

Sinteza novih biološki aktivnih halogeniranih hibrida bicikličkih heterocikla i 1,2,3-triazola

Bistrović, Andrea

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:746027>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Andrea Bistrović

**SINTEZA NOVIH BIOLOŠKI AKTIVNIH
HALOGENIRANIH HIBRIDA BICIKLIČKIH
HETEROCIKLA I 1,2,3-TRIAZOLA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Andrea Bistrović

**SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE
HALOGENATED HYBRIDS OF BICYCLIC
HETEROCYCLES AND 1,2,3-TRIAZOLE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Andrea Bistrović

**SINTEZA NOVIH BIOLOŠKI AKTIVNIH
HALOGENIRANIH HIBRIDA BICIKLIČKIH
HETEROCIKLA I 1,2,3-TRIAZOLA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Andrea Bistrović

**SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE
HALOGENATED HYBRIDS OF BICYCLIC
HETEROCYCLES AND 1,2,3-TRIAZOLE**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

Zagreb, 2018.

Bibliografski podaci:

- ❖ UDK: 547.857.057:615.28.011(043.3)
- ❖ Znanstveno područje: prirodne znanosti
- ❖ Znanstveno polje: kemija
- ❖ Institucija: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
- ❖ Voditelj rada: Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
- ❖ Broj stranica: 268
- ❖ Broj slika: 84
- ❖ Broj tablica: 27
- ❖ Broj shema: 56
- ❖ Broj literaturnih referenci: 246
- ❖ Datum obrane: 13. lipanj 2018.
- ❖ Sastav povjerenstva za obranu: Izv. prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević, FKIT
Prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT
Prof. dr. sc. Miroslav Bajić, VEF
- ❖ Rad je pohranjen u:
Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb;
Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, Marulićev trg 20;
Knjižnici Sveučilišta u Rijeci, Dolac 1;
Knjižnici Sveučilišta u Splitu, Livanjska 5 i
Knjižnici Sveučilišta u Osijeku, Europska avenija 24.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu održanoj 25. siječnja 2016. te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu održanoj 8. ožujka 2016.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić na predloženoj temi, pomoći i svim savjetima koje mi je pružila tijekom izrade i pisanja doktorskog rada.

Zahvaljujem Izv. prof. dr. sc. Sandri Kraljević Pavelić i njezinoj istraživačkoj grupi s Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci na ispitivanju antitumorskog djelovanja priređenih spojeva.

Hvala prof. dr. sc. Miroslavu Bajiću i doc. dr. sc. Luki Krstuloviću s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na ugodnoj suradnji i brojnim savjetima.

Hvala doc. dr. sc. Ivani Stolić s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pomoći prilikom određivanja i interpretacije rezultata ispitivanja interakcije priređenih spojeva s ctDNA i dsRNA.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Sanji Koštrun iz Fidelte na provođenju in silico analize priređenih spojeva.

Hvala Izv. prof. dr. sc. Mariju Cetini s Tekstilno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na određivanju kristalne strukture spojeva.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Domagoju Drenjančeviću s Medicinskog fakulteta Josipa Jurja Strossmayera Sveučilišta u Osijeku na ispitivanju antibakterijskog djelovanja pripremljenih spojeva.

Hvala prof. dr. sc. John M. Kellyu s London School of Hygiene and Tropical Medicine u Velikoj Britaniji na određivanju antitripanosomskog djelovanja sintetiziranih spojeva.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Janezu Plavec s NMR centra na Kemijskom institutu u Ljubljani na snimanju dvodimenzijskih spektara NMR i pomoći prilikom određivanja struktura spojeva.

Veliko hvala mojim kolegicama Andrijani Meščić i Silviji Maračić na nesebičnoj pomoći, savjetima i ugodnoj atmosferi.

Hvala svim članovima Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu na ugodnoj radnoj atmosferi i dobrom društvu.

Na kraju veliko hvala mojoj obitelji, zaručniku i prijateljima na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i strpljenju.

Zahvaljujem na dodijeljenoj stipendiji UNESCO-a pri Ministarstvu kulture i L'ORÉAL ADRIA d.o.o. „Za žene u znanosti“ u 2018. godini.

Istraživanje u doktorskome radu provedeno je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-IP-2013-11-5596 „Synthesis and Cytostatic Evaluations of Novel Nitrogen Heterocycles library (SCIENCENTRY)“.

SAŽETAK

U ovom radu opisana je sinteza i biološka aktivnost novih hibrida purina i purinskih izostera s 1,4-disupstituiranim 1,2,3-triazolom. Priređeni su purini i pseudopurini sa supstituentima u položajima 6 i 9 heterocikličke jezgre i derivati purinskog izostera benzimidazola supstituiranog u položajima 2 i 5(6). 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli su dobiveni Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom kataliziranom bakrom. Kako bi se optimirali reakcijski uvjeti, *click* reakcija provedena je klasičnom sintezom kao i primjenom ekološki prihvatljivih reakcija potpomognutih mikrovalovima i ultrazvukom.

Svim priređenim spojevima ispitano je antitumorsko djelovanje *in vitro* na niz staničnih linija humanih karcinoma, kao i na zdrave stanice. Spojevi **21**, **46**, **56**, **58**, **70**, **127b** i **132c** s naj snažnijim i selektivnim antitumorskim djelovanjem odabrani su kao kandidati za daljnja biološka ispitivanja kako bi se utvrdio mehanizam njihovog djelovanja. 5(6)-amidino-supstituirani derivati benzimidazola (**125a–133a**, **125b–134b**, **125c–134c** i **141–143**) pokazali su najizraženije antitumorsko djelovanje na odabrane tumorske stanične linije u nanomolarnom području inhibitornih koncentracija. 7-deazapurinski hibridi **21**, **56**, **58** i **70** pokazali su značajno smanjenje ekspresije CDK9/ciklin T1 u tumorskim stanicama, dok su benzimidazolni derivati **46**, **127b** i **132c** snažno i selektivno inhibirali karcinom pluća ne-malih stanica (A549) uz smanjenu ekspresiju enzima p38 MAPK. Daljnja *in silico* analiza mogućih interakcija s biološkom metom p38 MAPK potvrdila je mogućnost stvaranja značajnih interakcija s neaktivnom konformacijom tog enzima, a predviđena aktivnost imala je vrijednost nižu od 100 nM. Prema rezultatima molekuskog uklapanja priređeni su novi 5(6)-(2-imidazolil)-supstituirani hibridi benzimidazola (**153–155**, **161–163**, **165**, **171a–175a**, **171b–175b** i **171c–175c**) s ciljem dobivanja spojeva s boljim farmakokinetičkim svojstvima i inhibicijskom aktivnošću enzima p38 MAPK.

Amidino-supstituiranim hibridima benzimidazola (**125a–133a**, **125b–133b** i **125c–133c**) ispitane su interakcije s dvolančanim polinukleotidima *ctDNA* i dsRNA (pApU i pCpG) primjenom UV/Vis i CD-spektroskopije, te određivanjem temperature mekšanja. Spojevima koji su pokazali mogućnost stvaranja nekovalentnih interakcija s odabranim polinukleotidima ispitano je antibakterijsko i antiprotozalno djelovanje. Spojevi **125a** i **133b** pokazali su snažno antibakterijsko djelovanje protiv rezistentnih kliničkih sojeva *E.coli* (*ESBL*) i *MRSA*, dok je *p*-metoksifenil-1,2,3-triazolni supstituent (**130a–130c**) značajno poboljšao inhibitorno djelovanje protiv parazita *T. brucei*.

Ključne riječi: purini, pseudopurini, amidini, benzimidazoli, 1,2,3-triazoli, antitumorsko djelovanje, p38 MAPK, CDK9, *ctDNA*, dsRNA, rezistentne bakterije, *Trypanosoma brucei*

SUMMARY

This thesis describes the synthesis and biological activity of novel hybrids of purine and purine isosters containing 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles. Purines and pseudopurines substituted at positions 6 and 9 of the heterocyclic core, as well as purine isosters benzimidazoles substituted at positions 2 and 5(6) were prepared. 1,4-Disubstituted 1,2,3-triazoles were obtained by copper-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition. In order to optimize the reaction conditions, *click* reactions were conducted using classical synthetic approaches as well as eco-friendly microwave and ultrasound assisted reactions.

All prepared compounds were tested for their *in vitro* antitumor activities on several human cancer cells and normal fibroblasts. Compounds **21**, **46**, **56**, **58**, **70**, **127b** and **131c** with the most potent and selective antitumor activities were selected as candidates for further biological studies to determine the mechanism of their action. 5(6)-Amidino substituted benzimidazole derivatives (**125a–133a**, **125b–134b**, **125c–134c** and **141–143**) showed the most pronounced antitumor activities in nanomolar range towards all selected cancer cell lines. 7-Deazapurine hybrids **21**, **56**, **58** and **70** showed a significant reduction of CDK9/cyclin T1 expression, while benzimidazole derivatives **46**, **127b** and **131c** strongly and selectively inhibited non-small cell lung cancer (A549) reducing p38 MAPK expression. Further *in silico* analysis of possible interactions confirmed the ability of significant interactions with inactive conformation of p38 MAPK with predicted activity below 100 nM. According to molecular docking results, new 5(6)-(2-imidazolyl)-substituted benzimidazole hybrids (**153–155**, **161–163**, **165**, **171a–175a**, **171b–175b** and **171c–175c**) were prepared to obtain compounds with improved pharmacokinetic properties and p38 MAPK inhibitor activities.

The interactions with double-stranded polynucleotides *ctDNA* and dsRNA (pApU and pCpG) of chosen amidino substituted benzimidazole hybrids (**125a–133a**, **125b–133b** and **125c–133c**) were studied by using UV/Vis and CD spectroscopy and thermal denaturation experiments. Compounds that demonstrated the ability to generate non-covalent interactions with selected polynucleotides were tested for their antibacterial and antiprotozoal activity. Compounds **125a** and **133b** showed strong antibacterial activity against resistant clinical strains *E. coli* (*ESBL*) and *MRSA*, while the *p*-methoxyphenyl-1,2,3-triazole substituent (**130a–130c**) significantly improved the activity against *T. brucei*.

Key words: purines, pseudopurines, amidines, benzimidazoles, 1,2,3-triazoles, antitumor activity, p38 MAPK, CDK9, *ctDNA*, dsRNA, resistant bacteria, *Trypanosoma brucei*

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Opći dio	7
2.1. Mete u antitumorskoj terapiji	9
2.1.1. Proteinske kinaze	9
2.1.1.1. MAP-kinaze.....	11
2.1.1.2. CD-kinaze	14
2.2. 1,2,3-triazoli	16
2.2.1. Click kemija	17
2.2.2. Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (CuAAC)	19
2.2.2.1. Mehanizam CuAAC.....	19
2.2.2.2. Katalizatori i ligandi u CuAAC.....	21
2.2.3. Ostale azid-alkin cikloadicije katalizirane metalima (MAAC).....	24
2.2.4. Upotreba alternativnih izvora energije u click reakcijama.....	24
2.3. Purini	27
2.3.1. Biološki važni purinski derivati	29
2.3.1.1. Biološki važni 6-klorpurinski derivati.....	32
2.3.1.2. Sinteza hibrida purina i 1,2,3-triazola.....	34
2.4. Purinski izosteri	39
2.4.1. 7-deazapurini.....	40
2.4.1.1. Biološki važni hibridi 7-deazapurina i 1,2,3-triazola	42
2.4.2. Benzimidazoli	43
2.4.2.1. Sinteza amidino-supstituiranih benzimidazola	47
2.4.2.2. Sinteza hibrida benzimidazola i 1,2,3-triazola	51
3. Rezultati i rasprava	57
3.1. Uvod	59
3.2. Hibridi halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituiranim 1,2,3-triazolima	61
3.2.1. Sinteza hibrida halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituiranim 1,2,3-triazolima	62
3.2.2. Analiza NMR spektara N-7 i N-9 izomera halogeniranih derivata 6-klorpurina i 6-klor-3-deazapurina	66
3.2.3. Kristalna struktura hibrida 6-klorpurina (8) i 6-klor-3-deazapurina (12)	68
3.2.4. Biološka ispitivanja halogeniranih derivata purina i purinskih izostera	70

3.2.4.1. Antiproliferativna ispitivanja hibrida halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituiranim 1,2,3-triazolima	70
3.2.4.2. Analiza apoptoze za spoj 46	72
3.2.4.3. Analiza Western blot za spojeve 46 i 21	74
3.2.5. <i>In silico</i> analiza mogućih interakcija spoja 46 s p38 MAPK	76
3.3. Hibridi mono- i bis-6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom	79
3.3.1. Sinteza hibrida mono- i bis-6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom.....	80
3.3.2. Kristalna struktura hibrida mono- i bis-6-klor-7-deazapurina 58 , 64 i 65	82
3.3.3. Biološka ispitivanja hibrida mono- i bis-6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom	84
3.3.3.1. Antiproliferativna ispitivanja hibrida mono- i bis-6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom.....	84
3.3.3.2. Analiza apoptoze za spoj 70	86
3.3.3.3. Analiza Western blot za hibride mono- i bis-6-klor-7-deazapurina 58 , 68 i 70	87
3.4. Mono- i bis-triazolni 6-supstituirani purini i 7-deazapurini.....	89
3.4.1. Sinteza mono- i bis-triazonih 6-supstituiranih purina i 7-deazapurina.....	90
3.4.2. Kristalna struktura spoja 91	97
3.4.3. Antiproliferativna ispitivanja hibrida mono- i bis-triazolnih 6-supstituiranih purina i 7-deazapurina.....	98
3.5. Hibridi 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola i 1,2,3-triazola	101
3.5.1. Sinteza hibrida 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola.....	102
3.5.2. Antiproliferativna aktivnost hibrida 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola	106
3.5.3. Analiza apoptoze hibrida benzimidazola i 1,2,3-triazola 127b i 132c	109
3.5.4. Validacija predviđenih proteinskih meta spojeva 127b i 132c primjenom analize Western blot.....	111
3.5.5. Strukturna analiza mogućih interakcija spojeva 127b i 132c s p38 MAP kinazom	115
3.5.6. Spektroskopska karakterizacija 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola.....	120
3.5.7. Interakcije 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola s polinukleotidima.....	121
3.5.7.1. UV/Vis titracija 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola s <i>ctDNA</i> i <i>dsRNA</i>	121
3.5.7.2. Određivanje promjene temperature mekšanja (ΔT_m)	124
3.5.7.3. Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD)	125
3.5.8. Antibakterijska aktivnost <i>in vitro</i>	127
3.5.9. Ispitivanje antitripanosomskog djelovanja.....	129
3.6. Strukturno modificirani 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirani hibridi benzimidazola kao potencijalni inhibitori DFG-out konformacije kinaze p38 MAP	131
3.6.1. Sinteza strukturno modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola.....	132

3.6.2. <i>In silico</i> predviđanje farmakokinetičkih svojstava strukturno modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola	135
3.6.3. <i>In silico</i> predviđanje mogućih interakcija strukturno modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola s <i>DFG-out</i> konformacijom kinaze p38-MAP	141
4. Eksperimentalni dio	143
4.1. Opće napomene.....	145
4.2. Sinteza hibrida halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituiranim 1,2,3-triazolima	145
4.2.1. Opći postupak pripreve <i>N</i> -propargiliranih purinskih izostera 3–6, 19, 20 i 32–34	147
4.2.2. Opći postupak za sintezu <i>N</i> -1 supstituiranih 1,2,3-triazolnih purinomimetika 7–16, 21–28 i 35–49	149
4.3. Sinteza hibrida mono- i bis-6-klor-7-deazapurina i 1,2,3-triazola.....	161
4.3.1. Priprava 7-(2-brometil)-4-klor-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirimidina (50).....	162
4.3.2. Priprava 7-(2-azidoetil)-4-klor-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirimidina (51).....	162
4.3.3. Opći postupak pripreve hibrida 6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom (52–68)	162
4.3.4. Opći postupak pripreve bis-6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom (69 i 70).....	169
4.4. Sinteza mono- i bis-triazolnih 6-supstituiranih purina i 7-deazapurina	170
4.4.1. Priprava 1,4-bis(prop-2-in-1-iloksi)benzena (73)	171
4.4.2. Priprava 4,4'-bis(prop-2-in-1-iloksi)-1,1'-bifenila (74)	171
4.4.3. Opći postupak za pripravu 6-amino-supstituiranih purinskih baza 93 i 94	171
4.4.4. Opći postupak za pripravu <i>N</i> -brometilnih purinskih baza 89, 95, 96 i 108	172
4.4.5. Opći postupak za pripravu <i>N</i> -azidoetilnih purinskih baza 90, 97, 98 i 92	173
4.4.6. Opći postupak za sintezu mono- i bis-1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih hibrida purina (77a–80a, 78b i 79b) i 7-deazapurina purini (91, 99a–106a, 99b–101b, 104b, 105b, 109a, 111a i 109b–111b).....	174
4.4.7. Opći postupak za pripravu bis-pirolo[2,3- <i>d</i>]pirimidinskih derivata 81a–88a	184
4.5. Sinteza 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola.....	187
4.5.1. Priprava 4-(prop-2-in-1-iloksi)benzaldehida (113).....	188
4.5.2. Opći postupak pripreve 4-[(1,2,3-triazol-4-il)metoksi]benzaldehida 114–123	188
4.5.3. Opći postupak za pripravu 5(6)-amidino-supstituiranih hibrida benzimidazola 125a–133a, 125b–134b i 125c–134c	191
4.5.4. Opći postupak za pripravu benzimidazolnih derivata 127d i 127e	205
4.5.5. Priprava 1-azido-4-klorbenzena (136)	206
4.5.6. Opći postupak pripreve 1-(4-klorfenil)-1,2,3-triazolnih alkohola 137 i 138	206
4.5.7. Opći postupak pripreve 1-(4-klorfenil)-1,2,3-triazolilnih aldehida 139 i 140	207
4.5.8. Opći postupak za pripravu 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola 141–143	208

4.6. Sinteza strukturno modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola.....	210
4.6.1. Opći postupak priprave <i>O</i> -propargiliranih benzaldehida 148 i 149	211
4.6.2. Opći postupak one-pot sinteze <i>N</i> -1-benzil-1,2,3-triazolnih benzaldehida (121, 151 i 152)	211
4.6.3. Priprava 2-{4-[(1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazola (153) ..	212
4.6.4. Opći postupak za sinteza 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih benzimidazola 154 i 155	213
4.6.5. Priprava 4-(2-azidoetil)morfolina (157)	214
4.6.6. Opći postupak priprave <i>N</i> -1-morfolinetilnih 1,2,3-triazolnih benzaldehida 158–160	214
4.6.7. Opći postupak za sintezu 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola 161–163	215
4.6.8. Priprava 4-[(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metoksi]benzaldehyda (164)	217
4.6.9. Priprava 5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}benzimidazolnog hidroklorida (165)	217
4.6.10. Opći postupak priprave <i>O</i> -propargiliranih benzaldehida 166a–170a, 166b–170b i 166c–170c	218
4.6.11. Opći postupak za sinteza 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih benzimidazola 171a–175a, 171b–175b i 171c–175c	223
4.7. Rentgenska strukturna analiza	230
4.8. Biološka ispitivanja	230
4.8.1. Antitumorska ispitivanja <i>in vitro</i>	230
4.8.1.1. Uzgoj staničnih kultura <i>in vitro</i>	230
4.8.1.2. <i>MTT Test</i>	231
4.8.1.3. Analiza apoptoze <i>Aneksin-V testom</i>	231
4.8.1.4. <i>Western blot analiza</i>	231
4.8.2. Antibakterijska ispitivanja	232
4.8.3. Antitripanosomska ispitivanja	233
4.9. Ispitivanje interakcija odabranih spojeva s polinukleotidima	233
4.9.1. Polinukleotidi	233
4.9.2. UV/Vis spektroskopija	233
4.9.3. Određivanje promjene temperature mekšanja (ΔT_m)	234
4.9.4. Cirkularni dikroizam (CD)	234
4.10. <i>In silico</i> analize	235
5. Zaključak	237
6. Literatura	245
7. Prilozi	269

1. Uvod

Rak (karcinom) je bolest karakterizirana gubitkom normalnih staničnih funkcija, što rezultira u nekontroliranoj staničnoj proliferaciji i rastu [1]. Vodeći je uzročnik smrti u svijetu s 8,8 milijuna smrtnih slučajeva godišnje [2]. Predviđa se da će se do 2030. godine broj oboljelih od raka povećati s 14 milijuna na 21 milijun, od kojih će 13 milijuna smrtnih slučajeva biti uzrokovani karcinomom [3]. Poznato je više od dvjesto oblika karcinoma, od kojih su najsmrtonosniji karcinom pluća, jetre, debelog crijeva, želuca i dojke. Liječenje se može sastojati od lokaliziranih tretmana, poput kirurških zahvata i radioterapije, ili sustavnog liječenja upotrebom kemoterapijskih lijekova. Kako bi se spriječilo napredovanje tumora lijekovi mogu inhibirati stanični rast i diobu (citostatski lijekovi) ili uzrokovati smrt tumorskih stanica (citotoksični lijekovi) [4]. Kemoterapijska sredstva mogu se podijeliti u dvije kategorije: citotoksični lijekovi i lijekovi s ciljanom terapijom. Konvencionalni citotoksični lijekovi ne djeluju specifično na neki enzim ili makromolekulu, već se sustavno distribuiraju i nakupljaju u stanicama visoke proliferativne aktivnosti što uzrokuje toksičnost i staničnu smrt. Nedostatak uporabe takvih kemoterapeutika je u njihovoj neselektivnoj citotoksičnosti i izazivanju neželjenih učinaka na druge stanice koje se brzo dijele poput stanica epitela crijeva, koštane srži i folikuluma kose, pa često zahtjeva korištenje većih doza kako bi došlo do stanične smrti [1, 4]. Posljednjih 20 godina istraživanja u razvoju novih antitumorskih lijekova su znatno je napredovala. Detaljno razumijevanje molekularnih i genetskih procesa odgovornih za onkogenezu, omogućilo je razvijanje novih ciljanih terapija, kako bi se poboljšala selektivnost i akumulacija biološki aktivnih tvari u stanicama [5, 6].

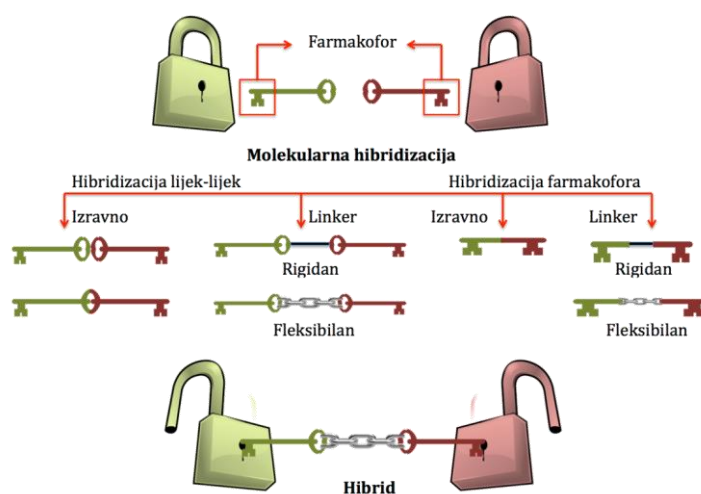
Proteinske kinaze, s preko 500 vrsta, imaju iznimno važnu ulogu u kontroli stanične fiziologije kroz mnoge procese, uključujući regulaciju staničnog ciklusa, diferencijaciju i programiranu staničnu smrt [7, 8]. Ovi se procesi kontroliraju pomoću prijenosa γ -fosfatne skupine iz molekule adenzin-trifosfata (ATP) na hidroksilne skupine serinskih, treoninskih ili tirozinskih proteinskih ostataka. Kontrola unutarstanične fosforilacije ključna je za normalno funkcioniranje stanice, te je poremećaj ovog procesa povezan s nizom bolesti uključujući karcinom, dijabetes i kronične upale. Budući da je molekula DNA nositelj genetske informacije, kao i središte tumorigeneze i patogeneze, važna je meta u razvoju novih lijekova [6, 7]. Replikacija i transkripcija DNA te sinteza proteina glavni su stupnjevi u rastu i diobi stanica.

Ciljana terapija pokazala je brojne uspjehe u razvijanju novih lijekova, no pojava rezistentnosti i slabe korelacije između *in vitro* i *in vivo* učinkovitosti dovela je do istraživanja

terapije koja djeluje na više meta [9–12]. Strategija ciljane terapije pokazala se korisnom za pristup pojedinačnim poremećajima gena, dok bolesti koje ovise o više čimbenika poput neurodegenerativnih bolesti, kroničnih upala i raka, zahtijevaju suzbijanje bolesti na više meta. Razvijene su različite strategije za učinkovito i sigurno liječenje takvih bolesti, uključujući kombinirane terapije. Međutim, glavni nedostaci takvih terapija uključuju slabu prihvatljivost lijeka od strane pacijenata i moguće interakcije lijekova što dovodi do ozbiljnih nuspojava [12].

Racionalni dizajn novih biološki aktivnih spojeva koji se temelji na povezivanju dvaju ili više biološki aktivnih heterocikličkih sustava u novu strukturu (kemijski entitet) s poboljšanim djelovanjem u odnosu na početne molekule naziva se molekularna hibridizacija [13–16]. Hibridi se dizajniraju radi smanjivanja nepoželjnih nusdjelovanja povezanih s jednim od fragmenata, poboljšanja učinka na određenu biološku metu ili stvaranja interakcija s više meta u jednoj molekuli. Oni se mogu koristiti u kombiniranoj terapiji, djelovati specifičnije i snažnije od klasičnih lijekova, smanjiti rezistentnost i rizik od međusobne interakcije pojedinih lijekova. Glavne prednosti hibridnih lijekova protiv karcinoma uključuju povećanu specifičnost, bolju prihvatljivost pacijenata i smanjenje nuspojava, zajedno sa smanjenjem kemo-rezistentnosti.

Dva glavna načina na koji se se ovakve molekule mogu pripraviti uključuju povezivanje farmakofora koristeći prenosnicu (eng. *linker*) ili povezivanje lijekova u novu hibridnu molekulu (slika 1) [14].



Slika 1. Dizajn novih spojeva primjenom koncepta molekularne hibridizacije.

Višekomponentnim i *click* reakcijama učinkovito se sintetiziraju hibridi povezani 1,2,3-triazolnim prstenom [16]. *Click* kemija omogućava pripremu različito supstituiranih biološki aktivnih 1,2,3-triazola koji imaju aktivnosti u nanomolarnom području [17, 18]. Budućnost ovakvog dizajna mogla bi dovesti do razvoja novih lijekova sa snažnijom aktivnošću, boljom selektivnošću i nižom toksičnošću u odnosu na tradicionalnu kombiniranu terapiju. Hibridizacija je djelotvoran pristup u razvijanju novih biološki aktivnih spojeva koji pronalazi sve veću primjenu u razvijanju antitumorskih, antimalarijskih, antituberkulostatskih, antifungalnih, antiinflamatornih i anti-HIV agenasa [16]. Novonastali hibridi zbog novih svojstava tako postaju spojevi nalik lijekovima (eng. *drug-like*), te je sinteza hibridnih molekula u konstantnom porastu u posljednja dva desetljeća.

Nadalje, pojam povlaštene strukture (eng. *privileged scaffolds*) [19–21], poput purina i benzimidazola, uveden je u posljednjih 15 godina i odnosi se na strukture koje su dio molekula i posjeduju aktivnost protiv velikog broja različitih bioloških meta modificiranjem funkcionalnih skupina. Takve strukture obično pokazuju svojstva slična lijekovima i mogu se promatrati kao molekularni filtri koji se odabiru kao poželjni kemijski entiteti u pripravi knjižnica spojeva s potencijalnim biološkim djelovanjem.

U dizajnu novih biološki aktivnih spojeva, često se koriste smjernice poput Lipinskog „pravila 5“ (eng. *Lipinski rule of 5*, Ro5), koje se povezuju s 90 % spojeva s oralnom primjenom [22]. Ova smjernica izvorno je definirana s četiri jednostavna fizikalno-kemijska parametra ($M_r \leq 500$, $\log P \leq 5$, donori H-veze ≤ 5 , akceptori H-veze ≤ 10), koji su povezani s prihvatljivom topivošću u vodi i permeabilnosti, te obuhvaćaju preduvjete za oralnu bioraspoloživost. Međutim, zadovoljavanje tih pravila nije ujedno jamstvo da će spojevi imati svojstva slična lijeku. Uz navedena pravila uvedene su i druge smjernice, poput broja veza koje se mogu rotirati i treba biti manji od 10, vrijednosti $\log D$ ($0 < \log D < 3$) i kiselo-bazna svojstva koja imaju značajan učinak na farmakokinetička i ADMET svojstva (apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost) pa se koriste u racionalnom dizajnu biološki aktivnih spojeva [23]. Iako su pravila Ro5 pronašla primjenu u razvijanju novih lijekova, treba naglasiti kako je samo polovica odobrenih lijekova u skladu s njima [24, 25]. Primjerice, na mete s velikim, planarnim veznim mjestom ili veznim mjestom u obliku utora mogu se uspješno vezati molekule koje ne zadovoljavaju svojstva Ro5.

Nadalje, uvođenje halogenih atoma u spojeve uglavnom se koristi u optimiranju ADMET svojstava s ciljem povećavanja lipofilnosti spojeva. Procjenjuje se da jedna četvrtina

ukupnog broja patenata i radova u području medicinske kemije u sintezi konačnih spojeva uključuje uvođenje halogenih atoma [26]. Halogeni atomi ulaze u male hidrofobne šupljine prisutne u mnogim proteinskim metama, mogu produžiti vrijeme biološkog poluraspada aktivne molekule, a sve se veći interes pridaje i halogenim interakcijama molekule s ligandom [27].

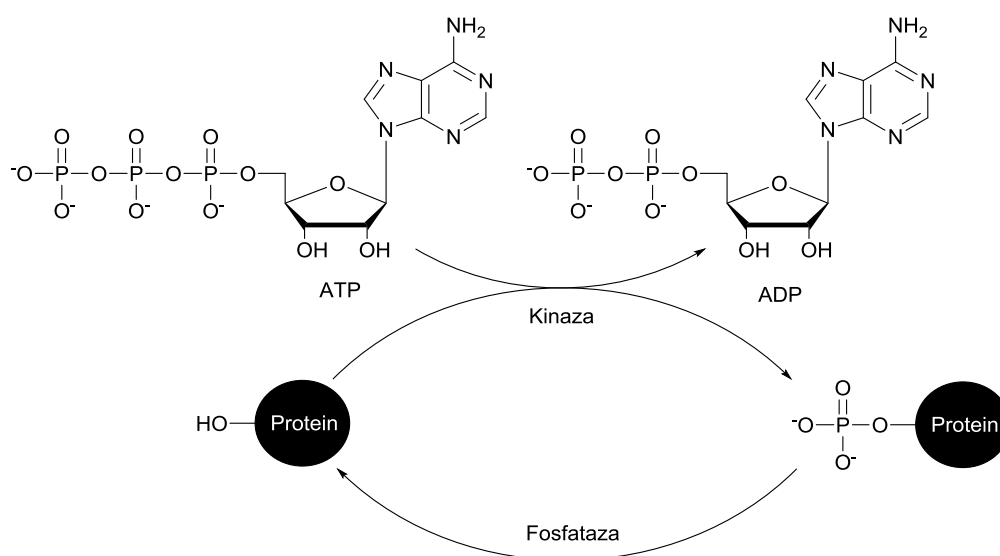
2. Opći dio

2.1. Mete u antitumorskoj terapiji

Rak je skupina bolesti koji ima različite uzročnike, te zahtijeva i različite oblike liječenja. Maligni tumori posjeduju sljedeća svojstva [28]: stanični rast i dioba u odsutnosti odgovarajućih signala, kontinuirani rast izbjegavanjem supresora rasta, stvaranje metastaza, omogućavanje replikacijske besmrtnost, izazivaje angiogeneze i izbjegavanje programirane stanične. Mete u protutumorskoj terapiji uključuju inhibitore angiogeneze, DNA interkalatore i molekule koje se vežu u mali utor (eng. *groove binder*), inhibitore DNA sinteze, transkripcijske regulatore, inhibitore enzima poput proteinskih kinaza, epigenetske faktore, inhibitore mikrotubulina i sl. [1, 5, 29].

2.1.1. Proteinske kinaze

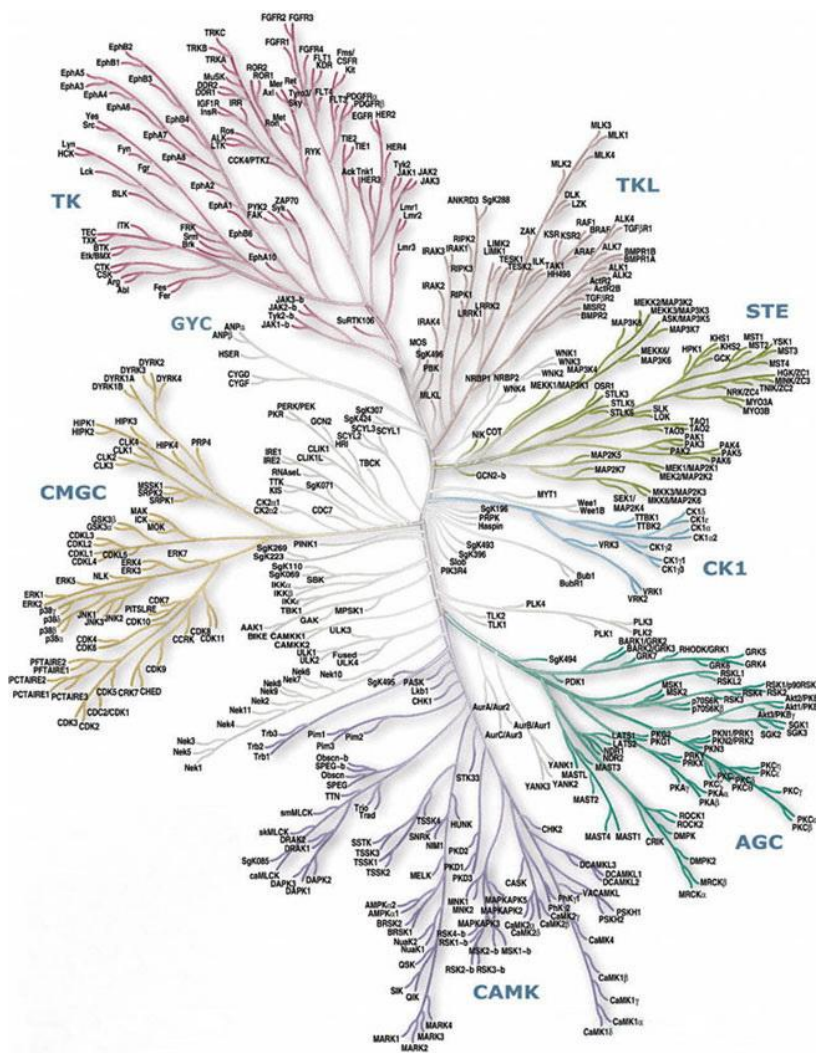
Proteinske kinaze su enzimi koji kataliziraju prijenos terminalne γ -fosfatne skupine ATP-a, ili rjeđe gvanozin-trifosfata (GTP), na specifični aminokiselinski ostatak proteinskog supstrata. Fosforiliranje uzrokuje strukturne promjene u proteinu, čija su posljedica aktivacija ili inhibicija signala proteina. Ovaj proces je reverzibilan, a održavaju ga fosfataze (slika 2), te ima ključnu ulogu u različitim staničnim procesima poput staničnog preživljavanja, rasta, proliferacije, angiogeneze, metabolizma i dr. Neuravnotežena aktivnost ovih enzima stoga je povezana s pojavom različitih bolesti [6, 29–32].



Slika 2. Fosforilacija i defosforilacija proteina.

2. OPĆI DIO

Ljudski kinom, odnosno ukupni set proteinskih kinaza kodiran genom, sastoji se od 518 proteinskih kinaza. S obzirom na proteinski ostatak koji fosforiliraju mogu se klasificirati na serin-treoninske i tirozinske proteinske kinaze, koje se dijele na nereceptorske i receptorske tirozin-kinaze [6]. Nadalje, mogu se podijeliti na osnovu sekvencija aminokiselina unutar katalitičke domene, specifičnosti supstrata ili mehanizma djelovanja. S obzirom na ljudski kinom podijeljene su u sedam skupina AGC, CAMK, CMGC, TK, TKL, STE i CK1 kinaze, koje se dalje dijele na odgovarajuće obitelji i podobitelji (slika 3) [33]. Skupinu CMGC koju čine kinaze ovisne o ciklinu (CDK), kinaze aktivirane mitogenom (MAPK), kinaze glikogen-sintaze (GSK3) i CDC-slične kinaze (CLK), direktno su uključene u regulaciju staničnog ciklusa, dok TK (tirozin-kinaze) imaju ključnu ulogu unutar- i izvanstaničnog prijenosa signala.



Slika 3. Ljudski kinom [34].

