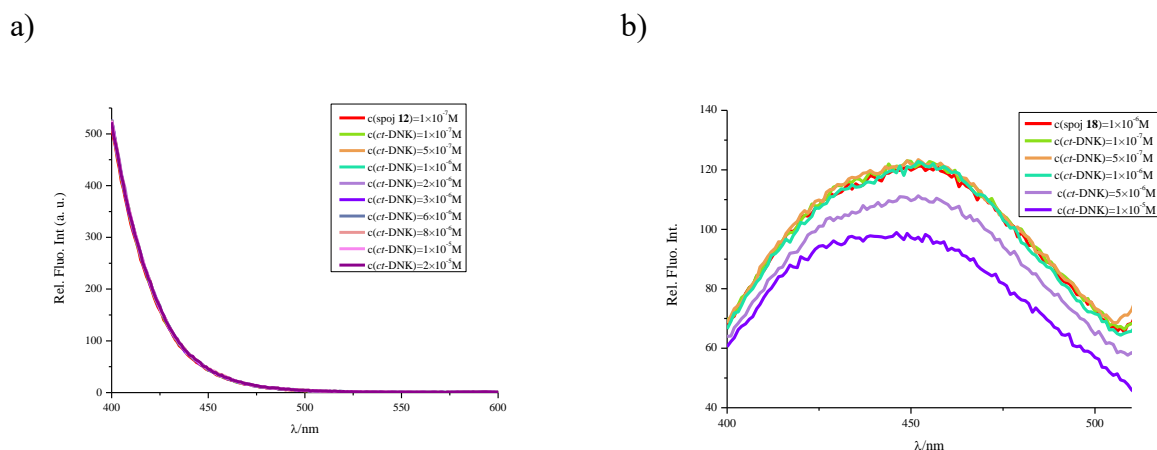
Slika 143. Ovisnost apsorbancije spojeva **17** a) o koncentraciji dodane *ct*-DNK na 325 nm i b) **19** 327 nm

Iz grafa ovisnosti intenziteta apsorbancije spoja **17** na 325 nm, odnosno spoja **19** o koncentraciji dodane *ct*-DNK primjećuje se da dolazi do pada intenziteta apsorbancije.

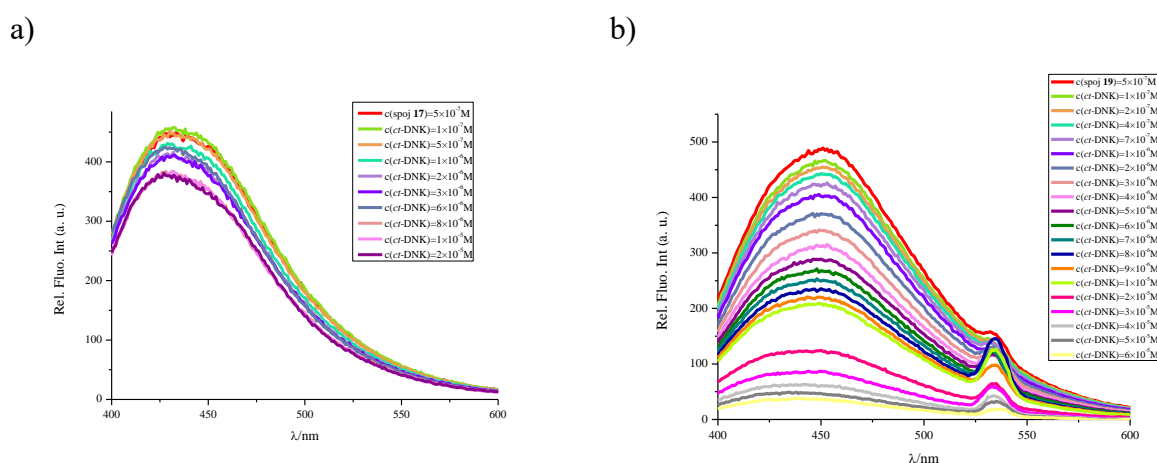
4.6.2. Fluorimetrijska spektroskopija

Fluorimetrijskim titracijama izabranih spojeva **12**, **18**, **17** i **19** također je ispitan afinitet prema *ct*-DNK. Ispitivanja su napravljena u puferu CaCo pri početnim koncentracijama spojeva 5×10^{-7} mol dm⁻³ pri čemu su korištene valne duljine pobude kako slijedi: spoj **12** ($\lambda_{\text{exc}} = 315$ nm); spoj **18** ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm); spoj **17** ($\lambda_{\text{exc}} = 325$ nm); spoj **19** ($\lambda_{\text{exc}} = 268$ nm). Fluorimetrijska spektroskopija puno je osjetljivija metoda od UV/Vis spektroskopije te je ispitivanja moguće provesti kod značajno nižih koncentracija.

Rezultati fluorimetrijskih titracija spojeva **12** i **18** s *ct*-DNK prikazani su na Slici 144 a) i b). Na temelju dobivenih titracijskih emisijskih krivulja, može se uočiti da prilikom titracije ispitivanog spoja **12** s *ct*-DNK (Slika 144. a), da je intenzitet emisije spoja ostao u potpunosti nepromijenjen dodatkom *ct*-DNK, dok za spoj **18** (Slika 144. b) neposredno nakon dodatka *ct*-DNK nema promjene intenziteta emisije, dok pri višim koncentracijama *ct*-DNK dolazi do hipokromnog efekta intenziteta emisije.



Slika 144. Fluorimetrijske spektroskopske titracije spojeva **12** a) i **18** b) s *ct*-DNK

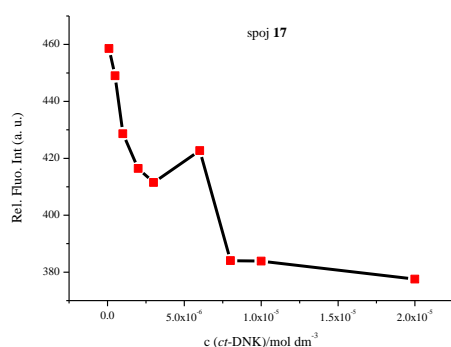


Slika 145. Fluorimetrijske spektroskopske titracije spojeva **17** a) i **19** b) s *ct*-DNK

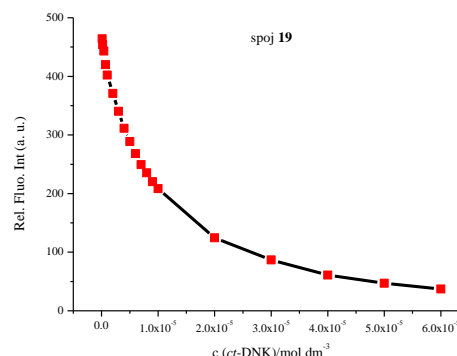
Dodatak *ct*-DNK u otopinu spoja, potpuno gasi fluorescenciju spoja **19** postupnim hipokromnim efektom inenziteta emisije, uz dodatnu pojavu apsorpcijskih maksimuma pri većim valnim duljinama kod posljednjih koncentracija iz reda veličine 10^{-6} mol dm^{-3} što može biti rezultat pogrešaka uslijed većih koncentracija. Ovaj rezultat je u suprotnosti s fluorescencijskom titracijskom krivuljom spoja **17** čija je emisija samo zanemarivo promijenjena uslijed dodatka *ct*-DNK; blagi hiperkromni efekt intenziteta emisije pri početku dodatka *ct*-DNK, te hipokromni efekt intenziteta emisije u daljnjim titracijama.

Na Slikama 146 a) i b) prikazana je ovisnost intenziteta emisije spoja **17** na 431 nm, odnosno spoja **19** na 450 nm o koncentraciji dodane *ct*-DNK. Za spoj **19** primjećuje se postupni pad intenziteta fluorescencije, dok za spoj **17** najprije dolazi do pravilnog pada intenziteta emisije, pa porasta te opet padanja intenziteta emisije¹¹².

a)



b)

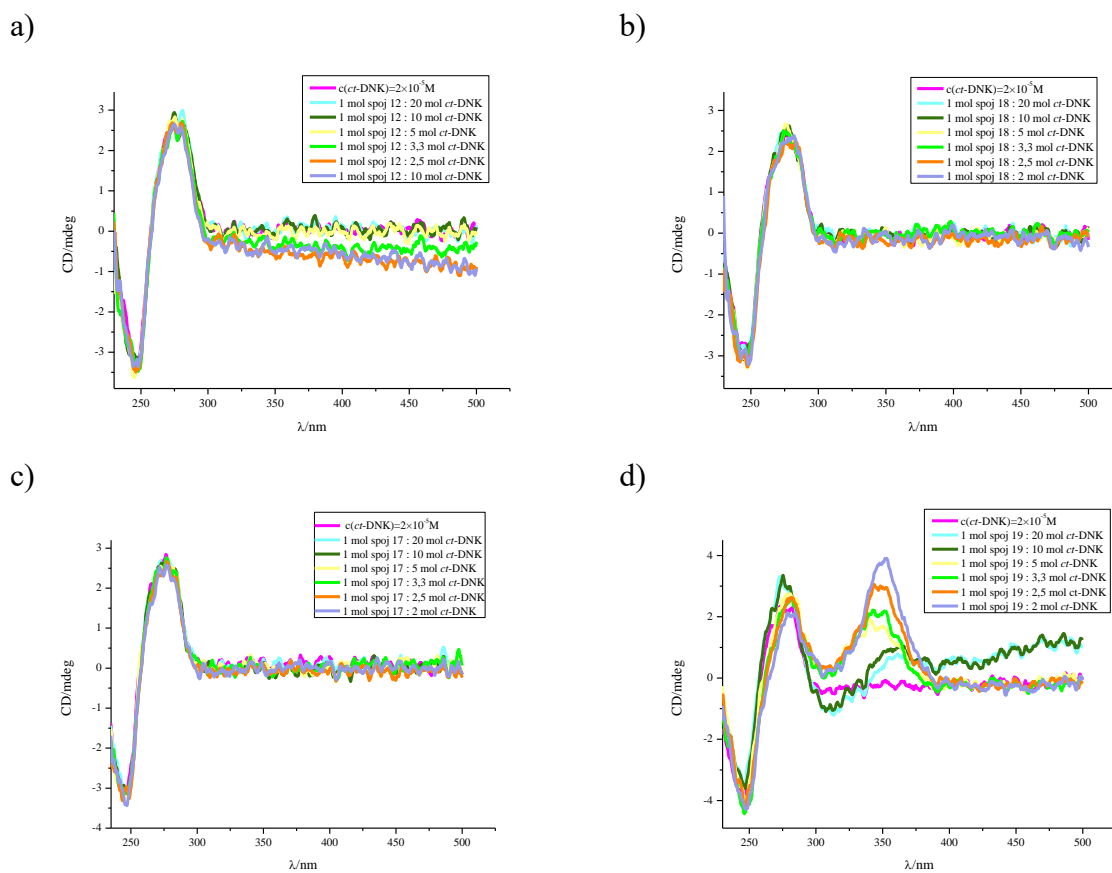


Slika 146. Ovisnost apsorbancije spojeva **17** a) o koncentraciji dodane *ct*-DNK na 431 nm i b) **19** 450 nm

4.6.3. CD spektroskopske titracije

Kako bi se dalje provjerila interakcija izabranih derivata **12**, **18**, **17** i **19** s *ct*-DNK koja ima mogućnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti, provedena su CD spektroskopska mjerenja. Općenito, sam izgled ICD spektra, odnosno tog induciranog signala će ovisiti o odnosu između vektora dipolnog momenta spoja koji nije kiralan u odnosu na dipolni moment kromofora same molekule DNK. Poznato je da, ukoliko se veže interkalator, da se na spektru uočavaju mali i negativni ICD signali kada je njegov dipolni moment polariziran uzduž duge osi veznog mjesta (koji je paralelan sa simetralom parova baza)¹¹³. *Groove binderi* obično pokazuju intenzivni i visoki pozitivan ICD signal te se nalaze pod kutem od 45° u odnosu na kiralnu os i u odnosu na dipolne momente parova baza. Amino skupinama mogu stvoriti nekakve vodikove veze.

Dodatak spoja **12** rezultirao je malim promjenama u CD spektru (Slika 147. a). Dodatak spoja **18** (Slika 147. b) i spoja **17** u otopinu *ct*-DNK (Slika 147. c) ne pokazuje promjene u CD spektru, što znači da ovi spojevi ne utječu značajno na promjenu strukture *ct*-DNK ili da se vežu slabim intenzitetom. Pojava intenzivno pozitivne ICD vrpce između $\lambda = 350$ i 400 nm sugerira na vezanje spoja **19** u mali tor *ct*-DNK¹¹⁴ (Slika 147. d). Moguće je da je takva interakcija spoja **19** s *ct*-DNK odgovorna za izraženu i selektivnu antiproliferativnu aktivnost tog spoja na MCF7 staničnu liniju humanog karcinoma.



Slika 147. Promjene u CD spektrima *ct*-DNK ($c(\text{DNK}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) dodatkom a) spoja **12**, b) spoja **18**, c) spoja **17** i d) spoja **19**

U Tablici 3 prikazani su rezultati dobiveni ispitivanjem interakcije spojeva s *ct*-DNK.

Tablica 3. Rezultati ispitivanja interakcije odabranih spojeva s DNK

spojevi	Rezultati dobiveni spektroskopskim titracijama		
	<i>UV/VIS</i>	<i>FLUO</i>	<i>CD</i>
12	hipokromni pomak	nema interakcije	nema ICD signala
18	hipokromni pomak	hipokromni pomak	nema ICD signala
17	hipokromni pomak	hipokromni pomak	nema ICD signala
19	hipokromni pomak batokromni pomak	izraženi hipokromni pomak	pozitivni ICD signal

Na temelju svih dobivenih rezultata preliminarnih ispitivanja može se zaključiti da **spoj 19** pokazuje **najbolju interakciju s *ct*-DNK** te se, sukladno svim dobivenim rezultatima, **veže u mali utor *ct*-DNK** što bi mogao biti jedan od mogućih mehanizama biološkog djelovanja.

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: 4-(3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzimidamid hidroklorid **14**, 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzimidamid hidroklorid **15**, 4,4'-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzimidamid dihidroklorid **16**, 2-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorid **17**, 6-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorid **18**, 2,6-bis(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin dihidroklorid **19**, 3-metil-6-fenil-2-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorid **20**, 3-metil-2-fenil-6-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorid **21**, 3-metil-2,6-bis(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin dihidroklorid **22**
- U prvom stupnju sinteze, reakcijom aminacije iz 5-brom-2-kloropiridin-3-amina **1** i suviškom metilamina priređen je 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amin **2**.
- Suzukijevom reakcijom križnog spajanja 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **2** s (4-cijanofenil)bornom kiselinom **3**, odnosno fenilbornom kiselinom **4** uz tetrakistrifenilfosfinpaladij Pd(PPh₃)₄ kao katalizator i 2M vodenom otopinom natrijevog karbonata kao baze, pripremljeni su spojevi **5** i **6**.
- Redukcijom spojeva **5** i **6** s SnCl₂·2H₂O priređeni su 4-(5-amino-6-(metilamino)piridin-3-il)benzonitril **7** i *N*²-metil-5-fenilpiridin-2,3-diamin **8**.
- 4-(3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzonitril **11**, 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzonitril **12**, 4,4'-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzonitril **13** kao glavni prekursori, priređeni su reakcijom ciklokondenzacije iz spojeva **7** i **8** te odgovarajućih benzaldehida **9** i **10** uz Na₂S₂O₅ zagrijavanjem na visokoj temperaturi.
- Sinteza derivata s nesupstituiranim amidinom 4-(3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzimidamid hidroklorida **14**, 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzimidamid hidroklorida **15** i 4,4'-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzimidamid dihidroklorida **16** provedena je u reakciji s LiHMDS.
- Sinteza 2-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **17**, 6-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **18**, 2,6-bis(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin dihidroklorida **19**, 3-metil-6-fenil-2-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **20**, 3-metil-2-fenil-

6-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **21** i 3-metil-2,6-bis(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin dihidroklorida **22** provedena je kiselom Pinnerovom reakcijom u 2-metoksietanolu.

