

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Borka Lučić

NOVI BIOLOŠKI AKTIVNI DERIVATI
IMIDAZO[4,5-*b*]PIRIDINA: SINTEZA, INTERAKCIJA S ctDNA
I ANTITUMORSKA AKTIVNOST *in vitro*

Zagreb, travanj 2010.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom dr. sc. Marijane Hranjec, docentice FKIT-a i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009. / 2010.

Popis kratica:

DNA –deoksiribonukleinska kiselina

RNA – ribonukleinska kiselina

UV/Vis – ultraljubičasta spektroskopija

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

LD – linearni dikroizam

CD – cirkularni dikroizam

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

Ks – konstanta stabilnosti

Tm – temperatura mekšanja

NaCaCo - kakodilatna kiselina / HCl, 0,02 moldm⁻³, I=0,05 moldm⁻³

PPA – polifosforna kiselina

IR – infracrvena spektroskopija

λ_{em} – valna duljina emisije

Sadržaj rada:

1. UVOD	1
1.1. UVOD	2
2. OPĆI DIO	3
2.1. Imidazo[4,5-<i>b</i>]piridini	4
2.1.1. Općenito o imidazo[4,5- <i>b</i>]piridinima	4
2.1.2. Biološki aktivni derivati imidazo-piridina	4
2.2. Interakcija organskih molekula s biomolekulama DNA i RNA	8
2.2.1. Uvod	8
2.2.2. Eksperimentalne metode ispitivanja nekovalentnih interakcija organskih molekula s polinukleotidima	11
2.2.2.1. Spektroskopske titracije	12
2.2.2.2. Promjena temperature mekšanja nukleotida	13
2.2.2.3. Viskozimetrija	15
2.2.2.4. Utvrđivanje modela vezanja ispitivanog spoja na DNA/RNA	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Opće napomene	18
3.2. Priprava 2-stiril-imidazo-piridina i njegovih derivata	19
3.3. Priprava 2-(2-kloro-5-nitro)stiril-imidazo-piridina i njegovih derivata	21
3.4. Ispitivanje interakcija nekih priređenih supstancija s ct-DNA	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Sinteza ciljanih spojeva	26
4.2. Ispitivanje interakcije spojeva 5 i 7 s ctDNA	31
4.2.1. UV/Vis baždarni dijagrami	31
4.2.2. UV/Vis titracije spojeva 5 i 7 s ct-DNA	33
4.2.3. Fluorimetrijski emisijski baždarni dijagrami spojeva 5 i 7	36
4.2.4. Fluorimetrijska titracija spojeva 5 i 7 s ctDNA	38
4.2.5. Promjena temperature mekšanja ctDNA	41
4.2.6. CD titracije	43
4.2.7. Viskozimetrija	44
4.2.8. Zaključak o načinu interakcije spojeva 5 i 7 s ctDNA	44
4.3. Ispitivanje antitumorske aktivnosti <i>in vitro</i>	45
5. ZAKLJUČAK	46
6. ZAHVALA	48
7. LITERATURA	50
8. SAŽETAK	53
9. SUMMARY	55
10. ŽIVOTOPIS	57
11. PRILOZI	59

1. UVOD

1.1. UVOD

U zadnjih nekoliko desetljeća veliki je interes organskih i medicinskih kemičara za sintezom heterocikličkih organskih molekula. Heterocikli i njihovi derivati pokazuju raznovrsna biološka i farmakološka djelovanja te stoga imaju potencijalnu primjenu u biomedicini za liječenje različitih bolesti.

Heterocikli su organski spojevi koji u svojoj strukturi imaju najmanje jedan atom koji nije ugljikov, a to su najčešće atomi dušika ili kisika, ali isto tako mogu sadržavati i atom sumpora ili fosfora.

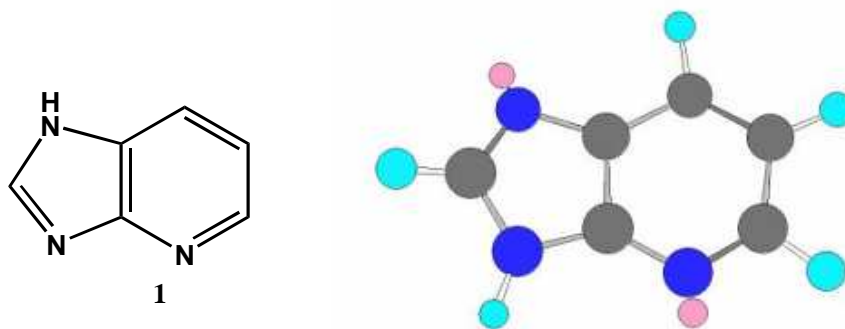
Imidazo[4,5-*b*]piridini predstavljaju vrlo važnu skupinu biološki aktivnih spojeva. Molekule koje u svojoj strukturi imaju navedenu jezgru smatraju se sintetskim analogima purina. Njihovi derivati posjeduju širok spektar biološke aktivnosti koji uključuje antitumorsku, antiviralnu, antimitotsku, tuberkulostatsku i antidijabetsku aktivnost,^{1,2,3,4,5} a mnogi derivati su pripremljeni kao potencijalni blokatori kod neuropatskih bolova ili kao sredstva za umirenje.

2. OPĆI DIO

2.1. Imidazo[4,5-*b*]piridini

2.1.1. Općenito o imidazo[4,5-*b*]piridinima

Imidazo[4,5-*b*]piridini su spojevi aromatskog karaktera koji u svojoj strukturi imaju dva heterociklička kondenzirana prstena, imidazolski i piridinski prsten.⁶ Njihova struktura prikazana je na Slici 1.

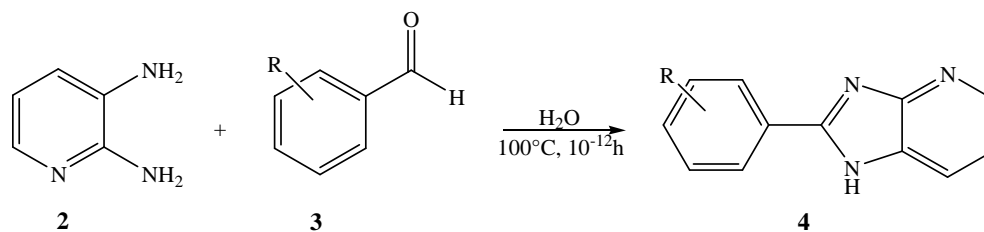


Slika 1. Struktura imidazo[4,5-*b*]piridina 1

2.1.2. Biološki aktivni derivati imidazo-piridina

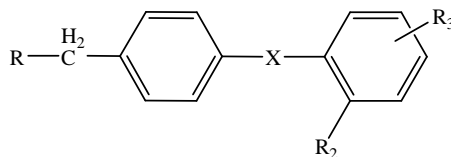
Imidazo[4,5-*b*]piridini mogu se na vrlo jednostavan i efikasan način prirediti iz odgovarajućih 2,3-diaminopiridina ili 3,4-diaminopiridina kondenzacijom s elektrofilnom karbonilnom grupom. Imidazo[4,5-*b*]piridini i ostali njihovi derivati vrlo su zanimljivo i do sada nedovoljno istraženo područje organske sintetske i medicinske kemije. Do sada je objavljeno nekoliko znanstvenih publikacija u kojima se opisuje biološka aktivnost imidazo[4,5-*b*]piridina.

R. P. Kale je sa skupinom indijskih istraživača 2008. godine proučavao djelovanje niza derivata imidazo[4,5-*b*]piridina koji su pokazali antihistaminsko djelovanje te djeluju kao inhibitori Aurora kinaze, koja ima ključnu ulogu u rastu i razvoju tumorskih stanica.⁷ Cilj je bio razviti jednostavnu i ekološki prihvatljivu metodu sinteze 2-supstituiranih-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina. Reakcijom 2,3-diamino-piridina i supstituiranih aril-aldehida, koristeći vodu kao otapalo, bez katalizatora i oksidansa, prema Shemi 1. priređen je niz različito supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **4a-4o**.

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

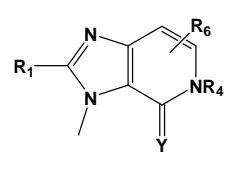
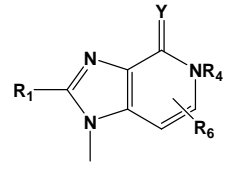
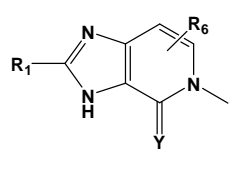
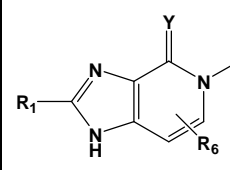
Spoj	R	Talište (°C)	Iskorištenje (%)
4a	C ₆ H ₅	288-290	87
4b	3-CH ₃ -C ₆ H ₄	240-242	84
4c	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	260-263	86
4d	4-OMe-C ₆ H ₄	228-230	83
4e	4- <i>N,N</i> -(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄	>300	83
4f	2-Cl-C ₆ H ₄	190-192	83
4g	3-Cl-C ₆ H ₄	298-190	86
4h	4-Cl-C ₆ H ₄	>300	87
4i	3-F-C ₆ H ₄	>300	87
4j	4-F-C ₆ H ₄	221	85
4k	3-Br-C ₆ H ₄	>300	83
4l	4-Br -C ₆ H ₄	>300	83
4m	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	>300	85
4n	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	>300	84
4o	2-piridil	240-242	83

Skupina njemačkih autora priredila je niz derivata imidazo-piridina, opće formule prikazane na Slici 2.⁸



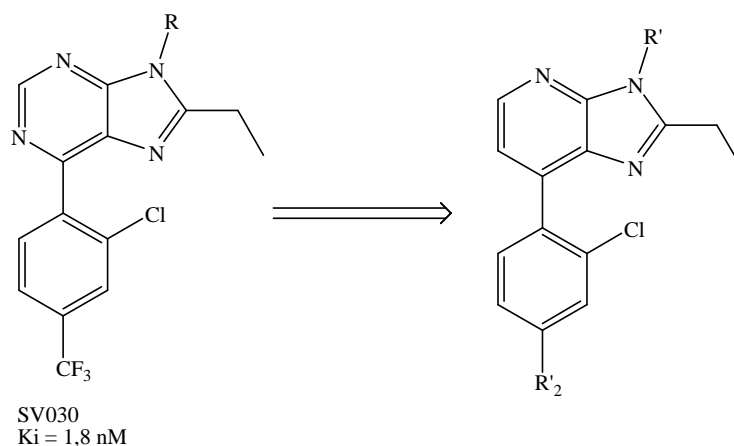
Slika 2. Priredeni derivati imidazo-piridina

Tablica 2. Priredeni derivati imidazo-piridina

R				
R₁	(A) alkil (C1-C6)			
R₂	COOH, CN, NO ₂ , NH ₂ , NHCOR ₅			
R₃	H, halogen, OA, NO ₂			
R₄	H, R5, cijanoalkil, karboksialkil			
R₅	Alkil (C1-C5)			
R₆	H, halogen			
X	-CO-, -O-, -NH-CO-, -CO-NH-, -O-CH ₂ -			
Y	O, S			

Sinteza je provođena u vodenom mediju, na temperaturi od 100° C, 10-12 h. Reakcija je praćena TLC (diklormetan: metanol; 9:1) kromatografijom. Produkti su dobiveni u velikim iskorištenjima, što je prikazano u Tablici 3.

Skupina američkih autora proućavala je ligande sa imidazo[4,5-*b*]piridinom kao jezgrom koji imaju veliki afinitet prema CRF receptoru. CRF ima bitnu ulogu kod mnogih neuropsihijatrijskih poremećaja kao što su tjeskoba, post-traumatski stresni poremećaj i depresija.⁹ Derivat sa purinskom jezgrom pokazao je najveći afinitet prema CRF receptoru. Nova serija imidazo[4,5-*b*]piridina, prikazanih općom formulom na Slici 3., pokazala je poboljšanim, jaćim biološkim i fizićkim svojstvima od purinskih baza.



Slika 3. Derivati s purinskom i imidazo[4,5-*b*]piridinskom jezgrom

Tablica 3. Purinske i imidazo[4,5-*b*] jezgre

OPĆI DIO

SPOJ	R	R'	R' ₁
2	cPr ₂ CH	CH(cPr)Me	Cl
3	cPr ₂ CH	CH(cPr)Et	Cl
4	cPr ₂ CH	CH(cPr)Et	Cl
5	cPr ₂ CH	CH(cBu)Me	Cl
6	cPr ₂ CH	CH(nPr)Me	Cl
7	cPr ₂ CH	CH ₂ EtMe	Cl
8	cPr ₂ CH	CH ₂ Et ₂	Cl
9	cPr ₂ CH	CH(cPr)C ₂ H ₄ OMe	Cl
10	cPr ₂ CH	CH(cBu)C ₂ H ₄ OMe	Cl
11	cPr ₂ CH	CH(Et)CH ₂ OMe	CF ₃
12	cPr ₂ CH	CH(Et)C ₂ H ₄ OMe	CF ₃
13	cPr ₂ CH	CH(cBu)C ₂ H ₄ OMe	OCF ₃
14	cPr ₂ CH	CH(cBu)C ₂ H ₄ OMe	CF ₃
15	cPr ₂ CH	CH(nPr)Me	Cl
16	cPr ₂ CH	CH(Et)C ₂ H ₄ OMe	CF ₃

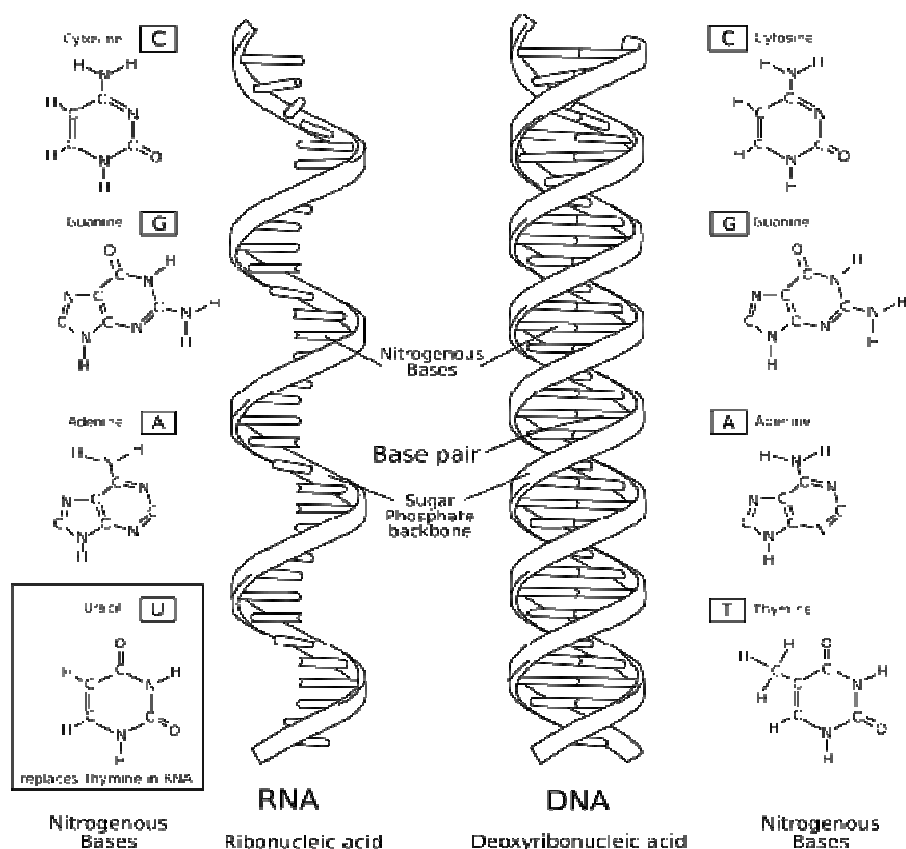
2. 2. Interakcija organskih molekula s biomolekulama DNA i RNA

2.2.1. Uvod

Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama DNA i RNA proučavaju se već više desetljeća, od otkrića dvostruke uzvojnice DNA, Watsona i Cricka, kada su otkrivene temeljne strukturne i funkcijske značajke ove biološke makromolekule, između ostalog replikacija i transkripcija.^{10,11} Njihovo je otkriće omogućilo razumijevanje strukturnih, fizikalno-kemijskih, termodinamičkih i kinetičkih značajki koje se dešavaju prilikom interakcije organskih molekula s DNA DNA je polimer deoksiribonukleotida, a molekula se sastoji od dva desna polinukleotidna lanca koji se pravilno zavijaju u prostoru u suprotnom smjeru dok se RNA molekula sastoji od jednog lanca (Slika 4.). Lanci se sastoje od purinskih i pirimidinskih baza, šećera deoksiriboze, te fosfatnih skupina. Purinske i pirimidinske baze stvaraju parove preko vodikovih veza pri čemu se timin (T) veže s adeninom (A) kod DNA a adenin (A) s uracilom (U) kod RNA, te gvanin (G) s citozinom (C) i kod DNA i RNA.

U strukturi DNA nukleotidni je dio povezan uzajamno fosfatnim jedinicama preko položaja 3 i 5 susjednih pentoznih jedinica, tj. oni su fosfatni esteri 1,3-diola, a svaki se nukleotidni dio razlikuje s obzirom na postojeću bazu.

Postoje tri osnovne konformacije uzvojnice DNA koje se razlikuju u udaljenosti parova baza koja je potrebna za potpuni zaokret, dimenzijama utora, položajima šećera te kutovima između parova baza i osi uzvojnice. U fiziološkim uvjetima gotovo sve molekule DNA imaju *B-DNA* oblik koji ima mali (eng. „*minor groove*”) utor širok 6 Å i veliki (eng. „*major groove*”) utor širok 12 Å.



Slika 4. Prikaz struktura molekula DNA i RNA

Svrha navedenih znanstvenih istraživanja tako je sinteza selektivnijih i biološki aktivnijih molekula koje će pokazati interakciju sa specifičnim sekvencama DNA molekule ili prepoznati stanice koje sadrže specifične DNA molekule kao i razjašnjenje osnove djelovanja prirodnih i sintetskih lijekova koji se vežu na DNA, određivanje prirode i uzroka promjena DNA pod utjecajem okoliša i kontrola osnovnih funkcija DNA *in vivo* i *in vitro* radi genske terapije te korištenja u dijagnostici.¹² Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama mogu biti **nepovratne**, ako nastaju kovalentne veze s polinukleotidima ili ako dolazi do cijepanja polinukleotidnog lanca te **povratne** interakcije koje se svode na nastajanje ravnotežnog kompleksa male molekule s polinukleotidom.

