

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

Ida Boček

**UTJECAJ POLOŽAJA DUŠIKOVOG ATOMA NA
SPEKTROSKOPSKA SVOJSTVA I INTERAKCIJU S
DNK/RNK REGIOIZOMERA TEMELJENIH NA
IMIDAZO[4,5-*b*]PIRIDINU**

Zagreb, travanj 2017.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Nataše Perin u sklopu projekata Hrvatske nacionalne zaklade br. 5596 (Synthesis and cytostatic evaluations of novel nitrogen heterocyclic library SCIENcENTRY) i br. 3386 (Design and Synthesis of Novel Nitrogen-Containing Heterocyclic Fluorophores and Fluorescent Nanomaterials for pH and Metal-Ion Sensing iNFiNiTE–SENS) te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

Popis kratica:

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

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

RNK – ribonukleinska kiselina

UV/Vis – ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

NOESY – Nuclear Overhauser effect spectroscopy tj. spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta

COSY - Correlation spectroscopy tj. korelacijska spektroskopija

HMQC - Heteronuclear multiple-quantum correlation spectroscopy

λ_{em} - valna duljina emisije

λ_{exc} - valna duljina ekscitacije

ϵ - molarni ekstincijski koeficijent

Abs – apsorbancija

DMSO – dimetilsulfoksid

MeOH – metanol

EtOH – etanol

EtAc – etil-acetat

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2. 1. Sinteza i biološka aktivnost derivata imidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	4
2. 2. Sinteza potpomognuta mikrovalovima	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Opće napomene	26
3. 2. Priprava amino supstituiranih tetracikličkih derivata imidazo[4,5- <i>b</i>]piridina.....	27
3.3. Ispitivanje interakcija nekih priređenih derivata s DNK/RNK	31
3.3.1. Supstrati	31
3.3.2. Spektroskopske metode	31
3.3.3. Izvedba titracija.....	31
4. RASPRAVA I REZULTATI	32
4.1. Cilj rada	33
4.2 Sinteza priređenih spojeva.....	34
4.3. Utjecaj otapala na spektroskopske karakteristike	46
4.3.1. Spektroskopska karakterizacija spoja 9 UV/Vis i emisijskom spektroskopijom....	47
4.3.2. Spektroskopska karakterizacija spoja 10 UV/Vis i emisijskom spektroskopijom..	50
4.3. Fluorescencija u čvrstom stanju	55
4.4. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva regioizomera 9 i 10	56
4.5. Ispitivanje interakcije nekih priređenih derivata s DNK/RNK	59
5. ZAKLJUČAK	63
6. ZAHVALA	66
7. LITERATURA	68
8. SAŽETAK	72
9. SUMMARY	74
10. ŽIVOTOPIS	76
11. PRILOZI	78

1. UVOD

1. UVOD

Imidazo[4,5-*b*]piridini su strukturni analozi purina čiji derivati lako ulaze u interakciju s važnim biomolekulama poput DNK, RNK ili različitim proteinima. Imaju važnu ulogu u istraživačkoj medicinskoj kemiji jer njihovi derivati pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti poput antioksidativne, antitumorske, antivirusne i antimikrobne a u organizmu djeluju kao antagonisti različitih bioloških receptora. Derivati imidazo[4,5-*b*]piridina inhibiraju različite tirozin kinaze, enzime koji su ključni za staničnu signalizaciju. Značajan napredak ostvaren je ciljanom sintezom derivata imidazo[4,5-*b*]piridina sa selektivnim inhibitorским djelovanjem. Tetraciklički derivati svoje antitumorsko djelovanje ostvaraju mehanizmom interkaliranja te se intenzivno istražuju jer su pokazali djelovanje na tumorske stanice koje su rezistentne prema uobičajenim kemoterapeutičima. Istražuje se i potencijalna primjena derivata imidazo[4,5-*b*]piridina kao optičkih bojila i fluorescentnih proba za obilježavanje DNK/RNK. Optički biomarkeri koriste se u biomedicini i terapiji za detekciju biomakromolekula, osobito DNK i različitih proteina. Glavne prednosti fluorescencijskih metoda su visoka osjetljivost, dobra ponovljivost i točnost kod vrlo niskih koncentracija.

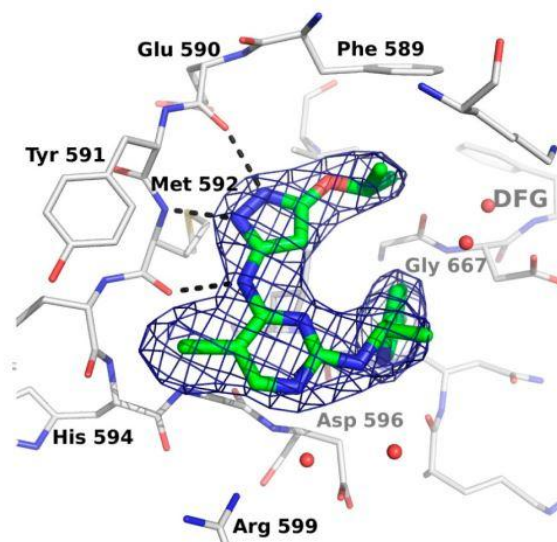
2. OPĆI DIO

2. 1. Sinteza i biološka aktivnost derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

Spojevi koji u svojoj strukturi sadrže jezgru imidazo[4,5-*b*]piridina smatraju se strukturnim analozima purina, te se predmet velikog interesa u istraživanju organskih i medicinskih kemičara zbog širokog spektra različitih bioloških aktivnosti i pozitivnih farmakoloških svojstava koje pokazuju.¹ Tako su npr. derivati imidazo[4,5-*b*]piridina antagonisti različitih bioloških receptora poput angiotenzina II i trombocit-aktivirajućeg faktora, a novija istraživanja ukazala su na njihovu potencijalnu upotrebu kao inhibitora Aurora kinaza ili cikličke nukleotidne fosfodiesteraze.²

Trk kinaze pripadaju podobitelji receptora tirozin kinaza koje imaju važnu ulogu u kaskadi staničnog signaliranja.³ Trk postoji u tri izomerna oblika: TrkA, TrkB i TrkC. Sva tri oblika su aktivirana ligandima faktora rasta – neurotropinima.⁴ Vežanjem neutropina u izvanstaničnu domenu, pokreće se fosforilacija nekoliko ključnih citoplazmatskih tirozinskih ogranaka u domeni kinaze koji imaju važnu ulogu u prenošenju signala.⁵ Prva istraživanja Trk kinaza povezala su ih s karcinomom prostate i gušterače⁶, dok je u posljednjem desetljeću dokazano da imaju ulogu u razvoju različitih karcinoma poput neuroblastoma, raka dojke i debelog crijeva.⁷ Iz tih razloga intenzivno se istražuju inhibitori Trk kinaza.⁸ Prva istraživanja kristalne strukture ovih receptora nisu obuhvaćala izvanstaničnu domenu. Značajan napredak postignut je kristalnom strukturom domene TrkC kinaze s oksindolnim inhibitorom.⁹ Skupina američkih znanstvenika¹⁰ već je otkrila spoj **1** koji je pokazao inhibitornu aktivnost prema TrkA/B *in vitro* i *in vivo* s dobrim fizikalnim i farmakokinetičkim svojstvima.¹¹ **1** je inhibirao rast ksenografta humanog tumorskog neuroblastoma, te je u kombinaciji s topotekanom imao produženo inhibitorno djelovanje na rast tumora.¹² Nagađa se da bi se spoj **1** vezao u područje kinaze preko pirazola ili aminopiridina, a studije preferiraju vezanje preko pirazola. Kako bi potvrdili pretpostavku, znanstvenici su utvrdili strukturu domene kinaze TrkA u kompleksu sa spojem **1** TrkA poprima inaktivan oblik s α C zavojnicom u katalitičkoj nekompetitivnoj orijentaciji. Spoj **1** veže se preko pirazonlog prstena stvarajući veze s atomima na okosnici Glu 590 i Met 592 prema slici 1.

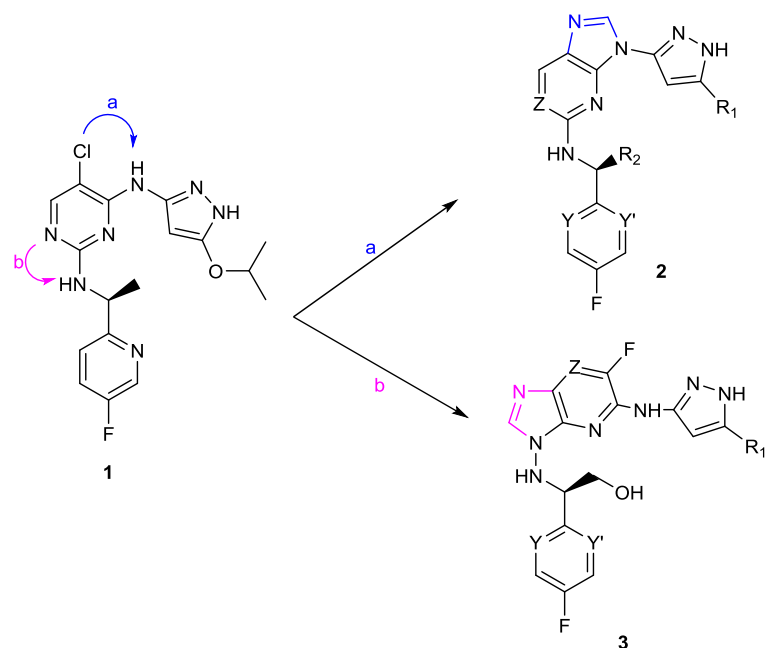
2. OPĆI DIO



Slika 1. Kristalna struktura spoja 1 u veznom mjestu Trk kinaze

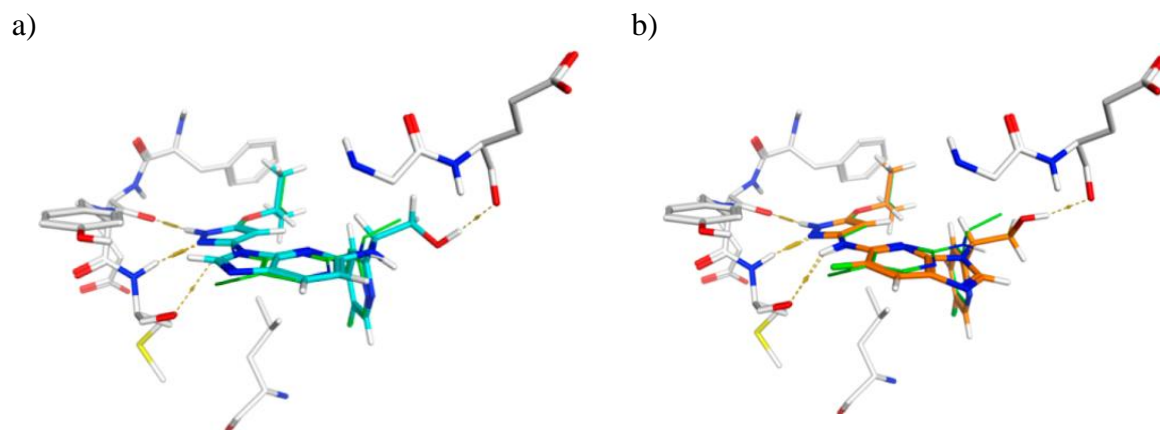
Izopropoksi skupina je usmjerena prema bočnom ogranku Phe 589. Fluoropiridinski prsten je u kontaktu s bočnim ogrankom Leu 657, a atom fluora je u blizini okosnice karbonilnog atoma Asn 665 i α C Gly 667 N-terminalnog kraja DFG sekvence aktivacijske petlje. N-1 atom pirimidina nije u direktnom kontaktu s bočnim ograncima TrkA proteina, ali se veže preko vode s Asp 596 NH i fleksibilnim bočnim lancima Asp 596 i Arg 599 u području koje je izloženo otapalu u ATP veznom mjestu. U svrhu istraživanja strukture i aktivnosti heterocikličkog prstena, istražene su zamjene za 2,4-disupstituirani pirimidin. Trk inhibitorna aktivnost je zadržana kad je prsten zamijenjen jezgrama poput fenila, 2,6-disupstituiranog piridila ili alternativno, regioizomerima 2,4-pirimidina.¹³ Istražene su i bicikličke jezgre. Fuzija dodatnog prstena na položajima C-5 i C-6 piridinskog prstena, rezultirala je kinazolin-2,4-diamino- i tieno[2,3-*e*]pirimidin-2,4-diamino analogima čiji je odnos strukture i aktivnosti pratio rezultate monocikličke pirimidinske jezgre.¹⁴ Druge fuzijske mogućnosti prikazane su na slici 2. C-5 ugljik povezuje se s egzocikličkom amino skupinom pirazol-3-ila u peteročlani imidazolski prsten (a) dok se drugim pristupom imidazolni prsten dobiva povezivanjem centralnog atoma dušika s 1-heteroaril etan amino skupinom. Prikazane strukture su derivati purina, odnosno imidazo[4,5-*b*]piridina.

2. OPĆI DIO



Slika 2. Sintetski putevi za sintezu bicikličkih derivata

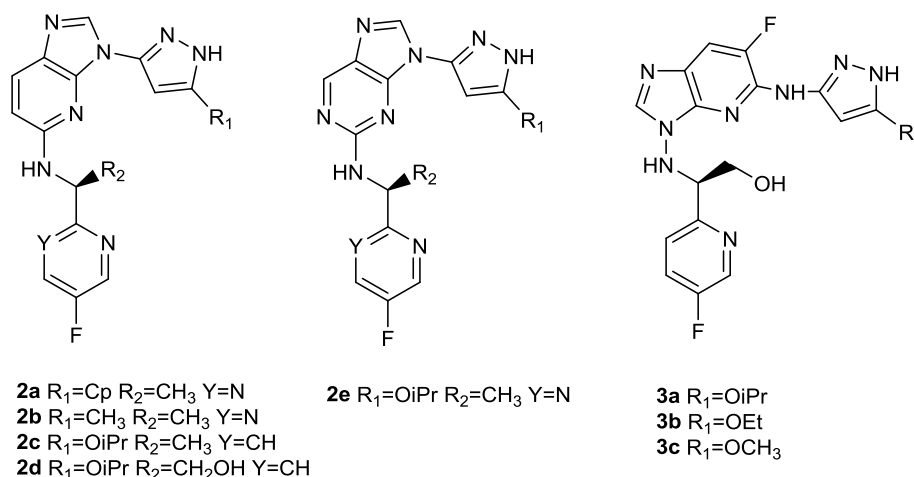
Očekivano je da će spoj 3 zadržati Trk aktivnost s obzirom da je 3-pirazolilna skupina prisutna nakon fuzije. Za spoj 2 pretpostavljeno je da će dva dušikova atoma na pirazolnom prstenu stvarati ključne vodikove veze, dok bi treću interakciju mogao stvoriti slabo kiseli C-H imidazolnog prstena. Modeli vezanja spojeva 2 i 3 s TrkA receptorom prikazani su na slici 3.



Slika 3. Modeli vezanja spojeva 2 (a) i 3 (b) s receptorom

2. OPĆI DIO

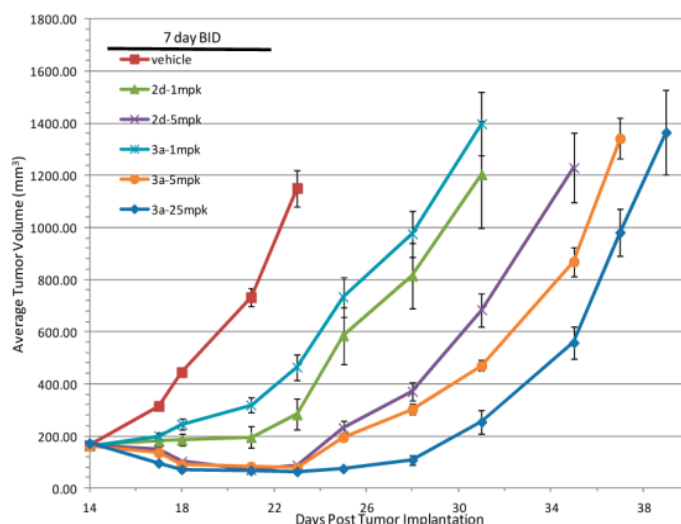
Sintetizirane su dvije serije derivata i testirane su na *in vitro* aktivnost, *in vitro* i *in vivo* farmakokinetiku na stanicama štakora i fizikalna svojstva. Derivati, čije su strukture prikazane na slici 4, pokazali su subnanomolarnu staničnu aktivnost za inhibiciju stanične fosforilacije TrkA.



Slika 4. Strukture sintetiziranih spojeva

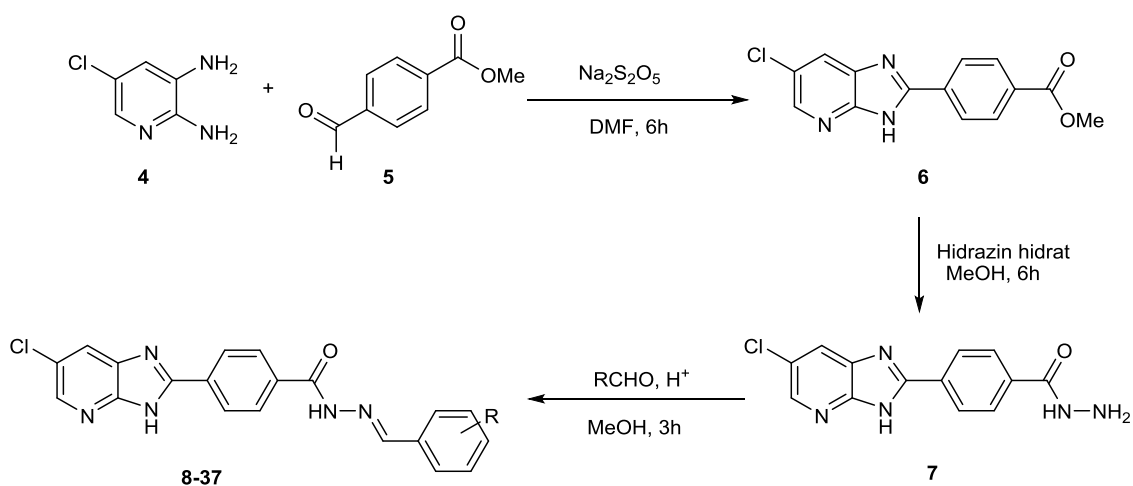
Istraživanje strukture i aktivnosti pokazalo je da za R₁ supstituent toleriraju ciklopropil, OiPr, OEt i OCH₃, dok manje skupine poput metila pokazuju značajan gubitak stanične aktivnosti. Derivati piridina (**2a**, **2c**, **2d**, **3a-c**) i pirimidina (**2e**) pokazuju slične stanične aktivnosti. Model za R₂ supstituent pretpostavlja dodatnu vodikovu vezu preko polarnog supstituenta, no spoj nije pokazao poboljšanje u aktivnosti u odnosu na spoj **2c**. *In vivo* antitumorsko djelovanje ispitano je na **3** T3-TrkA-Δ modelu alografta miša. Slika 5 prikazuje rezultate testiranja, te oba spoja, **2d** i **3a**, pokazuju antitumorsku aktivnost ovisnu o dozi. U dozi od 1 mg/kg oba spoja inhibiraju rast tumora. Značajno usporavanje rasta tumora uočeno je u dozama 5 i 25 mg/kg za derivat **3a**.

2. OPĆI DIO



Slika 5. Rezultati testiranja spojeva 2d i 3a na alograftu

Glikozilacija je reakcija koja se događa između reducirajućeg šećera i slobodne aminokiseline. Proces je poznat i pod nazivom Maillardova reakcija koja uključuje seriju kompleksnih neenzimatskih reakcija.¹⁵ Intermedijer, Amadori produkt, nastaje u ranim stadijima procesa glikozilacije.¹⁶ Proces se događa u tijelu i može modificirati biomolekule poput kristalina, kolagena, hemoglobina, albumina i DNK¹⁷. Modifikacije vode neispravnoj funkciji proteina¹⁸, a povezuje se i s mikrovaskularnim bolestima koje usporavaju zarastanje rana kod dijabetičara.¹⁹ Imidazo[4,5-*b*]piridini imaju širok spektar biološke aktivnosti. Benzohidrazidi su od prije poznati po svojoj antiglikozilacijskoj²⁰ i antioksidativnoj aktivnosti²¹. M. Taha i suradnici²² sintetizirali su seriju od 30 novih imidazo[4,5-*b*]piridin benzohidrazona te ispitali njihovu antiglikozilacijsku i antioksidativnu aktivnost.

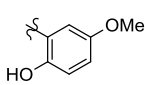
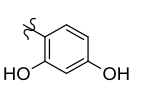
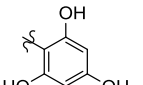

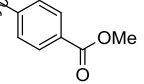
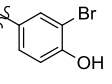

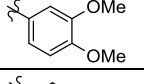
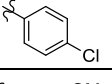
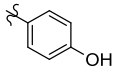
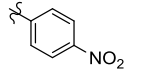
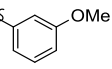

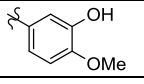
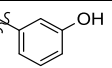
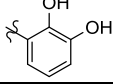
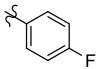

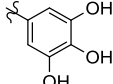
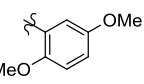
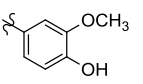


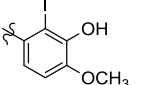

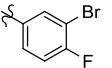
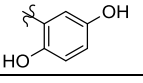
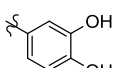
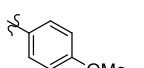
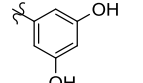


Shema 1. Sinteza derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

2. OPĆI DIO

Sinteza novih imidazo[4,5-*b*]piridin benzohidrazona prikazana je na shemi 1 te se odvija u tri koraka. U prvom koraku 5-klorpiridin-2,3-diamin reagira s metil-4-formilbenzoatom. Nastali 4-(6-klor-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzoat. U sljedećem koraku nastali ester se tretira hidrazin hidratom u metanolu, a nastali benzohidrazid podliježe reakciji s različitim benzaldehidima u prisutnosti octene kiseline te su nastali željeni produkti. Supstituenti fenilne jezgre prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Supstituenti fenilne jezgre

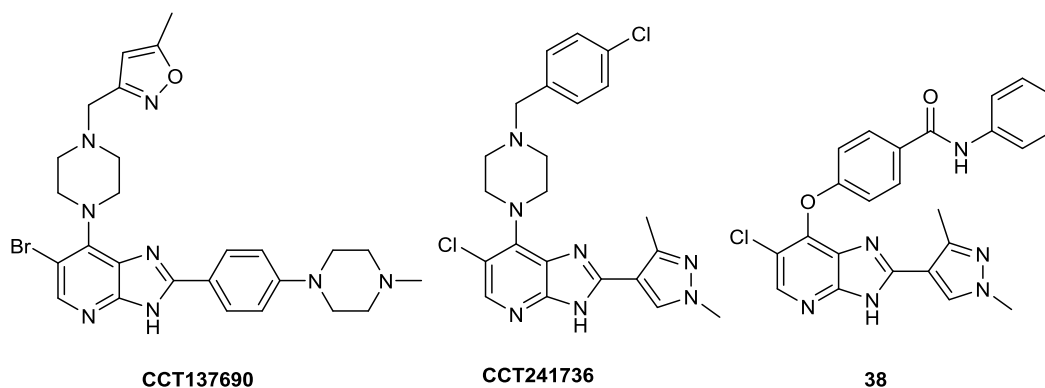
	R		R		R
8		18		28	
9		19		29	
10		20		30	
11		21		31	
12		22		32	
13		23		33	
14		24		34	
15		25		35	
16		26		36	
17		27		37	

Antiglikozilacijska ispitivanja pokazala su vrijednosti između 140,16 do 420,12 μM za određene derivate. Određeni derivati čija je IC_{50} vrijednost manja od 294,46 μM pokazali su bolju aktivnost od rutina. Obećavajuće rezultate pokazali su derivati **8**, **9**, **11**, **13**, **14**, **17**, **18**, **28** i **36**. Generalni zaključak je da je prisutnost, broj i pozicija OH skupine esencijalna za inhibiciju glikozilacijskog procesa. Najveću aktivnost pokazao je trihidroksi supstituirani

2. OPĆI DIO

derivat **28**. Monohidroksi supstituirani derivati pokazali su da je preferirana para supstitucija dok meta položaj pokazuje najslabiju inhibitornu aktivnost. Unatoč hidroksi supstituciji, derivati **15**, **32** i **37** nisu pokazali dobru aktivnost. Antioksidativna aktivnost ispitana jer DPPH i FRAP metodama. Najbolje rezultate pokazali su tri hidroksi supstituirani derivati. Rezultati su uspoređeni s galnom kiselinom koja je uzeta kao standard. Derivati **13**, **14**, **17**, **18**, **28**, **34**, **36** i **37** pokazali su bolju inhibitornu aktivnost DPPH radikala od standarda galne kiseline. Spoj **28**, koji je pokazao i najbolju antiglikozilacijsku aktivnost, pokazao je i najbolju antioksidativno aktivnost. Spojevi s više OH skupina pokazuju bolje rezultate. Najbolje rezultate testiranja FRAP metodom određivanja antioksidativne aktivnosti pokazao je derivat **14**. Spoj **28** koji je pokazao najbolje rezultate DPPH metodom, nije pokazao dobru aktivnost u ovom eseju. Spojevi s jednom OH skupinom pokazali su umjerenu ili slabu inhibitornu aktivnost. Spoj **16**, supstituiran furanom, jedini je spoj supstituiran heterocikličkom jezgrom koji je pokazao dobru aktivnost. Utjecaj metoksi ili halidne skupine ne igra važnu ulogu u aktivnosti FRAP eseja.

Male molekule inhibitor Aurora kinaza kao antitumorskih agenasa predmet su brojnih istraživanja. Identificirani su različiti kemotipovi za modulaciju Aurora kinaza.²³ Male molekule inhibiraju sva tri oblika, a nekoliko spojeva pokazuje selektivnost: AZD1152 za Aurora B²⁴ i MLN8237 kao selektivni Aurora-A inhibitor²⁵. Neki inhibitori su u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima za liječenje različitih humanih malignih bolesti.²⁶ V. Bavetsias i suradnici dugi niz godina istražuju inhibitore Aurora kinaza čija je osnova imidazo[4,5-*b*]piridinska jezgra. Na slici 6 prikazani su već sintetizirani inhibitori. Spoj CCT137690²⁷ je inhibitor Aurora kinaza, CCT241736²⁸ je dualni inhibitor FLT3/Aurora kinaze a spoj **38** selektivno inhibira Aurora-A kinazu.²⁹



Slika 6. Sintetizirani inhibitori Aurora kinaza

2. OPĆI DIO

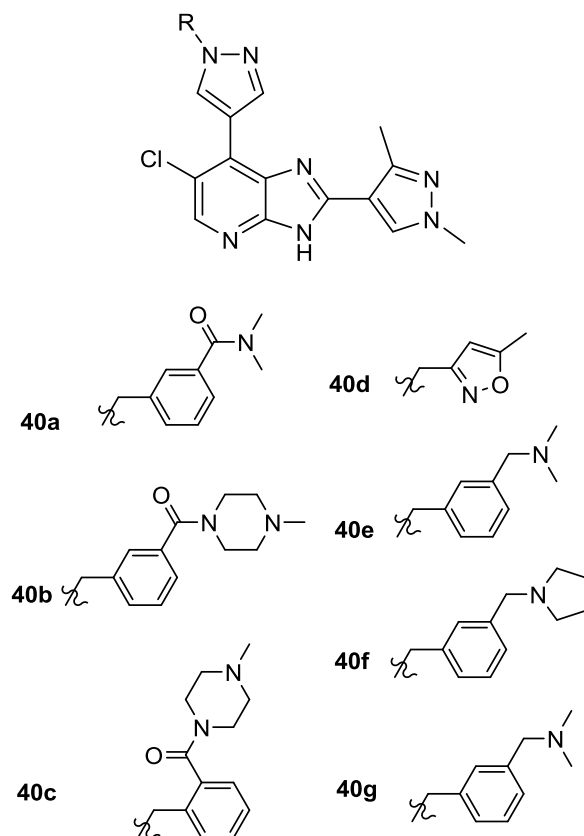
Prilikom istraživanja spoja **38**, otkriveno je da bi potencijalni inhibitori mogli biti dobiveni modifikacijama na imidazo[4,5-*b*]piridinskoj jezgri na položaju C7. Znanstvenici³⁰ su u nastavku svog istraživanja sintetizirali derivate koji su upravo na tom položaju supstituirani s pirazolnim prstenom u svrhu poboljšanja farmakološkog profila ove klase spojeva. Sintetizirana je prva serija derivata uvođenjem različitih 1-benzil-1*H*-pirazol-4-il supstituenata na položaj C7. Varijacije na tom položaju prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Varijacije na položaju C7

39a	
39b	
39c	
39d	
39e	

Derivat **39a** inhibira Aurora-A i B kinaze s IC_{50} vrijednosti 0,212 i 0,461 μ M. U HeLa stanicama raka cerviksa, isti derivat inhibira autofosforilaciju na T228 i fosforilaciju histona H3 na S10. Istraživanje sličnih derivata trebalo bi dovesti do povećane biokemijske aktivnosti na Aurora-A kinazu i povećanja mikrosomalne aktivnosti. Uvođenjem *p*-F supstituenta na fenilni prsten dobiven je derivat **39b** koji je pokazao sličan inhibitorski profil. Poboljšanje inhibitorske aktivnosti nije postignuto niti derivatom **39c** dok je **39d** pokazao bolju stabilnost u mikrosomima humane jetre. *In vivo* istraživanja otkrila su lošu bioraspoloživost i slabu topljivost. U svrhu poboljšavanja tih svojstava, sintetizirana je druga serija spojeva čiji su supstituenti prikazani na shemi 2.

2. OPĆI DIO

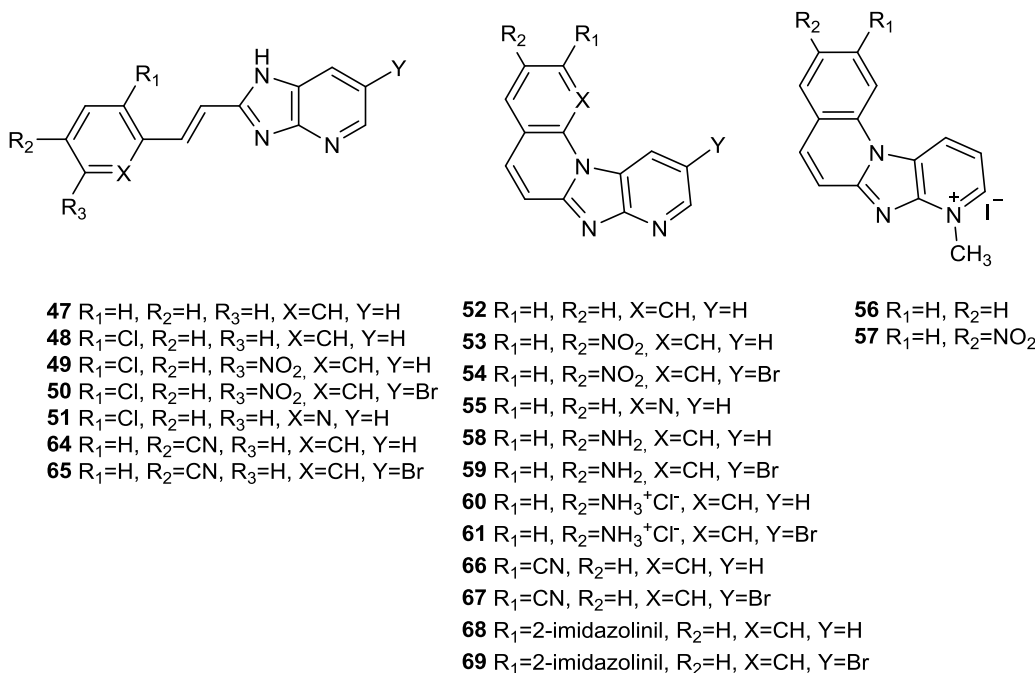


Shema 2. Derivati s različitim supstytutentima na položaju C7

Zamjenom fenilnog prstena **39a** sa 5-metilizoksazolnim dobiven je derivat **40d**. Pokazao značajno poboljšanje u inhibitornoj aktivnosti prema Aurora kinazama uz izostanak selektivnosti. Inhibirao je rast SW620 i HCT116 tumorskih stanica u sličnim koncentracijama kao derivat **39d**. Derivat m-dimetilbenzamida **40a** pokazao je bolju inhibitornu aktivnost prema Aurora-A proteinu no smanjenu stabilnost u mikrosomima humane jetre. Sličan trend prati i derivat **40b**. Odabranim derivatima ispitana je inhibitorna aktivnost na različitim kinazama. Inhibitorna aktivnost spojeva **39a**, **39d**, **40d** i **40g** ukazuje na činjenicu da 7-(pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridinska jezgra mora biti detaljnije istražena radi dizajniranja inhibitora više kinaza.