Općenito, katalitička podjedinica proteinske kinaze sastoji se od N- i C-terminalne domene, koje su građene od α -uzvojnica i β -listova. Vezno mjesto ATP-a se nalazi između

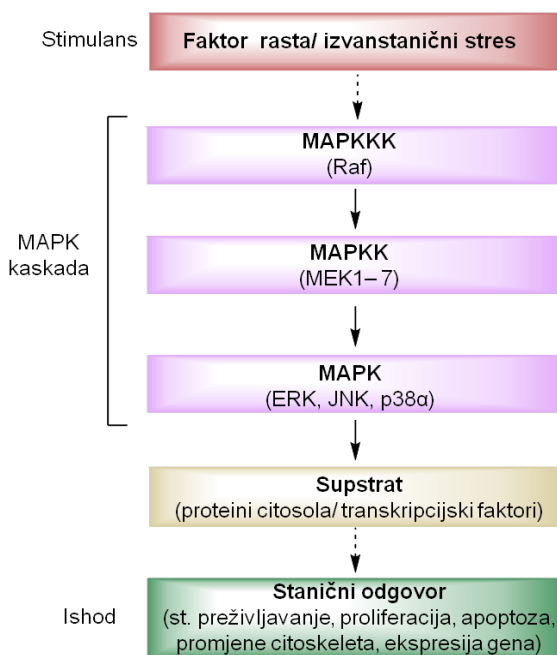
navedenih domena, a segment koji ih povezuje poznat je kao područje zgloba (eng. *hinge region*), u kojem molekula ATP-a stvara dvije vodikove veze s atomima N-1 i N-6 adenina. Većina proteinskih kinaza posjeduje dva različita katalitička oblika: aktivan, u kojem su svi proteinski ostaci u optimalnom položaju za prijenos fosfata, i neaktivan oblik sa smanjenom katalitičkom aktivnošću. Konformacija veznog mjesta ATP-a značajno se razlikuje u tim katalitičkim oblicima enzima. Vezno mjesto ATP-a proteinskih kinaza jako je slično u aktivnoj (*DFG-in*) konformaciji, dok se strukture neaktivnih (*DFG-out*) konformacija značajno razlikuju. Konformacija *DFG-out* karakterizirana je rotacijom motiva DFG (Asp-Phe-Gly) u veznom mjestu ATP-a za gotovo 180° u odnosu na aktivni oblik [35, 36].

Nakon receptora spregnutih s G-proteinom (GPCR), proteinske kinaze su po veličini druga meta u razvoju novih lijekova, posebice antitumorskih agenasa [37–39]. Inhibitori kinaza mogu se podijeliti u četiri osnovne skupine: inhibitore tipa I, tipa II, alosteričke i kovalentne inhibitore. Inhibitori tipa I kompetitivno se vežu za vezno mjesto ATP-a, stvarajući vodikove veze u području zgloba. Neki inhibitori dosežu do hidrofobnog džepa smještenog iza veznog mjesta ATP-a. Veličina i dostupnost ovog džepa djelomično je određena veličinom i vrstom aminokiselinskog ostatka koji se naziva *gatekeeper*, te se razlikuje kod kinaza i može biti odgovoran za selektivnost. Inhibitori tipa II vežu se za neaktivnu konformaciju enzima. Zakretanjem motiva DFG, fenilalanin u konformaciji *DFG-out* otvara dodatni hidrofobni džep. U mnogim slučajevima inhibitori tipa II pokazuju veći stupanj selektivnosti u odnosu na inhibitore tipa I, koji se vežu za konformaciju *DFG-in* [34, 40]. Alosterički inhibitori [41] se vežu izvan veznog mjesta ATP-a, te su karakterizirani visokom selektivnošću, dok kovalentni inhibitori sadrže elektrofilnu skupinu, koja podliježe Michaelovoj adiciji s aminokiselinskim ostatkom (najčešće cistein) u katalitičkoj domeni [42].

2.1.1.1. MAP-kinaze

Proteinske kinaze aktivirane mitogenom (eng. *mitogen activated protein kinase*, MAPK) su serin-treoninske kinaze koje reguliraju stanične funkcije poput proliferacije, diferencijacije, stanični odgovor na stres i apoptozu, te čine važnu metu za lijekove protiv upalnih procesa i raka [6]. Četiri su različite porodice MAP kinaza: kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (eng. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK), c-Jun N-terminalne kinaze (eng. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK), p38 izooblici i kinaze 5 regulirane izvanstaničnim signalom (eng. *extracellular signal-regulated kinases 5*, ERK5). MAPK

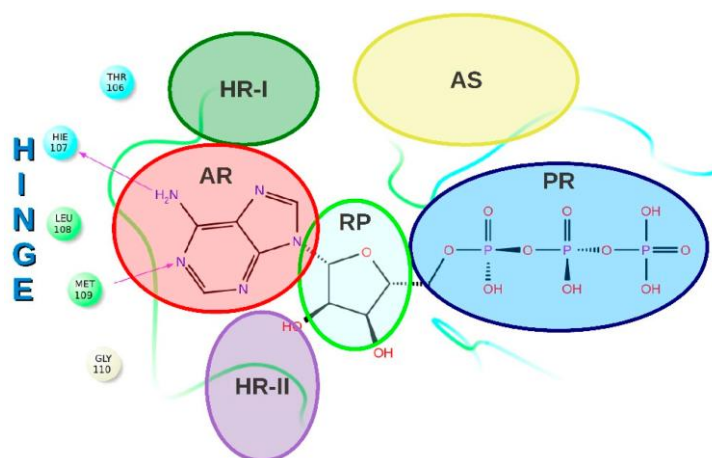
kaskada jedna je od najpoznatijih kaskada proteinskih kinaza i uključuje tri razine kinaza, MAP-kinazu (MAPK), MAPK-kinazu (MAPKK ili MAP2K) i MAPKK-kinazu (MAPKKK ili MAP3K). Izvanstaničnom pobudom se aktivira MAP3K, koja fosforilira MAP2K. MAP2K fosforiliranjem serina i tirozina aktivira MAPK, koja omogućuje prijenos unutarstaničnog signala (slika 4) [6, 43].



Slika 4. Opća kaskada MAPK signalizacijskog puta [43].

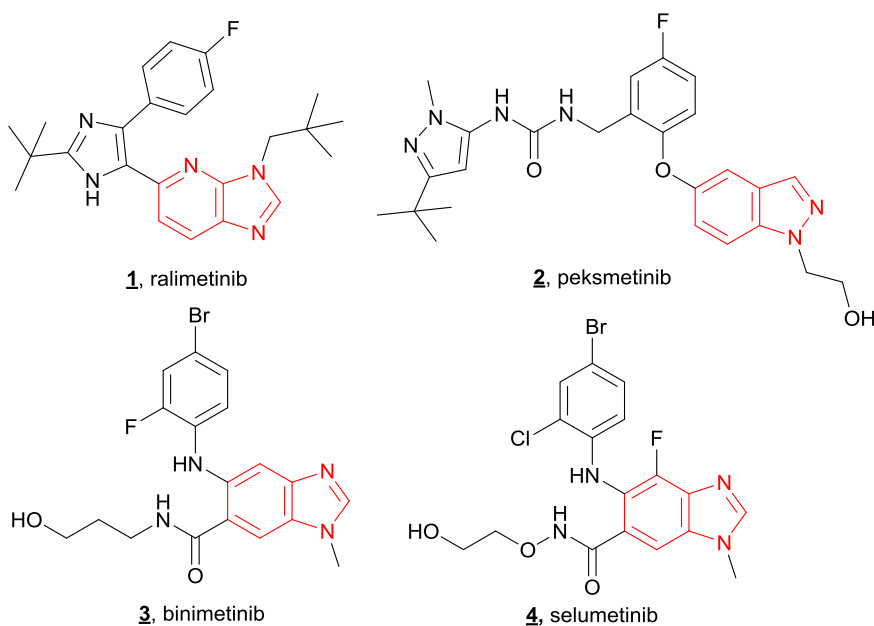
Čimbenici rasta signaliziraju ERK, koji rezultira rastom i diferencijacijom stanica, dok su JNK i p38-MAPK signalizirane stresom i citokinima, te doprinose regulaciji staničnog ciklusa, diferencijaciji stanica, apoptozi i upalnom procesu [44]. p38 MAP kinaza može poprimiti četiri izooblika MAPK11 (p38 α), MAPK12 (p38 β), MAPK13 (p38 γ) i MAPK14 (p38 δ). Ona može djelovati i kao tumorski supresor i kao onkogen ovisno o intenzitetu i trajanju stresa, vrsti stanica i križanju s drugim signalnim putovima. p38 MAPK regulira kontrolne točke pri prijelazima stupnjeva G0, G1/S i G2/M staničnog ciklusa [45]. Reguliranjem razine ciklina (ciklin A ili D1), fosforiliranjem proteina retinoblastoma (pRb) i fosforiliranjem p53 (Ser33 i Ser46), p38 utječe na G1/S prijelaz [46]. Nadalje, p38 MAP kinaza posjeduje relativno mali *gatekeeper* (Thr106) u usporedbi s drugim kinazama koje imaju sterički zahtjevnije ostatke zbog čega ova meta tolerira inhibitore linearne strukture, te podliježe izvrtanju glicina Gly110 u području zgloba (eng. *hinge region*). Samo u 46 proteinskih kinaza, od ukupno 518, uočeno je izvrtanje glicina (eng. *Gly flip*), od kojih samo tri kinaze također posjeduju i Thr106, što može uzrokovati dodatnu selektivnost [47]. Zbog

iznimne važnosti p38 MAPK signalnog puta u kontroli proliferacije i apoptoze, kao i njena deregulacija u nizu tumorskih stanica, čini ovu metu u razvoju novih lijekova posebno klinički značajnom.



Slika 5. Shematski prikaz veznog mjesta ATP-a p38 MAP kinaze [48]. (HINGE, područje zgloba; AR, adeninsko područje; RP, područje riboze; PR, područje fosfata; HR-I i HR-II, hidrofobna područja; AS, alosteričko područje).

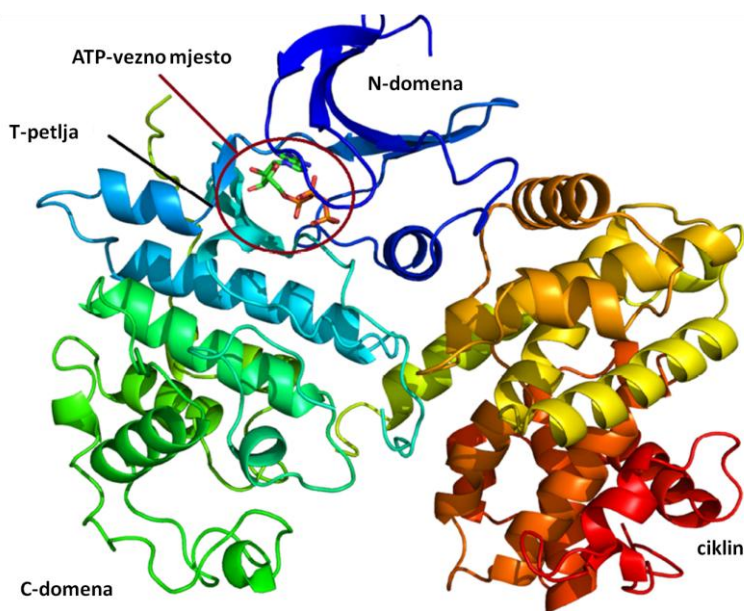
Purini i purinski izosteri pokazali su značajan utjecaj kao inhibitori MAP-kinaza poput inhibitora p38 MAP-kinaze ralimetiniba (**1**) [49] i peksmetiniba (**2**) [50], kao i inhibitora kinaza MEK binimetiniba (**3**) [51] i selumetiniba (**4**) [52], koji se nalaze u kliničkim antitumorskim ispitivanjima (slika 6).



Slika 6. Inhibitori kinaza MAP u kliničkim ispitivanjima kao antitumorska sredstva.

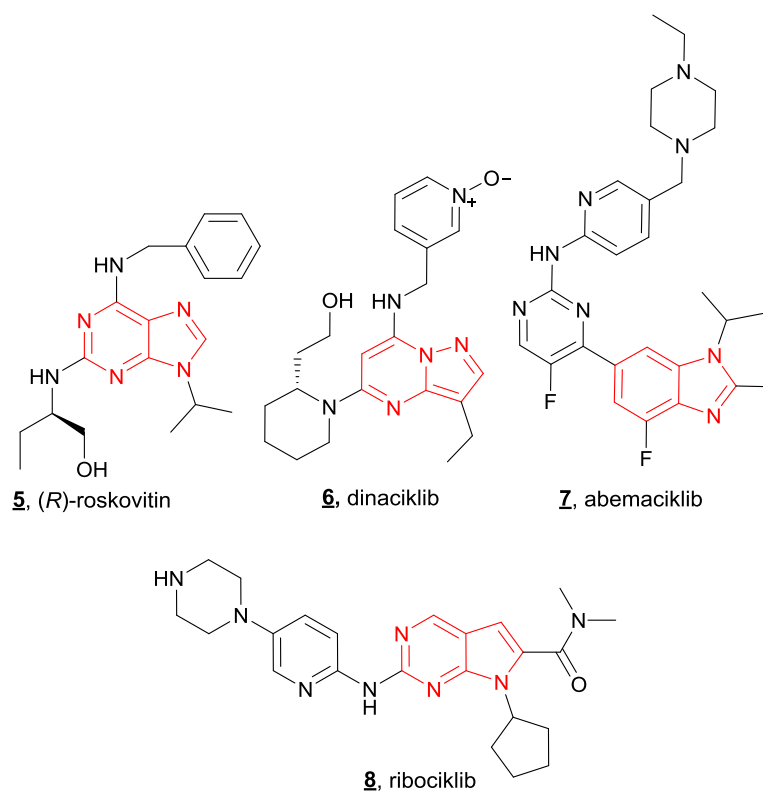
2.1.1.2. CD-kinaze

Proteinskim kinazama aktiviranim mitogenom (MAPK), najrodnije su kinaze ovisne o ciklinu (CDK), koje također spadaju u skupinu CMGC [33]. Njihova enzimska aktivnost regulirana je vezivanjem za proteinske podjedinice cikline. Poznato je 20 podobitelji CD-kinaza, od kojih su CDK1, CDK2, CDK4 i CDK6 uključene u stanični ciklus, a CDK7, CDK9 i CDK11-13 reguliraju transkripciju [53, 54]. U odsutnosti ciklina fleksibilna aktivacijska petlja, koja se još naziva T-petlja, blokira ATP-vezno mjesto između N- i C-terminalne katalitičke domene. Vezanjem ciklina dolazi do strukturnih promjena T-petlje, što omogućuje vezanje molekule ATP-a.



Slika 7. Struktura CDK-kinaze vezane za ciklin [53].

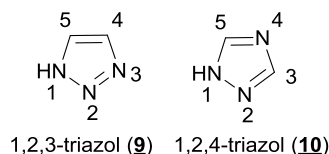
Disreguliranje kinaza ovisnih o ciklinu povezano je s različitim vrstama karcinoma, te se brojni ATP-kompetitivni inhibitori nalaze u kliničkim ispitivanjima kao antitumorska sredstva [54–56]. Jedan od prvih inhibitora CDK, koji je dospio u klinička ispitivanja je 2,6,9-trisupstituirani purinski derivat roskovitin (**5**) i nije zadovoljio sve kriterije za primjenu [57]. Brojni purinski izosteri poput dinacikliba (**6**) [58] se nalaze u kliničkim ispitivanjima ili su odobreni za liječenje karcinoma poput abemacikliba (**7**) i ribocikliba (**8**), odobrenih kao inhibitori CDK4/6 u liječenju karcinoma [59–61]. Dakle, purinska heterociklička jezgra pokazala je iznimnu važnost u inhibiciji CD-kinaza.



Slika 8. Purinski izosteri kao inhibitori kinaze CD koji su odobreni ili se nalaze u kliničkim ispitivanjima kao antitumorski agensi.

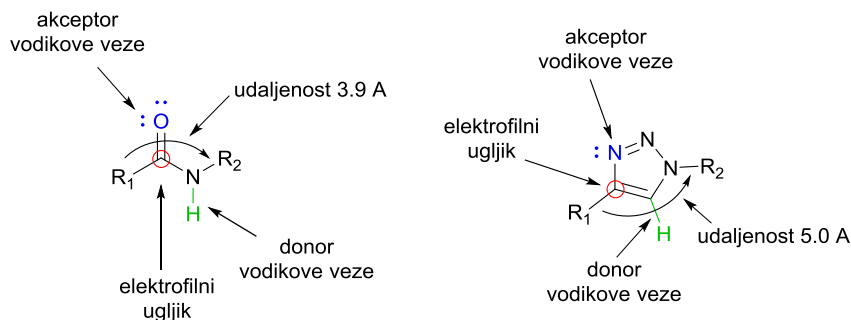
2.2 1,2,3-triazoli

Triazoli su heterociklički organski spojevi, građeni od peteročlanog prstena s tri atoma dušika i dva atoma ugljika. Poznata su dva izomera triazola: 1,2,3-triazol (**9**) i 1,2,4-triazol (**10**) (slika 9).



Slika 9. Izomeri triazola.

1,2,3-triazoli stabilni su pri hidrolitičkim, oksidacijskim i redukcijskim uvjetima, te su otporni na metaboličku razgradnju. Kao aromatični, elektronima bogati sustavi, triazolni derivati mogu se vezati za različite enzime i receptore vodikovim vezama, koordinativnim vezama, ion-dipolnim interakcijama, π -ionskim i interakcijama π - π [62]. Spojevi s triazolnim prstenom u svojoj strukturi pokazali su širok spektar biološke aktivnosti poput antitumorskog, antibakterijskog, antifungalnog, antituberkulostatskog, antiinflamatornog i antitripanosomskog djelovanja [62–64]. Nadalje, triazol posjeduje svojstva idealne prenosnice: dobru topljivost, stabilnost u uobičajenim biološkim uvjetima, visoku rigidnost, čime je onemogućena međusobna interakcija njegovih supstituenata, te pokazuje sličnost s amidnom vezom. Često se upotrebljava kao bioizoster različitih kemijskih sustava poput peptidne veze, imidazola, dvostruke veze i nukleozida [65, 66]. 1,4-disupstituirani triazoli pokazuju svojstva slična *Z*-amidnoj vezi, dok su 1,5-disupstituirani triazoli mimetici *E*-amidne veze. Slobodni elektronski par na karbonilnoj skupini i slobodni elektronski par *N*-3 atoma triazola djeluju kao akceptori vodikove veze, karbonilni ugljikov atom pokazuje sličnost s elektrofilnim C-4 atomom, a amidna N-H veza slična je C-H vezi u položaju 5 te djeluje kao donor vodikove veze (slika 10) [64].

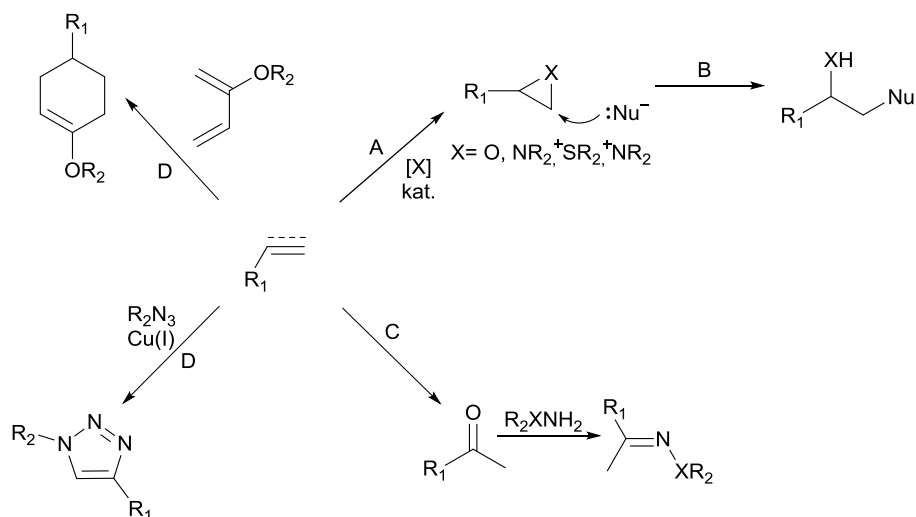


Slika 10. 1,4-disupstituirani-1,2,3-triazol kao bioizoster *Z*-amidne veze.

Zanimljiva svojstva 1,2,3-triazola čine ga važnim heterociklom, stoga je velik broj istraživanja u medicinskoj kemiji usmjeren na tu heterocikličku jezgru. Najznačajnija metoda sinteze 1,2,3-triazola je Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija između terminalnog alkina i azida. Reakcija se može provoditi u katalitičkim i nekatalitičkim sustavima. U termičkim uvjetima ova reakcija nije pronašla široku primjenu, zbog slabe regioselektivnosti, niskih iskorištenja i potrebnih visokih temperatura. Međutim, upotrebom bakra(I) kao katalizatora, uspješno su priređeni regioselektivni 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli u visokim iskorištenjima.

2.2.1. Click kemija

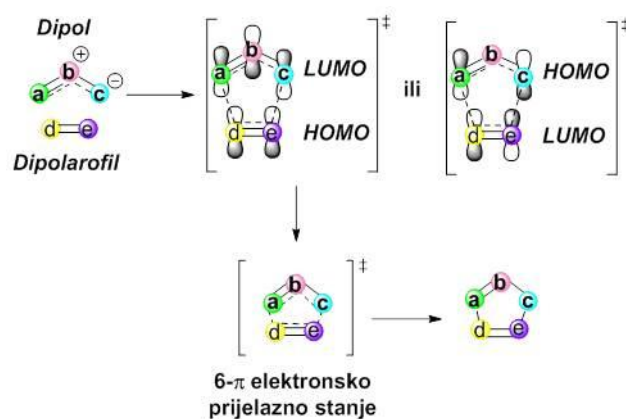
Koncept *click* kemije opisali su Sharpless i suradnici 2001. godine [67]. Oni su opisali niz „gotovo-savršenih“ reakcija stvaranja nove veze u sintezi velikog broja novih spojeva. Takve reakcije bi trebale biti jednostavne za izvođenje u blagim reakcijskim uvjetima stvarajući stereoselektivne produkte u visokim iskorištenjima iz lako dostupnih i netoksičnih reagensa i otapala ili bez uporabe otapala, uz lako pročišćavanje reakcijske smjese. Na temelju tih zahtjeva, neke su reakcije klasificirane kao *click* reakcije: adicija na dvostruku vezu (reakcije oksidacije, poput epoksidacije, dihidroksiliranja, aziridiranja te nitrozilna i sulfonilna haloadicija i Michaelova adicija), nukleofilno otvaranje prstena (aziridina, epoksida i sl.), nealdolne reakcije karbonilnog tipa (nastajanje oksima, hidrazona i aromatskih heterocikla) i cikloadicija (Diels-Alderova i 1,3-dipolarna cikloadicija) (slika 11) [68].



Slika 11. Reakcije koje zadovoljavaju kriterije *click* reakcija.

1,3-dipolarna cikloadicija je reakcija između 1,3-dipola s intramolekulskom oktetnom stabiliziranom strukturom i dipolarofila prilikom koje nastaje peteročlani prsten. Njemački je kemičar Rolf Huisgen prepoznao sintetske mogućnosti ove reakcije i razvio 1,3-dipolarnu cikloadiciju između organskog azida i alkina za dobivanje 1,2,3-triazola, zbog čega se ta reakcija često naziva i Huisgenova cikloadicija [69]. Sustavno unaprjeđivanje učinile su ovu reakciju važnom metodom u organskoj sintezi. Najznačajniji napredak postignut je 2002. godine kada su Sharpless i Meldal uvođenjem pojma *click* kemije popularizirali [3+2]cikloadiciju [67]. Danas se 1,3-dipolarna cikloadicija često upotrebljava u sintezi kompleksnih cikličkih kemijskih sustava za medicinska, biološka i mehanička ispitivanja [70].

1,3-dipol organska je molekula koja predstavlja bilo alilni tip ili propargil-alenilni tip zwitterionske oktetne ili sekstetne strukture tj. spoj koji u svojoj strukturi na položaju 1 sadrži atom s elektronskim sekstetom (nepopunjenu valentnu ljusku), zbog čega taj atom nosi formalni pozitivni naboj i na položaju 3 atom sa slobodnim elektronskim parom (npr. azid, diazoalkan ili nitrilni oksid) [71]. Kako bi se ostvarila oktetna stabilizacija u molekuli, atom na položaju 2 također mora posjedovati slobodan elektronski par, koji može donirati atomu s nedostatkom elektrona i na taj način rezonantno stabilizirati molekulu. Kako je razlika između HOMO-LUMO energijskih nivoa azida i alkina slična, moguće su dipol-HOMO i dipol-LUMO kontrolirane reakcije pa vrsta dipol-dipolarofilnog para određuje hoće li dominirati HOMO ili LUMO karakter 1,3-dipola [68]. 1,3-dipoli mogu se istodobno sagledavati kao nukleofili i elektrofil. Općenito, atom koji ima najveći orbitalni koeficijent u HOMO orbitali djeluje kao nukleofil, dok onaj u LUMO orbitali djeluje kao elektrofil. Alkeni i alkini najčešće su korišteni dipolarofili u 1,3-dipolarnim cikloadicijskim reakcijama. Poznato je kako dipolarofili koji sadrže heteroatom poput karbonila, nitrila i imina podliježu [3+2] cikloadiciji. Mehanistički gledano, 1,3-dipol reagira s dipolarofilom u dopuštenoj simetriji $\pi^4_s + \pi^2_s$ stvarajući šesteroelektronsko „Huckelovo aromatsko prijelazno stanje“ (HATS), koje vodi do stvaranja veze između dipola i dipolarofila (shema 1) [71]. Ukoliko je alkin nesimetrično supstituiran nastaje smjesa 1,4- i 1,5-regioizomera 1,2,3-triazola. 1,3-dipolarne cikloadicije obično rezultiraju zadržavanjem konfiguracije s obzirom na 1,3-diol i dipolarofil. Mehanizam reakcije ovisi o otapalu, stereokemijskim i termodinamičkim parametrima [71].



Shema 1. Dijagram interakcija orbitala pri 1,3-dipolarnoj cikloadiciji [71].

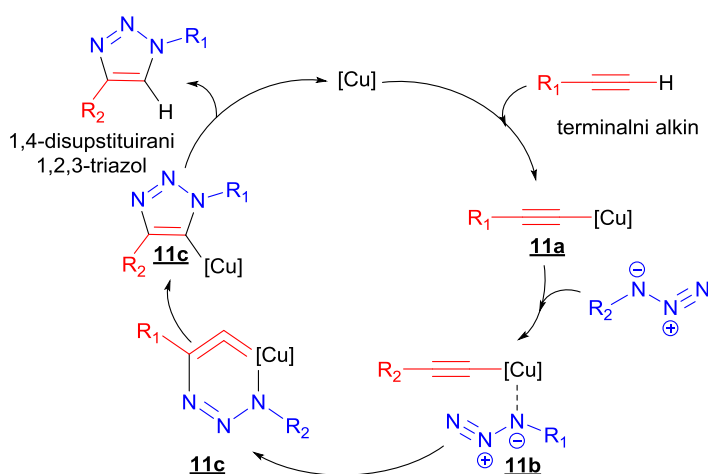
2.2.2. Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (CuAAC)

Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (CuAAC) koja je opisana u više od 2000 publikacija u jednom desetljeću, najznačajniji je primjer *click* kemije. Korištenjem Cu(I) katalizatora se brzina reakcije, u odnosu na termičku reakciju, povećava za 10^7 puta [62, 68]. Na reakciju CuAAC ne utječu značajno sterička i elektronska svojstva skupina vezanih na azidnom i alkinskom središtu, pa elektronima siromašni i elektronima bogati, alifatski, aromatski i heteroaromatski azidi obično dobro reagiraju s različito supstituiranim terminalnim alkinima. Reakcije se mogu odvijati u različitim protičnim i aprotičnim otapalima, uključujući vodu, bez potrebe za uporabom zaštitnih skupina. Predloženi su različiti mehanizmi koji uključuju Cu(I)-arilne mononuklearne ili binuklearne vrste bakra.

2.2.2.1. Mehanizam CuAAC

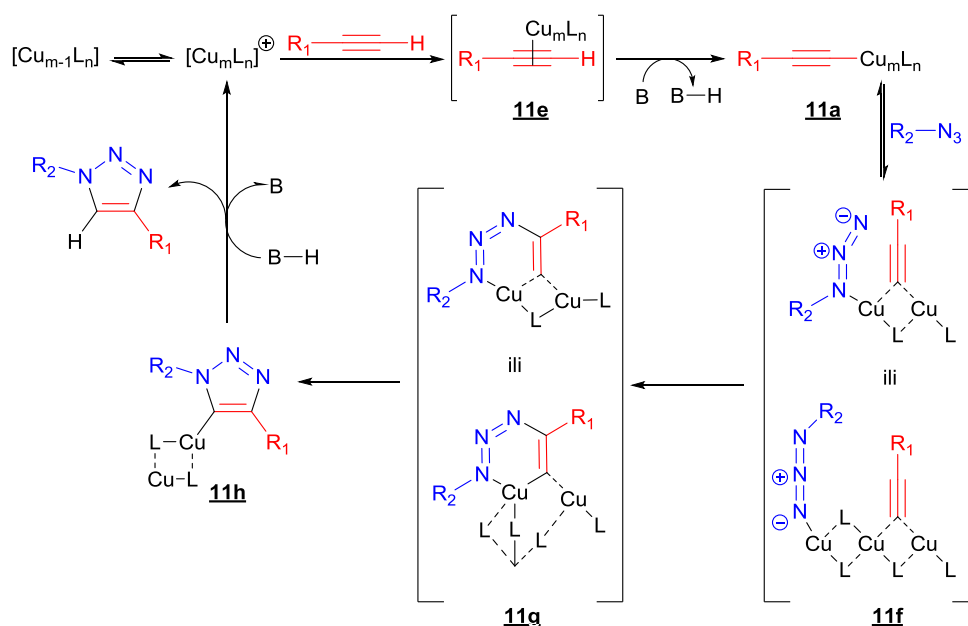
Rane mehanističke studije, uključivale su stvaranje bakrovog acetilida (**11a**), koji u reakciji s organskim azidom stvara šesteročlani prsten s metalom (**11c**), iz kojeg nastaje bakrov-triazolid (**11d**) čijim se protoniranjem regenerira Cu(I) i oslobađa 1,4-disupstituirani triazol (shema 2) [65]. Poznato je da se Cu(I) lako može umetnuti u terminalne alkine. Postoji nekoliko različitih načina kojima može nastati Cu(I)-acetilidni kompleks, ovisno o reakcijskim uvjetima koji se koriste: u vodenom otapalu. π kompleksiranjem Cu(I) smanjuje se pKa terminalnog alkina za čak 9,8 pH jedinica, što omogućuje deprotoniranje i stvaranje Cu-acetilida bez dodavanja baze. Upotrebom aprotičnog otapala, poput acetonitrila, diklormetana ili toluena, u prisutnosti stehiometrijske količine bakrove(I) soli (CuI, Cu(CH₃CN)₄PF₆, CuBr(PPh₃)₄ ili CuIP(OEt)₃), potrebno je dodati bazu, poput najčešće

korištenih amina (triethylamin, diethylamin) kako bi se induciralo deprotoniranje ključno za kompleksiranje [68].



Shema 2. Mehanizam reakcije CuAAC s mononuklearnim prijelaznim stanjem.

U kasnijim istraživanjima istaknuta je mogućnost uključivanja dva atoma Cu u prijelazno stanje katalitičkog ciklusa, a detaljne su kinetičke studije potvrdile mogućnost nastajanja σ,π -bimetalnog Cu(I)-intermedijara [72]. Učinak π -kompleksiranja σ -alkinil-Cu(I)-intermedijara pojačava reaktivnost alkinilnog liganda smanjujući gustoću elektrona na sp-hibridiziranom ugljikovom atomu, čime se olakšava azidni napad. Način koordinacije alkina na središte Cu značajno ovisi o prirodi liganda. Računskim istraživanjima bakrovih acetilidnih kompleksa utvrđeno je da su di- i tetra-nuklearni kompleksi reaktivniji u CuAAC reakciji u odnosu na mononuklearnu vrstu [72, 73]. Katalitički ciklus započinje stvaranjem bakar-alkin π -kompleksa (**11e**), koji se deprotonira i stvara bakrov acetilid (**11a**). U sljedećem koraku, azidni dušik zamjenjuje jedan od liganda drugog centra Cu u Cu(I)-acetilidnom kompleksu (**11f**), aktivira se azid za nukleofilni napad acetilenskog ugljika zbog blizine i elektronskih čimbenika, čime se olakšava napad drugog dušikovog atom na drugi ugljikov atom alkina, što dovodi do stvaranja metalocikla (**11g**). Metalocikl zatim tvori bakrov triazolid (**11h**), te se reduktivnom eliminacijom oslobađa 1,4-disupstituirani triazol i zatvara katalitički ciklus (shema 3) [68, 70]. Dinuklearni kompleksi pokazuju veću reaktivnost, te je poželjnija uporaba otapala koja potiču izmjenu liganda (npr. voda i alkoholi) u odnosu na nepolarna organska otapala koja potiču nakupljanje bakrovih vrsta.



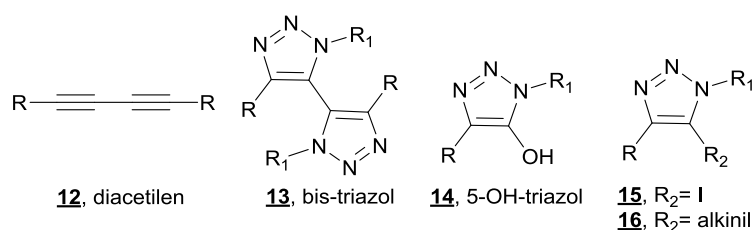
Shema 3. Mehanizam reakcije CuAAC s bi- i tetranuklearnim prijelaznim stanjem.

2.2.2.2. Katalizatori i ligandi u CuAAC

Različiti izvori aktivnog Cu(I) mogu se koristiti u reakcijama CuAAC. Najčešće se priređuju *in situ* redukcijom bakrovih(II) soli, poput bakrovog(II) sulfata ($CuSO_4 \times 5 H_2O$) ili bakrovog(II) acetata ($Cu(OAc)_2$), disproporcioniranjem Cu(II) soli i elementarnog bakra ili iz Cu(I) soli poput Cu(I) halogenida. Između tri najčešća oksidacijska stanja bakra (0, +1 i +2), +1 je termodinamički najmanje stabilan. Cu(I)-ioni mogu se oksidirati u katalitički neaktivne vrste Cu(II), ili se mogu disproporcionirati u smjesu Cu(II) i Cu(0) [62, 67, 68, 74].

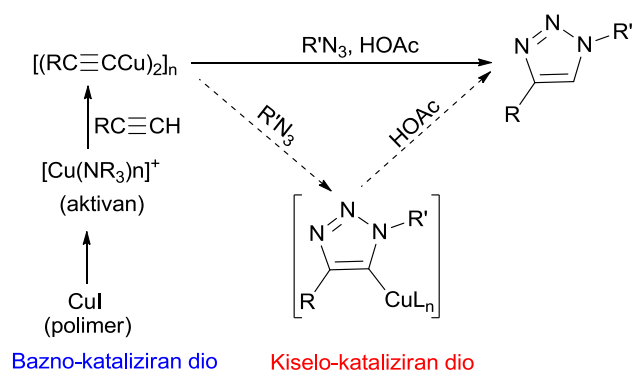
Cu(II) soli i kompleksi nisu dobri katalizatori za reakciju CuAAC, no dobro je poznato da su oni snažna oksidacijska sredstva velikog broja organskih spojeva poput alkohola, amina, aldehida, tiola, fenola i karboksilnih kiselina, pri čemu se reduciraju u katalitički aktivnu vrstu Cu(I). Kao redukcijsko sredstvo se uobičajeno koristi natrijev askorbat. Ovom metodom Cu(II) se reducira u Cu(I) održavajući visoku razinu katalitički aktivne vrste. Ta strategija ima mnoge prednosti: ekonomski je prihvatljiva, može se provoditi u vodi i ne zahtijeva inertnu atmosferu. Glavni nedostatak je redukcija Cu(II) u Cu(0), no to se može spriječiti korištenjem odgovarajućeg omjera redukcijskog sredstva i katalizatora ili dodavanjem sredstva za stabiliziranje bakra poput tris-3-(hidroksipropiltriazolilmetil)amina (THPTA). Voda je idealno otapalo za reaktivnost bakrovog(I) acetilida, osobito kada nastaje *in situ*.

Drugi način za dobivanje katalizatora *in situ* je dodavanje Cu(I) soli (bakrov(I) jodid, bromid, klorid i acetat) ili kompleksa poput $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ ili $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{OTf}$. Iako ova metoda ne zahtijeva redukcijsko sredstvo koristi se manje, a radi provođenja u inertnoj atmosferi u organskom otapalu manje je prihvatljiva od korištenja Cu(II) soli. Veliki nedostatak provođenja reakcije CuAAC u organskom otapalu s Cu(I) halogenidom kao katalizatorom je nastajanje različitih nusprodukata oksidativnim reakcijama (slika 12) [68, 75]. Cu(I) jodid može stvarati jodidne anione koji mogu djelovati kao premosni ligandi za metal, pri čemu nastaju polinuklearni acetilidni kompleksi, koji ometaju katalitički ciklus. Nadalje, pri određenim uvjetima CuI može rezultirati stvaranjem 1-jodalkina i 5-jodtriazola.



Slika 12. Nusprodukti u reakcijama CuAAC.

Cu(I) jodid se najčešće upotrebljava uz dodatak tercijarnog amina (Et_3N ili DIPEA), budući da se CuI pojavljuje kao stabilan polimer, a amini se uvode kako bi ga disocirali i stvorili aktivnu vrstu Cu(I) potrebnu za stvaranje bakrovog(I) acetilida. Bazični tercijarni amini pospješuju stvaranje bakrovog(I) acetilida i supstituciju bakrovog triazolida, dok je konverzija u protonirani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol jako spora, te nastaju nusprodukti (slika 12). Protoniranje bakrovog triazolida može se ubrzati dodavanjem octene kiseline (HOAc), no drugi izvori protona poput H_2O , *t*-BuOH, NH_3 ili vodene otopine NaOAc nisu pokazali takve rezultate. Shao i suradnici [75] predložili su kiselo-baznu CuAAC reakciju (shema 4). Amin, NR_3 , disocira polimernu strukturu CuI i ubrzava stvaranje bakrovog acetilida, te se u prisutnosti HOAc može brzo prevesti u željeni produkt [75]. Iako katalitički sustav CuSO_4/Na -askorbat ima niz prednosti, sustav CuI/NR_3 prihvatljiv je za provedbu reakcije u ne-vodenom ili aprotičnom mediju što je važno za supstrate koji ne toleriraju vodu ili protonska otapala. Vrlo učinkovit bakrov(I) acetat katalizira CuAAC reakciju *in situ* stvaranjem HOAc. Bakrove(I) soli se također mogu koristiti u kombinaciji s askorbatom, pri čemu se sve oksidirane bakrove(II) vrste provode ponovno u katalitički aktivno oksidacijsko stanje +1.