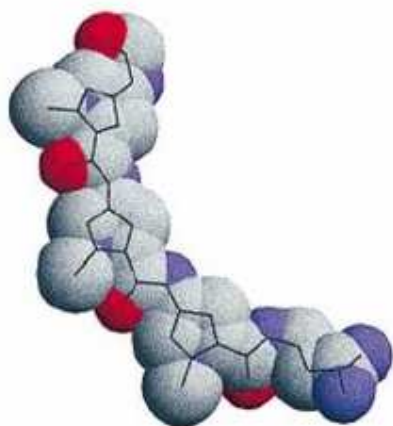
Postoje tri glavna načina interakcije supstancije s DNA molekulom:¹³

1. Kontrola transkripcijskih faktora i polimeraza pri čemu supstancija dolazi u interakciju s proteinom koji se veže na DNA

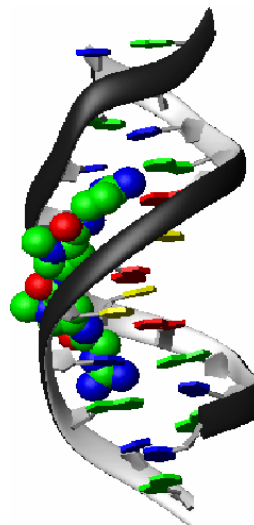
2. Vežanje RNA na dvostruku uzvojnica DNA pri čemu se dobije struktura trostruke uzvojnice ili stvaranje hibridne RNA koja s jednostrukom uzvojnicom DNA stvara DNA-RNA hibrid pri čemu dolazi do onemogućavanja transkripcijske aktivnosti
3. Vežanje malih aromatskih planarnih molekula na dvostruku uzvojnica DNA slijedećim načinima:
 - **interkaliranjem** između parova baza
 - vežanjem u mali i veliki utor DNA („groove binders“)
 - **kombinacija interkaliranja s vežanjem u mali utor DNA**
 - kao **alkilirajući agensi**

Spojevi koji se vežu u jedan od utora uzvojnica DNA ili RNA (engl. groove binding) predmet su opsežnih istraživanja radi niza antibiotika i antitumorskih lijekova čije djelovanje se temelji na spomenutom modelu vežanja. Konveksni oblik molekula karakterističan za spomenutu grupu spojeva odgovara konkavnom obliku utora dvostrukih uzvojnica DNA i RNA dok raspored stalnih pozitivnih naboja omogućuje interakcije s fosfatima polinukleotida. Velika većina spojeva pokazuje izrazitu selektivnost prema manjem utoru dvostruke uzvojnice DNA.^{14,15}

a)



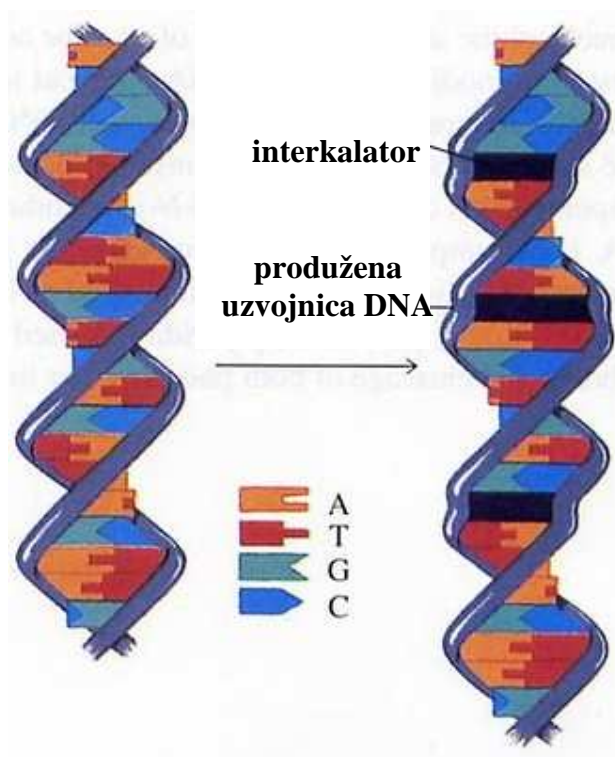
b)



Slika 5. a) Konveksni oblik molekula „groove bindersa“; **b)** Vežanje „groove bindersa“ u mali utor

Male planarne aromatske molekule najčešće se vežu na DNA molekulu interkalacijskim reverzibilnim mehanizmom. Nastajanje takvih interkalativnih kompleksa

značajno stabilizira i ukrućuje polinukleotidni lanac te dolazi do produljenja uzvojnice, njenog “odvijanja” i deformacije.



Slika 6. Interkaliranje u DNA

Strukturna, fizikalna i kemijska svojstva aromatskih sustava interkalatora i supstituenata izrazito utječu na svojstva nastalih kompleksa s DNA i RNA te se zahvaljujući tome niz interkalatora selektivno veže na određene slijedove DNA odnosno RNA.^{16,17} Interkalativni način vezanja ima ključnu ulogu u djelovanju mnogih klinički korištenih antitumorskih lijekova (amsakrin, elipticin, daunomicin, adriamicin) te nekih antibiotika (aktinomicin D, nogalamicin i derivati) blokirajući djelovanje topozimeraze II.¹⁸

2.2.2. Eksperimentalne metode ispitivanja nekovalentnih interakcija organskih molekula s polinukleotidima

Najčešće korištene eksperimentalne metode su:

1. Eksperimenti koji prate promjene strukture i stabilnosti polinukleotida uzrokovane vezanjem ispitivanog spoja:
 - promjena viskoziteta otopine DNA / RNA

- promjena sedimentacijskog koeficijenta ili elektroforetske pokretljivosti cirkularne DNA
 - pomaci u niže magnetsko polje signala fosfatnog dijela polinukleotida u ^{31}P NMR spektru polinukleotida
 - promjena točke “mekšanja” dvostruke uzvojnice nakon kompleksa s ispitivanim spojem
2. Metode temeljene na promjeni spektroskopskih svojstava ispitivanog spoja (UV/Vis, fluorescencijska i ^1H NMR spektroskopija).
 3. Metode koje upućuju na pravilnost orijentacije molekula ispitivanog spoja te dinamiku i homogenost načina vezanja na polinukleotid – CD i LD spektroskopija, polarizacija fluorescencije.

2.2.2.1. Spektroskopske titracije

Vezivanje organskih molekula na polinukleotide najčešće uzrokuje značajne promjene u njihovim spektroskopskim svojstvima (UV/Vis, fluorescencija, ^1H NMR).¹⁹ Izobestične točke u UV/Vis titracijama ispitivanog spoja s polinukleotidima upućuju na nastajanje samo jednog tipa kompleksa. Visoka osjetljivost fluorescencijskih metoda omogućava eksperimente pri mikromolarnim i nižim koncentracijama ispitivanog spoja, tj. uvjetima sličnim onima u biološkim sustavima. Budući da interkalativni model vezivanja jedini pruža mogućnost jasne definicije veznih mjesta na polinukleotidu, razvijen je niz jednadžbi za izračun konstante stabilnosti K_S nastalih kompleksa na osnovu podataka spektroskopskih titracija ispitivanog spoja s polinukleotidima. Osnova svih jednadžbi je Scatchardova jednadžba (I).²⁰

$$r / c_v = K_S (n - r)$$

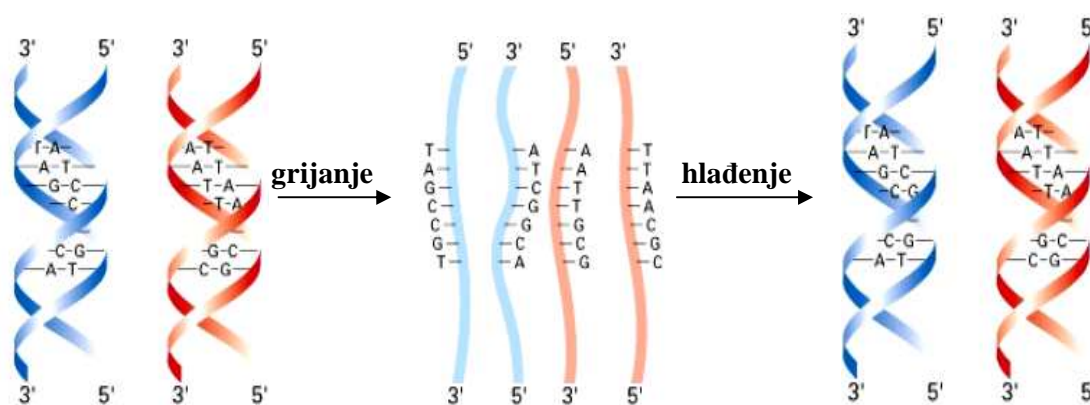
gdje je c_v koncentracija interkaliranog spoja, n je omjer [vezani spoj]/ [polinukleotid], omjer r =[spoj]/[polinukleotid] i K_S konstanta stabilnosti kompleksa.

Ovisno o tome da li je koncentracija polinukleotida ([polinukleotid]) definirana kao koncentracija purinskih i pirimidiniskih baza, parova purinskih i pirimidiniskih baza, odnosno najčešće koncentracija fosfata, u literaturi se mogu naći razne varijante omjera n . Pri povoljnim eksperimentalnim uvjetima interkaliranje daje linearnu ovisnost r/c_v o r te je iz dobivenog pravca moguće izračunati konstantu stabilnosti K_S i vrijednost omjera n .

Jednadžba (I) zahtjeva točno poznavanje spektroskopskih svojstava ispitivanog spoja i nastalog kompleksa, što kod posljednjeg vrlo često nije moguće eksperimentalno ustanoviti. Iz tog razloga pouzdanija je analiza podataka titracije pomoću Scatchardove jednadžbe nelinearnom regresijskom metodom. Spomenuti model ne uzima u obzir razlike između kooperativnog, ne-kooperativnog i anti-kooperativnog utjecaja molekule interkalatora na interkaliranje slijedeće molekule u susjedna vezna mjesta. Najpouzdaniji rezultati K_S i n mogu se dobiti temeljem titracija provedenih pri većem suvišku veznih mjesta polinukleotida (omjer $r < 0.1$) kod kojeg se može smatrati da se molekule interkalatora vezuju na izolirana, međusobno neovisna vezna mjesta. Ukoliko je moguće, omjer n treba odrediti pomoću barem dvije neovisne metode (npr. UV/Vis ili fluorimetrijska titracija, ovisnost temperature mekšanja o omjeru r).

2.2.2.2. Promjena temperature mekšanja nukleotida

Dvostruka uzvojnica DNA je termički nestabilna i ima određenu vrijednost temperature mekšanja T_m pri kojoj dolazi do odmatanja dvaju polinukleotidnih lanaca, pa se ova pojava još naziva i *termalno denaturiranje* (Slika 8.). Slijedovi parova baza A-T, koji su stabilizirani dvjema vodikovim vezama, razdvajaju se pri nižim temperaturama od slijedova parova baza G-C, koji su stabilizirani vodikovim vezama. Svaki dvolančani polinukleotid okarakteriziran je specifičnom T_m , odnosno temperaturom kod koje je polovina nukleinske kiseline u dvolančanom, a druga polovina u jednolančanom obliku.

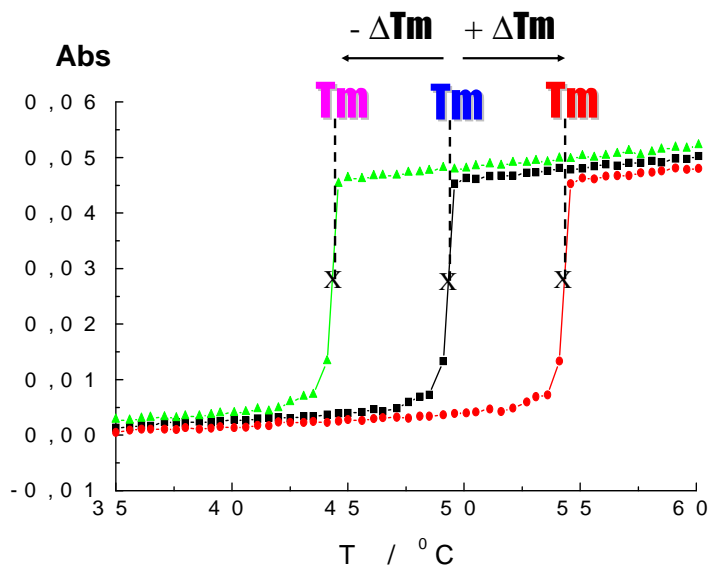


Slika 7. Proces mekšanja dvostruke uzvojnice DNA ili RNA molekule

Proces mekšanja može se pratiti različitim metodama (CD, NMR, viskozimetrija, elektroforeza, kalorimetrija), a najčešće se koristi UV/Vis spektroskopija.

OPĆI DIO

Apsorbancija otopine dvolančanog polinukleotida se povećava s udjelom jednolančanih polinukleotida što izaziva hiperkromni efekt. Oblik dobivene krivulje kod λ_{\max} određenog polinukleotida je sigmoidalnog oblika, a točka infleksije je T_m .²¹



Slika 8. Krivulje termalnog denaturiranja DNA i/ili RNA

Većina spojeva koja se veže na nukleinske kiseline pokazuje veći afinitet prema dvolančanom nego jednolančanom obliku, što uzrokuje stabiliziranje dvolančane uzvojnice i veći T_m .²² Interkalatori stabiliziraju dvolančane DNA i RNA i vežu se bez određene specifičnosti prema slijedovima parova baza A-T i G-C. Spojevi koji se vežu u mali utor DNA obično stabiliziraju dvolančane polinukleotide bogate sekvencama A-T, dok kod dvolančane RNA uzrokuju male promjene.²³

Prednost ove metode je jednostavnost, osjetljivost i reproducibilnost te male količine spoja i polinukleotida koje se koriste. Metoda zahtijeva spojeve stabilne pri visokim temperaturama i ne daje specifične informacije o strukturi kompleksa spoja i polinukleotida. Ovom metodom moguće je pri istim eksperimentalnim uvjetima uspoređivati afinitete niza spojeva koji se vežu istim načinom na određeni polinukleotid, odnosno uspoređivati afinitete jednog spoja prema više različitih polinukleotida.

2.2.2.3. Viskozimetrija

Utjecaj ispitivanog spoja na duljinu polinukleotidne uzvojnice uglavnom se prati mjerenjem viskoziteta otopine sonificiranih, štapićastih fragmenata DNA polinukleotida (molekulska masa oko $2,5 \times 10^5$) kao funkcije različitih omjera r . Pokazalo se da pri spomenutim uvjetima viskoznost otopine ovisi o produljenju uzvojnice uzrokovanom vezanjem spoja po jednadžbi (I):²⁴

$$L / L_0 = 1 + m r$$

gdje je L/L_0 relativno produljenje, omjer $r = ([\text{spoj}] / [\text{DNA}])$, a m nagib pravca ovisnosti L/L_0 o r .

Klasični interkalatori poput etidijevog bromida i akridinijevih derivata daju vrijednosti $m \approx 0,8 - 0,9$. Interkaliranje mora uzrokovati produljenje dvolančane uzvojnice te se bitno manja vrijednost m od gore spomenute smatra potvrdom neinterkalativnog načina vezanja. Obrnuti zaključak ne vrijedi pošto neki spojevi, koji se vežu u manji utor DNA i RNA, uzrokuju produljenja slična vrijednostima interkalatora. Nedostatci metode su relativno visoke koncentracije spoja i DNA potrebne za mjerenje ($c \approx 10^{-5} - 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) te nepouzdanost rezultata u slučaju ispitivanih spojeva koji vezanjem uzrokuju savijanje štapićaste dvostruke uzvojnice time prividno smanjujući produljenje uzrokovano interkaliranjem. Također, ova metoda ne razlikuje doprinos neinterkalativnog načina vezanja prisutnog kod većine interkalatora kod uvjeta bliskih zasićenju veznih mjesta DNA ($r \approx 0,25$).

2.2.2.4. Utvrđivanje modela vezanja ispitivanog spoja na DNA/RNA

S obzirom da nije moguće jednoznačno utvrditi način vezivanja na polinukleotide samo jednom metodom, on se utvrđuje kombinacijom rezultata više metoda, koje s velikom sigurnošću upućuju na interkalativni, odnosno neinterkalativni način vezanja malih molekula na polinukleotide (Tablica 4.).²⁵

Tablica 4. Kriteriji prema kojima se utvrđuje model vezanja

METODA	MODEL VEZIVANJA	
	Interkalativni	Neinterkalativni
viskozimetrija	produljenje ($m \approx 0,9$) i odvijanje ($17 - 26^0$) dvolančane uzvojnice za vrijednosti slične ili veće od onih za standardne interkalatore	vrlo malo ili nikakvo produljenje i odvijanje dvolančane uzvojnice (postoje iznimke)
temperatura mekšanja	pozitivne vrijednosti ΔT_m ; interkaliranje stabilizira dvostruke uzvojnice bez veće selektivnosti između analoga DNA i RNA (postoje iznimke)	moгуće pozitivne i negativne vrijednosti ΔT_m ; većinom izrazita DNA selektivnost (postoje iznimke)
UV/Vis i FLUO spektri	batokromni i hipokromni efekt u spektrima ispitivanog spoja	vrlo male promjene (postoje iznimke)
^1H NMR	izrazito proširenje (>20 Hz) te pomaci u više magnetsko polje signala ispitivanog spoja	pomaci u više ili niže magnetsko polje, nema proširenja signala
afinitet po Scatchardu	konstante stabilnosti K_S ne ovise bitno o promjeni ionske jakosti, omjer $n < 0.25$	omjer $n > 0.25$, spektroskopske promjene izrazito ovise o ionskoj jakosti, konstante stabilnosti K_S se ne mogu direktno računati jer nije moguće definirati koncentraciju veznih mjesta

4. EKSPERIMENTALNI DIO

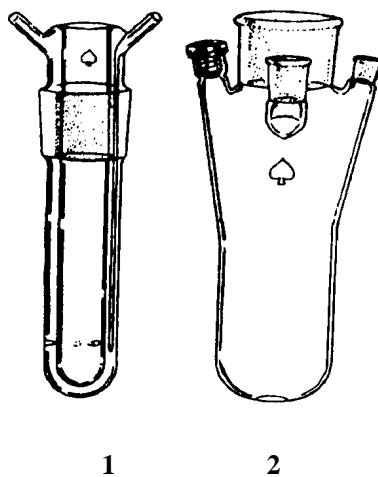
3.1. Opće napomene

Tališta priređenih spojeva određena su Kofler Mikroheiztisch aparatu Büchi 535 i nisu korigirana. IR spektri snimljeni su na spektrometru FTIR-ATR Vertex 70 Bruker spektrofotometar direktnim nanošenjem uzorka na dijamantnu podlogu.

^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Varian Gemini 300, na 300 odnosno 75 MHz, instrumentu Bruker AV-600, na 600 odnosno 150 MHz te Bruker Avance DRX 500 na 500 MHz. Svi NMR spektri snimani su u $\text{DMSO-}d_6$ kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (J) u Hz.