- Tijek Pinnerove reakcije praćen je IR spektroskopijom.
- Svi amidino-supstituirani derivati **14-22** izolirani su u obliku hidrokloridne soli radi bolje topljivosti.
- Strukture novopriređenih spojeva potvrđene su ¹H NMR i ¹³C NMR spektroskopijom.
- Svim ciljanim spojevima ispitana je antiproliferativna aktivnost *in vitro* na šest staničnih linija humanih karcinoma: HCT116, SWT620, H460, MCF7, PC3, HeLa te HEK293.
- Imidazolinilski derivati **17-19** pokazali su izuzetno snažno antiproliferativno djelovanje u niskim inhibitornim koncentracijama $IG_{50} < 10 \mu\text{M}$.
- HeLa stanična linija karcinoma posebno je osjetljiva prema svim priređenim spojevima, pri čemu se osobito ističe spoj **12** ($R_1 = \text{CN}$) s aktivnošću u submikromolarnom području ($IG_{50} = 0,7 \mu\text{M}$).
- Svim sintetiziranim spojevima ispitana je i antibakterijska aktivnost pri čemu je utvrđeno da većina testiranih spojeva nije pokazala antibakterijsku aktivnost.
- Iznimno, derivat **15** s nesupstituiranim amidinom pokazao je djelovanje prema *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (MIC = 16 μM), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (MIC = 32 μM) te *Escherichia coli* efflux del (MIC = 32 μM).
- UV/Vis, fluorimetrijskom i CD spektroskopijom provedeno je ispitivanje vezivanja spojeva **12**, **18**, **17** i **19** na *ct*-DNK.
- Na temelju dobivenih titracijskih krivulja i analize rezultata, utvrđeno je da spoj **19** ima najveći afinitet vezanja na *ct*-DNK i to preferirano u mali utor, što bi mogao biti jedan od mogućih mehanizama njegovog snažnog biološkog djelovanja.

6. ZAHVALA

Iznimno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Hranjec na pruženoj prilici za izradu ovog rada, stručnom vodstvu, strpljenju, znanjima, savjetima te uloženom vremenu tijekom pisanja i ispravljanja ovog rada.

Isto tako, iznimno hvala i mojoj asistentici Idi Boček Pavlinac, mag. app. chem. na motivaciji, organiziranosti, razumijevanju, strpljenju, korisnim savjetima, uloženom trudu u prenošenju znanja tijekom provođenja eksperimentalnog dijela, ali i pisanja i ispravljanja rada. Stvarno se vraški potrudila.

Zahvala ide i Anji, Marini, Vilmi i Mileni, kao ostalim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju na 3. katu na pristupačnosti i uvijek ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem i dr. sc. Ivani Fabijanić sa Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković na pomoći pri snimanju CD spektara.

Na kraju, najveća zahvala mojim roditeljima, sestrama, dečku i prijateljima na njihovoj bezuvjetnoj ljubavi i podršci.

7. LITERATURA

1. S. Patai, Z. Rappoport, *John Wiley & Sons Ltd.* (1991) 915.
2. J. Barker, M. Kilner, *Coordination Chemistry Reviews* **133** (1994) 219.
3. A. A. Aly, A. M. Nour El-Din, *Reviews and Accounts* **2008** (2008) 153.
4. C. Bailey, E. Baker, J. Hayler, P. Kane, *Tetrahedron Letters* **40** (1999) 4847.
5. M. E. Dalziel, J. A. Deichert, D. E. Carrera, D. Beaudry, C. Han, H. Zhang, R. Angelaud, *Organic Letters* **20** (2018) 2624.
6. Z.-Y. Gu, H. Han, Z.-Y. Li, S.-J. Ji, J.-B. Xia, *Organic Chemistry Frontiers* **8** (2021) 1544.
7. W. Guo, D. Liu, J. Liao, F. Ji, W. Wu, H. Jiang, *Organic Chemistry Frontiers* **4** (2017) 1107.
8. F. Yi, Q. Sun, J. Sun, C. Fu, W. Yi, *The Journal of Organic Chemistry* **84** (2019) 6780.
9. W. Phakhodee, S. Wangngae, N. Wiriya, M. Pattarawarapan, *Tetrahedron Letters* **57** (2016) 5351.
10. L. Yet, *Technical Report* **4** (2000) 12.
11. R. Roger, D. G. Neilson, *Chemical Reviews* **61** (1961) 179.
12. F. C. Schaefer, G. A. Peters, *The Journal of Organic Chemistry* **26** (1961) 412.
13. J. C. Grivas, A. Taurins, *Canadian Journal of Chemistry* **39** (1961) 761.
14. P. Oxley, M. W. Partridge, W. F. Short, *The Journal of the Chemical Society* **0** (1947) 1110.
15. R. S. Garigipati, *Tetrahedron Letters* **31** (1990) 1969.
16. R. A. Moss, W. Ma, D. C. Merrer, S. Xue, *Tetrahedron Letters* **36** (1995) 8761.
17. G. Rousselet, P. Capdevielle, M. Maumy, *Tetrahedron Letters* **34** (1993) 6395.
18. M. W. Partridge, A. Smith, *The Journal of the Chemical Society* **1** (1973) 453.
19. L. Weintraub, S. R. Oles, N. Kalish *The Journal of Organic Chemistry* **33** (1968) 1679.
20. R. L. Shriner, F. W. Neumann, *Chemical Reviews* (1944) 351.
21. H. K. Lee, L. N. Ten, C. Siek Pak, *Korean Chemical Society* **19** (1998) 1148.
22. Yu. M. Kargin, V. Z. Latypova, M. Yu. Kitaeva, A. A. Vafina, R. M. Zaripova, *Izvestiya Akademii Nauk SSSR* (1984) 2410.
23. L. P. Sysoeva, T. V. Troepol'skaya, B. I. Buzykin, Yu. P. Kitaev, *Zhurnal Organicheskoi Khimii* **11** (1975) 1525.
24. G. M. Abou-Elenkn. S. O. Abd Allah, N. A. Lsmail, W. M. Hosny, *The Journal of the Indian Chemical Society* **65** (1988) 253.
25. Y. Marcus, M. J. Kamlet, R. W. Taft, *The Journal of Physical Chemistry* **92** (1988) 3613.
26. R. N. Goyal, *Indian Journal of Chemistry* **26** (1987) 656.
27. G. Cauquis, H. M. Fahmy, G. Pierre, M. H. Elnagdi, *Electrochimica Acta* **24** (1979) 391.

28. H. M. Fahmy, N. F. Abdel Fattah, M. R. H. Elmoghayar, *The Journal of the Chemical Society* **2** (1988) 1.
29. W. U. Malik, R. N. Goyal, M. Rajeshwari, *The Journal of Electroanalytical Chemistry* **221** (1987) 155.
30. A. A. Rostami, G. Dryhurst, *The Journal of Electroanalytical Chemistry* **223** (1987) 143.
31. D. Krznarić, P. Valenta, H. W. Nurnberg, M. Branica, *The Journal of Electroanalytical Chemistry* **93** (1978) 41.
32. B. Czochralska, E. Bojarska, P. Valenta, H. W. Numberg, *Bioelectrochemistry* **14** (1985) 503.
33. A. A. Aly, S. Bräse, M. A.-M. Gomaa, *Archive for Organic Chemistry* **6** (2018) 85.
34. E. I. Klimova, V. S. Dominguez, J. S. Garcia, T. Klimova, L. V. Backinowsky, M. F. Alamo, M. M. Garcia, *Mendeleev Communications* **21** (2011) 307.
35. W. H. Graham, *The Journal of the American Chemical Society* **87** (1965) 4396.
36. A. K. Bose, I. Kugajevsky, *Tetrahedron* **23** (1967) 957.
37. K. Ito, Y. Kizuka, S. Ihara, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **43** (2006) 1217.
38. P. X. Franklin, A. D. Pillai, P. D. Rathod, S. Yerande, M. Nivsarkar, H. Padh, K. K. Vasu, V. Sudarsanam, *The European Journal of Medicinal Chemistry* **43** (2008) 129.
39. K. Okuda, R. Ide, N. Uramaru, T. Hirota, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **52** (2015) 880.
40. T. Yao, *Tetrahedron Letters* **56** (2015) 4623.
41. M. Hu, J. Wu, Y. Zhang, F. Qiu, Y. Yu, *Tetrahedron Letters* **67** (2011) 2676.
42. A. Hajri, R. Abderrahim, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **186** (2011) 520.
43. T. Ishikawa, *John Wiley & Sons Ltd* (2009) 336.
44. S. Nakamura, H. Umezawa, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **14** (1966) 981.
45. D. Schipper, *The Journal of Antibiotics* **36** (1983) 1076.
46. M. Kaneda, *The Journal of Antibiotics* **55** (2002) 924.
47. H. Nakamura, G. Koyama, Y. Iitaka, *Journal of the American Chemical Society* **96** (1974) 4327.
48. M. Ohno, N. Yagisawa, S. Shibahara, *Journal of the American Chemical Society* **96** (1974) 4326.
49. A. Bartsch, M. Bross, P. Spiteller, *Angewandte Chemie – International Edition* **44** (2005) 2597.

50. T. Aoyama, F. Kojima, C. Imada, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **8** (1995) 223.
51. C. Imada, *Antonie van Leeuwenhoek* **87** (2005) 59.
52. R. L. Peck, H. M. Shafer, F. J. Wolf, H. M. Peck, *US Patent* **2** 804 463.
53. E. Furusawa, W. Cutting, P. Buckley, S. Furusawa, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **116** (1964) 938.
54. B. G. Green, R. Chabin, S. K. Grant, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **225** (1996) 621.
55. R. E. Mitchell, K. L. Teh, *Organic and Biomolecular Chemistry* **3** (2005) 3540.
56. J. S. Carle, C. Christophersen, *Journal of the American Chemical Society* **101** (1979) 4012.
57. J. S. Carle, C. Christophersen, *The Journal of Organic Chemistry* **46** (1981) 3440.
58. L. Peters, G. M. Konig, A. D. Wright, *Applied and Environmental Microbiology* **69** (2003) 3469.
59. S. M. Verbitski, C. L. Mayne, R. A. Davis, *The Journal of Organic Chemistry* **67** (2002) 7124.
60. R. P. Irwin, *Nova Science Publishers* (2007) 309.
61. C. Len, S. Bruniaux, F. Delbecq, V. S. Parmar, *Catalysts* **7** (2017) 146.
62. J. M. Macharia, C. Joshi, J. A. Izzo, V. Wambua, S. Kim, J. S. Hirschi, M. J. Vetticatt, *ACS Catalysis* **12** (2022) 2959.
63. I. Maluenda, O. Navarro, *Molecules* **20** (2015) 7528.
64. R. Jana, T. P. Pathak, M. S. Sigman, *Chemical Reviews* **111** (2011) 1417.
65. N. Miyaura, A. Suzuki, *Chemical Reviews* **95** (1995) 2457.
66. S. Kotha, K. Lahiri, D. Kashinath, *Tetrahedron* **58** (2002) 9633.
67. S. Saito, M. Sakai, N. Miyaura, *Tetrahedron Letters* **37** (1996) 2993.
68. S. Saito, S. Oh-tani, N. Miyaura, *The Journal of Organic Chemistry* **62** (1997) 8024.
69. A. F. Indolese, *Tetrahedron Letters* **38** (1997) 3513.
70. J. Sołoducho, K. Olech, A. Świst, D. Zajac, J. Cabaj, *Advances in Chemical Engineering and Science* **3** (2013) 19.
71. R. P. Kale, M. U. Shaikh, G. R. Jadhav, C. H. Gill, *Tetrahedron Letters* **50** (2009) 1780.
72. R. B. Silverman, M. W. Holladay, *Elsevier Academic Press* (2014) 536.
73. C. Temple, *Journal of Medicinal Chemistry* **33** (1990) 656.
74. M. Mader, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18** (2008) 179.

75. L. Bukowski, R. Kaliszan, *Archiv der Pharmazie-Chemistry in Life Sciences* **9** (1991) 537.
76. D. M. Feng, J. M. Wai, S. D. Kuduk, C. Ng, K. L. Murphy, R. W. Ransom, D. Reiss, R. S. L. Chang, C. M. Harrell, T. MacNeil, C. Tang, T. Prueksaritanont, R. M. Freidinger, D. J. Pettibone, M. Bock, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15** (2005) 2385.
77. R. M. Weier, I. K. Khanna, M. A. Stealey, J. Julien, *US Patent* **5** 262 426.
78. S. S. Kulkarni, A. H. Newman, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17** (2007) 2987.
79. A. Cappelli, G. Pericot Mohr, G. Giuliani, S. Galeazzi, M. Anzini, L. Mennuni, F. Ferrari, F. Makovec, E. M. Kleinrath, T. Langer, M. Valoti, G. Giorgi, S. Vomero, *Journal of Medicinal Chemistry* **49** (2006) 6451.
80. M. Hranjec, B. Lučić, I. Ratkaj, S. Kraljević Pavelić, I. Piantanida, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *European Journal of Medicinal Chemistry* **46** (2011) 2748.
81. Y. Chai, A. Paul, M. Rettig, W. D. Wilson, D. W. Boykin, *The Journal of Organic Chemistry* **79** (2014) 852.
82. M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *The Journal of Molecular Biology* **183** (1985) 553.
83. J. W. Lown, K. Krowicki, U. G. Bhat, A. Skorobogaty, B. Ward, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry* **25** (1986) 7408.
84. F. Giordani, M. Munde, W. D. Wilson, M. A. Ismail, A. Kumar, D. W. Boykin, M. P. Barrett, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58** (2014) 1793.
85. W. D. Wilson, B. Nguyen, F. A. Tanious, A. Mathis, J. E. Hall, C. E. Stephens, D. W. Boykin, *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* **5** (2005) 389.
86. M. Munde, S. Wang, A. Kumar, C. E. Stephens, A. A. Farahat, D. W. Boykin, W. D. Wilson, G. M. K. Poon, *Nucleic Acids Research* **42** (2014) 1379.
87. J. E. Darnell, *Nature Reviews Cancer* **2** (2002) 740.
88. A. N. Koehler, *Current Opinion in Chemical Biology* **14** (2010) 331.
89. I. Antony-Debré, A. Paul, J. Leite, K. Mitchell, H. M. Kim, L. A. Carvajal, T. I. Todorova, K. Huang, A. Kumar, A. A. Farahat, B. Bartholdy, S.-R. Narayanagari, J. Chen, A. Ambesi-Impiombato, A. A. Ferrando, I. Mantzaris, E. Gavathiotis, A. Verma, B. Will, D. W. Boykin, W. D. Wilson, G. M. K. Poon, U. Steidl, *The Journal of Clinical Investigation* **127** (2017) 4297.
90. S. Bourichi, H. Misbahi, Y. K. Rodi, F. O. Chahdi, E. M. Essassi, S. Szabó, B. Szalontai, M. Gajdács, J. Molnár, G. Spengler, *Anticancer research*, **38** (2018) 3999.