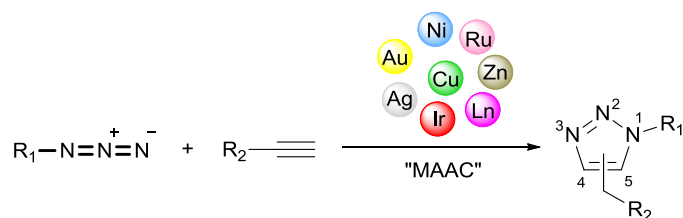
Shema 4. Predložen mehanizam reakcije CuAAC katalizirane sustavom CuI/NR₃/HOAc.

CuAAC reakcija također može biti katalizirana Cu(I)-vrstama dobivenim iz elementarnog bakra (žica ili strugotine) pri čemu se kao otapala koriste vodene otopine alkohola (metanol, etanol, *tert*-butanol), tetrahidrofuran i dimetilsulfoksid. Cu(II) sulfat se može dodati kako bi se ubrzala reakcija, no u većini slučajeva to nije potrebno jer su bakrovi oksidi i karbonati, patina na metalnoj površini, dovoljni za pokretanje katalitičkog ciklusa, te se izoliraju produkti s niskim bakrovim onečišćenjima. Drugi heterogeni katalizatori bakar(0) i bakar(I), kao što su nanočestice bakra ili bakrovog oksida i bakrove nanočestice adsorbirane na drveni ugljen također pokazuju dobru katalitičku aktivnost [68].

Iako korištenje liganada nije potrebno za provođenje CuAAC reakcije oni se često dodaju kako bi zaštitili Cu(I) od oksidacije. Dodavanje liganada može zaštititi Cu(I) središta i značajno poboljšati njihovu aktivnost, omogućujući im široku primjenu. Ligandi koji se koriste u reakcijama CuAAC moraju omogućiti dovoljno snažno vezanje za Cu(I) kako bi se spriječilo stvaranje nereaktivnih polimernih kompleksa, ali istodobno omogućiti azidu pristup koordinacijskoj sferi Cu središta u molekuli acetilida [68, 69, 76]. U reakcijama CuAAC uspješno se koriste dušikovi, fosforovi, ugljikovi, kisikovi i sumporovi ligandi [76]. Dušikovi ligandi su najčešće korišteni ligandi među kojima su najzastupljeniji tercijarni amini. Tris-triazolilni aminski ligandi, kao što su TBTA (tris[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amin) ili TTTA (tris[(1-*tert*-butil-1*H*-1,2,3-triazolil)metil]amin) i drugi tridentatni ligandi daju dovoljnu gustoću elektrona na metalu za iniciranje katalize bez destabiliziranja Cu(I) oksidacijskog stanja, te sprječavaju oštećenja bioloških molekula. Iz tog razloga često se primjenjuju u istraživanjima biokonjugata.

2.2.3. Ostale azid-alkin cikloadicije katalizirane metalima (MAAC)

Iako je najznačajnija azid-alkin cikloadicijska reakcija katalizirana metalom reakcija CuAAC, *click* reakcije su uspješno provedene i s drugim katalizatorima, poput Ru, Ag, Au, Ir, Ni, Zn, Ln (shema 5) [74].



Shema 5. MAAC reakcija [74].

Uz bakar, najčešće korišteni katalizatori MAAC reakcija (eng. *metal catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) su na bazi rutenija. Među svim Ru-katalizatorima, najistraženiji su pentametilkiklopentadienilni (Cp) rutenijevi kompleksi, [Cp*RuCl]. Ovi kompleksi kataliziraju regioselektivnu RuAAC reakciju terminalnih alkina koji, za razliku od CuAAC katalizatora, daje 1,5-disupstituirane 1,2,3-triazole. Tako su upotrebom različitih Ru katalizatora koji ne sadrže Cp ligande, poput [RuH₂(CO)(PPh₃)₃] i [RuH(η²-BH₄)(CO)(PCy₃)₂] sintetizirani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli. Nadalje, uspješno su provedene i reakcije AAC katalizirane s Ag(I). Srebrov acetilid aktivira stvaranje acetilidnog azida i potom ciklizaciju. Ag(I) sol nije dovoljna za pokretanje reakcije, no u prisutnosti liganda poput P,O-liganda 2-difenilfosfin-*N,N*-diizopropilkarboksamida uspješno su pripremljeni 1,2,3-triazoli. Upotrebom Raney nikla bez dodatnih redukcijskih sredstava, heterogenog cinkovog katalizatora Zn/C kao i nanočestica zlata Au/TiO₂ priređeni su 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli, dok su reakcijom NiAAC, ovisno o stereoelektronskim svojstvima azida i alkina, priređeni 1,4- ili 1,5-disupstituirani triazoli [74].

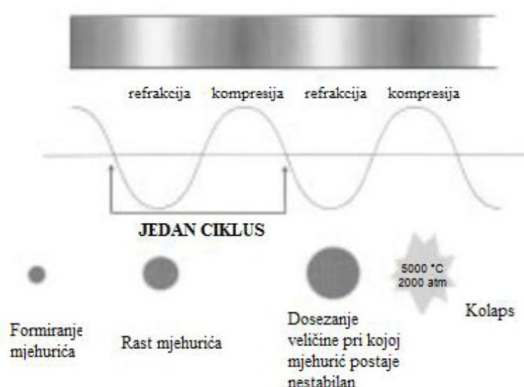
2.2.4. Upotreba alternativnih izvora energije u *click* reakcijama

Organske reakcije i procesi nastaju dovođenjem energije, uglavnom toplinske, stoga su uloženi veliki naponi u pronalaženje alternativnih izvora energije za poboljšanje kemijskih transformacija u blagim reakcijskim uvjetima. Najznačajniji alternativni izvori energije su mikrovalno i ultrazvučno zračenje, reakcije inducirane svjetlošću i mehanokemijske reakcije [77]. Primjenom ovih alternativnih metoda uspješno su provedene brojne kemijske reakcije

čime su poboljšane mnoge postojeće sintetske metode u usporedbi s provedenim reakcijama klasičnim načinom.

Neionizirajuće mikrovalno zračenje oblik je energije koji se manifestira kao toplina kroz interakciju s medijem ili materijalima u kojima se energija može reflektirati, apsorbirati ili prenositi. Kemijske reakcije se ubrzavaju selektivnom apsorpcijom MW zračenja u polarnim molekulama. Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem zauzele su značajno mjesto u organskoj sintezi jer ne samo da smanjuju vrijeme reakcije i povećavaju učinkovitost, već omogućuju zamjenu organskih otapala s vodom ili omogućavaju provođenje reakcija bez prisutnosti otapala uz maksimalnu učinkovitost. Stoga ne iznenađuje velik broj *click* reakcija koje su provedene upravo koristeći ovaj izvor energije [77–79].

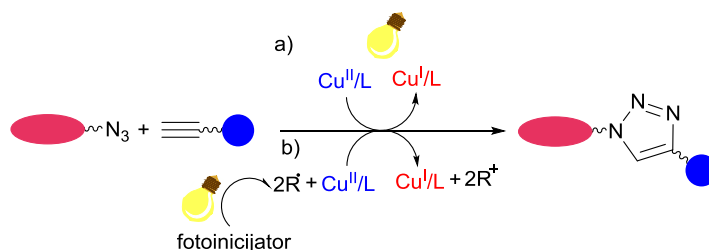
Ultrazvuk je dio zvučnog spektra frekvencije između 20 kHz i 100 MHz i može se podijeliti u 3 područja: ultrazvuk niske frekvencije i visoke jakosti (20 - 100 kHz), ultrazvuk visoke frekvencije i srednje jakosti (100 kHz - 1 MHz) te ultrazvuk visoke frekvencije i niske jakosti (1–10 MHz) [77, 80]. U rasponu ultrazvuka visoke i srednje jakosti moguće je izazvati kavitaciju pa se za sonokemiju koriste frekvencije od 20 kHz do 1 MHz. Mehanizam djelovanja ultrazvuka može se objasniti pojavom kavitacijskih mjehurića. Preduvjet za širenje ultrazvučnih valova je elastičnost provodnog medija, dok čestice medija osciliraju i prenose energiju u smjeru širenja vala. U tekućinama djelovanjem ultrazvukadolazi do stvaranja polja naizmjeničnog visokog i niskog tlaka. U polju niskog tlaka dolazi do rasta kavitacijskog mjehurića koji nakon nekog vremena više ne može rasti i kolapsira. Tim kolapsom se oslobađa energija i temperature se na tom mjestu podižu do nekoliko tisuća stupnjeva, a tlakovi i do tisuću atmosfera (slika 13).



Slika 13. Princip akustične kavitacije.

Akustična kavitacija pronašla je primjenu u provođenju kemijskih reakcija. Ultrazvučne reakcije mogu se podijeliti na homogene i heterogene reakcije te heterogene reakcije miješanog mehanizma. Homogene ultrazvučne reakcije odvijaju se nastajanjem radikala ili radikal-iona, kao intermedijara, preko kavitacijskog mehanizma, dok se heterogene odvijaju preko ionskih intermedijara i kod njih su izraženiji mehanički efekti poput čišćenja površine, smanjenja veličine čestica i poboljšanja prijenosa mase. Primjena ultrazvuka u organskoj sintezi sve se više primjenjuje posljednjih godina, a *click* reakcija je uspješno provedena u homogenim i heterogenim sustavima [77, 80, 81].

Korištenje zračenja UV/Vis za pokretanje kemijskih reakcija poznato je već dugi niz godina. U reakcijama CuAAC, Cu(I) se može prirediti i fotoredukcijom. Svjetlo se upotrebljava za aktiviranje *click* reakcije. Mehanizmi fotoinduciranih reakcija CuAAC uključuju izravni i neizravni redukcijski put od Cu(II) do Cu(I). Mnogi Cu(II)-kompleksi poput kompleksa CuCl₂/PMDETA osjetljivi su na UV zračenje i svjetlost. Ligand apsorbira UV svjetlost i uzrokuje unutarmolekularni prijenos elektrona iz π sustava liganda na središnji bakrov ion prilikom čega se Cu(II) reducira u Cu(I) i ligand se prevodi u radikal (slika 14) [82, 83].

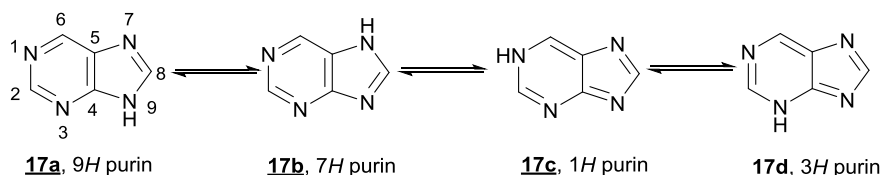


Slika 14. Prikaz fotoinducirane CuAAC reakcije [83].

Pojam mehanokemijske reakcije odnosi se na reakcije koje su potpomognute mehaničkom energijom. Različite promjene se mogu odvijati mehaničkim mljevenjem krutih tvari, što dovodi do pojave složenih transformacija. Reakcije CuAAC provedene bez otapala pokazale su znatno skraćivanje vremena reakcije, smanjenje potrebne energije i veća iskorištenja. U tim reakcijama uspješno su primijenjeni standardni katalitički sustavi poput bakrovih(II) soli, ali i heterogenih bakrovih(0) katalizatora, poput posuda za mljevenje bakra ili bakrov prah [77, 84].

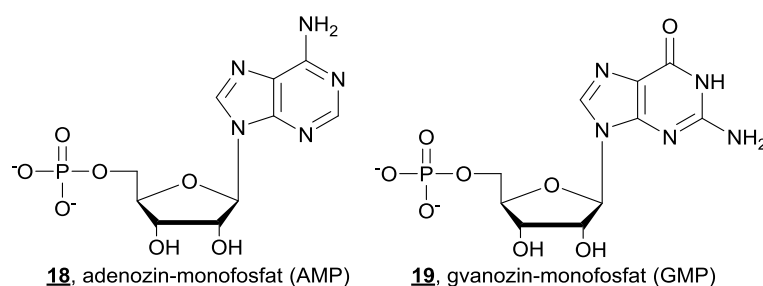
2.3. Purini

Purin ili imidazo[4,5-*d*]pirimidin je heterociklički aromatski organski spoj građen od kondenzirane pirimidinske i imidazolne jezgre. Postoji u četiri tautomerna oblika: 1*H*, 3*H*, 7*H* i 9*H* (slika 15). U otopini su najstabilniji 7*H* i 9*H* tautomerni oblici, dok je 7*H* oblik dominantan u krutom stanju [85].



Slika 15. Tautomerni oblici purinske jezgre.

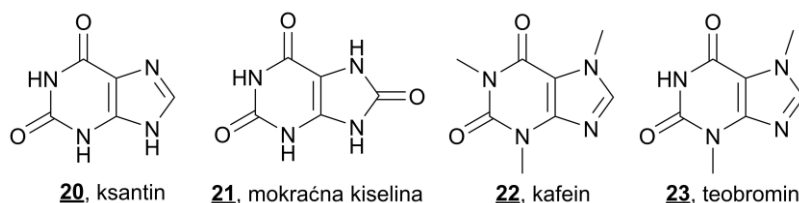
Purinska jezgra jedna je od najbrojnijih dušikovih heterocikličkih baza u prirodi, te ima važnu ulogu u velikom broju metaboličkih i staničnih procesa. Nesupstituirani purin nije prisutan u prirodi, međutim njegovi derivati su sastavni dijelovi važnih biomolekula. Purinske baze, adenin i gvanin, prisutne su u nukleotidima adenzin-monofosfatu, AMP (**18**) i gvanozin-monofosfatu, GMP (**19**), osnovnim građevnim jedinicama nukleinskih kiselina DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) i RNA (eng. *ribonucleic acid*) (slika 16). Adenin se sparuje s timinom u molekuli DNA i s uracilom u molekuli RNA tvoreći dvije vodikove veze, a gvanin s citozinom preko tri vodikove veze.



Slika 16. Strukture purinskih nukleotida AMP i GMP

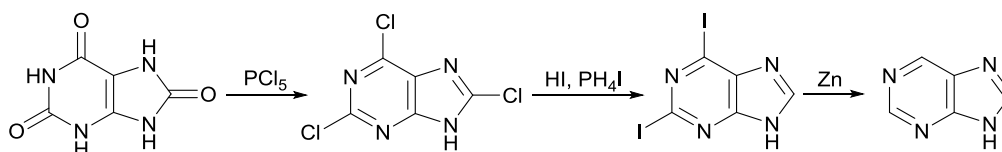
Adenin je također prisutan u adenzin-5'-trifosfatu (ATP), glavnom izvoru energije. Sastavni je dio nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD) i flavin-adenin-dinukleotida (FAD), koenzima ključnih za odvijanje oksido-redukcijskih reakcija u stanicama, te acetil-koenzima A (AcCoA). Nadalje, ciklički purinski nukleotidi (cAMP i cGMP) djeluju kao važni

sekundarni glasnici ili kao neurotransmitori vezujući se za adenozijske receptore [86]. Drugi prirodni analozi purina su mokraćna kiselina, ksantin i hipoksantin, te derivati ksantina, kafein, teobromin i teofilin, koji su prisutni u kavi, čajevcu i kakaovcu i djeluju stimulirajuće na središnji živčani sustav (slika 17).



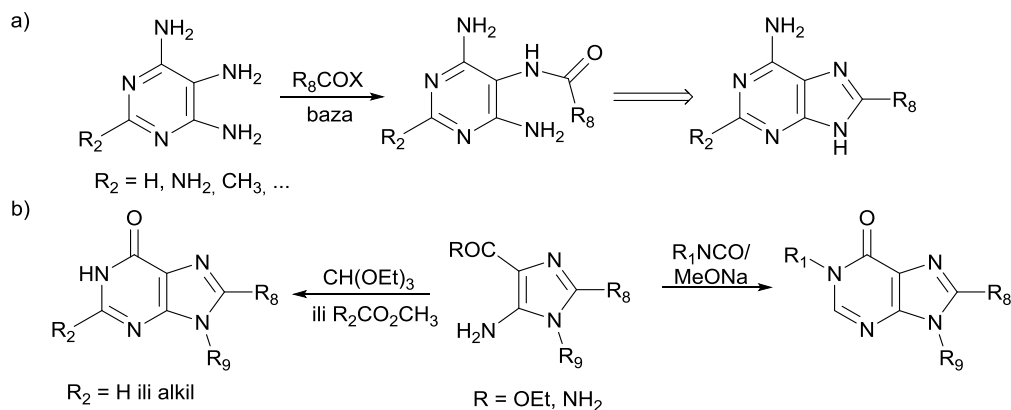
Slika 17. Strukture nekih prirodnih derivata purina.

Njemački nobelovac, Emil Fischer, prvi je sintetizirao purin 1898. godine iz mokraćne kiseline izolirane iz bubrežnih kamenaca, prema čemu su i dobili naziv purin (eng. *pure urine*) (shema 6) [86].



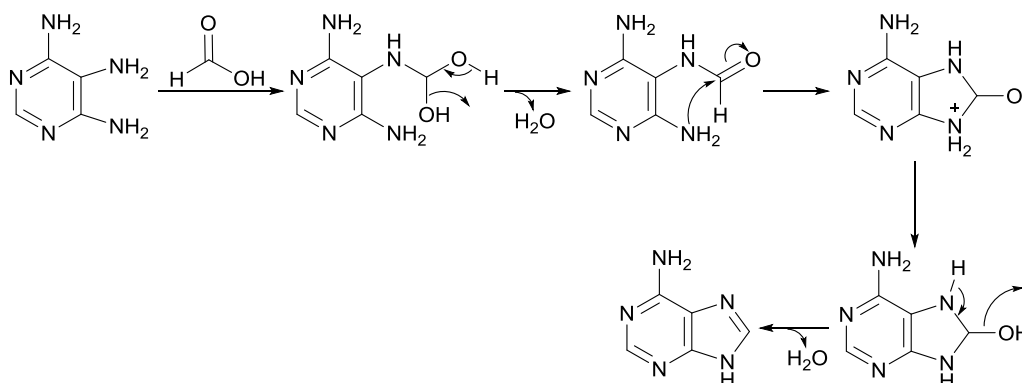
Shema 6. Sinteza purina iz mokraćne kiseline.

Purini se mogu lako prirediti dobro poznatim reakcijama iz odgovarajućih imidazolnih i pirimidinskih prekursora, poput reakcije *N*-aciliranja diaminopiridina (shema 7a) i reakcije derivata 5-aminoimidazol-4-karboksilne kiseline s izocijanatima ili odgovarajućih amidima s ortoesterima (shema 7b) [86].



Shema 7. Sinteza purina iz (a) pirimidinskih i (b) imidazolnih prekursora.

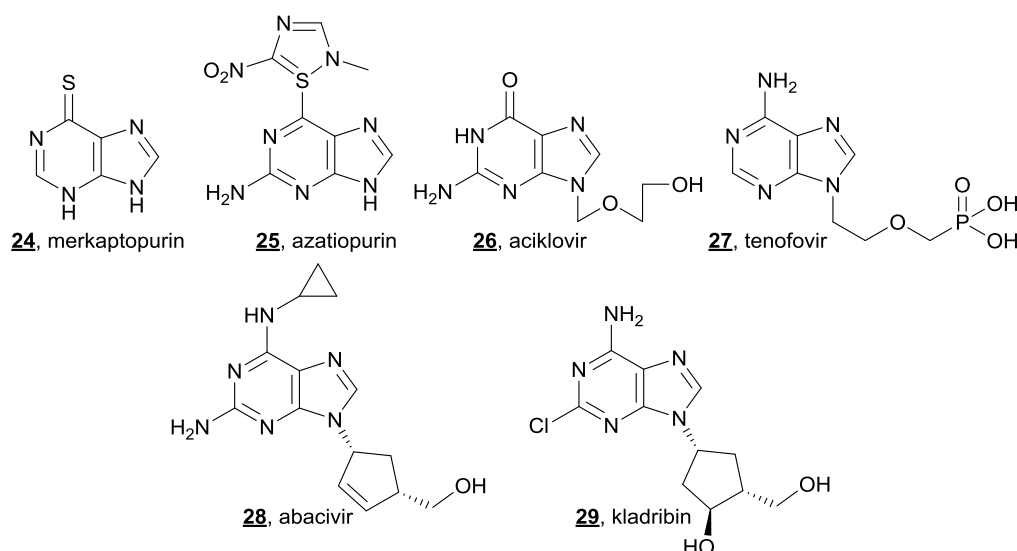
Kondenzacija 5,6-diaminopiridina s mravljom kiselinom još je poznata i kao Traubeova sinteza purina u kojoj se [4+1] cikloadicijom zatvara imidazolni prsten (shema 8) [87].



Shema 8. Mehanizam Traubeove sinteze adenina.

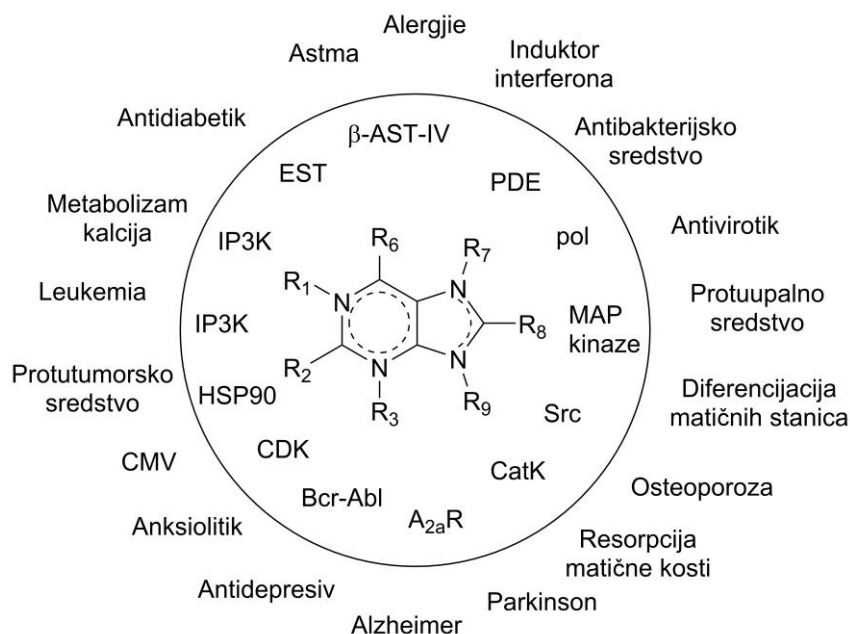
2.3.1. Biološki važni purinski derivati

Purinska baza smatra se povlaštenom strukturom [21] u medicinskoj kemiji i strukturna je jedinica nekih lijekova odobrenih za liječenje akutne leukemije (merkaptopurin, nelarabin), antivirusnih lijekova (aciklovir, penciklovir, ganciklovir, abakavir), imunosupresiva (azatiopurin), antitromboznih lijekova (kengreal) i antitumorskih agenasa (fludrabin, kladribin, klofarabin, tenofovir) (slika 18) [86, 88].



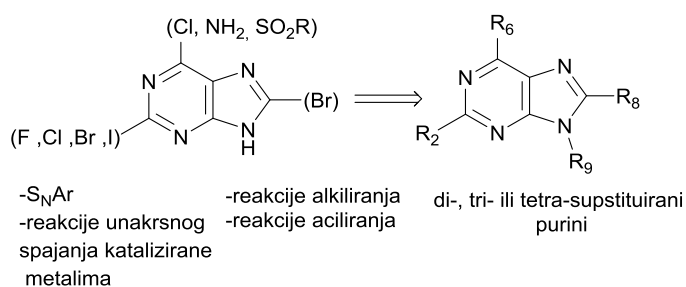
Slika 18. Primjeri lijekova s purinskom jezgrom.

Polovica svih proteina kodiranih ljudskim genomom, koji su prepoznati kao potencijalne mete u razvoju lijekova, ovise o purinskim nukleotidima (ATP, GTP, cAMP, FAD i NAD) kao kofaktorima ili supstratima u njihovoj funkcionalizaciji. Stoga, purinski derivati posjeduju veliki potencijal u interferiranju s važnim staničnim funkcijama kao i širok spektar biološke aktivnosti [86]. Analizi purinske nukleobaze pokazali su značajno antitumorsko [89–93], antivirusno [94, 95] i antibakterijsko [96] djelovanje, te aktivnost protiv neurodegenerativnih oboljenja poput Alzheimerove bolesti i depresije [97]. Nadalje inhibitori su mikrotubulina [92, 93], proteina toplinskog šoka (HSP90) [98], fosfodiesteraza (PDE) [99], sulfon-transferaza (ST) [86] i velikog broja proteinskih kinaza [86, 100], poput CDK, MAPK, PDGFR, PI3K i dr. (slika 19).



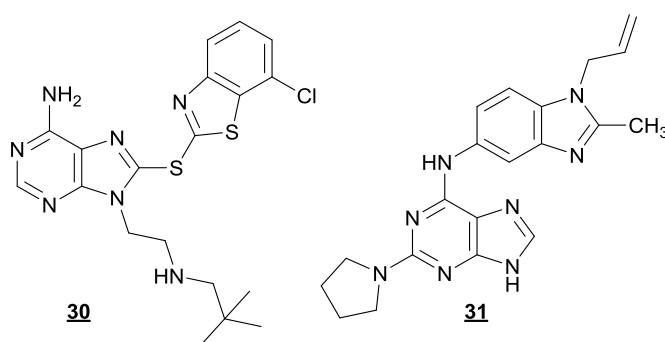
Slika 19. Potencijalna biološka primjena purinskih derivata. Unutar kruga su označene mete djelovanja, a izvan kruga potencijalna primjena [86].

Uvođenje supstituenata u položaje 2, 6 i/ili 9 pokazalo se ključnim za učinkovito i selektivno vezanje na kinaze, a time i djelovanje protiv tumorskih stanica [86, 100]. Višefunkcionalni (di-, tri- i tetra-supstituirani) purini mogu se prirediti iz različito aktiviranih purinskih intermedijara reakcijama nukleofilne supstitucije, reakcijama kataliziranim s prijelaznim metalima, *N*-alkiliranjem/aciliranjem, te Vorbrüggenovom reakcijom [86] (slika 20).



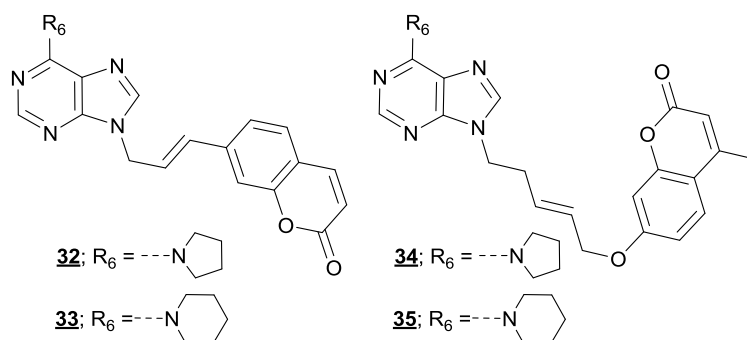
Slika 20. Priprava višefunkcionalnih purina.

Hibridi purina s drugim bicikličkim heterociklima poput benzotiazola [101] i benzimidazola [102] pokazali su snažnu antitumorsku aktivnost. Primjerice adeninski derivat **30** koji je pokazao snažno djelovanje protiv stanica karcinoma dojke (MCF-7) inhibirajući protein HER-2 (IC₅₀ = 35 nM), te 2-pirolidinski derivata **31**, koji je pokazao snažno djelovanje na gotovo svih 60 odabranih staničnih linija karcinoma pri koncentraciji 10⁻⁵ M i visoku osjetljivost na stanice karcinoma debelog crijeva (GI₅₀ = 3,16 μM), središnjeg živčanog sustava (GI₅₀ = 2,00 μM) i jajnika (GI₅₀ = 1,36 μM) (slika 21). Hibrid **31** pokazao je i značajnu aktivnost kao selektivni inhibitor Aurora-A-kinaze s IC₅₀ vrijednosti od 0,01 μM. Studije molekularnog uklapanja potvrdile su interakcije ove klase spojeva u aktivnom mjestu Aurora-A-kinaze, te selektivnost u odnosu na enzime Aurora B/C.



Slika 21. Hibridi purina s benotiazolom i benzimidazolom.

Nadalje, 6-pirol- i 6-piperidin-purinski hibridi s kumarinima povezanim preko alifatskih lanaca pokazali su djelovanje na monoamino-oksidade (MAO) i acetilkolin-esterazu (AChE) [103]. Spoj **34** pokazao je djelovanje kao selektivni inhibitor MAO-A i snažno antioksidativno djelovanje, dok je spoj **33** pokazao umjereno antioksidativno djelovanje i potpuno selektivno djelovanje na enzime MAO-A i AChE (slika 22).

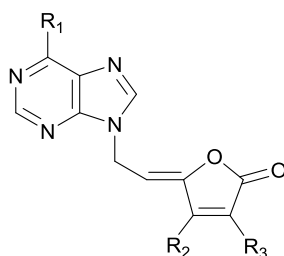


Slika 22. Hibridi purina i kumarina.

2.3.1.1. Biološki važni 6-klorpurinski derivati

Klorpurinske baze imaju važnu ulogu u sintezi purinskih derivata jer omogućuju jednostavno uvođenje raznih funkcionalnih skupina [104]. Klor u položaju C6 je najviše podložan supstituciji, te potom klor u položaju C8 i C2. Nadalje, derivati 6-klorpurina pokazali su također i biološku aktivnost, poput antitumorskog [105–107], antivirusnog [108], antibakterijskog [109] i antituberkulostatskog [110].

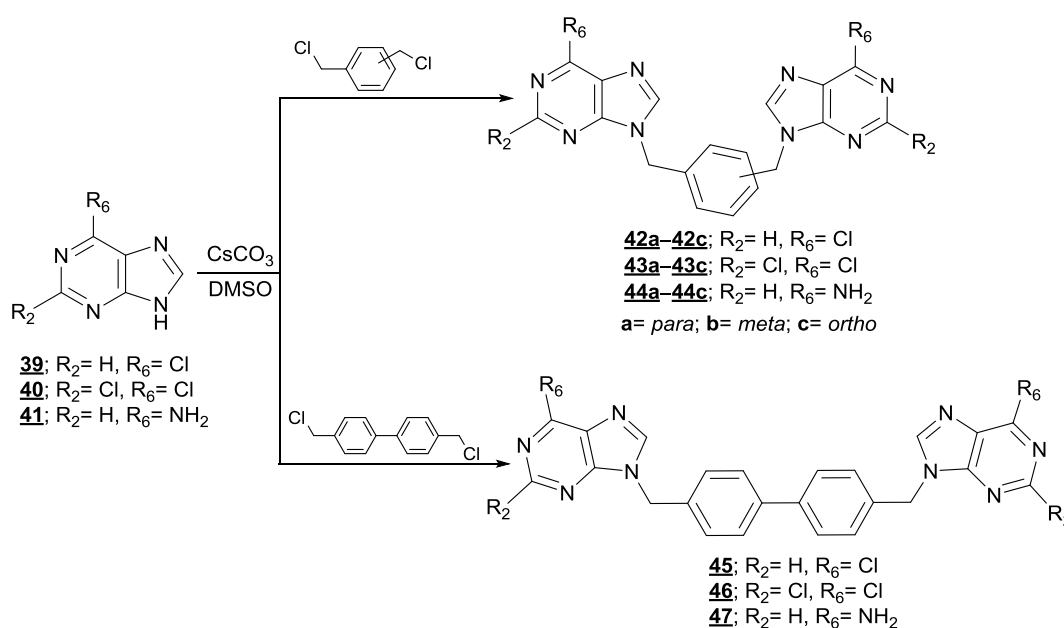
Nukleozidini analozi 6-kloropurina s L-askorbinskom kiselinom (**36** i **37**) kao šećernim mimetikom pokazali su aktivnost na stanice karcinoma vrata maternice (**36**; HeLa, IC₅₀ = 6,8 μM), gušterače (**36**; MiaPaCa-2, IC₅₀ = 6,5 μM) [111] i leukemije (**37**; L1210, IC₅₀ = 4,5 μM, te leukemije limfoblasta (**37**; CEM, IC₅₀ = 4,0 μM) [112]. Uz antitumorsku aktivnost, pokazali su i antivirusno djelovanje protiv herpes simpleks virusa tipa 1 i tipa 2 (HSV-1, HSV-2) i varicela zoster virusa (VZV), pri čemu adeninski analog (**38**) pokazuje znatno slabije antitumorsko i antivirusno djelovanje u odnosu na odgovarajući klorirani analog (**37**) (slika 23).



36: R₁ = Cl, R₂ = OBn, R₃ = OBn
37: R₁ = Cl, R₂ = OMe, R₃ = OMe
38: R₁ = NH₂, R₂ = OMe, R₃ = OMe

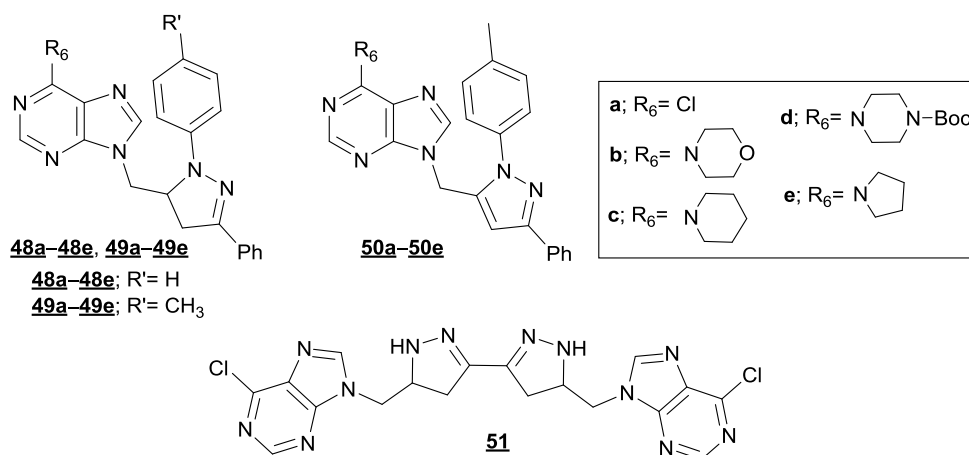
Slika 23. Nukleozidni analozi purinskih izostera i L-askorbinske kiseline.

Kode i suradnici [113] priredili su simetrične bis-purinske dimere 6-klorpurina (**42a–42c**, **45**), 2,6-diklorpurina (**43a–43c**, **46**) i adenina (**44a–44c,47**) povezanih preko fenilnih i bisfenilnih prenosnica u *para*, *meta* i *ortho* položaju (shema 9). Bis-2,6-diklorpurinski analozi povezani fenilnom prenosnicom (**43a–43c**) pokazali su naj snažniju antitumorsku aktivnost na preko 60 različitih staničnih linija karcinoma pluća, debelog crijeva, središnjeg živčanog sustava, jajnika, dojke, bubrega, prostate, melanoma i leukemije (**43a**; $IC_{50} = < 0,01-19 \mu M$, **43b**; $IC_{50} = 1,7-12 \mu M$, **43c**; $IC_{50} = 0,01-21 \mu M$).



Shema 9. Sinteza simetričnih bispurinskih analoga s antitumorskim djelovanjem.

Nadalje, Thalassitis i suradnici [114] priredili su seriju mono- (**48a–50a**) i bis-6-klorpurina (**51**) povezanih s pirazolinom i pirazolom, i njihove analoge u kojima je klor u položaju C6 zamijenjen s odgovarajućim cikličkim aminima (**48b–48e**, **49b–49e**, **50b–50e**) (slika 24). Priređenim spojevima ispitano je antiproliferativno i antioksidativno djelovanje, te inhibicija trombina. Klorirani derivati pokazali su snažnije antitumorsko djelovanje u odnosu na odgovarajućeaminske derivate, a bis-6-klorpurinski derivat (**51**) naj snažniju inhibiciju lipooksigenaze (92 %).