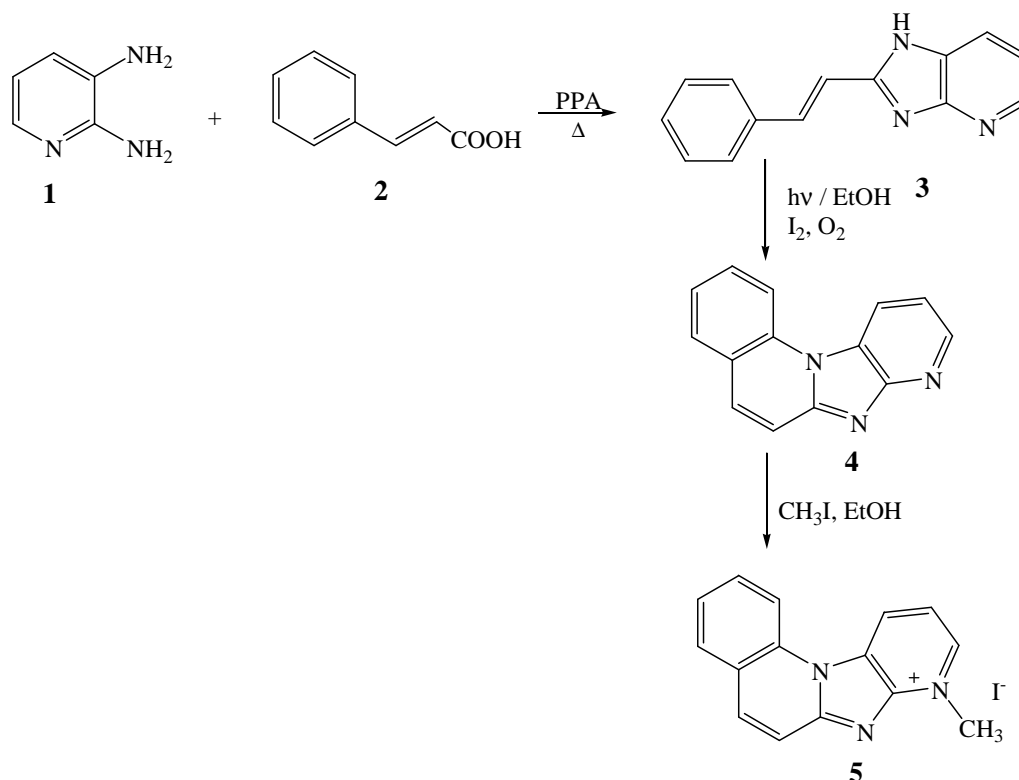
UV spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 50 i Varian Cary 100 spektrofotometrima a fluorescencijski spektri snimljeni su na Cary Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 1 cm te volumena 3 ili 1 cm^3 . CD spektri snimani su na JASCO Circular Dichroism spektrofotometru.

Fotokemijska reakcija provedena je u pyrex reaktoru s unutarnjim osvjetljavanjem (imerzijski reaktor) kod kojeg je izvor svjetla uronjen u reakcijsku otopinu. Imerzijski reaktor se sastoji od dva dijela: imerzijskog, koji se uranja u reakcijsku smjesu i reakcijske posude. Imerzijski dio, u kojem je smještena visokotlačna živina lampa, služi istodobno i kao filter i kao hladilo. Kao izvor svjetlosti korištena je visokotlačna živina lampa od 400 W (kućna proizvodnja).



Slika 9. Reaktor s unutarnjim osvjetljavanjem: **1**-imerzijski dio, **2**-reakcijska posuda

3.2. Priprava 2-stiril-imidazo-piridina i njegovih derivata



Shema 2. Priprava acikličkog derivata imidazo-piridina **3** i njegovih cikličkih derivata **4** i **5**

3.2.1. Priprava 2-stiril-1H-imidazo[4,5-b]piridina **3**

U okruglu tikvicu stavi se 2,04 g (13,76 mmol) cimetne kiseline **1** i 1,50 g (13,76 mmol) 2,3-diaminopiridina **2** te se doda oko 10 g PPA. Reakcijska se smjesa zagrijava na 180° 2,5 h. Topla se reakcijska smjesa izlije na smjesu led/voda i zaluži otopinom NaOH na pH=9. Istaloženi se produkt profiltrira i ispere vodom. Dobiveno je 0,71 g (23%) praškastog produkta bijele boje; T.t = 200 - 201°C.

IR (dijamant) ν / cm^{-1} : 3060, 1715, 1604, 1522; UV (EtOH) λ_{max} : 336, 266;

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ/ppm): 13,20 (šs, 1H, NH), 7,96 (šs, 1H, $H_{\text{arom.}}$), 7,77 (d, 1H, $J=16,50$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,68 (d, 2H, $J=7,60$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,45 (t, 1H, $J=7,30$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,39 (t, 1H, $J=3,30$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,22 (d, 1H, $J=4,80$, $H_{\text{pirid.}}$), 7,20 (d, 1H, $J=4,80$ Hz, $H_{\text{pirid.}}$), 7,18 (d, 1H, $J=16,40$, $H_{\text{arom.}}$);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 144,47 (d), 143,20 (s), 139,80 (s), 137,44 (d), 135,93 (s), 130,54 (s), 129,60 (d), 129,49 (d, 2C), 129,23 (d), 128,55 (d), 127,71 (d, 2C), 118,45(d).

3.2.2. Priprava 7,8,11b-triazabenzocfluorena 4

Otopina 0,60 g (2,70 mmol) 2-stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina **3** u 400 mL etanola uz dodatak joda. Otopina se osvjetljava u posudi UV-Hg lampom od 400 W uz propuhivanje zrakom 44h. Otopina se upari na 1-2 mL. Dobiveni se spoj **4** razdvaja kolonskom kromatografijom na silikagelu kao adsorbensu i sistemu diklormetan/metanol. Dobiveno je 0,11 g (18%) bijelog praškastog produkta; T.t. = 140 - 141 °C

IR (dijamant) ν / cm^{-1} : 3055, 2917, 1694, 1608, 1529, 1453. UV (EtOH) λ_{max} : 366, 348, 331, 247. ^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 9,83 (d, 1H, $J=8,60$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,65 (dd, 1H, $J_1=4,65$ Hz, $J_2=1,40$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,70 (d, 1H, $J=7,50$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,05 (d, 1H, $J=9,27$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,90 (t, 1H, $J=7,40$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,67 (d, 1H, $J=9,57$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,63 – 7,60 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 147,60 (s), 145,02 (s), 142,91 (d), 136,32 (s), 127,06 (s), 134,13 (s), 133,12 (d), 130,36 (d), 129,20 (d), 127,35 (d), 125,05 (d), 122,45 (s), 117,16 (d), 116,78 (d);

3.2.3. Priprava 8-metil-7,8,11b-triazabenzocfluoren-jodida 5

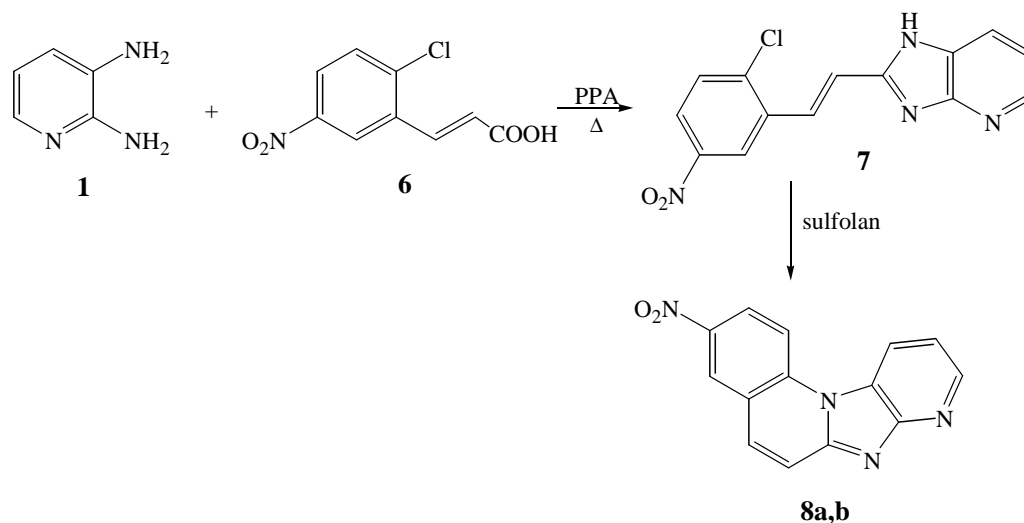
U tikvicu se stavi 0,04 g (0,18 mmol) spoja **4** i 12 μL MeI i 1 mL DMF. Smjesa se miješa na magnetnoj mješalici 24 sata. Dobiveno je 0,02 g (28%) smeđeg praškastog produkta; T.t. = $>300^\circ\text{C}$

IR (dijamant) ν / cm^{-1} : 2916, 1661, 1619, 1552, 1433; UV (EtOH) λ_{max} : 361, 344, 328, 225.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 10,67 (d, 1H, $J=8,70$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 9,00 (dd, 1H, $J_1=4,60$ Hz, $J_2=1,44$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,91 (d, 1H, $J=9,70$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,80 (dd, 1H, $J_1=7,53$ Hz, $J_2=1,42$ Hz), 8,43 (d, 1H, $J=9,70$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,41 (dd, 1H, $J_1=8,20$ Hz, $J_2=1,85$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,24 (t, 1H, $J=8,10$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,05 (dd, 1H, $J_1=8,37$ Hz, $J_2=4,85$ Hz), 7,95 (t, 1H, $J=7,70$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 4,31(s, 3H, H_{metil});

^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 146,40 (d), 143,50 (s), 141,60 (s), 140,91 (d), 133,56 (d), 132,74 (s), 130,40 (d), 127,70 (d), 126,52 (s), 123,50 (d), 123,47 (s), 122,48 (d), 118,17 (d), 109,19 (d);

3.3. Priprava 2-(2-kloro-5-nitro)stiril-imidazo-piridina i njegovih derivata



Shema 3. Priprava acikličkog derivata imidazopiridina **7** i njegovog cikličkog derivata **8a,b**

3.3.1. Priprava 2-(2-kloro-5-nitro)stiril-1H-imidazo[4,5-b]piridina **7**

U okruglu tikvicu stavi se 1,00 g (9,17 mmol) 2,3-diaminopiridina **1** i 2,09 g (9,17 mmol) 3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilne kiseline **6** te se doda oko 10 g PPA. Reakcijska se smjesa zagrijava na 180°C 3 h. Topla se reakcijska smjesa izlije na smjesu led/voda i zaluži otopinom NH₄OH do pH=10. Istaloženi se produkt profiltrira i prekrizalizira iz etanola uz dodatak aktivnog ugljena. Smjesa se ostavi u hladnjaku. Filtriranjem je dobiveno 1,48 g (53%) svijetlo- smeđeg praškastog produkta; T.t . = 155 - 157 °C;

IR (dijamant) ν / cm^{-1} : 3069, 2919, 1736, 1606, 1520; UV (EtOH) $\lambda_{\text{max}} = 339$;

¹H NMR (DMSO-d₆) (δ /ppm): 13,32 (šs, 1H, NH), 7,96 (s, 1H, H_{arom.}), 8,36 (d, 1H, J= 3,13 Hz, H_{py.}), 8,19 (d, 2H, J=8,20 Hz), 8,06 (d, 1H, J=16,32 Hz), 8,03 (d, 1H, J=4,50 Hz), 7,84 (d, 1H, J=8,82 Hz), 7,51 (d, 1H, J= 16,62 Hz), 7,27 – 7,23 (m, 1H).

¹³C NMR (DMSO-d₆) (δ /ppm): 151,20 (s), 148,06 (s), 146,90 (s), 144,41 (d), 139,02 (s), 134,85 (s), 131,33 (d), 128,86 (d), 126,47 (d), 124,34 (d), 123,75 (s), 123,10 (d), 121,91 (d), 118,30 (d);

3.3.2. Priprava 3-nitro-7,8,11b-triazabenzoc[*c*]fluorena 8a,b

U okruglu tikvicu stavi se 0,50 g (1,16 mmol) spoja **7** i 1,5 mL sulfolana. Smjesa se grije u pješčanoj kupelji na temperaturi 280°C 45 min. Smjesi se zatim doda vode, a nastali se talog profiltrira. Produkt se prekrizalizira iz etanola. Filtriranjem je dobiveno je 0,18 g (57%) žutog praškastog produkta. T.t. = > 261°C.

IR (dijamant) ν / cm^{-1} : 3056, 1632, 1616, 1598, 1529. UV (EtOH) $\lambda_{\text{max}} = 302, 335, 351, 369$;

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ/ppm): a) 9,93 (d, 1H, $J = 9,27$ Hz, H_{arom}), 9,03 (d, 1H, $J = 2,34$ Hz, H_{arom}), 8,40 (dd, 1H, $J_1 = 8,12$ Hz, $J_2 = 1,25$ Hz, H_{arom}), 8,23 (d, 1H, $J = 9,60$ Hz, H_{fluor}), 7,82 (d, 1H, $J = 9,63$ Hz, H_{fluor}), 7,66 (ABq, $J_1 = 8,16$ Hz, $J_2 = 4,71$ Hz, H_{arom}); b) 9,13 (d, 1H, $J = 8,25$ Hz, H_{arom}), 9,08 (d, 1H, $J = 2,49$ Hz, H_{arom}), 8,95 (dd, 1H, $J = 9,27$ Hz, H_{arom}), 8,76 (d, 1H, $J = 4,62$ Hz, H_{arom}), 8,54 (d, 1H, $J_1 = 9,24$ Hz, $J_2 = 2,52$ Hz, H_{arom}), 8,28 (Abq, $J = 9,69$ Hz, H_{arom}), 7,89 (d, 1H, $J = 9,60$ Hz, H_{arom}), 7,58 (ABq, $J_1 = 8,34$ Hz, $J_2 = 4,71$ Hz);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ/ppm): 164,14 (s), 163,15 (s), 156,34 (s), 149,61 (s), 144,15 (s), 143,86 (s), 143,07 (s), 142,90 (s), 142,33 (s), 138,65 (d), 133,05 (d), 128,68 (d), 127,97 (d), 126,99 (d), 125,97 (d), 125,01 (d), 123,57 (s), 123,20 (s), 124,85 (d), 124,03 (d), 123,51 (d), 123,40 (d), 119,62 (d), 118,69 (d), 118,31 (d), 117,60 (d), 116,86 (d), 115,93 (d);

3.4. Ispitivanje interakcija nekih priređenih supstancija s ct-DNA

3.4.1. Supstrat

ctDNA čistoće veće od 99 % kupljena je od Merck-a te korištena bez daljnjeg čišćenja na način da je otopljena u NaCaCo puferu (pH 7) u koncentraciji reda veličine 10^{-2} mol dm^{-3} . Koncentracija fosfata ctDNA određena na osnovu absorbancije u puferu pH=7; 0,01 M prema slijedećim vrijednostima:

- ctDNA na 260 nm, $\epsilon = 6600$.

3.4.2. Spektroskopske metode

Kod UV/Vis titracija praćene su promjene spektara ispitivanih spojeva na valnim duljinama (ovisno o sistemu $\lambda = 300 - 400$ nm) gdje korištena ctDNA ne apsorbira UV/Vis zračenje.

EKSPERIMENTALNI DIO

Kod fluorescencijskih titracija praćene su promjene intenziteta fluorescencije ispitivanog spoja na valnim duljinama ($\lambda_{em.} = 380 - 600 \text{ nm}$) gdje niti jedan sastojak u otopini nema UV/Vis spektar te su korištene valne duljine pobude kod kojih ctDNA nema UV/Vis spektar ($\lambda_{eksc.} > 320 \text{ nm}$). Ukoliko je bilo potrebno, fluorescencijski spektri korigirani su za baznu liniju pufera.

3.4.3. Izvedba titracija

Promjene spektara ispitivanih spojeva po dodatku polinukleotida korigirane su za razrjeđenje. Ukupno razrjeđenje tokom titracija bilo je 3 - 15 .

Korištena je metoda titracije pri kojoj je korišteno relativno kratko vrijeme (5 - 7 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 vodene otopine supstrata. Po svakom dodatku nakon navedenog vremena uravnoteženja uz miješanje magnetskim mješaćem snimljen je spektar ispitivanog spoja.

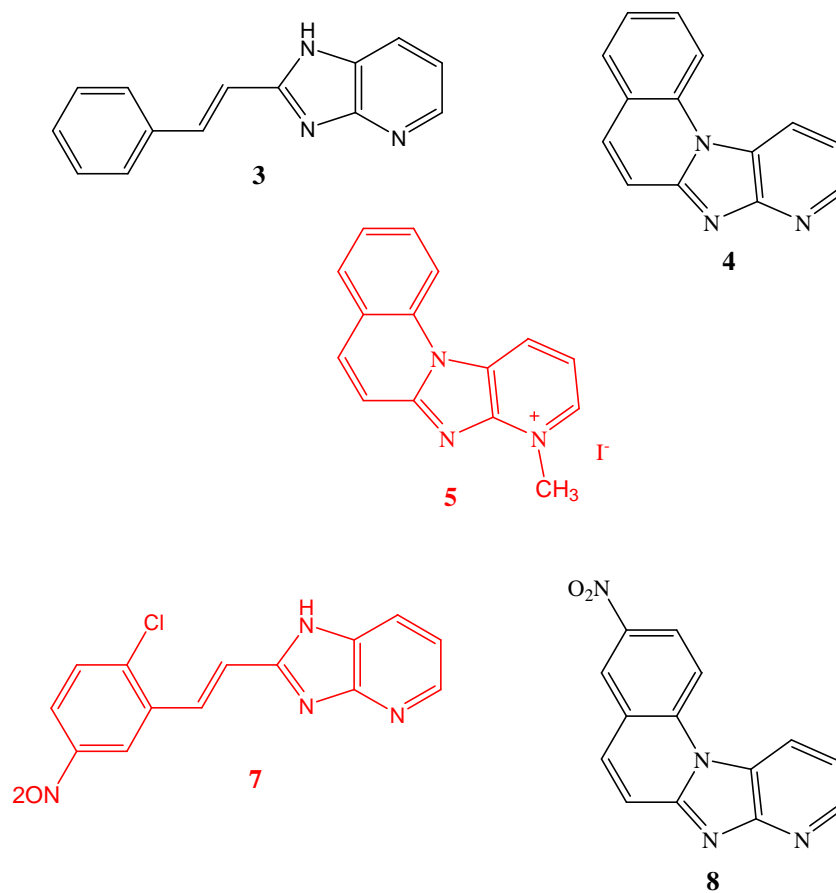
3.4.4. Određivanje promjene temperature „mekšanja“ (ΔT_m) polinukleotida

Temperaturne krivulje „mekšanja“ DNA te njezinih kompleksa s ispitivanim spojevima određene su praćenjem promjene absorbancije ctDNA na 260 nm u ovisnosti o temperaturi. Absorbancija ispitivanih spojeva oduzeta je od ukupne absorbancija uzorka. Temperature „mekšanja“ određene su kao točke infleksije temperaturnih krivulja na osnovu prve derivacije ili metodom tangente. Vrijednosti promjene temperature „mekšanja“ (ΔT_m) razlika su između vrijednosti temperature „mekšanja“ kompleksa ctDNA/spoj i temperature „mekšanja“ čiste ctDNA. Dobivene vrijednosti ΔT_m rezultat su najmanje dva neovisna pokusa. Pogreška vrijednosti ΔT_m je $\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Prema Slici 8. vrijednosti ΔT_m mogu biti pozitivne (stabiliziranje uzvojnice polinukleotida) ili negativne (destabiliziranje polinukleotida).