Imidazo[4,5-b]piridini su strukturni analozi purina čiji derivati lako ulaze u interakciju s velikim biomolekulama poput DNK, RNK i različitim proteinima *in vivo*. Znanstveni tim M. Hranjec³¹ sintetizirao je nove derivate imidazo[4,5-b]piridina i triaza-benzo[c]fluorena supstituiranih na različitim položajima heterocikličke jezgre čija je struktura prikazana na Slici 7.

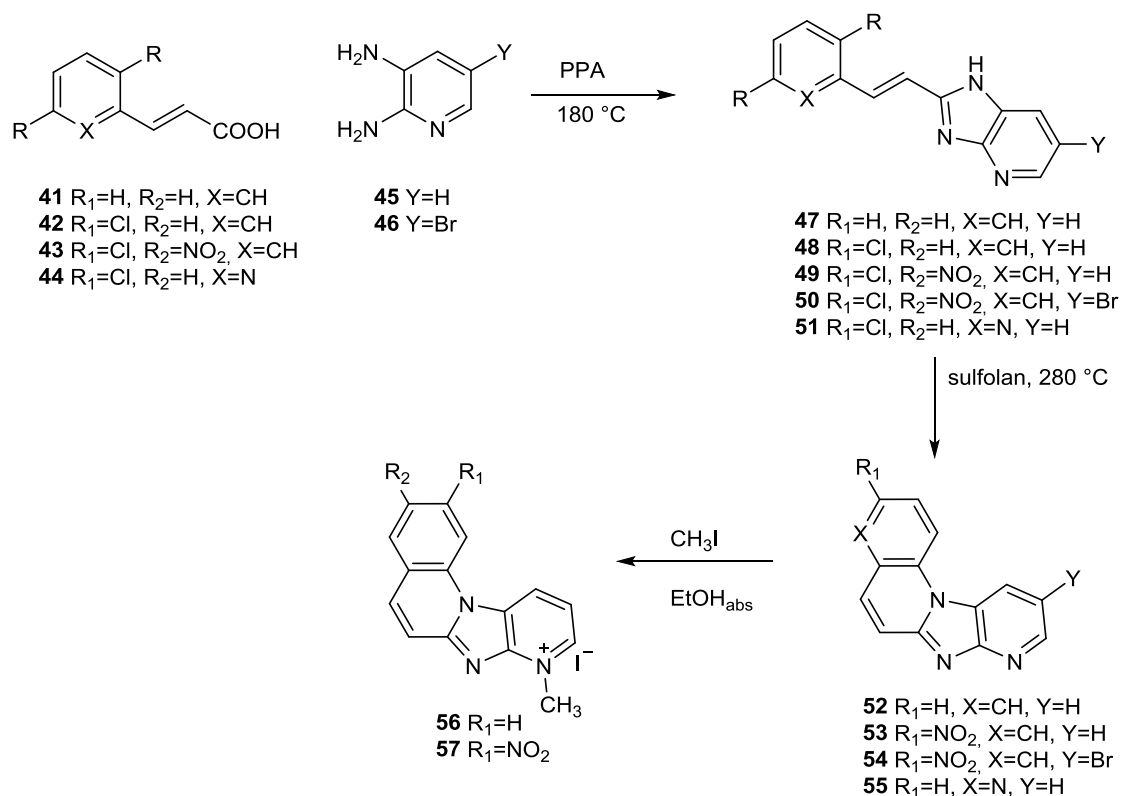
2. OPĆI DIO



Slika 7. Strukture sintetiziranih spojeva

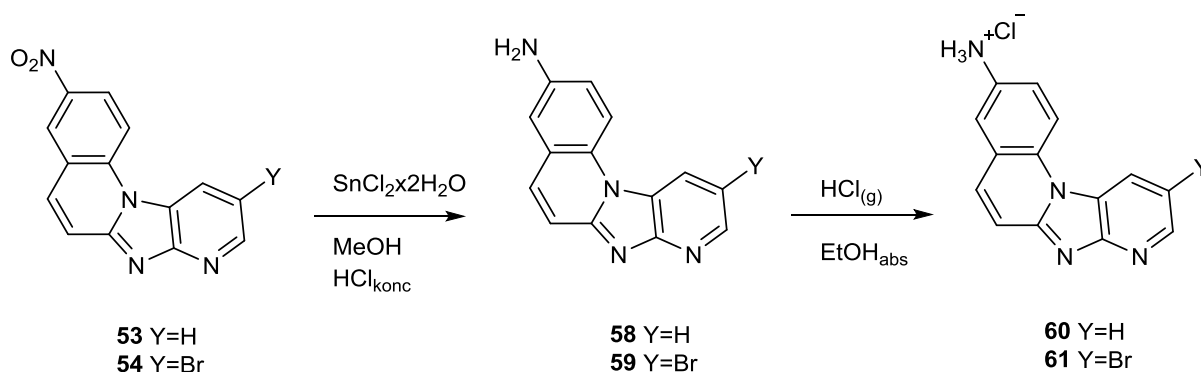
Testirana je antiproliferativna aktivnost većine sintetiziranih spojeva na sedam staničnih linija humanih karcinoma. Mogući antiproliferativni mehanizam i mete djelovanja detaljno su istražene za spojeve **58** i **68** dok su vezna mjesta na DNK proučavani za spojeve **56**, **58** i **68**. Spojevi su sintetizirani konvencionalnim metodama organske sinteze kojim se pripremaju slični heterociklički spojevi prema Shemi 3. Iz *E*-3-fenilsubstituiranih akrilnih kiselina, reakcijom ciklokondenzacije s odgovarajuće supstituiranim 2,3-diaminopiridinima uz prisutnost polifosforne kiseline sintetizirani su derivati *E*-2-stiril-imidazo[4,5-*b*]piridina **47-51**. Njihovi ciklički derivati, triaza-benzo[*c*]fluoreni **52-55**, priređeni su termičkim reakcijama koristeći sulfolane za cikličku dehidrohalogenaciju pri 280 °C pri čemu su dobivene smjese dva nerazdvojiva regioizomera. Nesupstituirani derivat **52** pripremljen je fotokemijskom dehidrociklizacijom iz etanolne otopine derivata **47**. *N*-metilirani derivati **56** i **57** priređeni su iz spojeva **52** i **53**, dok metiliranje derivata triaza-benzo[*c*]fluorena nije uspješno provedeno.

2. OPĆI DIO



Shema 3. Sinteza ciljanih derivata

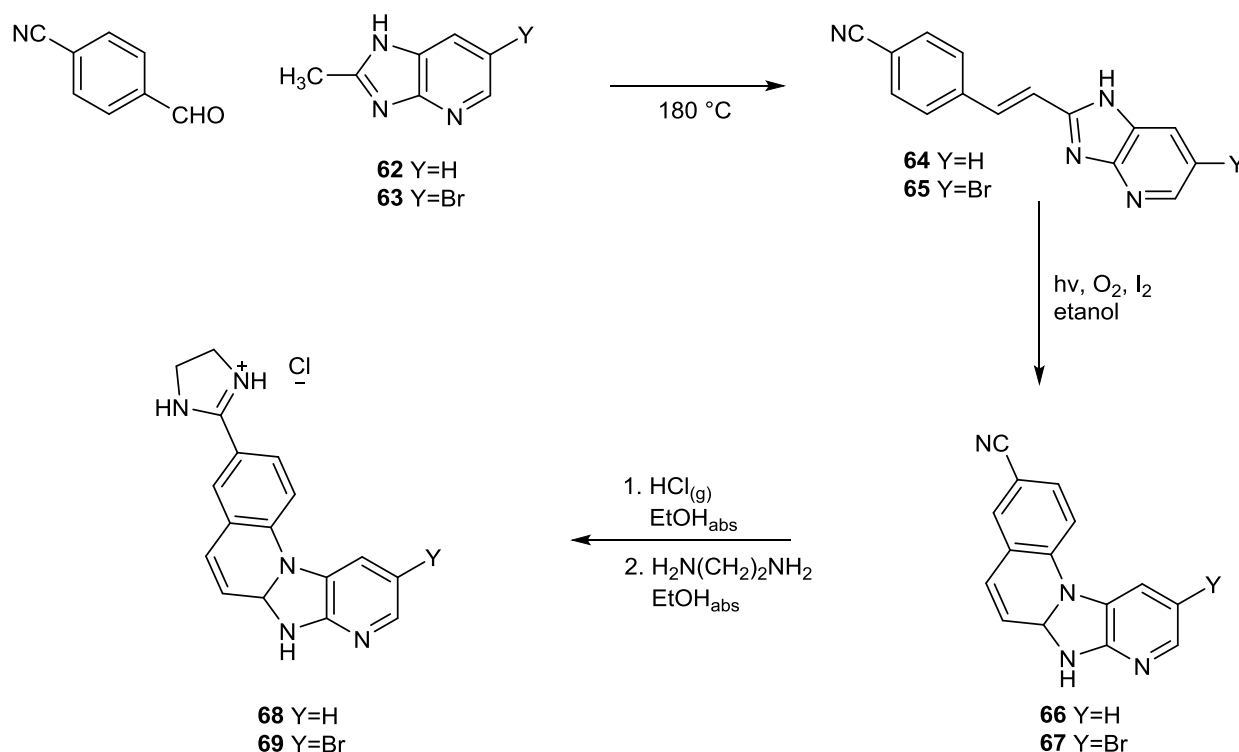
Amino supstituirani triaza-benzo[c]derivati **58** i **59** su pripremljeni, prema shemi 4, redukcijom s $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ iz nitro supstituiranih prekursora u vrlo dobrim iskorištenjima. Hidrokloridne soli amino derivata dobivene su protoniranjem s $HCl_{(g)}$ radi postizanja bolje topljivosti spojeva.



Shema 4. Sinteza cikličkih derivata

2. OPĆI DIO

Cijano-supstituirani *E*-2-stiril-imidazo[4,5-*b*]piridini **64-65** priređeni su u vrlo dobrim iskorištenjima reakcijama kondenzacije između odgovarajućih 2-metilimidazo[4,5-*b*]piridina i *p*-cijanobenzaldehida u zatvorenim cijevima pri 180 °C prema shemi 5. Cijano-supstituirani triaza-benzo[*c*]fluoreni **66-67** priređeni su fotokemijski izlaganjem etanolnih otopina spojeva **54-55** isijavanju visokotlačne živine lampe. Reakcija su praćene UV/Vis spektroskopijom. 2-imidazolinil-supstituirani triaza-benzo[*c*]fluoreni kao hidrokloridne soli pripremljeni su Pinnerovom reakcijom sinteze amidina.

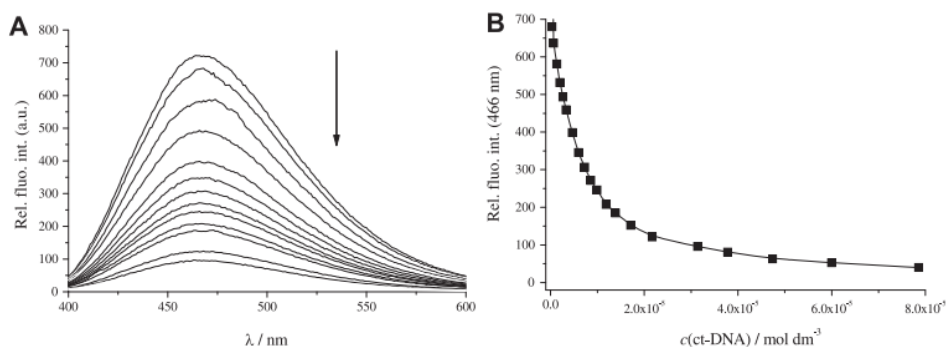


Shema 5. Sinteza imidazolinskih derivata

Za istraživanje interakcija s DNK, odabrani su aktivni spojevi **56**, **58** i **68**. Navedeni spojevi okarakterizirani su elektronskom apsorpcijskom (UV/Vis) i fluorescencijskom emisijskom spektroskopijom. Ispitivanja su pokazala da povišenje temperature na 98 °C ima neznatan utjecaj na spektroskopska svojstva te da je reproducibilnost nakon hlađenja na 25 °C očuvana. UV/Vis spektrofotometrijskim titracijama praćene su interakcije spojeva s *ct*-DNK u vodenom mediju. Dodatak *ct*-DNK rezultirao je batokromnim i hipokromnim efektom u UV/Vis spektru. Za spojeva **56** i **68** uočeno je značajno odstupanje od izosbestičke točke što upućuje na postojanje barem dva različita kompleksa. Fluorimetrijske titracije pokazale su da

2. OPĆI DIO

dodatkom *ct*-DNK dolazi do potpunog gašenja fluorescencije spoja **68**, što je prikazano na slici 8, i jakog gašenja fluorescencije spoja **56** u odnosu na fluorescenciju spoja **58** čija se emisija neznatno promijenila. Podaci iz UV/Vis i fluorimetrijskih titracija obrađeni su pomoću Schathardove jednadžbe iz kojih su dobivene vrijednosti konstanti stabilnosti K_s . Usporedbom K_s vrijednosti dokazan je veći afinitet spojeva **56** i **58** prema *ct*-DNK u odnosu na analog **58** sa slobodnim aminskim supstituentom.



Slika 8. Emisijske krivulje ispitivanja spoja **58** s *ct*-DNK (A), ovisnost intenziteta emisije na 446 nm o koncentraciji *ct*-DNK

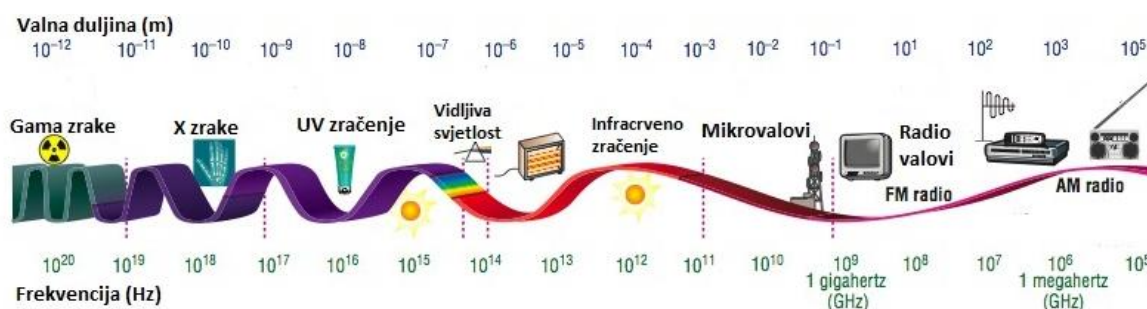
Iz rezultata CD spektrofotometrijskih titracija zaključeno je da se spojevi **56** i **68** u interakciji s *ct*-DNK ponašaju kao interkalatori jer je uočena negativna ICD vrpca u području karakterističnom za interkalatore. Novim sintetiziranim derivatima imidazo[4,5-*b*]piridina i triaza-benzo[*c*]flourena ispitana je antitumorska aktivnost na sedam staničnih linija humanih karcinoma: HeLa (karcinom grlića maternice), SW620 (metastatski kolorektalni adenokarcinom), MiaPaCa-2 (karcinom gušterače), MCF-7 (metastatski epitelni adenokarcinom dojke), Hep-2 (epidermoidni karcinom grkljana) i SK-BR-3 (metastatski adenokarcinom dojke) kao i normalni diploidni humani fibroblasti (W138). Njihov citostatički učinak uspoređen je cisplatinom i 5-fluoruracilom, koji su često korišteni kemoterapeutici. Osim spojeva **51** i **55**, koji su pokazali nikakvu ili umjerenu antiproliferativnu aktivnost, svi spojevi pokazali su snažni citotoksični učinak na svim testiranim staničnim linijama. Osobito su se istaknuli spojevi *E*-2-stiril supstituirani derivati imidazo[4,5-*b*]piridina **47**, **48**, **50** i **65** i derivati triaza-benzoflourena **56**, **58**, **59**, **60**, **68**, **69** jer su citotoksični učinak pokazali već u mikromolarnim koncentracijama u rasponu od 1 do 10 μM. Spojevi **58** i **60** pokazali su selektivni učinak na staničnu liniju SK-BR-3 dok je spoj **56** uz to pokazao i specifičnu inhibiciju rasta MCF-7 i HeLa stanica. Iz klase spojeva triaza-benzo[*c*]flourena, spojevi **68** i **69** pokazali su najjače nespecifično djelovanje na stanične linije u mikromolarnim

2. OPĆI DIO

koncentracijama. Navedeni spojevi sadrže 2-imidazolinilni supstituent, što pridonosi njihovoj citotoksičnosti koja je u rangu citotoksičnosti cisplatina i 5-fluoruracila. Spojevi **58** i **60** pokazali su manju toksičnost na normalne humane fibrinoblaste u odnosu na druge biološki aktivne spojeve. Zbog obećavajućih rezultata, detaljnije je istražen mehanizam djelovanja spojeva **58** i **68**, osobito jer je spoj **58** visoko selektivan prema staničnoj liniji metastatskog adenokarcinoma dojke uz nisku citotoksičnost prema normalnih humanim fibroblastima a spoj **68** visoko je selektivan prema dvije metastatske stanične linije koje su rezistentne prema uobičajenim kemoterapeutičima. Spoj **68** u visokim koncentracijama inducira apoptozu što je povezano s interkaliranjem.

2. 2. Sinteza potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalno zračenje je dio elektromagnetskog spektra u rasponu frekvencija od 0,3 – 600 GHz. Nalazi se između infracrvenog područja i radio valova u elektromagnetskom spektru koji je prikazan na slici 9.



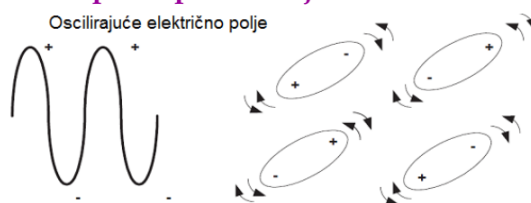
Slika 9. Elektromagnetski spektar

Radi se o zračenju relativno velikih valnih duljina i malih frekvencija što potvrđuje činjenica da energija mikrovalnog zračenja nije dovoljna za kidanje kemijskih veza. Mikrovalno zračenje sastoji se od električne i magnetske komponente koje su međusobno okomite, a za interakciju s materijom odgovorna je električna komponenta.

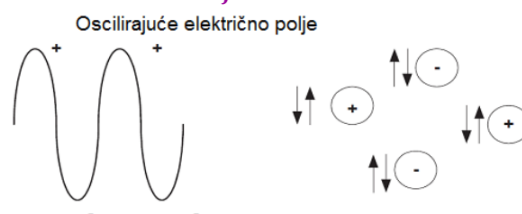
Postoje dva mehanizma zagrijavanja mikrovalnim zračenjem: dipolna polarizacija i ionska vodljivost, koja su prikazana na Slici 1. Materija mora imati dipolni moment da bi mogla apsorbirati energiju mikrovalnog zračenja jer tad električno polje potiče rotaciju molekula. Njihovo kretanje nije dovoljno brzo da bi pratilo brze izmjene električnog polja te dolazi do raspada elektromagnetskog zračenja u obliku toplinske energije. Ionska vodljivost javlja se kad su prisutni slobodni ioni ili ionske vrste u mediju na koji djeluje mikrovalno zračenje pri čemu oni slijede smjer kretanja električnog polja.

2. OPĆI DIO

Mehanizam dipolne polarizacije:



Mehanizam ionske vodljivosti:



Slika 10. Mehanizmi zagrijavanja mikrovalnim zračenjem

Jakost interakcija određena je dielektričnim svojstvima materije. Dielektrična konstanta (ϵ') pokazuje sposobnost molekule da bude polarizirana pod utjecajem električnog polja. Dielektrični gubitak (ϵ'') je količina energije mikrovalnog zračenja koja se rasipa u toplinsku. Tangens gubitka ($\tan\delta$) je sposobnost materije da pretvara energiju elektromagnetskog zračenja u toplinsku energiju pri određenoj frekvenciji i temperaturi. Navedene veličine povezane su preko relacije:

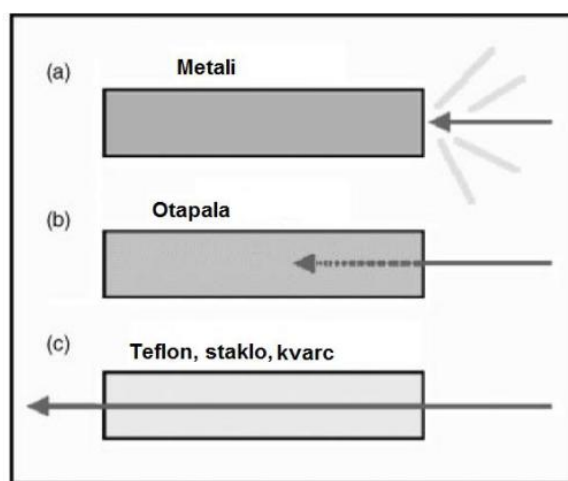
$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$$

Veliku ulogu u apsorpciji mikrovalnog zračenja imaju otapala za koje je poželjno da su polarna s dipolnim momentom i visokom dielektričnom konstantom. Za vrlo visoku sposobnost apsorpcije mikrovalnog zračenja, kao i brzo zagrijavanje, reakcijski medij mora imati visok tangens gubitka ($\tan\delta$) koji je ovisan o frekvenciji i temperaturi. Otapala se dijele u tri kategorije s obzirom na sposobnost apsorpcije mikrovalnog zračenja. Otapala s visokim $\tan\delta$ (DMSO, etanol, metanol, nitrobenzen), srednjim $\tan\delta$ (DMF, voda, octena kiselina, CH_2Cl_2) i niskim $\tan\delta$ (toluen, heksan, aceton, acetonitril. Što je $\tan\delta$ veći, otapalo djelotvornije pretvara energiju mikrovalnog zračenja u toplinsku i brže se zgrijava. Otapala poput benzena, dioksana i CCl_4 su propusna na mikrovalno zračenje te ga ne apsorbiraju. Sama vrelišta otapala nisu bitna za korištenje u sintezi potpomognutoj mikrovalovima jer pod njihovim utjecajem, sva otapala se nakon nekoliko sekundi zagriju do temperature vrelišta.

2. OPĆI DIO

Materijali s visokom dielektričnom konstantom ne moraju nužno imati visok tangens gubitka jer se mogu koristiti aditivi te reaktanti i katalizatori koji povećavaju ukupna dielektrična svojstva smjese.

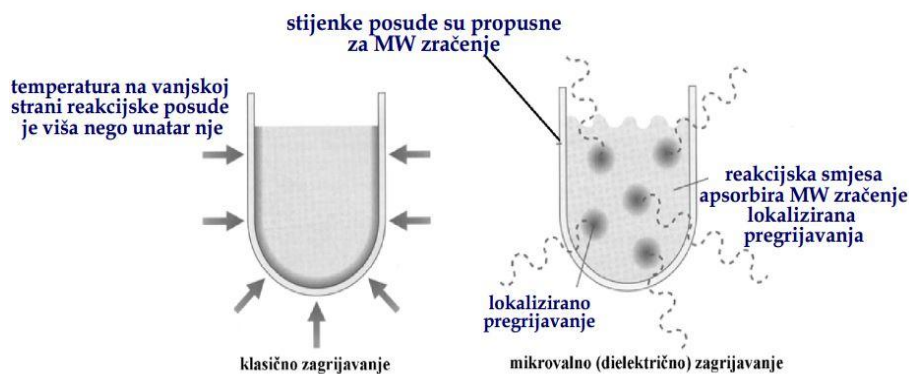
S obzirom na interakciju s mikrovalnim zračenjem, materijali se dijele u tri kategorije: konduktori, apsorpcijski materijali i izolatori. Konduktori su metali i oni reflektiraju mikrovalno zračenje (Slika 11. a). Apsorpcijski materijali i otapala (Slika 11 b) apsorbiraju mikrovalno zračenje dok izolatori (Slika 11. c) propuštaju mikrovalno zračenje bez interakcije.



Slika 11. Interakcija materijala s mikrovalnim zračenjem

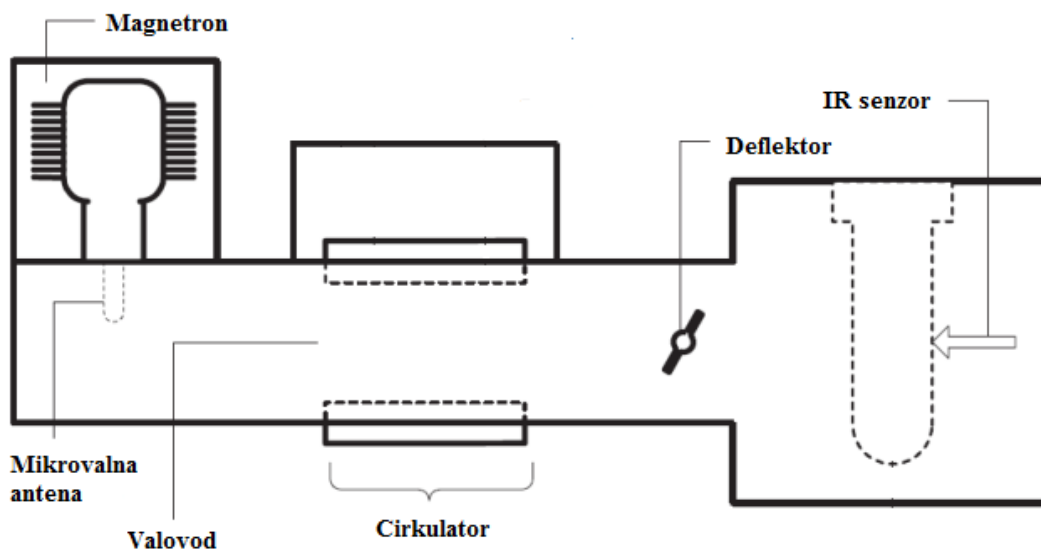
Mikrovalno zagrijavanje energetski je povoljnije od klasičnog zagrijavanja jer je izvor topline elektromagnetski val. Reakcijska smjesa direktno apsorpira energiju jer su stjenke propusne, dok se u klasičnom zagrijavanju posredno smjesa zagrijava pomoću vanjskog izvora topline. Maksimalna temperatura mikrovalnim zagrijavanjem nije ograničena vrelištem otapala već je moguće doseći daleko veće temperature. Mikrovalnim zagrijavanjem postiže se idealni temperaturni profil. Veliki nedostatak klasičnog zagrijavanja je činjenica da je temperatura viša na vanjskoj strani reakcijske posude dok kod dielektričnog zagrijavanja postoji opasnost od lokalnog pregrijavanja što je prikazano na slici 12.

2. OPĆI DIO



Slika 12. Razlika između klasičnog i mikrovalnog zagrijavanja

Mikrovalni sustav prikazan je na slici 13. Sastoji se od magnetrona koji je izvor konstantnog mikrovalnog zračenja. Valovod vodi mikrovalno zračenje od antene prema reakcijskoj posudi. Cirkulator je dio sustava koji štiti magnetron i cijeli instrument od reflektirajućeg mikrovalnog zračenja dok deflektor osigurava da se maksimalna snaga mikrovalnog zračenja pretvara u toplinu. U blizini reakcijske posude s uzorkom nalazi se IR senzor koji prati temperaturu.



Slika 13. Mikrovalni sustav

U sintetskoj kemiji mikrovalno zračenje omogućilo je provođenje reakcija koje nije moguće provesti konvencionalnim putem. Reakcijsko vrijeme je skraćeno, čistoća produkta je veća uz veća iskorištenja te je povećana reproducibilnost eksperimenata. Mikrovalna sinteza je aspekt zelene kemije te se često kombinira i s drugim zelenim metodama. Koncept zelene kemije nastoji zaštititi okoliš otkrićem novih kemijskih procesa i reakcija koje sprječavaju zgađenje. Odnosi se na sve aspekte kemije.

2. OPĆI DIO

Farmaceutska zelena kemija zasniva se na razvoju novih, učinkovitih i ekološki prihvatljivih sintetskih metoda. Disperzija opasnih i štetnih kemikalija te otpada u okoliš mora biti minimalna ili kompletno minimalizirana. Glavni principi zelene kemije su:

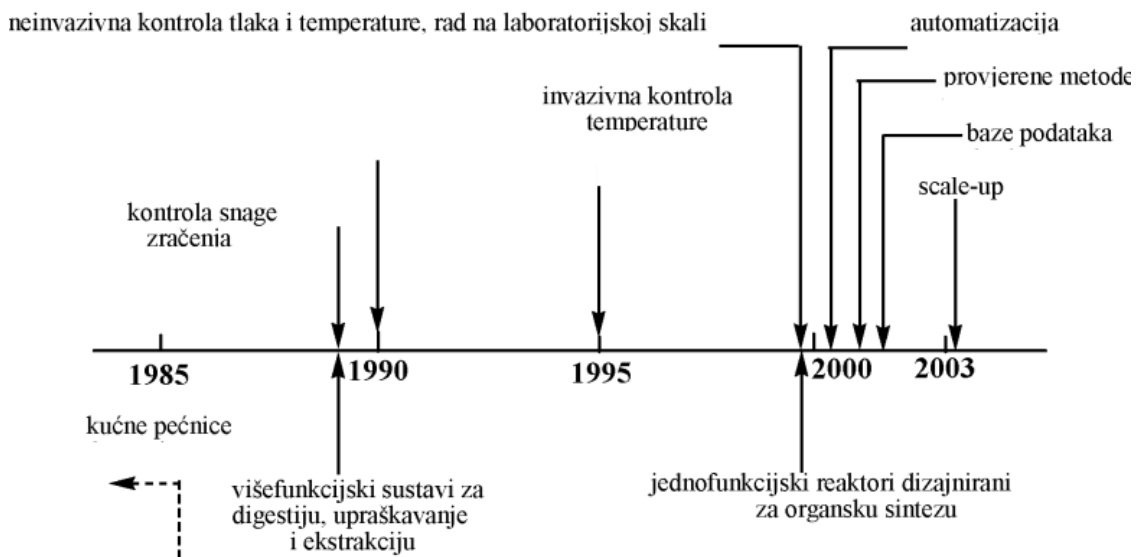
1. sprječavanje upotrebe lako isparljivih i toksičnih otapala
2. ponovna upotreba katalizatora i reagensa
3. korištenje benignih kemikalija, ekonomičnih sintetskih metoda s minimalnim brojem sintetskih koraka i nusprodukata
4. minimalna potrošnja materijala i energije uz maksimalnu učinkovitost
5. blagi reakcijski uvjeti
6. zamjena toksičnih otapala bio-otapalima, ionskim otopinama i superkritičnim fluidima
7. korištenje vode, zelenih otapala i provođenje reakcija bez prisutnosti otapala
8. metode moraju biti pogodne za scale up i industrijsku primjenu
9. sinteza potpomognuta mikrovalovima
10. sinteza u krutoj fazi ili bez prisutnosti otapala.