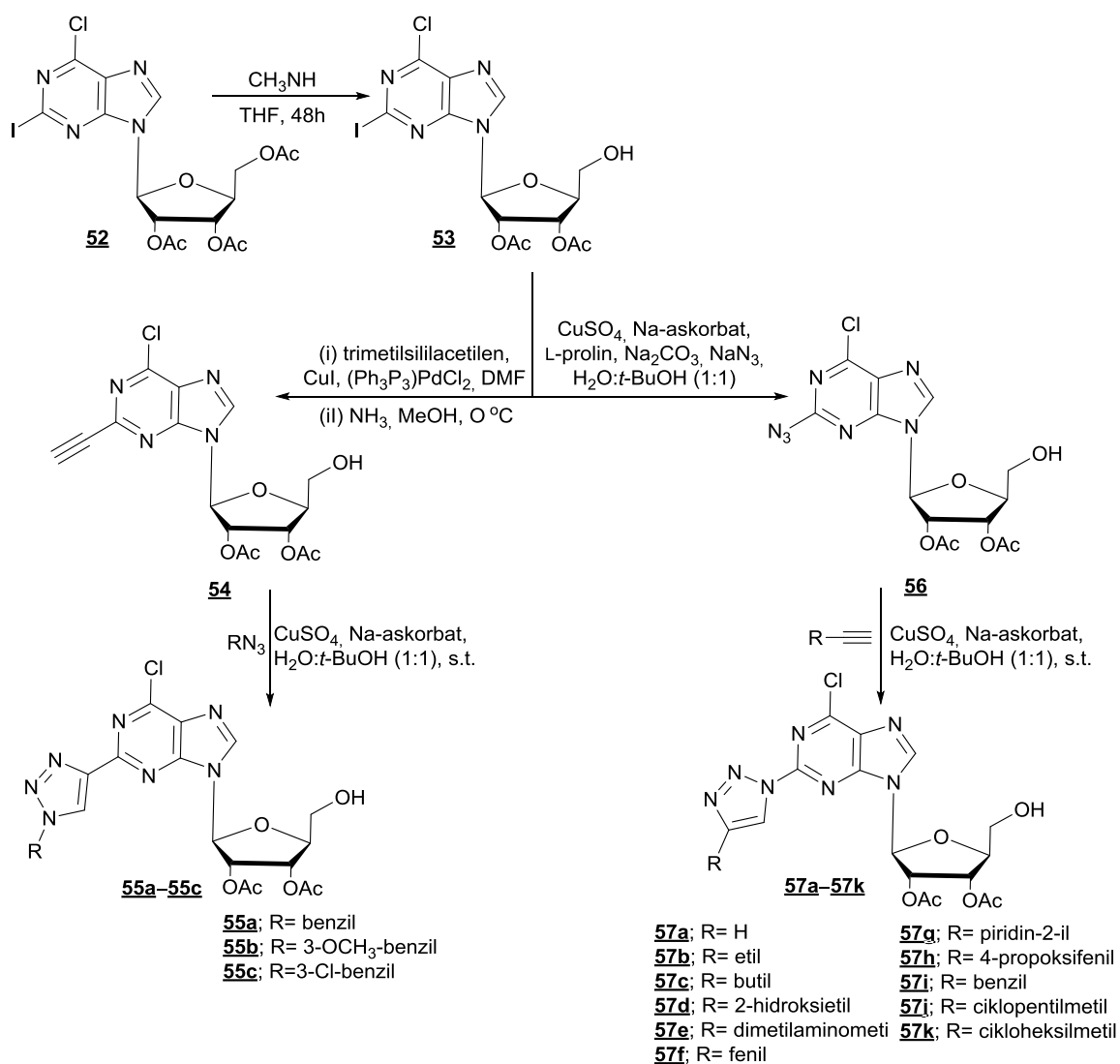


Slika 24. Mono- i bis-6-klorpurinski derivati s pirazolom i pirazolinom.

2.3.1.2. Sinteza hibrida purina i 1,2,3-triazola

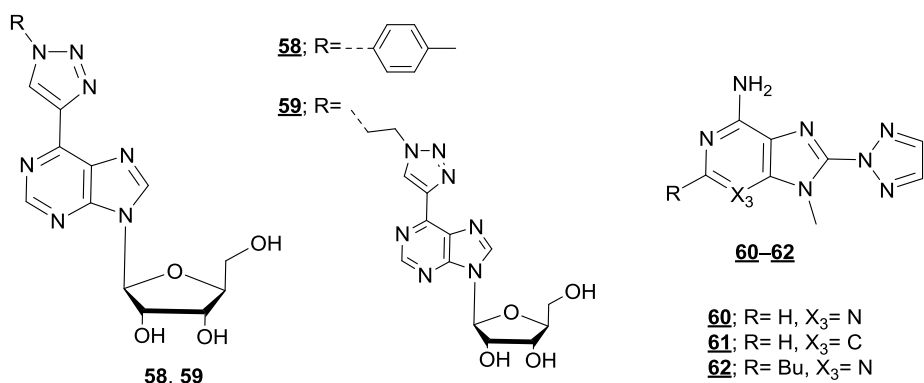
Kako 1,2,3-triazol pokazuje svojstva idealne prenosnice, ali i značajna farmakološka svojstva, te se može prirediti brzom i jednostavnom *click* reakcijom u visokom iskorištenju (poglavlje 2.2.) [62–66], taj je heterocikl pronašao široku primjenu u racionalnom razvoju novih biološki aktivnih molekula [115] primjenom molekularne hibridizacije [12–15], koncepta koji se temelji na povezivanju dvaju ili više biološki aktivnih heterocikličkih sustava u novu strukturu s poboljšanim djelovanjem u odnosu na početne molekule (slika 1, poglavlje 1). U literaturi se mogu pronaći hibridi purina i 1,2,3-triazola u položajima C-2, C-6, C-8 i N-1 purinske jezgre, koji su pokazali širok spektar biološkog djelovanja.

Uvođenjem triazolnog prstena u položaje C-2 i C-6 purinskih nukleozidnih analoga priređeni su selektivni inhibitori adenzinskih receptora. Cosyn i suradnici [116] pripravili su 2-triazolil-supstituirane analoge adenina, koji su pokazali selektivnu aktivnost na A₃ adenzinski receptor u niskom nanomolarnom području (shema 10). 2-triazolil-purinski hibridi vezani za C-4 položaj triazolnog prstena (**55a–55c**) sintetizirani su iz 2-alkinilnog prekursora **54** priređenog Sonogashirinom reakcijom iz spoja **53**. Nukleofilnom supstitucijom kataliziranom Cu(I) pripremljen je 2-azidopurinski prekursor **56** koji je potom preveden u 2-triazolil-purinske hibride vezane za N-1 položaj triazolnog prstena (**57a–57k**).



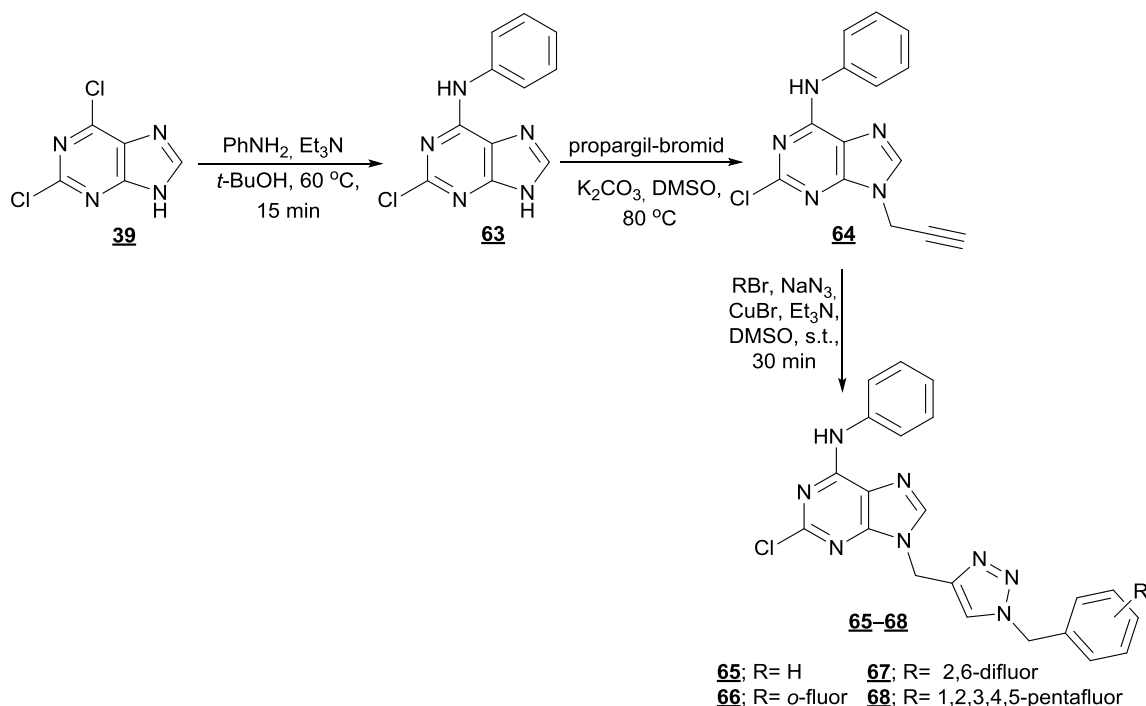
Shema 10. Sinteza 2-(triazol-1-il)-adnezinskih derivata.

Nadalje, 6-triazolil-supstituirani nukleozidni derivati purina, priredeni kao i 2-triazolilni derivati iz 6-alkinilnog prekursora, pokazali su djelovanje kao agonisti A₁ adenzinskog receptora (A₁AR), poput mono-triazolilnog derivata **58** (IC₅₀ = 0,29 μM), dok bis-purinski analog **59** djeluje kao antagonist A₁AR (IC₅₀ = 11 μM), odnosno povećava sintezu cAMP (slika 25) [117]. 8-triazolil-adeninski hibrid **60** selektivno inhibira A₁ adenzinski receptor, a njegov 3-deazapurinski analog **61** pokazuje djelovanje kao inhibitor A_{2A} adenzinskog receptora. Uvođenjem butilnog lanca u položaj 2 purinskog prstena (**62**) dodatno se povećava učinkovitost vezanja za A_{2A} i A₁ adenzinske receptore (**62**; A_{2A}, K_i= 10,7 nM; A₁, K_i= 103 nM). Spoj **62** pronašao je primjenu u liječenju Parkinsonove bolesti [118,119].



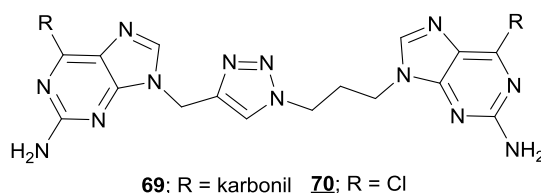
Slika 25. 6- i 8-triazolil-supstituirani purinski hibridi koji djeluju na adenzinske receptore.

Uz djelovanje na adenzinske receptore hibridi purina s 1,2,3-triazolnim prstenom pokazali su djelovanje i kao inhibitori proteinskih kinaza. Nair i suradnici [120] priredili su *N*-9-triazolil-purinske hibride, koji su pokazali djelovanje kao inhibitori CDK5 kinaze ovisne o ciklinu (shema 11). *N*-alkiliranjem purina s propargilnim bromidom dobiven je *N*-propargilni derivat **64**, koji zatim podliježe *in situ* Cu(I)-kataliziranoj dipolarnoj cikloadiciji s odgovarajućim fluorfenilnim bromidom (shema 11). *O*-fluorbenzilni derivat **66** inhibira CDK5/p25 kinazu gotovo jednako kao referentni inhibitor roskovitin **5** (slika 8), te je *in silico* molekulsko uklapanje pokazalo kako se oba spoja vežu u vezno mjesto ATP-a sa sličnim energijama vezanja.



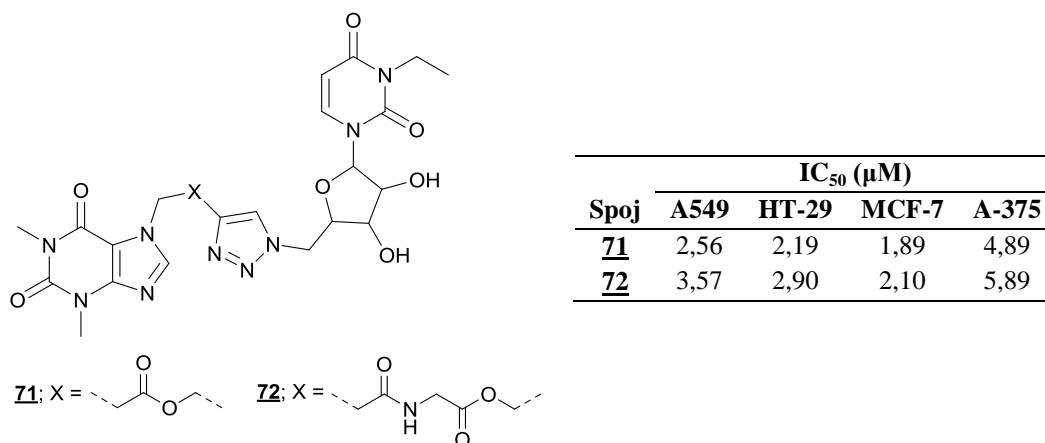
Shema 11. Sintaza 6-fenilamino-9-triazolil-purinskih derivata.

Ferincola i suradnici [121] pripravili su bis-purinske hibride vezane preko triazolne premosnice kao inhibitore cikličkog digvanozin-monofosfata (c-di-GMP), koji ima funkciju sekundarnog glasnika, te ima ključnu ulogu u stvaranju biofilma kod bakterija, citotoksičnosti i progresiji staničnog ciklusa. C-di-GMP reguliran je diguanilat-ciklazom i fosfodiesterazom. Kao najučinkovitiji inhibitori cikličkog di-GMP-a pokazali su se gvanozinski dimer **69** i 2-amino-6-klorpurinski dimer **70** (slika 26).



Slika 26. Bis-purinski hibridi vezani preko 1,2,3-triazolne premosnice.

Skupina indijskih autora [122] priredila je teofilin-nukleozidne analoge povezane 1,2,3-triazolnom premosnicom u *click* reakciji nukleozidnih azida i odgovarajućih teofilnih terminalnih alkina, te je ispitano njihovo antiproliferativno i antibakterijsko djelovanje. Spojevi **71** i **72** pokazali su najsnažnije antiproliferativno djelovanje inhibirajući rast stanica karcinoma pluća (A549), karcinoma debelog crijeva (HT-29), karcinoma dojke (MCF-7) i melanoma (A375) (slika 27).

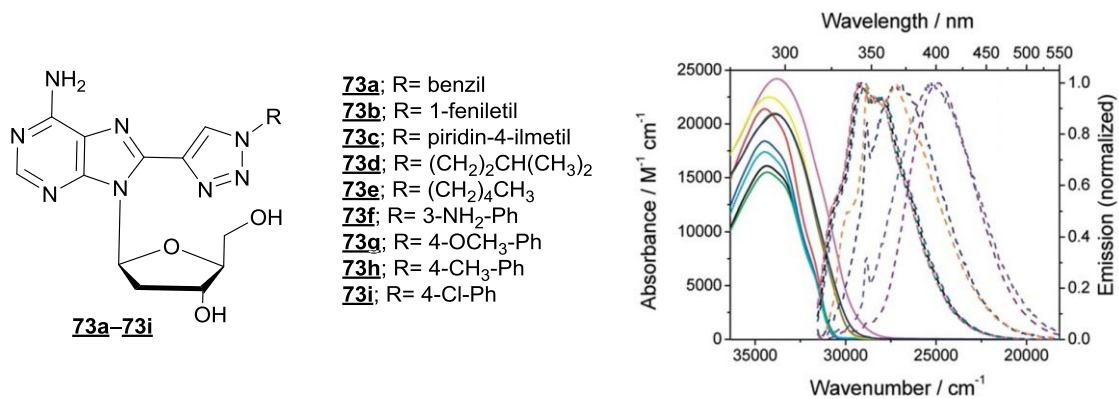


Slika 27. Teofilin-nukleozidni analozi povezani 1,2,3-triazolnom premosnicom s antiproliferativnom aktivnosti.

8-triazolil-purinski nukleozidni derivati **73a–73i** su također pokazali izvrsna fotofizikalna svojstva, što ih čini obećavajućim fluorescentnim probama (slika 28) [123]. *Click* kemijom omogućeno je jednostavno podešavanje fluorescentnih svojstava nukleozida.

2. OPĆI DIO

Valna duljina emisije varira u ovisnosti o supstituentu na triazolnom prstenu, bez značajne promjene apsorpcijskih svojstava.

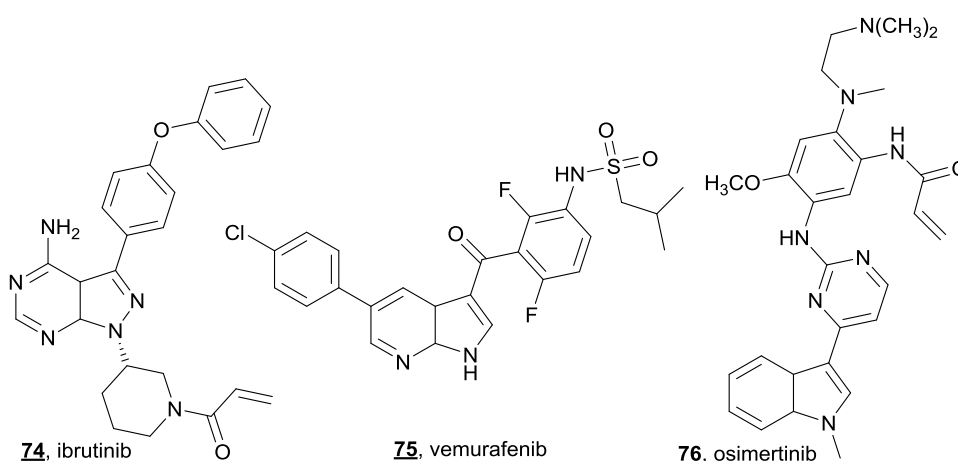


Slika 28. Primjer 8-triazolilpurinskih derivata i njihovih fotofizikalnih svojstava **73a–73i**.

2.4. Purinski izosteri

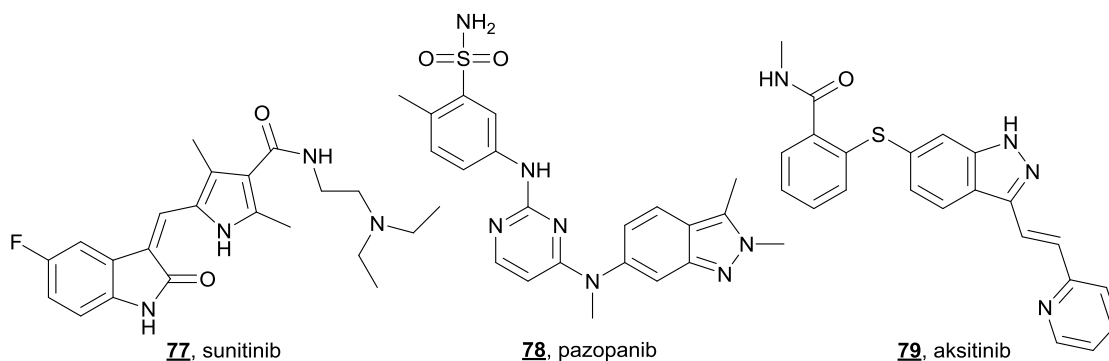
Bioizosterija jedan je od pristupa koji se koristi u racionalnom razvoju lijekova i odnosi se na zamjenu strukturnih fragmenata ili funkcionalnih skupina koji sadrže slične oblike i dimenzije, približno jednaku raspodjelu elektrona, imaju slična fizikalna svojstva i biološko djelovanje. Strukturne promjene na predvodnim spojevima korištenjem bioizosterije dovele su do poboljšanja selektivnosti, smanjenja nuspojava i toksičnosti, te poboljšanja farmakokinetičkih svojstava, poput metaboličke stabilnosti [6, 124]. Jedna od mogućnosti bioizosterije je zamjena prstena ili nekog drugog fragmenta (eng. *scaffold hopping*) u kojima se skelet predvodne male molekule zamjenjuje bioizosterom [124]. Skelet može biti od izuzetne važnosti za stvaranje interakcija s ciljanom metom ili može omogućiti supstituciju s funkcionalnim skupinama u odgovarajućoj geometrijskoj konfiguraciji. Strukturno modificirani prirodni purini, osobito korištenjem izosternih prstenastih sustava poput aza- i deazapurinskih izostera, u središtu su istraživanja novih biološki aktivnih molekula [86].

Velik broj purinskih izostera odobreni su kao antitumorski lijekovi, poput već spomenutih inhibitora CDK4/6, abemcikliba (**7**) i ribocikliba (**8**) (slika 8) [59–61], koji se koriste za liječenje karcinoma dojke, te inhibitora BTK (eng. *Bruton's tyrosine kinase*) tirozin-kinaze, ibrutiniba (**74**) [125] odobrenog za liječenje leukemije, inhibitora kinaze B-Raf, vemurafeniba (**75**) odobrenog za liječenje melanoma [126] i inhibitora EGFR, osimertiniba (**76**) koji je pronašao primjenu u liječenju karcinoma pluća ne-malih stanica [127] (slika 29).



Slika 29. Purinski izosteri odobreni kao antitumorski lijekovi.

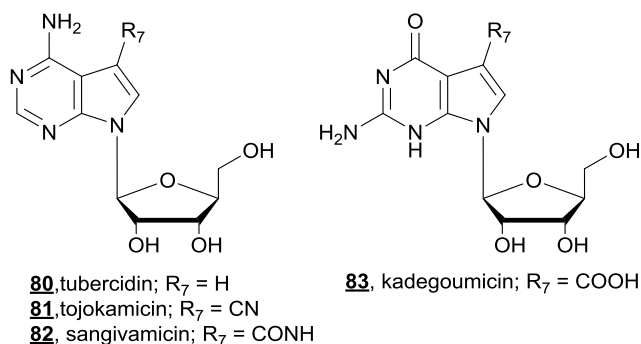
Nadalje, ovaj se heterociklički prsten također pokazao značajnim u razvoju antitumorskih agenasa koji djeluju na više meta s ciljem smanjenja rezistentnosti i povećanja učinkovitosti, poput multi-kinaznog inhibitora sunitiniba (**77**) [128], pazopaniba (**78**) [129] i aksitiniba (**79**) [130], koji su korišteni za liječenje karcinoma bubrežnih stanica (slika 30).



Slika 30. Purinski izosteri odbreni kao antitumorski lijekovi.

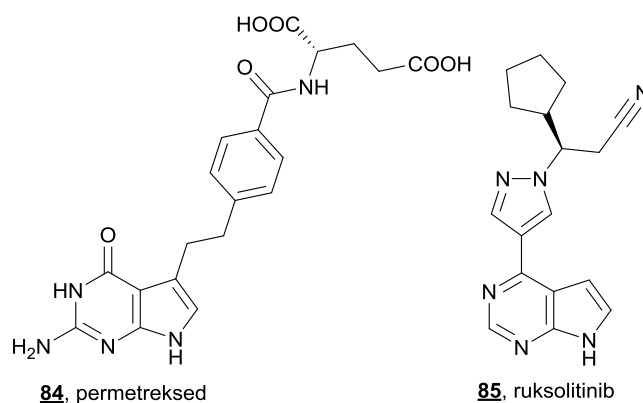
2.4.1. 7-deazapurini

7-deazapurin ili pirolo[2,3-*d*]pirimidin je izoster purina u kojem je dušikov atom u položaju 7 purina zamijenjen s ugljikovim atomom, te je strukturni dio velikog broja prirodnih antibiotika poput tubercidina (**80**), tojokamicina (**81**), sangivamicina (**82**) i kadegoumicina (**83**) (slika 31) [131]. Ovi prirodni nukleozidni analozi pokazali su citotoksičnu aktivnost na stanice karcinoma pluća ne-malih stanica A549 (**80**; $IC_{50} = 0,001 \mu M$, **82**; $IC_{50} = 0,006 \mu M$) i karcinoma prostate HTB-81 (**81** $IC_{50} = 0,012 \mu M$) [132]. Njihovim fosforiliranjem omogućena je ugradnja u RNA i DNA molekule, što uzrokuje nepravilnosti u funkciji nukleinskih kiselina. Zamjena atoma N7 s ugljikovim atomom čini peteročlani prsten bogatiji elektronima čime je omogućeno uvođenje dodatnih supstituenata. Uvođenjem halogena u C7 položaj prirodnih antibiotika značajno se smanjuje njihov toksični učinak.



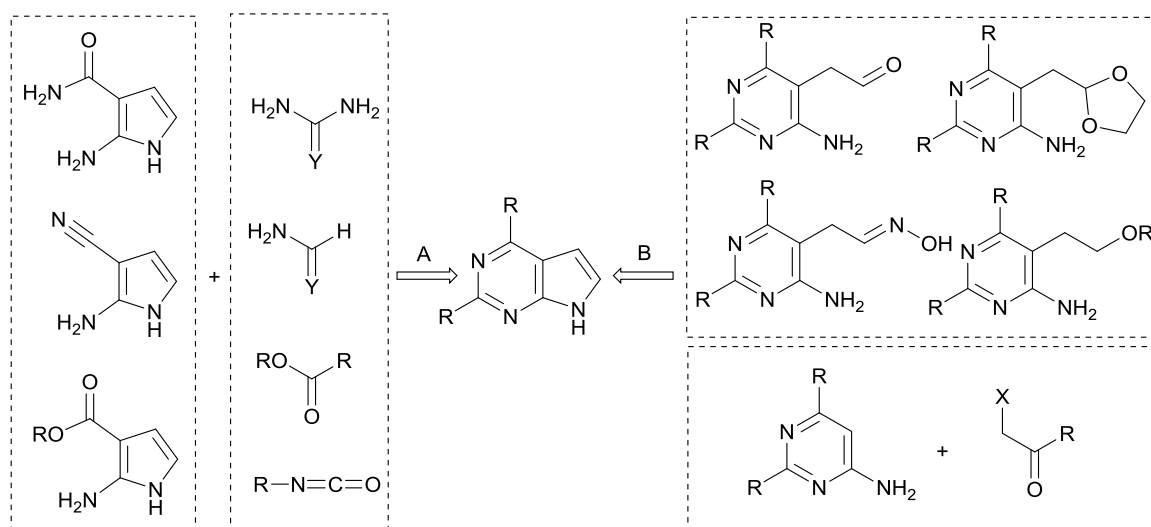
Slika 31. Prirodni pirolo[2,3-*d*]pirimidini.

Pirolpirimidinska jezgra oponaša purinski prsten molekule ATP-a, te može djelovati kao kompetitivni inhibitor proteinskih kinaza vezujući se u područje zgloba. Uz već spomenuti inhibitor CDK4/6, ribociklib (slika 8), ovaj purinski izoster također je sastavni dio antitumorskog lijeka pemetrekseda (**84**), koji djeluje kao antifolat odobren za liječenje karcinoma pluća, te inhibitora Janus-kinaza JAK1 i JAK2 ruksolitiniba (**85**), koji se koristi za liječenje karcinom koštane srži i krvnih stanica (slika 32) [131].



Slika 32. Odobreni 7-deazapuriniski antitumorski lijekovi.

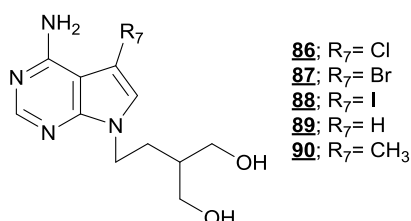
Pirol[2,3-*d*]pirimidini se mogu prirediti kondenzacijom pirimidinskog prstena na supstituirani pirolni prsten pomoću amidnih veza s derivatima uree, estera i formamida ili njihovih retrosintetskih analoga (izocijanata ili orto-estera) kao C1-gradivnih jedinica, te kondenzacijom 4-aminopirimidina koji sadrži 2-oksoetilni (ili alkilni) supstituent u položaju 5 (shema 11) [131].



Shema 11. Metode A i B za sintezu 7-deazapurina [131].

Različitim kemijskim transformacijama, najčešće u položajima 2, 6, 7 i 9 uspješno su priređeni brojni 7-deazapurinski derivati, koji uz antitumorsku aktivnost pokazuju i antivirusno, antibakterijsko i antiinflamatorno djelovanje [131–135]. Njihova aktivnost se najčešće može pripisati inhibiciji kinaza, poput CDK, MAPK i receptorskih tirozin-kinaza VEGFR i PGFR [131, 132, 136, 137].

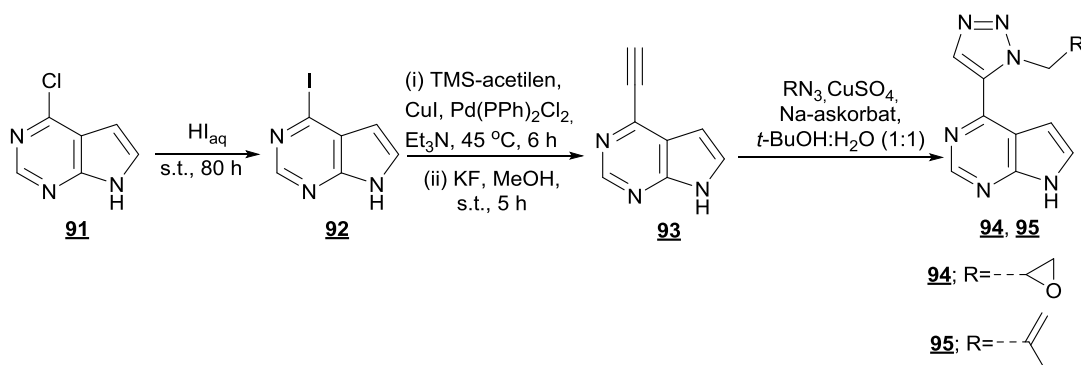
Pudlo i suradnici [138] priredili su acikličke pirolpirimidine supstituirane u položaju 7 (**86–90**) (slika 33). Uvođenjem halogena u položaj C-7 deazapurina povećava se inhibitorna aktivnost protiv stanica mišje leukemije, L1210 i virusa herpesa HSV-1 i CMV. Bromirani analog **87** pokazao je najbolju antitumorsku aktivnost (L1210; $IC_{50} = 0,7 \mu M$), dok nesupstituirani i analozi supstituirani metilom nisu pokazali značajnije djelovanje.



Slika 33. Halogenirani aciklički 7-supstituirani-7-deazapurini.

2.4.1.1. Biološki važni hibridi 7-deazapurina i 1,2,3-triazola

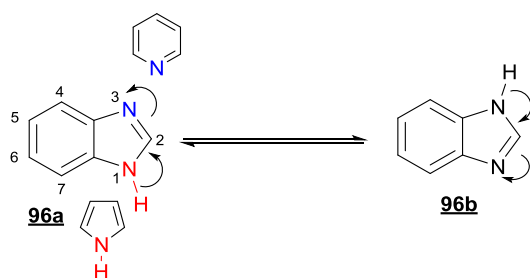
Bioizosternom zamjenom pirazolnog prstena antitumorskog lijeka ruksolitiniba **85** (slika 32) s 1,2,3-triazolnim prstenom Gehringer i suradnici [139] priredili su snažne 6-triazolil-7-deazapurinske inhibitore Janus kinaza JAK1-3, odgovorne za fosforiliranje receptora citokina koji ima ključnu ulogu u staničnom rastu (shema 12). *Click* reakcijom sintetizirana je serija od 38 analoga ruksolitiniba od kojih su spojevi **94** i **95** pokazali najsnažnije inhibitorno djelovanje na kinazu JAK1 (**94**; $IC_{50} = 2,7 \mu M$; **95**; $IC_{50} = 1,4 \mu M$), JAK2 (**94**; $IC_{50} = 2,5 \mu M$; **95**; $IC_{50} = 0,87 \mu M$) i JAK3 (**94**; $IC_{50} = 0,04 \mu M$; **95**; $IC_{50} = 0,97 \mu M$). Ključni alkinilni prekursor **93** priređen je Sonogashirinom reakcijom, a kao katalitički sustav u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji korišten je bakrov(II) sulfat i natrijev askorbat (shema 12).



Shema 12. Sinteza 6-triazolil-7-deazapurinskih izostera ruksolitiniba **94** i **95**.

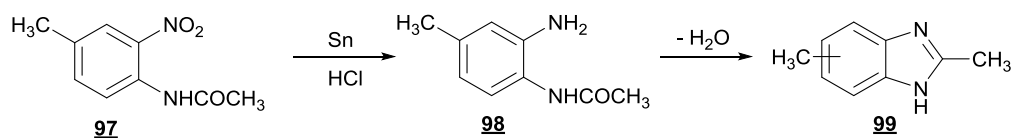
2.4.2. Benzimidazoli

Benzimidazoli su heterociklički spojevi građeni od imidazalnog prstena kondenziranog na benzensku jezgru, a dolaze u obliku dva tautomera (slika 34). Položaji 5 i 6, kao i supstituenti na tim položajima u prstenu, kemijski su ekvivalentni. U *N*-supstituiranim benzimidazolima nema tautomerije, te se mogu izolirati i karakterizirati kao dvije različite molekule tj. izomeri.



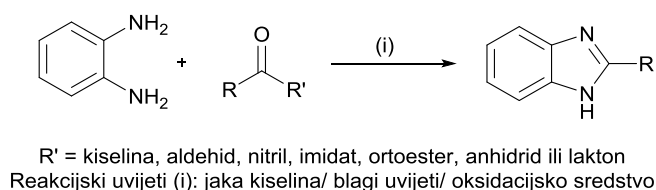
Slika 34. Tautomerne strukture benzimidazolne jezgre.

Poput imidazola su amfoternog karaktera, zbog bazičnog i kiselog dušikovog atoma [140]. U svojoj strukturi imaju pirolni dušik, koji doprinosi aromatskom sekstetu, i piridinski dušik, čiji je slobodni elektronski par u sp^2 orbitali i ne doprinosi aromatskom sekstetu. Benzimidazol (pK_a 5,4) je umjeren bazičan, te se njegov dušik u položaju 3 može protonirati, ali isto tako se dušik na položaju 1 može deprotonirati kao slaba kiselina. Prvi put je sintetiziran 1872. godine redukcijom i dehidratiranjem 4-metil-2-nitroacetanilida (shema 13) i jedan je od najstarijih poznatih dušikovitih heterocikla [141].



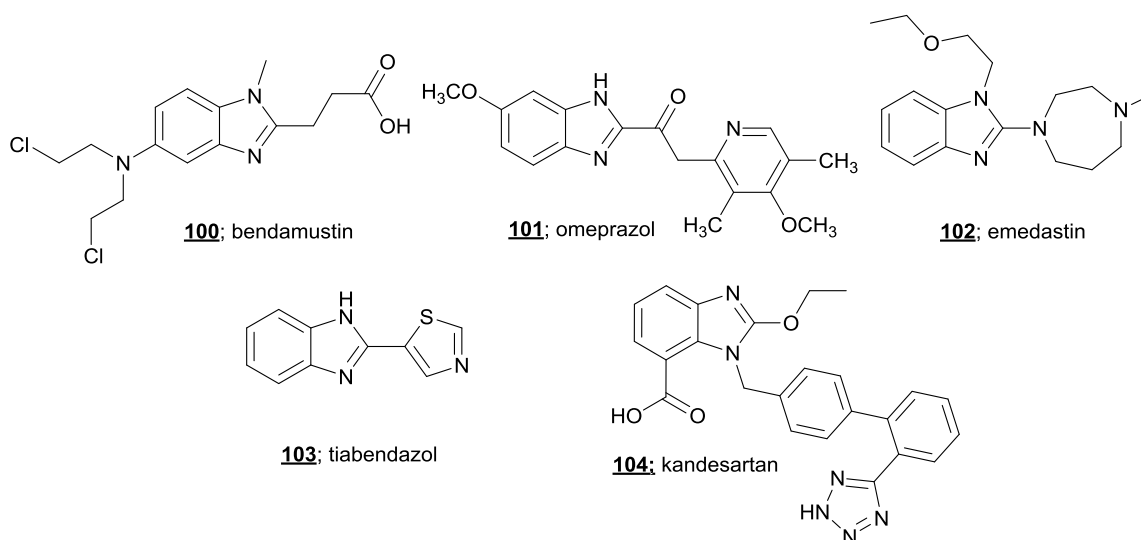
Shema 13. Sinteza benzimidazola iz 4-metil-2-nitroacetanilida.

Benzimidazolni derivati se mogu prirediti reakcijom 1,2-diaminobenzena s karboksilnim kiselinama u snažnim dehidrationskim uvjetima koristeći jake kiseline poput klorovodične (Filipsova metoda), polifosforne, borne ili *p*-toluensulfonske kiseline. Provođenjem sinteze u blažim reakcijskim uvjetima uz Lewisove kiseline iskorištenje reakcije je veće i reakcijske smjese se lakše pročišćavaju. Sinteza benzimidazola reakcijom *o*-fenilendiamina i aldehida zahtijeva oksidacijsko sredstvo poput benzokinona, joda, bakrovog(II) acetata ili natrijevog bisulfita. Također se mogu pripravljati iz 1,2-diaminobenzena s derivatima karboksilnih kiselina poput nitrila, imidata, ortoestera, anhidrida ili laktona (shema 14) [142].



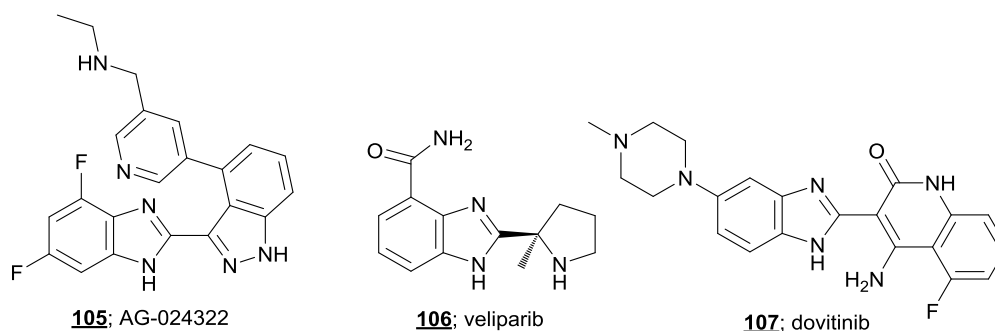
Shema 14. Sinteza benzimidazola reakcijom *o*-fenilendiamina i aldehida.

Iako se svih sedam položaja na benzimidazolnoj jezgri može supstituirati različitim kemijskim entitetima, većina biološki aktivnih benzimidazola imaju funkcionalne skupine u položaju 1, 2 i/ili 5, 6, te čine mono-, di- ili tri-supstituirane analoge. Najistaknutiji prirodni benzimidazolni derivat je *N*-ribozil-dimetilbenzimidazol, koji je aksijalni ligand za kobalt u vitaminu B₁₂. Ova *N*-heterociklička jezgra sastavni je dio antitumorskih lijekova poput već spomenutog inhibitora CDK4/6 abemacicliba **7** (slika 6) i alkilirajućeg agensa bendamustina **100**, koji se koristi u liječenju leukemije, lijekova odobrenih kao inhibitora protonskih pumpi (omeprazol, **101**), antihistaminika (emedastin, **102**), fungicida (tiabendazola, **103**) i antihipertenziva (kandesartan, **104**) prikazanih na slici 35 [88, 141].