4. REZULTATI I RASPRAVA

REZULTATI I RASPRAVA

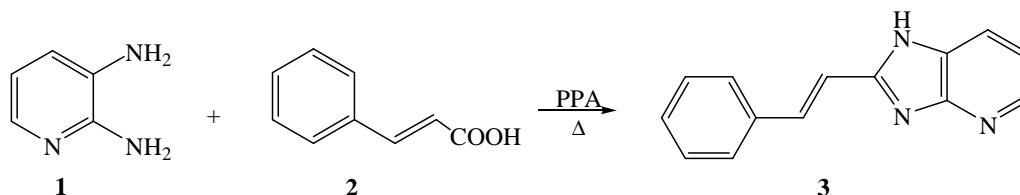
Zadatak ovog rada je bio prirediti acikličke 2-stiril-imidazopiridine te njihove cikličke derivate triaza-benzo[*c*]fluorene kako je prikazano na Slici 10. te ispitati interakciju spojeva **5** i **7** s ctDNA u svrhu određivanja mehanizma njihovog biološkog djelovanja.



Slika 10. Strukture priređenih spojeva

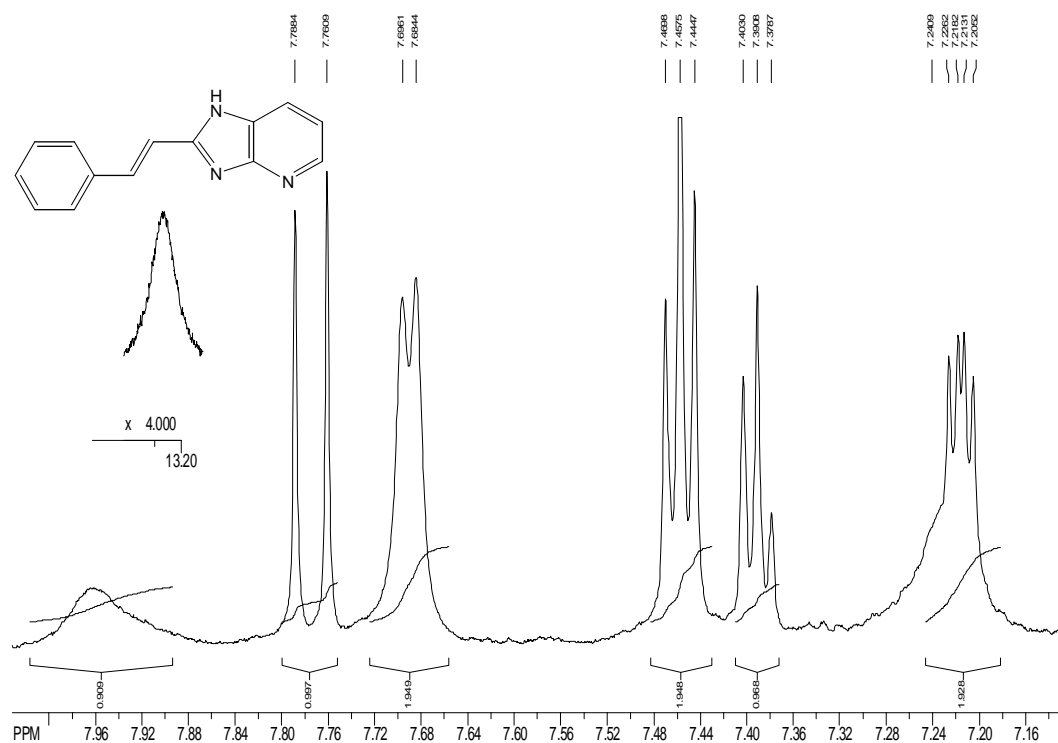
4.1. Sinteza ciljanih spojeva

Sintezu 2-stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina **3** proveli smo direktno iz reaktanata diaminopiridina **1** i cimetne kiseline **2** uz dodatak polifosforne kiseline i zagrijavanje prema Shemi 4.^{26,27}



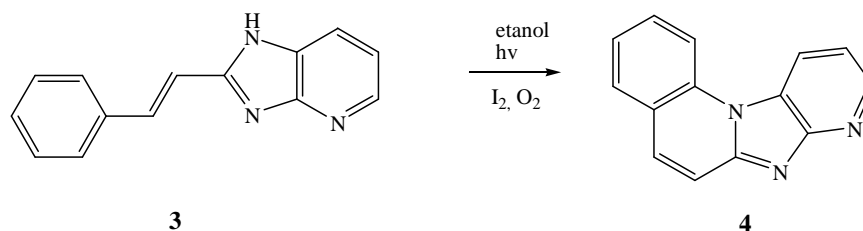
Shema 4. Sinteza spoja **3**

Ovom metodom dobiven je produkt 2-stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin **3** u iskorištenju 23%. Dobiveni spoj **3** okarakteriziran je ¹H i ¹³C NMR spektrima (Prilog 1). U ¹H NMR spektru vidljiv je signal na 13 ppm koji odgovara protonu NH skupine te karakteristični dubleti s konstantama sprege oko 16 Hz koji odgovaraju trans protonima dvostruke veze na 7,78 i 7,46 ppm. Ostali signali odgovaraju aromatskim protonima.



Slika 11. ¹H NMR spektar 2-stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina **3**

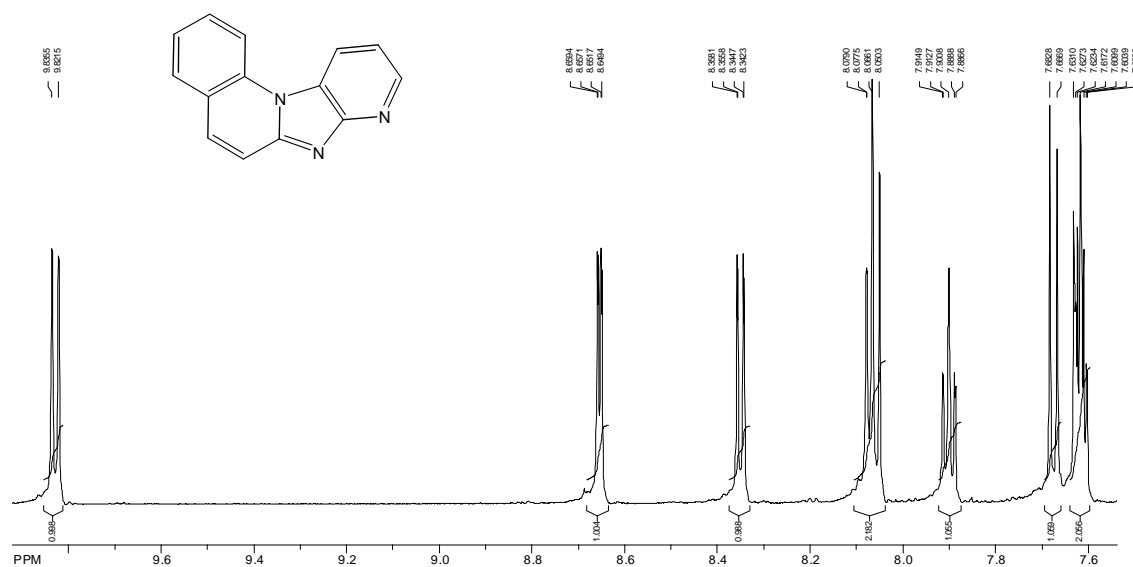
REZULTATI I RASPRAVA



Shema 5. Sinteza 7,8,11b-triazabenzoc[c]fluorena **4**

7,8,11b-triazabenzoc[c]fluoren **4** priređen je reakcijom fotokemijske dehidrociklizacije u etanolnoj otopini osvjetljavanjem visokotlačnom živinom UV lampom od 400 W prema Shemi 5. Tijek reakcije praćen je UV/Vis spektroskopijom.²⁸

Struktura spoja **4** potvrđena je ¹H NMR i ¹³C NMR spektrima (Prilog 2.), gdje u ¹H NMR spektru u odnosu na spektar spoja **3** postoji pomak prema nižim magnetskim poljima te nestanak signala dušikovog protona na 13,2 ppm.

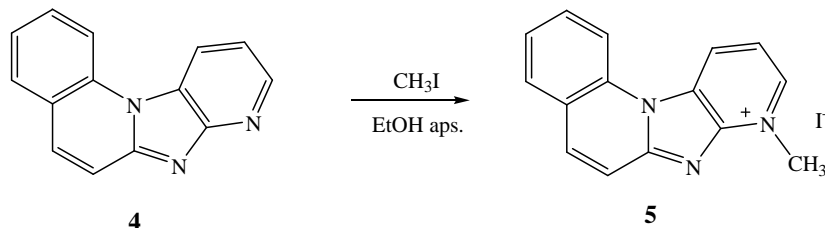


Slika 12. ¹H NMR spektar 7,8,11b-triazabenzoc[c]fluorena **4**

Osim signala aromatskih protona mogu vidjeti dva dubleta koji odgovaraju fluorenskim protonima s konstantom sprege oko 9,5 Hz na 8,05 i 7,68 ppm što je karakteristično za takav tip spojeva.

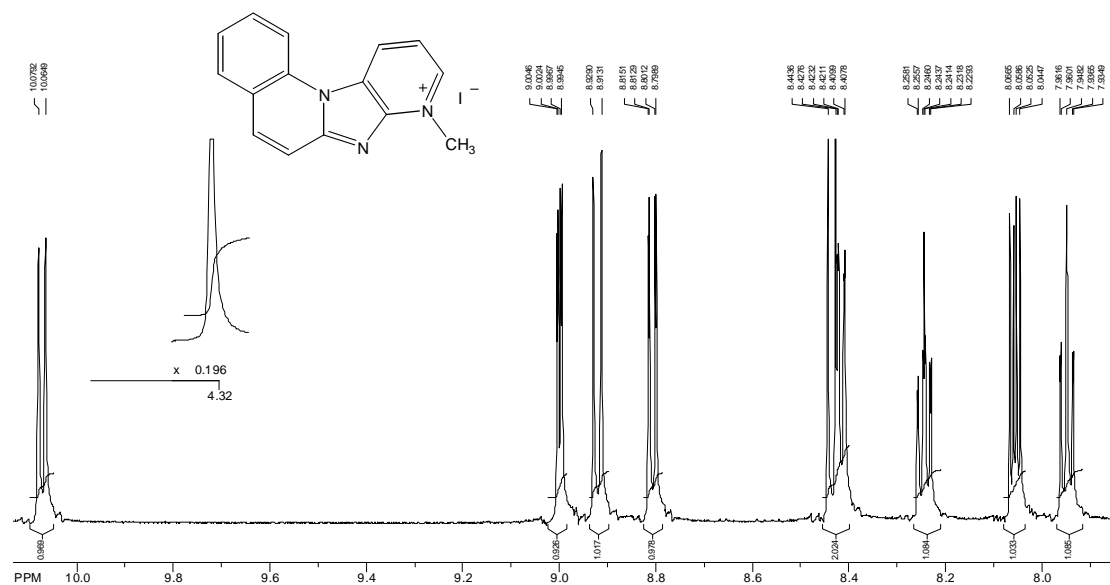
REZULTATI I RASPRAVA

Idući zadatak bilo je prevođenje 7,8,11b-triazabeno[*c*]fluorena **4** *N*-metil-jodidnu sol **5**. Sinteza je provedena prema Shemi 6.



Shema 6. Metiliranje cikličkih triaza-benzo[*c*]fluorena

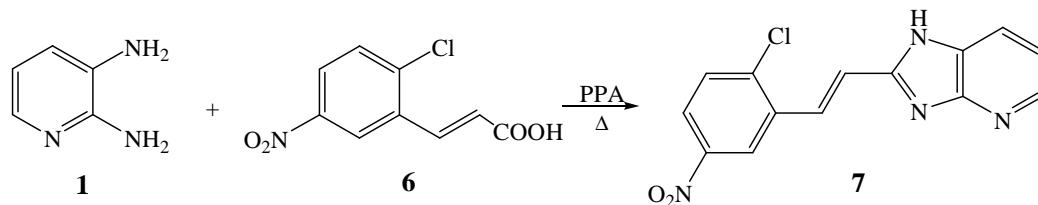
Sintezu smo proveli zbog bolje topljivosti jodidne soli u vodi. Metiliranje je provedeno s metil-jodidom u apsolutnom etanolu. Spoj je okarakteriziran ^1H i ^{13}C NMR-om (Prilog 3). U ^1H NMR spektru su vidljivi signali aromatskih i fluorenskih protona u području od 9,0-7,5 ppm. Oko 4,3 ppm vidljiv je signal koji odgovara CH_3 skupini.



Slika 13. ^1H NMR spektar 8-metil-7,8,11b-triazabeno[*c*]fluoren-jodida **5**

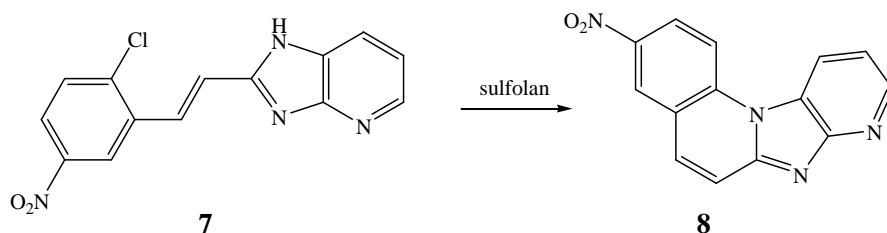
REZULTATI I RASPRAVA

Sinteza 2-(2-kloro-5-nitro)stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina **7** provedena je iz reaktanata diaminopiridina **1** i 3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilne kiseline **6** uz dodatak polifosforne kiseline i zagrijavanje prema Shemi 7.²⁹



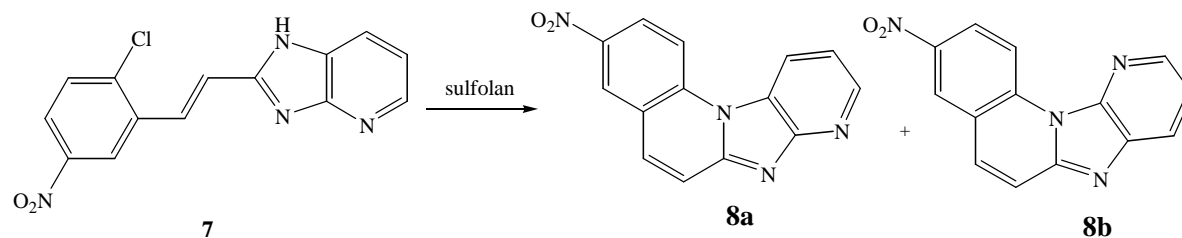
Shema 7. Sinteza spoja **7**

Dobiveni spoj **7** okarakteriziran je ^1H i ^{13}C NMR spektrima (Prilog 4). U ^1H NMR spektru vidljiv je signal na 13 ppm koji odgovara protonu NH skupine te karakteristični dubleti s konstantama sprege oko 16 Hz na 8,06 i 7,51 ppm koji odgovaraju trans protonima dvostruke veze. Ostali signali odgovaraju aromatskim protonima.



Shema 8. Sinteza spoja **8**

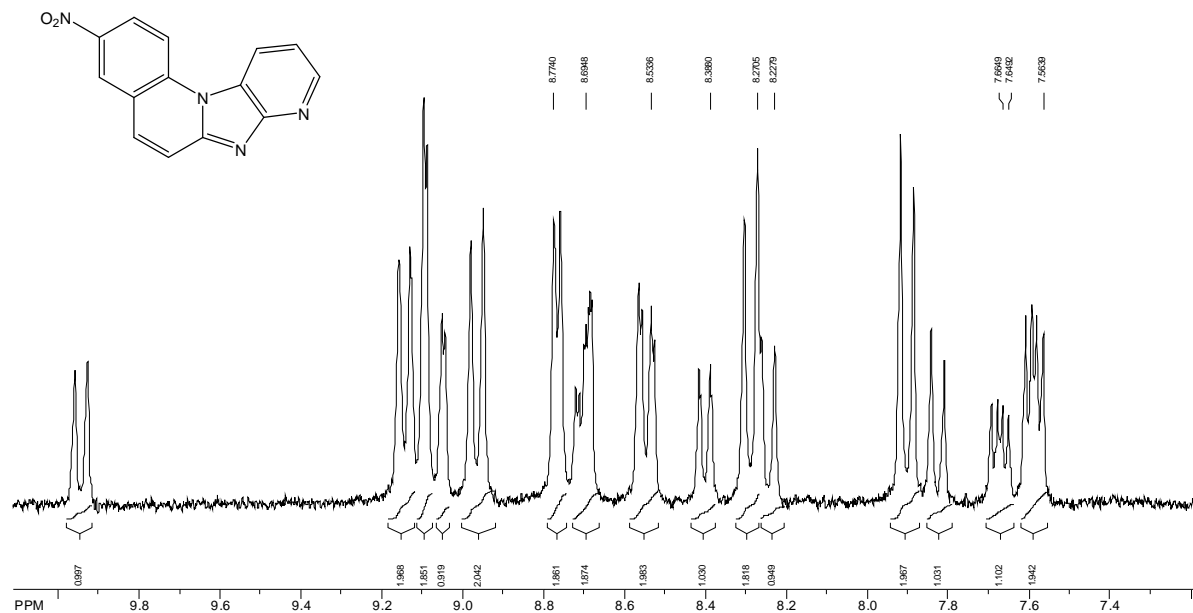
Sinteza spoja **8** provedena je reakcijom termičke ciklizacije spoja **7** u sulfolanu, u pješčanoj kupelji na temperaturi 285°C, prema Shemi 8.²⁹ Reakcija je praćena UV/Vis spektroskopijom. Reakcijom termičke ciklizacije dobivena je smjesa dva strukturna izomera **8a** i **8b** prema Shemi 9.



Shema 9. Strukturni izomeri spoja **8**

REZULTATI I RASPRAVA

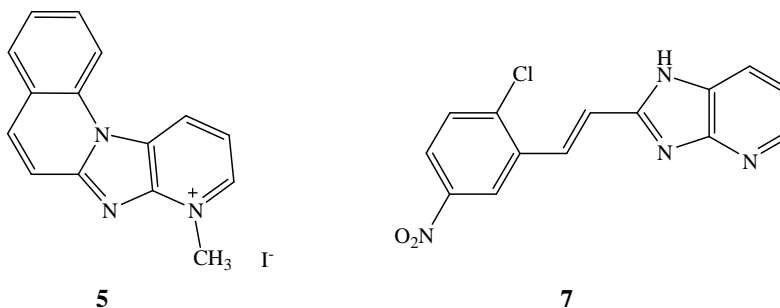
U ^1H NMR spektru spoja **8** vidljivo je da u odnosu na njegov aciklički derivat postoji pomak signala prema nižem magnetskom polju te nestanak signala NH skupine na 13 ppm. Osim signala aromatskih protona mogu vidjeti dva dubleta koji odgovaraju fluorenskim protonima s konstantama sprege oko 9,5 Hz u aromatskom području što je karakteristično za takav tip spojeva.



Slika 14. ^1H NMR spektar 3-nitro-7,8,11b-triazabenzoc[9]fluorena **8** kao smjese strukturnih izomera **8a** i **8b** (1:2)

4.2. Ispitivanje interakcije spojeva 5 i 7 s ctDNA

Derivatima imidazo[4,5-*b*]piridina **5** i **7** ispitana je interakcija s ctDNA prema postupcima opisanim u poglavlju 3.4.