Osobitu važnost u sintezi potpomognutoj mikrovalovima zauzima voda. Kao otapalo u organskoj sintezi ima jedinstvenu reaktivnost i selektivnost zbog hidrofobnog efekta. Mikrovalno zračenje omogućava provođenje reakcija u vodenom mediju pri temperaturama višim od 100 °C u zatvorenim reakcijskim posudama. Zbog promjene u fizikalnim i kemijskim karakteristikama vode kod visokih tlakova i temperatura, voda postaje pseudoorgansko otapalo. Takvim korištenjem vode dolazi se do čistih produkata jer se pri hlađenju voda vraća svojim uobičajenim karakteristikama te su produkti ponovno netopljivi. Tangens gubitka vode može se znatno povećati dodatkom male količine anorganske soli koja će povećati apsorpciju mikrovalnog zračenja kondukcijskim mehanizmom. Osobita važnost vode kao otapala leži u činjenicama da je dostupna u velikim količinama, jeftina je, netoksična, nekorozivna, nezapaljiva i ima visok tlak para. Polarna je i dobro apsorbira mikrovalno zračenje što ubrzava kemijske reakcije. Nedostaci su što je većina organskih spojeva netopljiva u vodi, no to se rješava korištenjem mikrovalova prilikom čega voda poprima drugačije fizikalno-kemijske karakteristike i postaje pseudoorgansko otapalo.³²

Sinteza potpomognuta mikrovalovima u početku se provodila u kućnim mikrovalnim pećnicama. Prvi eksperimenti imali su brojne nedostatke poput niske reproducibilnosti rezultata, miješanja reakcijske smjese, mogućnosti eksplozije, velikih temperaturnih razlika unutar kućišta, nemogućnosti mjerenja temperature i zraka a osobit problem bio je

2. OPĆI DIO

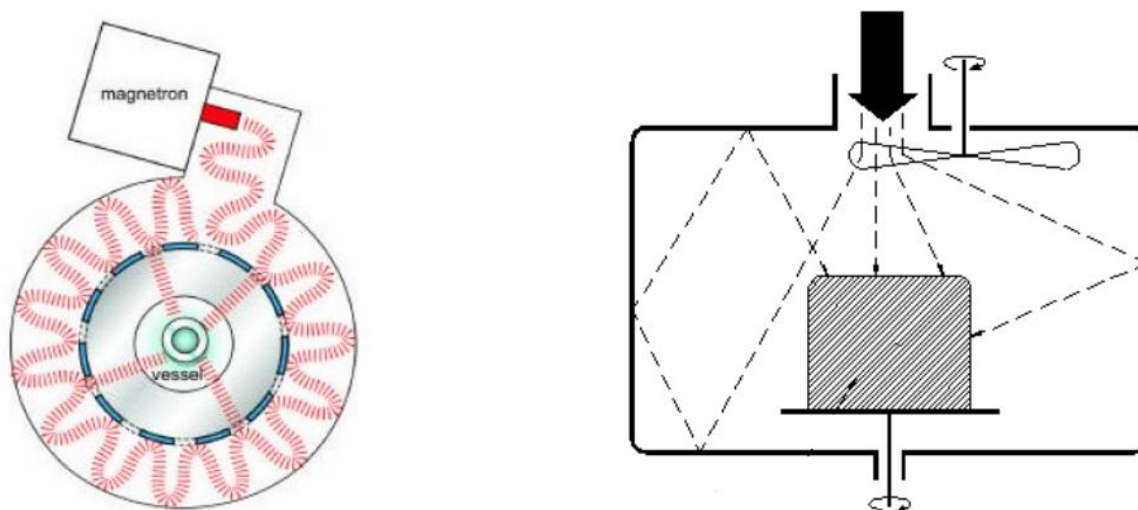
neravnomjerno zagrijavanje reakcijske smjese zbog povremenog isključivanja magnetrona. Ubrzo su znanstvenici počeli razvijati posebne mikrovalne reaktore koji se danas koriste u suvremenim laboratorijima. Na slici 14 prikazan je kronološki razvoj mikrovalnih reaktora.



Slika 14. Kronološki razvoj mikrovalnih reaktora

Jednofunkcijski mikrovalni reaktor ima malo kućište i koristi se za reakcije do maksimalnog volumena 50 mL. Sastoji se od kućišta u koje se stavlja jedna reakcijska posuda. Zračenje prolazi kroz dobro definiran valovod i usmjereno pada na reakcijsku posudu koja je smještena na točno određenoj udaljenosti od izvora mikrovalnog zračenja. Stvara se stalni valni profil mikrovalnog zračenja što znači da nastaje skup čvorova na kojima je intenzitet mikrovalne energije nula i skup čvorova gdje je magnituda mikrovalnog zračenja najviša i intenzitet energije maksimalan. Reakcijska posuda mora biti smještena na odgovarajućoj udaljenosti od magnetrona kako bi uzorak bio smješten na čvorovima s maksimalnom energijom mikrovalnog zračenja. Istovremeno se koristi samo jedna reakcijska posuda a scale-up je moguć korištenjem veće reakcijske posude. Jednofunkcijski mikrovalni reaktor dobar je izbor za reakcije kojima su poznati reakcijski uvjeti.

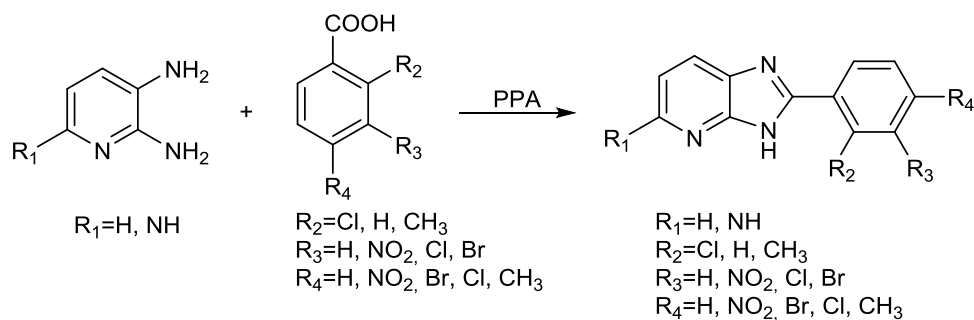
2. OPĆI DIO



Slika 15. Raspodjela mikrovalnog zračenja u jednofunkcijskom (a) i višefunkcijskom (b) mikrovalnom reaktoru

Višefunkcijski mikrovalni reaktor ima veliko kućište unutar kojeg je mikrovalno zračenje raspodijeljeno u svim smjerovima reflektiranjem na stijenke kućišta. Homogena raspodjela elektromagnetskog polja postiže se rotacijom reakcijskih posuda. Za razliku od jednofunkcijskog reaktora, ne dolazi do stvaranja stalnog valnog profila niti potpune kontrole temperature. Razlika između raspodjele mikrovalnog zračenja u jednofunkcijskom i višefunkcijskom reaktoru prikazana na je na slici 15. Višefunkcijski mikrovalni reaktori koriste se za veće količine, do nekoliko litara te su pogodni za scale-up i paralelnu sintezu.

Klasična sinteza 2-aril-imidazo[4,5-*b*] i [4,5-*c*]piridina je reakcija 2,3- ili 3,4-diaminopiridina s aromatskim karboksilnim kiselinama u prisutnosti polifosforne kiseline. Različiti derivati pripremljeni su sličnim metodama ciklizacije diaminopiridina uz trietil-ortoformat, ureu, tioureu i *N*-okside prema shemi 6. Temperaturni raspon kreće se od 170 – 200 °C a vrijeme trajanja reakcije od 30 minuta do 4 sata.³³



Shema 6. Konvencionalna sinteza derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

2. OPĆI DIO

Organska otapala, kao i mnogi organski spojevi često su vrlo toksični, otrovni, korozivni i kancerogeni te je jedan od glavnih ciljeva organske kemije ekološki prihvatljiva sinteza. Derivati benzimidazola i imidazo[4,5-*b*]piridina zbog izražene biološke aktivnosti vrlo su aktualna tema istraživanja medicinskih kemičara.³⁴ Sinteze potpomognute mikrovalnim zračenjem imaju veliki doprinos u razvoju organske sinteze.³⁵ Principi zelene kemije zalažu se za korištenje reakcija bez otapala, a osobito puno pozornosti privlači kombinacija dvije zelene metode: mikrovalno zračenje i reakcija bez otapala.³⁶ Reakcije bez otapala obično se provode na internom nosaču, primjerice zeolitu.³⁷ N. Montazeri i suradnici³⁸ primjenom mikrovalnog zračenja opisali su sintezu derivata benzimidazola i imidazo[4,5-*b*]piridina ciklokondenzacijom 1,2-diamino aromatskih spojeva kataliziranu s $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ u uvjetima bez otapala prema shemi 7. Sulfatna kiselina prethodno je adsorbirana na silika gel i koristi se kao čvrsti nosač katalizatora.



*Shema 7. Sinteza derivata benzimidazola i imidazo[4,5-*b*]piridina potpomognuta mikrovalovima*

Pokušaji reakcije 1,2-diaminoaromata s orto esterom u odsutnosti katalizatora ili miješanjem katalizatora s reaktantima bez izlaganja mikrovalnom zračenju nisu bili uspješni. Ista reakcija podvrgnuta je mikrovalnom zračenju uz pomoć $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$. Ciljani produkti dobiveni su kroz nekoliko minuta. Prednosti ove metode su što se katalizator može vrlo jednostavno pripremiti sa silikagelom za kromatografiju i sumpornom kiselinom otopljenom u aceton. Tako pripremljen katalizator može se skladištiti u eksikatoru dulji vremenski period bez gubitka aktivnosti. Razvijena metoda može poslužiti kao ogledni primjer zelene kemije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker AV600 i Bruker AV600. ^1H NMR spektri snimani su pri 300 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 SMP11 Bibby i Büchi 535 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.

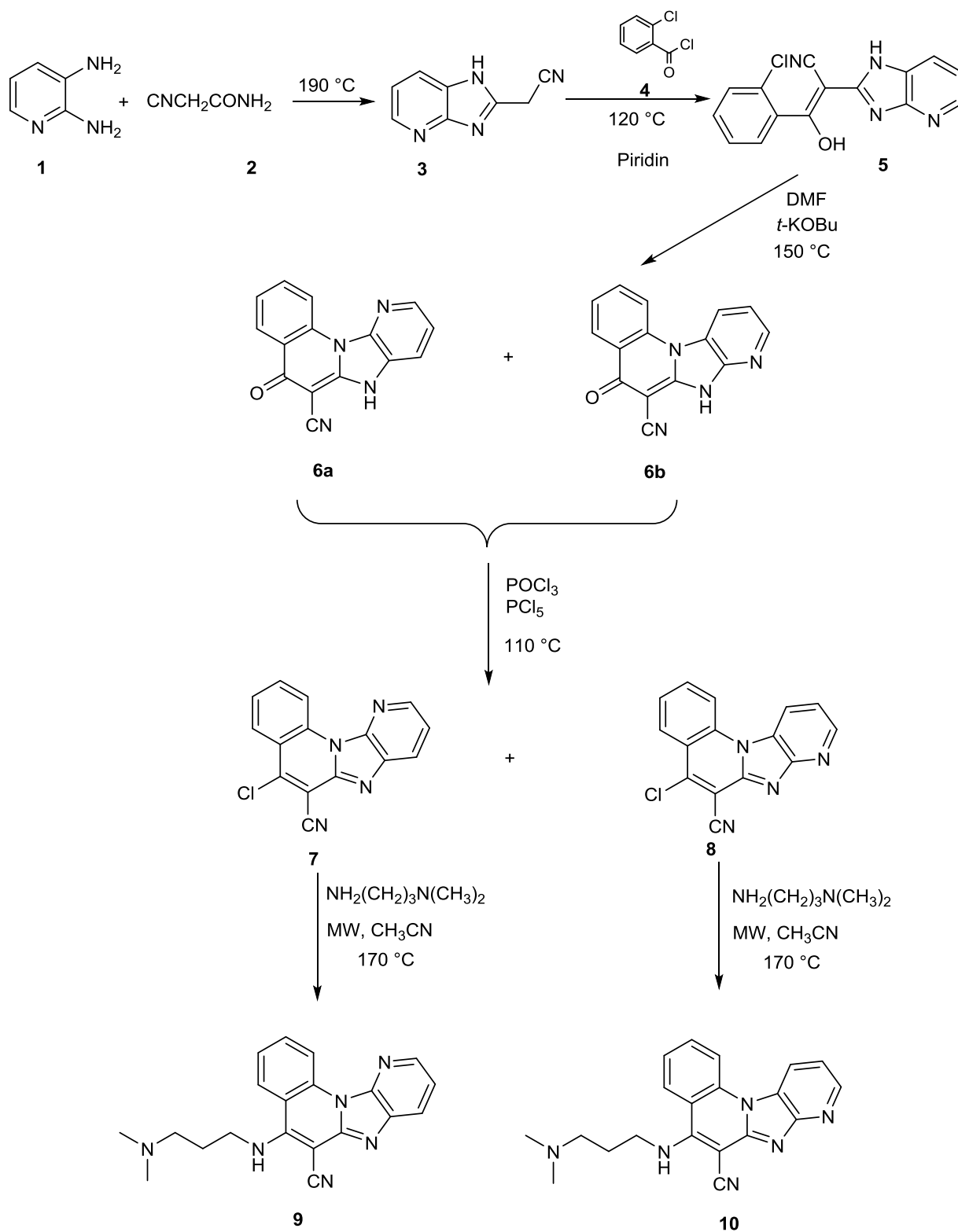
Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u Milestone Start Synth mikrovalnom reaktoru u kvarcnim posudama (40 bar).

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



Slika 16. Mikrovalni reaktor

3. 2. Priprava amino supstituuiranih tetracikličkih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina



Shema 8. Priprava amino supstituuiranih tetracikličkih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.2.1. Priprava 2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **3**

U okruglu tikvicu stavi se 3,000 g (27,00 mmol) 2,4-diaminopiridina **1** i 2,510 g (30,00 mmol) 2-cijanoacetamida **2**, dobro se promiješa i zagrijava u uljnoj kupelji pri 190 °C 20 minuta. Smjesa se prekrystalizira iz 130 ml 50% etanola, kratko prokuha s aktivnim ugljenom i upari na mali volumen. Nastali talog se profiltrira. Dobiveno je 1,422 g (33%) svijetlo smeđeg praškastog produkta. T.t. 262 - 266 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 13,06$ (šs, 1H, H_{benzimidazol}), 8,34 (s, 1H, H_{arom}), 8,00 (s, 1H, H_{arom}), 7,25 (dd, 1H, $J_1 = 8,02$ Hz, $J_2 = 4,79$ Hz, H_{arom}), 4,45 (s, 2H, CH₂).

3. 2. 2. Priprava (Z)-3-(2-klorfenil)-3-hidroksi-2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **5**

Reakcijska smjesa 1,000 g (6,32 mmol) 2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **3**, 7 ml piridina i 0,80 ml 2-klorbenzoil-klorida **4** refluksira se 1,5 h. Po završetku reakcije smjesi se doda 50 ml vode, a nastali talog se profiltrira. Dobiveno je 1,24 g (66%) narančastog praškastog produkta. T.t. >300 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 13,51$ (šs, 1H, OH), 13,29 (šs, 1H, H_{benzimidazol}), 8,28 (dd, 1H, $J_1 = 5,22$ Hz, $J_2 = 1,23$ Hz, H_{arom}), 7,97 (dd, 1H, $J_1 = 7,88$ Hz, $J_2 = 1,16$ Hz, H_{arom}), 7,52 (dd, $J_1 = 7,68$ Hz, $J_2 = 2,01$ Hz, H_{arom}), 7,48 – 7,40 (m, 3H, H_{arom}), 7,32 (dd, 1H, $J_1 = 7,91$ Hz, $J_2 = 5,27$ Hz, H_{arom}); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) $\delta = 195,04, 186,51, 154,01, 149,16, 140,93, 130,82, 129,93, 129,89, 128,85, 127,53, 121,15, 120,01, 118,59, 64,48$.

3. 2. 3. Priprava 5-okso-5,7-dihidropirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **6a** i 5-okso-5,7-dihidropirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **6b**

Reakcijska smjesa 1,190 g (4,01 mmol) 3-(2-klorfenil)-3-hidroksi-2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **5**, 1,125 g *t*-KOBu i 14 ml DMFa refluksira se 2 h. Po završetku reakcije smjesa se upari pod sniženim tlakom do suhog i doda se 50 ml vode. Nastali talog se profiltrira. Dobiveno je 0,759 g (73%) svijetlo smeđeg praškastog produkta koji se sastoji od smjese regioizomera u omjeru **6a:6b** = 1:5. T.t. >300 °C.

6a: ¹H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 9,64$ (d, 1H, $J = 8,01$ Hz, H_{arom}), 8,37 (dd, 1H, $J_1 = 4,67$ Hz, $J_2 = 1,16$ Hz, H_{arom}), 8,33-8,28 (m, 1H, H_{arom}), 7,90 (dd, 1H, $J_1 = 6,08$ Hz, $J_2 = 1,37$ Hz, H_{arom}), 7,77 (d, 1H, $J = 1,17$ Hz, H_{arom}), 7,57-7,55 (m, 1H, H_{arom}), 7,45 (dd, 1H, $J_1 = 7,92$ Hz, $J_2 = 5,19$ Hz, H_{arom});

3. EKSPERIMENTALNI DIO

6b: ^1H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 8,82$ (d, 1H, $J = 8,04$ Hz, H_{arom}), $8,49$ (d, 1H, $J = 8,37$ Hz, H_{arom}), $8,31$ (m, 2H, H_{arom}), $7,85$ (td, 1H, $J_1 = 7,70$, $J_2 = 1,50$ Hz, H_{arom}), $7,55$ (t, 1H, $J = 7,49$ Hz, H_{arom}), $7,31$ (dd, 1H, $J_1 = 8,13$ Hz, $J_2 = 5,43$ Hz, H_{arom}).

3. 2. 4. Priprava 5-klorpirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **7** i

5-klorpirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **8**

Reakcijska smjesa 0,500 g (1,92 mmol) 5-okso-5,7-dihidropirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **6a** i 5-okso-5,7-dihidropirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **6b**, 0,214 g PCl_5 i 11 ml POCl_3 refluksira se 1,5 h pri 110°C . Po završetku reakcije smjesa se upari pod sniženim tlakom do suhog, doda se mala količina vode te se nastali talog profiltrira. Dobiveno je 0,373 g (78%) žutog praškastog produkta u obliku smjese regioizomera u omjeru **7:8** = 1:5 koji su odvojeni kolonskom kromatografijom na silikagelu uz $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ kao eluens.

7: 0,027 g T.t. $>300^\circ\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 9,94$ (d, 1H, $J = 8,34$ Hz, H_{arom}), $8,74$ (d, 1H, $J = 4,23$ Hz, H_{arom}), $8,49$ (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, H_{arom}), $8,40$ (d, 1H, $J = 8,49$ Hz, H_{arom}), $8,18$ (t, 1H, $J = 7,13$ Hz, H_{arom}), $7,82$ (t, 1H, $J = 7,91$ Hz, H_{arom}), $7,72$ (t, 1H, $J = 6,37$ Hz, H_{arom}).

8: 0,249 g T.t. $>300^\circ\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 9,17$ (dd, 1H, $J_1 = 8,48$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, H_{arom}), $8,86$ (d, 1H, $J = 8,49$ Hz, H_{arom}), $8,79$ (dd, 1H, $J_1 = 4,67$ Hz, $J_2 = 1,22$ Hz, H_{arom}), $8,40$ (dd, 1H, $J_1 = 8,19$, $J_2 = 1,26$ Hz, H_{arom}), $8,10$ (td, 1H, $J_1 = 7,89$ Hz, $J_2 = 1,32$ Hz, H_{arom}), $7,80$ (t, 1H, $J = 7,71$ Hz, H_{arom}), $7,60$ (dd, 1H, $J_1 = 8,43$ Hz, $J_2 = 4,68$ Hz, H_{arom}).

3. 2. 5. Priprava 5-[(3-(dimetilamino)propil)amino]pirido[3',2':4,5]imidazo

[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **9**

Spoj **9** priređen je sintezom potpomognutom mikrovalovima korištenjem MW zračenja snage 800 W i temperature 170°C iz 0,070 g (0,20 mmol) 5-klorpirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **7** u 10 ml acetonitrila i 0,16 ml (1,00 mmol) *N,N*-dimetilaminopropil-1-amina. Nakon 4 h mikrovalnog zračenja, ohlađena reakcijska smjesa se profiltrira pri čemu je dobiveno 0,047 g (69%) žutog praškastog produkta. T.t. $211 - 213^\circ\text{C}$.

^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta = 9,69$ (dd, 1H, $J_1 = 8,40$ Hz, $J_2 = 0,84$ Hz, H_{arom}), $8,74$ (šs, 1H, NH_{amin}), $8,33$ (dd, 1H, $J_1 = 4,74$ Hz, $J_2 = 1,44$ Hz, H_{arom}), $8,13$ (d, 1H, $J = 7,92$ Hz, H_{arom}), $8,05$ (dd, 1H, $J_1 = 8,01$ Hz, $J_2 = 1,41$ Hz, H_{arom}), $7,85$ (td, 1H, $J_1 = 8,19$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz,

3. EKSPERIMENTALNI DIO

H_{arom}), 7,52 (td, 1H, $J_1 = 8,19$ Hz, $J_2 = 0,99$ Hz, H_{arom}), 7,41 (dd, 1H, $J_1 = 7,95$ Hz, $J_2 = 4,77$ Hz, H_{arom}), 3,92 (s, 2H, CH_2), 2,43 (t, 2H, $J = 6,45$ Hz, CH_2), 2,21 (s, 6H, CH_3), 1,89 (dd, 2H, $J_1 = 13,34$ Hz, $J_2 = 6,66$ Hz, CH_2).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) $\delta = 151,48, 149,88, 146,59, 141,10, 137,49, 134,94, 133,11, 125,61, 125,38, 123,92, 120,22, 117,89, 117,65, 116,81, 71,72, 57,47, 55,25, 45,52, 44,38, 26,76$.

3. 2. 6. Priprava 5-[(3-(dimetilamino)propil)amino]pirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **10**

Spoj **10** priređen je sintezom potpomognutom mikrovalovima korištenjem MW zračenja snage 800 W i temperature 170 °C iz 0,070 g (0,20 mmol) 5-klorpirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **8** u 10 ml acetonitrila i 0,16 ml (1,00 mmol) *N,N*-dimetilaminopropil-1-amina. Nakon 4 h mikrovalnog zračenja, ohlađena reakcijska smjesa se profiltrira pri čemu je dobiveno 0,056 g (82%) žutog praškastog produkta. T.t. 253 - 255 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta = 8,72$ (dd, 1H, $J_1 = 8,25$ Hz, $J_2 = 1,35$ Hz, H_{arom}), 8,70 (šs, 1H, NH_{amin}), 8,54 (d, 1H, $J = 8,16$ Hz, H_{arom}), 8,50 (dd, 1H, $J_1 = 4,77$ Hz, $J_2 = 1,23$ Hz, H_{arom}), 8,25 (dd, 1H, $J_1 = 4,14$ Hz, $J_2 = 0,74$ Hz, H_{arom}), 7,89 (td, 1H, $J_1 = 8,82$ Hz, $J_2 = 1,05$ Hz, H_{arom}), 7,59 (t, 1H, $J = 7,68$ Hz, H_{arom}), 7,29 (dd, 1H, $J_1 = 8,19$ Hz, $J_2 = 4,77$ Hz, H_{arom}), 3,98 (t, 2H, $J = 6,87$ Hz, CH_2), 2,47 (t, 2H, $J = 6,48$ Hz, CH_2), 2,24 (s, 6H, CH_3), 1,97-1,93 (m, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) $\delta = 157,13, 151,62, 151,07, 145,58, 135,14, 133,61, 125,37, 124,55, 123,77, 121,51, 117,85, 116,94, 116,91, 116,55, 71,37, 57,36, 45,56, 44,27, 40,83, 40,56, 40,28, 40,00, 39,72, 39,44, 39,16, 26,65$.

3.3. Ispitivanje interakcija nekih priređenih derivata s DNK/RNK

3.3.1. Supstrati

Nukleotidi čistoće veće od 99 % kupljeni su od Aldricha-a te su korišteni bez daljnjeg čišćenja na način da su otopljeni u BPE puferu (pH 7) u koncentraciji reda veličine 10^{-2} mol dm^{-3} . Otopljeni su 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, $\varepsilon = 6600$
- poli G-poli C na 260 nm, $\varepsilon = 6000$

3.3.2. Spektroskopske metode

Kod fluorescencijskih titracija praćene su promjene intenziteta fluorescencije ispitivanog spoja na valnim duljinama ($\lambda_{\text{em.}} = 380\text{--}750$ nm) gdje niti jedan sastojak u otopini nema UV/Vis spektar te su korištene valne duljine pobude kod kojih *ct*-DNK i pG-pC nemaju UV/Vis spektar ($\lambda_{\text{eksc.}} > 320$ nm). Ukoliko je bilo potrebno, fluorescencijski spektri korigirani su za baznu liniju pufera.

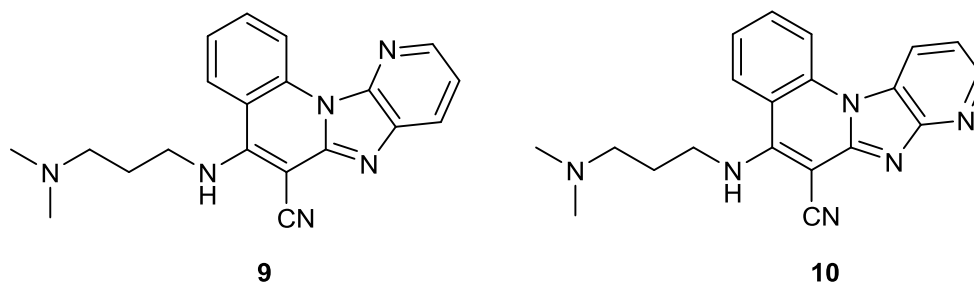
3.3.3. Izvedba titracija

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.

4. RASPRAVA I REZULTATI

4.1. Cilj rada

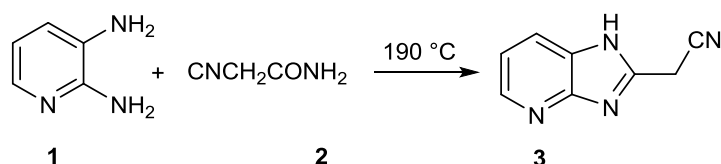
Osnovni cilj ovog rada bila je sinteza i izolacija dva ciklička derivata imidazo[4,5-*b*]piridina, regioizomera 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **9** i 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **10**. Struktura odvojenih regioizomera potvrđena je korištenjem jednodimenzijske i dvodimenzijske NMR spektroskopije. Provedena je i njihova spektroskopska karakterizacija korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije matičnih otopina regioizomera **9** i **10** u 11 otapala prema rastućoj polarnosti: toluen, eter, dioksan, etil-acetat, diklormetan, aceton, dimetilsulfoksid, acetonitril, etanol, metanol i voda. pH titracije provedene su u svrhu utvrđivanja potencijalne primjene priređenih regioizomera kao senzora za detekciju pH. Kako bi se utvrdila potencijalna mogućnost primjene nekih od priređenih regioizomera kao fluorescentnih proba za obilježavanje biomakromolekula DNK/RNK, ispitana je njihova interakcija s polinukleotidima *ct*-DNK i poliC-poliG (RNK) korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.



Slika 167. Strukture priređenih spojeva

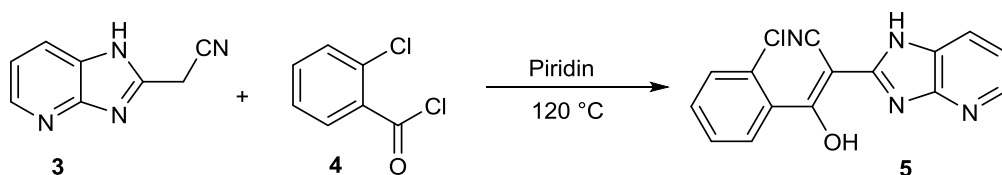
4.2 Sinteza priređenih spojeva

Glavni prekursor za sintezu ciljanih spojeva, 2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitril **3**, sintetiziran je iz 2,4-diaminopiridina **1** i 2-cijanoacetamida **2**. Njihovom kondenzacijom dolazi do ciklizacije u imidazo[4,5-*b*]piridinski prsten. Reakcija se provodi bez otapala prema shemi 9, a produkt je izoliran u iskorištenju od 33%.



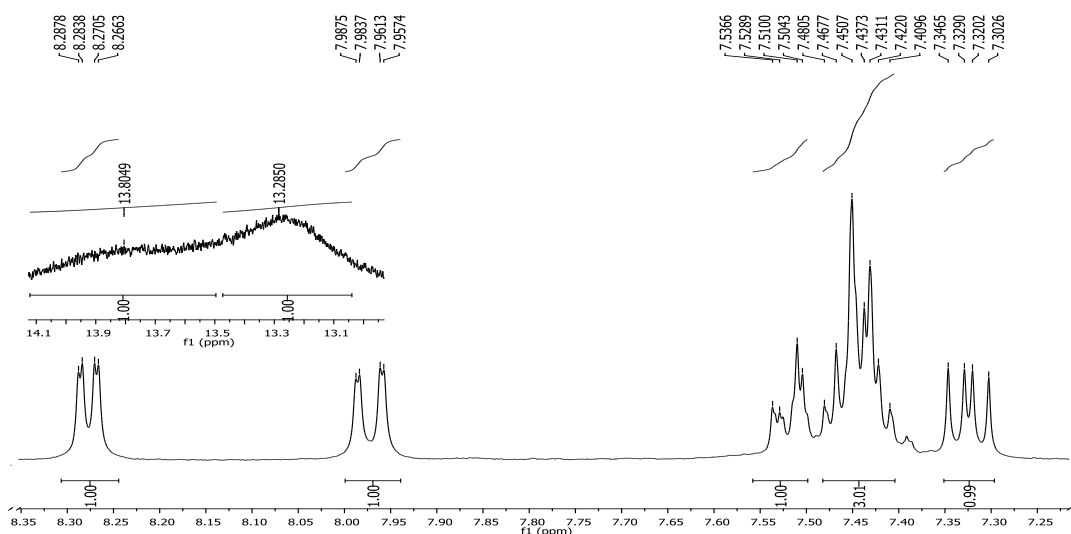
Shema 9.