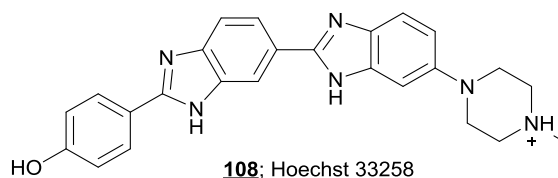
Slika 35. Primjeri odobrenih lijekova s benzimidazolnom jezgrom.

Benzimidazoli se mogu svrstati u takozvane povlaštene strukture jer se vežu na veliki broj receptora s visokim afinitetom i pokazuju širok spektar bioloških djelovanja poput antiinflamatorne i analgetske, antifungalne, antibakterijske, antivirusne, antiproliferativne, antitripanosomske, antioksidativne i antituberkulostatske aktivnosti [141–144]. Derivati benzimidazola, uz interakciju s molekulom DNA [145], inhibiraju velik broj proteinskih kinaza poput kasein-kinaza (CK1, CK2), glikogen-sintaza (GSK-3), fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K), receptor tirozin-kinaza (EGFR, VEGFR, PDGFR, IGFR), kinaza ovisnih o ciklinu (CDK), kinaza brzo rastućih fibrosarkoma (RAF) i mitogenom aktiviranih kinaza (MEK, ERK, p38 MAPK) [146, 147]. U kliničkim ispitivanjima kao antitumorski agensi se, uz spomenute inhibitore mitogenom aktivirane kinaze MEK selumetiniba **3** i binimetiniba **4** (slika 6), nalaze i inhibitor kinaze CDK AG-024322 (**105**) [148], inhibitor PARP veliparib (**106**) [149] i multi-kinazni inhibitor dovitinib (**107**) [150] (slika 36).



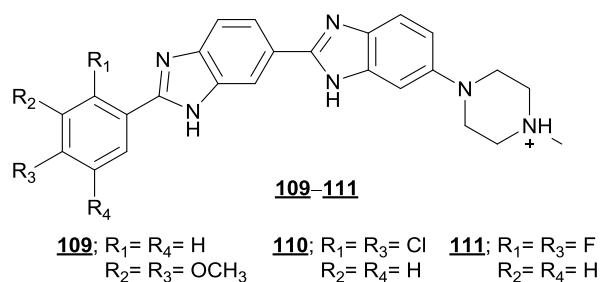
Slika 36. Primjeri benzimidazolnih inhibitora proteinskih kinaza u kliničkim ispitivanjima kao antitumorskih agenasa.

Bis-benzimidazoli spadaju među najistraživanije klase heterocikličkih spojeva, koji su pokazali snažno antitumorsko djelovanje vezanjem u mali utor molekule DNA. Jedan od najznačajnijih derivata bis-benzimidazola je Hoechst **108**, fluorescentno bojilo koje služi za označavanje molekule DNA (slika 37). Ima polukružnu planarnu strukturu koja prati DNA uzvojnici i nabijene krajeve, te se veže u elektronegativan mali utor DNA molekule bogat sekvencama adenina i timina [151].



Slika 37. Struktura bis-benzimidazola Hoechst 33258.

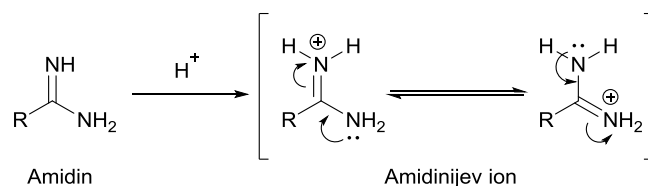
Kako je spoj **108** pokazao djelovanje kao inhibitor topoizomeraze I, dizajnirani su analozi sa snažnim antitumorskim djelovanjem. Singh i suradnici [152] pripravili su 2-aril disupstituirane 2-bis-benzimidazole (**109–111**) prikazane na slici 38. Klorirani derivat **110** je pokazao najsnažnije antitumorsko djelovanje na stanice karcinoma vrata maternice HeLa ($IC_{50} = 0,6 \mu M$), dok je spoj **109** s metoksi supstituentima na fenilnoj jezgri pokazao najveću selektivnost. Spojevi **110** i **111** s halogenim supstituentima također su ostvarili snažnije interakcije s *ct*DNA i učinkovitiju inhibiciju enzima topoizomeraze I.



Slika 38. Bis-benzimidazolni derivati s antitumorskim djelovanjem.

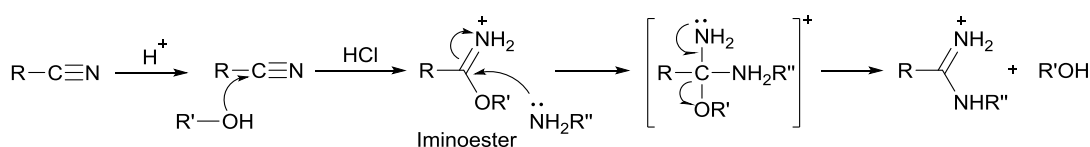
2.4.2.1. Sinteza amidino-supstituiranih benzimidazola

Amidini su dušikovi derivati karboksilnih kiselina i estera opće formule $R_nE(=NR)NR_2$ i jedna su od najjačih neutralnih baza, odnosno superbaza [153, 154]. Protoniranjem sp^2 hibridiziranog dušika, pozitivan naboj se može delokalizirati između oba dušikova atoma, pri čemu se dobiva amidinijev ion koji posjeduje C–N veze jednakih duljina (shema 15).



Shema 15. Protoniranje amidina.

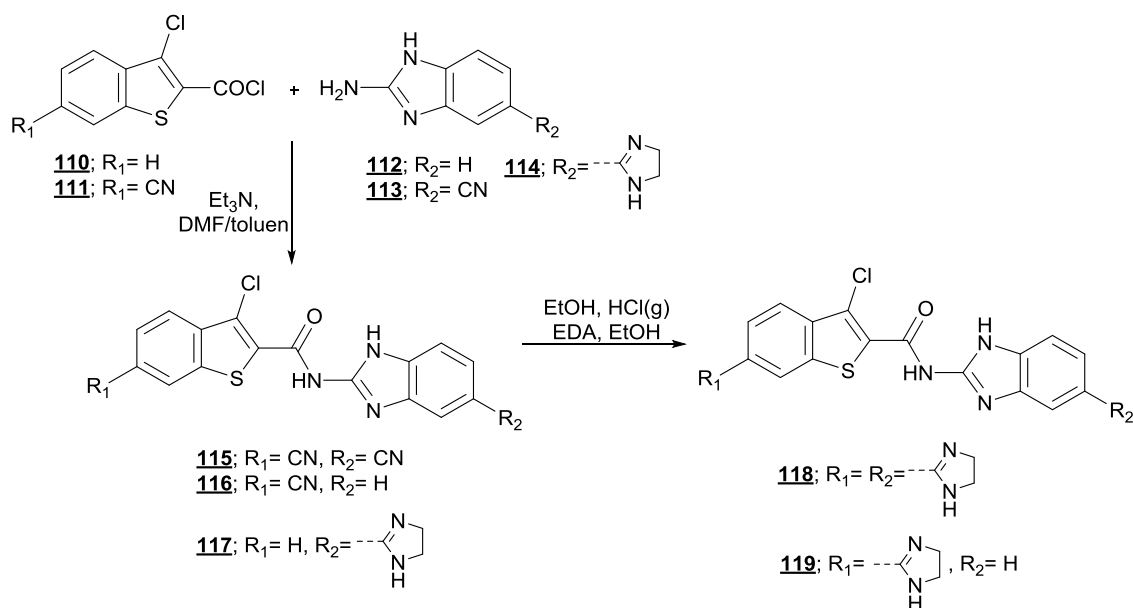
Amidini su strukturni dijelovi brojnih biološki aktivnih spojeva poput antibiotika distamicina, antivirusnog lijeka amidinomicina i antiprotozoalnih lijekova pentamidina i berenila [155, 156], koji su pokazali također i snažno antitumorsko djelovanje [157]. Među poznatim pozitivno nabijenim skupinama, amidini privlače pažnju zbog mogućnosti stvaranja vodikovih veza i afiniteta prema biološkim metama. Navedena strukturna jedinica omogućuje prolazak kroz stanične membrane, čime izravno utječe na raspodjelu spojeva unutar organizma. Mogu se prirediti iz nitrila Pinnerovom reakcijom, metodom amidoksima i nukleofilnom adicijom litijevog heksametildisilizana (LHMDS) [158]. Sinteza amidina iz nitrila ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima nitrila, definiranim ponajprije funkcionalnim skupinama na nitrilu (elektron donorske ili akceptorske skupine) i steričkim utjecajima oko nitrilne skupine. Pinnerova metoda je najčešće korištena metoda za pripremu amidina i uključuje dva stupnja: prevođenje nitrila u iminoester kiselom-kataliziranom nukleofilnom adicijom alkohola te supstituciju s aminom ili amonijakom.



Shema 16. Sinteza amidina Pinnerovom reakcijom.

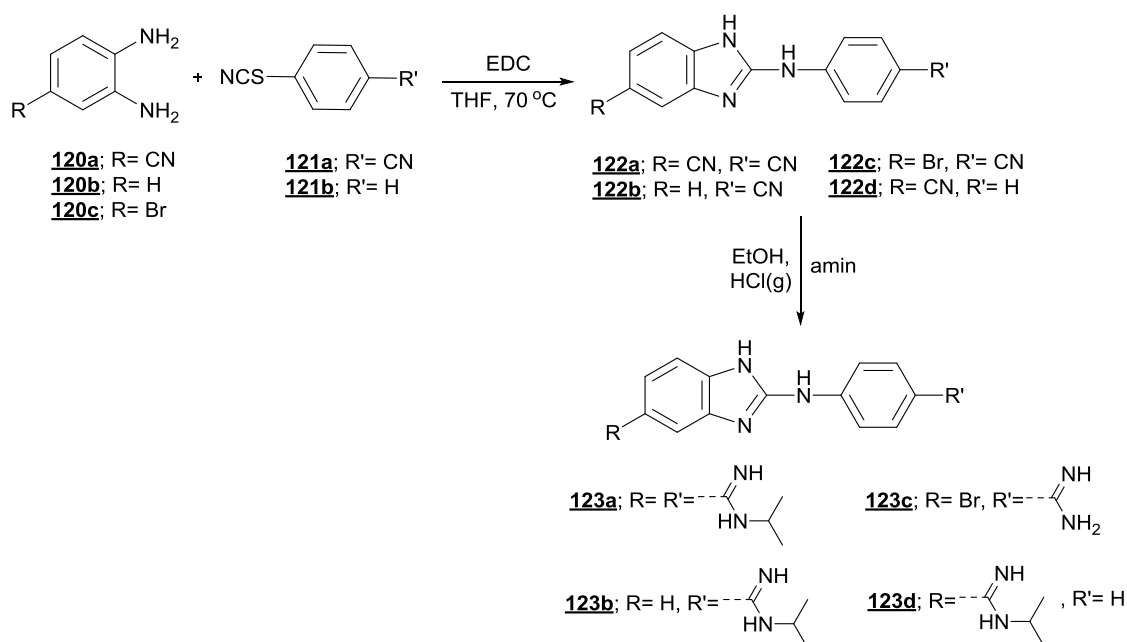
Amidino-supstituirani derivati benzimidazola pokazali su antitumorsko, antibakterijsko i antiprotozalno djelovanje najčešće stvaranjem kovalentnih interakcija u

malom utoru molekule DNA. Cindrić i suradnici [159] priredili su hibride benzotiazola i benzimidazola kao derivate benzo[*b*]tieno-2-karboksamida (**117–119**) te ispitali njihovo antiproliferativno djelovanje i interakcije s *ct*DNA. Benzimidazolni hibridi priređeni su iz odgovarajućih 3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorida i 2-aminobenzimidazola, a odgovarajući 2-imidazolinilni derivati priređeni su Pinnerovom reakcijom iz cijano derivata (shema 17). Pripravljene spojevi pokazali su snažno antiproliferativno djelovanje na tumorskim stanicama vrata maternice (HeLa) i jetre (HepG2). Najsnažnije interakcije s *ct*DNA su pokazali bis-amidinski derivati.



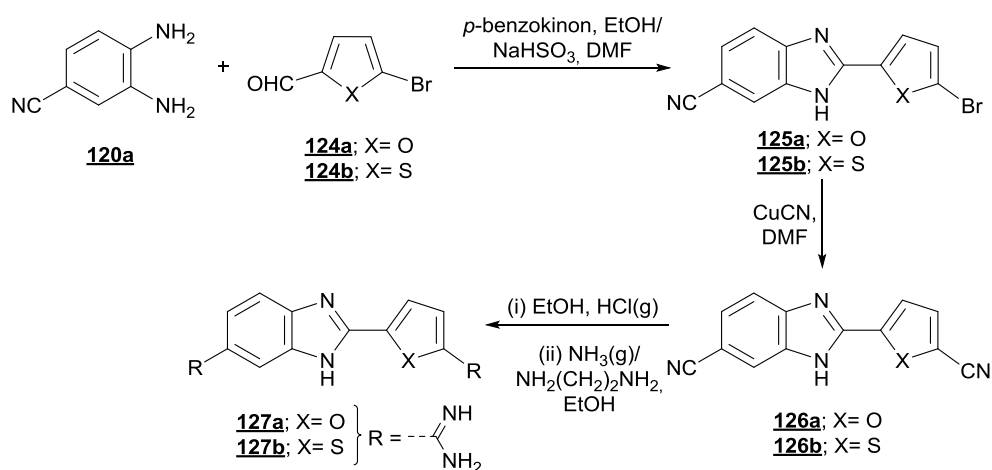
Shema 17. Sintaza hibrida amidino-supstituiranih benimidazola kao derivata benzo[*b*]tieno-2-karboksamida.

Karaaslan i suradnici [160] priredili su mono- i di-kationske amidino-supstituirane derivate benzimidazola koji pokazuju snažno antitumorsko djelovanje u nanomolarnom području na stanice karcinoma dojke (MCF-7). Benzimidazoli su priređeni ciklizacijom odgovarajućih *o*-fenilendiamina i izocijanata (shema 18). Spojevi **123a–123d** djeluju na stanice MCF-7 snažnije od referentnih lijekova imatinib-mesilata i docetaksela. Uspoređujući ovisnost strukture o antitumorskoj aktivnosti, *N*-izopropilamidinski derivati benzimidazola pokazuju najbolje djelovanje. Priređenim spojevima su također računski određeni parametri Ro5 te su predviđena dobra ADMET svojstva.



Shema 18. Sinteza amidino-supstituiranih derivata benzimidazola **123a–123d**.

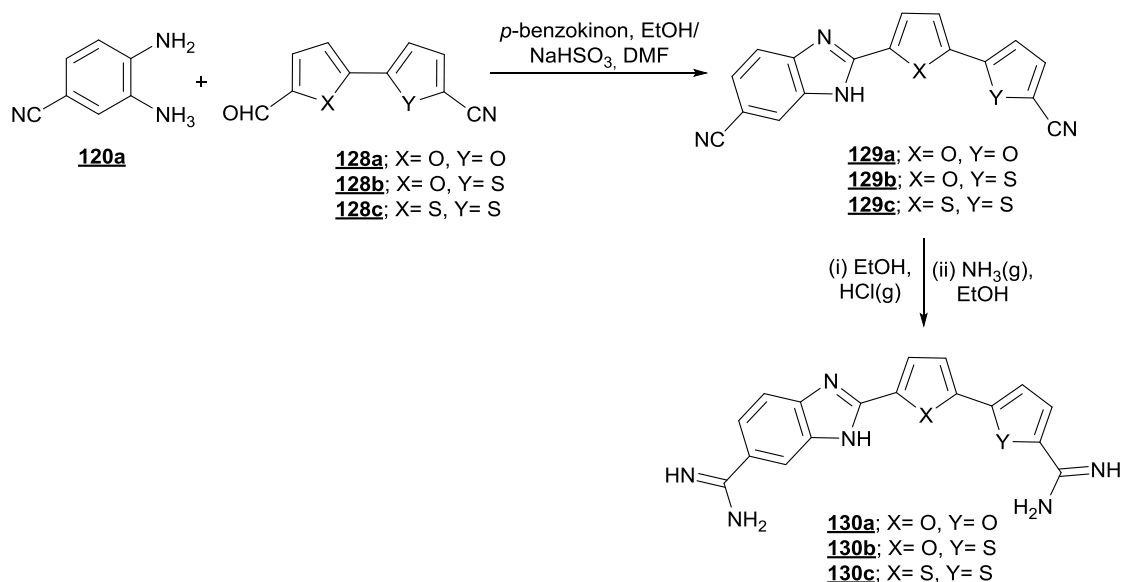
Nadalje, amidino-supstituirani derivati benzimidazola pokazuju i snažno djelovanje protiv parazita *Trypanosoma brucei*. Farhat i suradnici [161] priredili su seriju bis-amidinskih derivata benzimidazola kojima je ispitana aktivnost protiv *Trypanosoma brucei rhodesiense* (T.b.r.). Ciljani spojevi su sintetizirani iz cijano derivata Pinnerovom reakcijom i redukcijom amidoksimskih intermedijara (shema 19). Naj snažniju aktivnost pokazao je tiofenski derivat **127b**, a priređeni dikationi snažno se vežu u mali utor DNA kovalentnim interakcijama.



Shema 19. Sinteza bis-amidinskih derivata **127a** i **127b**.

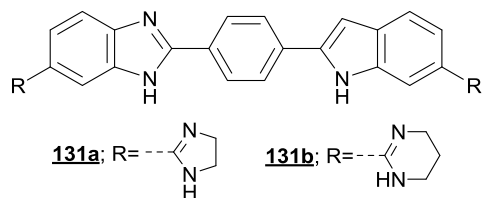
Ista skupina autora [162] priredila je benzimidazolne i indolne bikalkofenske diamidinske derivate koji su uz antitripanosomsko djelovanje također pokazali antimalarijsku

aktivnost. Bis-cijanobenzimidazolni prekursori (**129a–129c**) su priređeni ciklizacijom aldehida i 4-cijano-1,2-diaminobenzena s *p*-benzokinonom ili natrijevim bisulfatom kao oksidacijskim sredstvom, iz kojih su diamidini (**130a–130c**) pripremljeni Pinnerovom reakcijom (shema 20). Priređeni derivati pokazali su značajne interakcije s DNA vezanjem u mali utor.



Shema 20. Sinteza benzimidazolnih bikalkofenskih diamidinskih derivata.

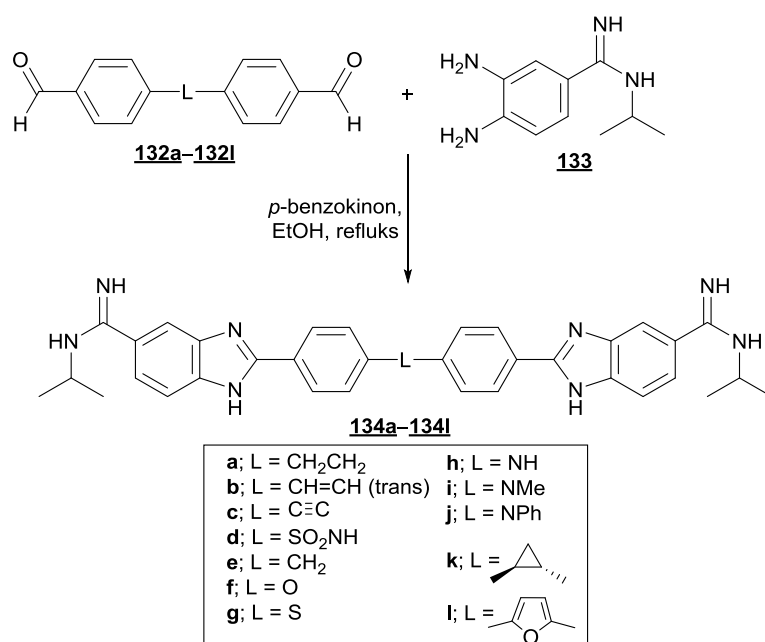
Bis-amidinski hibridi benzimidazola i indola vezani preko fenilne prenosnice (**131a** i **131b**) pokazali su također i značajno antibakterijsko djelovanje [163]. Spojevi su ispitani na različite gram-pozitivne bakterijske vrste, te su pokazali najsnažnije djelovanje na *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, meticilin-otpornu *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin-otpornu *Enterococcus faecalis* (VRE) bakterijsku vrstu (slika 39).



Slika 39. Bis-amidinski hibridi benzimidazola i indola s antibakterijskom aktivnošću.

Hu i suradnici [164] sintetizirali su bis-benzimidazolne diamidine s različitim prenosnicama (**134a–134l**) ciklizacijom odgovarajućeg bisaldehida s 4-(*N*-izopropilamidino)-1,2-fenildiaminom (shema 21). Spoj **134f** pokazao je najsnažnije djelovanje protiv

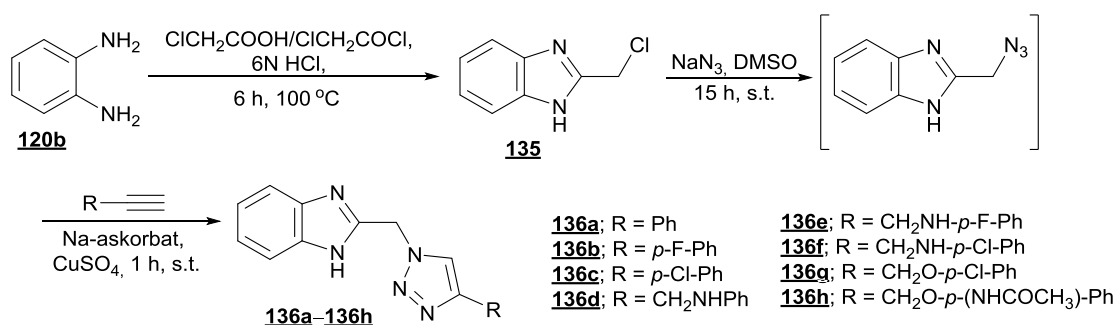
rezistentnih sojeva MRSA i VRE, čak snažnije od referentnog antibiotika vankomicina.



Shema 21. Sinteza bis-benzimidazolnih diamidina.

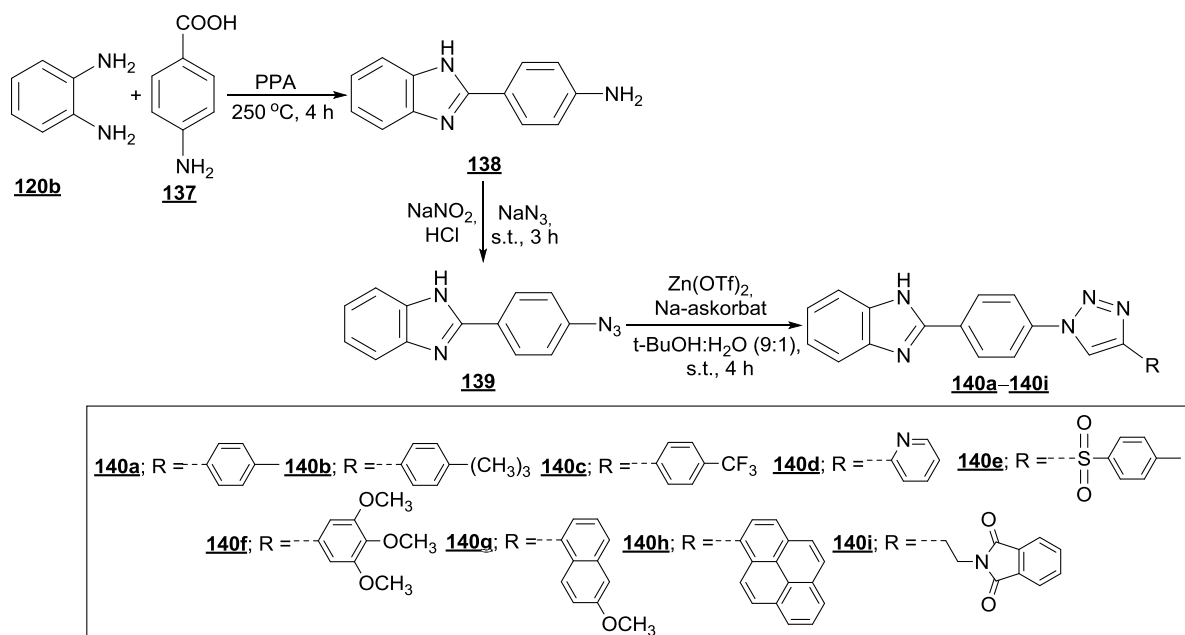
2.4.2.2. Sinteza hibrida benzimidazola i 1,2,3-triazola

Hibridi benzimidazola i 1,2,3-triazola povezani preko N-1, C-2, i C-5(6) položaja benzimidazola pokazali su antitumorsko, antibakterijsko, antifungalno i antivirusno djelovanje [165]. Ishani i suradnici [166] pripravili su derivate benzimidazola na koje je u položaju C-2 preko metilne prenosnice uveden 1,2,3-triazolni prsten. Ciljani 1,4-disupstituirani triazoli priređeni su *in situ* iz 2-(klormetil)benzimidazolnih prekursora bez izoliranja azidnog derivata u iskorištenju od 85–98 % (shema 22). Svim priređenim spojevima ispitana je antiproliferativna aktivnost na 60 tumorskih staničnih linija. Spoj **136f** pokazao je najsnažnije antiproliferativno djelovanje inhibirajući rast stanica karcinoma bubrega (UO-310) pri koncentraciji od 10 μM za 40 %.



Shema 22. Sinteza hibrida benzimidazola i 1,2,3-triazola preko metilne prenosnice.

2-triazolil-benzimidazolne hibride s aromatskom fenilnom prenosnicom između benzimidazolnog i triazolnog prstena (**140a–140i**) sintetizirali su Harkala i suradnici [167]. 2-azidofenilni benzimidazolni prekursor (**139**) priređen je reakcijom diazotacije iz aminofenilnog analoga (**138**). Kao katalizator u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji umjesto CuSO_4 korišten je $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ (shema 23). Antiproliferativno djelovanje priređenih spojeva ispitano je na tumorske stanične linije melanoma (A375 i B16), karcinoma debelog crijeva (colon-205), karcinoma dojke (MCF7) i karcinoma pluća (A549).

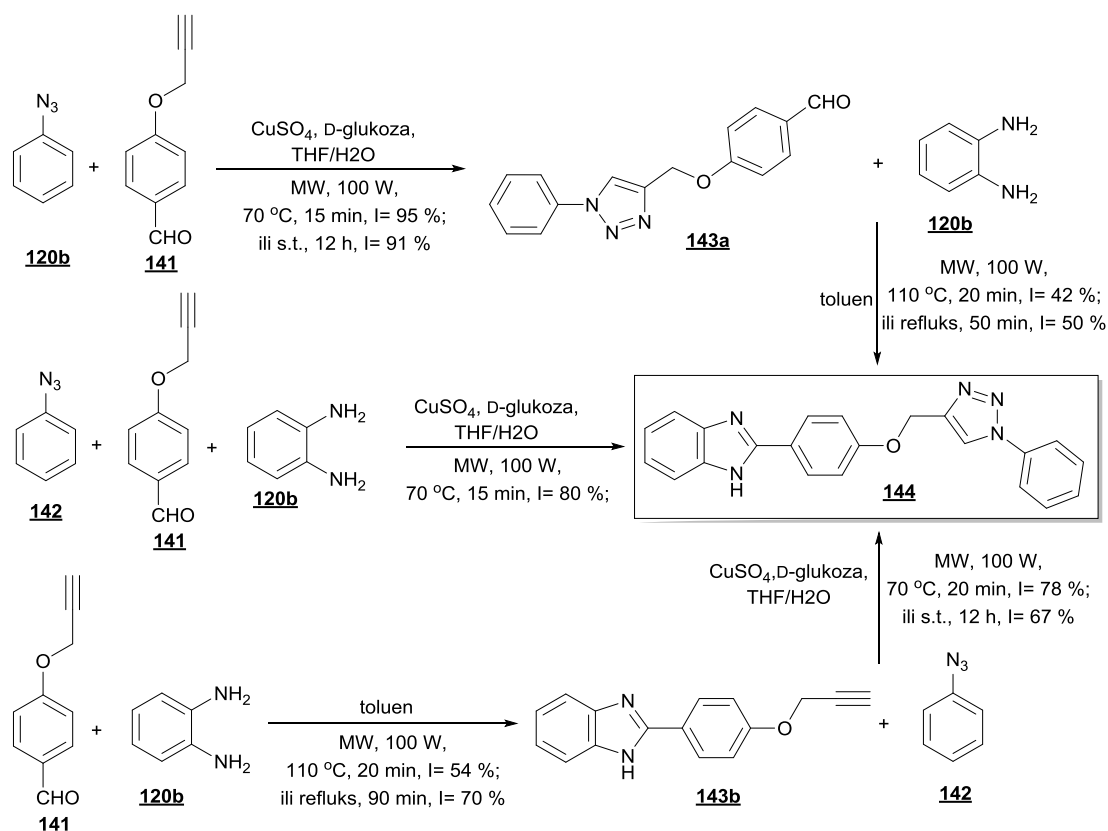


Spoj	IC ₅₀ /μM					Spoj	IC ₅₀ /μM				
	A537	B16	Colon205	MCF7	A549		A537	B16	Colon205	MCF7	A549
140a	-	-	-	37	32	140f	2,7	-	1,3	3,2	0,1
140b	27	10	21	-	-	140g	43	-	32	-	26
140c	-	4,7	8	-	-	140h	1,6	16	0,12	1,9	-
140d	15	3,9	17	-	-	140i	2,3	1,9	3,5	1,7	2,6
140e	2,1	-	1,3	0,3	1,8						

Shema 23. Sinteza i antiproliferativno djelovanje 2-triazolil-benzimidazolnih derivata.

Kumar i suradnici [168] predložili su tri sintetska puta za sintezu 2-{4-[(1-fenil-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}benzimidazola (**144**). Sinteza je provedena u dva stupnja, uzastopnim zatvaranjem triazolnog i imidazolnog prstena. Ovisno o reakcijskom putu konačni je produkt dobiven u različitim iskorištenjima. Kada je sinteza triazola provedena u prvom stupnju iskorištenje *click* reakcije je iznosilo 91 % i 95 %, dok je *click* reakcijom u drugom stupnju, nakon ciklizacije benzimidazola, dobiveno iskorištenje od 78 % i 67 %. *One-pot* multikomponentnom reakcijom (MCR) u jednom stupnju uspješno je izoliran željeni produkt (**144**) u iskorištenju od 80 %. Reakcija MCR potpomognuta mikrovalnim zračenjem

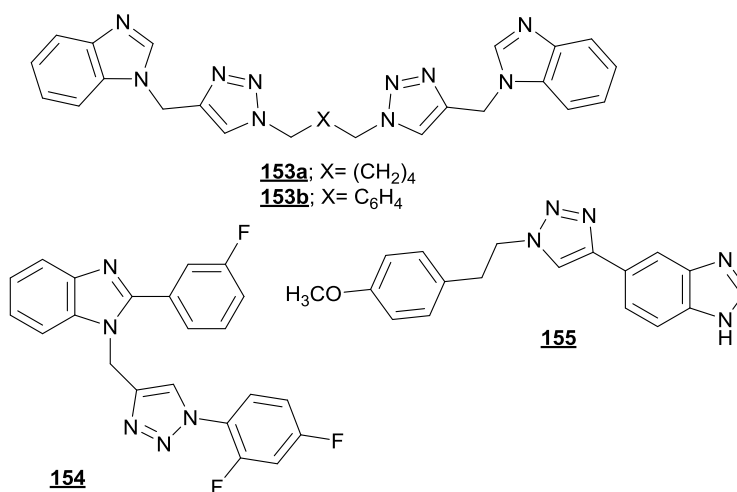
provedena je u svega 15 minuta uz CuSO_4 i D-glukoza kao redukcijско sredstvo. Željeni produkt nije sintetiziran reakcijom MCR (shema 24).



Shema 24. Sinteza 2-{4-[(1-fenil-1,2,3-triazol-4-il)metiloksi]fenil}benzimidazola.

2-triazolil-benzimidazoli također su pokazali antibakterijsko djelovanje, halogenirani benzimidazolni derivat **145** [169] umjereno antibakterijsko djelovanje, te triazolni hibridi Hoechst (**146a–146d**), koji su inhibirali rast gram-negativnih bakterija, uključujući soj MRSA i pokazali inhibitorno djelovanje DNA-topoizomeraze I iz *E. coli* [170] (slika 40). Ranjan i suradnici [171, 172] pripravili su također hibride mono- i bis-benzimidazolnih derivata Hoechst s neomicinom. Usporedili su utjecaj premosnice između tih farmakofornih jedinica, duljinu lanca i broj triazolnih jezgri na interakcije s molekulom RNA i proteinom trans-aktivirajućeg područja (TAR) virusne RNA, važnom metom virusa HIV-a. Hibridi s kraćim premosnicama poput spoja **147** [171] pokazali su veći afinitet i selektivnost inhibicije proteina TAR, kao i smanjenje razine miRNA-27a (eng. *microRNA*), obećavajuće mete u antitumorskoj terapiji (slika 40).

gram-pozitivnih bakterija (*Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*), gram-negativnih bakterija (*Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*), te fungi (*Candida albicans* i *Aspergillus niger*) [174]. Uvođenjem difluorfenil-supstituiranog triazolnog prstena u *N*-1 položaj benzimidazolne jezgre (**154**) dobiveni su hibridi s antituberkulostatskim djelovanjem [175], dok su 5(6)-triazolil-benzimidazolni derivati (**155**) pokazali djelovanje kao inhibitori glutamil-ciklaze [176] (slika 41).

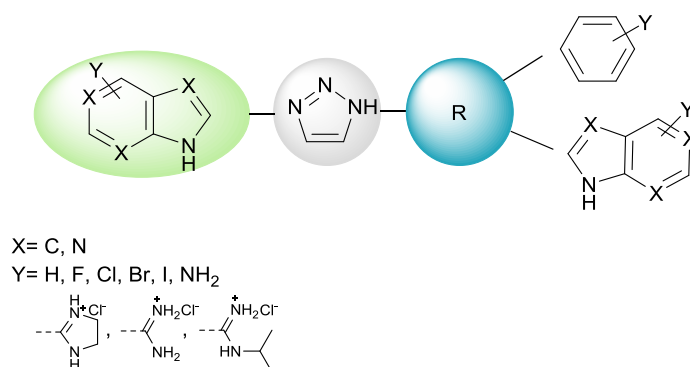


Slika 41. Biološki aktivni hibridi benzimidazola i triazola.

3. Rezultati i rasprava

3.1. Uvod

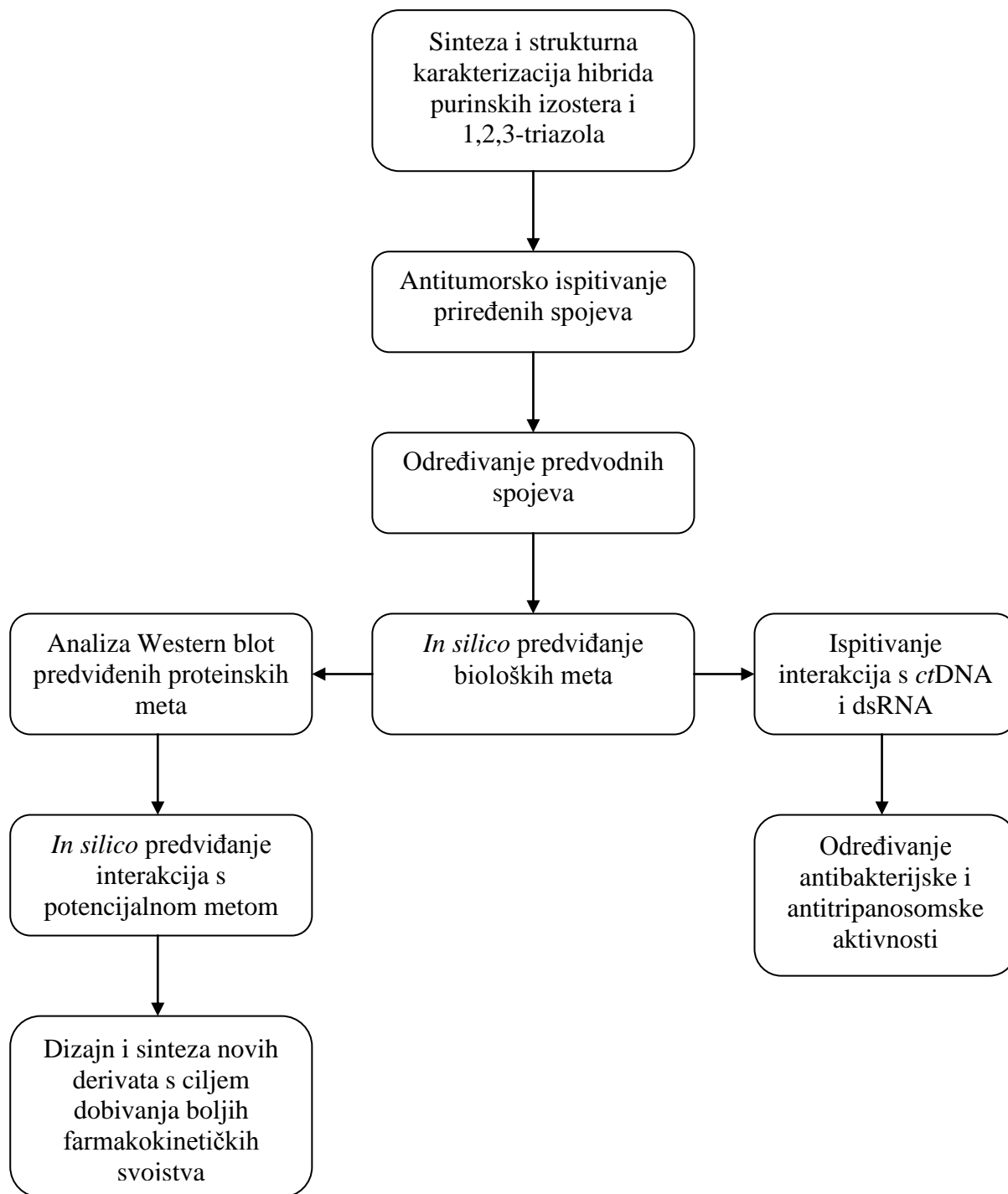
U svrhu sinteze novih molekula s potencijalnim biološkim djelovanjem u ovom doktorskom radu priređeni su novi derivati purina i purinskih izostera s 1,2,3-triazolom primjenom koncepta molekularne hibridizacije. Sintetizirani su derivati pseudopurina sa supstituentima u položajima 6 i 9 purinske jezgre, te položajima 2 i 5(6) purinskog izostera benzimidazola (slika 42).