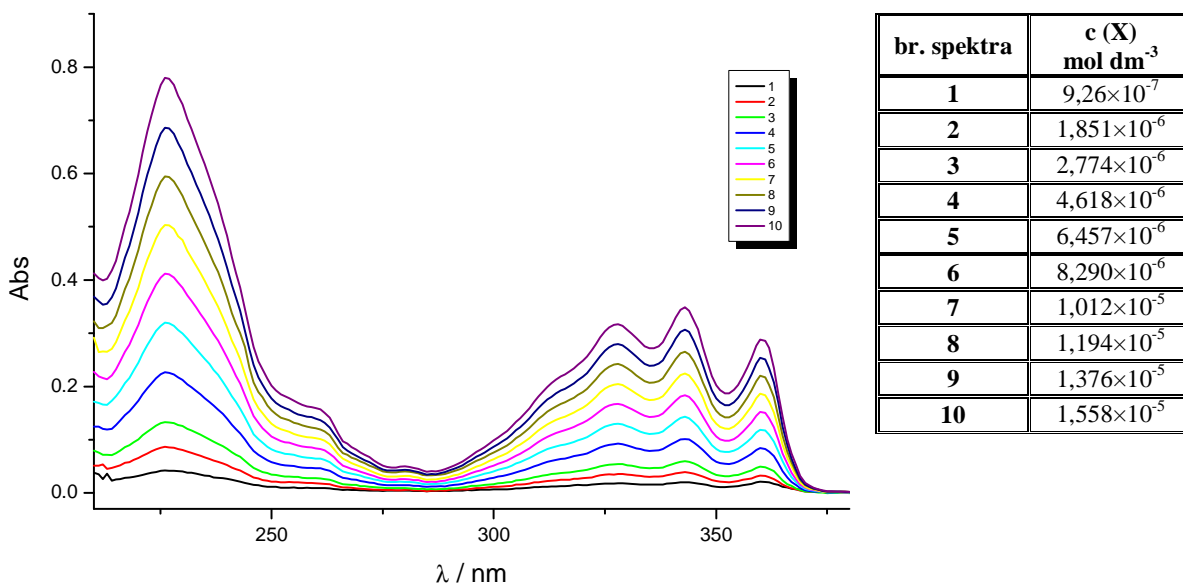


Slika 15. Struktura ispitivanih spojeva s ctDNA

Matična otopina spoja **5** je priređena u vodi dok spoj **7** nije dovoljno dobro topljiv u vodi pa je njegova matična otopina priređena u DMSO-u. Njihove spektroskopske karakteristike su ispitane u puferskoj otopini NaCaCo pri pH 7. Koncentracije priređenih matičnih otopina kreću se u području koncentracija 10^{-3} mol dm⁻³.

4.2.1. UV/Vis baždarni dijagrami

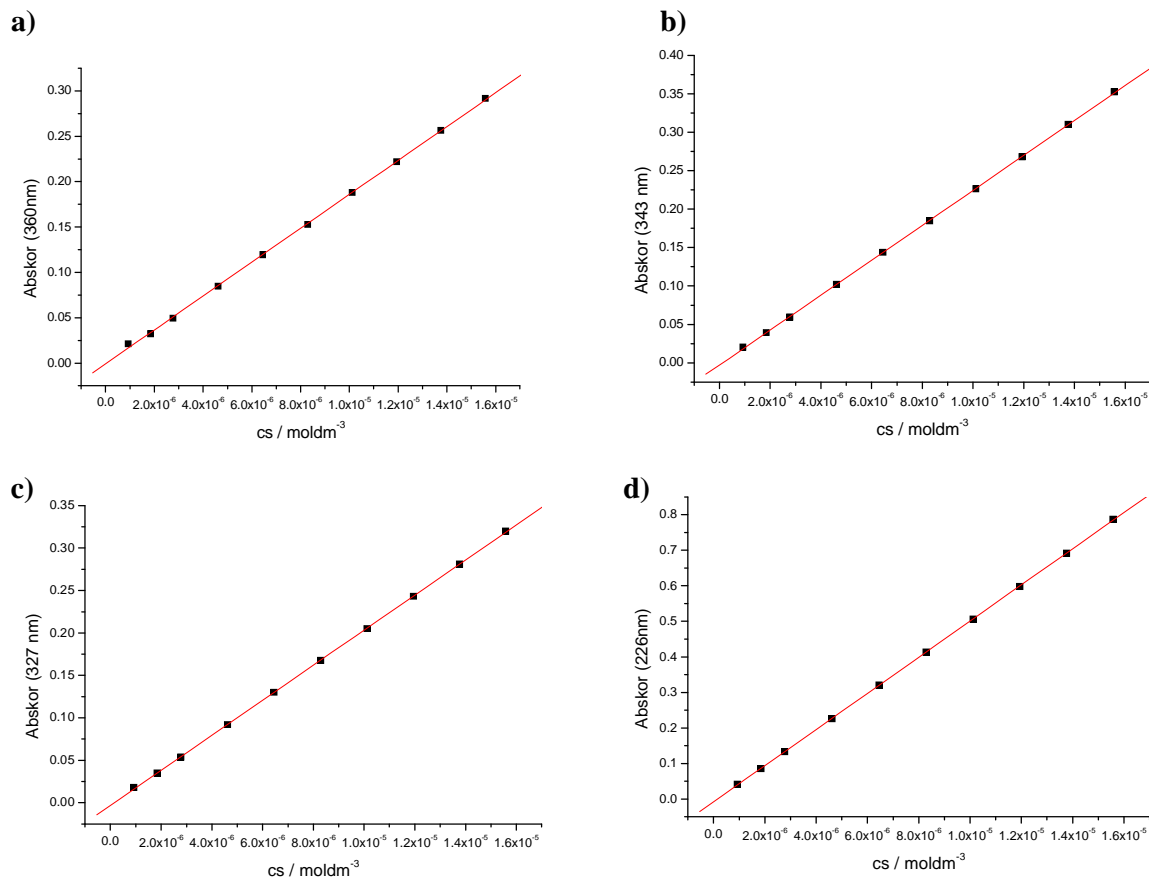
Kako bi se utvrdila stabilnost spojeva **5** i **7** u puferskoj otopini, napravljeni su UV/Vis baždarni dijagrami. Na Slici 16. prikazan je UV/Vis baždarni dijagram spoja **5**.



Slika 16. UV/Vis baždarni dijagram spoja **5**

REZULTATI I RASPRAVA

Apsorbancija je linearno ovisna o koncentraciji ispitivanog spoja **5** u području koncentracija 10^{-5} mol dm^{-3} što je prikazano na Slici 17.



Slika 17. Linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji dodanog spoja **5** na
a) 360 nm, b) 343 nm, c) 327 nm i d) 226 nm

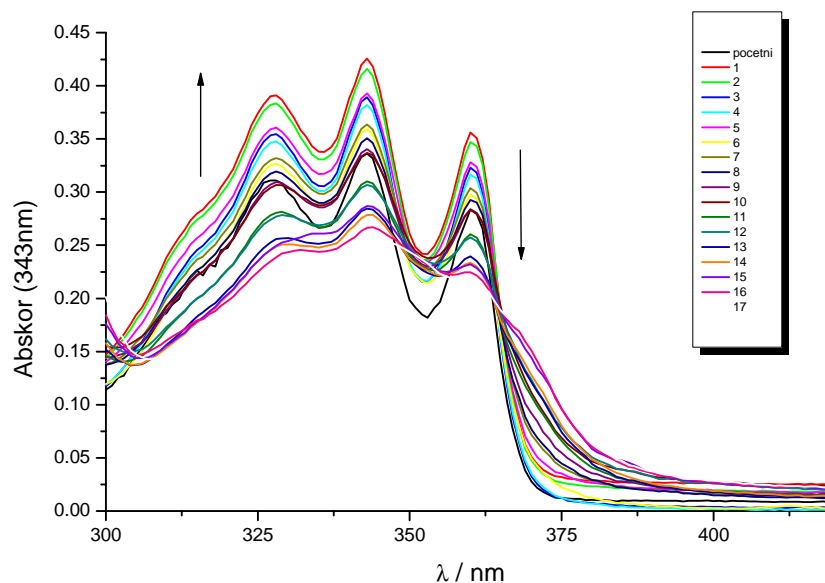
Tablica 5. Valne duljine maksimuma apsorbancije i pripadajući ekstincijski koeficijenti spojeva **5** i **7**

SPOJ	$\lambda_{\text{maks}}/\text{nm}$	$\epsilon \times 10^3$ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
5	360	18671
	343	22717
	327	20664
	226	50863
7	332	20953

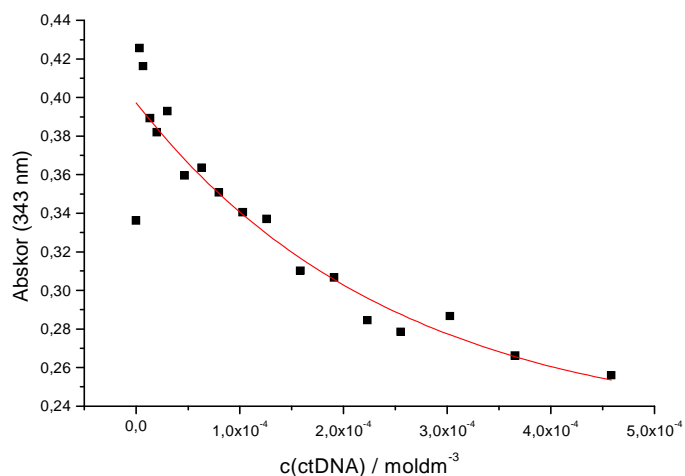
4.2.2. UV/Vis titracije spojeva 5 i 7 s ctDNA

Za navedene spojeve **5** i **7** izvedene su UV/Vis titracije s puferskom otopinom ctDNA u NaCaCo puferu pri pH=7, prema postupku opisanom u poglavlju **3.4**. Koncentracije ispitivanih spojeva kreću se u području 10^{-5} mol dm^{-3} . Na Slici 18. a) prikazana je krivulja UV/Vis titracija spoja **5**, a na Slici 18. b) i ovisnost apsorbancije na maksimumu 343 nm o koncentraciji dodane otopine ctDNA.

a)



b)



Slika 18. a) UV/Vis titracija spoja **5** ($1,85 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) ctDNA ($1,02 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3});
b) Ovisnost apsorbancije spoja **5** na 343 nm o koncentraciji dodane ctDNA

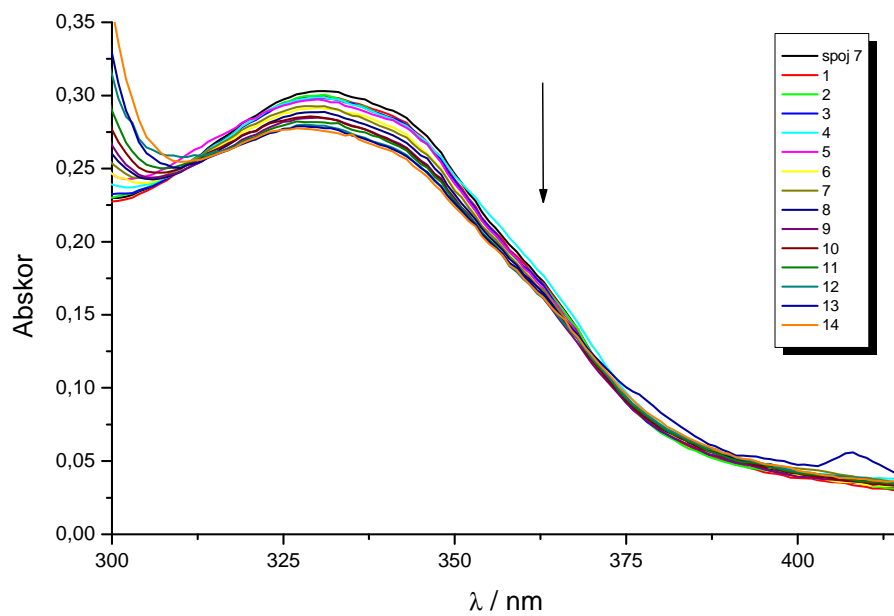
Tablica 6. Promjena apsorbancije spoja **5** na 343 nm uslijed dodatka ctDNA

Br.	Abskor (343 nm)	c (ctDNA) / mol dm ⁻³
0	0,336	0
1	0,426	3,35×10 ⁻⁶
2	0,416	6,71×10 ⁻⁶
3	0,389	1,34×10 ⁻⁵
4	0,382	2,01×10 ⁻⁵
5	0,393	3,01×10 ⁻⁵
6	0,360	4,68×10 ⁻⁵
7	0,364	6,34×10 ⁻⁵
8	0,351	7,99×10 ⁻⁵
9	0,340	1,03×10 ⁻⁴
10	0,337	1,26×10 ⁻⁴
11	0,310	1,59×10 ⁻⁴
12	0,307	1,91×10 ⁻⁴
13	0,284	2,23×10 ⁻⁴
14	0,278	2,55×10 ⁻⁴
15	0,287	3,03×10 ⁻⁴
16	0,266	3,66×10 ⁻⁴

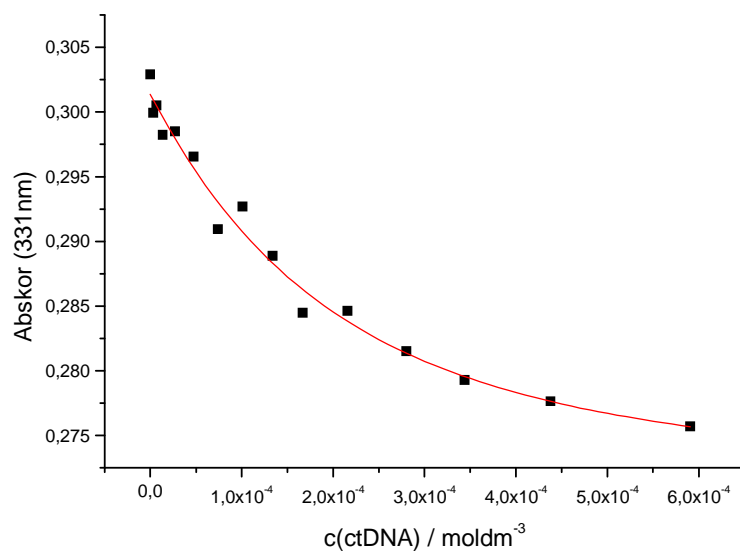
Iz UV/Vis titracijske krivulje spoja **5** vidljivo je da tijekom dodavanja puferske otopine ctDNA u pufersku otopinu spoja **5** dolazi do opadanja apsorbancije, tj. hipokromnog pomaka i slabog batokromnog pomaka. U Tablici 6. dani su podaci o promjeni apsorbancije spoja **5** na 343 nm uslijed dodatka ctDNA.

Na Slici 19. a) prikazana je krivulja UV/Vis titracija spoja **7** s ctDNA a na Slici 19. b) ovisnost apsorbancije na maksimumu 331 nm o koncentraciji dodane otopine ctDNA.

a)



b)



Slika 19. a) UV/Vis titracija spoja **7** ($1,57 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s ctDNA ($1,021 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$);

b) Ovisnost apsorbancije spoja na 331 nm o koncentraciji dodane ctDNA

Tablica 7. Promjena apsorbancije spoja **7** na 331 nm uslijed dodatka ctDNA

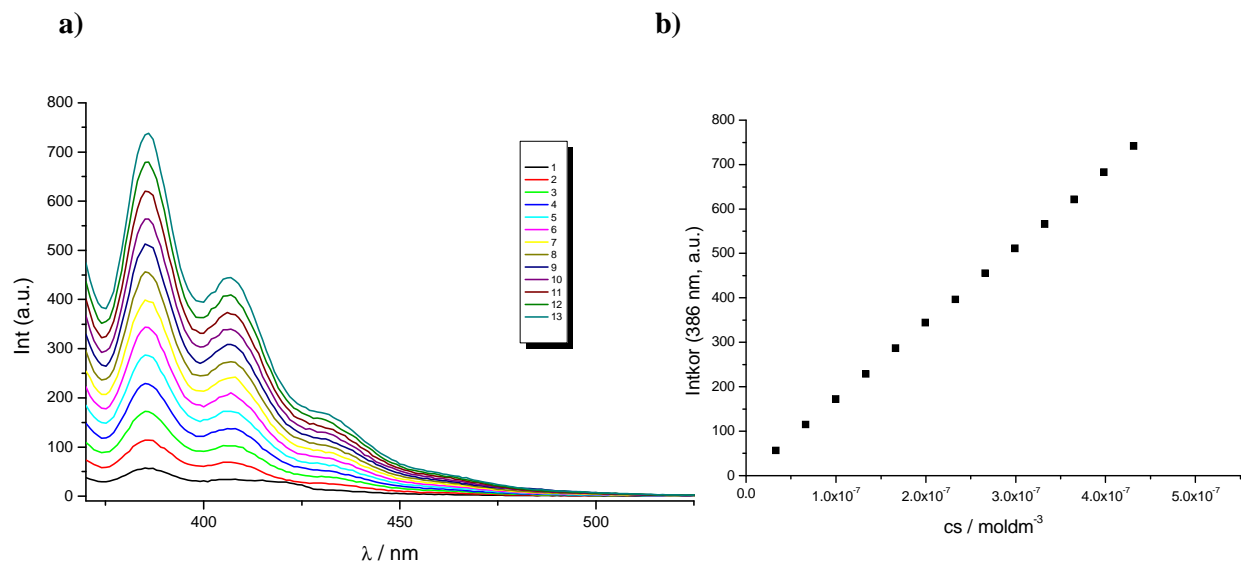
br.	Abskor 331 nm	c (ctDNA) mol dm ⁻³
0	0,303	0
1	0,300	3,39×10 ⁻⁶
2	0,301	6,77×10 ⁻⁶
3	0,298	1,35×10 ⁻⁵
4	0,299	2,70×10 ⁻⁵
5	0,297	4,72×10 ⁻⁵
6	0,291	7,40×10 ⁻⁵
7	0,293	1,01×10 ⁻⁴
8	0,289	1,34×10 ⁻⁴
9	0,284	1,67×10 ⁻⁴
10	0,285	2,16×10 ⁻⁴
11	0,282	2,8×10 ⁻⁴
12	0,279	3,44×10 ⁻⁴
13	0,278	4,38×10 ⁻⁴
14	0,276	5,91×10 ⁻⁴

Iz UV/Vis titracijske krivulje spoja **7** vidljivo je da tijekom dodavanja puferske otopine ctDNA u pufersku otopinu spoja **7** dolazi do slabog opadanja apsorbancije na maksimumu od 331 nm.