Aciklički prekursor (Z)-3-(2-klorfenil)-3-hidroksi-2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitril **5** priređen je kondenzacijom 2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **3** s 2-klorbenzoil-kloridom u iskorištenju od 66%.^{39, 40}



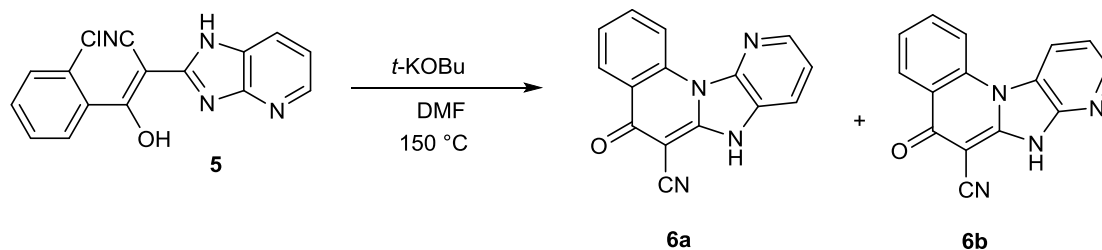
Shema 10.

Struktura priređenog spoja potvrđena je ¹H NMR spektroskopijom. Na slici 18 uočljiv je odgovarajući broj signala u aromatskom dijelu spektra te dva signala protona OH i NH skupine.

Slika 18. ¹H NMR spektar spoja **5**

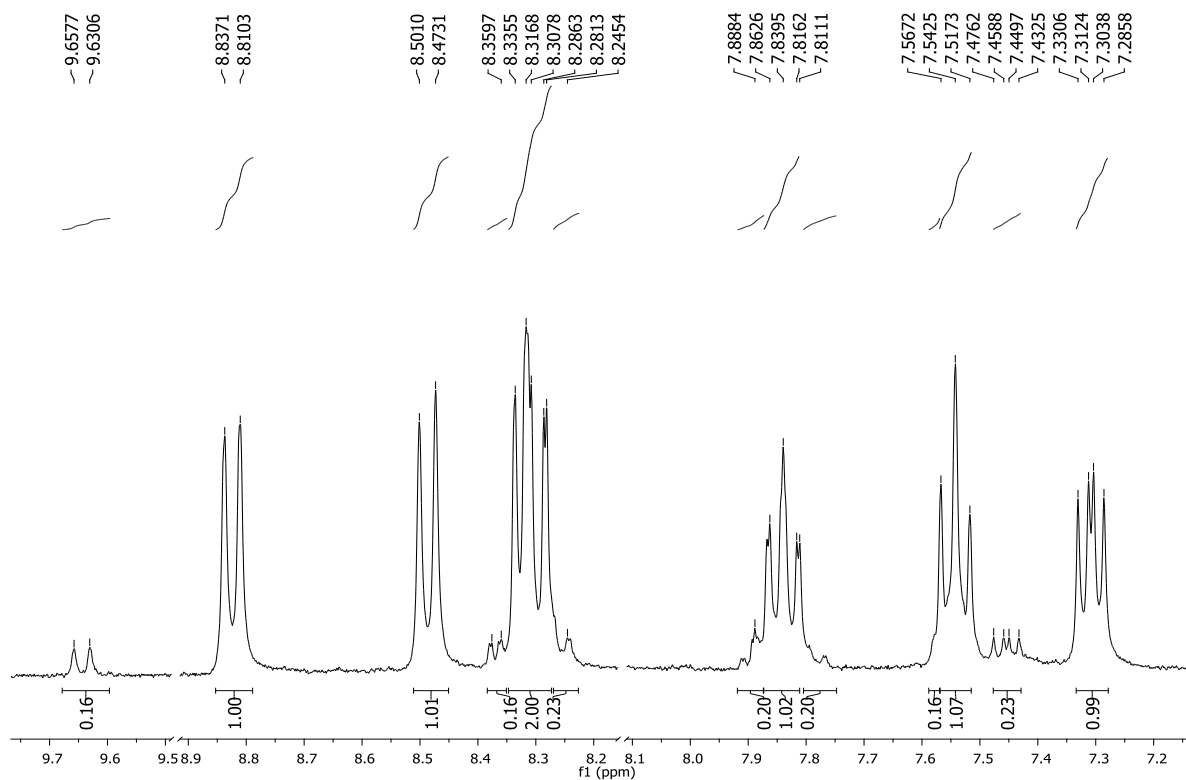
4. RASPRAVA I REZULTATI

Termičkom ciklizacijom acikličkog prekursora u DMF-u u prisutnosti *t*-KOBu priređena je smjesa regioizomera 5-okso-5,7-dihidropirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **6a** i 5-okso-5,7-dihidropirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **6b** koja nije razdvajana u ovom stupnju.



Shema 11.

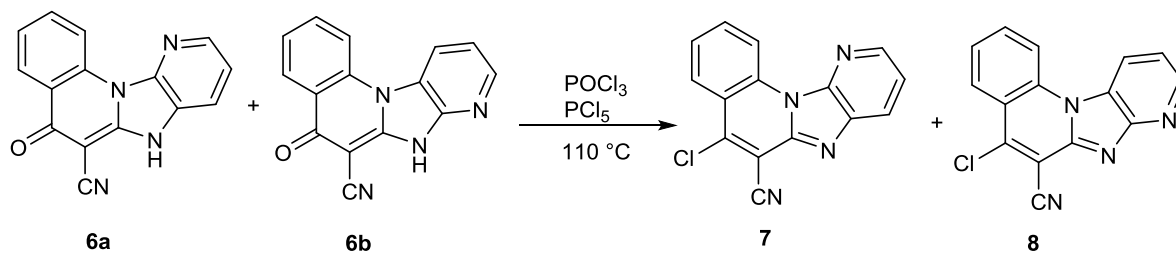
Iz ^1H NMR spektra smjese prikazanom na slici 19 vidljivo je da regioizomeri ne nastaju u jednakim količinama već u omjeru 1:5. Uočljiv je značajan utjecaj promjene položaja piridinskog dušika na pomake signala u NMR spektrima.



Slika 19. ^1H NMR spektar smjese produkata **6a** i **6b**

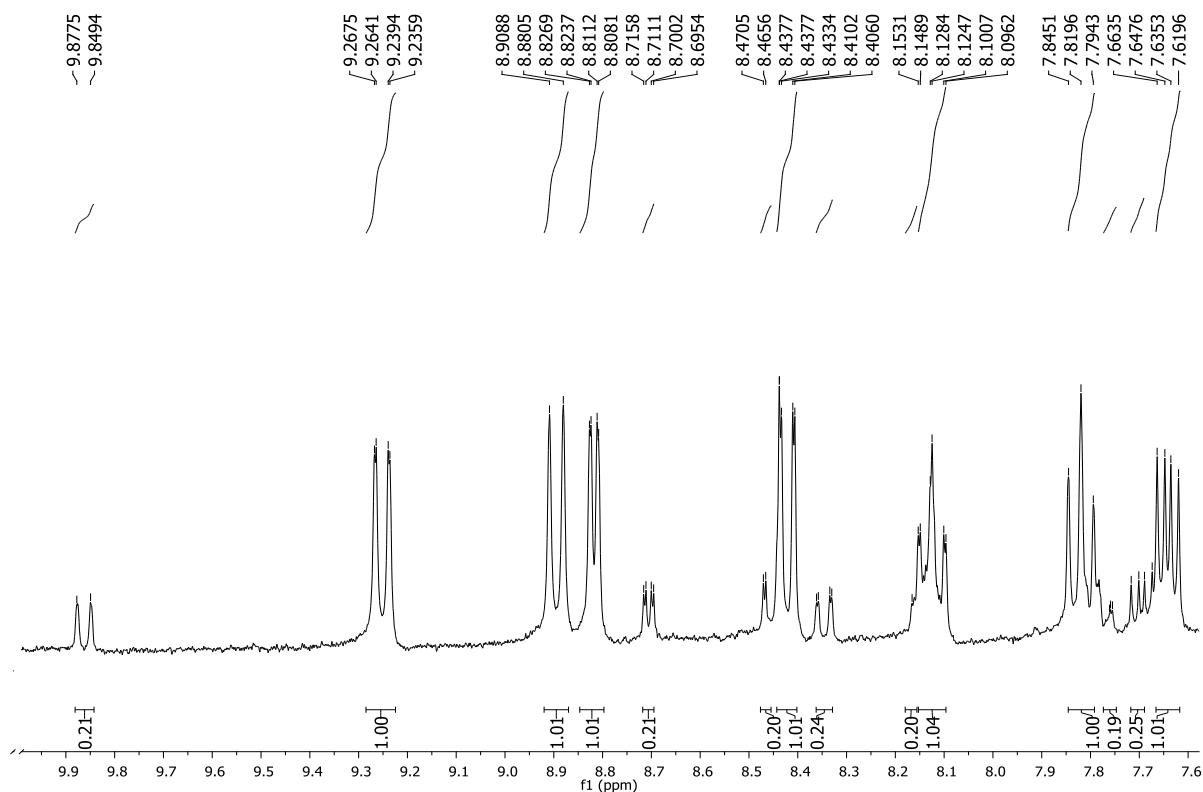
4. RASPRAVA I REZULTATI

Zagrijavanjem smjese s POCl_3 i PCl_5 dobivena je smjesa regioizomera 5-klorpirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **7** i 5-klorpirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **8** prema shemi 12 u iskorištenju 48%.



Shema 12.

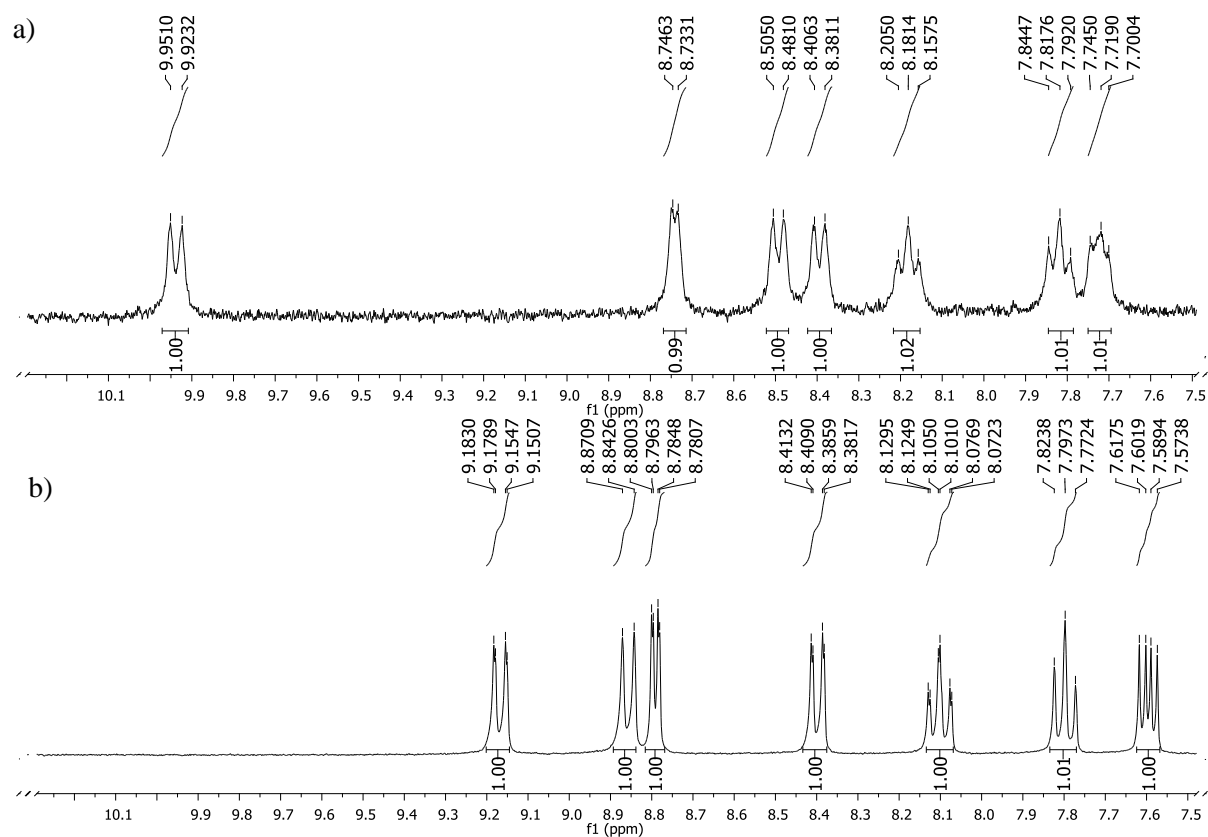
^1H NMR spektar smjese na slici 20 pokazuje odgovarajući broj signala aromatskih protona oba regioizomera, u omjeru **7:8** = 1:5.



Slika 20. ^1H NMR spektar smjese produkata **7** i **8**

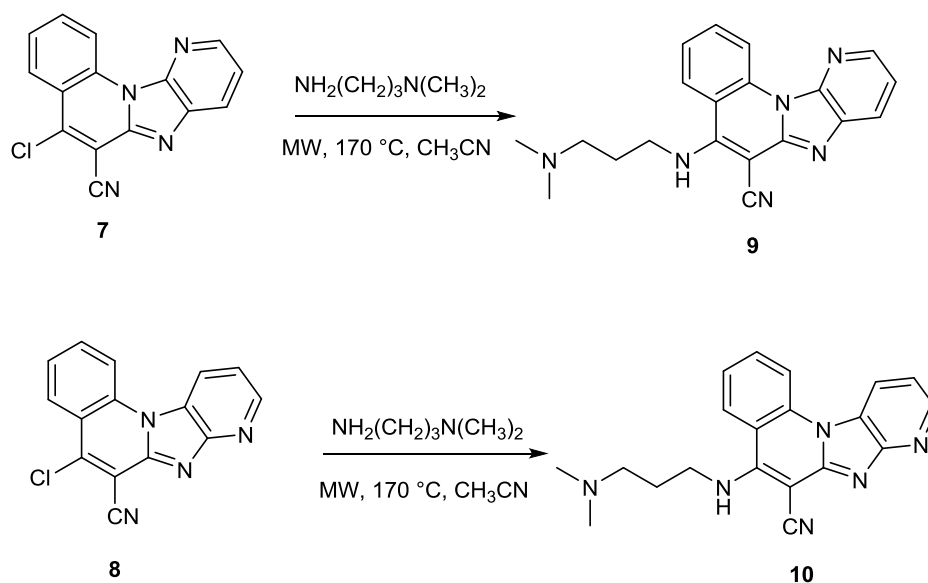
Smjesa regioizomera uspješno je odvojena kolonskom kromatografijom na silikagelu uz $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ kao eluens te su dobivena dva regioizomera **7** i **8**. Na slici 21 prikazana je usporedba ^1H NMR spektara spojeva **9** i **10** na kojima se uočava isti broj signala aromatskih protona no različit kemijski pomak.

4. RASPRAVA I REZULTATI



Slika 21. ^1H NMR spektar spoja **9** (a) i **10** (b)

Nekataliziranom reakcijom aminiranja potpomognutog mikrovalovima u acetonitrilu uz dodatak suviška *N,N*-dimetilaminopropil-1-amina iz derivata **7** i **8** priređeni su 5-amino supstituirani derivati prema shemi 13.⁴¹

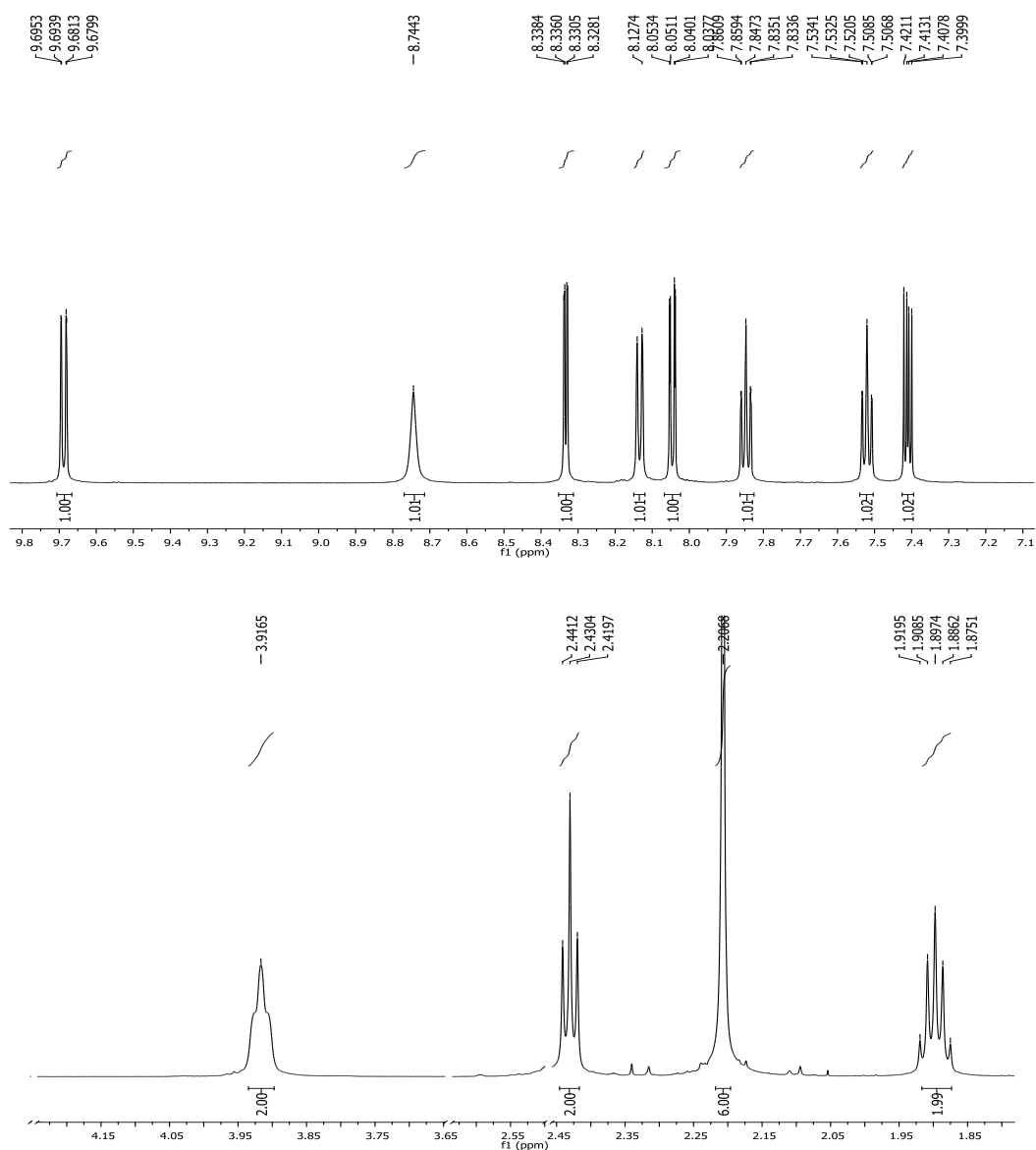


Shema 13.

4. RASPRAVA I REZULTATI

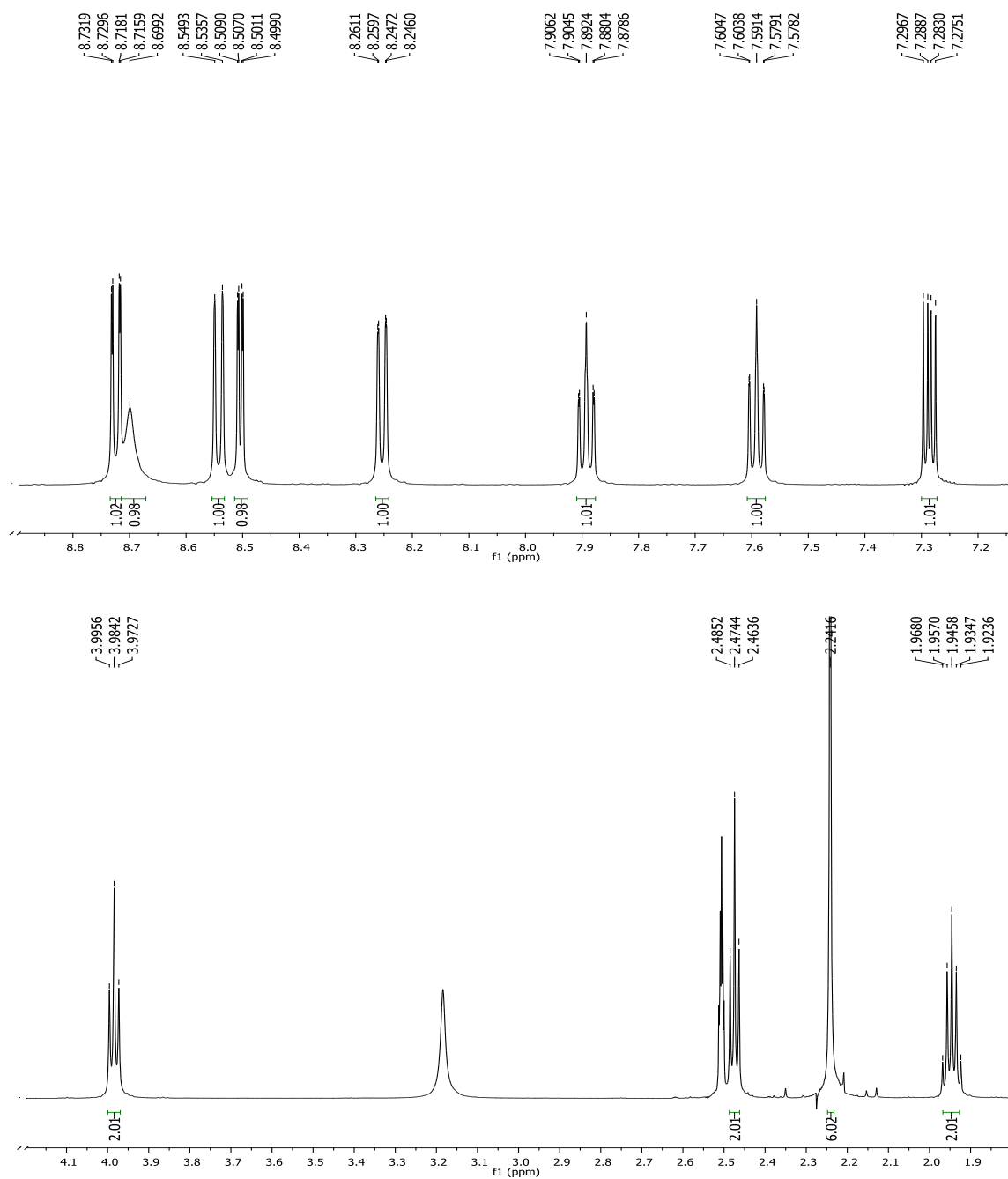
Spojevi **9** i **10** priređeni su sintezom potpomognutom mikrovalovima korištenjem MW zračenja snage 800 W i temperature 170 °C, iz spojeva **7** ili **8** u 10 ml acetonitrila i uz suvišak *N,N*-dimetilaminopropil-1-amina. Produkti su dobiveni u dobrim iskorištenjima od 69% za spoj **9** i 82% za spoj **10**.

Na slikama 22 i 23 prikazani su ^1H NMR spektri spojeva **9** i **10**. Osim signala u aromatskom dijelu spektra, u alifatskom dijelu spektra pojavljuju se signali lanca supstituiranog amina. Na oba spektra uočljiv je signal oko 2,20 ppm za 6 protona dvije metilne i tri signala s odgovarajućim kemijskim pomacima za protone metilenske skupine.



Slika 22. a) Aromatski dio ^1H NMR spektra spoja **9**, b) alifatski dio ^1H NMR spektra spoja **9**

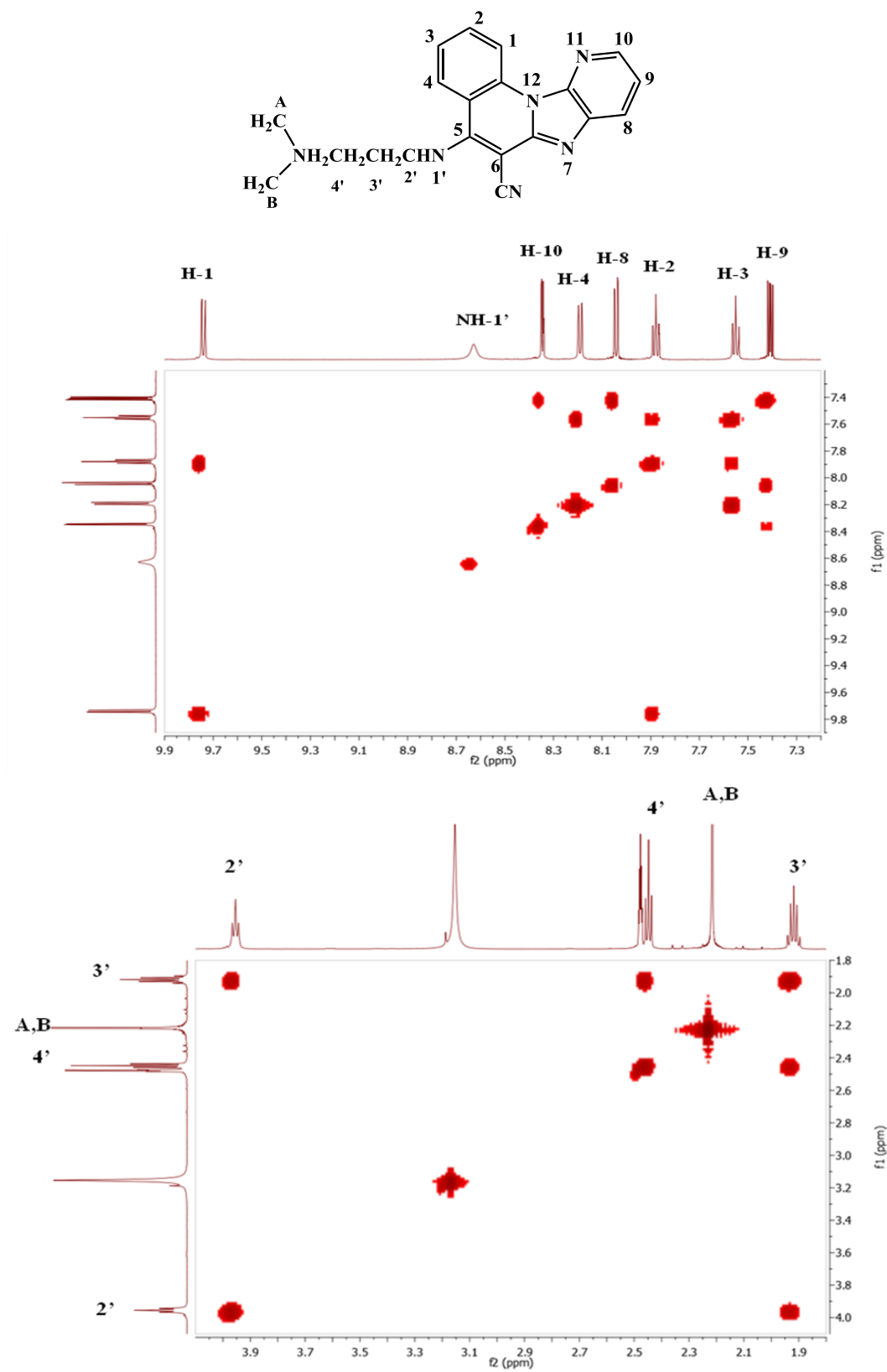
4. RASPRAVA I REZULTATI



Slika 23. a) Aromatski dio ^1H NMR spektra spoja **10**, b) alifatski dio ^1H NMR spektra spoja **10**

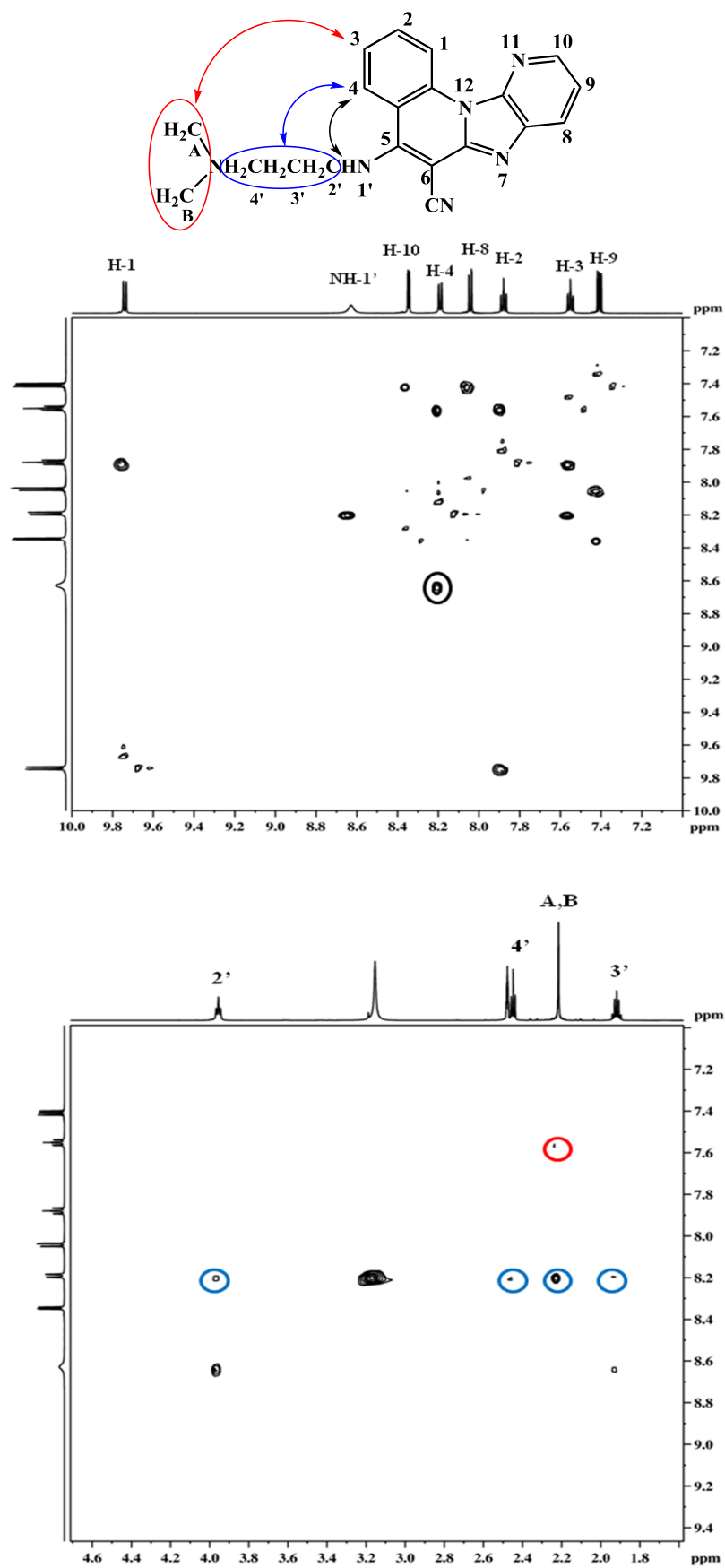
Strukture regioizomera **9** i **10** dodatno su potvrđene 2D NMR spektroskopijom. Na slici 24 prikazan je COSY spektar regioizomera **9**, a na slici 25 NOESY spektar regioizomera **9**.