Slika 42. Općeniti prikaz spojeva priređenih u doktorskom radu.

Osnovni je cilj ovog rada sinteza novih biološki aktivnih spojeva koji sadrže farmakoforne *N*-heterocikle, poput povlaštenih struktura (eng. *privileged scaffold*) purina i benzimidazola, i 1,2,3-triazolni prsten u svrhu pronalaženja predvodnih spojeva s izraženim i selektivnim antitumorskim djelovanjem. Spojevi s najizraženijim antiproliferativnim djelovanjem dodatno su biološki ispitani kako bi se utvrdio mehanizam njihovog djelovanja. *In silico* analize također su potvrdile mogućnost stvaranja interakcija sa specifičnim biološkim metama. Prema predviđanjima molekulskog uklapanja (eng. *docking*) dizajnirane su nove strukture s potencijalnim snažnijim djelovanjem na specifičnu metu p38 MAPK i boljim farmakokinetičkim svojstvima (slika 43).

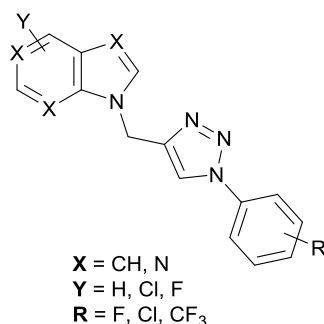
Nadalje, amidino-supstituiranim derivatima benzimidazola ispitane su interakcije s *ctDNA* i RNA polinukleotidima pApU i pCpG. Takvi spojevi, prema literaturnim podacima, uz antitumorsko djelovanje imaju potencijalno antibakterijsko i antitripanosomsko djelovanje, stoga je toj klasi purinskih izostera ispitano i antimikrobno djelovanje (slika 43).



Slika 43. Dijagram tijeka istraživanja u sklopu doktorskog rada.

3.2. Hibridi halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituiranim 1,2,3-triazolima [177]

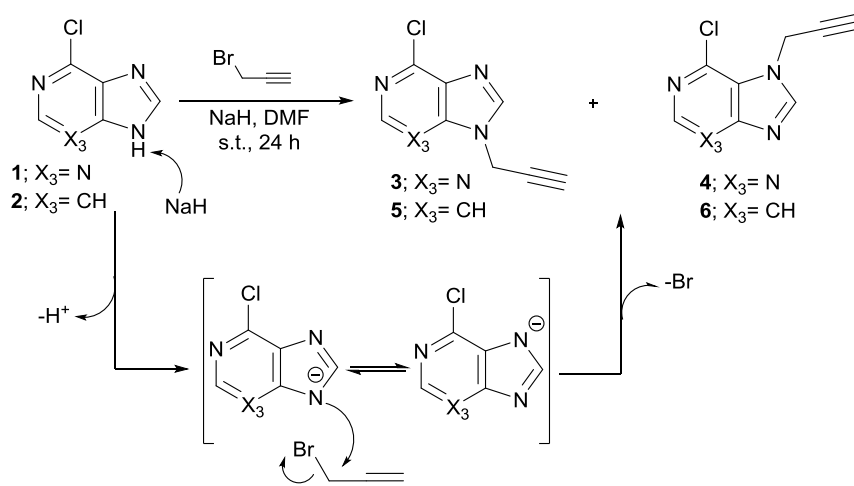
Hibridi purina i pseudopurina: 6-klorpurin, 6-klor-3-deazapurin, 6-klor-7-deazapurin, 7-brom-6-klor-7-deazapurin, 5-fluorindol, indo i benzimidazol s različitim 1-aril-supstituiranim 1,2,3-triazolima priređeni su 1,3-dipolarnom cikloadicijom kataliziranom bakrom(II) (slika 44). Triazolna jezgra je za *N*-heterocikličku bazu vezana preko metilenske prenosnice. Ciljani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli priređeni su Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom. *Click* reakcija provedena je primjenom mikrovalnog zračenja od 400 W, koristeći CuSO₄/Cu(0) sustav za *in situ* pripremu aktivnog Cu(I). Preko triazolnog prstena uvedeni su različiti halogen-supstituirani fenili i 7-hidroksikumarinski supstituenti. Kemijski entiteti u položaju *N*-1 triazolnog prstena, *p*-klorfenil, *p*-fluorfenil, *p*-(trifluormetil)fenil, *o*-fluorfenil i 4-metil-7-hidroksikumarin, odabrani su prema prethodno pripremljenim hybridima *N*-heterocikla poput pirimidina [178], benzotiazola i 5-jodindola s 1,2,3-triazolom koji su pokazali značajno antitumorsko [173] i antibakterijsko djelovanje [179].



Slika 44. Opći prikaz strukture hibrida halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituiranim 1,2,3-triazolima.

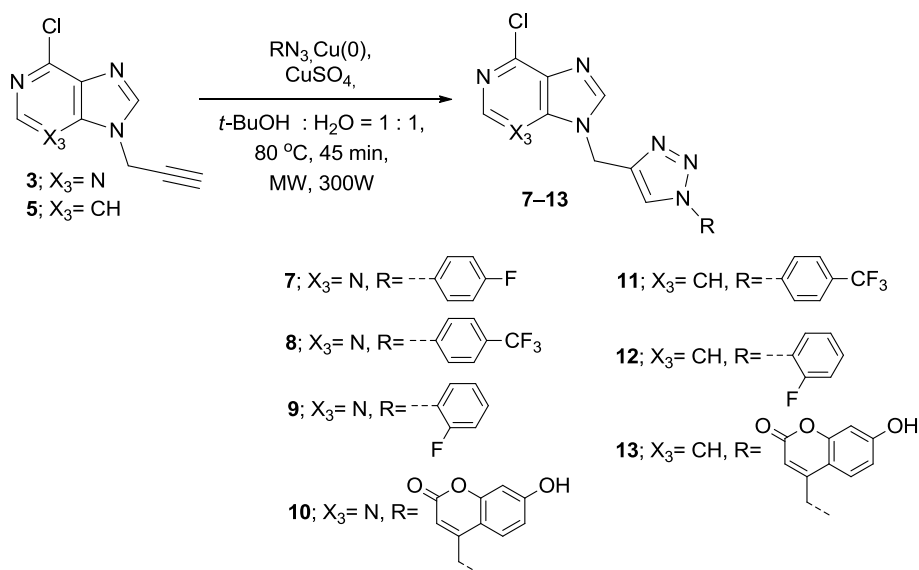
3.2.1. Sinteza hibrida halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituiranim 1,2,3-triazolima

Prvi stupanj u sintezi 6-klorpurinskih i 6-klor-3-deazapurinskih 1,2,3-triazolnih derivata je reakcija *N*-alkiliranja purinske baze s propargilnim bromidom pri čemu nastaju odgovarajući *N*-7 (**4** i **6**) i *N*-9 (**3** i **5**) propargilni regioizomeri (shema 26).



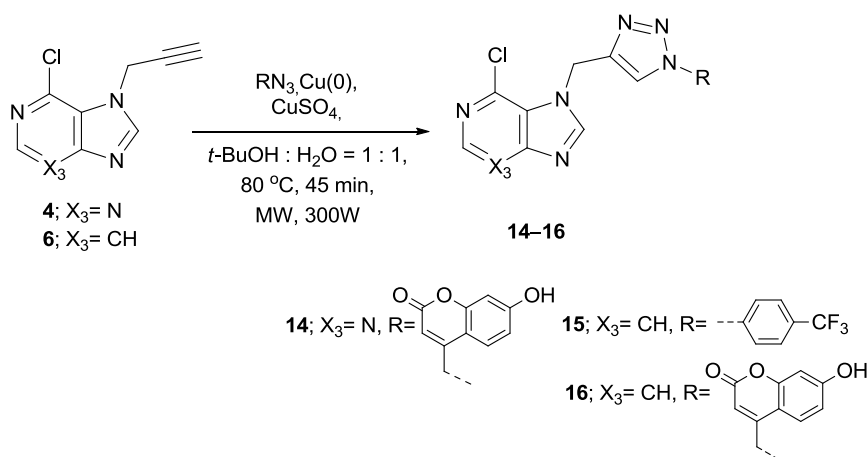
Shema 26. Sinteza *N*-9 i *N*-7 propargiliranih purinskih i 3-deazapurinskih derivata.

1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli *N*-9-propargiliranih purina (**7–10**) i purinskih izostera (**11–13**) priređeni su Cu(I)-kataliziranom *click* reakcijom potpomognutom mikrovalnim zračenjem (shema 27). Reakcija je provedena sa svim odabranim organskim azidima, te su u položaj *N*-9 6-klorpurinske baze uspješno uvedeni *p*-fluorfenilni (**7**), *p*-trifluorfenilni (**8**), *o*-fluorfenilni (**9**) i 7-hidoksikumarinski (**10**) supstituenti preko 1,2,3-triazolnog prstena, dok su u reakciji s 6-klor-3-deazapurinskim derivatom **5** uvedene *p*-trifluorfenilna (**11**), *o*-fluorfenilna (**12**) i 7-hidoksikumarinska (**13**) jezgra na *N*-1 položaj triazolnog prstena.



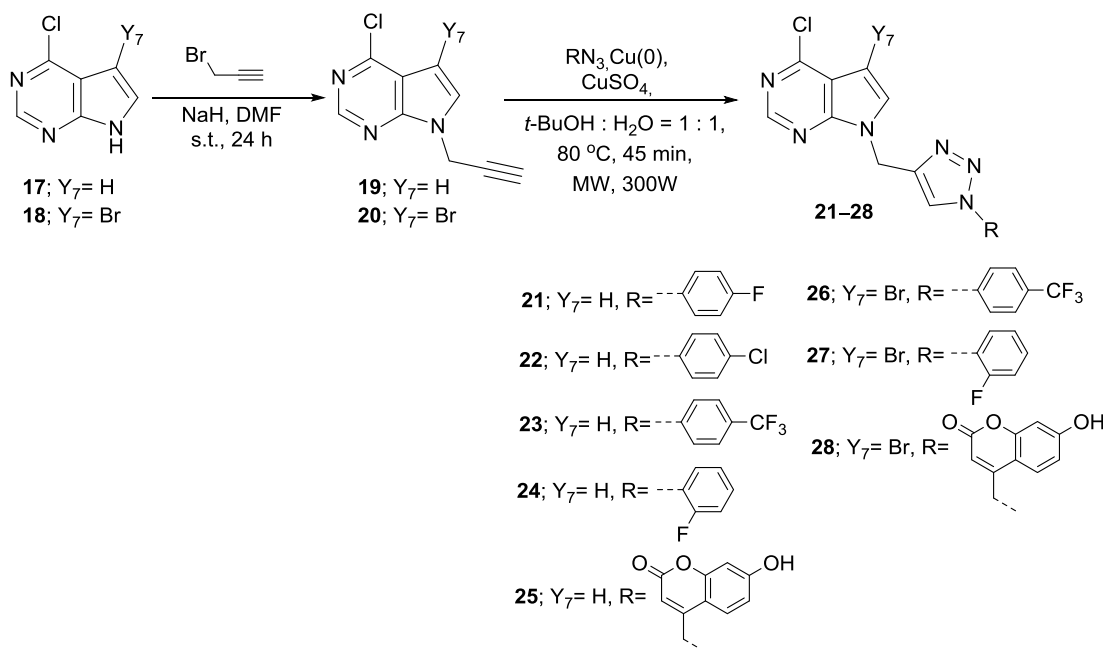
Shema 27. Sinteza hibrida purina i 3-deazapurina s 1,2,3-triazolom u položaju N-9.

Reaktivnost *N*-7-propargiliranih purina **4** i **6** u *click* reakciji s odgovarajućim azidima je znatno slabija u odnosu na njihove *N*-9-regioizomere **3** i **5**. U reakciji s 6-klorpurinskim derivatom **4** dobiven je samo ciljani produkt **14** s 7-hidroksikumarinskim supstituentom, dok su s 6-klor-3-deazapurinskim derivatom **6** uspješno izolirani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati s *p*-trifluorfenilnim (**15**) i 7-hidroksikumarinskim (**16**) supstituentima na triazolnom prstenu (shema 28).



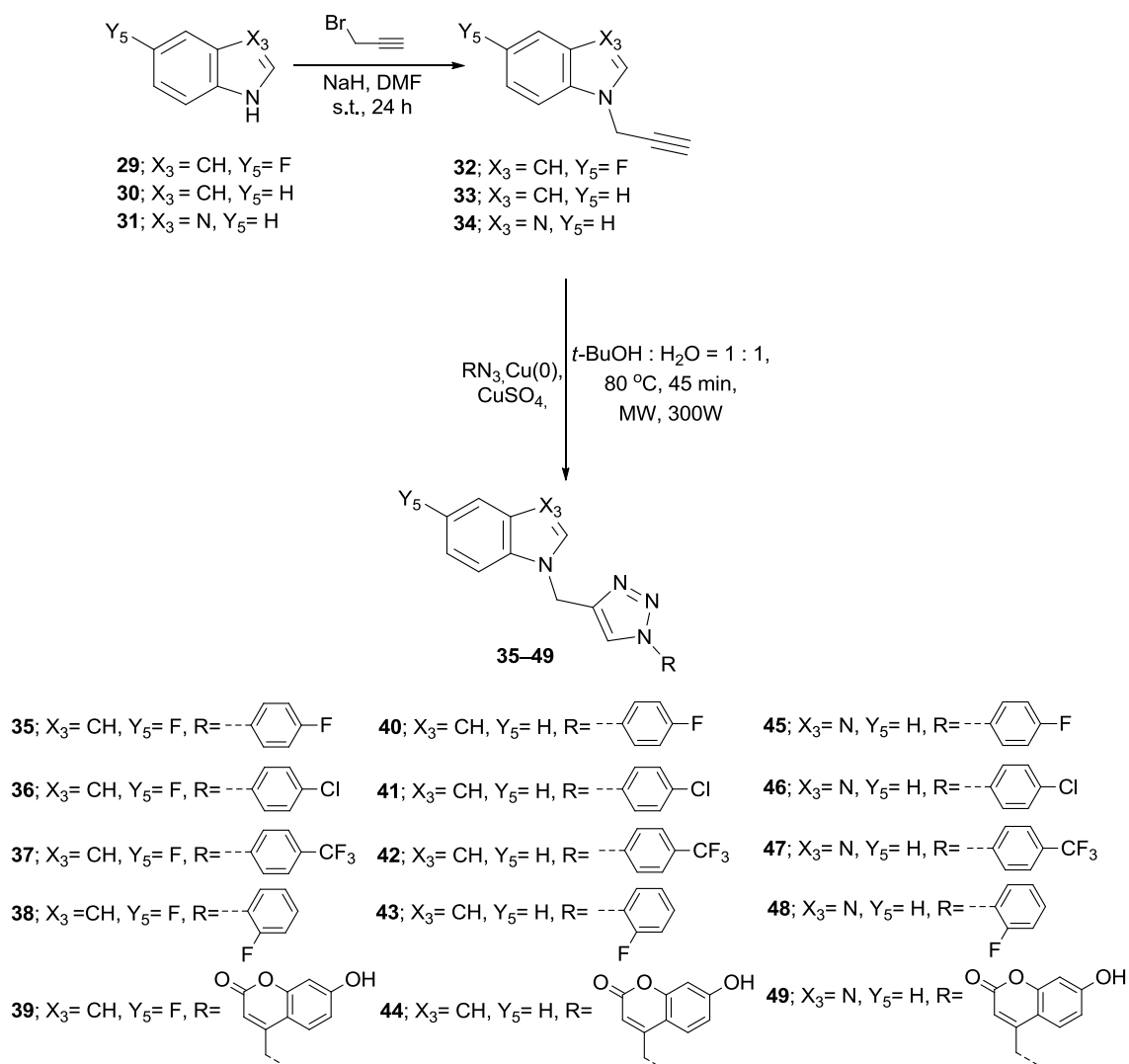
Shema 28. Sinteza hibrida purina i 3-deazapurina s 1,2,3-triazolom u položaju N-7.

Sinteza 6-klor-7-deazapurinskih 1,2,3-triazolnih derivata **21–28** prikazana je na shemi 29. Nukleofilnom supstitucijom s NaH kao deprotonirajućim sredstvom, nastaju propargilirani prekursori 6-klor-7-deazapurina (**19**) i 7-brom-6-klor-7-deazapurina (**20**), koji zatim s odgovarajućim halo-supstituiranim fenilnim azidima i 4-azidometil-7-hidroksikumarinom daju odgovarajuće 6-klor-7-deazapurinske triazolne derivate (**21–25**) i 7-brom-6-klor-7-deazapurinske derivate (**26–28**). Brom u položaju C-7 deazapurinskog prstena smanjuje reaktivnost 7-deazapurinske baze u *click* reakciji s odabranim organskim azidima.



Shema 29. Sinteza hibrida 7-deazapurina s 1,2,3-triazolom.

Sinteza hibrida nepolarnih purinskih izostera 5-fluorindola (**35–39**), indola (**40–44**) i benzimidazola (**45–49**) s 1,2,3-triazolom prikazana je na shemi 30. *Click* reakcijom potpomognutom mikrovalnim zračenjem odgovarajućih *N*-heterocikličkih terminalnih alkina (**32–34**) s odabranim organskim azidima priređeni su svi ciljani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati (**35–49**) u dobrom iskorištenju.

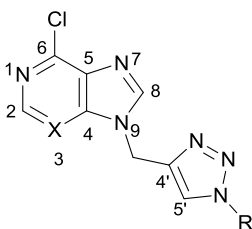


Shema 30. Sinteza 1,2,3-triazolnih derivata indola i benzimidazola.

3.2.2. Analiza NMR spektara *N*-7 i *N*-9 izomera halogeniranih derivata 6-klorpurina i 6-klor-3-deazapurina

Strukture novih purinskih izostera potvrđene su 1D i 2D NMR spektroskopijom. H2 i H3 protoni 1*H*-imidazo[4,5-*c*]piridina (3-deazapurina) u regioizomerima **11**, **15**, **13** i **16** pokazuju karakteristične kemijske pomake između 8,14–8,17 i 7,70–7,79 ppm u ¹H NMR spektru (tablica 1). Nadalje, *N*-7 regioizomeri **14**, **15** i **16** pokazuju veću vrijednost kemijskih pomaka za atom H-8 (δ_{H} 8,73–8,96 ppm) u usporedbi s *N*-9 regioizomerima **10**, **11** i **13** (δ_{H} 8,58–8,81 ppm).

Tablica 1. Kemijski pomaci protona *N*-7 i *N*-9 regioizomera spojeva **10**, **11**, **13**–**16** u spektrima ¹H NMR.



Spoj	¹ H NMR (δ /ppm)				
	H2	H3	H8	CH ₂	H5'
10	8,77	-	8,81	5,66	8,31
14	8,81	-	8,97	5,85	8,30
11	8,17	7,72	8,63	5,77	8,72
15	8,16	7,76	8,76	5,97	8,98
13	8,14	7,70	8,58	5,69	8,31
16	8,15	7,74	8,73	5,86	8,25

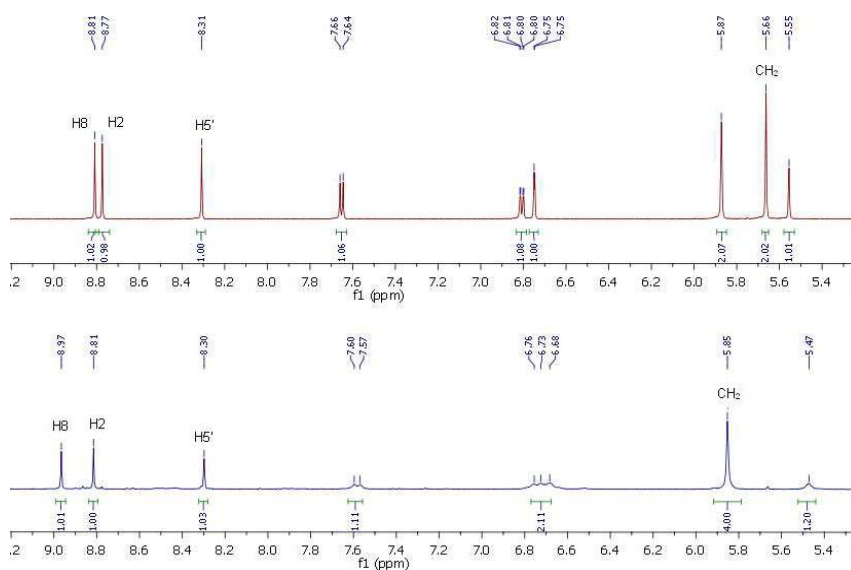
N-7 i *N*-9 regioizomeri nedvojbeno se razlikuju u kemijskim pomacima u ¹³C NMR spektrima i korelacijskim signalima dugog raspona promatranih u HMBC spektrima (tablica 2, slika p-1, prilog 1). *N*-7 regioizomeri pokazali su u ¹³C-NMR spektru kemijski pomak za C4 atom oko δ_{C} 150–151 ppm u 3-dezapurinskim derivatima **15** i **16** i δ_{C} 162 ppm u purinskom derivatu **14**, dok je kod *N*-9 regioizomera **11** i **13** taj pomak oko 140 ppm, odnosno 155 ppm za spoj **10**. Dodatno, atomi C5 opaženi su kod *N*-7 regioizomera **15** i **16** na δ_{C} 127–128 ppm i regioizomera **14** na 122 ppm, dok je pomak kod njihovih odgovarajućih *N*-9 regioizomera **11** i **13** na 137 ppm tj. 151 ppm za **10**. *N*-7 regioizomeri potvrđeni su i korelacijskim signalima dugog raspona između protona metilenske skupine (7,7–6,0 ppm) i atoma C5 (slika 45), dok su protoni metilenske skupine *N*-9 regioizomera pokazali korelacijski signal s atomom C4.

Tablica 2. Kemijski pomaci za C-atome *N*-7 i *N*-9 regioizomerima spojeva **10**, **11**, **13**–**16**.

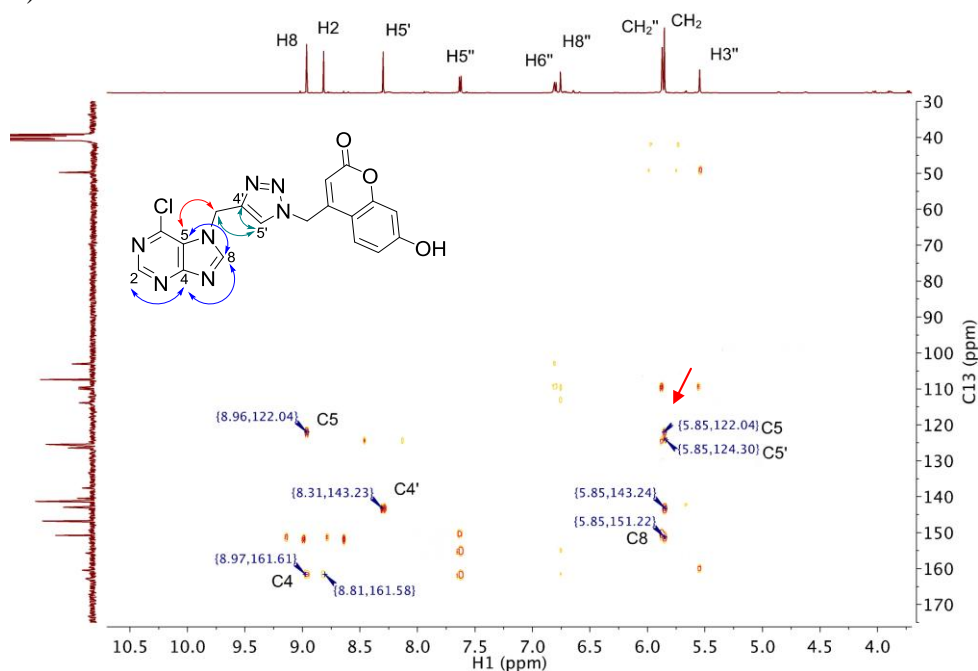
Spoj	¹³ C NMR (δ ppm)								
	C2	C3	C4	C5	C6	C8	CH2	C4'	C5'
10	151,8	-	154,9	151,2	150,5	^a	38,9	142,4	125,1
14	151,8	-	161,6	122,1	^a	151,1	42,0	143,3	124,4
11	141,0	107,1	137,1	136,3	140,1	146,4	38,9	142,6	126,0
15	140,7	114,9	151,0	127,2	132,9	149,3	41,3	144,8	121,8
13	140,8	106,9	140,0	137,1	140,9	146,3	40,1	142,4	124,9
16	140,7	114,9	150,4	127,5	133,2	^a	41,5	143,8	124,2

^apomaci nisu određeni.

a)



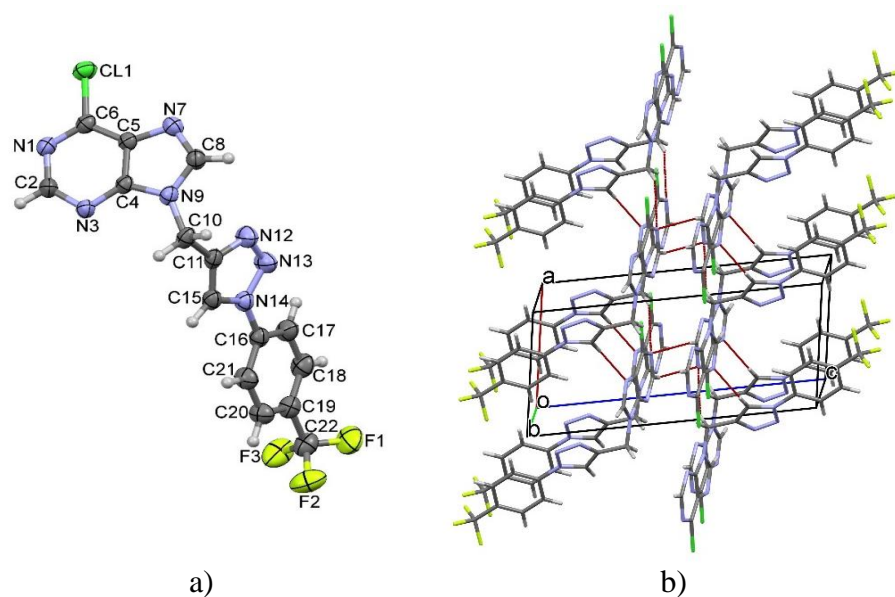
b)

Slika 45. ¹H NMR spektar za spoj **10** (crveno) i spoj **14** (plavo) (a); HMBC NMR spektar za spoj **14** (b).

3.2.3. Kristalna struktura hibrida 6-klorpurina (**8**) i 6-klor-3-deazapurina (**12**)

Struktura spojeva **8** i **12** dodatno je potvrđena rentgenskom strukturnom analizom. U spojevima **8** i **12**, 6-klorpurinski i 6-klor-3-deazapurinski prstenovi povezani su s 1,2,3-triazolnim prstenom preko metilenske skupine (slike 46 i 47), dok je na triazolni prsten izravno vezan fenilni s dva različita supstituenta: *p*-trifluorometilnom skupinom u spoju **8** i u spoju **12** s fluorom u *ortho* položaju.

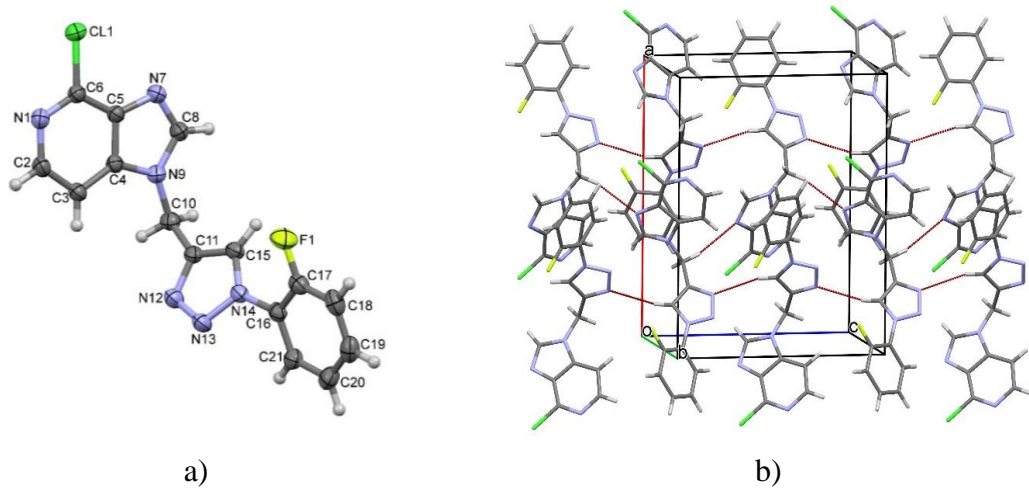
Duljina veze i vezni kutovi u skladu su s uobičajenim vrijednostima i približno su jednaki u zajedničkim dijelovima molekula. Međutim, 1,2,3-triazolni prsten u spojevima **8** i **12** ima različitu orijentaciju u odnosu na 6-klorpurinski, odnosno 6-klor-3-deazapurinski prsten. Naime, triazolni prstenovi su u strukturama ova dva spoja zaokrenuti oko veze C10–C11 za približno 180° (slike 46a i 47a). Diedarski kut između ravnina triazolnog i fenilnog prstena u strukturi spoja **8** iznosi 15,04(19)°, dok je fenilni prsten u spoju **12** pod kutem od 41,85(16)° u odnosu na triazolni prsten. Ovakav drugačiji položaj dvaju prstenova je steričke prirode, odnosno posljedica prisutnosti atoma fluora u *ortho* položaju fenilnog prstena u spoju **12**.



Slika 46. Molekulska struktura (a) i kristalno pakiranje (b) spoja **8**.

Samo tri slabe C–H⋯N vodikove veze sudjeluju u supramolekulskom udruživanju spoja **8**. Jedna vodikova veza C–H⋯N stvara centrosimetrični dimer preko šesteročlanog prstena. Druge dvije C–H⋯N vodikove veze povezuju molekule u lance te time zajedno s prethodnom stvaraju dvodimenzijsku mrežu (slika 46b).

U izgradnji supramolekulske strukture spoja **12** sudjeluju samo dvije slabe vodikove veze C–H···N pri čemu obje stvaraju motiv lanca, ali kao i u strukturi spoja **8** povezuju molekule u dvodimenzijisku mrežu (slika 47b).



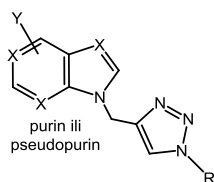
Slika 47. Molekulska struktura (a) i kristalno pakiranje (b) spoja **12**.

3.2.4. Biološka ispitivanja halogeniranih derivata purina i purinskih izostera

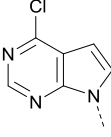
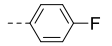
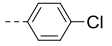
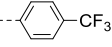
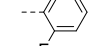
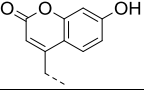
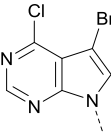
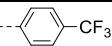
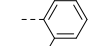
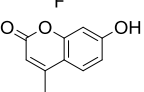
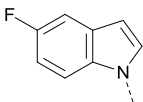
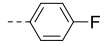
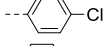
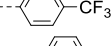
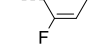
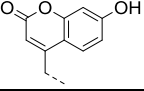
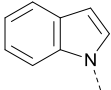
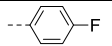
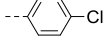
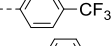
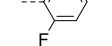
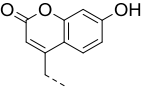
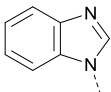
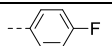
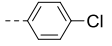
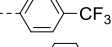
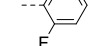
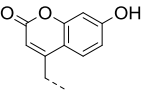
3.2.4.1. Antiproliferativna ispitivanja hibrida halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituuiranim 1,2,3-triazolima

Antiproliferativno djelovanje hibrida halogeniranih derivata purina i purinskih izostera (7–16, 21–28 i 35–49) ispitano je na četiri stanične linije humanih karcinoma: adenokarcinom pluća ne-malih stanica (A549), adenokarcinom gušterače (CFPAC-1), karcinom vrata maternice (HeLa) i metastatski kolorektalni adenokarcinom (SW620) kao i na normalne ljudske plućne fibroblaste (WI38) ili fibroblaste ljudskog prepucija (HFF-1). Rezultati ispitivanja prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Antiproliferativno djelovanje hibrida halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituuiranim 1,2,3-triazolima.



Spoj	Purinska baza	R	IC ₅₀ ^a (μM)				
			A549	CFPAC-1	HeLa	SW620	WI38/HFF-1 ^b
7			53,2	33,4	34,2	38,9	5,2
8			15,9	7,9	12,3	14,7	0,75
9			54,6	31,1	33,2	41,6	23,9
10			89,0	>100	58,0	92,5	6,6
11			9,4	7,4	22,5	11,8	5,2
12			73,9	>100	>100	90,3	23,9
13			>100	>100	>100	>100	60,5
14			>100	>100	>100	>100	73,6
15			>100	89,2	36,8	69,0	19,4
16			>100	>100	8,8	>100	7,6

Spoj	Purinska baza	R	IC ₅₀ ^a (μM)				
			A549	CFPAC-1	HeLa	SW620	WI38/HFF-1 ^b
21			85,4	48,4	39,4	8,50	32,1
22			64,5	47,7	65,5	44,6	21,0
23			46,9	46,6	38,8	37,1	4,6
24			69,0	35,2	83,3	65,5	22,5
25			69,2	36,3	33,6	73,5	39,9
26			66,4	62,8	32,9	55,7	57,5
27			86,4	65,1	20,0	65,9	48,5
28			45,5	47,3	24,5	45,1	10,8
35			>100	>100	>100	>100	>100
36			40,2	>100	31,0	45,8	58,1
37			71,6	64,7	53,0	54,3	24,0
38			>100	>100	82,92	>100	>100
39			51,9	77,1	47,6	57,6	45,7
40			44,0	>100	>100	43,3	>100 ^b
41			>100	>100	>100	>100	>100 ^b
42			>100	>100	>100	>100	>100 ^b
43			51,3	85,6	71,2	44,8	40,4 ^b
44			75,4	>100	83,0	68,5	40,0 ^b
45			76,3	86,5	71,70	99,9	91,9
46			0,79	52,6	42,17	91,2	38,1
47			14,2	56,4	30,61	>100	>100
48			36,3	34,7	21,9	>100	30,6
49			>100	>100	>100	>100	>100

^a IC₅₀; koncentracija spoja koja inhibira rast stanica za 50 %. ^b spojevi 36–40 ispitani su na HFF-1 staničnim linijama.

Prema dobivenim vrijednostima antiproliferativne aktivnosti priređenih spojeva značajniju antitumorsku aktivnost (IC₅₀ < 10 μM) pokazuju spojevi **8**, **11**, **16**, **21** i **46**. Naj snažnije inhibitorno djelovanje na adenokarcinom gušterače (CFPAC-1) pokazali su 6-klorpurinski (**8**) i 6-klor-3-deazapurinski (**11**) derivati s *p*-trifluorfenilnim supstituentom u

položaju *N*-1 triazola. Oni pokazuju sličnu aktivnost (**8**, $IC_{50} = 7,9 \mu M$ i **9**, $IC_{50} = 7,4 \mu M$), dok odgovarajući *N*-7 regioizomer (**15**, $IC_{50} = 89,2 \mu M$) i 6-klor-7-deazapurinski derivat (**23**, $IC_{50} = 46,6 \mu M$) pokazuju znatno slabije antitumorsko djelovanje. Iz tih vrijednosti se može zaključiti da dušikov atom u položaju 3 purinske baze nije odgovoran za aktivnost tih spojeva na staničnu liniju CFPAC-1, dok dušikov atom u položaju 7 jezgre ima važnu ulogu, te njegovom zamjenom s atomom ugljika dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti. Spojevi **8** i **11** pokazuju neselektivnu aktivnost na ostale tumorske stanične linije i toksičnost na normalne fibroblaste. Uz inhibiciju rasta stanica spojevi **8** i **11** uzrokovali su i staničnu smrt (tablica 4).

Tablica 4. Letalna koncentracija spojeva **8** i **11**.