91. R. P. Kale, M. U. Shaikh, G. R. Jadhav, C. H. Gill, *Tetrahedron Letters* **50** (2009) 1780.
92. S. Bourichi, Y. K. Rodi, K. Misbahi, F. O. Chahdi, M. Akhazzane, E. M. Essassi, *Moroccan Journal of Heterocyclic Chemistry* **14** (2016) 69.
93. I. Boček Pavlinac, K. Zlatić, L. Persoons, D. Daelemans, M. Banjanac, V. Radovanović, K. Butković, M. Kralj, M. Hranjec, *Molecules* **28** (2023) 34.
94. C. C. Chrovian, A. Soyode-Johnson, B. Stenne, D. J. Pippel, J. Schoellerman, B. Lord, A. S. Needham, C. Xia, K. J. Coe, K. Sepassi, F. Schoetens, B. Scott, L. Nguyen, X. Jiang, T. Koudriakova, B. Balana, M. A. Letavic, *Journal of Medicinal Chemistry* **63** (2020) 9181.
95. J. A. Pollock, S. H. Kim, J. A. Katzenellenbogen, *Tetrahedron Letters* **56** (2015) 6097.
96. R. A. I. Abou-Elkhair, A. E. A. Hassan, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Organic Letters* **18** (2016) 4714.
97. A. A. Weekes, M. C. Dix, M. C. Bagley, A. D. Westwell, *An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry* **40** (2010) 3027.
98. K. Smerkova, T. Vaculovic, M. Vaculovicova, J. Kynicky, M. Brtnicky, T. Eckschlager, M. Stiborova, J. Hubalek, V. Adam, *Analytical Biochemistry* **539** (2017) 22.
99. K. Gurova, *Future Oncology* **5** (2009) 1685.
100. A. Bolhuis, J. R. Aldrich-Wright, *Bioorganic Chemistry* **55** (2014) 51.
101. J. C. Menéndez, C. Avendaño, *Elsevier Science* (2015) 768.
102. X. Cai, P. J. Gray Jr., D. D. Von Hoff, *Cancer Treatment Reviews* **35** (2009) 437.
103. L. R. Ferguson, W. A. Denny, *Mutation Research* **623** (2007) 14.
104. N. J. Wheate, C. R. Brodie, J. Grant Collins, S. Kemp, J. R. Aldrich-Wright, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **7** (2007) 627.
105. Y.-M. Chang, C.K.-M. Chen, M.-H. Hou, *The International Journal of Molecular Sciences* (2012) **13** 3394.
106. N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, *John Wiley and Sons* (2000) 912.
107. A Presta, M Stillman, *John Wiley and Sons* (2007) 594.
108. C. R. Cantor, P. R Schimmel, *W.H. Freeman & Company* (1980) 365.
109. J. Kypr, I. Kejnovska, D. Renciuik, M. Vorlickova, *Nucleic Acids Research* **37** (2009) 1713.
110. A. A. Aly, A. M. Nour El-Din, *Reviews and Accounts* **2008** (2008) 153.
111. J. Kypr, M. Vorlickova, *General Physiology and Biophysics* **5** (1986) 415.
112. I. Boček, *Rad za Rektorovu nagradu* (2017) str 89.
113. H. Ihmels, K. Faulhaber, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, G. Viola, *Photochemistry and Photobiology*, **81** (2005) 1107.

114. N. Perin, R.Nhili, M. Cindrić, B.Bertoša, D. Vušak, I. Martin-Kleiner, W. Laine, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. D. Cordonnier, M. Hranjec, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **122** (2016) 530.

8. SAŽETAK

Sinteza, biološka aktivnost i interakcija s *ct*-DNK novih amidino-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

U okviru ovog rada opisana je sinteza, spektroskopska karakterizacija, biološka aktivnost te interakcija s *ct*-DNK novih amidino-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **14-22**. Ciljani spojevi priređeni su klasičnim reakcijama organske sinteze. Aminacijom 5-brom-2-klor-3-nitropiridina **1** pripremljen je 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amin **2** koji potom s odgovarajućim fenilbornim kiselinama **3-4** i paladijevim katalizatorom u Suzukijevoj reakciji daje nitro-supstituirane derivate **5-6** s uvedenim aromatskim prstenom u položaj 5 piridinske jezgre. Redukcijom spojeva **5-6** sa SnCl₂·2H₂O priređeni su amino supstituirani derivati **7-8** koji u reakciji ciklokonenzacije s benzaldehidima **9-10** i natrijevim metabisulfitom u DMSO daju glavne prekursore ove reakcije **11-13**. Nukleofilnom adicijom LiHMDS na nitrilne prekursore **11-13** priređeni su ciljani spojevi **14-16** s nesupstituiranom amidino skupinom.

Klasična Pinnerova metoda korištena je za sintezu ciljanih spojeva **17-22**. Nitrili **11-13** se u bezvodnom 2-metoksietanolu uz HCl(g), prevode u imino-estere koji u reakciji s etilendiaminom daju 2-imidazolinilne amidine **17-19**, a s 1,3-propilendiaminom 1,4,5,6-tetrahidropirimidinske amidino spojeve **20-22**. Svi amidino-supstituirani spojevi priređeni su kao hidrokloridne soli radi bolje topljivosti. Strukture novopriređenih produkata potvrđene su ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom, a tijekom Pinnerove reakcije je praćen IR spektroskopijom.

Ispitana je biološka aktivnosti pripremljenih spojeva ispitivanjem antiproliferativne aktivnosti *in vitro* na šest staničnih linija humanih karcinoma te antibakterijskog djelovanja protiv odabranih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih sojeva bakterija. Najizraženije antiproliferativno djelovanje u submikromolarnom inhibitornom rasponu koncentracija uočeno je za monocijano supstituirani derivat **12** i to prema staničnim linijama MCF-7 (IG₅₀ = 0,6 μM) i HeLa (IG₅₀ = 0,7 μM), te za di-imidazolinilni spoj **19** prema MCF-7 staničnoj liniji karcinoma dojke (IG₅₀ = 0,6 μM). Svi testirani spojevi nisu pokazali antibakterijsko djelovanje, osim spoja **15**, koji je pokazao umjereno djelovanje protiv *E. coli* (MIC 32 μM).

Provedbom spektroskopskih titracija utvrđeno je da je mehanizam vezanja spoja **19**, vezanje u mali utor *ct*-DNK što može biti jedan od mehanizama djelovanja s izuzetno snažnom antiproliferativnom aktivnošću prema MCF-7 staničnoj liniji.

Ključne riječi: imidazo[4,5-*b*]piridini, amidini, ¹H, ¹³C NMR spektroskopija, biološka aktivnost, vezanje na *ct*-DNK

9. SUMMARY

Synthesis, biological activity and interaction with *ct*-DNA of novel amidino-substituted imidazo[4,5-*b*]pyridine derivatives

This work presents the synthesis, spectroscopic characterization, biological activity and interaction with *ct*-DNA of novel amidino-substituted imidazo[4,5-*b*]pyridines **14-22**. Target compounds were prepared by conventional reactions of organic synthesis. By amination of 5-bromo-2-chloro-3-nitropyridine **1**, 5-bromo-*N*-methyl-3-nitropyridin-2-amine **2** was prepared which then, with the corresponding phenylboronic acids **3-4** and a palladium catalyst, in the Suzuki reaction gives nitro derivatives **5-6** with an aromatic ring in the position 5 of the pyridine core. By reduction of the compounds **5-6** with $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, amino-substituted derivatives **7-8** were prepared, which then, in the DMSO-mediated cyclocondensation reaction with benzaldehydes **9-10** and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ form the main precursors **11-13**. Target compounds **14-16** bearing an unsubstituted amidino group were synthesized by nucleophilic addition of LiHMDS to nitrile precursors **11-13**.

Pinner reaction was used for the synthesis of target compounds **17-22**. Nitriles **11-13** are in anhydrous 2-methoxyethanol and HCl(g) converted into imino-ester intermediates which then react with ethylenediamine to give 2-imidazolyl amidines **17-19**, and with 1,3-propylenediamine, 1,4,5,6-tetrahydropyrimidine amidines **20-22**. All amidino-substituted compounds were prepared as hydrochloride salts in order to achieve better solubility. The structures of the newly prepared compounds were confirmed by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, whereas the Pinner reaction was monitored by IR spectroscopy.

Biological evaluation included *in vitro* assessment of antiproliferative activity on six human cancer cell lines and antibacterial activity against chosen Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. The most pronounced antiproliferative activity in submicromolar inhibitory concentration range was noted for monocyano-substituted derivative **12** against the MCF-7 ($\text{IG}_{50} = 0.6 \mu\text{M}$) and HeLa ($\text{IG}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$) cell lines and for the di-imidazolyl compound **19** against the MCF-7 breast cancer cell line ($\text{IG}_{50} = 0.6 \mu\text{M}$). All tested compounds lacked antibacterial activity, with the exception of compound **15**, which showed moderate activity against *E. coli* (MIC $32 \mu\text{M}$). According to the spectroscopic study of the interaction of derivative **19**, minor groove binding into *ct*-DNA as a dominant interaction was observed which is potentially correlated to its strong antiproliferative activity against MCF-7 cell line.

Key words: imidazo[4,5-*b*]pyridine, amidines, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, biological activity, *ct*-DNA binding

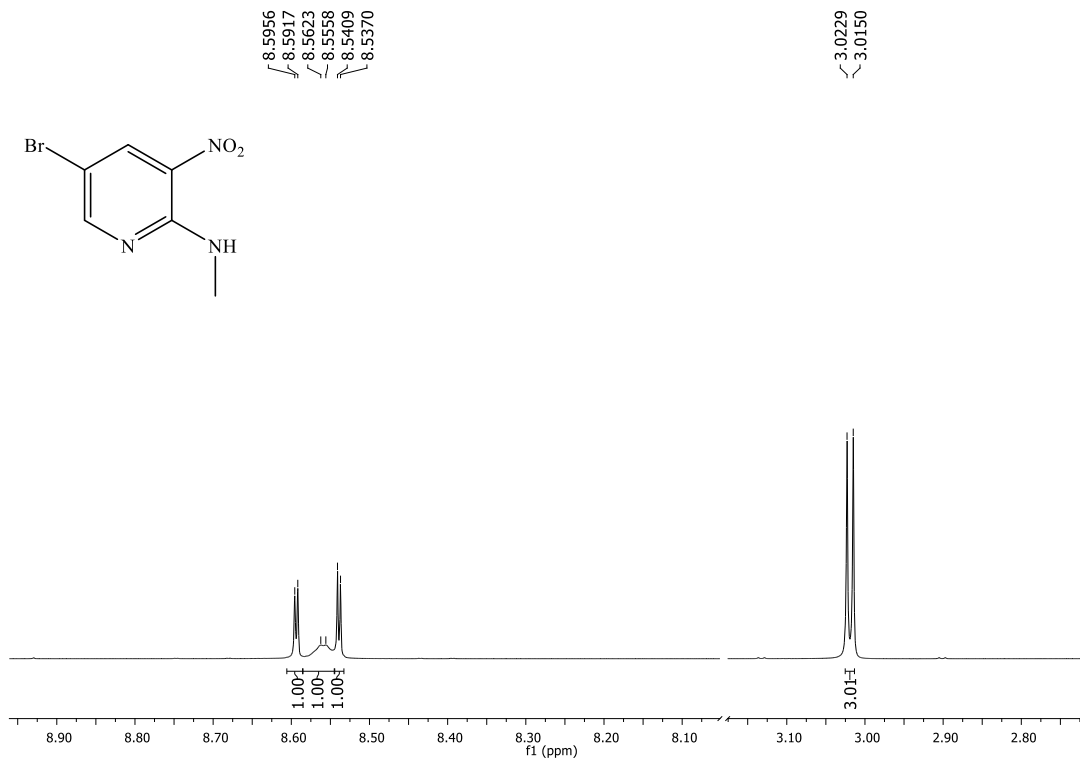
10. ŽIVOTOPIS

Corina Šljubura, rođena je 20.9.1999. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Popovača pohađa u razdoblju od 2006.-2014. godine nakon čega upisuje Srednju školu Tina Ujevića Kutina, smjer Opća gimnazija. Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Primijenjena kemija upisuje 2018. godine. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za elektronsku spinsku spektroskopiju. Završni rad iz područja organske kemije „Sinteza i strukturna karakterizacija novih *N*-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina" pod mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Hranjec obranila je 2021. godine i postala sveučilišna Prvostupnica primijenjene kemije. Iste godine upisuje diplomski studij, studij Primijenjena organska kemija. Sudjelovala je na XIV. susretu mladih kemijskih inženjera s posterskim priopćenjem pod nazivom „Sinteza i antioksidativna aktivnost derivata benzimidazola i imidazo[4,5-*b*]piridina“. Sudjelovala je na znanstveno-sportskom natjecanju „Tehnologijada“ s usmenim izlaganjem rada pod nazivom „Sinteza, strukturna karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih konjugata kumarina i imidazo[4,5-*b*]piridina“ te je osvojila 2. mjesto u kategoriji znanstvenih radova. Služi se engleskim jezikom u govoru i pismu, Microsoft office programskim paketom te poznaje osnove programa MatLab, Origin i CorelDRAW.

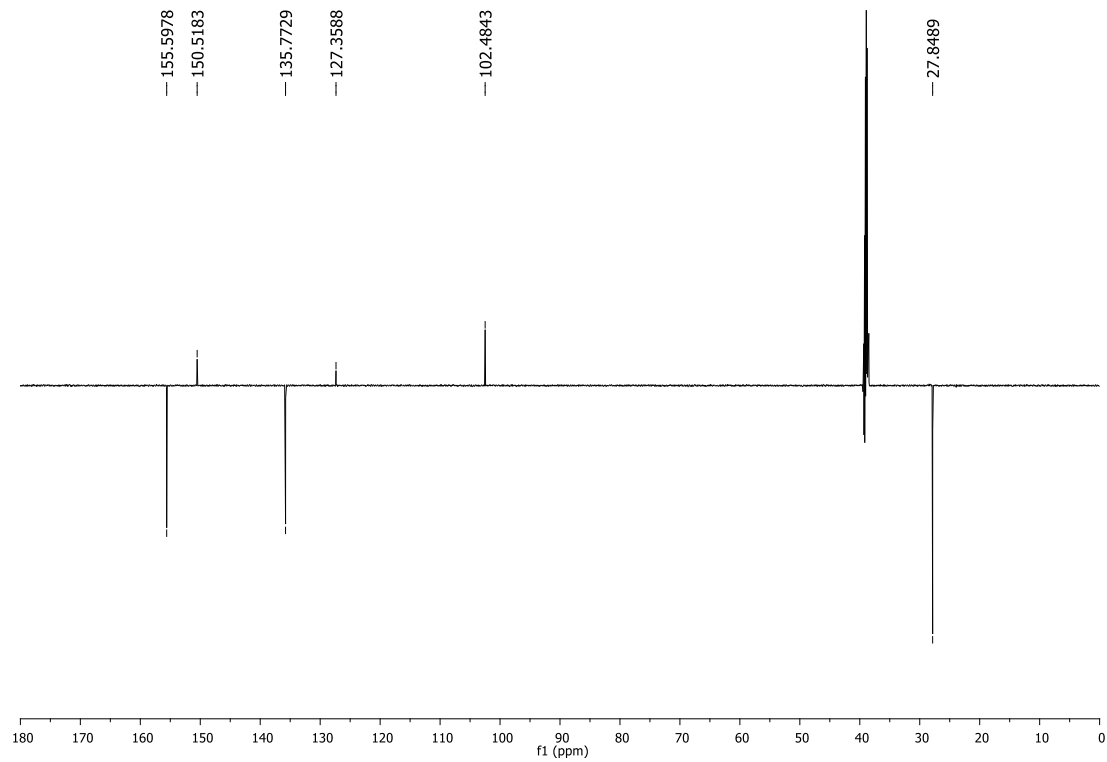
11. PRILOZI

Prilog 1.