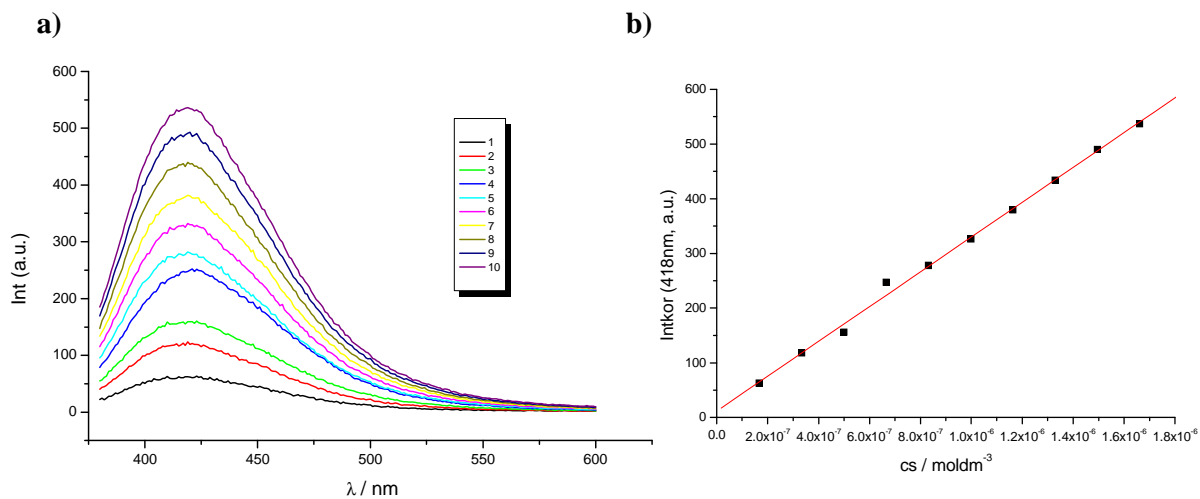
4.2.3. Fluorimetrijski emisijski baždarni dijagrami spojeva **5** i **7**

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja, moguće je provesti kod bitno manjih koncentracija pa su takvi uvjeti slični onima u biološkim sustavima. Prije izvedbe fluorimetrijskih titracija napravljeni su fluorimetrijski emisijski baždarni grafovi spojeva **5** i **7** kako bi se utvrdilo područje linearne ovisnosti intenziteta fluorescencije o količini dodane supstancije. Na Slici 20. i Slici 21. prikazani su fluorimetrijski emisijski baždarni dijagrami spojeva **5** (a) i **7** (a) te linearne ovisnosti intenziteta fluorescencije na maksimumu emisije o koncentracijama dodanih spojeva **5** (b) i **7** (b).

REZULTATI I RASPRAVA



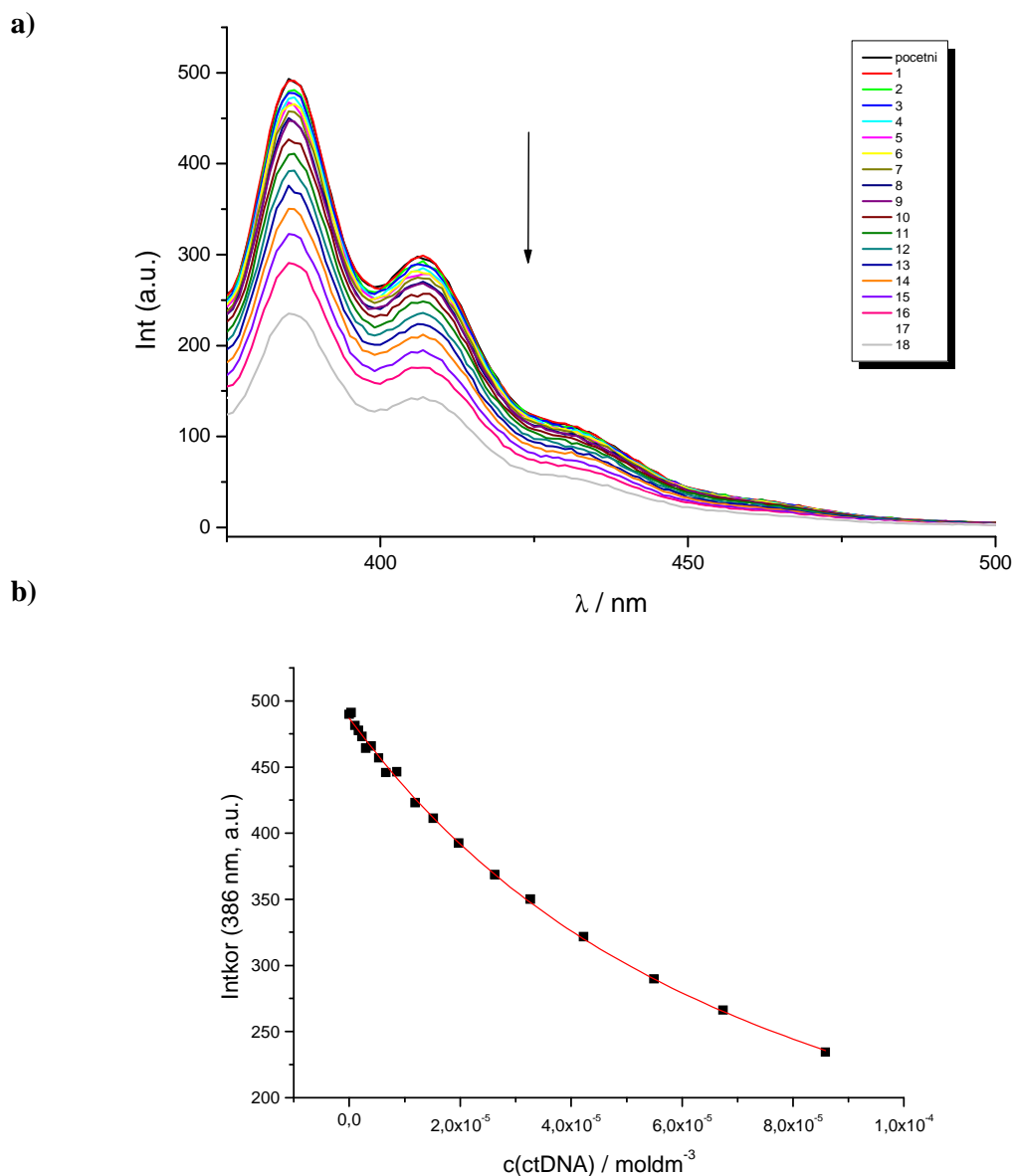
Slika 20. a) Fluorimetrijski emisijski baždarni dijagram spoja 5; b) ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji dodanog spoja 5 na maksimumu emisije 386 nm



Slika 21. a) Fluorimetrijski emisijski baždarni dijagram spoja 7; b) ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji dodanog spoja 7 na maksimumu emisije 418 nm

4.2.4. Fluorimetrijska titracija spojeva 5 i 7 s ctDNA

Nakon što je u prethodnom poglavlju utvrđeno da postoji koncentracijsko područje u kojem je linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji dodanog spoja, u tom su području provedene fluorimetrijske titracije puferских otopina spojeva **5** i **7** s puferском otopinom ctDNA. Na Slici 22. prikazane su fluorimetrijske titracije spojeva **5** (a) s ctDNA te ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **5** (b) o koncentraciji dodane ctDNA na maksimumu emisije 386 nm.



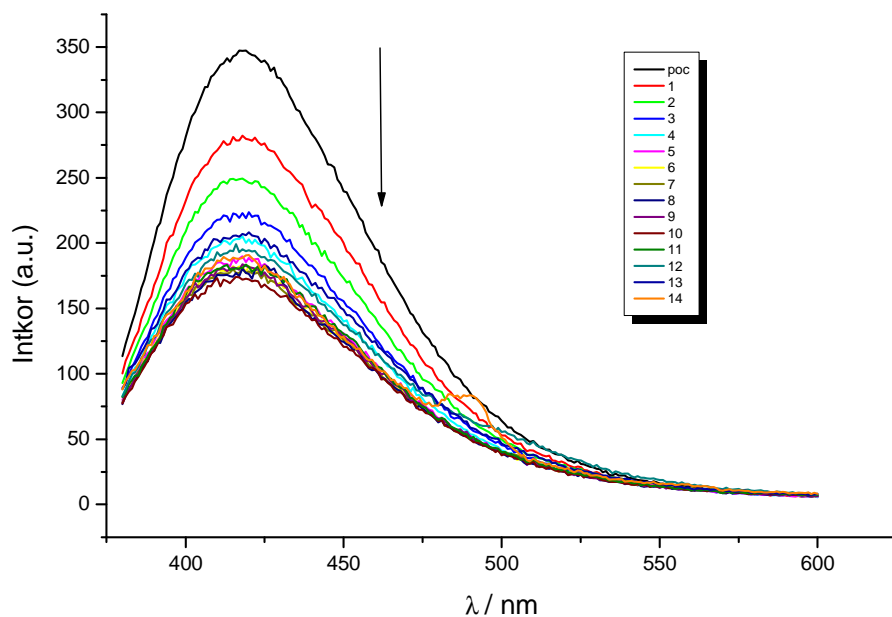
Slika 22.a) Fluorimetrijska titracija spoja **5** ($3,33 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³) s ctDNA ($2,0 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³)
b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **5** na 386 nm o koncentraciji dodane ctDNA

Tablica 8. Promjena intenziteta fluorescencije spoja **5** na 386 nm uslijed dodatka ctDNA

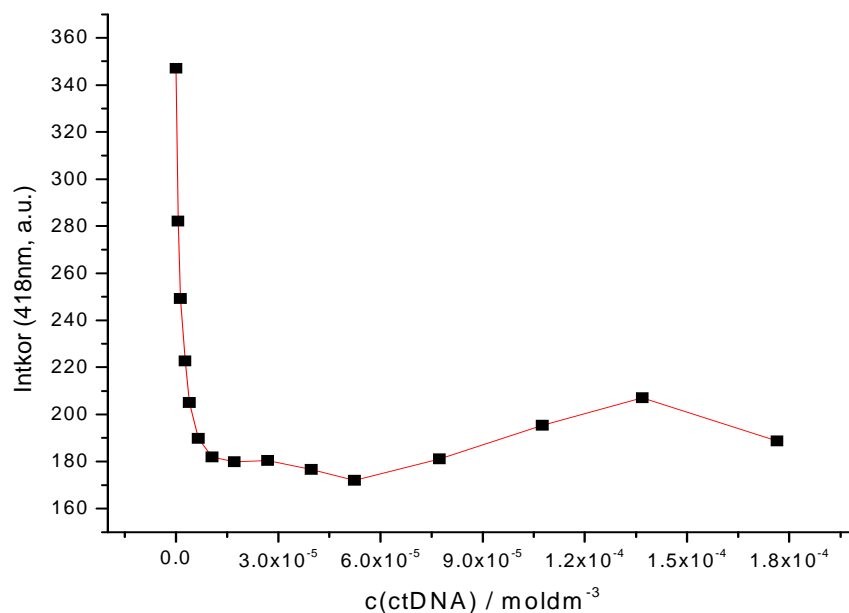
br.	Intkor 386nm	c (ctDNA) mol dm ⁻³
0	489,888	0
1	491,197	3,322×10 ⁻⁷
2	481,301	9,962×10 ⁻⁷
3	477,556	1,66×10 ⁻⁶
4	473,180	2,323×10 ⁻⁶
5	464,131	2,986×10 ⁻⁶
6	465,905	3,979×10 ⁻⁶
7	456,927	5,302×10 ⁻⁶
8	445,756	6,623×10 ⁻⁶
9	446,394	8,601×10 ⁻⁶
10	422,939	1,189×10 ⁻⁵
11	411,228	1,517×10 ⁻⁵
12	392,454	1,974×10 ⁻⁵
13	368,606	2,623×10 ⁻⁵
14	350,194	3,268×10 ⁻⁵
15	321,633	4,228×10 ⁻⁵
16	289,927	5,493×10 ⁻⁵
17	266,331	6,742×10 ⁻⁵
18	234,358	8,585×10 ⁻⁵

Na Slici 23. prikazane su fluorimetrijske titracije spojeva **7** (a) s ctDNA te ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **7** (b) o koncentraciji dodane ctDNA na 418 nm.

a)



b)



Slika 23.a) Fluorimetrijska titracija spoja **7** ($1,33 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s ctDNA ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$)
b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **7** na 418 nm o koncentraciji ctDNA

Tablica 9. Promjena intenziteta fluorescencije spoja **7** na 418 nm uslijed dodatka ctDNA

br.	Intkor 418 nm	c (ctDNA) mol dm ⁻³
0	347,093	0
1	282,194	$6,647 \times 10^{-7}$
2	249,301	$1,329 \times 10^{-6}$
3	222,729	$2,656 \times 10^{-6}$
4	205,011	$3,981 \times 10^{-6}$
5	189,724	$6,627 \times 10^{-6}$
6	181,997	$1,058 \times 10^{-5}$
7	179,971	$1,714 \times 10^{-5}$
8	180,392	$2,689 \times 10^{-5}$
9	176,610	$3,975 \times 10^{-5}$
10	172,017	$5,244 \times 10^{-5}$
11	181,089	$7,734 \times 10^{-5}$
12	195,359	$1,076 \times 10^{-4}$
13	207,033	$1,369 \times 10^{-4}$
14	188,738	$1,764 \times 10^{-4}$

REZULTATI I RASPRAVA

Iz dobivenih krivulja fluorimetrijskih titracija spojeva **5** i **7** s ctDNA može se zaključiti da oba spoja uslijed dodatka ctDNA pokazuju interakciju s ctDNA i gašenje intenziteta fluorescencije, tj. hipokromni pomak na maksimumu emisije. Spoj **5** pokazuje puno jači afinitet prema ctDNA.

Na temelju dobivenih rezultata fluorimetrijske titracije spoja **5** s ctDNA, izračunata je konstanta stabilnosti K_s i omjer n (Tablica 10.) prema Scatchardovoj jednadži (Poglavlje 2.2.2.1).

Tablica 10. Konstanta stabilnosti K_s i n za spoj **5**

SPOJ	FLUORIMETRIJSKA TITRACIJA		
	n	K_s	$\log K_s$
5	0,20	7200	4,85

Konstantu stabilnosti K_s i omjer n za spoj **7** nije bilo moguće izračunati iz rezultata dobivenih UV/Vis i fluorimetrijskom titracijom.

4.2.5. Promjena temperature mekšanja ctDNA

Kako bi se utvrdio utjecaj spojeva **5** i **7** na stabilnost dvolančane uzvojnice ctDNA, provedeni su eksperimenti određivanja temperature mekšanja $\Delta T_m / ^\circ\text{C}$ prema postupku opisanom u Poglavlju **4.3** Temperature mekšanja polinukleotida određene su kod različitih koncentracijskih omjera spoja i polinukleotida r ($r = 0,1, 0,2, 0,3$ i $0,5$). Rezultati dobiveni eksperimentom prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. Promjene temperature mekšanja ($\Delta T_m^a / ^\circ\text{C}$) ct-DNA uslijed dodatka spojeva **5** i **7** kod pH =7 (pufer NaCaCo)

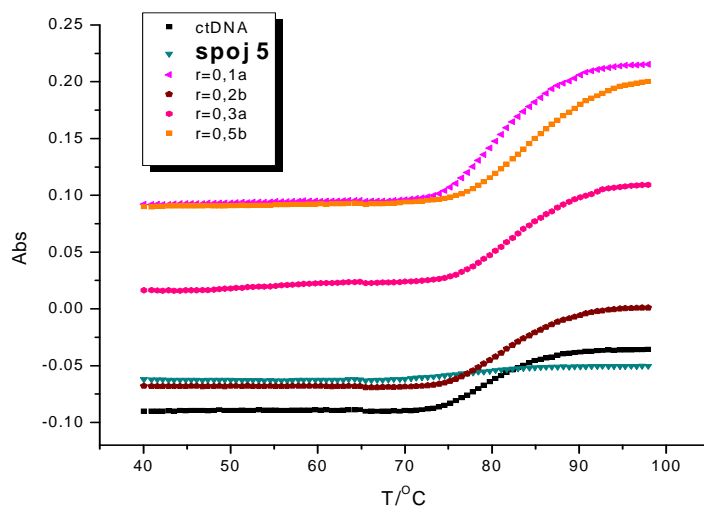
$^b r$	$\Delta T_m^a / ^\circ\text{C}$	
	5	7
0,1	1,60	-
0,2	2,60	0,50
0,3	4,25	0,60
0,5	6,10	0,70

^a greška ΔT_m : 0.5°C ; ^b $r = [\text{vezani spoj}] / [\text{ct-DNA}]$

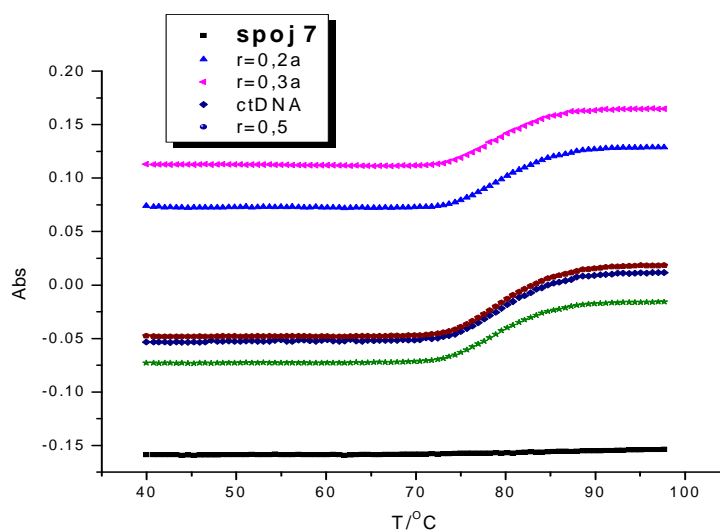
REZULTATI I RASPRAVA

Dodatak spoja **5** u otopinu ctDNA kod danih omjera r uzrokuje stabilizaciju dvostruke uzvojnice ctDNA, naročito za omjer $r=0,5$ kada stabilizacija iznosi $6,10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ovakve pozitivne vrijednosti karakteristične su za interkalatore. Aciklički spoj **7** vrlo slabo za sve dane omjere, stabilizira dvostruku uzvojniciu ctDNA. Spojevi **5** i **7** ne pokazuju promjenu apsorbancije tijekom zagrijavanja te se može zaključiti da su termodinamički stabilni. Na Slici 24. prikazane su krivulje termalnog denaturiranja za spoj **5(a)** i spoj **7(b)**.

a)



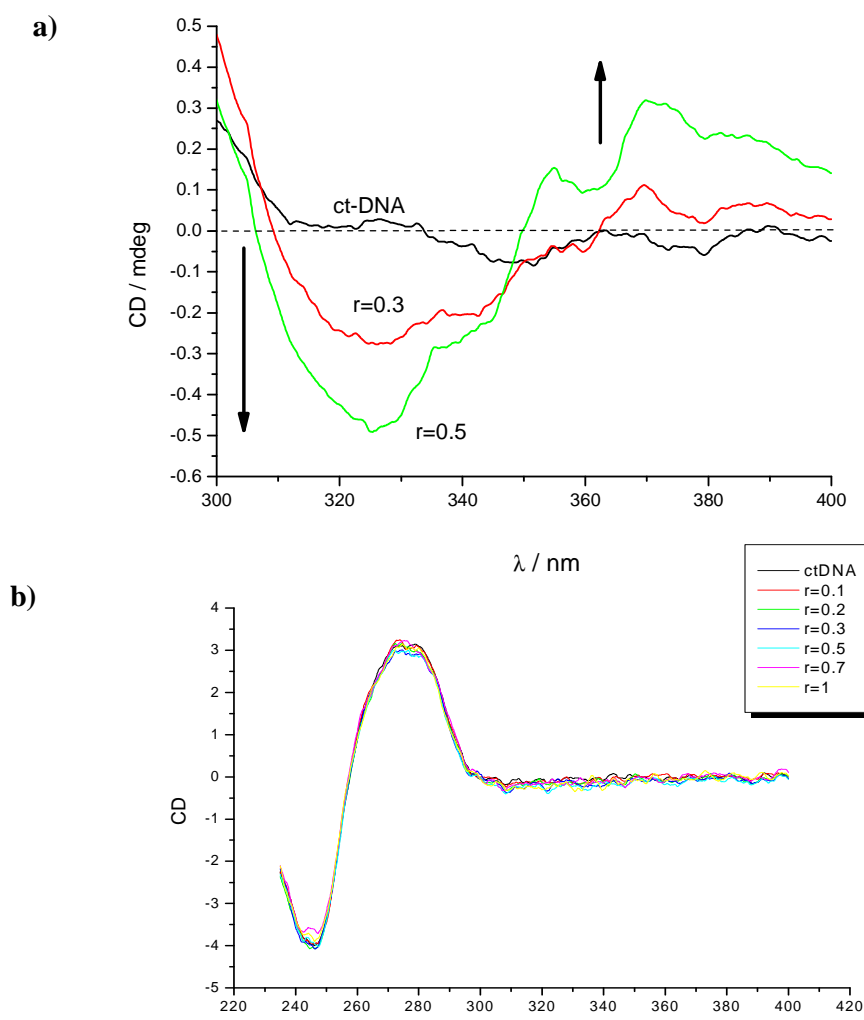
b)



Slika 24. Temperaturne denuracijske krivulje spojeva **a) 5** i **b) 7** pri raznim molarnim omjerima r ($[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$), $\text{pH}=7$ (pufer NaCaCo)

4.2.6. CD titracije

Eksperimenti CD titracija spojeva **5** i **7** s ctDNA napravljeni su kako bi se dobili dodatni podaci o načinu vezanja ovih supstancija.^{32,33} Eksperimenti su provedeni na „Institutu Ruđer Bošković“. Na slijedećoj su Slici 25. prikazani rezultati dobiveni CD titracijama ctDNA sa spojevima **5** i **7** kod različitih koncentracijskih omjera spoja i ctDNA r .