4. RASPRAVA I REZULTATI



Slika 24. COSY spektar regioizomera **9**

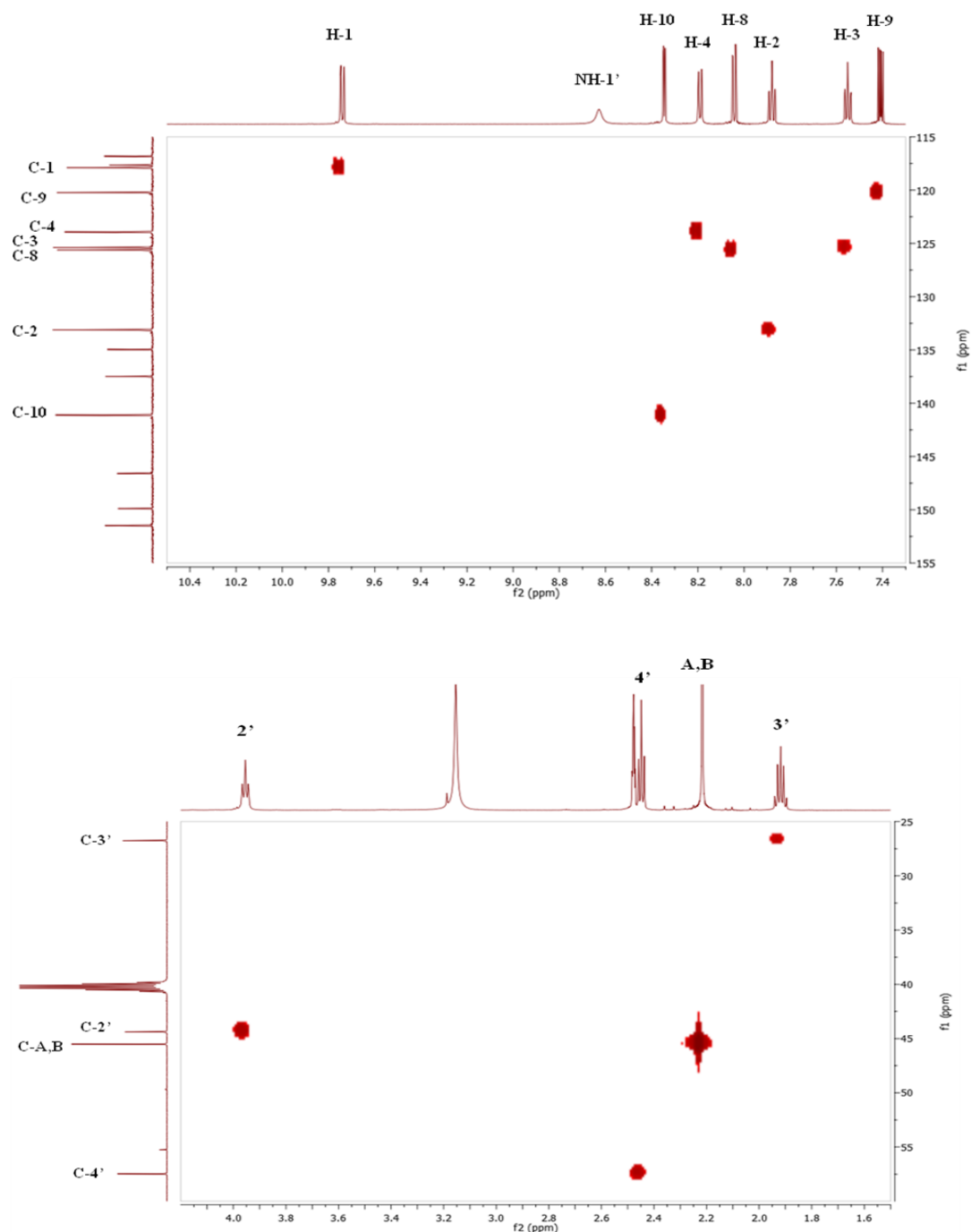
4. RASPRAVA I REZULTATI



Slika 25. NOESY spektar regioizimera **9**

4. RASPRAVA I REZULTATI

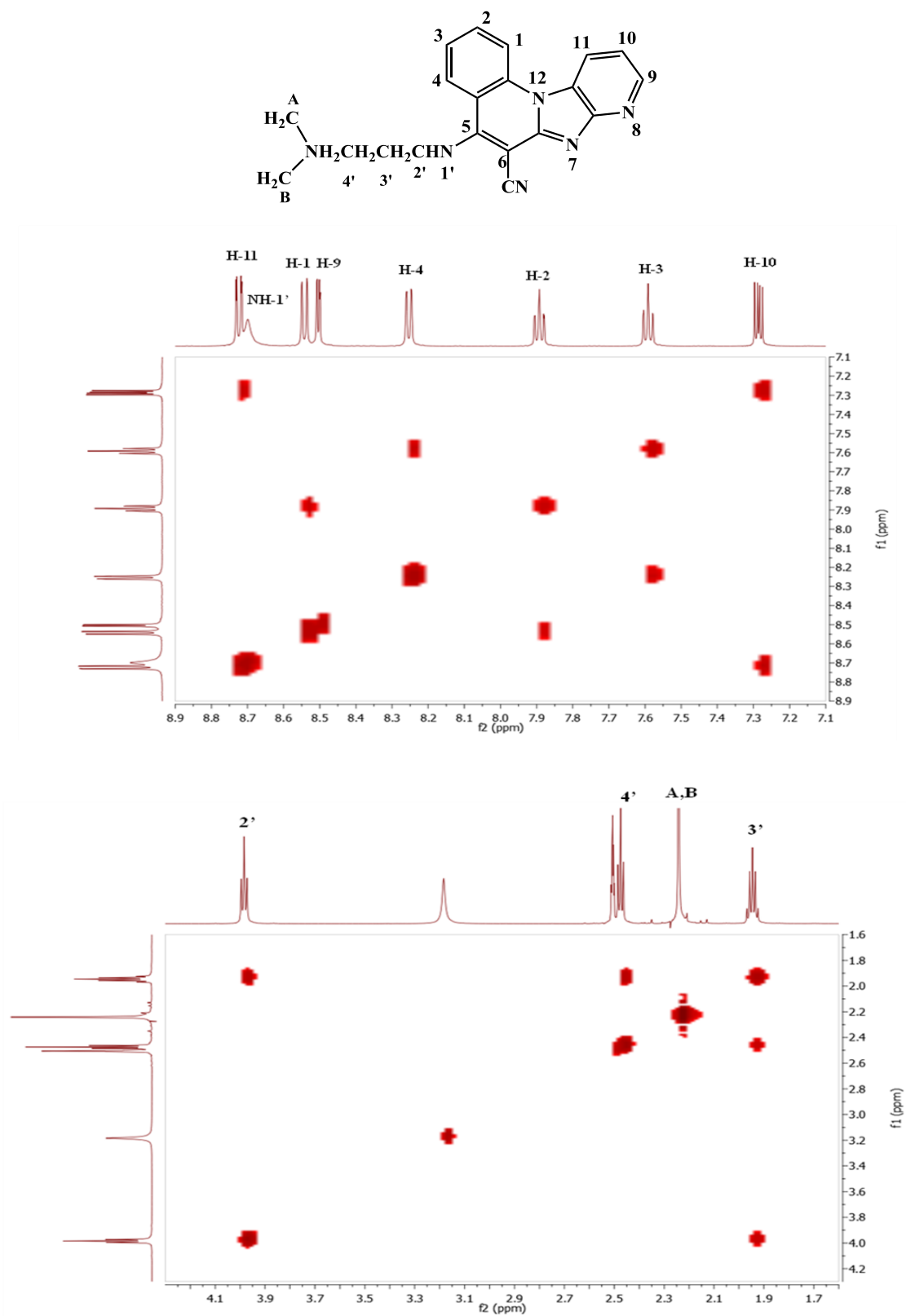
U spektru se mogu uočiti NOE interakcije između dušikovog protona H-1' aaminskog supstituenta i H-4 protona aromatske jezgre. Također uočene su NOE interakcije protona metilenskih skupina aaminskog lanca s H-4 protonom aromatske jezgre kao i interakcije protona dviju metilnih skupina *N,N*-dimetilamino skupine s H-3 protonom aromatske jezgre. Na slici 26 prikazan je HMQC spektar regioizomera **9** kojim su asignirani signali aromatskih CH skupina.



Slika 26. HMQC spektar regioizomera **9**

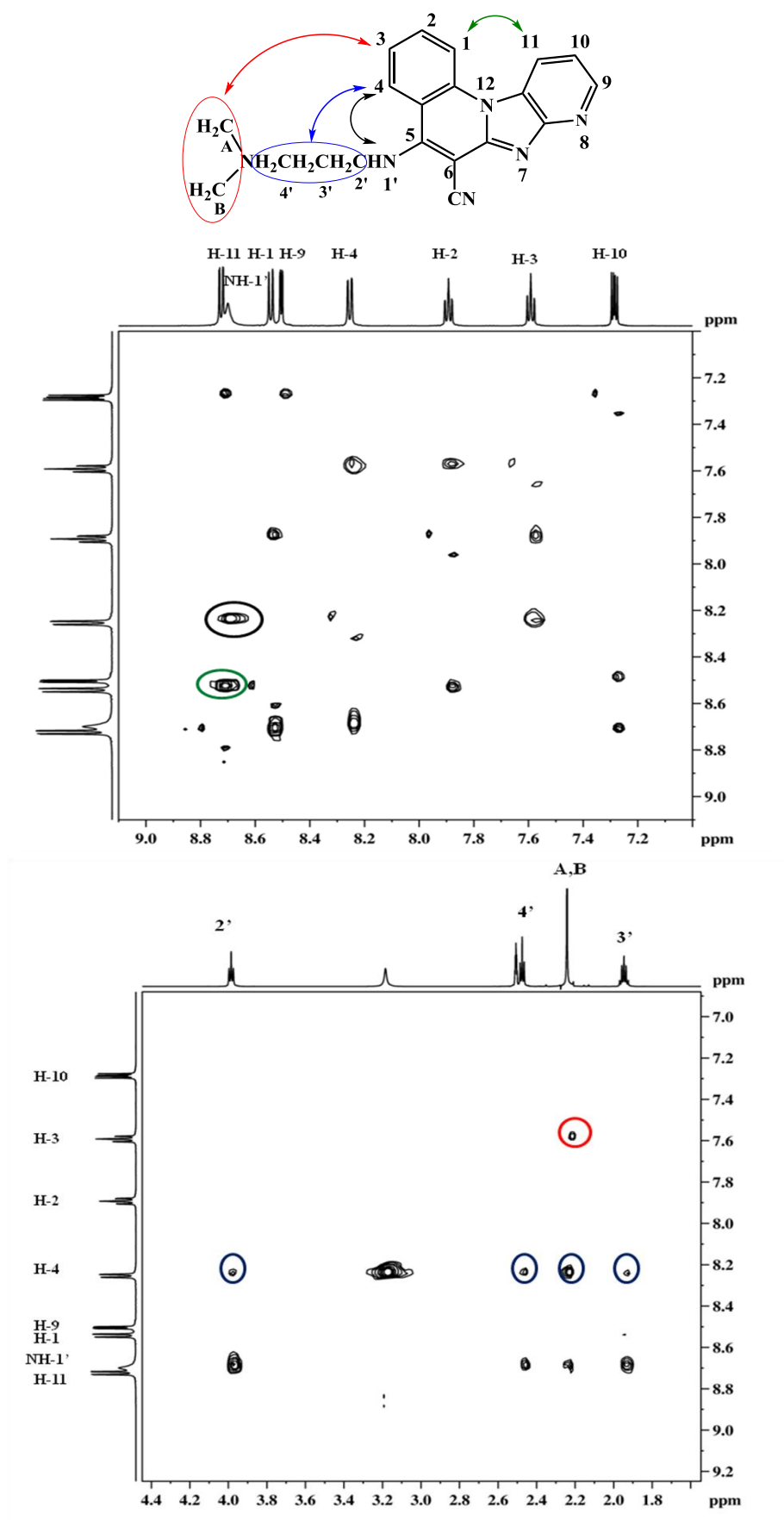
4. RASPRAVA I REZULTATI

Na slici 27 prikazan je COSY spektar regioizomera **10**, a na slici 28 NOESY spektar regioizomera **10**.



Slika 27. COSY spektar regioizomera **10**

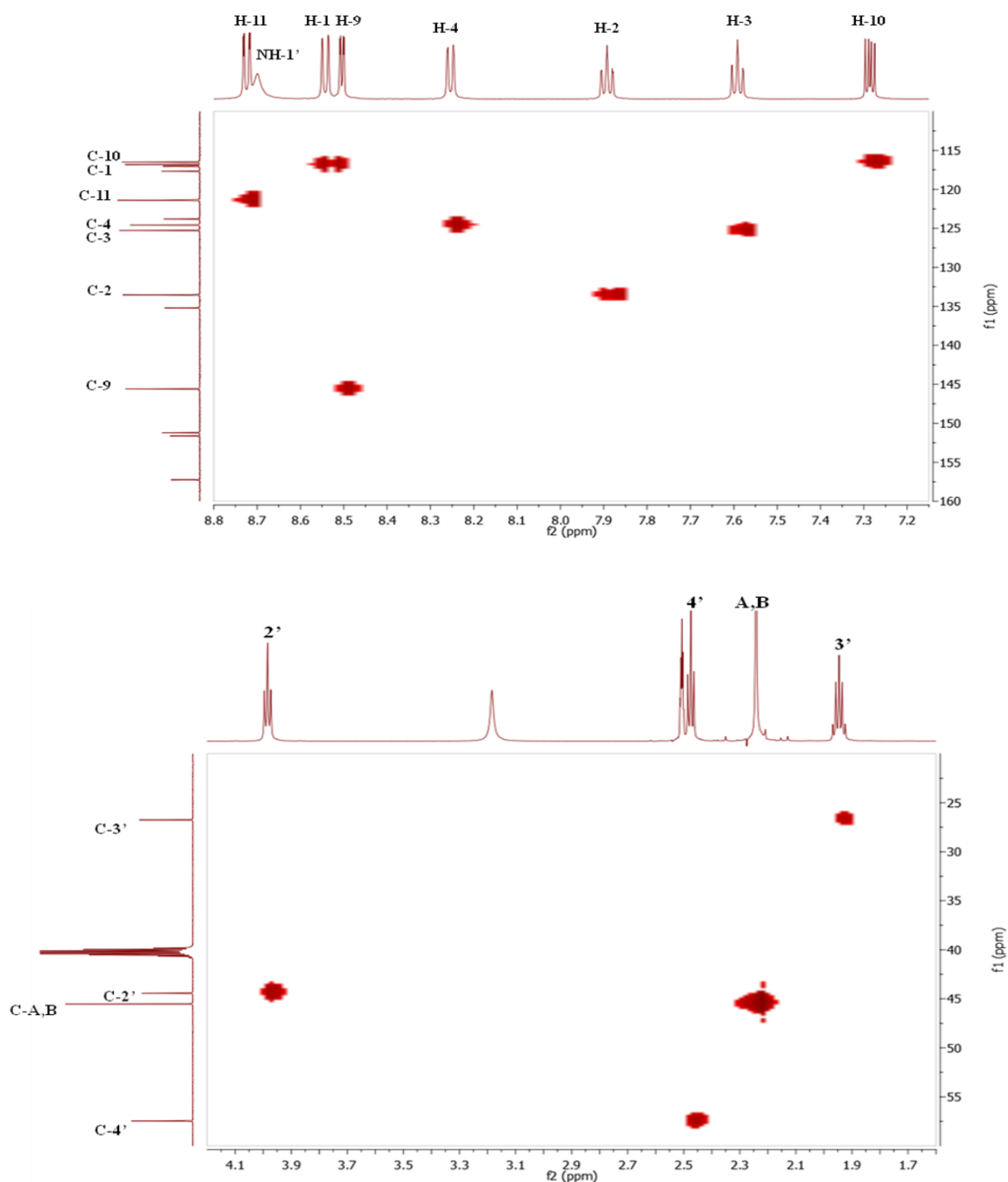
4. RASPRAVA I REZULTATI



Slika 28. NOESY spektar regioizimera **10**

4. RASPRAVA I REZULTATI

U spektru se mogu uočiti NOE interakcije između dušikovog protona aaminskog supstituenta i H-4 protona aromatske jezgre, kao i NOE interakcije H-1 i H-11 protona aromatske jezgre. Također uočene su NOE interakcije protona metilenskih skupina aaminskog lanca s H-4 protonom aromatske jezgre kao i interakcije protona dviju metilnih skupina *N,N*-dimetilamino skupine s H-3 protonom aromatske jezgre. Na slici 29 prikazan je HMQC spektar regioizomera **10** kojim su asignirani signali aromatskih CH skupina.

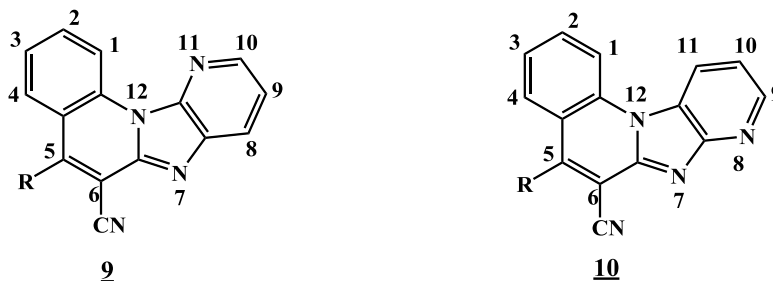


Slika 29. HMQC spektar regioizomera **10**

4. RASPRAVA I REZULTATI

Na temelju dobivenih informacija iz COSY i NOESY spektara provedeno je potpuno asigniranje vodikovih atoma.

Tablica 3. Kemijski pomaci aromatskih protona regioizomera **9** i **10** u ^1H NMR spektrima



Spoj	^1H NMR (δ/ppm)							
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-8	H-9	H-10	H-11
9	9,69	7,85	7,52	8,13	8,04	7,41	8,35	-
10	8,58	7,90	7,61	8,25	-	8,50	7,30	7,72

4.3. Utjecaj otapala na spektroskopske karakteristike

Prirednim spojevima **9** i **10** ispitane su spektroskopske karakteristike korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.⁴² Kako bi se utvrdio utjecaj otapala na spektroskopske karakteristike, snimljeni su spektri spojeva u 11 otapala koja se razlikuju prema polarosti. Otapala imaju značajan utjecaj na spektroskopske karakteristike određenog spoja, što se naziva solvatokromizmom. Te promjene rezultat su fizikalnih interakcija između otapala i otopljene tvari, a objašnjavaju se promjenama u razlici između osnovnog i pobuđenog stanja molekule koja apsorbira energiju. Solvatokromizam može biti pozitivan i negativan. Polarnije otapalo uzrokuje negativan solvatokromizam što se očituje hipsokromnim pomakom dok pozitivni solvatokromizam izaziva batokromni pomak. Polarnost otapala izražava se pomoću empirijskog parametra $E_T(30)$ koji ih uspoređuje s negativnim solvatokromizmom piridin *N*-fenolat betainskog bojila te se definira kao molarna energija prijelaza elektrona iz osnovnog u prvo pobuđeno stanje.⁴³ Što je otapalo manje polarno, imat će manje $E_T(30)$ koji se može izračunati prema izrazu:

$$E_T(30) (\text{kcal mol}^{-1}) = h \times c \times \nu \times N_A = \frac{28591}{\lambda_{\text{max}}(\text{nm})}$$

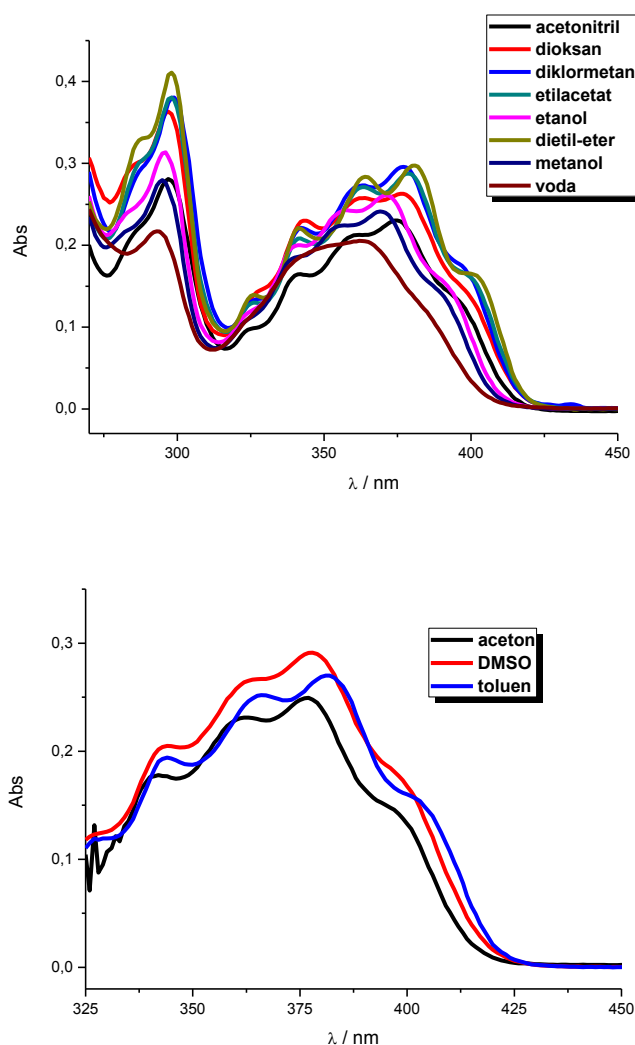
4. RASPRAVA I REZULTATI

Apsorpcijske vrpce u području od 250 do 320 nm rezultat su elektronskih $\pi-\pi^*$ prijelaza, a apsorpcijske vrpce u području od 330 do 425 nm rezultat su $n-\pi^*$ elektronskih prijelaza. Iz položaja apsorpcije vidljivo je da je više energije potrebno za $\pi-\pi^*$ nego za $n-\pi^*$ prijelaze.

4.3.1. Spektroskopska karakterizacija spoja 9 UV/Vis i emisijskom spektroskopijom

Apsorpcijski spektri snimani su pri koncentraciji spojeva $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ u svakom korištenom otapalu. Na slici 30 prikazani su apsorpcijski spektri regioizomera 9.

Iz dobivenih apsorpcijskih krivulja vidljivo je da najveći intenzitet apsorpcije spoj 9 pokazuje u diklormetanu, a najmanji u metanolu. Porastom polarosti otapala dolazi do hipsokromnog pomaka u području $n-\pi^*$ prijelaza. Maksimum apsorpcije u vodi, najpolarnijem otapalu, nalazi se na 379 nm dok se u toluenu, kao najmanje polaranom otapalu nalazi se na 384 nm.

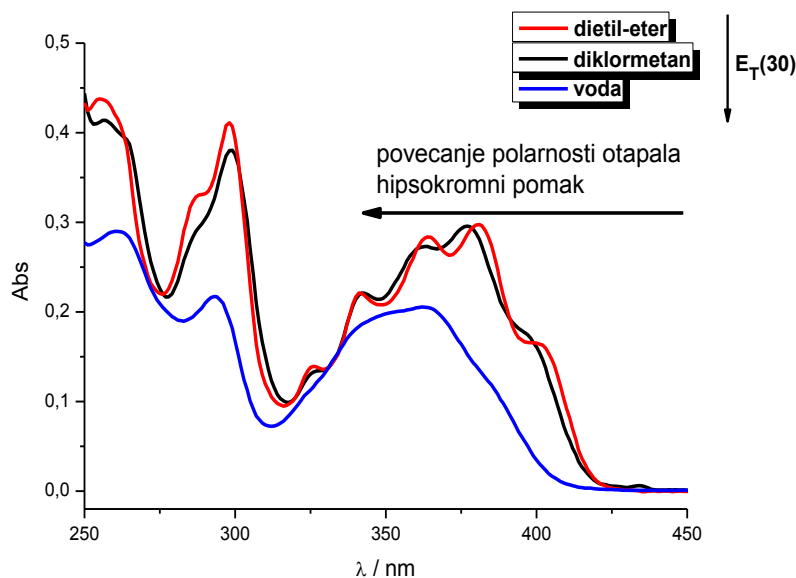


Slika 30. Apsorpcijski spektri spoja 9

4. RASPRAVA I REZULTATI

Pomak apsorpcijskih maksimuma može se objasniti činjenicom da polarna otapala stvaraju jače vodikove veze s polarnim molekulama u osnovnom nego u pobuđenom stanju te je za taj prijelaz potrebno uložiti više energije. Rezultat je da polarna otapala pomiču $n-\pi^*$ prijelaze prema kraćim valnim duljinama. Kod $\pi-\pi^*$ prijelaza polarna otapala imaju suprotan efekt, odnosno pomiču maksimum apsorpcije prema većim valnim duljinama. Iz grafa je vidljivo da u području $\pi-\pi^*$ prijelaza maksimumi ne prate strogo taj trend stoga je važno naglasiti da je $E_T(30)$, koji se koristi kao mjera za polarnost otapala, empirijski parametar koji vrlo vjerojatno nije obuhvatio sve potencijalne utjecaje.

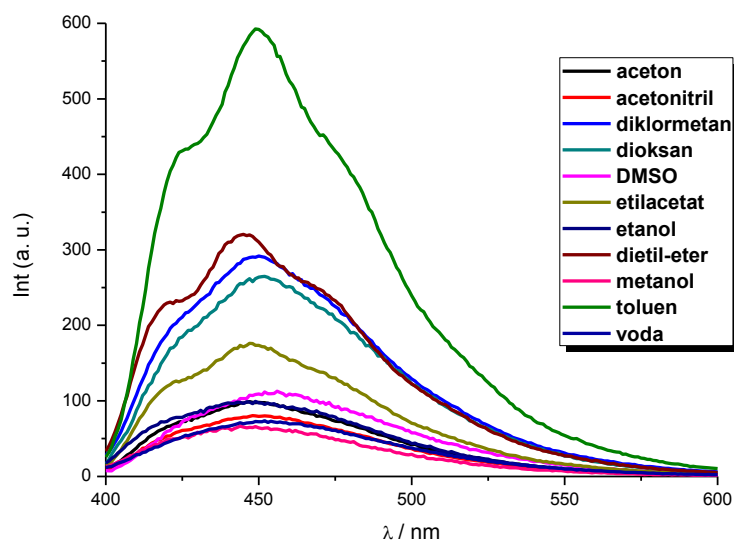
Na slici 31 prikazani su usporedni spektri spoja **9** u tri odabrana otapala s rastućom polarnosti iz kojih se može uočiti hipsokromni pomak maksimuma apsorpcije uzrokovan povećanjem polarnosti otapala.



Slika 31. Usporedni apsorpcijski spektri spoja **9** prema rastućoj polarnosti otapala

Emisijski spektri u različitim otapalima snimani su pri značajno nižoj koncentraciji spojeva od $2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ jer je fluorimetrijska spektroskopija metoda izrazito visoke osjetljivosti. Kao valna duljina ekscitacije korištena je valna duljina maksimuma apsorpcije iz UV/Vis spektra za svako pojedino otapalo. Emisijski spektri prikazani su na slici 32.

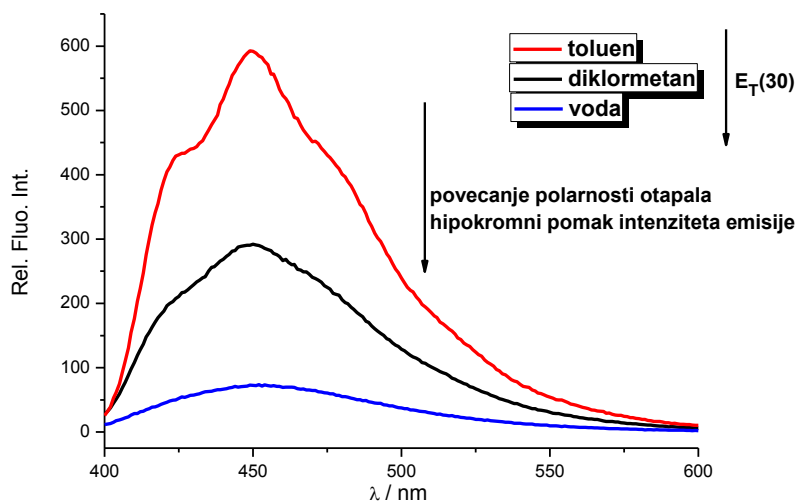
4. RASPRAVA I REZULTATI



Slika 32. Emisijski spektri spoja 9

Najveći intenzitet fluorescencije spoj 9 pokazuje u toluenu, najmanje polarnom otapalu. Spektri snimljeni u izrazito polarnim otapalima kao što su metanol, acetone, etanol, acetonitril i voda pokazuju gotovo šest puta slabiji intenzitet fluorescencije iz čega se zaključuje da povećanjem polarosti otapala spoj slabije fluorescira. Također je vidljivo da dva najmanje polarna otapala, toluen i eter, pokazuju tri emisijska maksimuma.

Na slici 33 dan je usporedni emisijski spektar regioizomera 9 u tri otapala prema rastućoj polarnosti u kojem se može uočiti značajan hipokromni pomak intenziteta emisije s povećanjem polarosti otapala.



Slika 33. Usporedni emisijski spektri regioizomera 9 prema rastućoj polarnosti otapala

4. RASPRAVA I REZULTATI

U Tablici 4. sumirani su svi rezultati i karakteristike dobivene spektroskopskim ispitivanjima regioizomera **9** u 11 različitih otapala različite polarnosti korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.

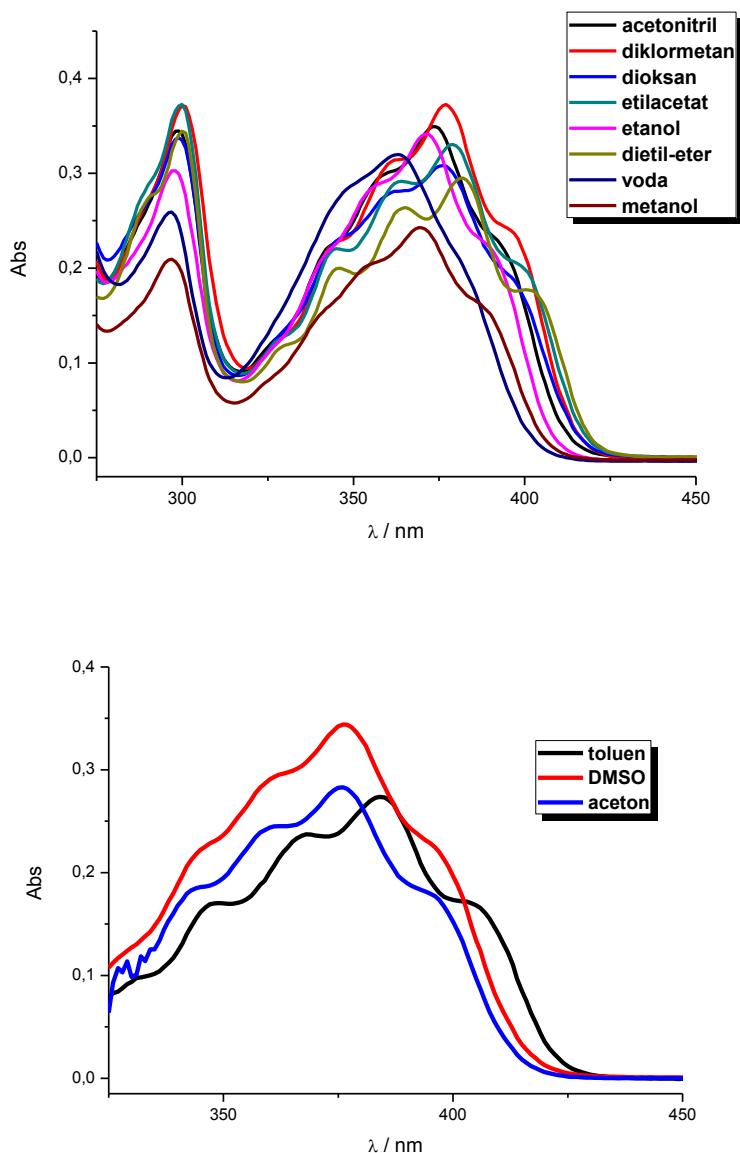
Tablica 4. UV/Vis i fluorimetrijski podaci regioizomera **9**

9											
	toluen	(C ₂ H ₅) ₂ O	dioksan	EtAc	CH ₂ Cl ₂	aceton	DMSO	CH ₃ CN	EtOH	MeOH	voda
E _T (30)	33,9	34,5	36,0	38,1	40,7	42,2	45,1	45,6	51,9	55,4	63,1
λ _{max} /nm	406 384 366 346 303	404 379 362 345 300 290 264 243	400 377 362 343 298 285 262	401 379 343 300 264 256	397 376 360 341 300 258 242	398 377 356 360 340	398 377 356 344 301 266	392 375 358 340 298 254 241 222	392 371 357 341 297 263 256 242 217	387 370 353 297 264 257 241 216	379 364 347 296 261 240 216
ε × 10 ³ (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)	8,1 13,5 12,5 9,6 6,0 18,3	7,9 14,7 14,3 10,8 6,9 20,3 16,6 21,4 41,3	6,9 12,7 13,1 11,4 18,1 14,7 19,9	7,7 14,1 13,5 10,4 18,9 14,8	8,5 14, 13,4 10,8 19,0 20,6 39,5	6,7 12,1 11,4 8,5	8,7 14,3 13,5 10,2 17,7	6,9 11,3 10,5 8,2 13,8 15,2 30,1 20,5	7,7 13,0 12,1 9,9 15,1 17,3 33,3 24,1	7,2 11,9 11,0 9,1 13,9 15,9 30,5 21,9	10,1 10,7 14,5 25,3 19,5
λ _{emis} /nm	449 424	446 419	452	448 423	450	448	456	450	447	446	452
Rel. Fluo. Int.	591 429	319 228	263	175 127	291	98	111	79	98	65	72

4.3.2. Spektroskopska karakterizacija spoja **10** UV/Vis i emisijskom spektroskopijom

Apsorpcijski spektri spoja **10** također su snimani pri koncentraciji 2×10⁻⁵ moldm⁻³ u svim ispitivanim otapalima. Rezultati su prikazani na slici 34.