a) ^1H NMR 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **2**

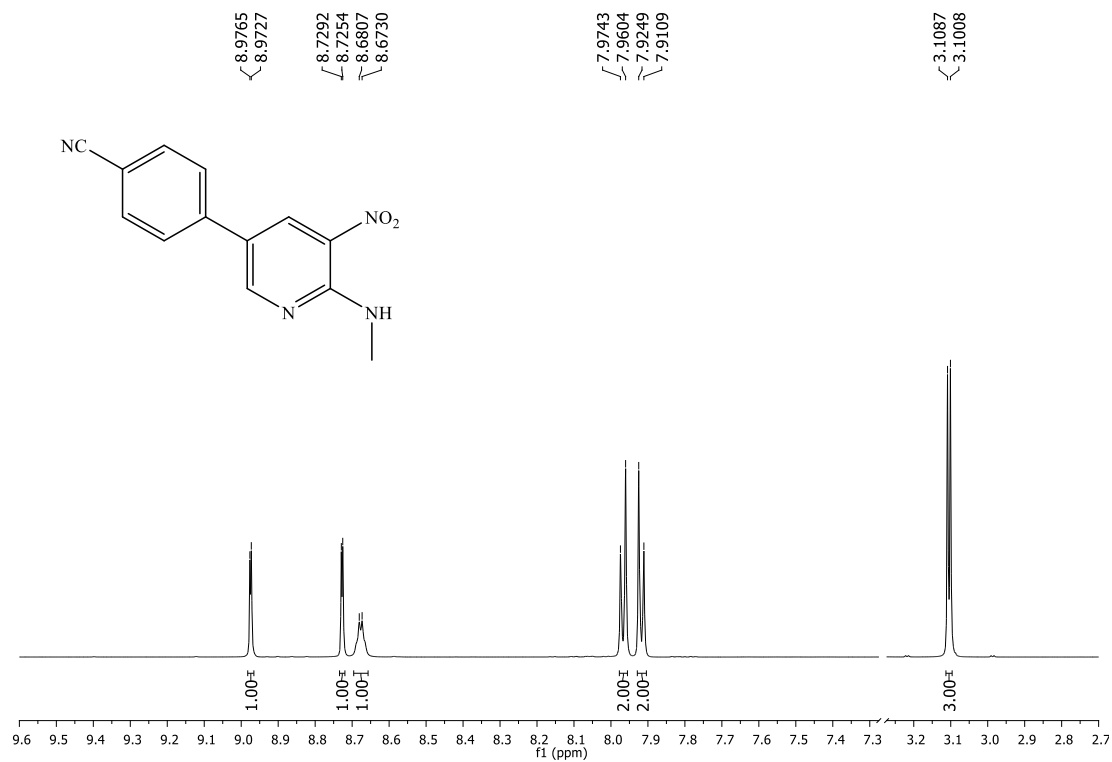


b) ^{13}C NMR spektar 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **2**

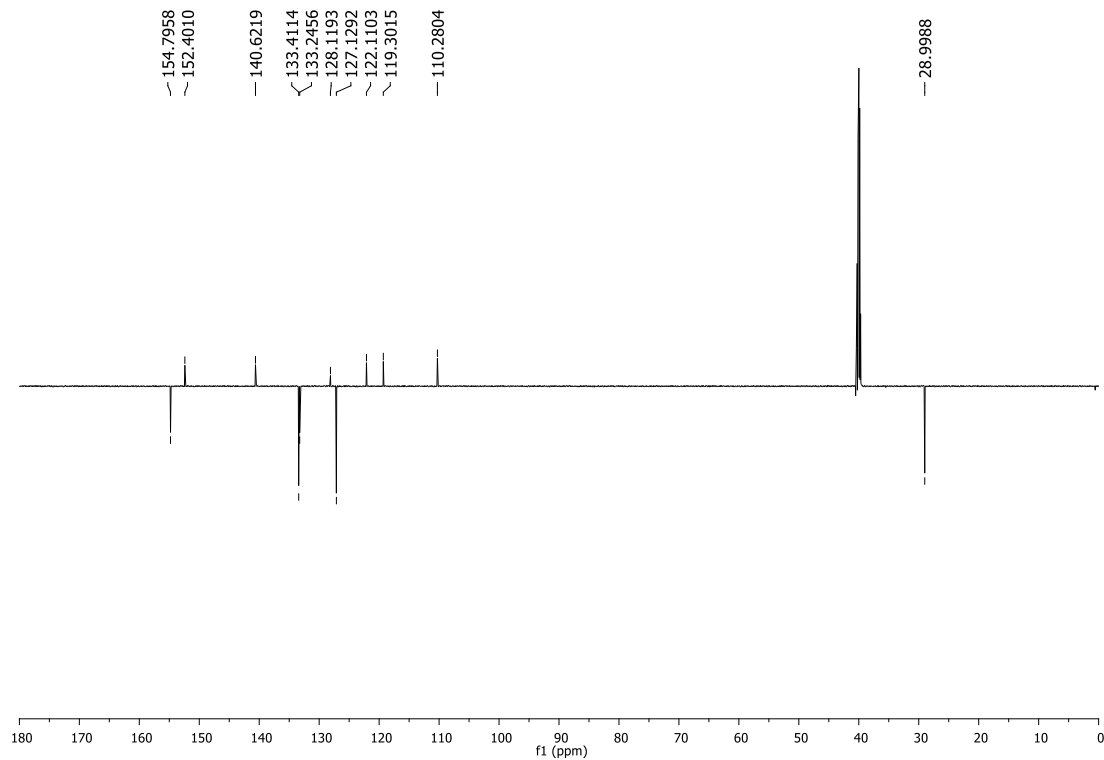


Prilog 2.

a) ^1H NMR spektar 4-(6-(metilamino)-5-nitropiridin-3-il)benzonitrila **5**

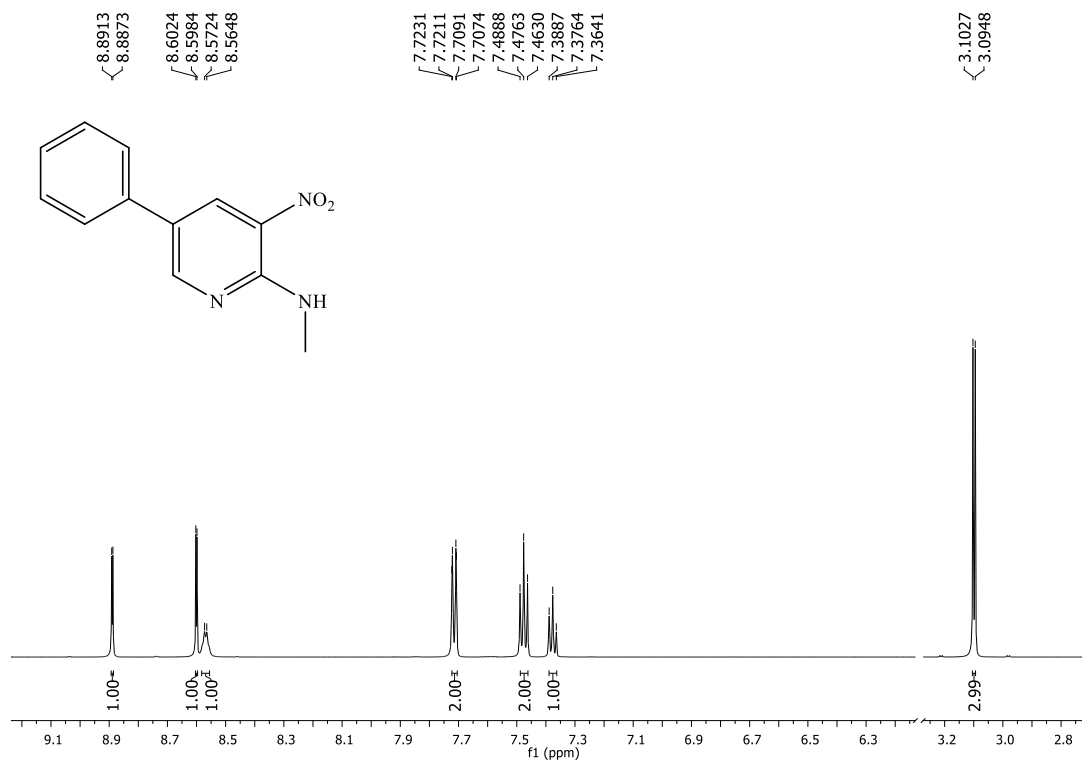


b) ^{13}C NMR spektar 4-(6-(metilamino)-5-nitropiridin-3-il)benzonitrila **5**

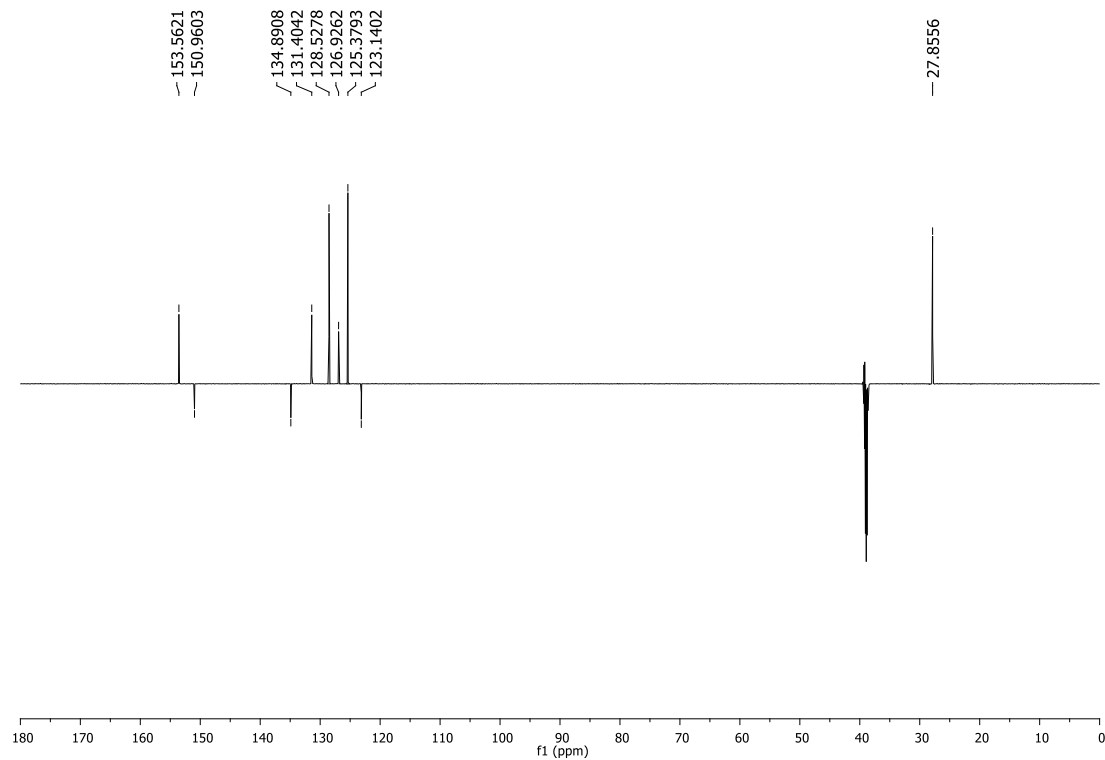


Prilog 3.

a) ^1H NMR spektar *N*-metil-3-nitro-5-fenilpiridin-2-amina **6**



b) ^{13}C NMR spektar *N*-metil-3-nitro-5-fenilpiridin-2-amina **6**

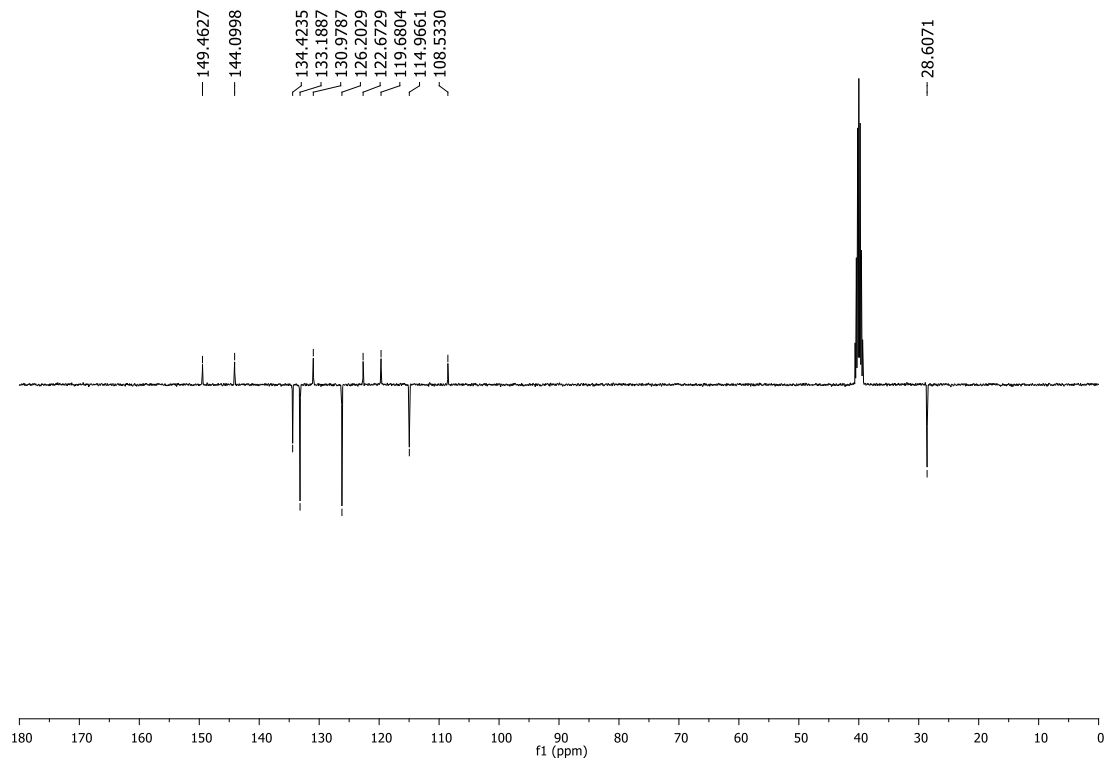


Prilog 4.

a) ^1H NMR spektar 4-(5-amino-6-(metilamino)piridin-3-il)benzonitrila **7**

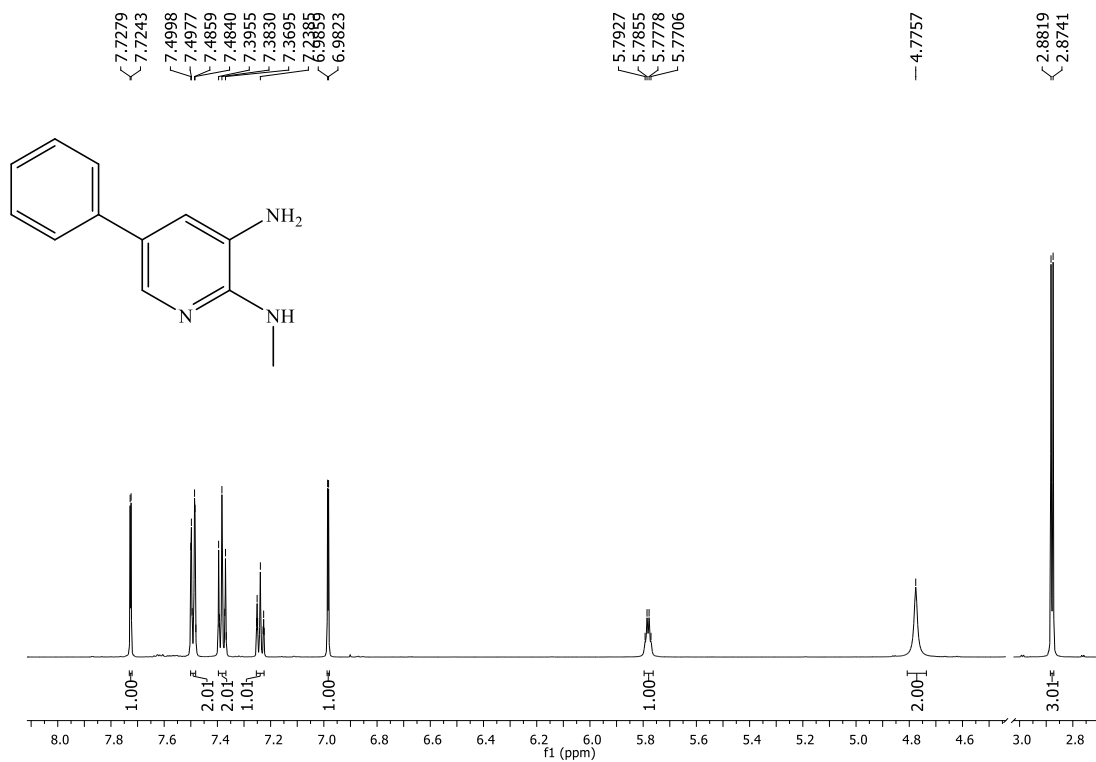


b) ^{13}C NMR spektar 4-(5-amino-6-(metilamino)piridin-3-il)benzonitrila **7**

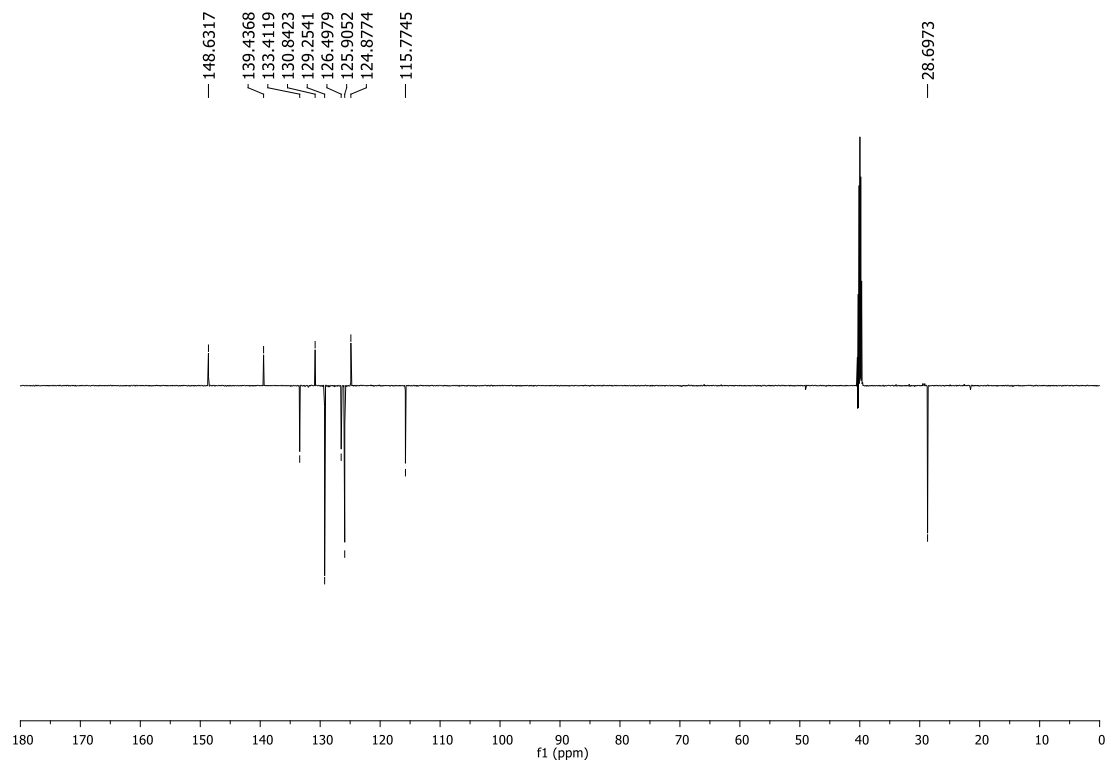


Prilog 5.