Slika 25. CD titracija ctDNA ($c = 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) sa spojem **a) 5** i **b) 7**

Iz dobivenih rezultata CD titracija ctDNA sa spojevima **5** i **7** može se zaključiti da spoj **5** pokazuje slabi negativni ICD 310 – 350 nm i slabi pozitivni ICD 350 – 400 nm što odgovara UV/Vis spektru spoja. ICD efekti ukazuju na interkaliranje, s time da je moguće razlučiti orijentaciju aromatskog sustava u odnosu na parove nukleobaza. U spektru spoja **7** nema dodatnih CD signala što ukazuje na vrlo slabu interakciju s ctDNA.

4.2.7. Viskozimetrija

Ekperimenti viskozimetrije provedeni su na temperaturi 25 ± 0.1 °C. Alikvoti ispitivanih spojeva dodavani su u 5,5 ml otopine ctDNA koncentracije 5×10^{-4} mol dm⁻³ u puferu (NaCaCo, pH 7). Svi ekperimenti mjerenja vremena provedeni su najmanje tri puta. Na temelju dobivenih rezultata nije bilo moguće izračunati relativno produljenje zavojnice α .

Tablica 12. Rezultati dobiveni viskozimetrijom za spoj 5

spoj	vrijeme / sec				
	pufer	ct-DNA	r=0.05	r=0.1	r=0.15
5	T=25.0C	T=25.1 °C	T=25.1 °C	T=25.1 °C	T=25.0 °C
	45,4	70,7	73,1	75,0	78,0
	45,0	70,9	73,0	75,8	78,1
	44,8	70,6	73,5	75,8	78,1

4.2.8. Zaključak o načinu interakcije spojeva 5 i 7 s ctDNA

Rezultati dobiveni ispitivanjem interakcije spojeva 5 i 7 s ctDNA svim korištenim gore navedenim metodama prikazani su u Tablici 13.

Tablica 13. Rezultati dobiveni ispitivanjem interakcije spojeva 5 i 7 s ctDNA

KORIŠTENA METODA	ISPITIVANI SPOJEVI	
	5	7
Temperatura mekšanja	pozitivne vrijednosti ΔT_m ; stabilizacija dvostruke ctDNA	vrlo male pozitivne vrijednosti ΔT_m ; vrlo slaba stabilizacija dvostruke uzvojnice
UV/Vis titracije	izraženi batokromni i hipokromni pomak u spektru ispitivanog spoja tijekom titracije s ctDNA	vrlo mali hipokromni pomak u spektru ispitivanog spoja tijekom titracije s ctDNA (agregacija)
Fluorimetrijske titracije	izraženi hipokromni efekt u spektru ispitivanog spoja tijekom titracije s ctDNA	vrlo mali hipokromni pomak u spektru ispitivanog spoja tijekom titracije s ctDNA (agregacija)
CD titracije	slabi negativni ICD signal i slabi negativni ICD signal	nije uočen nikakav efekt
Afinitet po Scatchardu	konstanta stabilnosti $\log K_S = 4.2$ omjer $n = 0.2$	nije bilo moguće izračunati

Na temelju svih dobivenih rezultata može se zaključiti da spoj 7 pokazuje vrlo slabu interakciju s ctDNA koja je vjerojatno posljedica agregacije dok spoj 5 pokazuje izraženu interakciju s ctDNA i može se zaključiti da je **interkaliranje u dvostruku uzvojnica ctDNA jedan od mehanizama njegovog biološkog djelovanja.**

4.3. Ispitivanje antitumorske aktivnosti *in vitro*

Spojevima **5 i 7** ispitana je antitumorska aktivnost *in vitro* na šest humanih tumorskih staničnih linija Hep-2 – epidermalni karcinom, HeLa - karcinom grlića maternice, MiaPaCa-2 - karcinom gušterače, SW 620 - karcinom debelog crijeva, MCF-7 - karcinom dojke i SK-BR-3 – metastatski adenokarcinom dojke te normalne humane fibroblaste WI38. Antitumorska aktivnost novopripređenih spojeva ispitana je u Zavodu za Molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Sandre Kraljević-Pavelić. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 14.

Tablica 14. Antitumorska aktivnost *in vitro* spojeva **5 i 7**

GI ₅₀ ^a (μM)							
SPOJ	Stanična linija						
	Hep-2	HeLa	MiaPaca-2	SK-BR-3	SW-620	MCF-7	WI38
3	3,89	2,22	4,39	2,06	4,64	7,57	3,87
4	39,24	43,36	48,18	2,94	34,77	72,38	<100
5	26,69	27,16	43,42	3,64	25,91	55,96	<100
7	52,28	14,32	80,52	83,52	78,28	75,45	47,41
8	14,09	30,91	33,04	7,76	38,65	61,70	85,37

^a koncentracija koja inhibira rast tumorskih stanica za 50%

Iz dobivenih rezultata prikazanih u Tablici 14., može se zaključiti da spoj **5** pokazuje bolju antitumorsku aktivnost s izraženim selektivnijim djelovanjem na stanične linije metastatskog adenokarcinoma dojke SK-BR-3 te vrlo slabo djelovanje na normalne humane fibroblaste WI38. Spoj **7** ne pokazuje značajniju antitumorsku aktivnost. Aciklički spoj **3** pokazuje vrlo izraženu aktivnost, ali bez selektivnog djelovanja na pojedine stanične linije. Ciklički spoj **4** i **8** pokazuju značajnu selektivnost prema staničnim linijama metastatskog adenokarcinoma dojke SK-BR-3 kao i slabije djelovanje na normalne humane fibroblaste WI38.

5. ZAKLJUČAK

ZAKLJUČAK

- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: 2-stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin **3**, 8,11b-triazabenzoc[*c*]fluoren **4**, 8-metil-7,8,11b-triazabenzoc[*c*]fluoren-jodid **5**, 2-2-kloro-5-nitro)stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin **7**, 3-nitro-7,9(10),11b-triazabenzoc[*c*]fluoren **8**.
- 2-stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin **3** i 2-(2-kloro-5-nitro)stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin **7** priređeni su iz 2,3-diaminopiridina i odgovarajuće akrilne kiseline.
- Reakcijom fotokemijske dehidrociklizacije spoja **3**, osvjetljavanjem UV lampom od 400 W u etanolu, priređen je spoj **4**.
- Spoj **8** priređen je termičkom ciklizacijom kao smjesa dva strukturna izomera **8a** i **8b**, zagrijavanjem acikličkog spoja **5** u sulfolanu.
- Reakcijom metiliranja spoja **4** s metil-jodidom priređen je spoj **5**.
- Svim novopriređenim spojevima struktura je potvrđena korištenjem ¹H i ¹³C NMR, UV/Vis te IR spektroskopijom.
- Spojevima **5** i **7**, kao biološki aktivnim spojevima i potencijalnim kemoterapeutskim agensima, ispitana je interakcija s ctDNA korištenjem 5 metoda: viskozimetrijom, termalnim denaturiranjem ili određivanjem temperature mekšanja, UV/Vis, fluorimetrijskom i CD spektroskopijom u svrhu određivanja jednog od mehanizama njihovog biološkog djelovanja.
- Spoj **5** pokazao je na temelju svih dobivenih rezultata značajnu interakciju s ctDNA te se može smatrati da je jedan od mehanizama njegovog biološkog djelovanja interkaliranje u dvostruku uzvojnici ctDNA.
- Spoj **7** nije pokazao značajniju interakciju s ctDNA.
- Spojevima **3-5** i **7-8** ispitana je antitumorska aktivnost *in vitro* na 6 staničnih linija humanih karcinoma i normalne fibroblaste.
- Spoj **5** pokazuje dobru antitumorsku aktivnost s izraženim selektivnijim djelovanjem na stanične linije metastatskog adenokarcinoma dojke SK-BR-3 te vrlo slabo djelovanje na normalne humane fibroblaste WI38 dok spoj **7** ne pokazuje značajniju antitumorsku aktivnost.
- Aciklički spoj **3** pokazuje vrlo izraženu aktivnost ali bez selektivnog djelovanja na pojedine stanične linije humanih karcinoma. Ciklički spojevi **4** i **8** pokazuju značajnu selektivnost prema staničnim linijama metastatskog adenokarcinoma dojke SK-BR-3 kao i slabije djelovanje na normalne humane fibroblaste WI38.
- Na temelju svega navedenoga, može se zaključiti da priređeni spojevi, naročito spojevi **3**, **4** i **5** imaju karakteristike potencijalnih kemoterapeutskih agensa .

6. ZAHVALA

Zahvaljujem prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola, voditeljici projekta „Novi heterocikli kao antitumorski i antivirusni (pametni) lijekovi“ (broj 125-0982464-1356 financiranim od MZOŠ-a) u sklopu kojeg je napravljen ovaj rad kao i na savjetima koje mi je pružila tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Marijani Hranjec, mentorici, na predloženoj temi kao i savjetima i pomoći koju mi je pružila tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Hvala dr. sc. Ivi Piantanidi iz Laboratorija za studij interakcija biomakromolekula Instituta Ruđer Bošković, na pomoći prilikom interpretacije rezultata ispitivanja interakcije spojeva s ctDNA.

Hvala dr. sc. Sandri Kraljević-Pavelić i dipl. ing. Ivani Ratkaj iz Laboratorija za sistemsku medicinu Instituta Ruđer Bošković, na ispitanoj antitumorskoj aktivnosti priređenih spojeva *in vitro*.

Zahvaljujem također i svim članovima Zavoda za organsku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na ugodnom radnom okruženju.

7. LITERATURA

LITERATURA

1. D. J. Phillips, R. J. Davenport, T. A. Demaude, F. P. Galleway, M. W. Jones, L. Knerr, B. G. Perry, A. J. Ratcliffe, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2008) 4146-4149.
2. C. London *et al*, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2008) 1696-1701.
3. A. M. Palmer, U. Nettekoven, *Tetrahedron: Asymmetry* **18** (2007) 2381-2385.
4. I. Vliegen, J. Paeshuyse, L. S. Lehman, W. Zhong, S. Roofthoof, H. Dutartre, B. Selisko, B. Canard, N. Boddeker, S. Bondy, D. Oare, E. De Clercq, W. A. Lee, G. Pürstinger, J. Neyts, *Antiviral Research* **74** (2007) A37.
5. Z. Wu *et al*, *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2004) 909-912
6. J. A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, 4th Ed, Blackwell Publishing, India, 2007.
7. R. J. Kale, M. U. Shaikh, G. R. Jadhav, C. H. Gill, *Tetrahedron Letters* (2008)
8. W. Mederski, J. Sombroek, P. Schelling, N. Beier, I. Lues, K. Minck, US Patent 6,037,349 (2000)
9. A.G. Arvanitis *et al*; *Bioorg. Med. Chem.* **13** (2003) 125-128.
10. J. Ren, J. B. Chaires, *Biochemistry* **38** (1999) 16067-16075.
11. H. W. Zimmermann, *Angewandte Chemie* **25** (1986) 115-196.
12. J. B. Chaires, *Current Opinion in Structural biology* **8** (1998) 314-320.
13. L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 18-30.
14. R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Elsevier; Academic Press, 2nd Ed, 2004.
15. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, In *DNA. and RNA. Binders*, Weinheim: Wiley-VCH; 2002.
16. D. Staerk, A. A. Hamed, E. Pedersen, J. P. Jacobsen, *Bioconjugate Chem.* **8** (1997) 869-877.
17. a) D. Madge, R. Wong, G. P. Seybold, *Photochemistry and Photobiology* **75** (2002) 327-334; b) A. E. Wood, G. Bishop, *Molecules* **9** (2004) 67-85.
18. a) X. Qu, J. O. Trent, I. Fokt, W. Priebe, J. B. Chaires, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97** (2002) 12032-12037; b) G. Bing, Y. Yinfa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240** (1997) 557-560.
19. F. A. Tanious, D. Daoyuan, A. P. Donald, W. D. Wilson, *Biochemistry* **36** (1997) 15315-15325.
20. G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**(1949)660-664.
21. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, Part III.

LITERATURA

22. a) W. D. Wilson, F. A. Tanious, M. Fernandez-Saiz, T. Rigl, *Methods in Molecular Biology* **90** (1998) 219-240; b) J. Sartorius, H. J. Schneider, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1997) 2319-2327.
23. S. A. Robertson, K. Harada, A. D. Frankel, D. E. Wemmer, *Biochemistry* **39** (2000) 946.
24. a) G. Cohen, H. Eisenberg, *Biopolymers*, **8** (45) (1969); b) M. Wirth, O. Buchardt, T. Koch, P. E. Nielsen, *J. Am. Chem. Soc.*, **110** (1988) 932.
25. a) G. Dougherty, J. R. Pilbrow, *Int. J. Biochem.* **16**(1984)1179-92; b) E. C. Long, J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.* **23**(1990) 273-9.
26. P.K. Dubey, C. V. Ratnam, *Ind.J. Chem.* (1977).
27. P.K. Dubey, C. V. Ratnam, *Ind J. Chem.* **18** (1979) 428-431.
28. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, M. Sedić, L. Šuman, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 5696-5711.
29. N. Perin, Diplomski rad „Sinteza, mikrovalna sinteza i spektroskopska karakterizacija novih potencijalnih biološki aktivnih derivata benzimidazo[1,2-*a*]kinolina“ Zagreb, 2009.
30. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, L. Šuman, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola; *J. Med. Chem.* **51** (2008) 4899-4910.
31. K. Ester, M. Hranjec, I. Piantanida, I. Čaleta, J. Ivana, K Pavelić, M. Kralj, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **52** (2009) 2482-2492.
32. H. C. Becker, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 5798-5803
33. N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, In *Circular dichroism Principles and Applications*, 2nd Ed, New York Wiley-VCH, New York, 2000.

8. SAŽETAK

Borka Lučić

**NOVI BIOLOŠKI AKTIVNI DERIVATI IMIDAZO[4,5-*b*]PIRIDINA:
SINTEZA, INTERAKCIJA S ctDNA I ANTITUMORSKA
AKTIVNOST *in vitro***

Kao nastavak našeg dugogodišnjeg kontinuiranog rada na području organske i medicinske kemije, ovaj rad prikazuje sintezu novih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina, ispitivanje njihove antitumorske aktivnosti *in vitro* te spektroskopsko ispitivanje interakcije s ctDNA u svrhu određivanja jednog od mehanizama njihovog biološkog djelovanja. 2-stirilimidazo[4,5-*b*]piridini priređeni su korištenjem klasičnih reakcija organske kemije. Njihovi ciklički analozi, triazabenzocfluoreni, priređeni su reakcijama fotokemijske dehidrociklizacije i termičke ciklizacije. Strukture novopriređenih spojeva potvrđene su korištenjem ^1H i ^{13}C NMR, IR i UV/Vis spektroskopije.

Antitumorska aktivnost ispitana je *in vitro* na 6 staničnih linija humanih karcinoma i stanične linije normalnih fibroblasta. Neki od ispitanih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina pokazuju značajnu antitumorsku aktivnost i selektivnost te su potencijalni kemoterapeutske agensi za daljnja ispitivanja.

Interakcija s ctDNA dva derivata imidazo[4,5-*b*]piridina ispitana je korištenjem 5 metoda koje uključuju viskozimetriju i termalno denaturiranje te UV/Vis, fluorimetrijsku i CD spektroskopiju kojima su provedene titracije s ctDNA. Ciklički derivat triazabenzocfluorena pokazao je značajnu interakciju s ctDNA te se na temelju svih dobivenih rezultata može zaključiti da je jedan od njegovih mehanizama biološkog djelovanja **interkaliranje u dvostruku uzvojnici DNA.**

Ključne riječi: imidazo[4,5-*b*]piridini, triazabenzocpiridini, NMR, IR, UV/Vis, fluorimetrijska i CD spektroskopija, interakcija s ctDNA, antitumorska aktivnost *in vitro*

9. SUMMARY

Borka Lučić

**NOVEL BIOLOGICALLY ACTIVE IMIDAZO[4,5-*b*]PYRIDINE
DERIVATIVES: SYNTHESIS, INTERACTION WITH ctDNA AND
ANTITUMOR ACTIVITY *in vitro***

As a part of our continuing research in the field of organic and medicinal chemistry, in this work, the synthesis of novel imidazo[4,5-*b*]pyridine derivatives, antitumor activity *in vitro* as well as spectroscopic study of interaction with ctDNA in order to determinate one of possible mechanisms of their biological action, has been presented.

2-styryl-imidazo[4,5-*b*]pyridines were prepared by using classical organic synthesis reactions. Their cyclic analogues, triazabenzoc[*c*]fluorenes were prepared by photochemical dehydrocyclization and thermic cyclization reactions. Structures of prepared compounds were confirmed by means of ^1H , ^{13}C NMR, IR and UV spectroscopy.