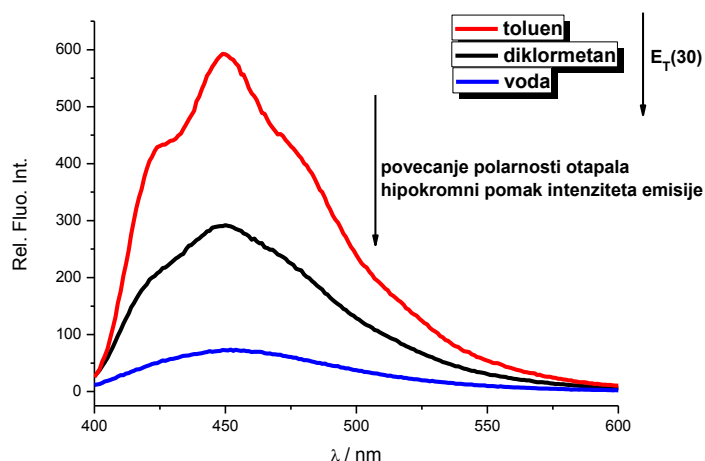
4. RASPRAVA I REZULTATI



Slika 34. Apsorpcijski spektri **10**

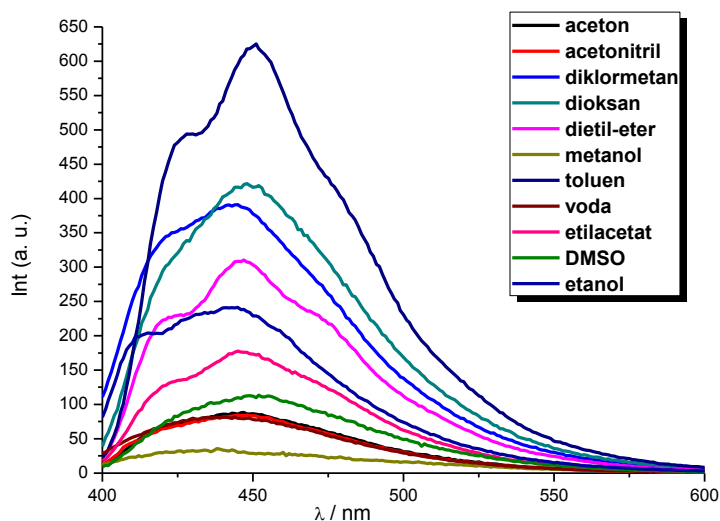
Spoj **10** pokazuje istu ovisnost maksimuma apsorpcije o polarnosti otapala što je detaljnije objašnjeno za spoj **9**. Maksimum apsorpcije spoja u vodi kao najpolarnijem otapalu nalazi se na 364 nm, a u najmanje polarnom otapalu, toluenu, na 384 nm u području $n-\pi^*$ prijelaza. U području $\pi-\pi^*$, kao i kod spoja **9**, spojevi ne prate strogo uobičajeno pravilo u praksi. Na slici 35 prikazani su usporedni spektri regioizomera **10** u tri odabrana otapa s rastućom polarnosti iz kojih se može uočiti hipsokromni pomak maksimuma apsorpcije uzrokovan povećanjem polarnosti otapala.

4. RASPRAVA I REZULTATI



Slika 35. Usporedni apsorpcijski spektri spoja **10** prema rastućoj polarности otapala

Emisijski spektri, snimani kod koncentracije spoja 2×10^{-7} mol dm^{-3} , prikazani su na slici 36.



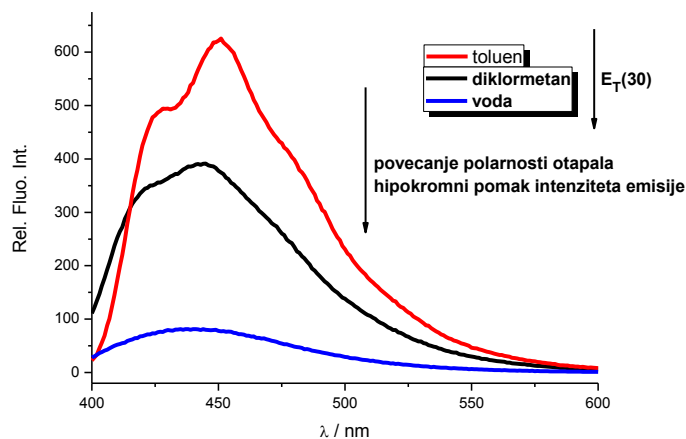
Slika 36. Emisijski spektri regioizomera **10**

Spoj **10** općenito pokazuje jači intenzitet fluorescencije u odnosu na spoj **9**. Intenzitet fluorescencije spoja prati trend smanjenja povećanjem polarности otapala.

Jasnije je uočljiva razlika intenziteta fluorescencije kod polarnijih otapala. Najslabiji intenzitet fluorescencije spoj pokazuje u metanolu.

Na slici 37 dan je usporedni emisijski spektar regioizomera **10** u tri otapala prema rastućoj polarности u kojem se može uočiti značajan hipokromni pomak intenziteta emisije s povećanjem polarности otapala.

4. RASPRAVA I REZULTATI



Slika 37. Usporedni emisijski spektri regioizomera **10** prema rastućoj polarnosti otapala

U Tablici 5 sumirani su svi rezultati i karakteristike dobivene spektroskopskim ispitivanjima regioizomera **10** u 11 različitih otapala korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.

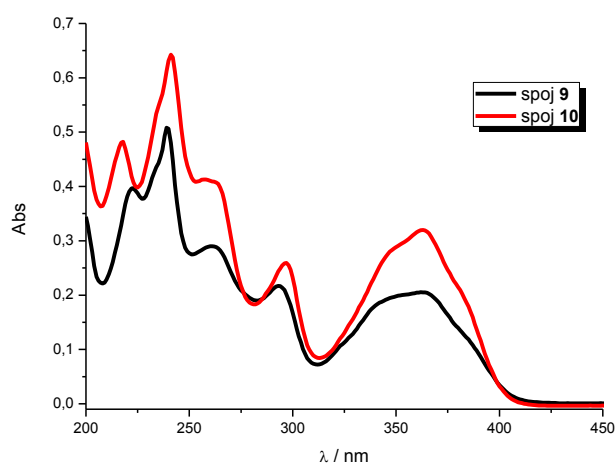
Tablica 5. UV/Vis i fluorimetrijski podaci regioizomera **10**

10											
	toluen	(C ₂ H ₅) ₂ O	dioksan	EtAc	CH ₂ Cl ₂	aceton	DMSO	CH ₃ CN	EtOH	MeOH	voda
E _T (30)	33,9	34,5	36,0	38,1	40,7	42,2	45,1	45,6	51,9	55,4	63,1
λ _{max} /nm	406 384 366 346 303	404 379 362 345 300 290 264 243	397 377 359 343 300 299 266	401 379 343 300 264 256	398 376 360 343 300 263 257 244	397 376 356 342 327	398 377 356 344 301 266	392 373 357 341 299 265 257 242 217	392 371 357 341 297 263 256 242 217	387 370 353 297 264 257 241 216	379 364 347 296 261 240 216
ε × 10 ³ (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)	8,1 13,7 11,8 8,5 16,2	8,8 14,9 13,1 10,5 16,6 14,0 26,3 36,8	8,5 16,2 13,4 10,7 17,3 25,4	10,5 16,8 10,5 17,9 27,3 25,2	11,4 18,0 15,0 11,4 18,0 25,8 26,4 41,0	7,2 14,4 12,9 8,6 4,3	10,1 18,0 13,6 10,1 17,3 25,1	11,1 17,1 14,6 11,1 17,1 24,3 24,6 39,5 26,7	10,8 16,9 14,4 10,9 15,0 21,5 22,1 35,7 24,7	8,0 11,9 10,0 10,2 15,2 15,7 25,2 17,4	10,8 15,9 14,3 12,9 20,5 32,0 23,9
λ _{emiss} /nm	450 427	470 448 423	448	446 424	442 423	446	452	447	443 411	439	440
Rel. Fluor. Int.	624 427	232 310 230	423	175 134	388 348	87	112	84	175 162	35	81

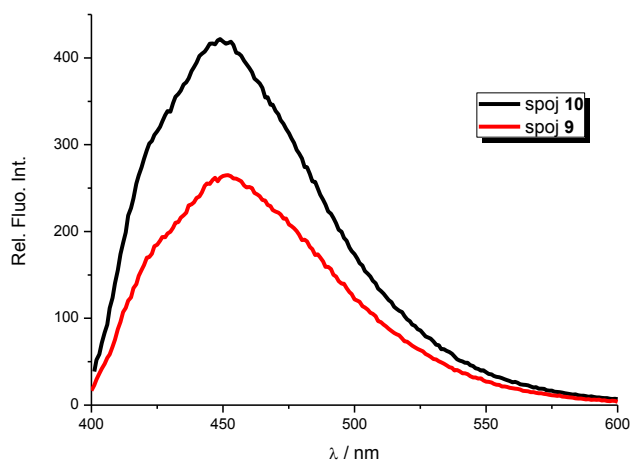
4. RASPRAVA I REZULTATI

Na temelju dobivenih rezultata spektroskopske karakterizacije UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom regioizomera **9** i **10** u 11 organskih otapala različite polarnosti možemo zaključiti da polarnost otapala utječe na promjenu spektroskopskih svojstava. Na slici 38 prikazani su usporedni apsorpcijski (a) i emisijski (b) spektri regioizomera **9** i **10** u vodi i dioksanu. Iz prikazanih spektara može se uočiti značajan utjecaj odabranog otapala na spektroskopske karakteristike pojedinog regioizomera, tj. utjecaj promjene položaja dušikovog atoma na piridinskom prstenu na spektroskopska svojstva.

a)



b)

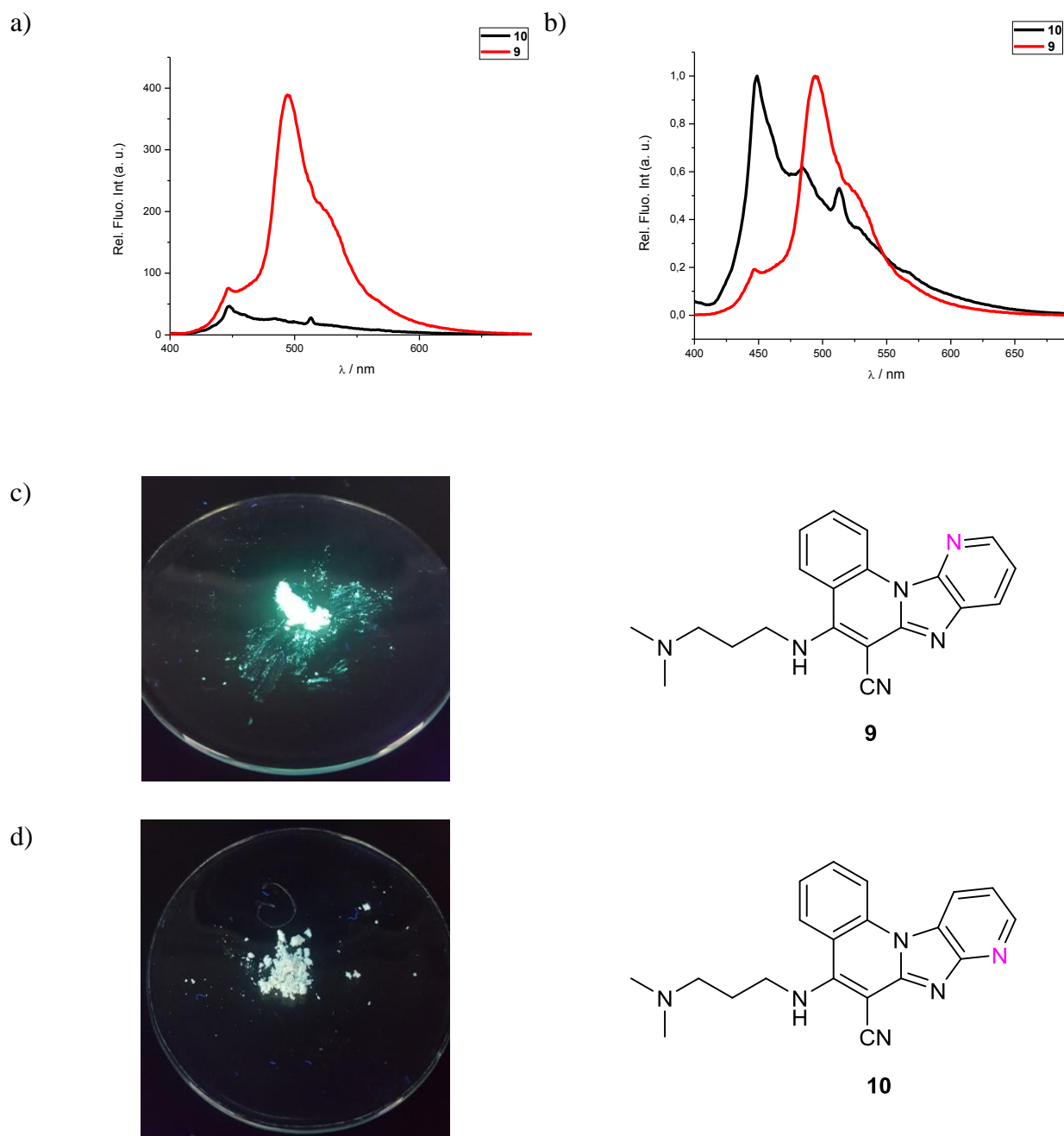


Slika 38. Usporedni apsorpcijski spektri regioizomera **9** i **10** u vodi (a) i emisijski spektri regioizomera **9** i **10** u dioksanu (b)

4. RASPRAVA I REZULTATI

4.3. Fluorescencija u čvrstom stanju

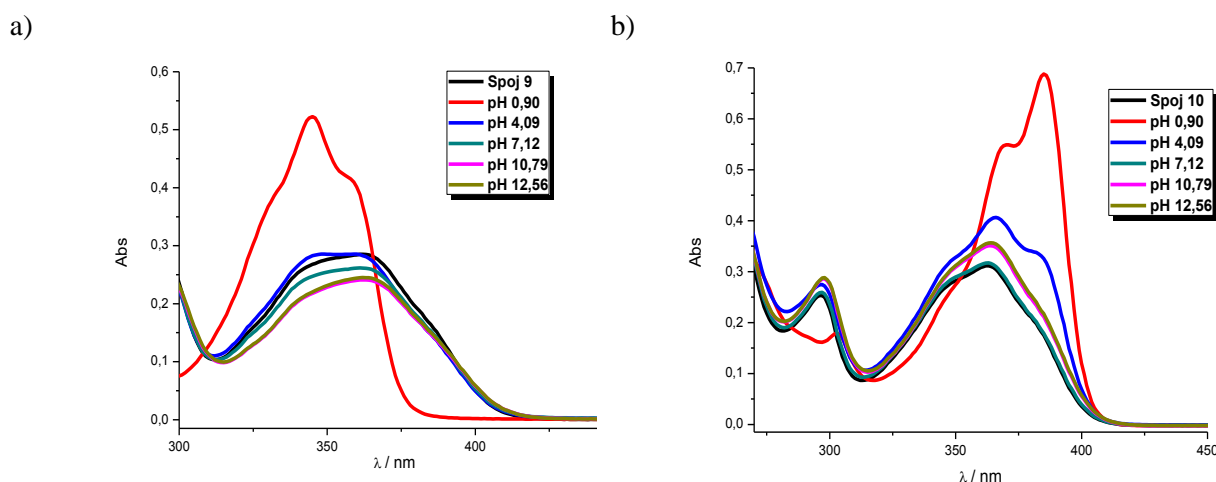
Na slici 39 prikazani su emisijski spektri regioizomera **9** i **10** u krutom stanju (a) iz kojih se može uočiti velika razlika u intenzitetu fluorescencije regioizomera **9** i **10**. Također se uočava i razlika u položaju maskimuma emisije (b) pojedinih regioizomera.



Slika 39. a) Emisijski spektri regioizomera **9** i **10** snimani pri istim uvjetima ($\lambda_{exc}=376$ nm); b) normalizirani emisijski spektri regioizomera **9** i **10**; c) fluorescencija regioizomera **9** pod svjetlošću valne duljine 366 nm; d) fluorescencija regioizomera **10** pod svjetlošću valne duljine 366 nm

4.4. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva regioizomera **9** i **10**

Kako bi se ispitala mogućnost primjene regioizomera **9** i **10** kao optičkih pH senzora, ispitana je promjena njihovih spektroskopskih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije. Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri ispitivanih spojeva u otopinama univerzalnog pufera i metanola različitih vrijednosti pH. Kiselo bazna svojstva spojeva u otopinama univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH prikazana su na slici 40.



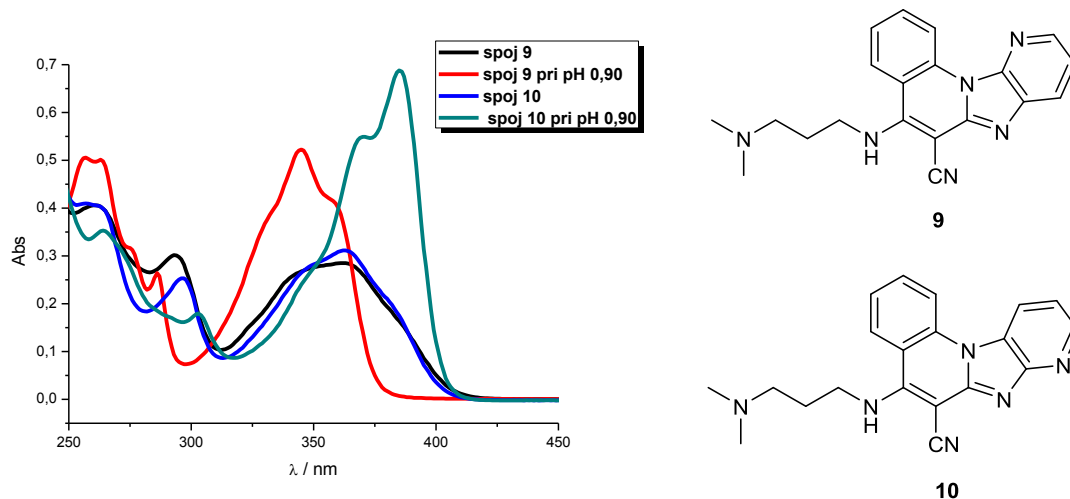
Slika 40. Apsorpcijski spektri pH titracija a) spoja **9** i b) spoja **10**

Iz dobivenih rezultata može se uočiti značajna promjena spektroskopskih svojstava ispitivanih spojeva kod različitih vrijednosti pH. Iz apsorpcijskih spektara regioizomera **9** i **10** vidljivo je da promjenom pH vrijednosti pufera dolazi do značajne promjene u intenzitetu i valnoj duljini maksimuma apsorpcije. U apsorpcijskom spektru spoja **9** pri pH 0,90 dolazi do hipsokromnog i izrazitog hiperkromnog pomaka maksimuma apsorpcije uz pojavu dva apsorpcijska maksimuma na 344 i 359 nm. Porastom pH vrijednosti na 4,09 i dalje je uočljiv blagi hipsokromni pomak. Daljnji rast pH vrijednosti rezultirao je smanjenjem intenziteta apsorpcije u odnosu na sam spoj i zadržavanje istog apsorpcijskog maksimuma na 362 nm. Rezultati pH titracija drugog regioizomera, spoja **10**, pokazuju sličan ali suprotan trend. Spektri spoja u svim otopinama pufera različitih pH vrijednosti pokazuju hiperkromni pomak. U vrlo kiselom mediju, pH 0,90 dolazi do izrazitog hiperkromnog i batokromnog pomaka kao i pojave dva apsorpcijska maksimuma 385 i 369 nm. Batokromni pomak iznosi oko 20 nm u odnosu na otopinu spoja pri neutralnoj vrijednosti pH.

4. RASPRAVA I REZULTATI

Povećanjem pH vrijednosti dolazi do postupnog smanjenja intenziteta apsorbancije i povratka apsorpcijskom maksimumu koji je karakterističan za spoj **10** na 362 nm.

Na slici 41 dani su apsorpcijski spektri oba regioizomera **9** i **10** te njihovi spektri pri pH 0,90 iz kojih se jasno može uočiti hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije izomera **9** te suprotni efekt, batokromni pomak maksimuma apsorbancije izomera **10** u kiselom mediju. Oba spoja pokazuju i izraženi hiperkromni pomak intenziteta apsorbancije s tim da regioizomer **10** pokazuje izraženiji utjecaj na porast intenziteta apsorbancije.

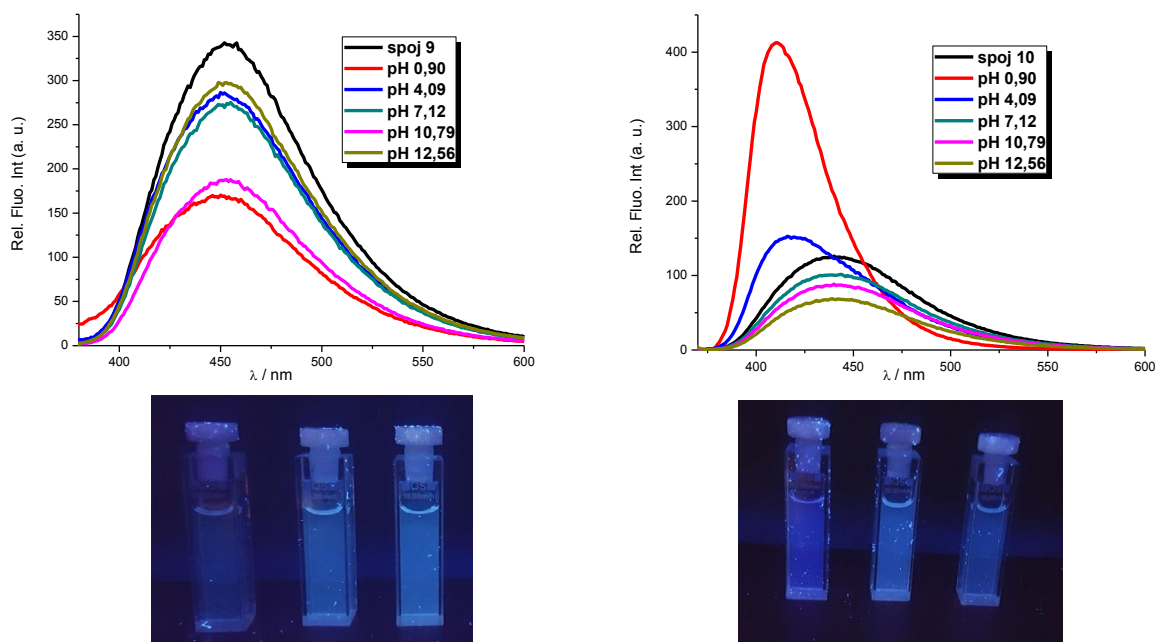


Slika 41. Usporedni apsorpcijski spektri regioizomera **9** i **10** u kiselom mediju

Rezultati spektroskopskih titracija za spojeve **9** i **10** prikazani su na slici 42.

a)

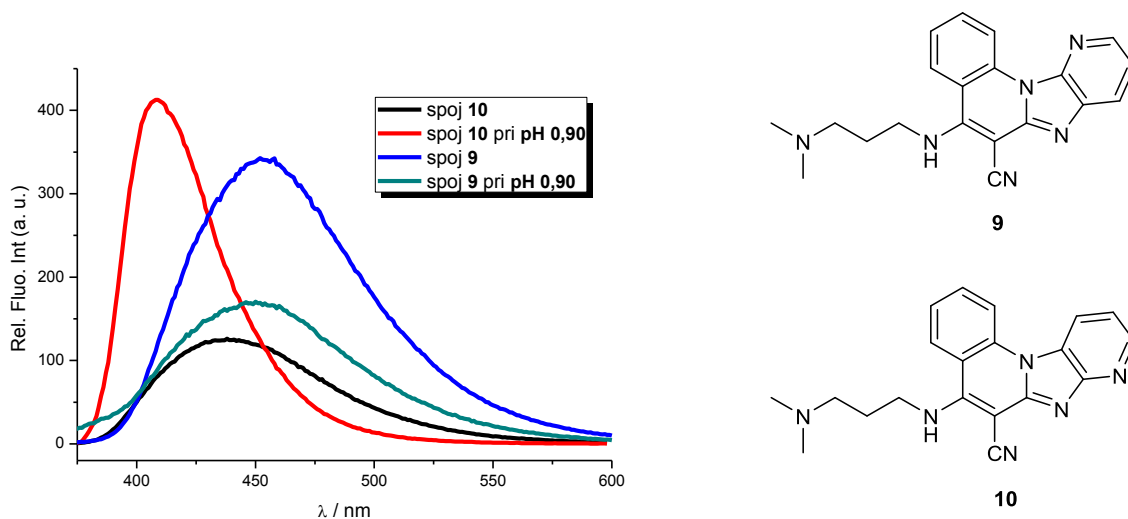
b)



Slika 42. Emisijski spektri pH titracija regioizomera a) **9** i b) **10**

4. RASPRAVA I REZULTATI

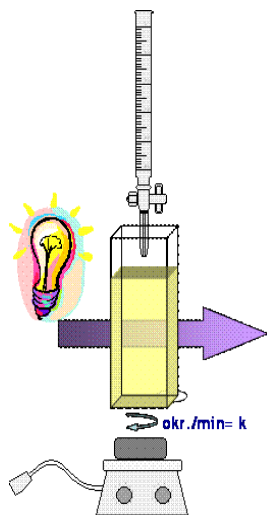
Emisijski spektri pH titracija spoja **9** pokazuju da povećanjem pH vrijednosti dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije. pH vrijednosti 0,90 i 10,79 znatno smanjuju intenzitet fluorescencije dok je nešto blaži hipokromni pomak uočen za ostale vrijednosti pH medija. U fluorimetrijskim pH titracijama maksimum fluorescencije nalazi se na istoj valnoj duljini. Fluorimetrijske titracije spoja **10** pokazuju hiperkromni i hipsokromni pomak u kiselom mediju. Za pH 0,90 maksimum fluorescencije nalazi se na 410 nm što znači da je došlo do hipsokromnog pomaka od 30 nm. U lužnatom mediju dolazi do postupnog gašenja fluorescencije, a maksimum fluorescencije zadržan je na 440 nm, odnosno na valnoj duljini maksimuma samog spoja **10**. Na slici 43 dani su emisijski spektri oba regioizomera **9** i **10** te njihovi spektri pri pH 0,90 iz kojih se jasno može uočiti da u kiselom mediju dolazi do vrlo izraženog porasta intenziteta fluorescencije te hipsokromnog pomaka maksimuma emisije u emisijskom spektru regioizomera **9**. U emisijskom spektru regioizomera **10** u kiselom mediju dolazi do gašenja fluorescencije, tj. izraženog hipokromnog pomaka intenziteta emisije.



Slika 43. Usporedni emisijski spektri regioizomera **9** i **10** u kiselom mediju

Dobiveni rezultati preliminarnih ispitivanja **potvrđuju mogućnost primjene ispitivanih spojeva kao pH senzora**. S obzirom da su ispitani spojevi regioizomeri, rezultati u kiselom mediju UV/Vis titracija, pri čemu regioizomer **9** pokazuje hipsokromni, a **10** batokromni pomak, su vrlo zanimljivi kao i pojava pojačavanja intenziteta fluorescencije u slučaju jednog i gašenja fluorescencije u slučaju drugog regioizomera. Položaj dušikovog atoma na piridinskom prstenu značajno utječe na kiselost i/ili bazičnost ostalih ionizabilnih mjesta u molekuli.

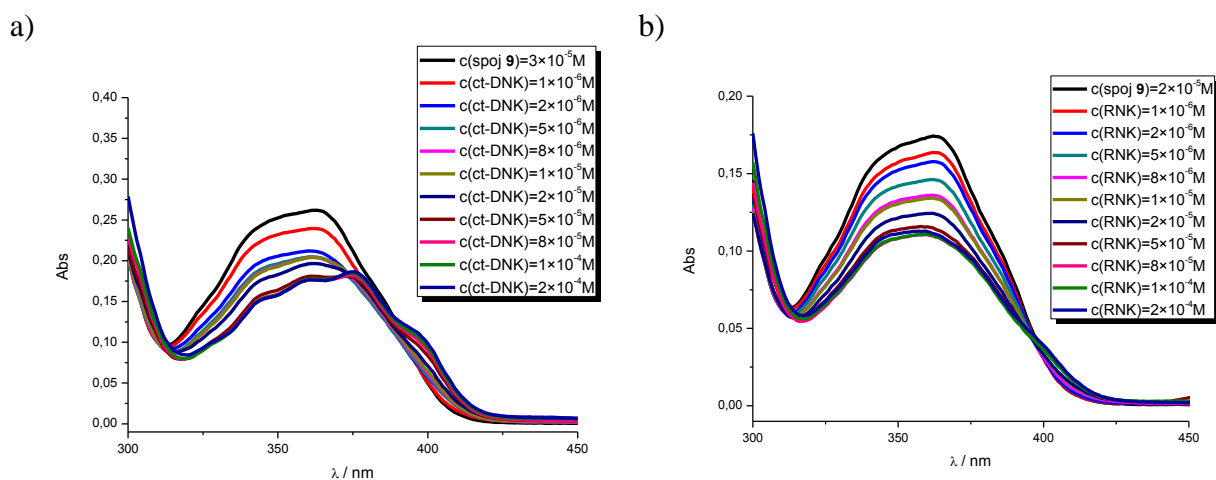
4.5. Ispitivanje interakcije nekih priređenih derivata s DNK/RNK



Slika 44.