a) ^1H NMR spektar N^2 -metil-5-fenilpiridin-2,3-diamina **8**

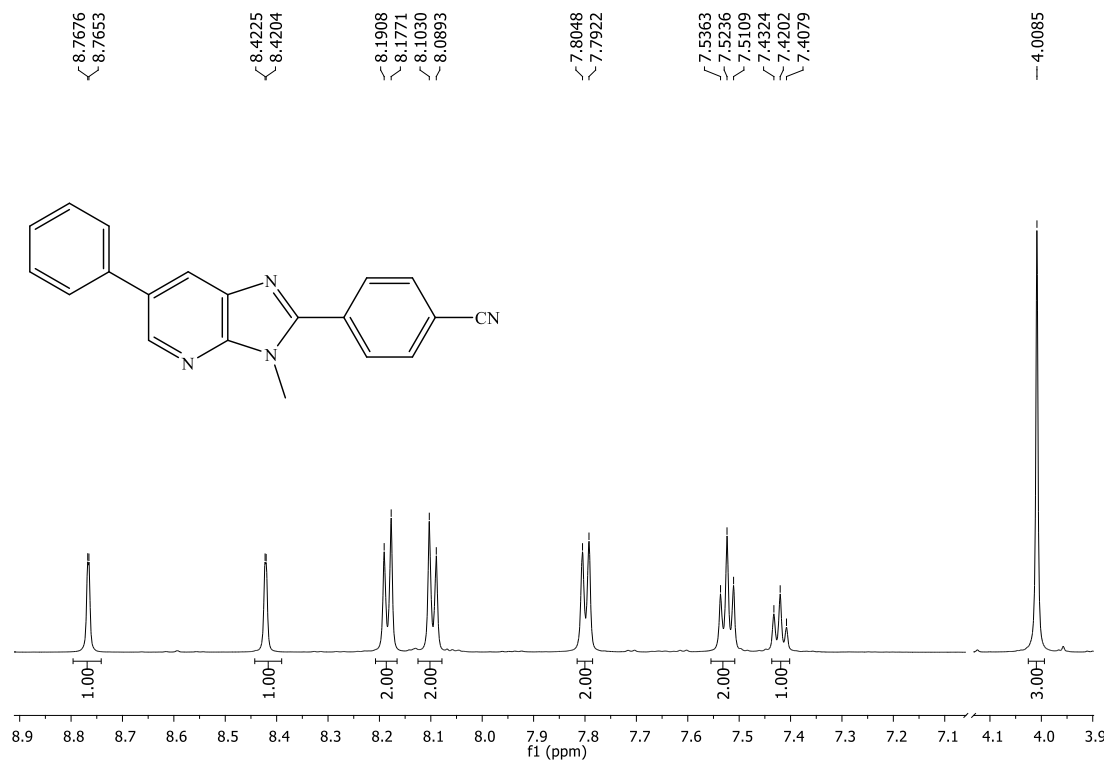


b) ^{13}C NMR spektar N^2 -metil-5-fenilpiridin-2,3-diamina **8**

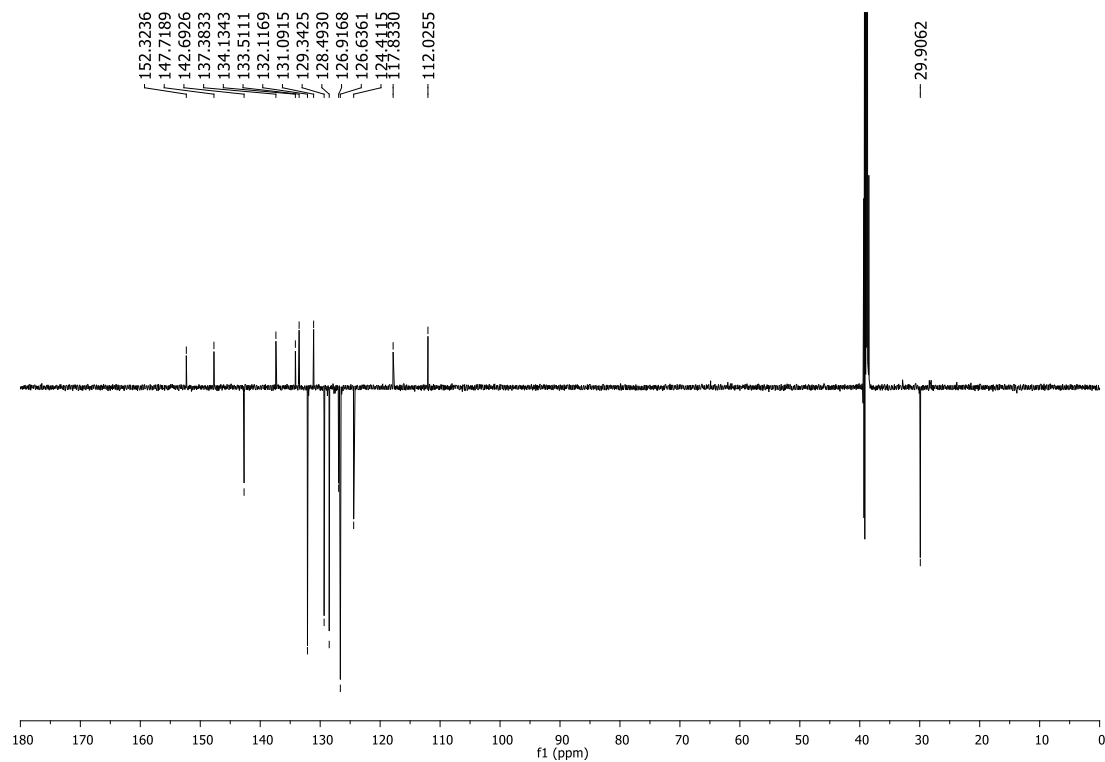


Prilog 6.

a) ^1H NMR spektar 4-(3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzonitrila **11**

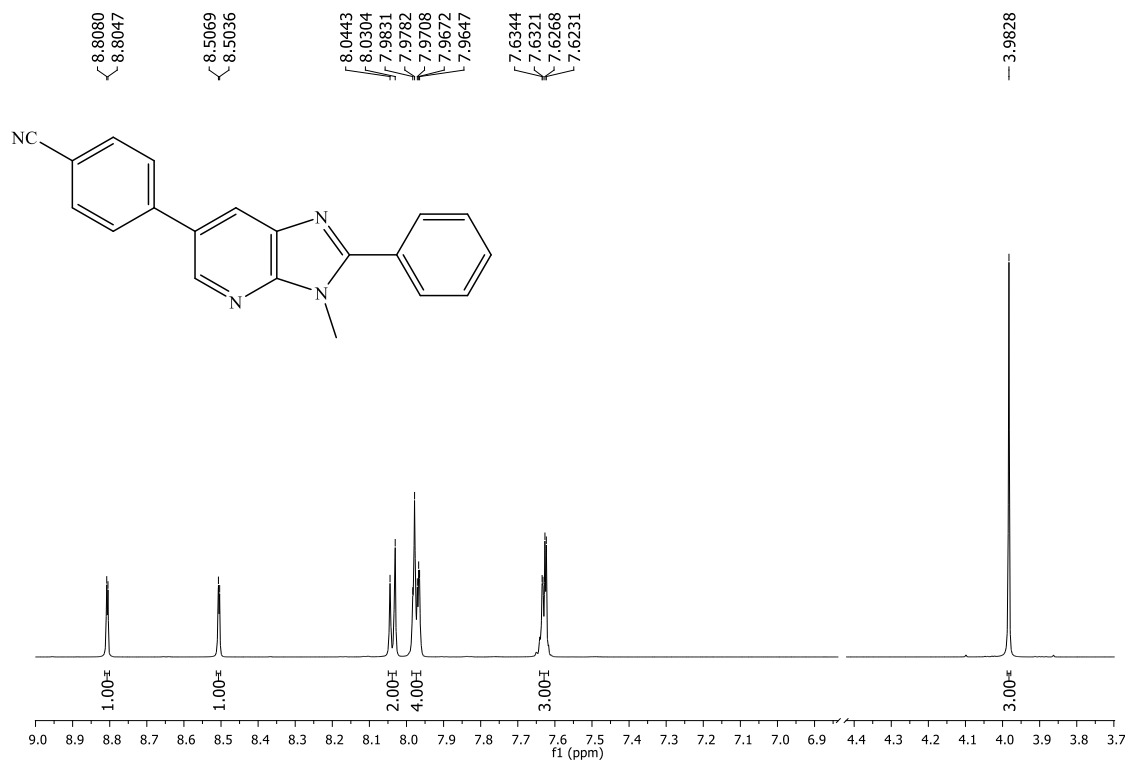


b) ^{13}C NMR spektar 4-(3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzonitrila **11**

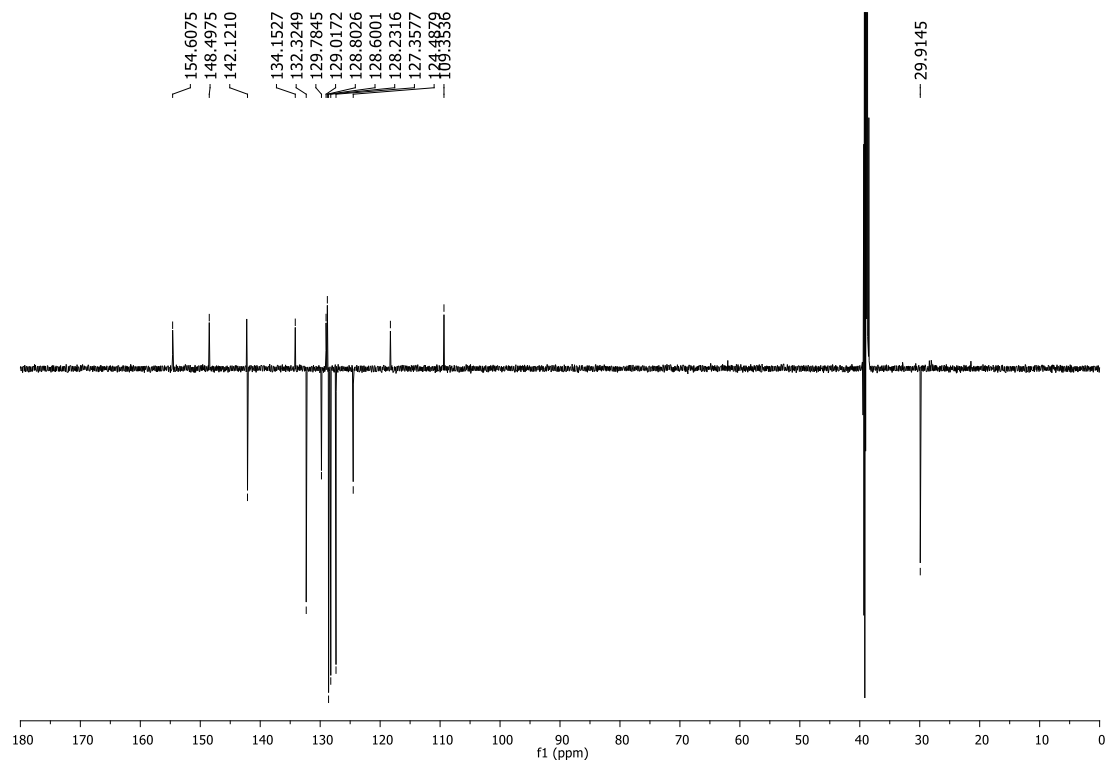


Prilog 7.

a) ^1H NMR spektar 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzonitrila **12**

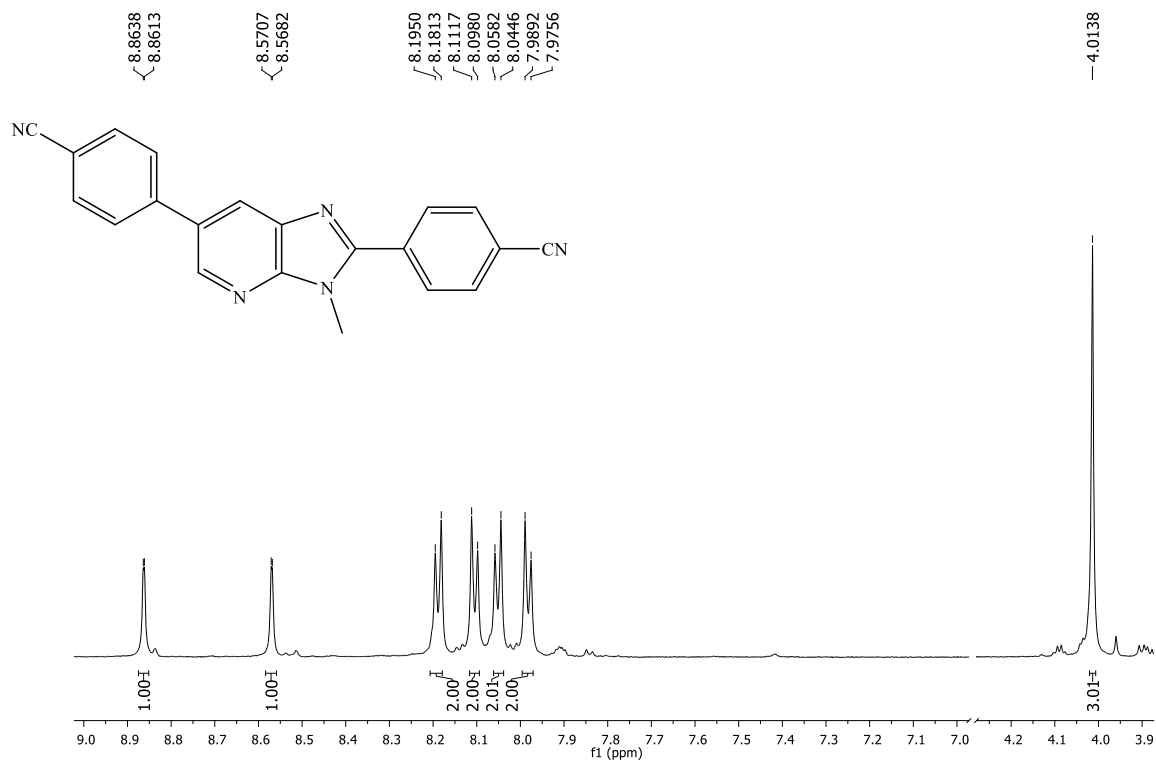


b) ^{13}C NMR spektar 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzonitrila **12**