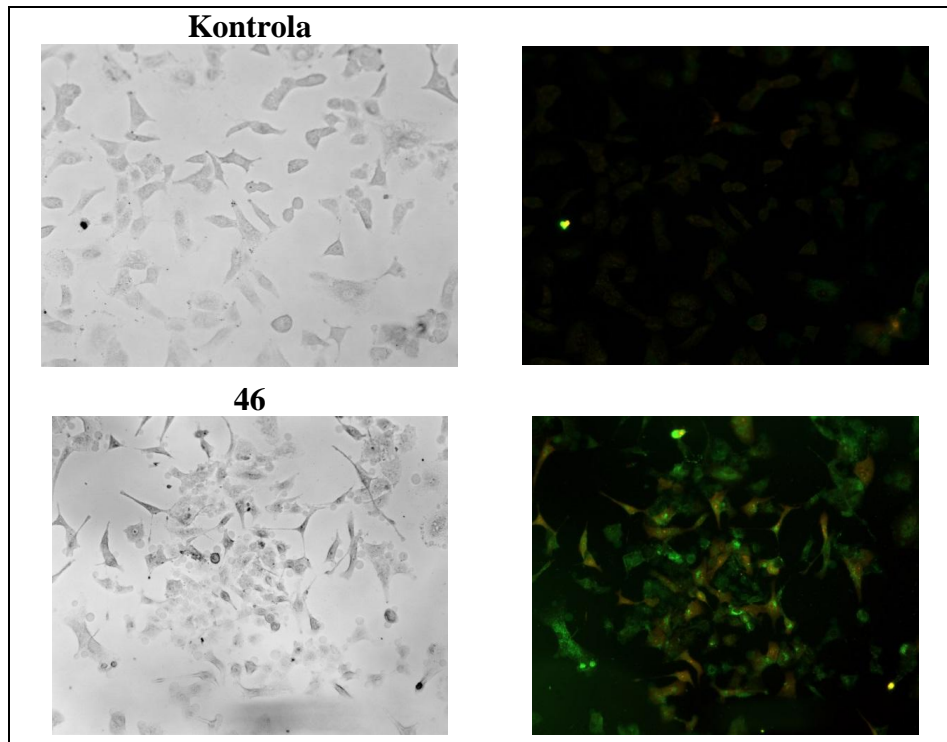
Spoj	LC_{50}^a (μM)				
	A549	CFPAC-1	HeLa	SW620	WI38
8	-	-	78,02	-	-
11	77,10	75,67	79,41	73,40	80,71

^a LC_{50} ; letalna koncentracija spoja potrebna da bi usmrtila 50 % populacije.

N-7 regioizomer 3-deazapurina s kumarinskim prstenom na 1,2,3-triazolu (**16**) pokazao je selektivnu antiproliferativnu aktivnost ($IC_{50} = 8,8 \mu M$) na stanice HeLa, dok njegov *N*-9 analog **13** ne pokazuje antitumorski učinak. Poput spojeva **8** i **11**, spoj **16** također pokazuje snažan toksični učinak na stanice normalnih fibroblasta. 7-deazapurinski analog s *p*-trifluorfenilnim supstituentom na triazolu (**21**) pokazao je inhibitorni učinak na staničnu liniju SW620 ($IC_{50} = 8,5 \mu M$), koji je četiri puta snažniji od učinka na zdrave stanice. Konjugati 7-brom-6-klor-7-deazapurina (**25–28**), 5-fluorindola (**35–39**) i indola (**40–44**) i 1,2,3-triazola ne pokazuju izraženiju antiproliferativnu aktivnost. Najsnažniji i selektivan antiproliferativan učinak na stanice A549 pokazuje benzimidazolni analog s *p*-klorfenil supstituiranim 1,2,3-triazolom **46** ($IC_{50} = 0,79 \mu M$).

3.2.4.2. Analiza apoptoze za spoj **46**

Daljnja biološka ispitivanja provedena su na najaktivnijem spoju **46** kako bi se antitumorski učinak tog spoja na stanice karcinoma pluća (A549) povezao s induciranjem apoptoze. Proveden je Aneksin V test, čiji rezultati su prikazani u tablici 5 i na slici 48. Tretiranje stanica karcinoma pluća sa spojem **46** dovelo je do značajnog smanjenja živih stanica (55,72 %) uz istodobno značajno povećanje rane i kasne apoptoze/nekrotičnih stanica (30,62 % i 19,76 %). Ovi rezultati ukazuju da spoj **46** inducira apoptozu u stanicama A549.



Slika 48. Određivanje apoptoze inducirane spojem **46** u stanicama A549 testom Aneksin V-FITC. Prikazane su slike svijetlih polja (lijevo) i kasno apoptotične/primarno nekrotične stanice (desno).

Tablica 5. Aneksin V test za određivanje apoptoze^a.

A549	Kontrola (%)	46 (%)
Sekundarno nekrotične stanice	0	2,39
Rano apoptotične stanice	0,52	31,14
Žive stanice	99,48	46,71
Kasno apoptotične/ Primarno nekrotične stanice	0	19,76

^a Postotci živih stanica (PI-/Ann V-), rano apoptotičnih stanica (PI-/Ann V+), kasno apoptotičnih/ primarno nekrotičnih stanica (PI+/Ann V+) i sekundarno nekrotičnih stanica (PI+) nakon 48 h tretmana $2 \times IC_{50}$ vrijednosti za spoj 46.

3.2.4.3. Analiza Western blot za spojeve 46 i 21

Daljnja *in silico* analiza predviđanja spektra aktivnosti, PASS (eng. *Prediction of Activity Spectra for Substances*) [180], provedena je kako bi se odredile moguće mete biološke aktivnosti za spojeve koji su pokazali najizraženiju antiproliferativnu aktivnost. Analizom PASS predviđene su glikozilfosfatidilinozitol specifična fosfolipaza D1 (GPLD1) i p38 mitogenom aktivirana proteinska kinaza (p38 MAPK) kao potencijalne mete za spoj 46 (tablica 6). Prema dobivenim t PASS analize kao i literaturnim podacima metodom Western blot ispitan je utjecaj spoja 46 na ekspresiju odabranih enzima u stanicama A549, te spoja 21 u stanicama SW620 (slika 49).

Tablica 6. Biološke mete za spojeve 46 i 21 predviđene *in silico* metodom PASS^a.

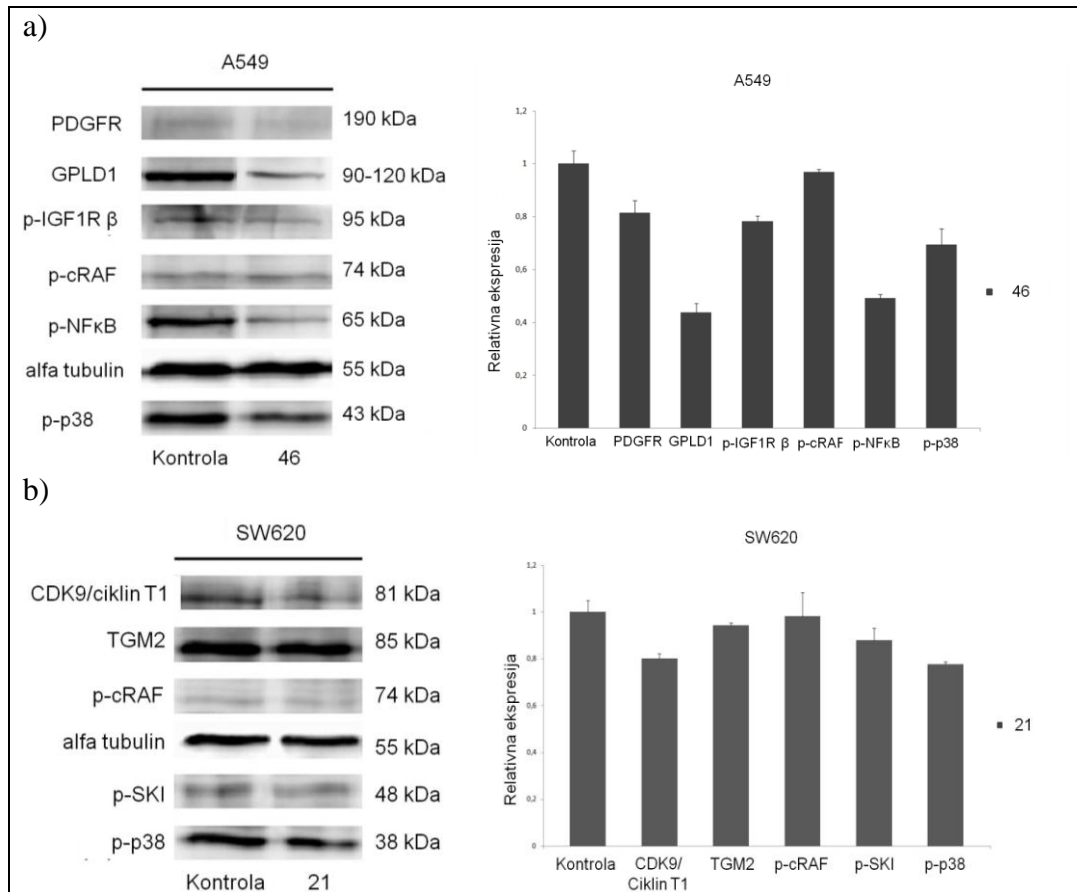
Biološke mete	46		Biološke mete	21	
	Pa	Pi		Pa	Pi
Inhibitor glikozilfosfatidilinozitol fosfolipaze D	0,615	0,060	Inhibitor kinaze MAP	0,202	0,005
Inhibitor kinaze MAP	0,331	0,003	Inhibitor CDK9/ciklin T1	0,257	0,205

^aSpektar aktivnosti koji predviđa PASS prikazan je popisom aktivnosti s vjerojatnostima "aktivnosti" (Pa) i "neaktivnosti" (Pi). Što je veća Pa i manja Pi vrijednost, to je veća vjerojanost predviđene aktivnosti.

Glikozilfosfatidilinozitol (GPI) su proteini koji se nalaze na površini eukariotskih stanica i uključeni su u niz fizioloških funkcija [181]. Njihov utor sadrži modificirani C-terminalni kraj peptida, koji im omogućava funkciju „sidra“ na staničnoj površini u odsutnosti domene transmembranskih proteina. Obitelj proteina GPI obuhvaća više od 150 proteina plazmatske membrane uključenih u različite stanične procese poput proteolize, transmembranske signalizacije i stanične proliferacije. Glikozilfosfatidilinozitol-specifična fosfolipaza D1 (GPLD1) je enzim koji specifično cijepa vezu inozitol-fosfata u proteinima usidrenim fosfatidilinozitolglikanima, čime se otpušta vezani protein iz plazmatske membrane. Prethodna istraživanja su pokazala povezanost ekspresije enzima GPLD1 s progresijom tumora. Rezultati analize Western blot također su pokazali da spoj 46 značajno smanjuje razinu ekspresije proteina GPLD1 u stanicama karcinoma pluća A549, što je ujedno predviđeno PASS analiza (tablica 6, slika 49a).

Ovi rezultati ukazuju da se meta za spoj 46 nalazi na površini stanice i da može djelovati na membransku signalizaciju inducirajući kaskadu procesa koji dovode do inhibicije

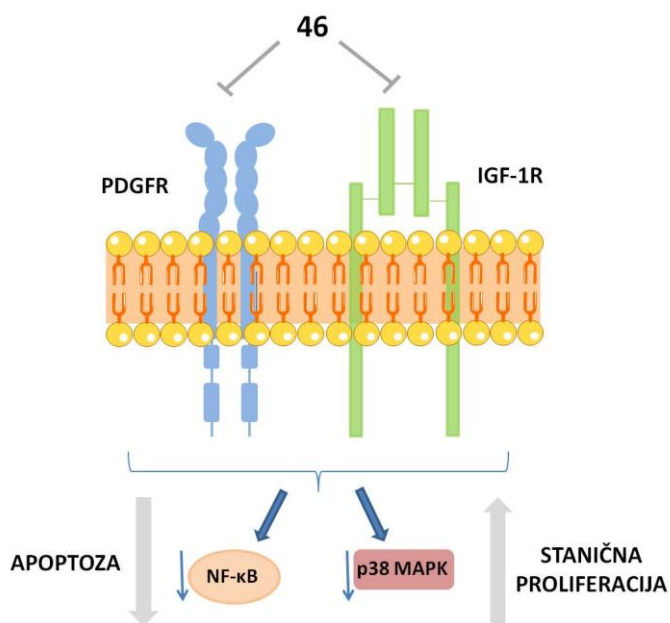
rasta stanice i indukcije apoptoze. Kako bi se dodatno potkrijepila ova hipoteza, ispitano je djelovanje spoja **46** na razinu ekspresije receptora plazmatske membrane, PDGFR (eng. *platelet-derived growth factor receptor*) i IGF-1R (eng. *insulin-like growth factor 1 receptor*). Western blot analizom utvrđeno je da spoj **46** smanjuje ekspresiju PDGFR i p-IGF-1R (slika 49a)



Slika 49. Western blot analiza predviđenih meta za spojeve **46** (a) i **21** (b).

Poremećaj u signalizaciji posredovan ovim receptorima dodatno je potkrijepljen značajnim smanjenjem ekspresije p-NF- κ B (eng. *nuclear factor κ B*), nizvodne mete receptora PDGFR i IGF-1R. NF- κ B je transkripcijski faktor s antiapoptotičkom aktivnošću, što bi moglo objasniti opaženu indukciju apoptoze koju uzrokuje spoj **46** u stanicama A549 (tablica 5, slika 48). Stanice tretirane sa spojem **46** također smanjuju ekspresiju kinaze p38 MAP. Nadalje, iz Western blot analize spoja **21** vidljivo je blago smanjenje ekspresije CDK9 i p38 MAPK (slika 49b).

Na temelju ovih opažanja antiproliferativni učinci spoja **46** mogu se pripisati inhibiciji p38 MAPK. Kako je stimulacija receptora PDGFR i IGF-1R povezana s aktivacijom kinaze p38 MAP, može se pretpostaviti da je inhibicija p38 MAPK posredovana signalizacijom PDGFR i IGF-1R (slika 50).

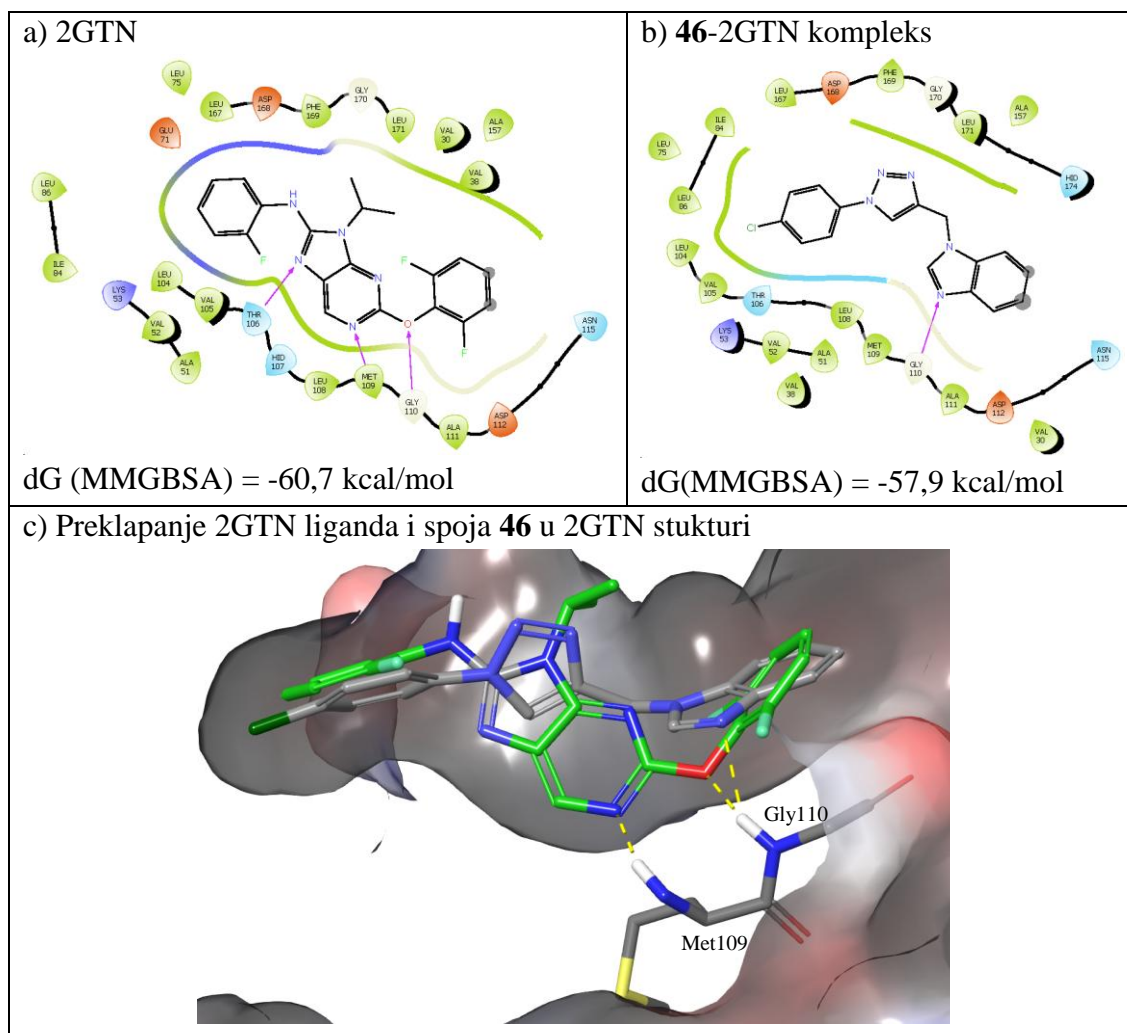


Slika 50. Uočeni antiproliferativni i antiapoptotički učinci spoja **46** u stanicama karcinoma pluća (A549) povezani su s inhibicijom specifičnih membranskih receptora, što rezultira blokiranjem nizvodnog signaliziranja propagiranog pomoću p38 MAPK i NF- κ B.

3.2.5. *In silico* analiza mogućih interakcija spoja 46 s p38 MAPK

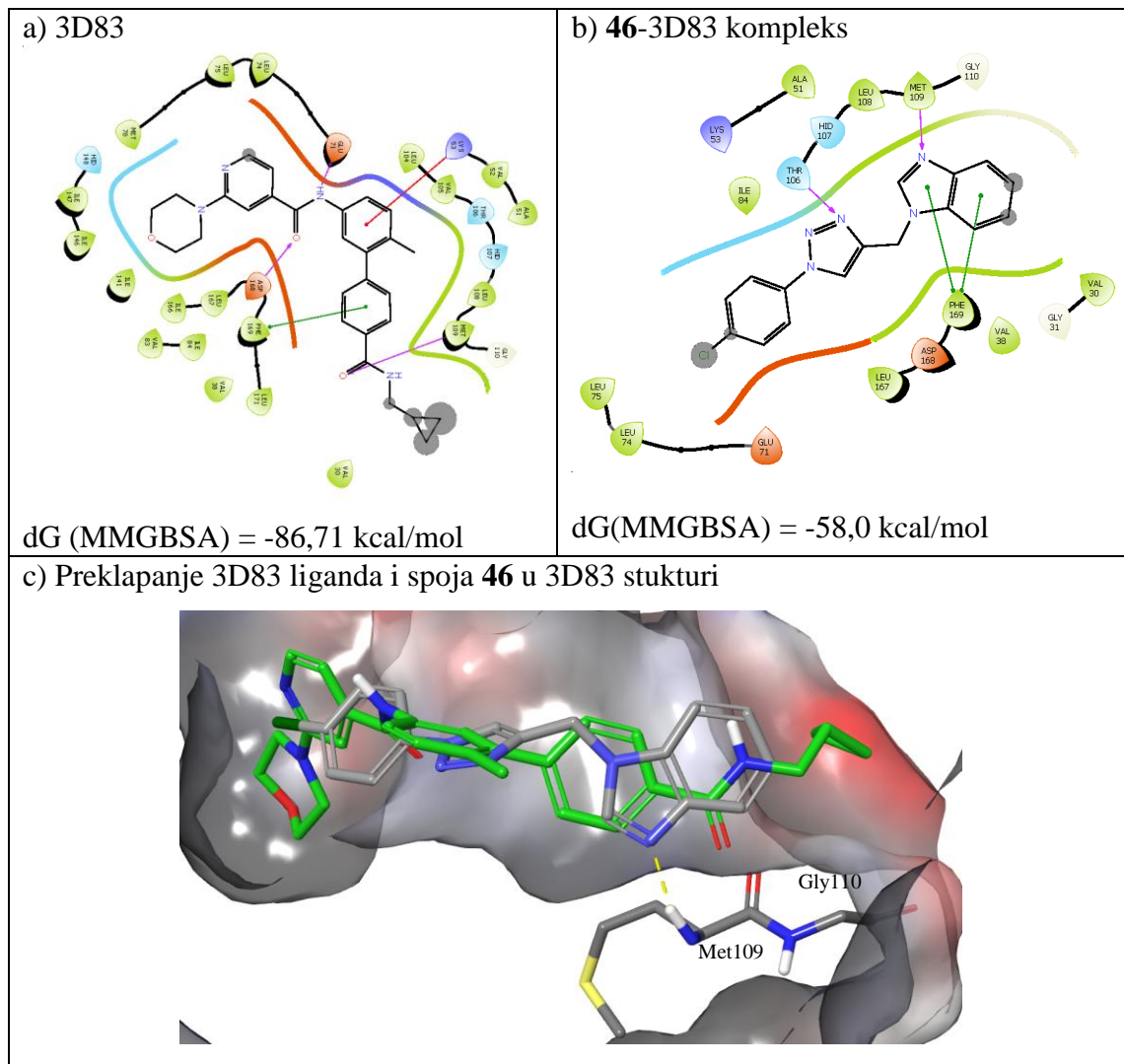
Na temelju rezultata Western blot, koji ukazuju na značajno smanjenje aktivnosti kinaze p38 MAP u prisutnosti spoja **46**, ta je meta odabrana za daljnje *in silico* ispitivanje mogućih interakcija s testiranim spojevima. Molekulsko uklapanje (eng. *docking*) provedeno je upotrebom kompleksa p38 i purinskog inhibitora (pdb: 2GTN) i pirazolopirimidinskog inhibitora (pdb: 3GFE) koji su vezani u *DFG-in* konformaciji enzima i kompleksa p38 s bifenilamidnim inhibitorom (pdb: 3D83) vezanim u *DFG-out* konformaciji enzima. U strukturi 2GTN uočeno je izvrtnje glicina (eng. *Gly flip*) koji bi mogao biti odgovoran za vezanje spoja **46**. Vezujuće konformacije spoja **46** prikupljene su različitim eksperimentima molekuskog uklapanja, a energija vezanja procijenjena je korištenjem metode MM-GBSA (eng. *Molecular Mechanics Generalized Surface Area*), kao što je opisano u eksperimentalnom dijelu. Stabilnost kompleksa spoja **46** s 2GTN i 3D83 je slična, dok su interakcije s 3GFE strukturom nešto slabije (slika p-2, prilog 2).

Energetski najpovoljniji kompleks spoja **46** sa strukturom enzima 2GTN prikazan je na slici 51. Benzimidazolna jezgra stvara vodikovu vezu s Gly110 u području zgloba (eng. *hinge region*), dok je *p*-klorfenilni supstituent vezan za položaj *N*-1 triazolnog prstena smješten u hidrofobno okruženje.



Slika 51. . Interakcije vezanja: 2GTN strukture s purinskim ligandom (a), interakcije spoja **46** u 2GTN proteinskoj strukturi (b), struktura a i b preklapljene unutar aktivnog mjesta (2GTN ligand zelene boje) (c).

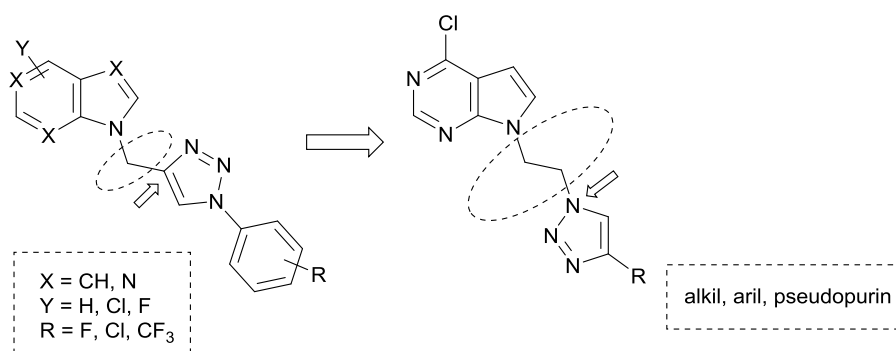
Najstabilnija vezujuća konformacija spoja **46** u usporedbi s ligandom 3D83 prikazana je na slici 52. Benzimidazolna jezgra stvara vodikovu vezu s Met109 u području zgloba i π - π interakcije s Phe169, dok 1,2,3-triazolni prsten stvara vodikovu vezu s Thr106. Korištenjem utvrđene korelacije (poglavlje 3.5.5.) izračunatih ΔG energija i eksperimentalnih aktivnosti, predviđa se da spoj **46** inhibira p38 MAPK s aktivnošću ispod 100 nM.



Slika 52. Interakcije vezanja: 3D83 struktura s purinskim ligandom (a), interakcije spoja **46** u 3D83 proteinskoj strukturi (b), strukture a i b preklapljene unutar aktivnog mjesta (3D83 ligand zelene boje) (c).

3.3. Hibridi mono- i bis-6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom [182]

Daljnje strukturne modifikacije provedene su na 6-klor-7-deazapurinu, te su priređeni mono- i bis-7-deazapurinski derivati s 1,2,3-triazolom. U odnosu na prethodno opisane hibride halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1-aril-supstituiranim 1,2,3-triazolima (sheme 27–30) koji su preko metilenske prenosnice povezivali *N*-heterocikličku bazu za C-4 položaj 1,2,3-triazola, 7-deazapurinska baza je preko etilenske prenosnice uvedena na *N*-1 položaj triazolnog prstena (slika 53). Nadalje, heterociklički dimeri opisani u literaturnom pregledu [101, 102, 113, 114] pokazali su značajnu antiproliferativnu aktivnost, stoga su pripremljeni nesimetrični bis-pseudopurini vezani preko 1,2,3-triazola, kao i simetrični bis-7-deazapurinski derivati.

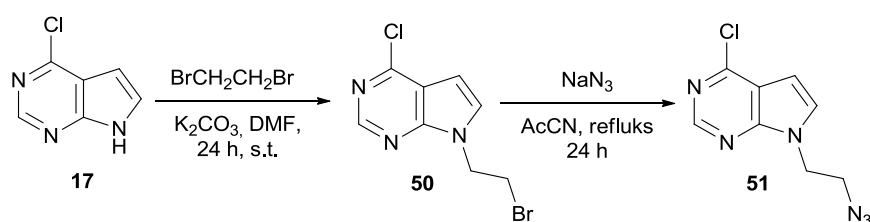


Slika 53. Opći prikaz hibrida mono- i bis-7-deazapurina s C-4 supstituiranim 1,2,3-triazolom.

1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli pripremljeni su Cu(I)-kataliziranom 1,3-dipolarnom cikloadicijom potpomognutom mikrovalnim zračenjem u smjesi vode i organskog otapala. Aktivni Cu(I) dobiven je *in situ* iz bakrovog(II) sulfata i elementarnog bakra. Preko triazola uvedeni su alkilni, različito supstituirani fenilni i fenilsulfonamidni farmakofori kako bi se mogao odrediti utjecaj različitih supstituenata na antiproliferativnu aktivnost.

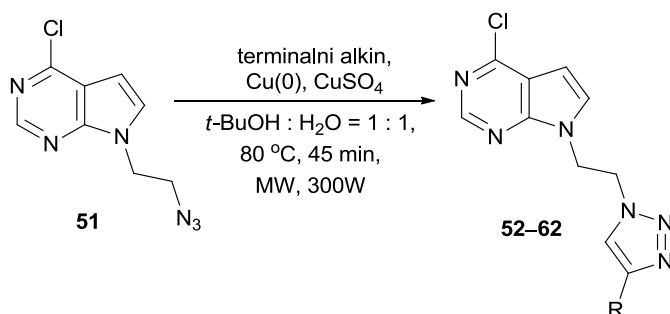
3.3.1. Sinteza hibrida mono- i bis-6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom

Kako bi se priredili 7-deazapurinski derivati vezani za *N*-1 položaj 1,2,3-triazola priređen je *N*-9-azidoetilni 7-deazapurinski prekursor **51**. U prvom stupnju *N*-alkiliranjem pirolo[2,3-*d*]pirimidina **17** s dibrometanom u prisutnosti baze K₂CO₃ sintetiziran je brometilni derivat **50**. Spoj **50** je zatim nukleofilnom supstitucijom s natrijevim azidom preveden u derivat **51**. Supstitucija je uspješno provedena u acetonitrilu i acetonu, dok korištenjem DMF-a kao otapala nije priređen željeni azidni derivat **51** (shema 31).



Shema 31. Sinteza *N*-9-azidoetil-6-klor-7-deazapurina.

Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom azidnog derivata **51** i odgovarajućih terminalnih alkina priređeni su 4-alkil- (**52** i **53**), 4-aril- (**54–59**) i 4-arilsulfonamid-supstituirani (**60–62**) 1,2,3-triazolni pirolo[2,3-*d*]pirimidinski hibridi (shema 32).

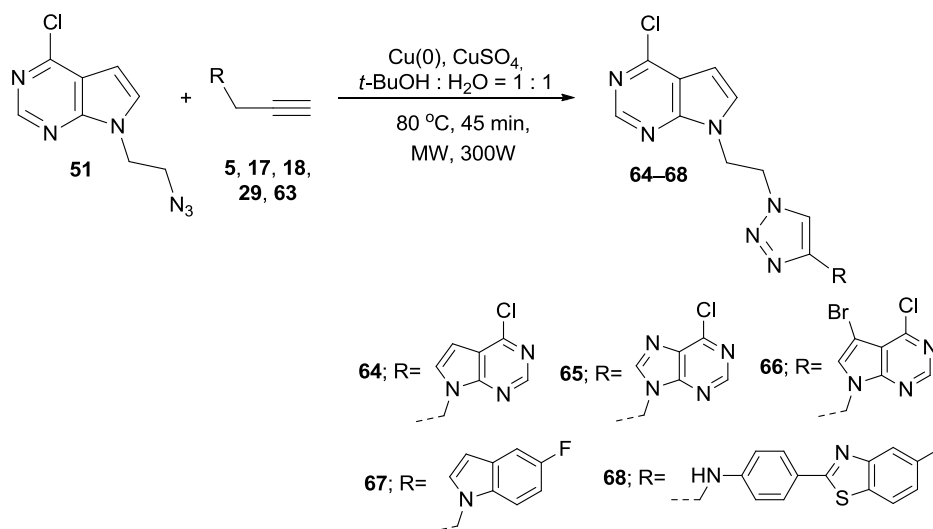


Spoj	52	53	54	55	56	57
R	---(CH ₂) ₇ CH ₃	---(CH ₂) ₃ Cl	---	---	---	---

Spoj	58	59	60	61	62
R	------(CH ₂) ₄ CH ₃	------O(CH ₂) ₄ CH ₃	---	---	---

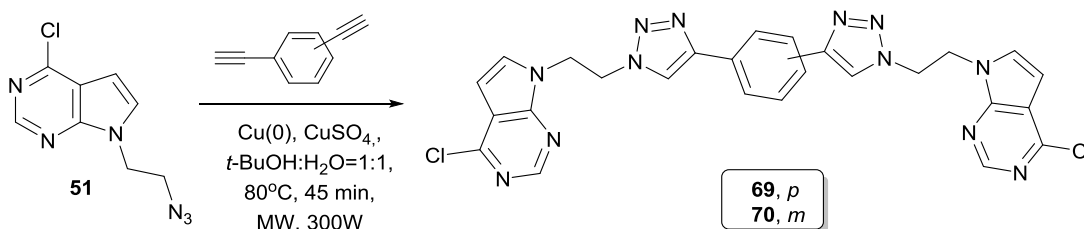
Shema 32. Sinteza spojeva **52–62**.

Ciljani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli **52–62** pripremljeni su *click* reakcijom potpomognutom mikrovalovima u dobrom iskorištenju (72–92 %), izuzev oktil- (**52**) i toлил- (**54**) supstituiranih triazola, koji su dobiveni u iskorištenju 26 % i 31 %. Reakcija je provedena 45 minuta, a kao katalitički sustav korišten je CuSO₄/Cu(0). Nadalje, reakcijom azidnog derivata **51** s *N*-propargiliranim pseudopurinima **5**, **17**, **18**, **29** i 5-metilbenzotiazolom (**63**) [179] pod istim uvjetima sintetizirani su nesimetrični bis-pseudopurinski hibridi **64–68** u iskorištenju od 77–98 %, dok je spoj **67** dobiven u nešto slabijem iskorištenju od 38 % (shema 33).



Shema 33. Sinteza nesimetričnih bis-pseudopurinskih hibrida **64–68**.

Simetrični bis-6-klor-7-dezapurinski derivati **69** i **70** povezani *p*- i *m*-fenilenskom premosnicom dobiveni su u *click* reakciji s 1,4- i 1,3-dietinilbenzenima i azidom **51**, prema navedenim uvjetima u iskorištenju 39 % i 81 % (shema 34).

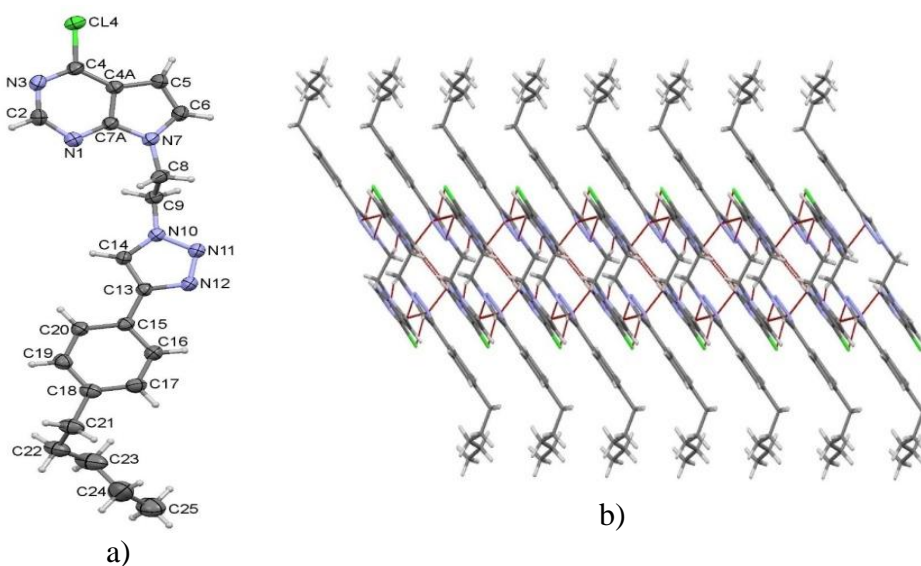


Shema 34. Sinteza simetričnih bis-pseudopurinskih hibrida **69** i **70**.

3.3.2. Kristalna struktura hibrida mono- i bis-6-klor-7-deazapurina **58**, **64** i **65**

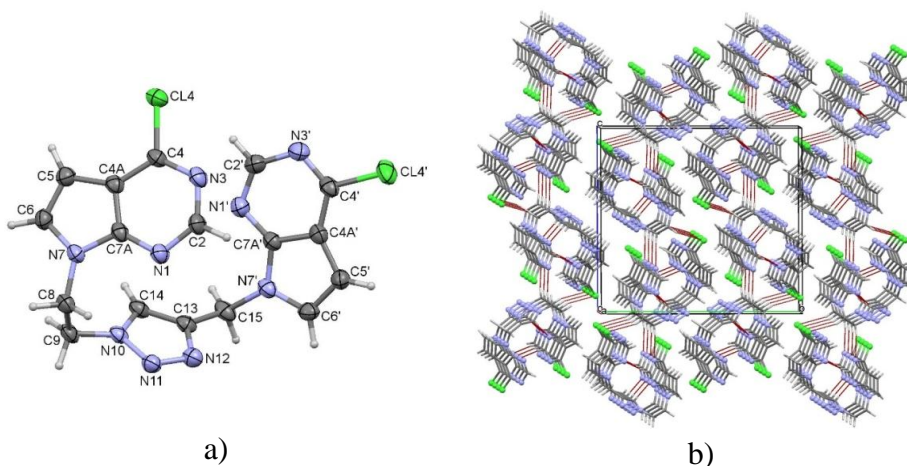
Strukture spojeva **58**, **64** i **65** dodatno su potvrđene rentgenskom strukturnom analizom. U navedena tri spoja 1,2,3-triazolni prsten vezan je na 7-deazapurinski prsten preko etilenske skupine. 1,2,3-triazolni prsten u ova tri spoja ima tri različita supstituenta: *p*-pentilfenilni supstituent u spoju **58** izravno je vezan na triazolni prsten (slika 54a), te 7-deazapurinski i purinski prsten u spojevima **64** i **65** koji su vezani na triazolni prsten preko metilenske skupine (slike 55a i 56a). Iako su duljine veza u tim strukturama vrlo slične, postoje neke konformacijske razlike među njima. Fenilni prsten u spoju **58** koplanaran je s triazolnim prstenom (diedarski kut između ravnina tih dvaju prstenova iznosi $3,93(13)^\circ$), dok je diedarski kut između ravnina 7-deazapurinskog i triazolnog prstena nešto veći ($14,24(11)^\circ$). Nasuprot tome, diedarski kutovi između 7-deazapurinskih prstenova u spoju **64**, kao i purinskog i deazapurinskog prstena u spoju **65** iznose od 40 do 70° . Također, 7-deazapurinski prsten u spoju **64**, u usporedbi sa strukturom spoja **65**, zaokrenut je u odnosu na triazolni prsten oko N7–C8 veze približno za 180° (slike 55a i 56a).

Slabe C–H \cdots N i C–H \cdots Cl vodikove veze sudjeluju u supramolekulskom udruživanju spojeva **58**, **64** i **65**. Tako, u izgradnji supramolekulske strukture spoja **58** sudjeluje šest slabih vodikovih veza C–H \cdots N i jedna vodikova veza C–H \cdots Cl koje stvaraju dvodimenzijsku mrežu (slika 54b). U stvaranju ovakve supramolekulske strukture sudjeluju također dvije $\pi\cdots\pi$ interakcije ostvarene između triazolnih i fenilnih prstenova susjednih molekula.