Kako bi se utvrdila mogućnost primjene sintetiziranih regioizomera za obilježavanje biomakromolekula DNK ili RNK, provedena su preliminarna ispitivanja interakcije spojeva s *ct*-DNK i poliC-poliG RNK. Titracije su praćene UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom. Ispitivanja UV/Vis spektroskopijom su provedena u puferu BPE pri početnim koncentracijama ispitivanih spojeva $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, a fluorimetrijskom spektroskopijom pri početnim koncentracijama ispitivanih spojeva $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$.

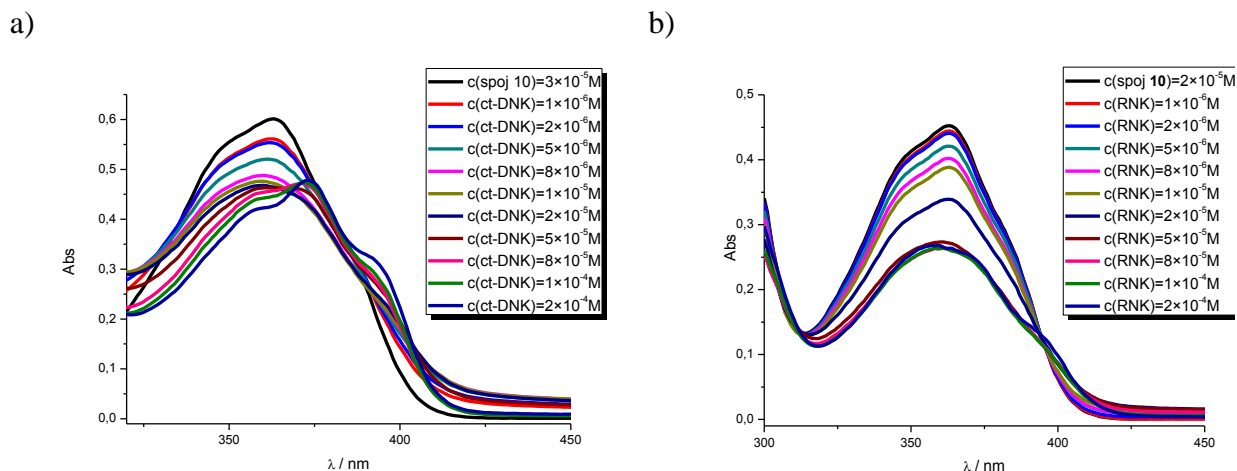
Na slici 45 prikazane su titracijske krivulje ispitivanja interakcije regioizomera **9** s *ct*-DNK i RNK praćene UV/Vis spektroskopijom.

Slika 45. UV/Vis spektroskopske titracije regioizomera **9** s *ct*-DNK i RNK

Povećanjem koncentracije *ct*-DNK dolazi do smanjenja intenziteta apsorbancije (33%) i postupnog batokromnog pomaka u apsorpcijskom spektru početnog spoja **9**. U odnosu na maksimum apsorbancije spoja, batokromni pomak pri višim koncentracijama iznosi 15 nm. Dodatkom otopine RNK također dolazi do značajnog smanjenja intenziteta apsorbancije ispitivanog regioizomera **9** (37%) bez uočenih pomaka maksimuma apsorbancije.

4. RASPRAVA I REZULTATI

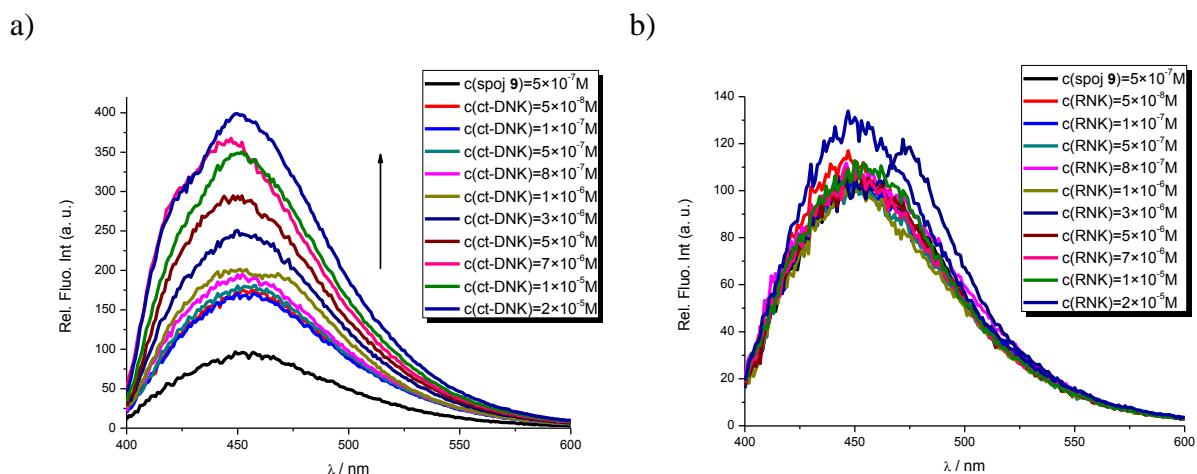
Na slici 46 prikazane su titracijske krivulje ispitivanja interakcije regioizomera **10** s *ct*-DNK i RNK praćene UV/Vis spektroskopijom.



Slika 46. UV/Vis spektroskopske titracije regioizomera **10** s *ct*-DNK i RNK

Povećanjem koncentracije *ct*-DNK također dolazi do smanjenja intenziteta apsorbancije (29%) i postupnog batokromnog pomaka u apsorpcijskom spektru početnog spoja **10**. Pri koncentracijama reda veličine 10^{-4} M dolazi do blagog hiperkromnog i batokromnog pomaka s maksimumom apsorbancije na 373 nm te pojave drugog maksimuma na 394 nm. Dodatkom otopine RNK također dolazi do značajnog smanjenja intenziteta apsorbancije ispitivanog regioizomera **10** (42%) bez uočenih pomaka maksimuma apsorbancije.

Rezultati fluorimetrijskih titracija regioizomera **9** s *ct*-DNK i RNK prikazani su na slici 47.



Slika 47. Fluorimetrijske spektroskopske titracije regioizomera **9** (5×10^{-7} mol dm⁻³) s *ct*-DNK i RNK

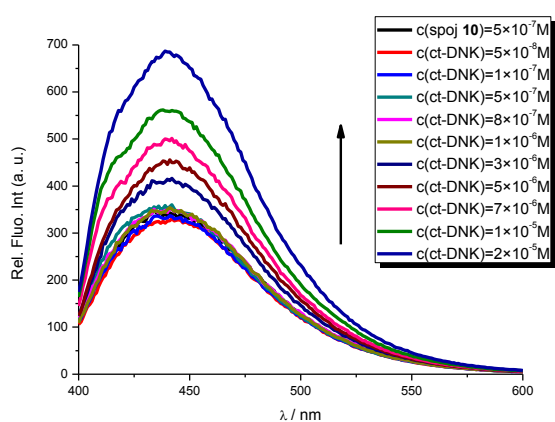
4. RASPRAVA I REZULTATI

Dobiveni rezultati fluorimetrijskih titracija pokazuju da prilikom interakcije regioizomera **9** s *ct*-DNK dolazi do značajnog porasta intenziteta fluorescencije.

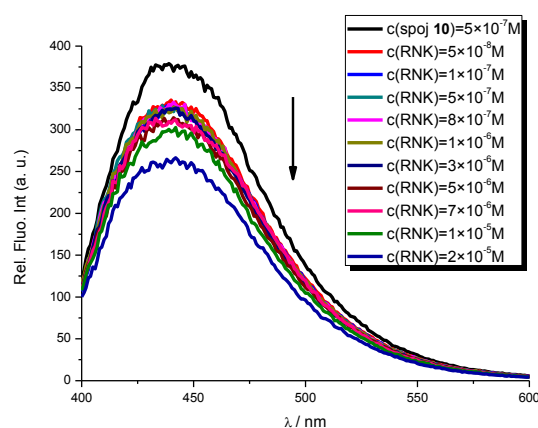
Fluorimetrijska titracija ukazuje na vrlo slabu interakciju regioizomera **9** s RNK te su promjene u intenzitetu fluorescencije vrlo male.

Regioizomer **10** pokazuje veći intenzitet fluorescencije u odnosu na regioizomer **9**. Titracijske krivulje regioizomera **10** s *ct*-DNK pokazuju blagi hiperkromni pomak pri nižim koncentracijama i izraziti hiperkromni pomak kod koncentracija *ct*-DNK većih od 10^{-6} M (slika 48). Titracijom otopine regioizomera **10** s RNK dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije tj. blažeg hipokromnog pomaka.

a)



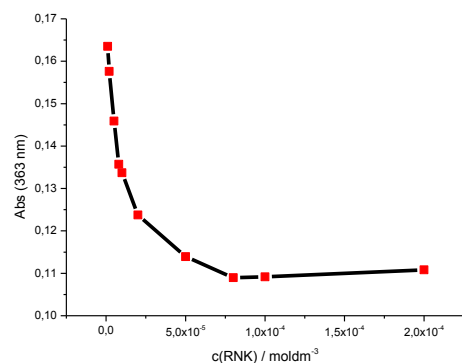
b)



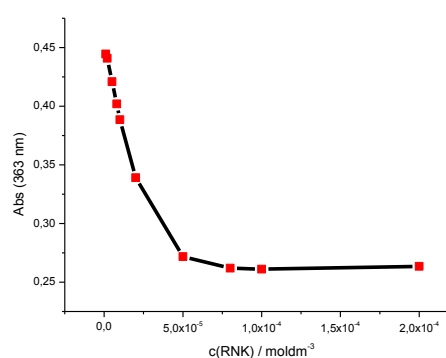
Slika 48. Fluorimetrijske spektroskopske titracije regioizomera **10** ($5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNK i RNK

Na slici 49 prikazane su ovisnosti intenziteta apsorbancije regioizomera **9** i **10** na 363 nm o koncentraciji dodane RNK iz kojih se vidi da dodatkom otopine RNK u otopine ispitivanih regioizomera dolazi do značajnog pada apsorbancije.

a)



b)

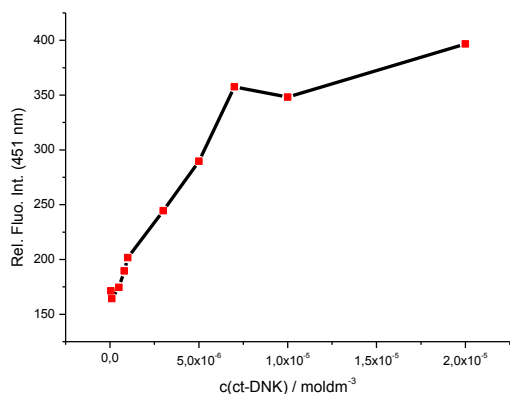


Slika 49. Ovisnost apsorbancije regioizomera **9** (a) i **10** (b) o koncentraciji dodane RNK na 363 nm

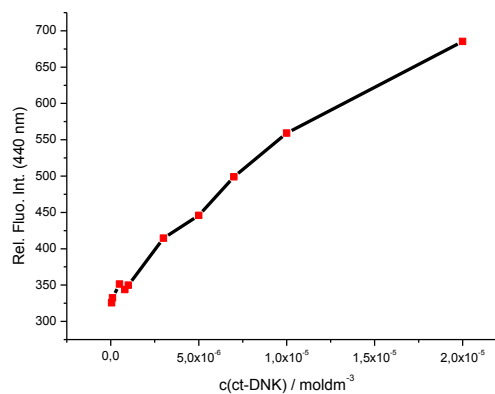
4. RASPRAVA I REZULTATI

Na slici 50 prikazane su ovisnosti intenziteta emisije regioizomera **9** i **10** na 451 nm i 440 nm o koncentraciji dodane *ct*-DNK. Iz prikazanih krivulja jasno se može uočiti da dolazi do značajnog porasta intenziteta fluorescencije dodatkom otopine DNK u emisijskom spektru regioizomera **9** (50 a) i **10** (50 b).

a)



b)



Slika 50. Ovisnost intenziteta emisije regioizomera **9** (a) i **10** (b) o koncentraciji dodane *ct*-DNK na 451 i 440 nm

U Tablici 6 prikazani su sumirani rezultati dobiveni ispitivanjem interakcije regioizomera **9** i **10** s *ct*-DNK i RNK.

Tablica 6. Rezultati ispitivanja interakcije odabranih spojeva s DNK/RNK

spojevi	rezultati dobiveni UV/Vis titracijama	
	<i>ct</i> -DNK	pG-pC (RNK)
9	hipokromni pomak batokromni pomak	hipokromni pomak
10	hipokromni pomak batokromni pomak	hipokromni pomak
spojevi	rezultati dobiveni fluorimetrijskim titracijama	
	<i>ct</i> -DNK	pG-pC (RNK)
9	izraženi hiperkromni pomak	vrlo slabe promjene
10	izraženi hiperkromni pomak	hipokromni pomak

Na temelju svih dobivenih rezultata preliminarnih ispitivanja može se zaključiti da oba regioizomera **pokazuju mogućnost potencijalne primjene kao fluorescentnih proba** za označavanje DNK/RNK koje se koriste u medicinskoj dijagnostici ili u analitičkoj kemiji.

5. ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: 2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitril **3**, (*Z*)-3-(2-klorfenil)-3-hidroksi-2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitril **5**, 5-okso-5,7-dihidro pirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril **6a**, 5-okso-5,7-dihidropirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril **6b**, 5-klorpirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril **7**, 5-klorpirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril **8**, 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril **9** i 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril **10**.
- Reakcijom 2,3-diaminopiridina i 2-cijanoacetamida priređen je spoj 2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitril **3**.
- Kondenzacijom spoja **3** s 2-klorbenzoil-kloridom priređen je aciklički prekursor **5**.
- Ciklički spojevi **6a** i **6b** priređeni su kao smjesa regioizomera termičkom ciklizacijom u DMF uz korištenje *t*-KOBu.
- Regioizomeri **7** i **8** priređeni su zagrijavanjem smjese regioizomera **6a** i **6b** s POCl₃ i PCl₅ te su razdvojeni kolonskom kromatografijom na silikagelu.
- Nekataliziranom aminacijom potpomognutom mikrovalovima, iz spojeva **7** i **8** u acetonitrilu pri temperaturi od 170°C i sa suviškom *N,N*-dimetilaminopropil-1-amina priređeni su amino supstituirani regioizomeri **9** i **10**.
- Svim novopriređenim spojevima struktura je potvrđena korištenjem ¹H, ¹³C NMR i 2D NMR spektroskopijom te UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom.
- Spektroskopska karakterizacija provedena je korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije matičnih otopina cijanih derivata **9** i **10** u 11 otapala različite polarnosti.
- Iz dobivenih rezultata može se uočiti značajan utjecaj vrste polarnog otapala na spektroskopske karakteristike.
- Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **9** i **10** kao optičkih pH senzora, ispitana je promjena njihovih spektroskopskih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.
- Iz dobivenih rezultata pH titracija može se zaključiti da se značajno mijenjaju spektroskopske karakteristike ispitivanih spojeva u ovisnosti o pH vrijednostima otopina te ovi regioizomeri pokazuju mogućnost primjene kao pH senzori.

5. ZAKLJUČAK

- Regioizomeri **9** i **10** pokazuju suprotan efekt u spektroskopskim karakteristikama u kiselom mediju prilikom UV/Vis spektroskopskih pH titacija te gašenje i povećavanje intenziteta fluorescencije kod pH titacija praćenih fluorimetrijskom spektroskopijom.
- Spojevima **9** i **10** ispitana je interakcija s *ct*-DNK i RNK korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.
- Spojevi **9** i **10** smanjuju intenzitet apsorbancije u prisutnosti *ct*-DNK i RNK te značajno povećavaju intenzitet fluorescencije u prisutnosti *ct*-DNK dok u prisutnosti RNK spoj **9** slabo pojačava a spoj **10** postupno gasi fluorescenciju.
- U ovom radu utvrđen je značajan utjecaj promjene položaja dušikovog atoma u piridinskom prstenu na spektroskopske karakteristike dva ispitana regioizomera u 11 organskih otapala različite polarnosti, u puferima različitih pH vrijednosti te u prisustvu *ct*-DNK i RNK.

6. ZAHVALA

6. ZAHVALA

Od srca zahvaljujem svojoj višegodišnjoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marijani Hranjec na predanosti i stručnom vodstvu, kojima je značajno doprinijela mom profesionalnom razvoju.

Zahvaljujem dr. sc. Nataši Perin na znanju koje mi je prenijela, radnom entuzijazmu i pomoći prilikom izvođenja i pisanja rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji, osobito roditeljima, čija je podrška, strpljenje i ljubav temelj svakog mog uspjeha.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

1. T. George, J. W. Christopher, W. W. George, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** (1999) 629.
2. V. Bavetsias, C. Sun, N. Bouloc, J. Reynisson, P. Workman, S. Linardopoulos, E. McDonald, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17** (2007) 6567.
3. A. Gschwind, O. M. Fischer, A. Ullrich, *Nat. Rev. Cancer* **4** (2004) 361-370.
4. A. Patapoutian, L. F. Reichardt, *Curr. Opin. Neurobiol.* **11** (2001) 272-280.
5. M. Pattarawarapan, K. Burgess, *J. Med. Chem.* **46** (2003) 5277-5291.
6. A. T. Weeraratna, J. T. Arnold, D. J. George, A. DeMarzo, J. T. Isaacs, *Cancer. Prostate* **45** (2000) 40-48.
7. C. J. Thiele, Z. Li, A. E. McKee, *Biology. Clin. Cancer Res.* **15** (2009) 5962-5967.
8. J. R. Ghilardi, K. T. Freeman, J. M. Jimenez-Andrade, W. G. Mantyh, A. P. Bloom, M. A. Kuskowski, P. W. Mantyh, *Mol. Pain* **6** (2010) 87-97.
9. P. Albaugh, Y. Fan, Y. Mi, F. Sun, F. Adrian, N. Li, Y. Jia, Y. Sarkisova, A. Kreusch, T. Hood, M. Lu, G. Liu, S. Huang, Z. Liu, J. Loren, T. Tuntland, D. S. Karanewsky, H. M. Seidel, V. Molteni, *ACS Med. Chem. Lett.* **3** (2012) 140-145.
10. T. Wang, M. L. Lamb, M. H. Block, A. M. Davies, Y. Han, E. Hoffmann, S. Ioannidis, J. A. Josey, Z.-Y. Liu, P. D. Lyne, T. MacIntyre, P. J. Mohr, C. A. Omer, T. Sjögren, K. Thress, B. Wang, H. Wang, D. Yu, H.-J. Zhang, *ACS Med. Chem. Lett.* **3** (2012) 705-709.
11. T. Wang, M. L. Lamb, D. A. Scott, H. Wang, M. H. Block, P. D. Lyne, J. W. Lee, A. M. Davies, H.-J. Zhang, Y. Zhu, F. Gu, Y. Han, B. Wang, P. J. Mohr, R. J. Kaus, J. A. Josey, E. Hoffmann, K. Thress, T. MacIntyre, H. Wang, C. A. Omer, D. Yu, *J. Med. Chem.* **51** (2008) 4672-4684.
12. P. E. Zage, T. C. Graham, L. Zeng, W. Fang, C. Pien, K. Thress, C. Omer, J. L. Brown, P. A. Zweidler-McKay, *Cancer* **117** (2011) 1321-1329.
13. T. Wang, D. Yu, M. L. Lamb, *Expert Opin. Ther. Pat.* **19** (2009) 1-15.
14. M. H. Block, Y. Han, J. A. Josey, J. W. Lee, D. Scott, B. Wang, H. Wang, T. Wang, D. Yu, WO200549033 (2005).
15. J. E. Hodge, *J. Agric. Food Chem.* **1** (1953) 928-943.
16. A. Goldin, J. A. Beckman, A. M. Schmidt, M. A. Creager, *Circulation* **114** (2006). 597-605.
17. G. Misciagna, G. De Michele, M. Trevisan, *Curr. Pharm. Des.* **13** (2007) 3688-3695.
18. M. T. Goodarzi, M. Rashidi, M. Rezaei, *Iran. J. Basic Med. Sci.* **13** (2010) 194-199

7. LITERATURA

19. B. J. Rodriguez, S. P. Jarvis, 2012. Book chapter in Nanotechnology & Nanomedicine in Diabetes. In: Le, L.A., Hunter, R.J., Preedy, V.R. (Eds.). Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp. 4–58.
20. K. M. Khan, M. Taha, F. Rahim, M. I. Fakhri, S. Rasheed, F. Rahim, W. Jamil, M. Khan, A. Karim, S. Perveen, M. I. Choudhary, *J. Chem. Soc. Pak.* **35** (2013) 930–938.
21. A. N. Aziz, M. Taha, N. H. Ismail, E. H. Anouar, S. Yousuf, W. Jamil, K. Awang, N. Ahmat, K. M. Khan, S. M. Kashif, *Molecules* **19** (2014) 8414–8433
22. M. Taha, K. A. A. Alkadi, N. H. Ismail, S. Imran, A. Adam, S. M. Kashif, S. A. A. Shah, W. Jamil, S. Sidiqqi, K. M. Khan *Arab. J. Chem.* · doi: doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.08.004
23. J. R. Pollard, M. Mortimore, *J. Med. Chem.* **52** (2009) 2629.
24. A. A. Mortlock, K. M. Foote, N. M. Heron, F. H. Jung, G. Pasquet, J. J. M. Lohmann, N. Warin, F. Renaud, C. De Savi, N. J. Roberts, T. Johnson, C. Dousson, G. B. Hill, D. Perkins, G. Hatter, R. W. Wilkinson, S. R. Wedge, S. P. Heaton, R. Odedra, N. J. Keen, C. Crafter, E. Brown, K. Thompson, S. Brightwell, L. Khatri, M. C. Brady, S. Kearney, D. McKillop, S. Rhead, T. Parry, S. Green, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 2213.
25. M. G. Manfredi, J. A. Ecsedy, A. Chakravarty, L. Silverman, M. Zhang, K. M. Hoar, S. G. Stroud, W. Chen, V. Shinde, J. J. Huck, D. R. Wysong, D. A. Janowick, M. L. Hyer, P. J. LeRoy, R. E. Gershman, M. D. Silva, M. S. Germanos, J. B. Bolen, C. F. Claiborne, T. B. Sells, *Clin. Cancer Res.* **17** (2011) 7614
26. M. R. Green, J. E. Woolery, D. Mahadevan, *Expert Opin. Drug Discov.* **6** (2011) 291
27. V. Bavetsias, J. M. Large, C. Sun, N. Bouloc, M. Kosmopoulou, M. Matteucci, N. E. Wilsher, V. Martins, J. Reynisson, B. Atrash, A. Faisal, F. Urban, M. Valenti, A. de Haven Brandon, G. Box, F. I. Raynaud, P. Workman, S. A. Eccles, R. Bayliss, J. Blagg, S. Linardopoulos, E. McDonald, *J. Med. Chem.* **53** (2010) 5213.
28. V. Bavetsias, S. Crumpler, C. Sun, S. Avery, B. Atrash, A. Faisal, A. S. Moore, M. Kosmopoulou, N. Brown, P. W. Sheldrake, K. Bush, A. Henley, G. Box, M. Valenti, A. de Haven Brandon, F. I. Raynaud, P. Workman, S. A. Eccles, R. Bayliss, S. Linardopoulos, J. Blagg, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 8721.
29. V. Bavetsias, A. Faisal, S. Crumpler, N. Brown, M. Kosmopoulou, A. Joshi, B. Atrash, Y. Pérez-Fuertes, J. A. Schmitt, K. J. Boxall, R. Burke, C. Sun, S. Avery, K. Bush, A. Henley, F. I. Raynaud, P. Workman, R. Bayliss, S. Linardopoulos, J. Blagg, *J. Med Chem* **56**. (2013) 9122.

7. LITERATURA

30. V. Bavetsias, Y. Pérez-Fuertes, P. J. McIntyre, B. Atrash, Magda Kosmopoulou, L. O'Fee, R. Burke, C. Sun, A. Faisal, K. Bush, S. Avery, A. Henley, F. I. Raynaud, S. Linardopoulos, R. Bayliss, J. Blagg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25** (2015) 4203–4209
31. M. Hranjec, B. Lučić, I. Ratkaj, S. Kraljević Pavelić, I. Piantanida, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *European Journal of Medicinal Chemistry* **46** (2011) 2748-2758
32. I. Zrinski, M. Eckert-Maksić, *Kem. Ind.* **54** (2005) 469–476
33. R. W. Middleton, D. G. Wibberley, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **17** (1980) 1757-1760.
34. D. Villemin, M. Hammadi, B. Martin *Synth. Commun.* **26** (1996) 2895.
35. S. Caddick, *Tetrahedron* **38** (1995) 10403.
36. A. Vass, J. Dudas, R. S. Varma, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 4951.
37. J. M. Thomas *Angew. Chem. Int, Eng.* **33** (1994) 913.
38. N. Montaueri, K. Rad-Moghadam, *Asian Journal of Chemistry* **18** (2006), 1557-1559
39. N. Perin, R. Nhili, K. Ester, W. Laine, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. H. David-Cordonnier, M. Hranjec, *Eur. J. Med. Chem.* **80** (2014) 218–227.
40. N. Perin, R. Nhili, M. Cindrić, B. Bertoša, D. Vušak, I. Martin-Kleiner, W. Laine, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. H. David-Cordonnier, M. Hranjec, *Eur. J. Med. Chem.* **122** (2016) 530–545.
41. N. Perin, I. Martin-Kleiner, R. Nhili, W. Laine, M.-H. David-Cordonnier, O. Vurgec, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. Hranjec, *Med. Chem. Comm.* **4** (2013) 1537–1550
42. M. Hranjec, E. Horak, D. Babić, S. Plavljanin, Z. Srdović, I. Murković Steinberg, R. Vianello, N. Perin, *New J. Chem.* **41** (2017) 358–371.
43. C. Reichardt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **18** (1979) 98-100

8. SAŽETAK

SAŽETAK

Utjecaj položaja dušikovog atoma na spektroskopska svojstva i interakciju s DNK/RNK regioizomera temeljenih na imidazo[4,5-*b*]piridinu

U ovom radu prikazana je sinteza, spektroskopska karakterizacija kao i ispitivanje potencijalne primjene novih regioizomera kao fluorescentnih proba za detekciju DNK ili RNK te pH senzora. Za sintezu ciljanih amino supstituiranih regioizomera **9** i **10** temeljenih na imidazo[4,5-*b*]piridinu korištene su klasične metode organske sinteze te sinteza potpomognuta mikrovalovima. Kondenzacijom derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **3** s 2-klorbenzoi-kloridom, priređen je aciklički prekursor **5**. Termičkom ciklizacijom priređena je smjesa cikličkih prekursora **6a** i **6b** iz kojih su dobiveni klor supstituirani tetraciklički derivati **7** i **8**. Amino supstituirani regioizomeri **9** i **10** priređeni su nekataliziranom reakcijom aminacije potpomognutom mikrovalovima. Strukture svih novopriređenih spojeva potvrđene su korištenjem ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije, a struktura regioizomera potvrđena je 2D NMR spektroskopijom.

Provedena je spektroskopska karakterizacija regioizomera **9** i **10** korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije u 11 organskih otapala različite polarnosti. Regioizomeri pokazuju zanimljive spektroskopske karakteristike koje značajno ovise o korištenom otapalu te su različite za svaki regioizomer.

Kako bi se potvrdila mogućnost primjene novih regioizomera kao senzora za detekciju pH, provedene su UV/Vis i fluorimetrijske pH titracije. Regioizomeri **9** i **10** pokazali su zanimljive promjene spektroskopskih svojstava kod različitih vrijednosti pH. Značajna razlika uočljiva je u kiselom mediju pri čemu se vidi suprotan efekt regioizomera na spektroskopske karakteristike.

Preliminarnim ispitivanjem interakcije s polinukleotidima DNK/RNK, korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije, utvrđena je mogućnost potencijalne primjene ispitanih spojeva kao fluorescentnih proba za obilježavanje i detekciju nukleinskih kiselina budući da vezanjem na DNK/RNK značajno mijenjaju spektroskopska svojstva.

Ključne riječi: imidazo[4,5-*b*]piridini, regioizomeri, interakcija s *ct*-DNK i RNK, UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija, pH senzori

9. SUMMARY

SUMMARY

The influence of the nitrogen position on the spectroscopic properties and interaction with DNA/RNA of regioisomers based on imidazo[4,5-*b*]pyridine

Within this work, the synthesis, spectroscopic characterization and potential application of novel regioisomers as fluorescent probes for detection of DNA/RNA or pH sensors was presented. For the synthesis of novel targeted compounds, classical organic synthesis reactions as well as microwave assisted synthesis were used. Due to the condensation of imidazo[4,5-*b*]pyridine derivative with 2-chlorobenzoyl chloride, acyclic precursor **5** was prepared. In reaction of thermic cyclization, the mixture of cyclic precursors **6a** and **6b** was prepared. Furthermore, from **6a** and **6b** chloro substituted cyclic tetracyclic derivatives **7** and **8** obtained in the next step. Amino substituted regioisomers **9** and **10** were prepared by uncatalyzed microwave assisted amination. Structures of newly prepared compounds were confirmed by means of ^1H i ^{13}C NMR, UV/Vis and fluorimetric spectroscopy. Structure of regioisomers was determined by 2D NMR spectroscopy.

Spectroscopic characterization of regioisomers **9** and **10** was performed by using UV/Vis and fluorimetric spectroscopy in 11 organic solvents of varying polarities. Studied regioisomers showed interesting spectroscopic characteristics which are significantly dependant on the used solvent and are different for each regioisomer.

To explore and confirm the possibility of novel regioisomers **9** and **10** for their application as sensors for detection pH, UV/Vis and fluorimetric pH titrations were performed. Regioisomers **9** and **10** showed interesting changes of spectroscopic characteristics depended on different pH. Significant differences in the changes of spectroscopic characteristics in acidic medium were obtained.

Based on preliminary investigation of interaction with polynucleotides DNA/RNA by UV/Vis and fluorimetric spectroscopy, their possible application as a fluorescent probes for detection and tracing of nucleic acids was determinate since binding to DNA/RNA significantly changed the spectroscopic characteristics of regioisomers.