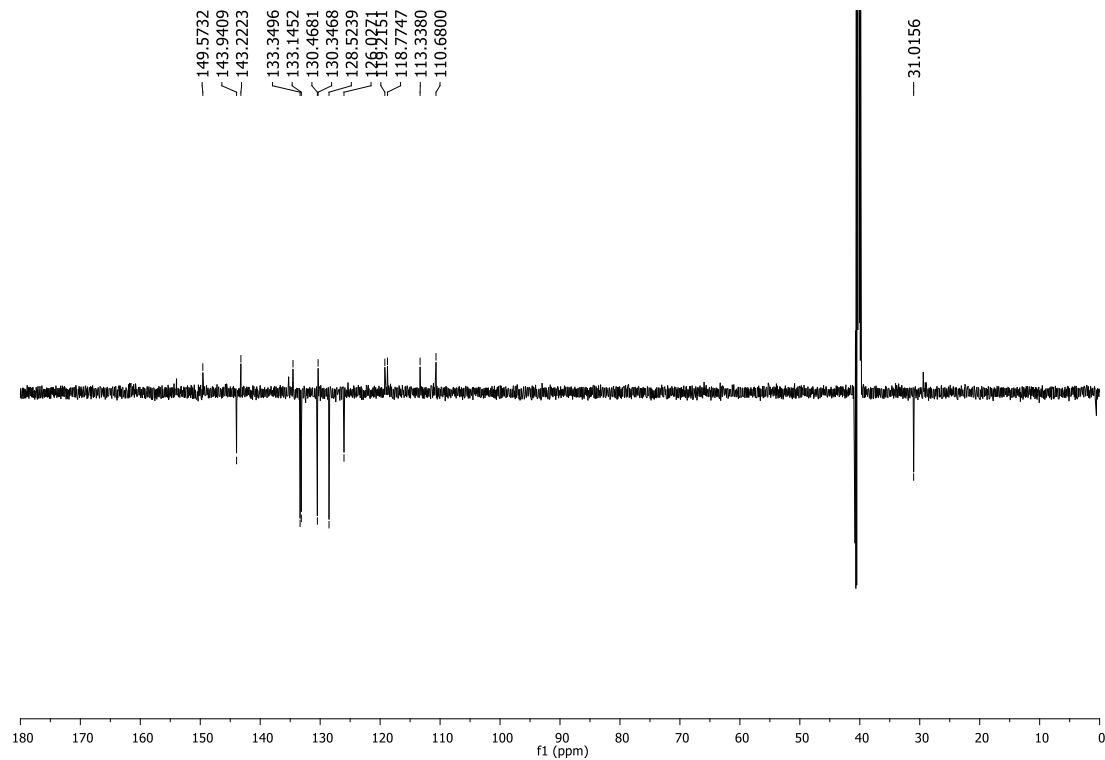


Prilog 8.

a) ^1H NMR spektar 4,4'-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzonitrila **13**

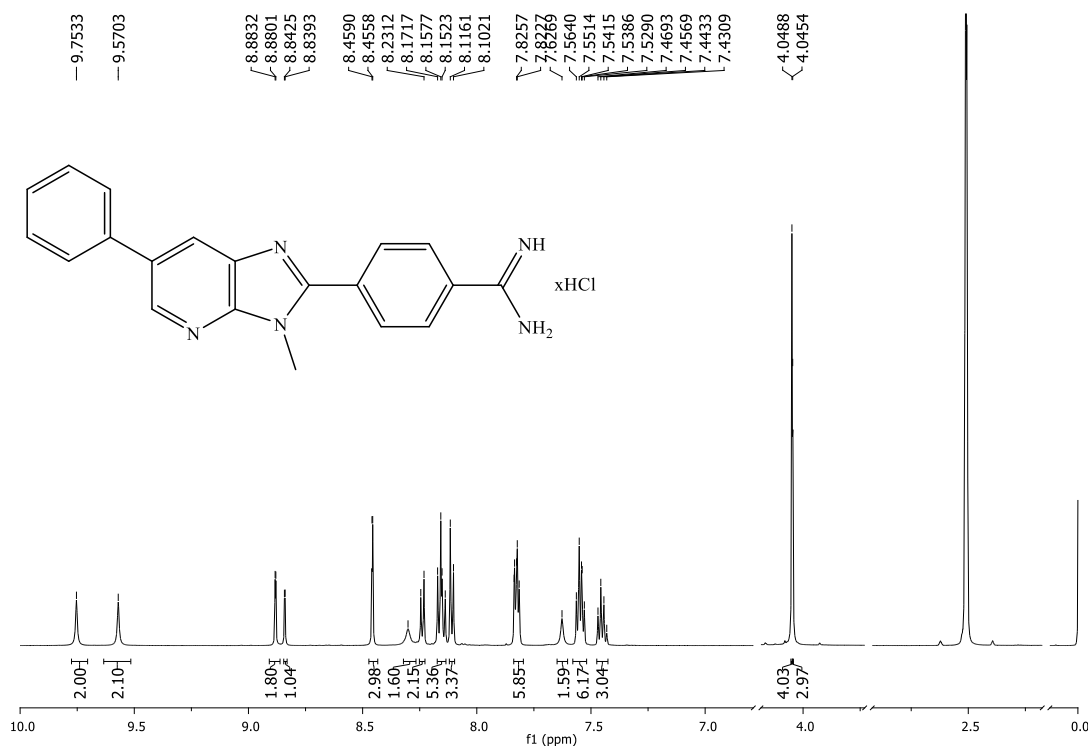


b) ^{13}C NMR spektar 4,4'-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzonitrila **13**

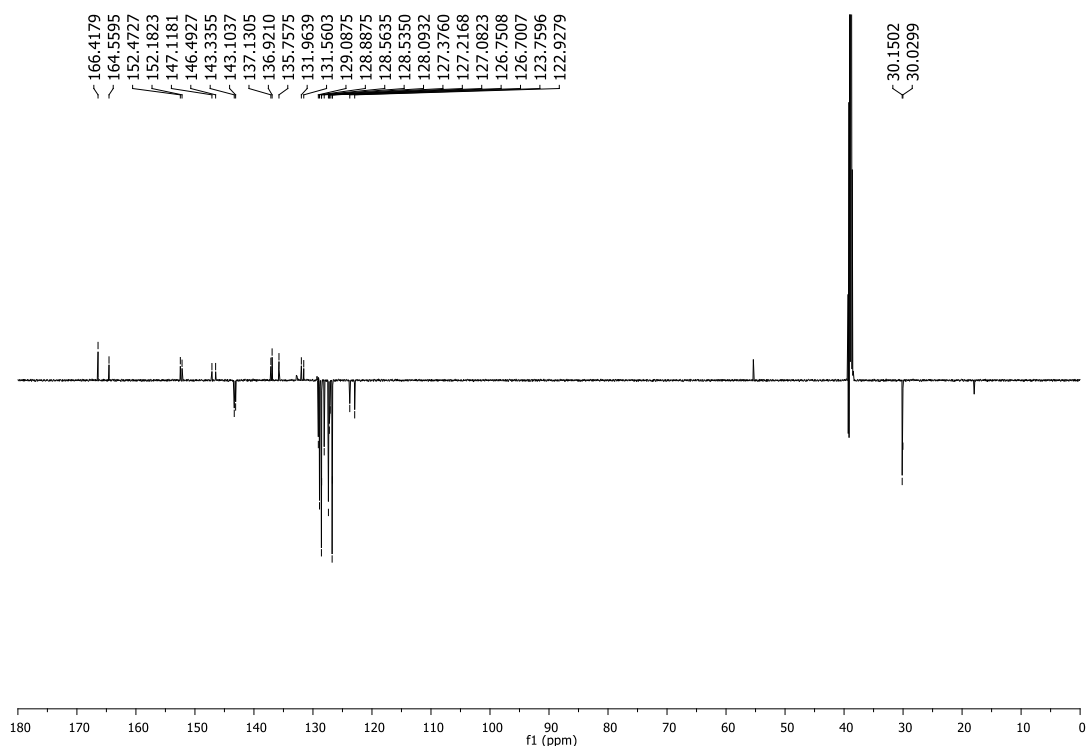


Prilog 9.

a) ^1H NMR spektar 4-(3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzimidamid hidroklorida **14**

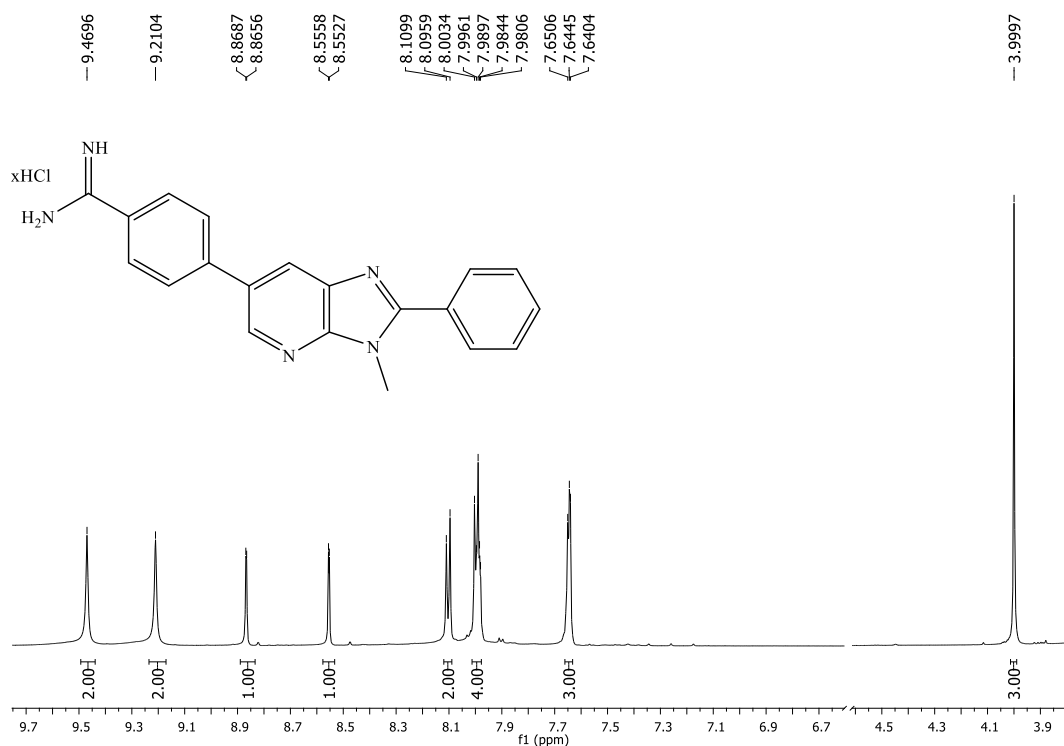


b) ^{13}C NMR spektar 4-(3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzimidamid hidroklorida **14**

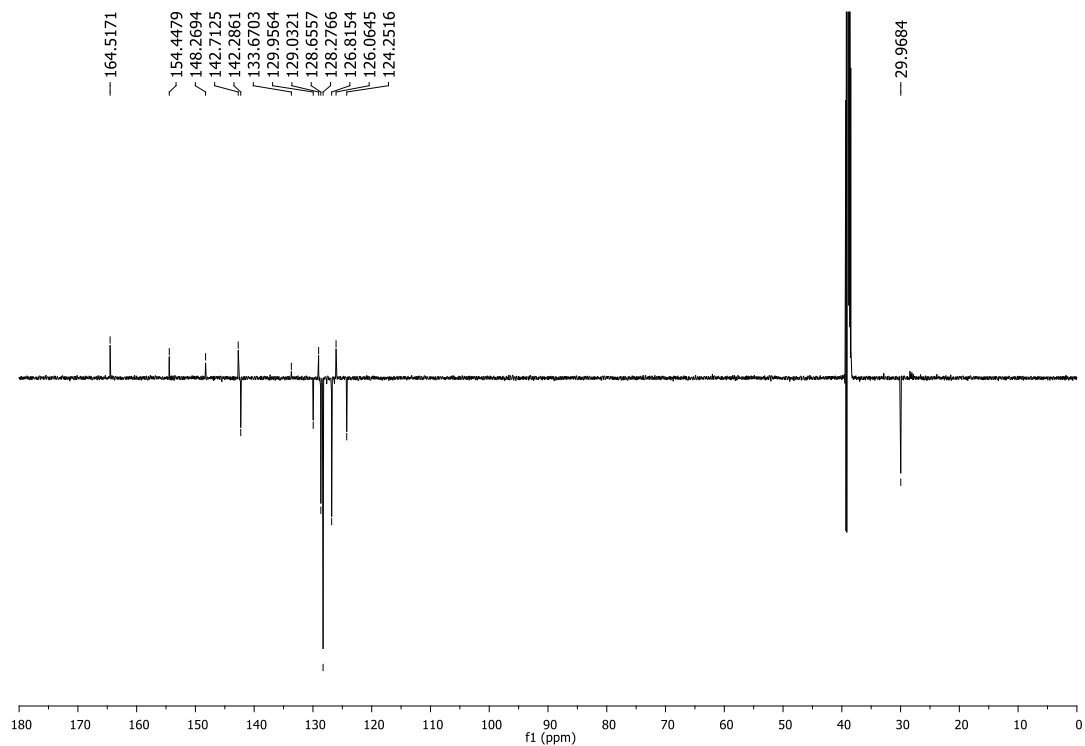


Prilog 10.

a) ^1H NMR spektar 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzimidamid hidroklorida **15**

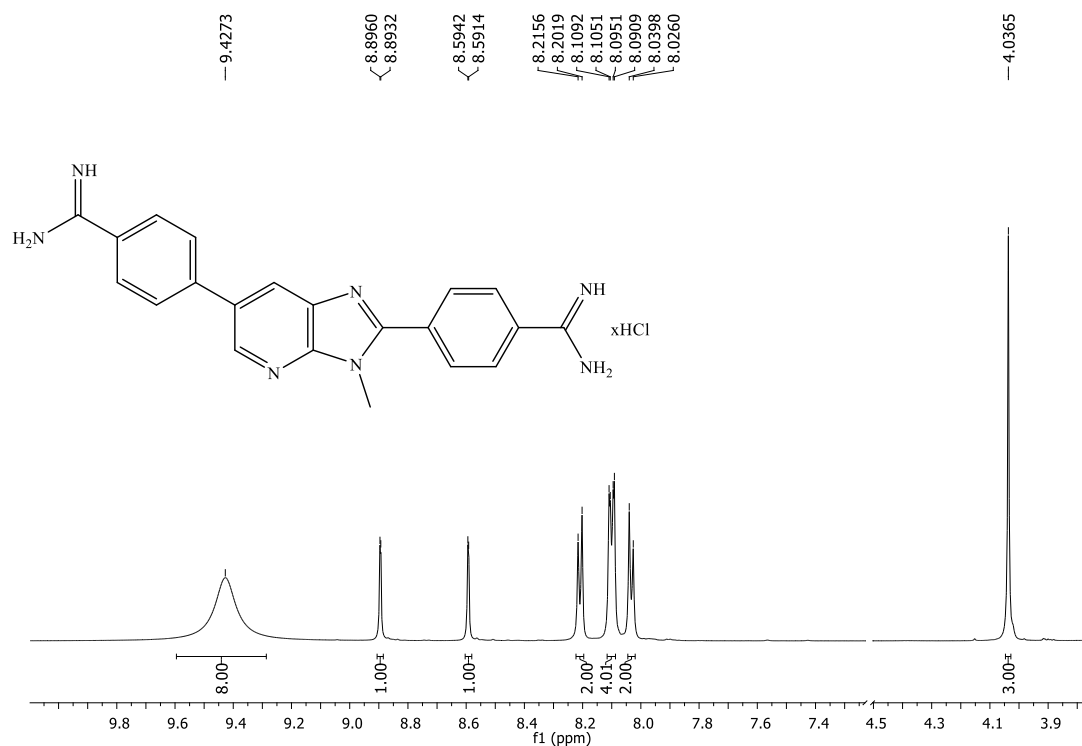


b) ^{13}C NMR spektar 4-(3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)benzimidamid hidroklorida **15**