Antitumor activity *in vitro* was tested on 6 human tumour cell lines, as well as on normal (diploid) human fibroblasts. Some of tested compounds showed a differential and significant antiproliferative effect at micromole concentrations and thus, some additional studies of their action as a potential chemotherapeutics will be performed.

Interaction with ctDNA of two imidazo[4,5-*b*]derivatives was studied by using 5 different methods including viscometry, thermal denaturation experiment and spectroscopic UV/Vis, fluorimetric and CD titrations with ctDNA. Both Cyclic derivative triazabenzoc[*c*]fluorene showed significant interaction with ctDNA and based on all experiment results, we can conclude that one of the mechanisms of its biological action is **intercalation into DNA**.

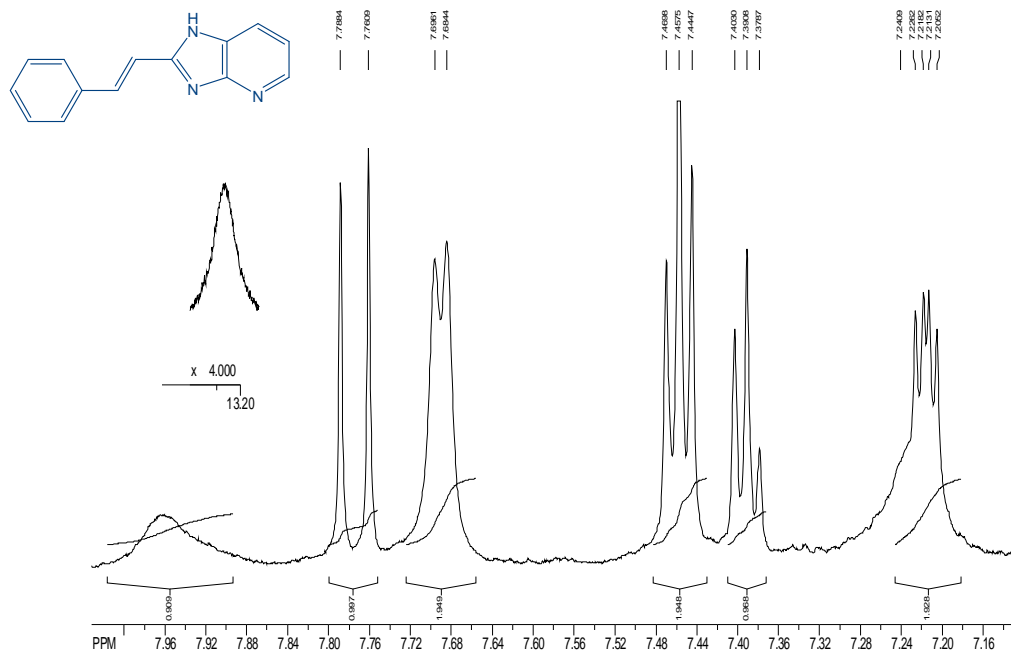
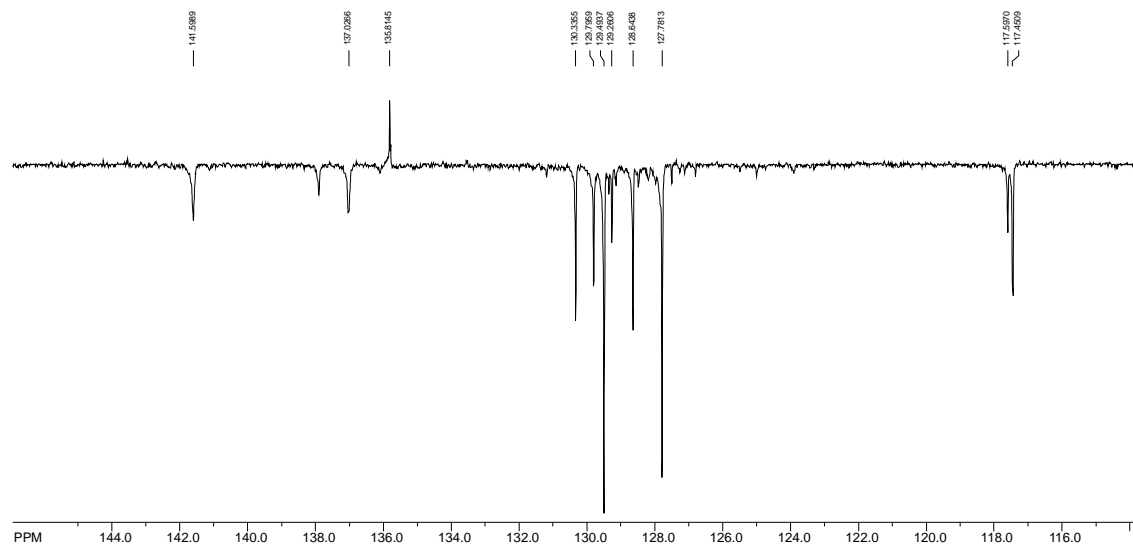
Key words: imidazo[4,5-*b*]pyridines, triazabenzoc[*c*]fluorenes, NMR, IR, UV/Vis, fluorimetric and CD spectroscopy, interaction with ctDNA, antitumor activity *in vitro*

10. ŽIVOTOPIS

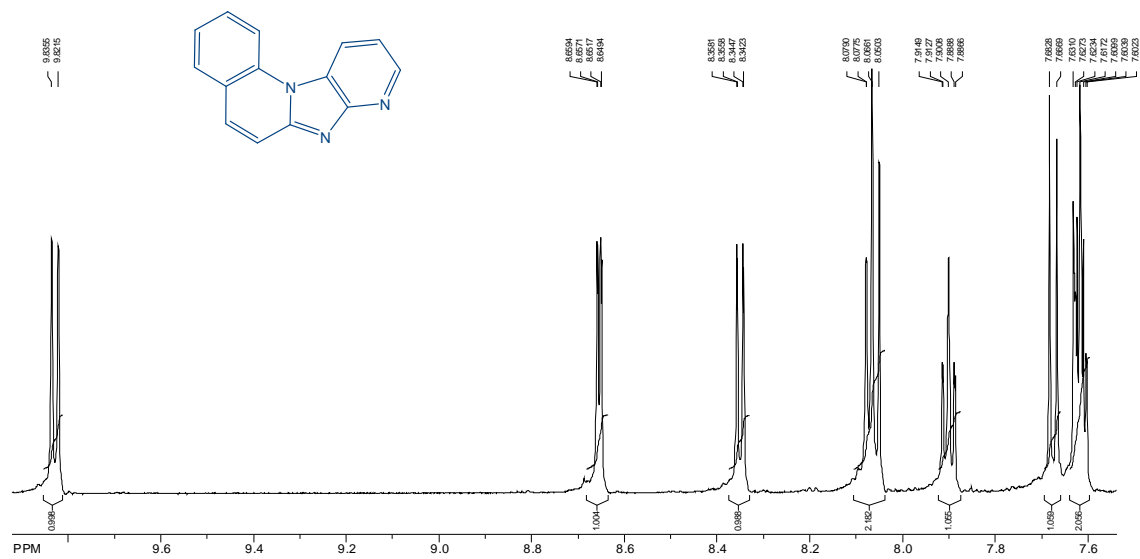
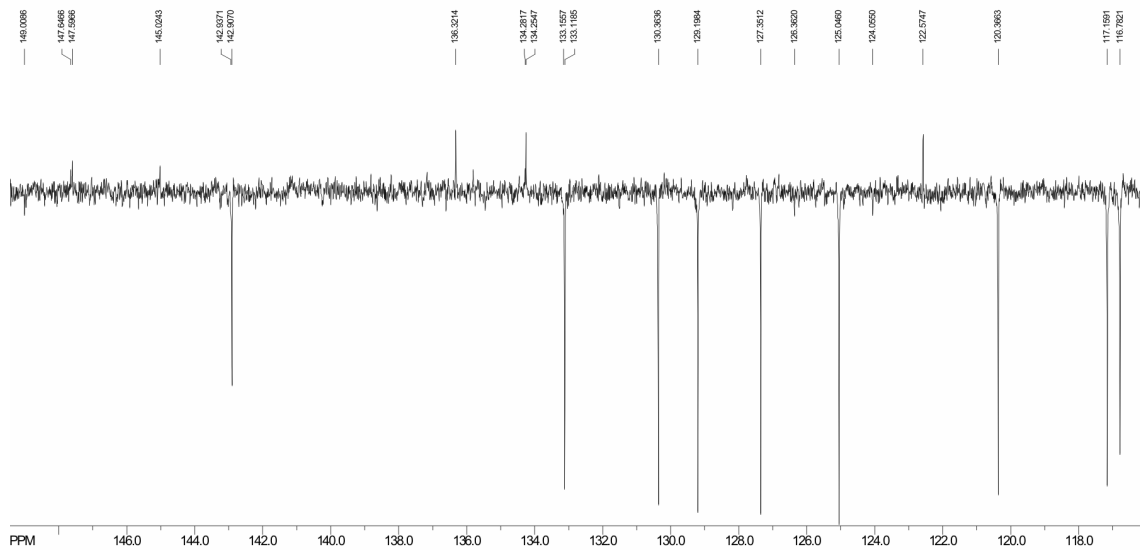
Borka Lučić rođena je 14. ožujka 1986. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađala je u Jastrebarskom, a opću gimnaziju u Srednjoj školi Jastrebarsko gdje je 2004. godine maturirala s odličnim uspjehom. Tijekom osnovne i srednje škole sudjelovala je na brojnim općinskim i županijskim natjecanjima gdje je postizala zapažene rezultate. Godine 2004. upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Na 4. godini studija opredjelila se za smjer Procesi i proizvodi, modul Organski procesi i proizvodi, te se uključila u znanstveno-istraživački rad u Zavodu za organsku kemiju istog fakulteta na projektu „Novi heterocikli kao antitumorski i antivirusni (pametni) lijekovi“ (broj 125-0982464-1356 financiranim od MZOŠ-a) voditeljice prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola.. Tijekom studija je također bila demonstrator na vježbama iz kolegija Prijenos tvari i energije, Mehaničkog procesnog inženjerstva i Toplinskog procesnog inženjerstva.. Od 2004. godine prima Državnu stipendiju Republike Hrvatske, a od 2007. godine stipendiju PLIVA-e. Do sada je položila sve ispite osim dva ispita iz VII. semestra s prosjekom ocjena 4,45. Sudjelovala je na XII. Ružičkinim danima održanim u Vukovaru od 18. -19. 09. 2008. s priopćenjem na posteru pod nazivom „Ciklički derivati benzimidazola i imidazo[4,5-*b*]piridina“. Sudjelovala je na VIII. Susretu mladih kemijskih inženjera održanim u Zagrebu od 18. – 19. 02. 2010. s priopćenjem na posteru pod nazivom „Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina“

11. PRILOZI

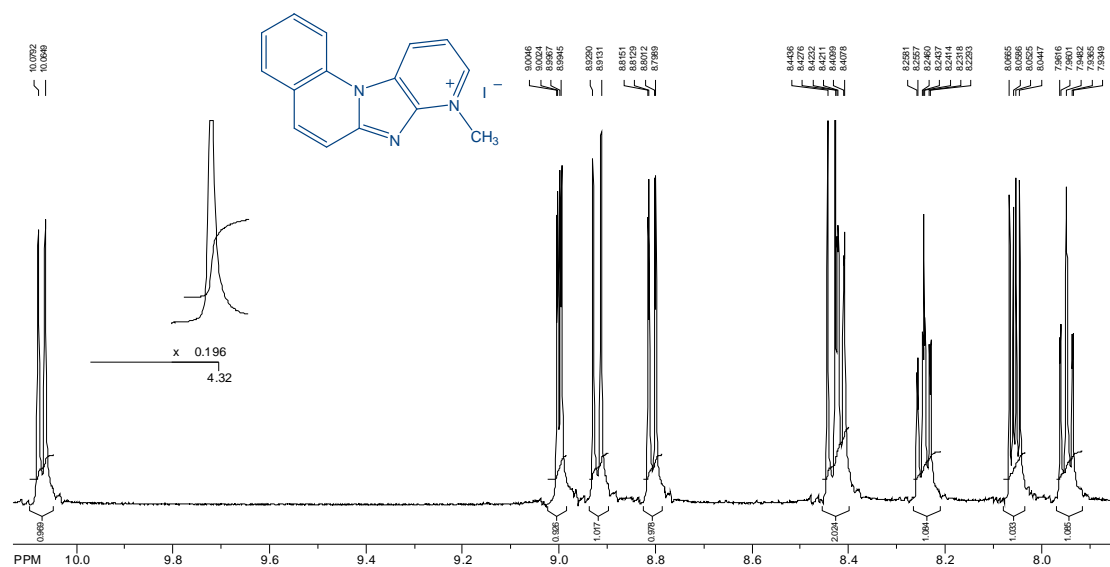
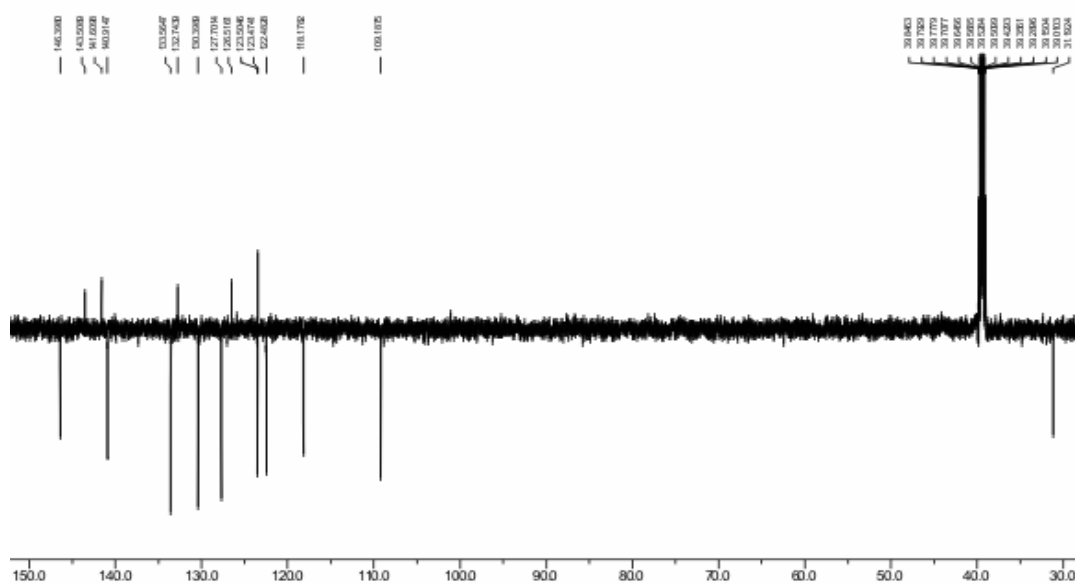
PRILOG 1.

 ^1H NMR spektar 2-stiril-1H-imidazo[4,5-*b*]piridina **3** ^{13}C NMR spektar 2-stiril-1H-imidazo[4,5-*b*]piridina **3**

PRILOG 2.

 ^1H NMR spektar 7,8,11b-triazabeno[*c*]fluorena **4** ^{13}C NMR spektar 7,8,11b-triazabeno[*c*]fluorena **4**

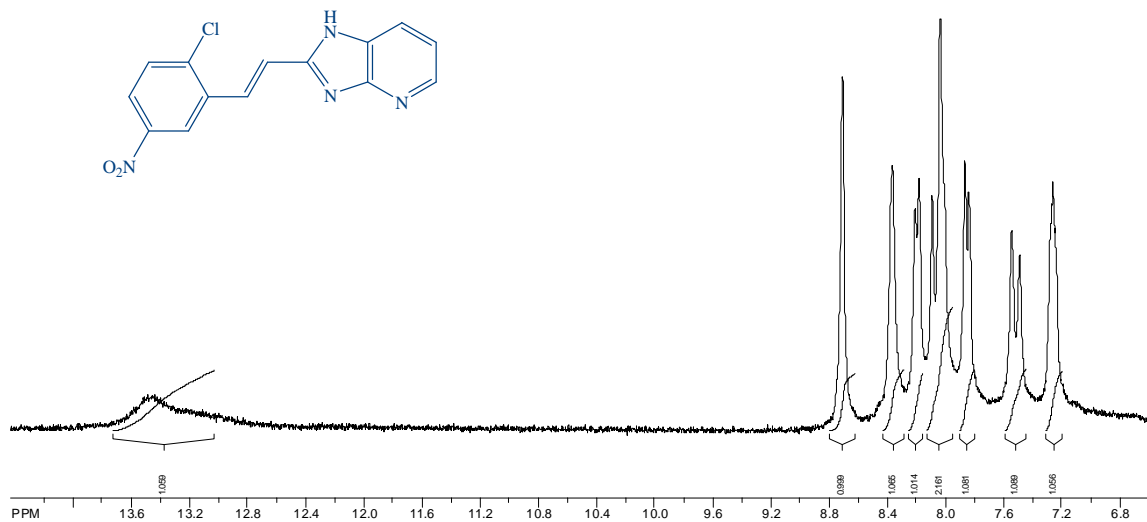
PRILOG 3.

 ^1H NMR spektar 8-metil-7,8,11b-triazabeno[*c*]fluoren-jodida **5** ^{13}C NMR spektar 8-metil-7,8,11b-triazabeno[*c*]fluoren-jodida **5**

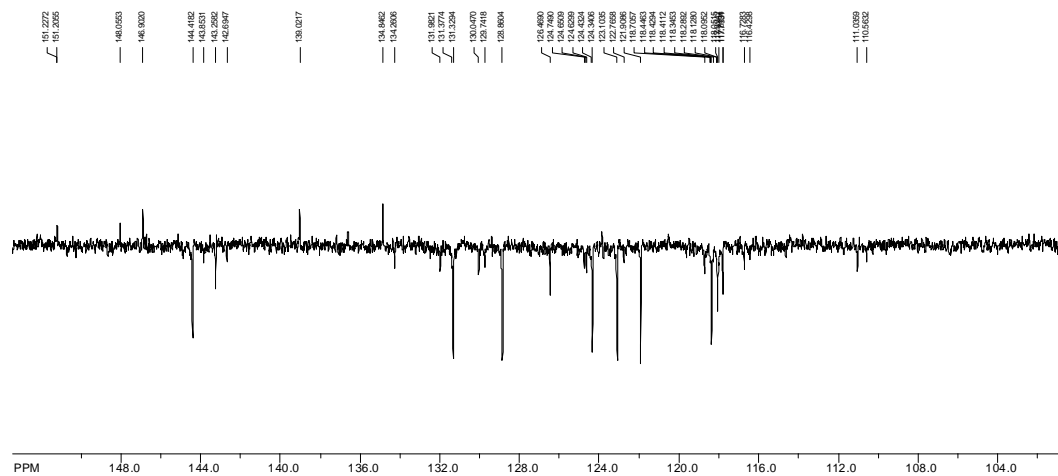
PRILOZI

PRILOG 4.

^1H NMR spektar 2-(2-kloro-5-nitro)stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina 7



^{13}C NMR spektar 2-(2-kloro-5-nitro)stiril-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina 7



PRILOG 5.

 ^1H NMR spektar 3-nitro-7,8,11b-triazabeno[*c*]fluorena **8**