Key words: imidazo[4,5-*b*]pyridines, regioisomers, interaction with *ct*-DNA i RNA, UV/Vis and fluorescence spectroscopy, pH sensors

10. ŽIVOTOPIS

10. ŽIVOTOPIS

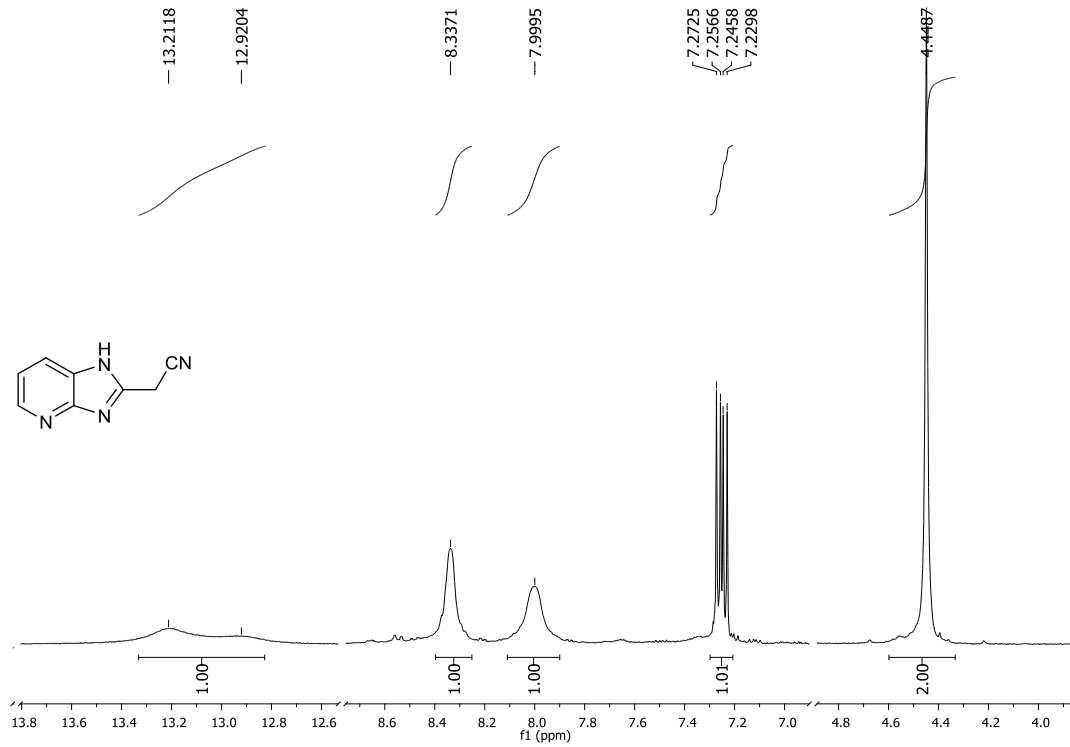
Ida Boček rođena je 07.07.1992. godine u Sisku. Osnovnu školu završila je 2007. godine nakon čega je upisala Gimnaziju Sisak. Maturirala je 2011. godine. U razdoblju od 2000. do 2010. godine pohađala je osnovnu i srednju glazbenu školu Fran Lhotka Sisak i stekla zvanje glazbenika flautista 2010. godine. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija upisala je 2011. godine. Završni rad iz područja organske kemije "Novi hidroksi supstituirani derivati benzamida kao potencijalni antioksidansi" pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec obranila je 2015. godine i postala sveučilišna prvostupnica primijenjene kemije. Na diplomskom studiju opredijelila se za smjer Primijenjena organska kemija. S posterskim priopćenjima sudjelovala je na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera 2016. godine pod nazivom "Novi hidroksi derivati amidino supstituiranih benzimidazola i benzamida kao potencijalni antioksidansi" te na 25. hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera 2017. godine pod nazivom "Antioksidativna i antiproliferativna aktivnost metoksi i amidino supstituiranih benzamida i benzimidazola". S usmenim izlaganjem sudjelovala je na 3. simpoziju studenata kemičara pod nazivom "Sinteza, spektroskopska karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih hidroksi supstituiranih heteroaromatskih derivata kao potencijalnih senzora za detekciju pH i/ili metalnih kationa u otopinama". Dobitnica je dekanove nagrade 2015./2016. za zapažen studentski znanstveni rad. Osposobljeni je ronilac s bocama kategorije R1 po CMAS-u.

11. PRILOZI

11. PRILOZI

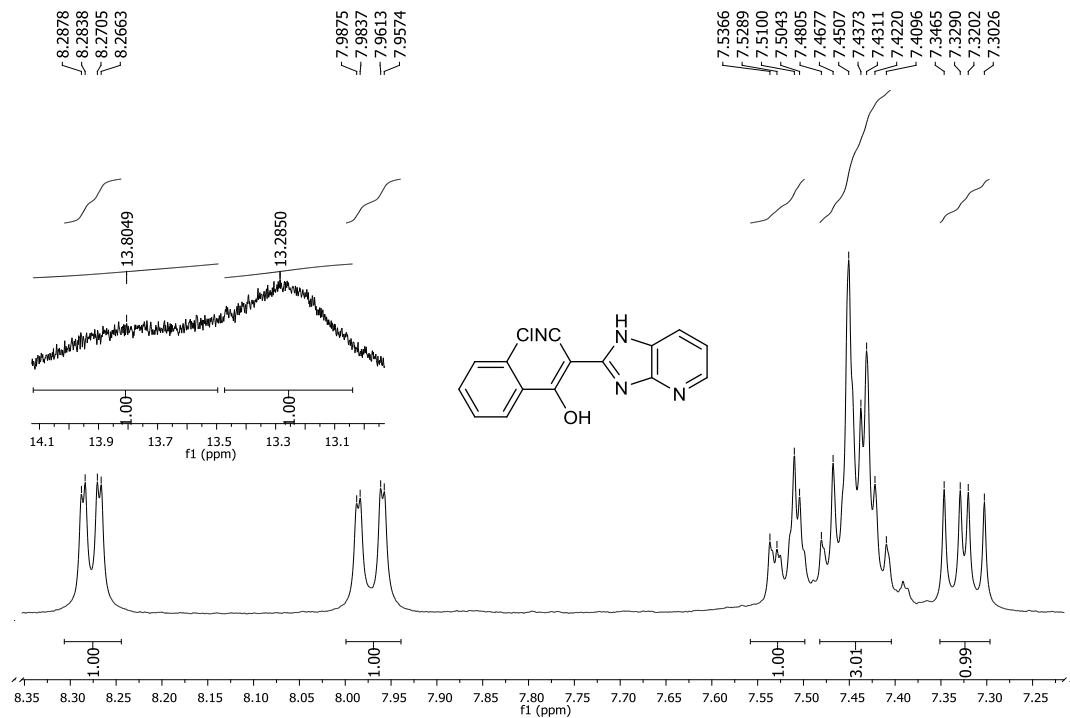
Prilog 1

a) ^1H NMR spektar 2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **3**



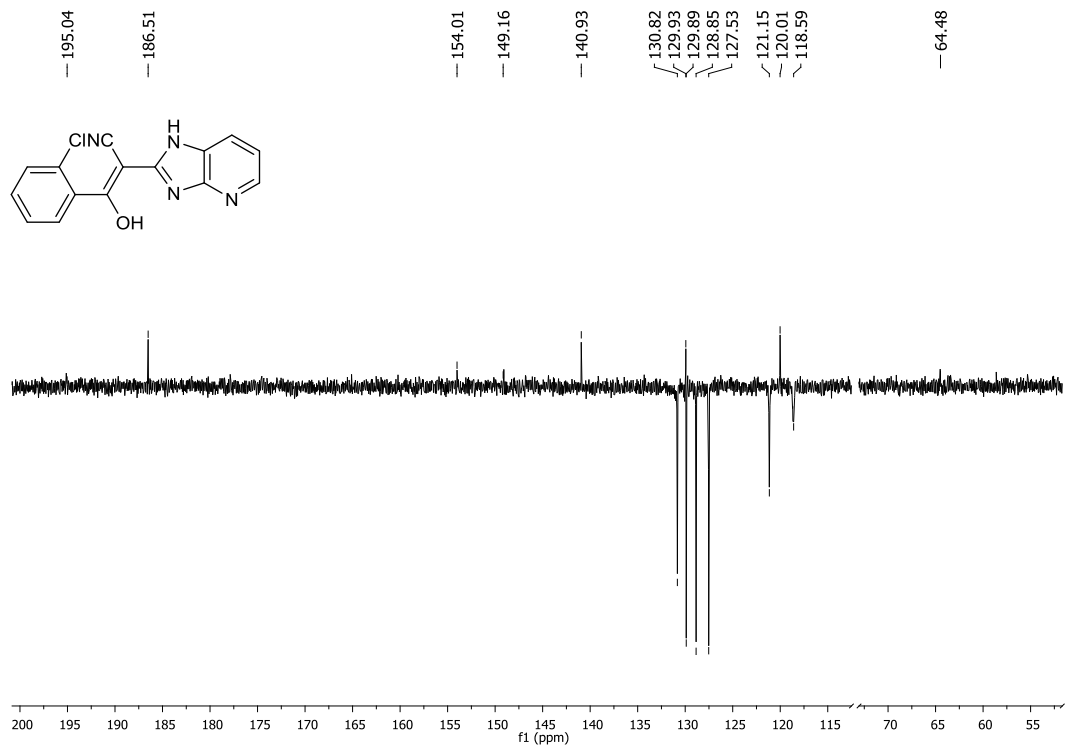
Prilog 2

a) ^1H NMR spektar (*Z*)-3-(2-klorfenil)-3-hidroksi-2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **5**



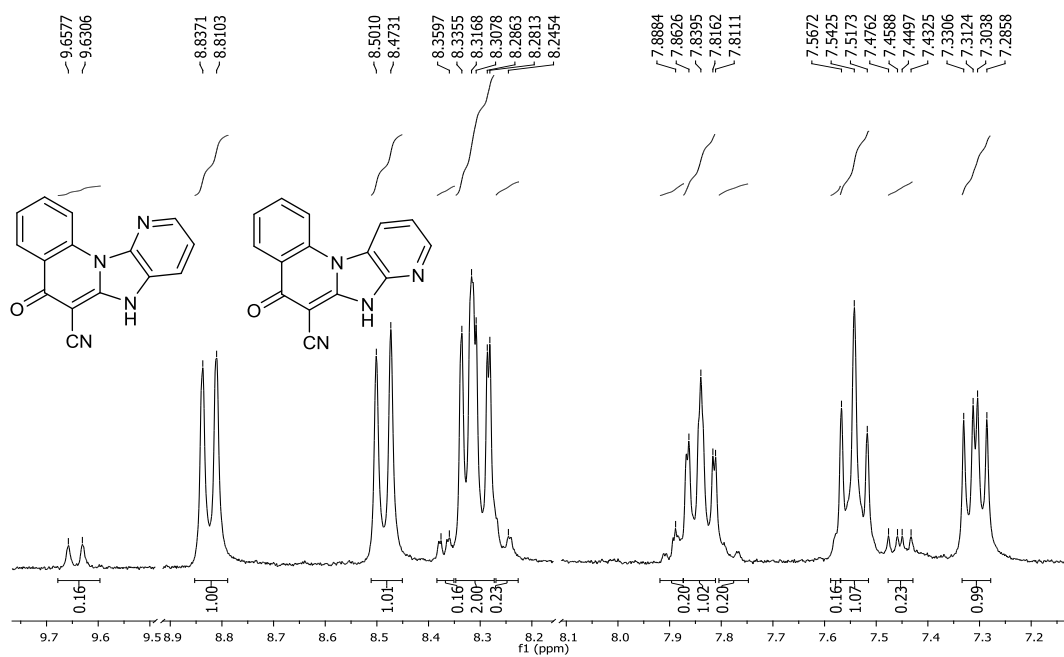
11. PRILOZI

b) ^{13}C NMR spektar (*Z*)-3-(2-klorfenil)-3-hidroksi-2-(1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **5**



Prilog 3

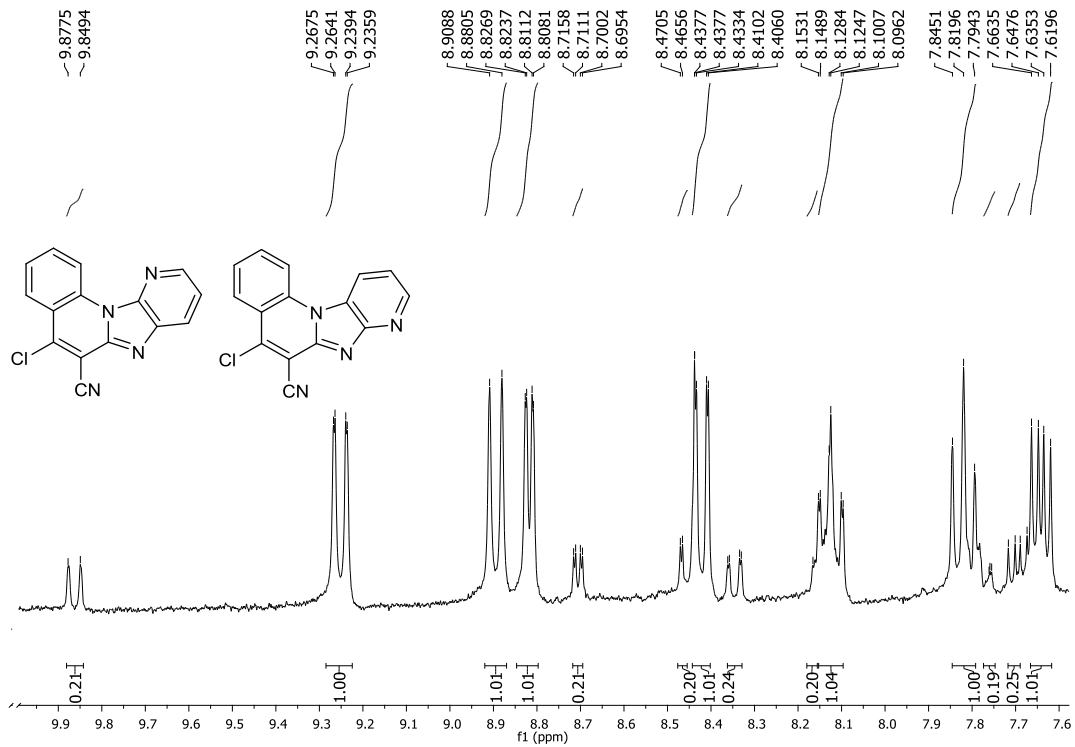
a) ^1H NMR spektar smjese 5-okso-5,7-dihidropirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **6a** i 5-okso-5,7-dihidropirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **6b**



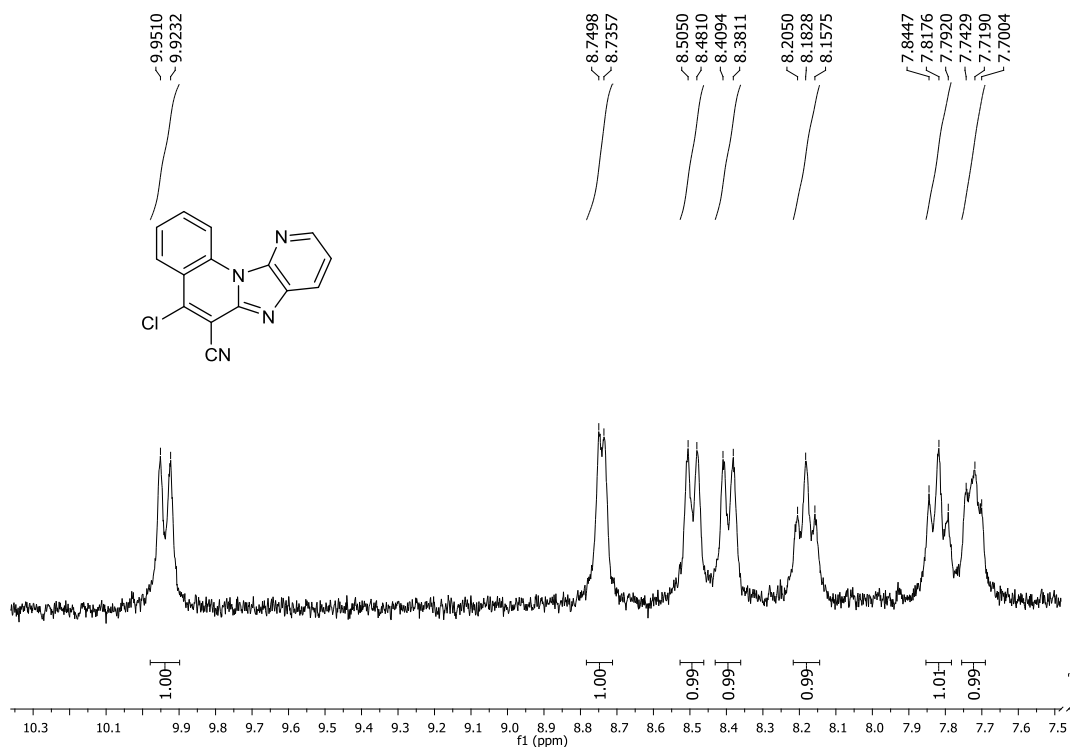
11. PRILOZI

Prilog 4

a) ^1H NMR spektr smjese 5-klorpirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **7**
5-klorpirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **8**

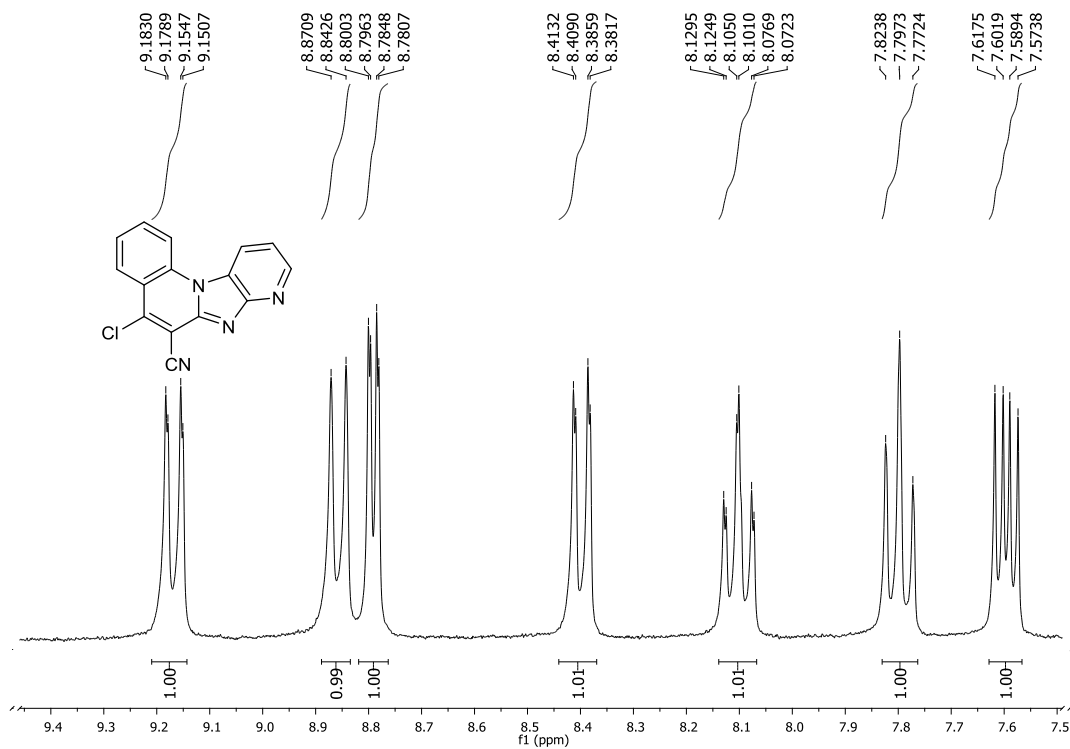


b) ^1H NMR spektr 5-klorpirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **7**



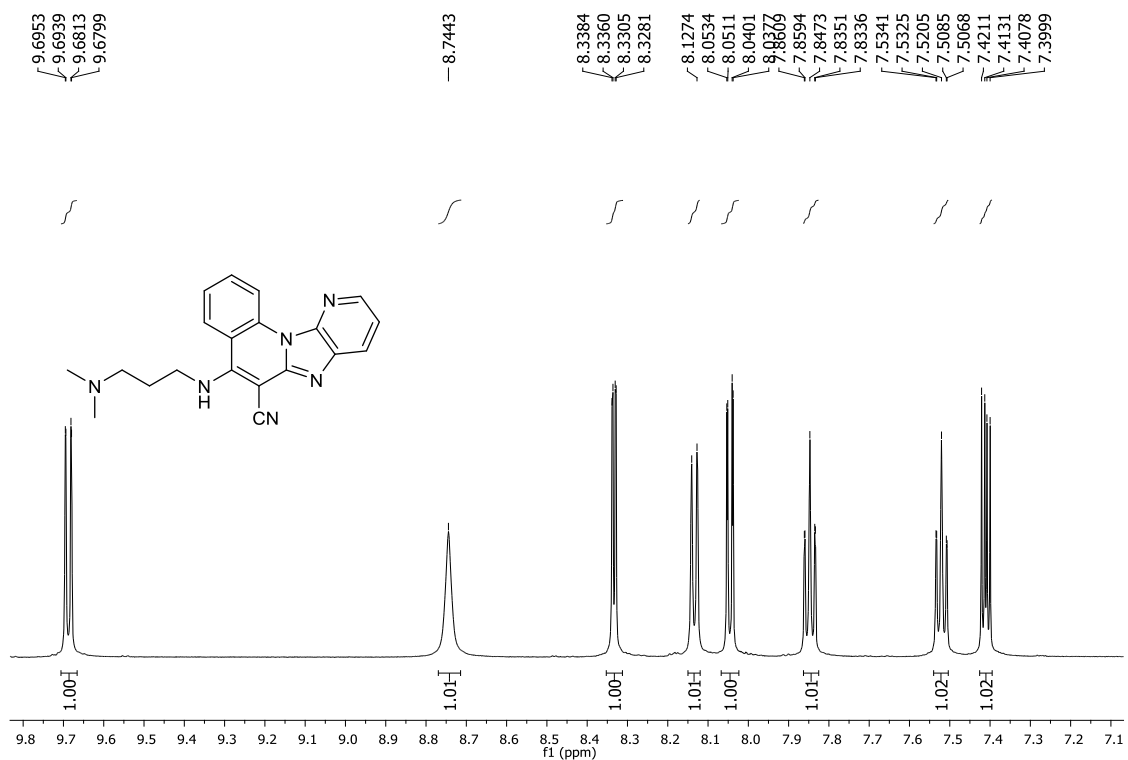
11. PRILOZI

c) ^1H NMR spektr 5-klorpirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **8**



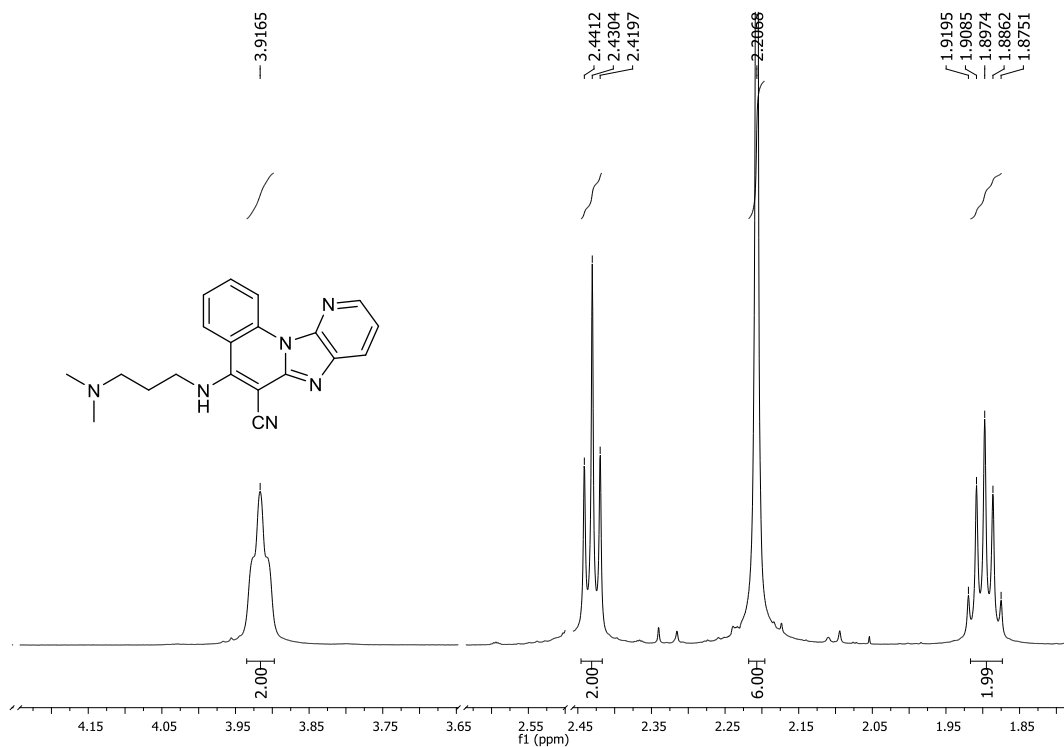
Prilog 6

a) aromatski dio ^1H NMR spektra 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **9**

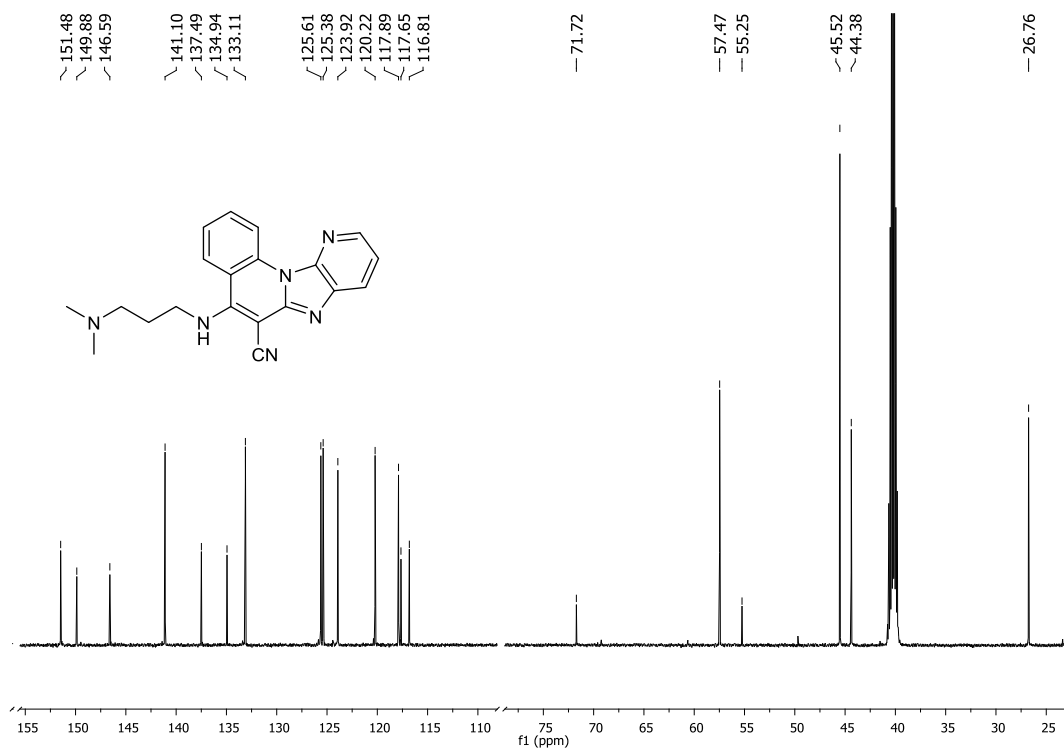


11. PRILOZI

b) alifatski dio ^1H NMR spektra 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **9**



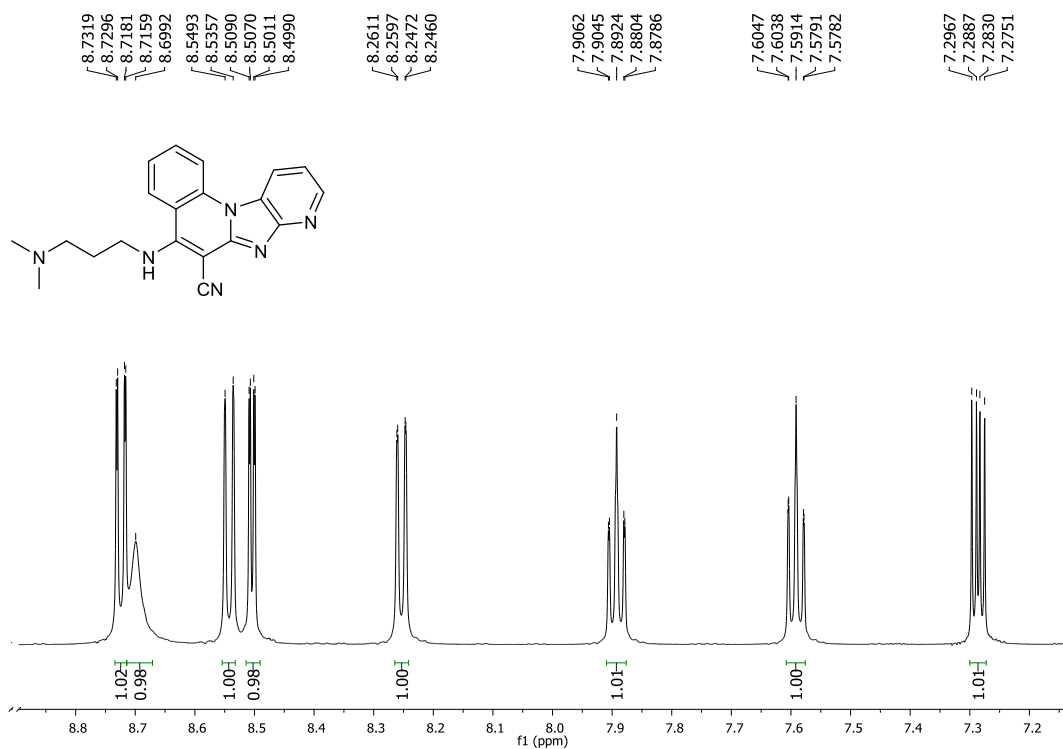
c) ^{13}C NMR spektar 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila **9**



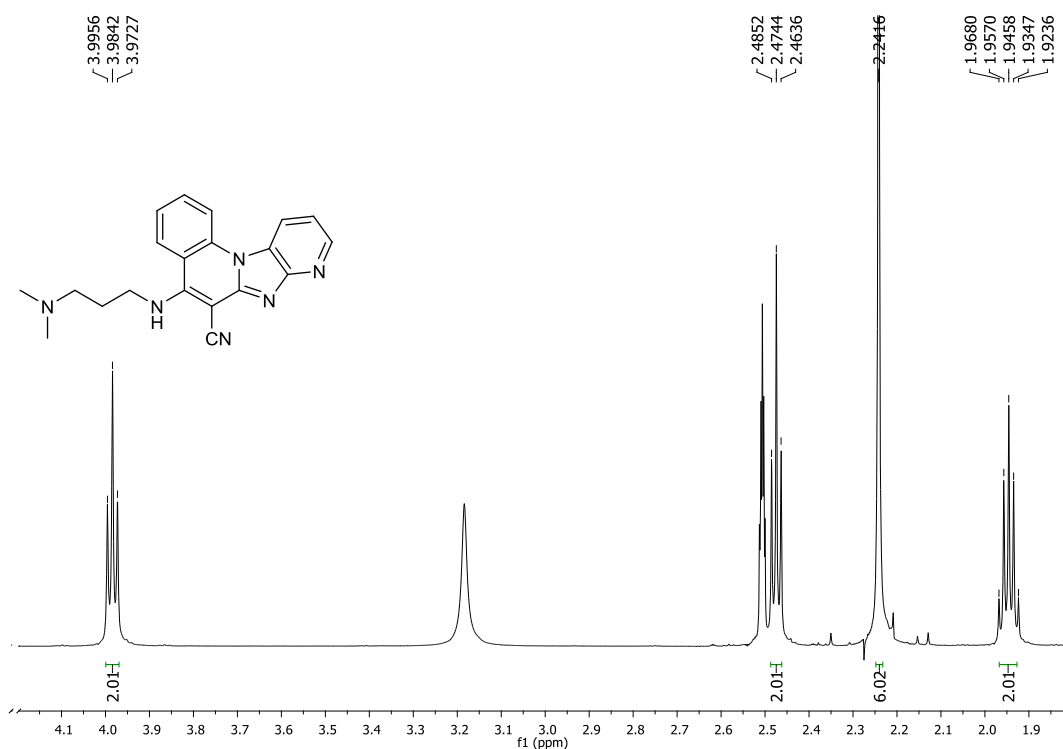
11. PRILOZI

Prilog 6

a) aromatski dio ^1H NMR spektra 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril **10**



b) alifatski dio ^1H NMR spektra 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril **10**



11. PRILOZI

c) ^{13}C NMR spektar spektra 5-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril **10**