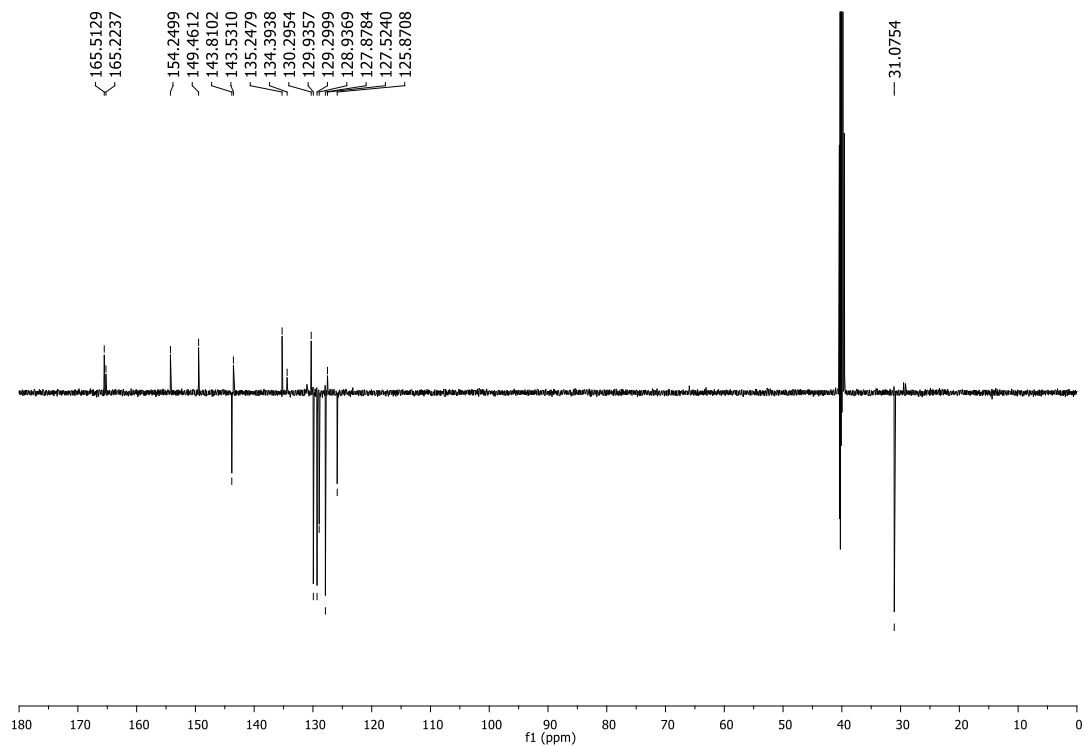


Prilog 11.

a) ^1H NMR spektar 4,4'-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzimidamid dihidroklorida **16**

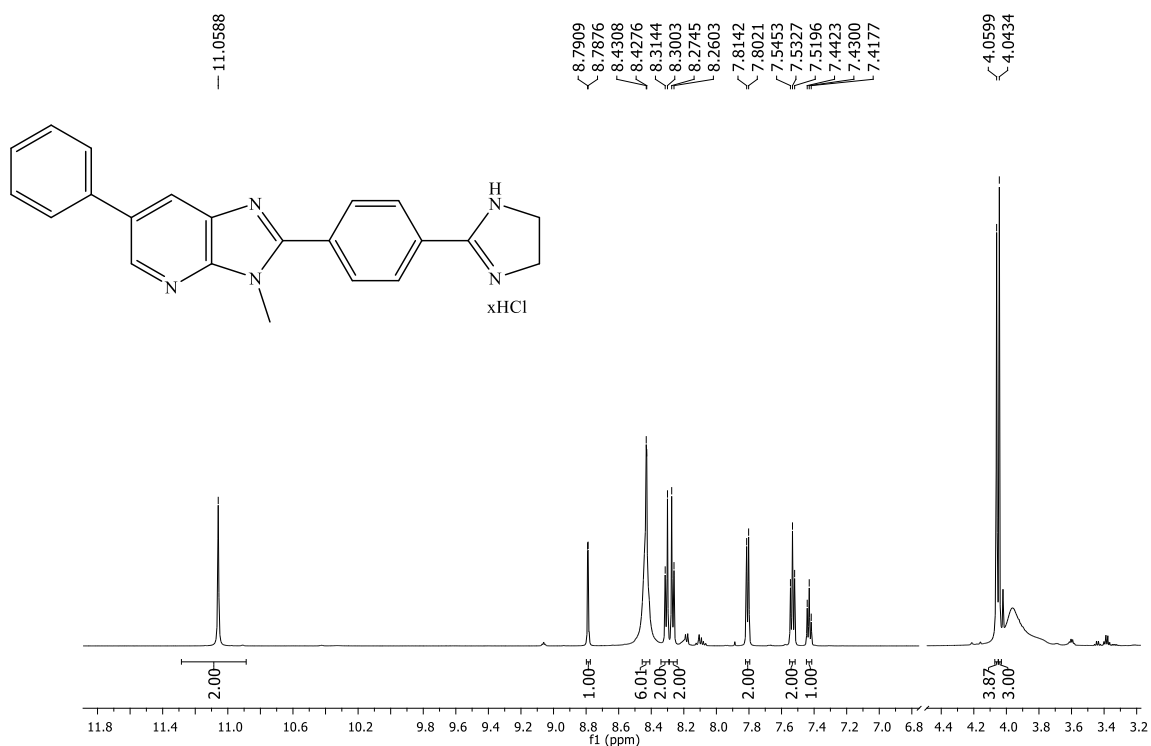


b) ^{13}C NMR spektar 4,4'-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2,6-diil)dibenzimidamid dihidroklorida **16**

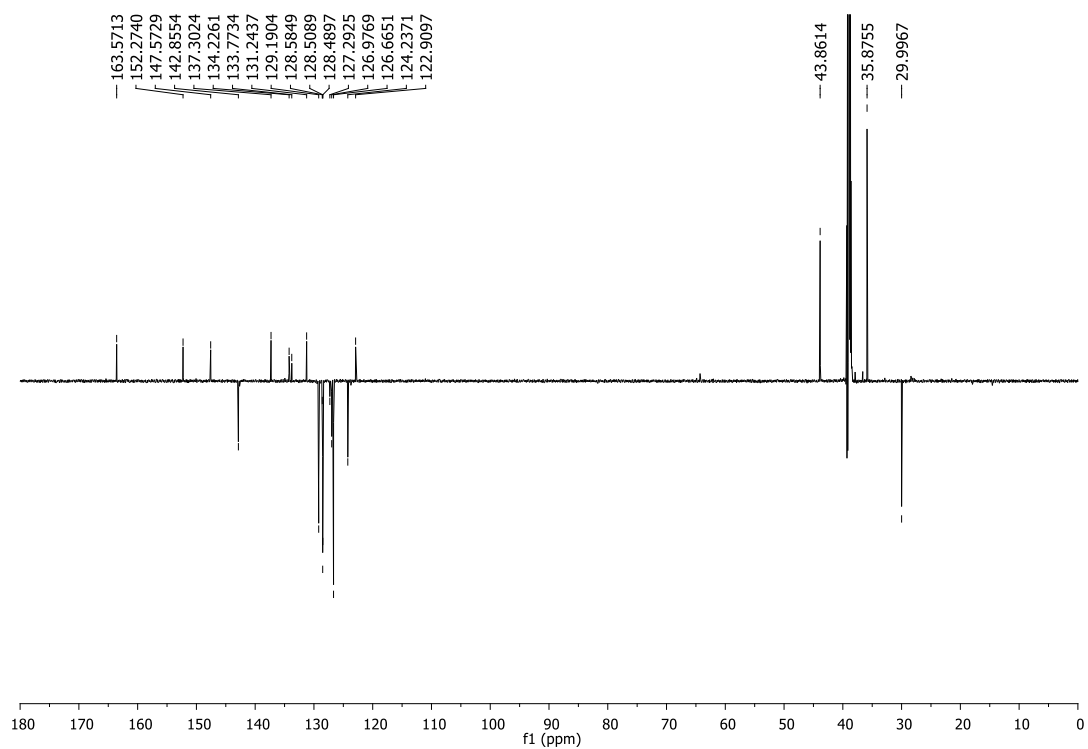


Prilog 12.

a) ^1H NMR spektar 2-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin hidroklorida **17**

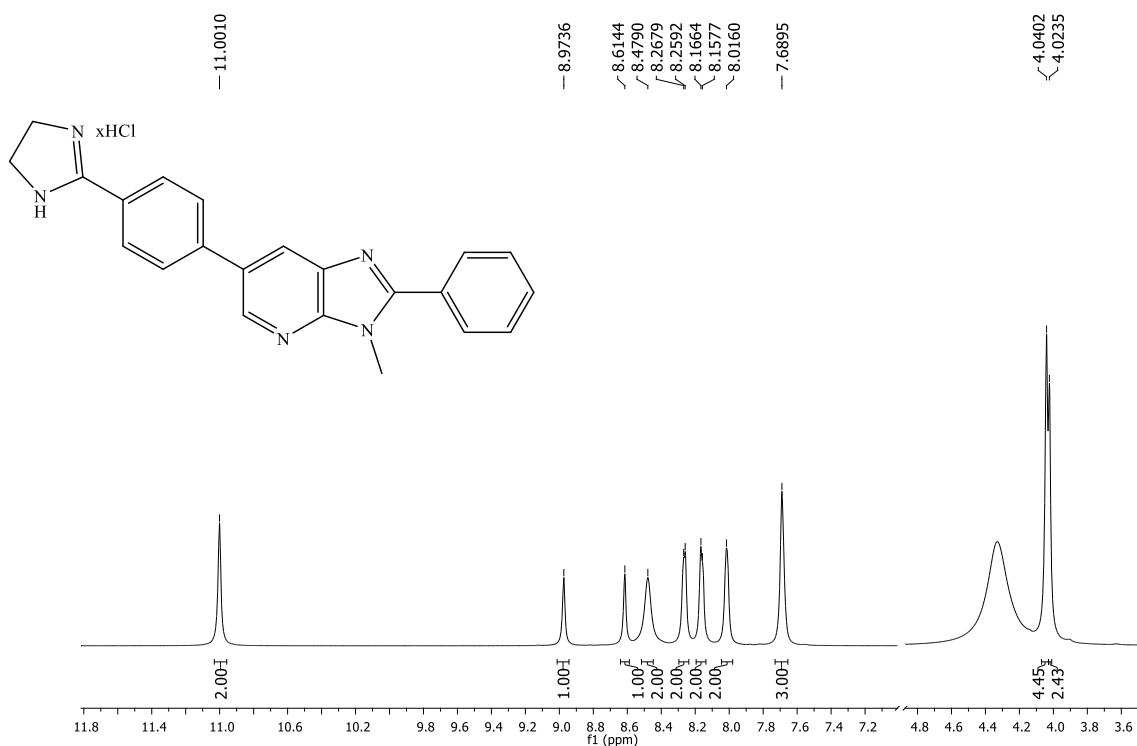


b) ^{13}C NMR spektar 2-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-6-fenil-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin hidroklorida **17**

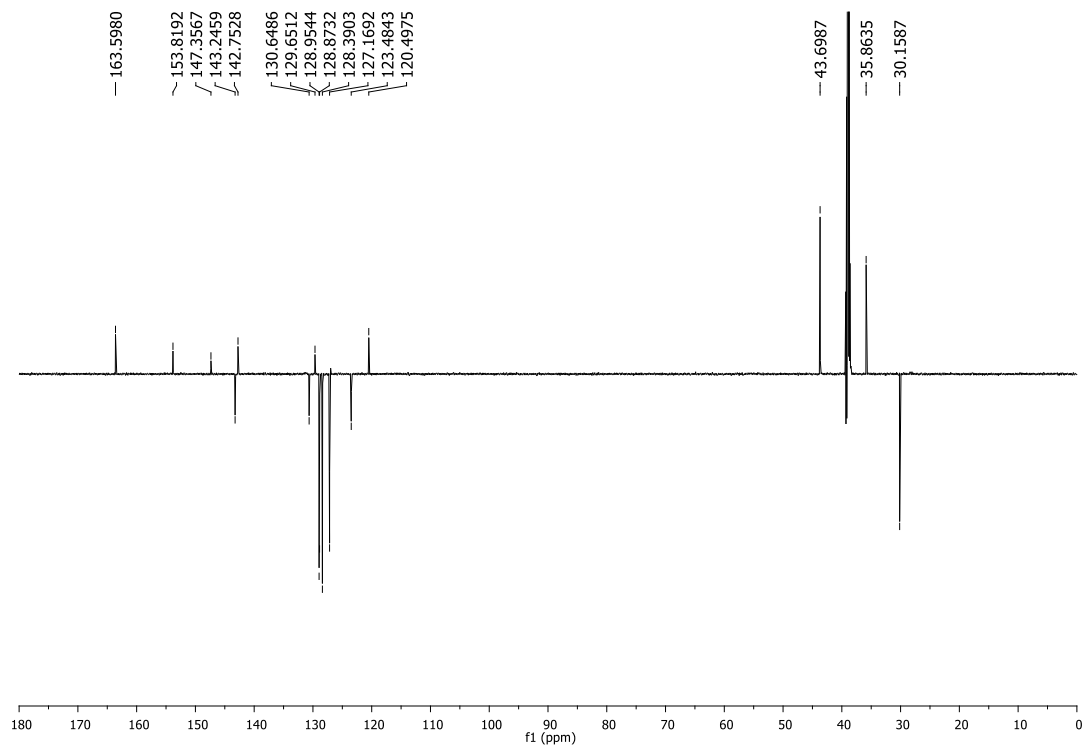


Prilog 13.

a) ^1H NMR spektar 6-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin hidroklorida **18**

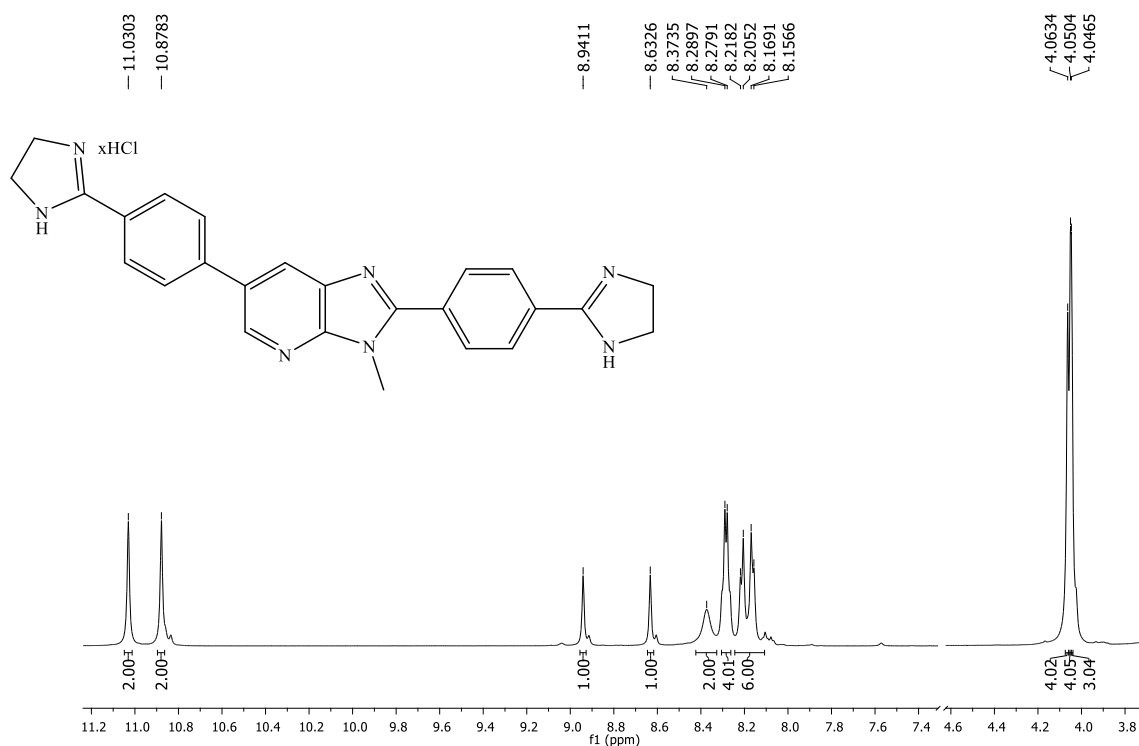


b) ^{13}C NMR spektar 6-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-2-fenil-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin hidroklorida **18**

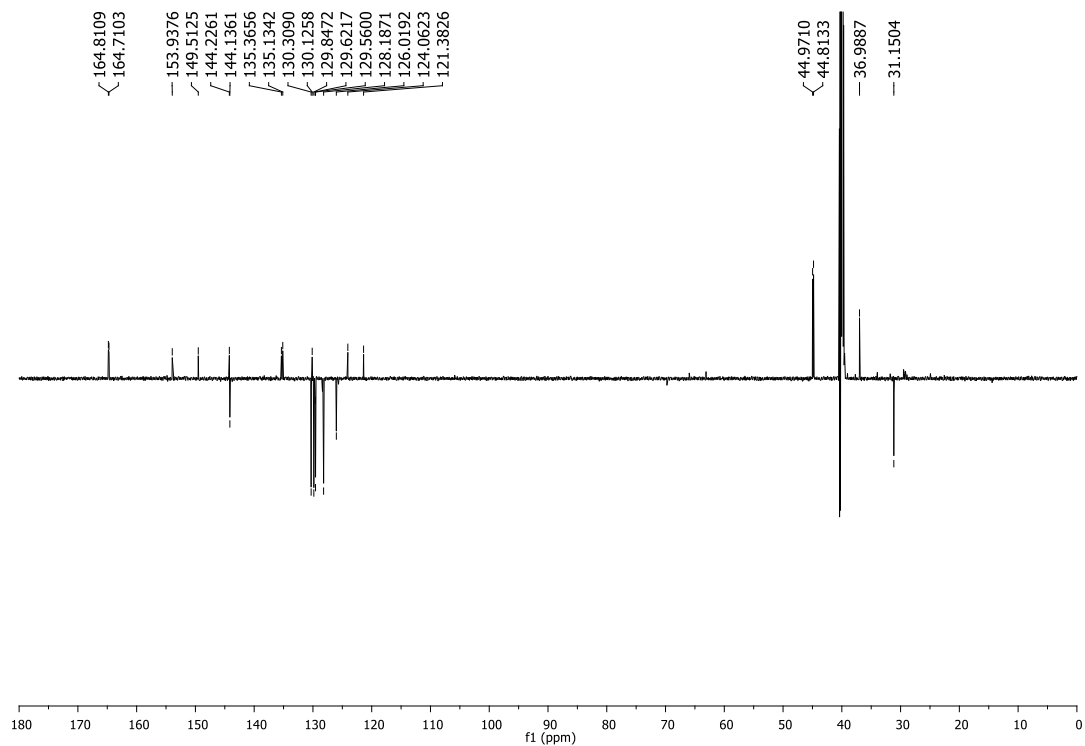


Prilog 14.

a) ^1H NMR spektar 2,6-bis(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin dihidroklorida **19**

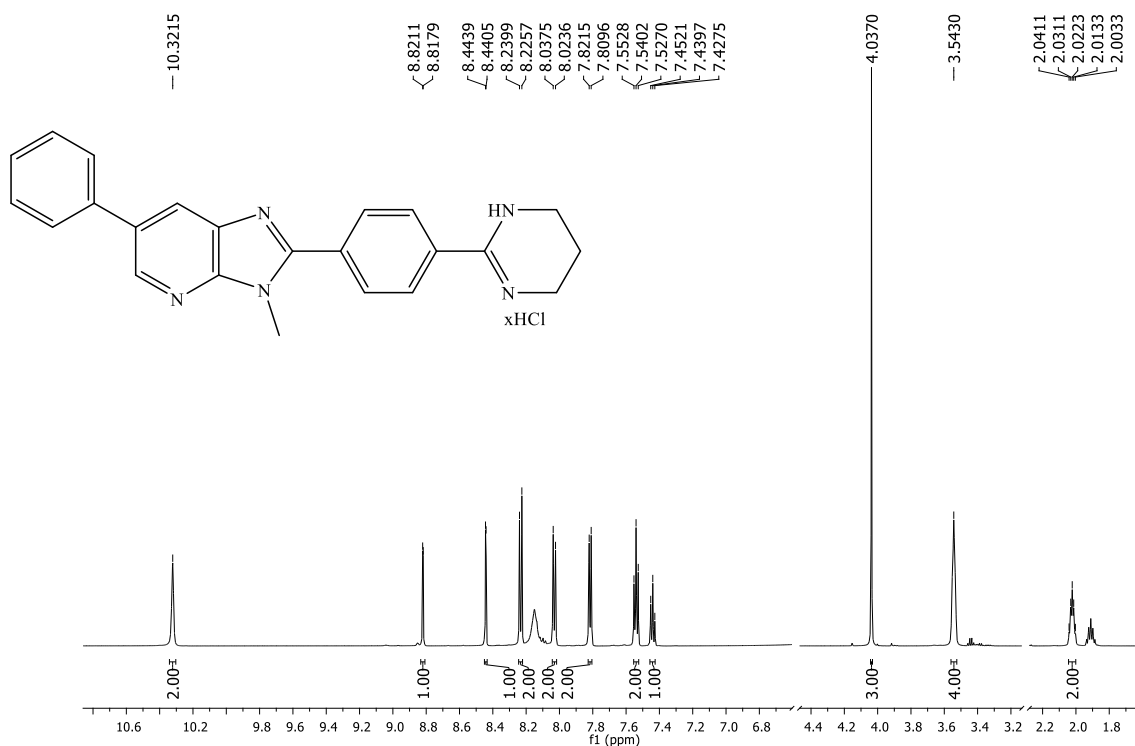


b) ^{13}C NMR spektar 2,6-bis(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-3-metil-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin dihidroklorida **19**

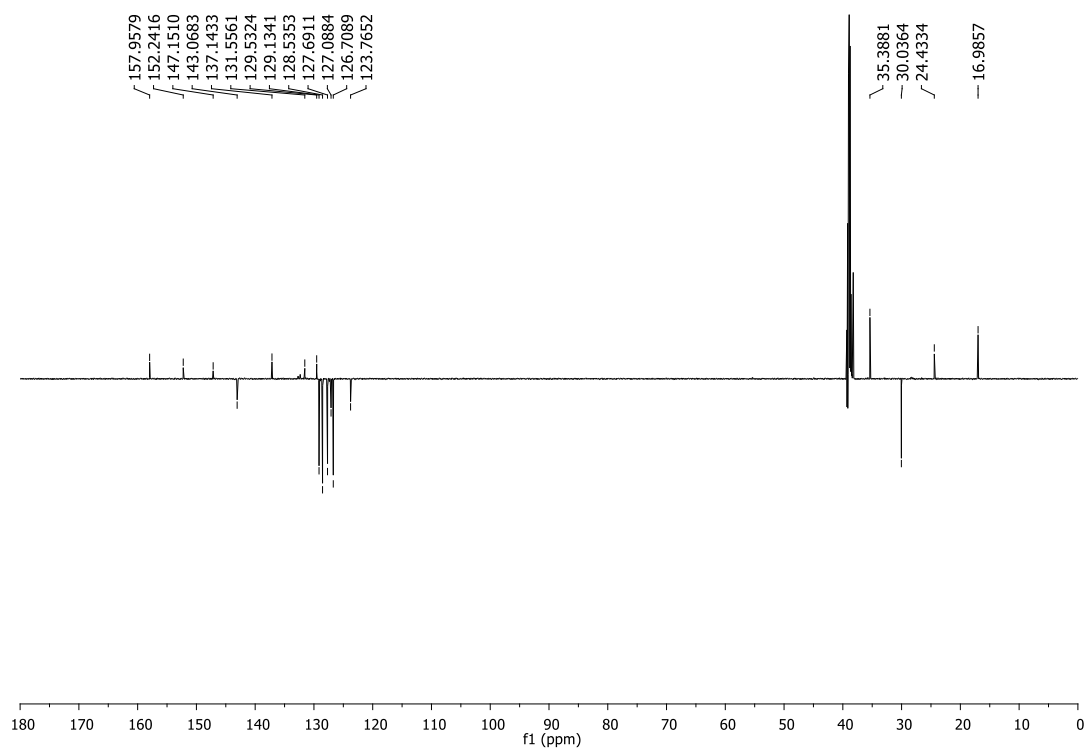


Prilog 15.

a) ^1H NMR spektar 3-metil-6-fenil-2-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **20**

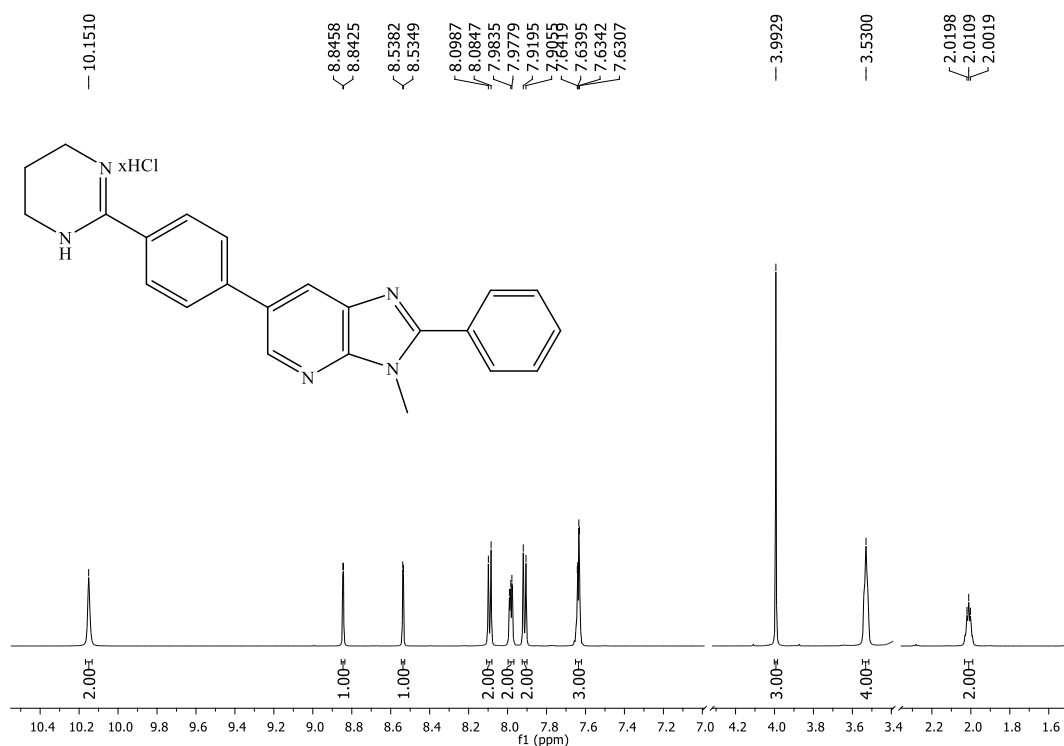


b) ^{13}C NMR spektar 3-metil-6-fenil-2-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **20**

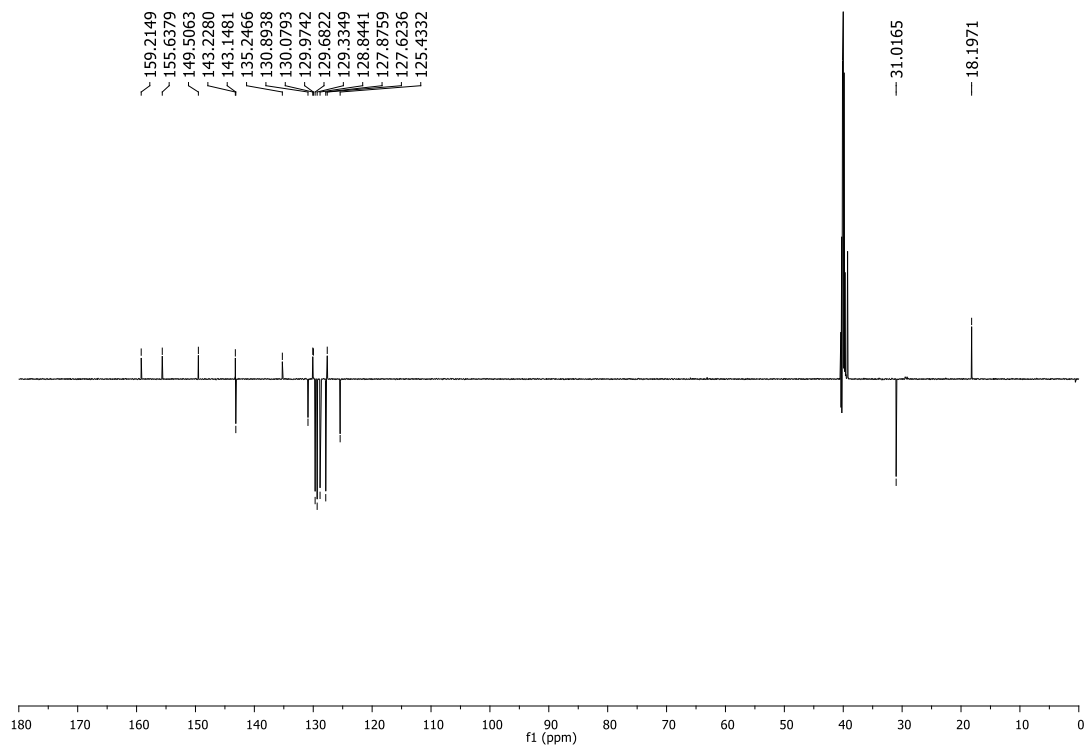


Prilog 16.

a) ^1H NMR spektar 3-metil-2-fenil-6-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **21**

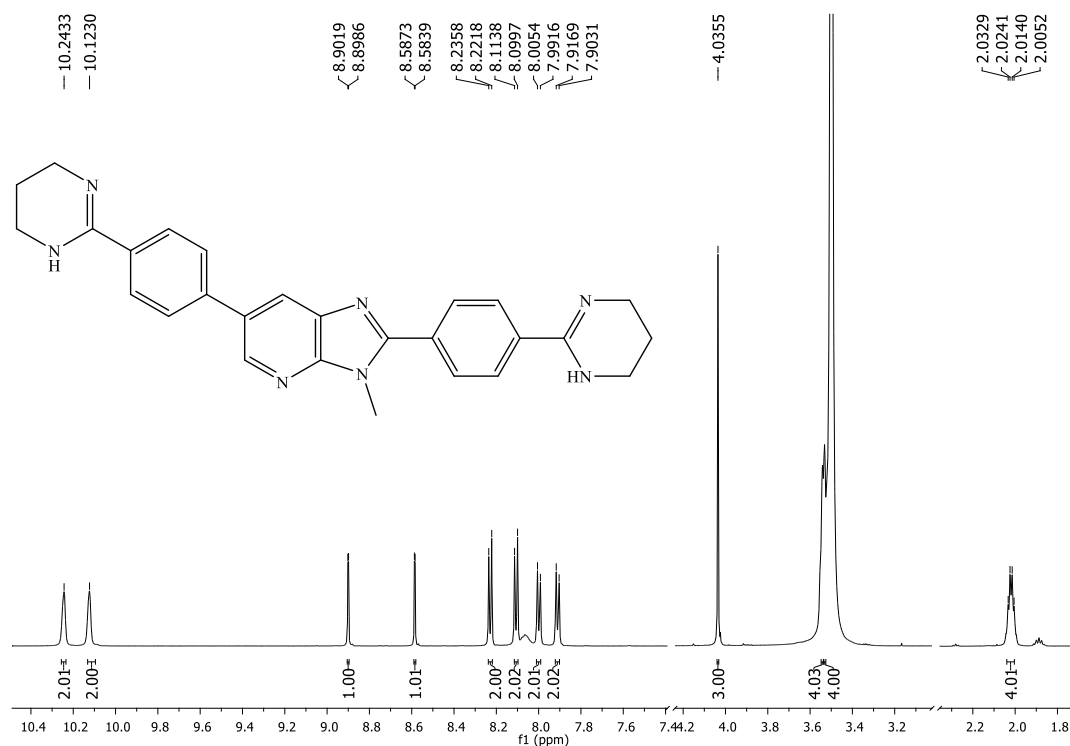


b) ^{13}C NMR spektar 3-metil-2-fenil-6-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin hidroklorida **21**



Prilog 17.

a) ^1H NMR spektar 3-metil-2,6-bis(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin dihidroklorida **22**



b) ^{13}C NMR spektar 3-metil-2,6-bis(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin dihidroklorida **22**