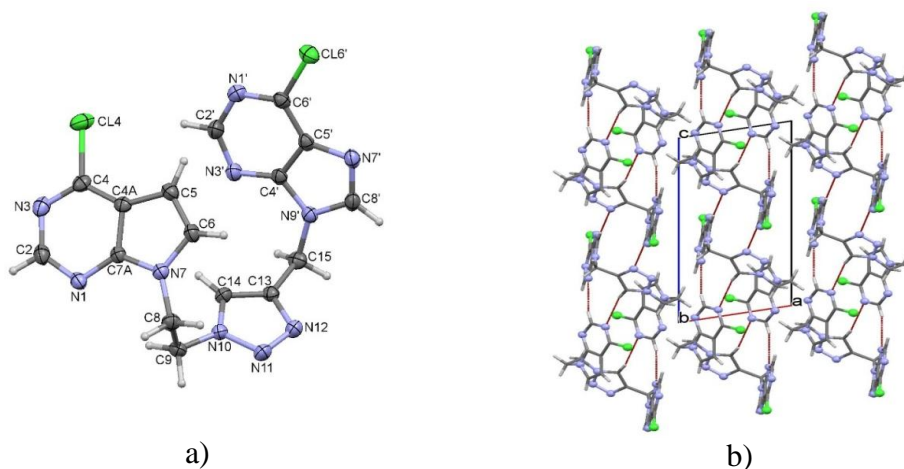
Slika 54. Molekulska struktura (a) i dio kristalne strukture (b) spoja **58**.

Molekule spoja **64** povezane su s tri vodikove veze C–H···N i jednom vodikovom vezom C–H···Cl. Svaka molekula povezana je tim interakcijama na način da stvaraju paralelne lance vodikovih veza. Dijagram kristalnog pakiranja pokazuje da lanci stvaraju međusobno paralelnu dvodimenzijску mrežu (slika 55b).

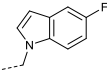
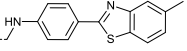
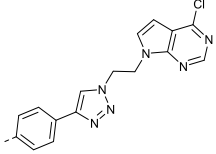
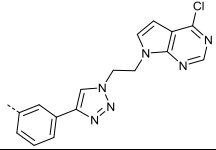


Slika 55. Molekulska struktura (a) i kristalno pakiranje (b) spoja **64**.

Kao i u spoju **64**, svaka molekula spoja **65** povezana je sa susjednim molekulama pomoću tri vodikove veze C–H···N i jedne C–H···Cl. Molekule povezane vodikovim vezama međusobno su paralelne i stvaraju dvodimenzijскую mrežu vrlo sličnu onoj u strukturi spoja **64** (slika 55b). Međutim, postoji jedna razlika između tih dviju supramolekulskih struktura. Šesteročlani N1/C2/N3/C4/C4A/C7A prstenovi susjednih molekula međusobno su paralelni, te tako stvaraju dvije $\pi\cdots\pi$ interakcije. Te dvije interakcije povezuju dvodimenzijске mreže, tako da je konačna supramolekulska struktura spoja **65** trodimenzijская mreža (slika 56b).



Slika 56. Molekulska struktura (a) i kristalna struktura (b) spoja **65**.

Spoj	R	IC ₅₀ ^a (μM)				
		A549	CFPAC-1	HeLa	SW620	WI38
67		75,6	60,6	53,2	75,8	0,13
68		>100	9,8	5,3	36,5	0,80
69		9,4	3,6	7,0	40,8	0,94
70		4,2	0,95	2,3	6,8	0,11
5	-	24,7	25,3	27,2	28,0	

^a IC₅₀; koncentracija spoja koja inhibira rast stanica za 50 %.

Prema dobivenim vrijednostima antiproliferativne aktivnosti priređenih spojeva značajniju antitumorsku aktivnost (IC₅₀ < 10 μM) pokazuju spojevi **58**, **59**, **68–70**. Od 4-alkil i 4-aril C-4 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata 7-deazapurina (**52–62**) aktivnost pokazuju spojevi **58** i **59** s *p*-alkil- i *p*-alkoksifenilnim supstituentima u C-4 položaju 1,2,3-triazola. 7-deazapurinski derivat **58** s 4-(*p*-pentilfenil)-1,2,3-triazolom selektivno inhibira tumorske stanice karcinoma vrata maternice HeLa (IC₅₀ = 9,5 μM), dok njegov analog **59** s *p*-pentoksifenilnim supstituentom u položaju C-4 djeluje neselektivno (CFPAC-1, IC₅₀ = 8,1 μM; HeLa, IC₅₀ = 7,8 μM; SW620, IC₅₀ = 6,9 μM). Među nesimetričnim bis-purinskim izosterima (**64–68**), značajnu inhibitornu aktivnost na tumorsku staničnu liniju HeLa (IC₅₀ = 5,3 μM) pokazuje spoj **68** s 2-aminofenilbenzotiazolnim supstituentom u položaju C-4 triazola. Simetrični bis-6-klor-7-deazapurinski derivati povezani preko 1,4- i 1,3-fenilnih prenosnica, **69** i **70**, najizraženije inhibiraju rast tumorske stanične linije adenokarcinoma gušterače CFPAC-1 (**69**; IC₅₀ = 3,6 μM, **70**; IC₅₀ = 0,95 μM). Spojevi **66** i **70** su, uz inhibiciju rasta stanica, uzrokovali i staničnu smrt (tablica 8).

Tablica 8. Letalna koncentracija spojeva **66** i **70**.

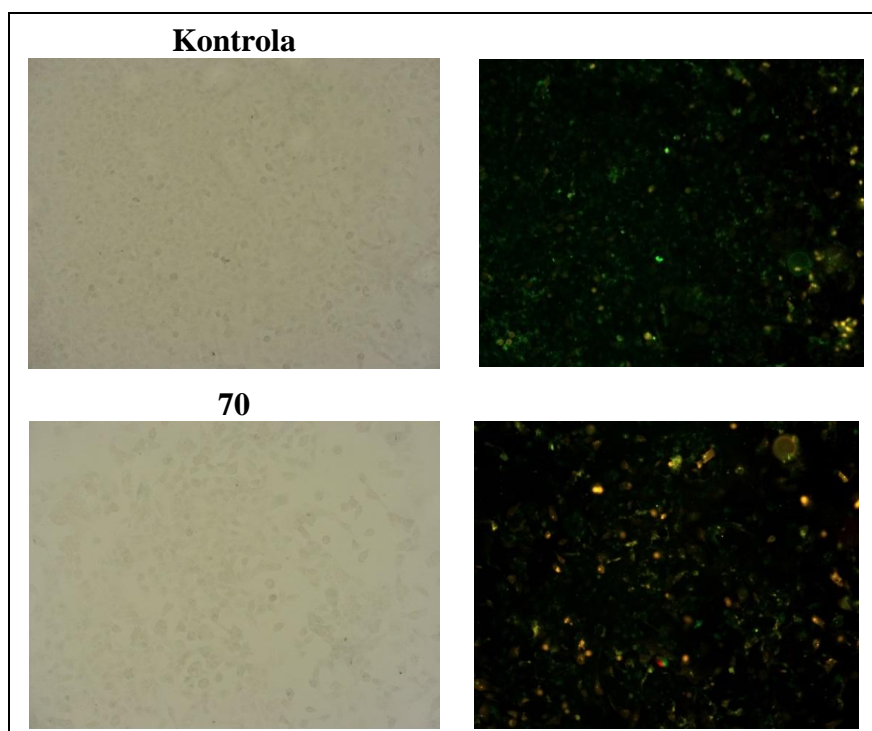
Spoj	LC ₅₀ ^a (μM)				
	A549	CFPAC-1	HeLa	SW620	WI38
66	-	91,3	90,5	99,2	88,0
70	-	86,6	98,0	-	77,0

^a LC₅₀; letalna koncentracija spoja potrebna da bi usmrtila 50 % populacije.

Mono- (**58**) i bis-pseudopurini (**68**) sa selektivnim antitumorskim djelovanjem na stanice HeLa, kao i simetrični bis-pirololo[2,3-*d*]pirimidini (**70**), koji pokazuju snažan citostatski učinak na stanice CFPAC-1 odabrani su kao kandidati za daljnja biološka ispitivanja.

3.3.3.2. Analiza apoptoze za spoj **70**

Aneksin V test proveden je za najaktivniji spoj **70**, koji je pokazao najznačajniju aktivnost na stanice CFPAC-1, kako bi se odredila moguća ovisnost antitumorske aktivnosti o induciranoj apoptozi. Iz dobivenih rezultata (tablica 9 i slika 57) vidljivo je da spoj **70** smanjuje udio živih stanica za 19,48 % i istodobno povećava udio stanica u kasnoj apoptozi/primarnoj nekrozi i sekundarnoj nekrozi za 12,24 % i 10,28 %. Antiproliferativno djelovanje spoja **70** u CFPAC-1 stanicama može se pripisati njegovoj sposobnosti da inducira kasnu apoptozu i nekrozu.



Slika 57. Određivanje apoptoze stanica CFPAC-1 tretiranih sa spojem **70** Aneksin V testom.

Prikazane su slike svijetlih polja (lijevo) i kasno apoptotične/primarno nekrotične stanice (desno).

Tablica 9. Aneksin V test za određivanje apoptoze spoja **70** u stanicama CFPAC-1.^a

CFPAC-1	Kontrola (%)	70 (%)
Sekundarno nekrotične stanica	10,44	20,72
Kasno apoptotične/ primarno nekrotične stanice	5,78	18,02
Žive stanice	78,04	58,56
Rano apoptotične stanice	5,78	2,70

^aUdio živih stanica (PI-/Ann V-), rano apoptotičnih stanica (PI-/Ann V+), kasno apoptotičnih/primarno nekrotičnih stanica (PI+/Ann V+) i sekundarno nekrotičnih stanica (PI+) nakon tretmana CFPAC-1 stanica 48 h s $2 \times IC_{50}$ vrijednosti spoja **70**.

3.3.3.3. Analiza Western blot za hibride mono- i bis-6-klor-7-deazapurina **58**, **68** i **70**

In silico analiza PASS [180] predviđanja spektra aktivnosti provedena je za odabrane kandidate **58**, **68** i **70** kako bi se odredile njihove moguće proteinske mete. PASS analizom je CDK9/ciklin T1 naznačen kao najvjerojatnija meta odabranih spojeva (tablica 10).

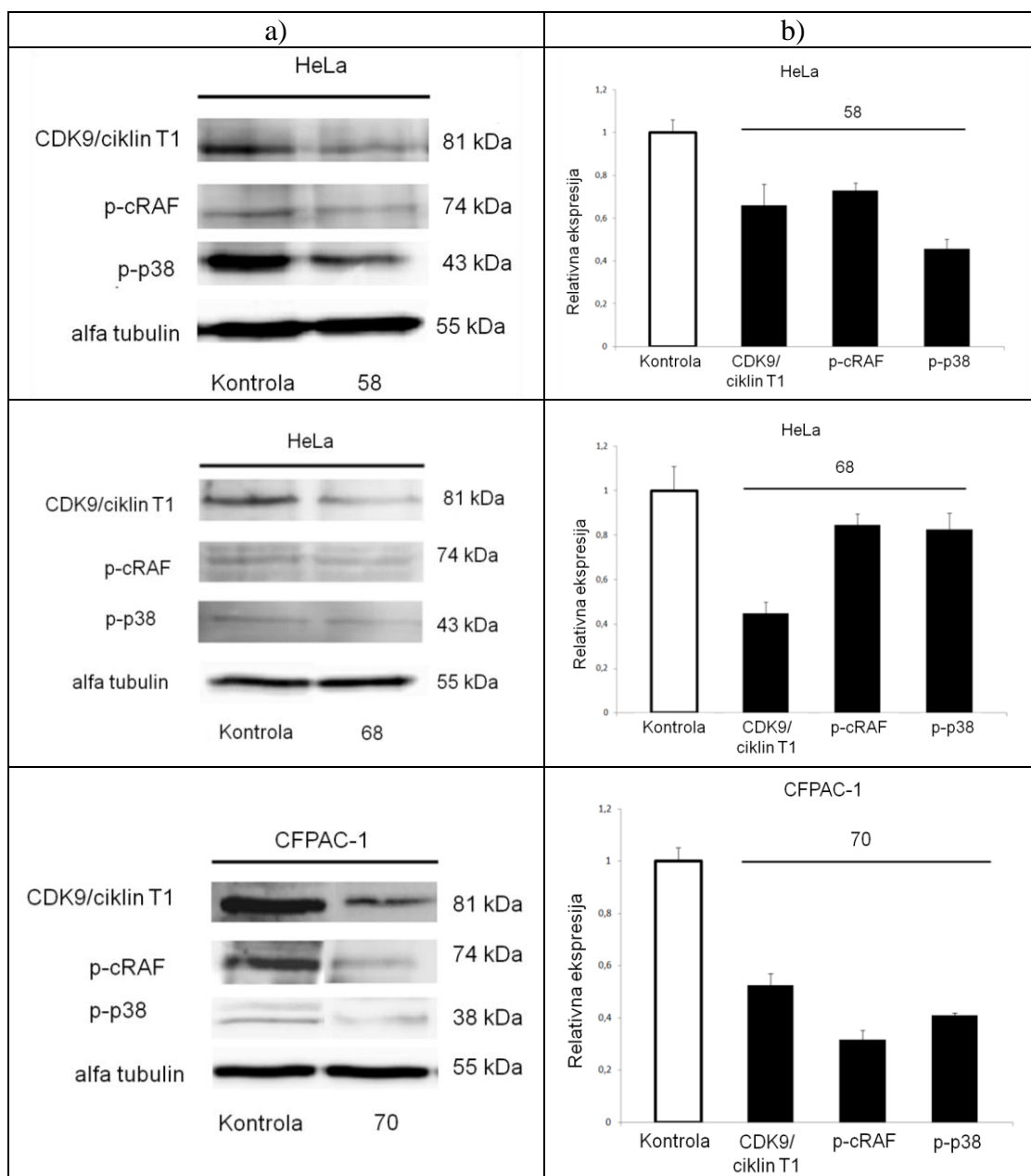
Tablica 10. PASS analiza najvjerojatnijih bioloških meta za spojeve **58**, **68**, **69** i **70**.

Biološke mete	58		68		70	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Inhibitor CDK9/ciklin T1	0,408	0,041	0,414	0,039	0,444	0,028
Inhibitor MAP kinaze	0,081	0,031	0,428	0,003	0,131	0,012
Inhibitor p38 MAP kinaze	0,074	0,062	-	-	0,154	0,021
Antineoplastično djelovanje	0,243	0,191	0,337	0,132	0,440	0,090

Western blot analiza pokazala je da spojevi **68** i **70** značajno smanjuju razine ekspresije CDK9/ciklin T1 u stanicama adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1) i karcinoma vrata maternice (HeLa), dok spoj **58** pokazuje nešto slabije smanjenje ekspresije CDK9/ciklin T1, što ukazuje da spojevi **58**, **68** i **70** pokazuju antitumorski učinak djelujući na CDK9/ciklin T1. Nadalje, istražena je također razina ekspresije mitogenom aktiviranih kinaza p38 MAP i c-Raf, koje su najsrodnije ciklin-ovisnim kinazama (CDK) i koji također reguliraju staničnu proliferaciju. Iz dobivenih rezultata Western blot analize uočeno je da simetrični bis-pirololo[2,3-*d*]pirimidin **68** izaziva značajno smanjenje razine kinaza fosfo-c-Raf i fosfo-p38 MAP, što upućuje na smanjenje njihove aktivnosti (slika 58). Umjerena inhibicija aktivnosti c-Raf također je opažena za mono-pirololo[2,3-*d*]pirimidin **58** i nesimetrični bis-purinski izoster **68**. Spoj **58** značajno smanjuje aktivnosti p38 MAPK u stanicama HeLa.

3. REZULTATI I RASPRAVA

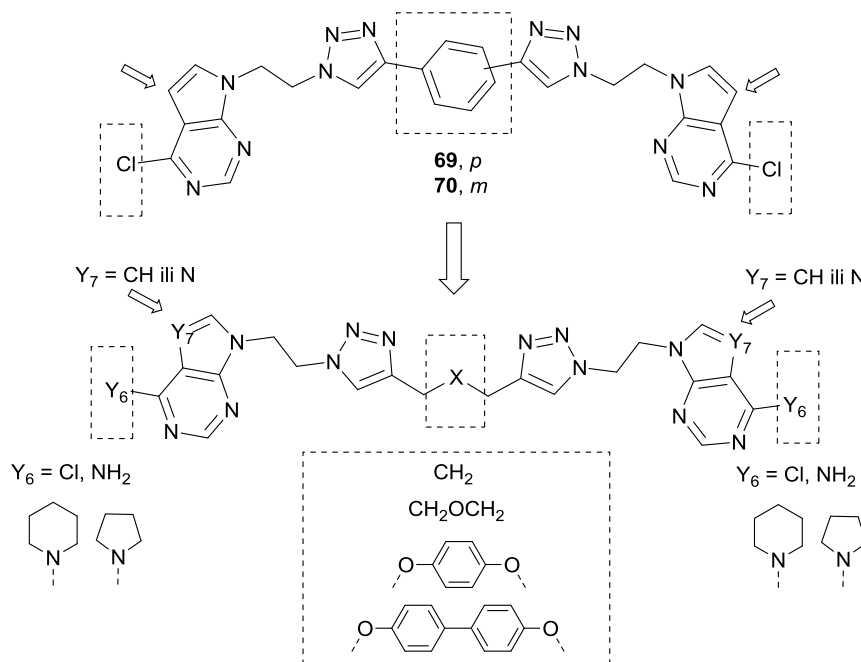
Ove razlike u inhibicijskim učincima na aktivnosti kinaza c-Raf i p38 MAP odabranih spojeva mogu se pripisati supstituentu u položaju C-4 1,2,3-triazolnog prstena. Simetrični bis-pirololo[2,3-*d*]pirimidinski hibrid **70** s najizraženijom ekspresijom kinaza c-Raf i p38 MAP pokazuje ujedno i najsnažniji citostatski učinak. Iz Western blot analize se antiproliferativan učinak spoja **70** u stanicama CFPAC-1 može pripisati inhibiciji CDK9/ciklina T1 i slabljenju onkogenog signala za p38 MAPK i c-Raf.



Slika 58. Rezultati analize Western blot predviđenih meta za spojeve **58**, **68** i **70**.

3.4. Mono- i bis-triazolni 6-supstituirani purini i 7-deazapurini

Iz dobivenih rezultata antiproliferativnog djelovanja hibrida mono- i bis-6-klor-7-deazapurina (tablica 7) vidljivo je da simetrični pirolo[2,3-*d*]pirimidinski dimeri **69** i **70** naj snažnije inhibiraju rast tumorskih stanica, te je priređena serija simetričnih bis-triazolnih dimera 6-supstituiranih 7-deazapurina i purina s različitim alifatskim (propilenskom i dimetileterskom) i aromatskim (*p*-dimetiloksifenilnom i *p*-dimetiloksibifenilnom) premosnicama (slika 59).

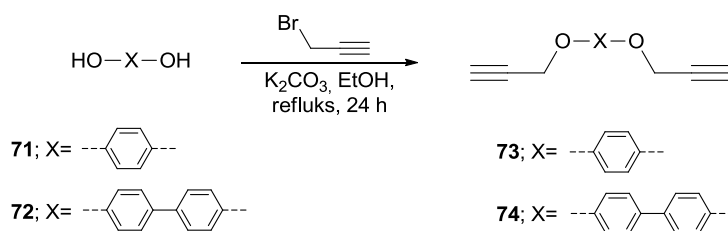


Slika 59. Opći prikaz struktura bis-triazolnih 6-supstituiranih dimera purina i 7-deazapurina.

Ciljani bis-triazolni 6-supstituirani purinski i pirolo[2,3-*d*]pirimidinski dimeri priređeni su Cu(I) kataliziranom *click* reakcijom te su, ovisno o reakcijskim uvjetima, izolirani i odgovarajući mono-supstituirani triazolni derivati. U svrhu optimiranja Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije, *click* reakcija je provedena primjenom različitih sintetskih metoda. Korištenjem različitih Cu(I) soli i izvora energije uspoređeno je vrijeme reakcije, selektivnost i iskorištenje tih reakcija. U metodi A priređen je *in situ* Cu(I) katalizator iz Cu(II)-sulfata i elementarnog bakra u reakcijama potpomognutim ultrazvučnim valovima, dok je metodom B reakcija provedena, korištenjem istog izvora bakra, klasičnom sintezom bez dodatnog izvora energije. U metodi C kao izvor bakra korišten je bakrov(I) jodid, s dodatkom dušikovog liganda *N,N*-diisopropiletilamina i octene kiseline kako bi se ubrzala reakcija i smanjila mogućnost nastanka nusprodukata.

3.4.1. Sinteza mono- i bis-triazonih 6-supstituiranih purina i 7-deazapurina

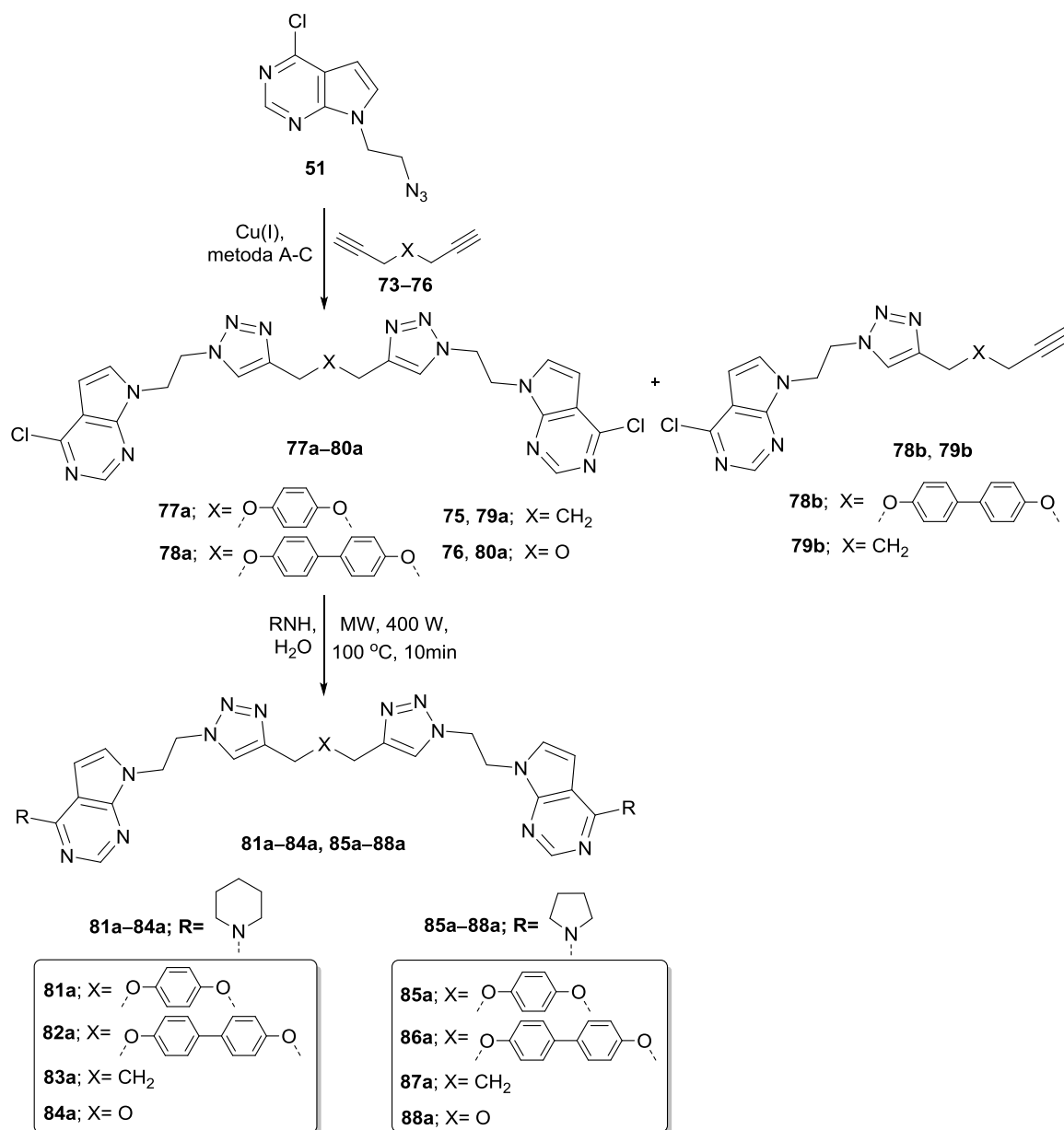
Aromatski terminalni bis-alkini, 1,4-bis(propiniloksi)benzen (**73**) i 4,4'-bis(propiniloksi)-1,1'-bifenil (**74**), priređeni su reakcijom *O*-alkiliranja odgovarajućeg alkohola (**71**, hidrokinon i **72**, 4,4'-bifenol) s propargilnim bromidom u prisutnosti baze (shema 35), dok su alifatski bis-alkini, hepta-1,6-diin (**75**) i propargil-eter (**76**), komercijalno dostupni.



Shema 35. Sinteza aromatskih bisalkina.

Ciljani 6-klor-7-deazapurinski bis-triazolni dimeri **77a–80a** pripremljeni su regioselektivnom bakom(I) kataliziranom Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikoadicijom iz azidnog derivata **51** i odgovarajućih bis-alkina (**73–76**). U *click* reakciji s 4,4'-bis(propiniloksi)-1,1'-bifenilom (**74**) i hepta-1,6-diinom (**75**), uz 7-deazapurinske dimere dobiveni su i odgovarajući mono-triazolni derivati **78b** i **79b**.

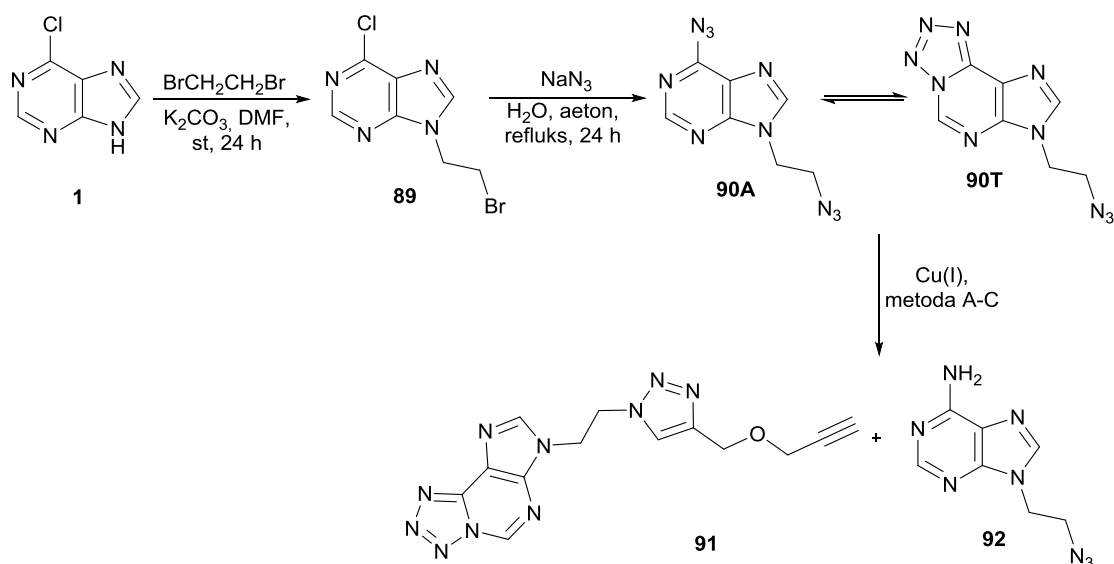
Bis-triazolni dimeri **77a–80a** zatim su nukleofilnom supstitucijom potpomognutom mikrovalovima s odgovarajućim cikličkim aminom (piperidin ili pirolidin) prevedeni u 6-amino-supstituirane bis-triazolne 7-deazapurinske dimere **81a–88a** u dobrim iskorištenjima 60-97 % (shema 36). Kao otapalo korištena je voda, a vrijeme reakcije iznosilo je 10 min.



Shema 36. Sinteza 6-supstituiranih mono- i bis-triazolnih 7-deazapurina.

Nadalje, kako bi se usporedio utjecaj dušika u položaju 7 na antiproliferativno djelovanje ove klase spojeva 6-klorpurin (**1**), preveden je u brometilni derivat (**89**) reakcijom *N*-alkiliranja s dibrometanom. S ciljem dobivanja ključnog azidnog derivata provedena je supstitucija s natrijev azidom, no umjesto željenog prekursora priređen je bis-azidni derivat (**90A**), koji je u ravnoteži s tetrazolnim tautomerom (**90T**) (shema 37).

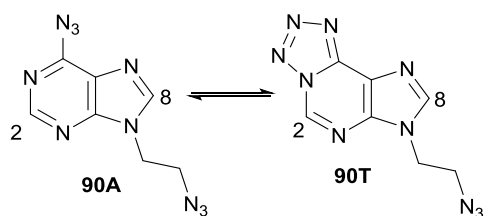
3. REZULTATI I RASPRAVA



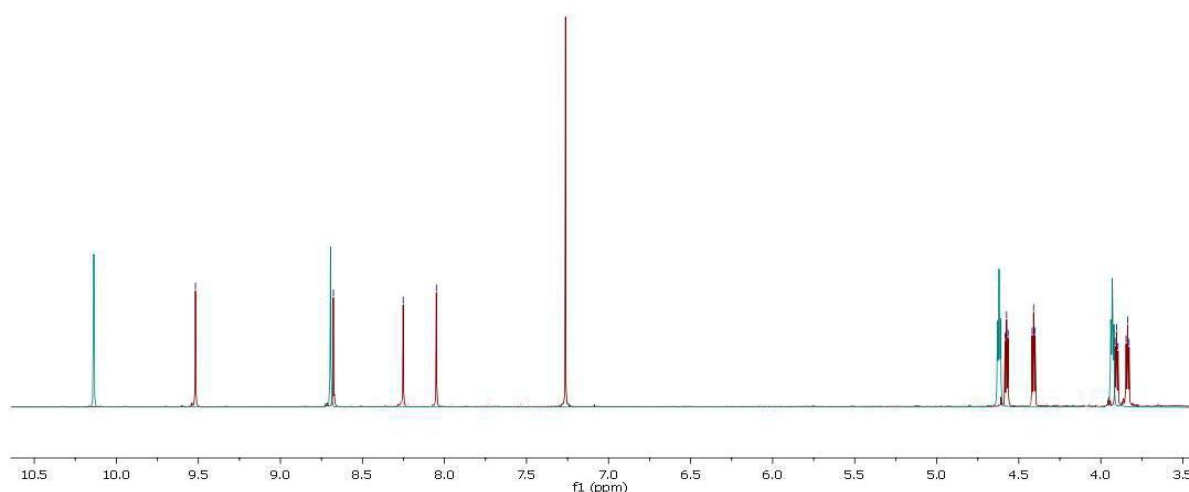
Shema 37. Sinteza spojeva **91** i **92**.

Potvrđeno je da 6-azidopurinški derivat u čvrstom stanju i u DMSO-*d*₆ poprima tetrazolnu strukturu **90T** [183], dok se u ¹H NMR spektru snimljenom u CDCl₃ pojavljuju oba tautomerna oblika (slika 60, tablica 11). Karakteristični protoni H2 i H8 purinske jezgre značajno su odsjenjeni u tetrazolnoj strukturi **90T** u odnosu na azidnu strukturu **90A**.

Tablica 11. Kemijski pomaci protona H2 i H8 u spektru ¹H NMR za spojeve **90A** i **90T**.

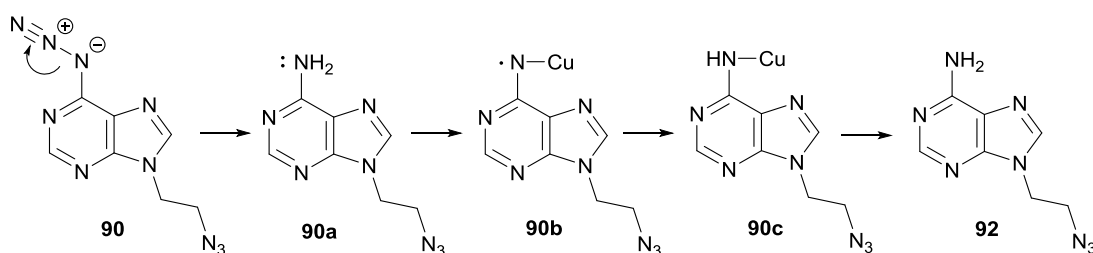


	90A		90T	
Otapalo	H2(ppm)	H8(ppm)	H2(ppm)	H8(ppm)
CDCl ₃	8,67	8,05	9,52	8,25
DMSO- <i>d</i> ₆	-	-	10,14	8,69



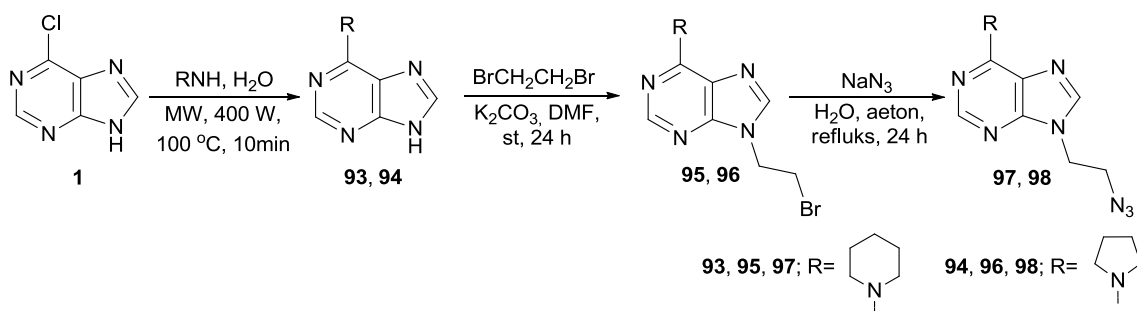
Slika 60. Spektar ^1H NMR za spoj **90** snimljen u $\text{DMSO-}d_6$ (plavo) i CDCl_3 (crveno).

U prisutnosti bakra kao katalizatora diazidni derivat **90** podliježe redukciji pri čemu nastaje *N*-azidoetilni derivat adenina **92**. Isključivo s vrlo reaktivnim propargil-eterom izoliran je monosupstituirani produkt *click* reakcije spoj **92**, čija je struktura potvrđena rentgenskom strukturnom analizom (shema 38). Pretpostavljeni mehanizam redukcije azidnog derivata **85** u adeninski analog **87** je radikalska reakcija [184, 185]. Gubitkom molekule dušika nastaje nitren (**90a**), koji se pomoću bakra prevodi u Cu-nitren (**90b**). Prisutnost vode u reakcijskoj smjesi, koja može donirati H-atom, dodatno ubrzava redukciju (shema 38).



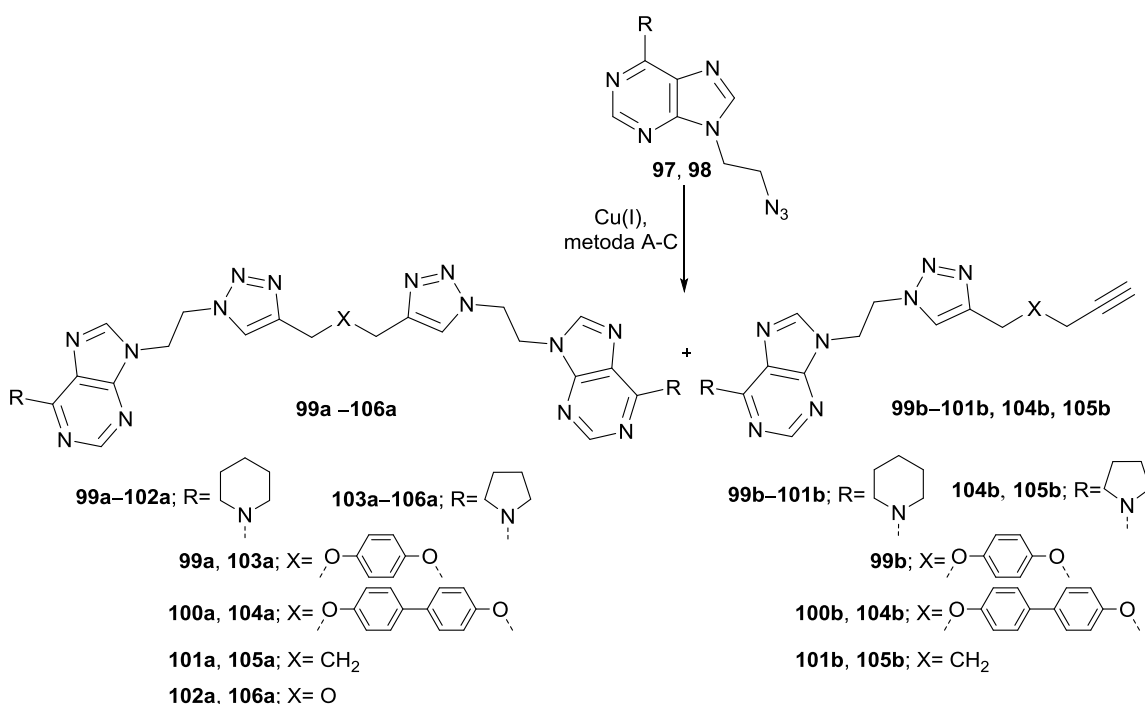
Shema 38. Predloženi mehanizam redukcije azido derivata **90** u adeninski analog **92**.

Pošto dolazi do neželjene supstitucije 6-klorpurina s natrijevim azidom, predložen je drugi sintetski put (shema 39). U prvom stupnju provedena je supstitucija 6-klorpurina (**1**) s odgovarajućim cikličkim aminom. Pripravljena piperidinska (**93**) i pirolidinska (**94**) purinska baza zatim alkiliranjem s dibrometanom i supstitucijom s natrijevim azidom, daje odgovarajuće *N*-9-azidoetilne purinske derivate **97** i **98**.



Shema 39. Sinteza 6-amino-supstituiranih *N*-9-azidoetilnih purinskih derivata **97** i **98**.

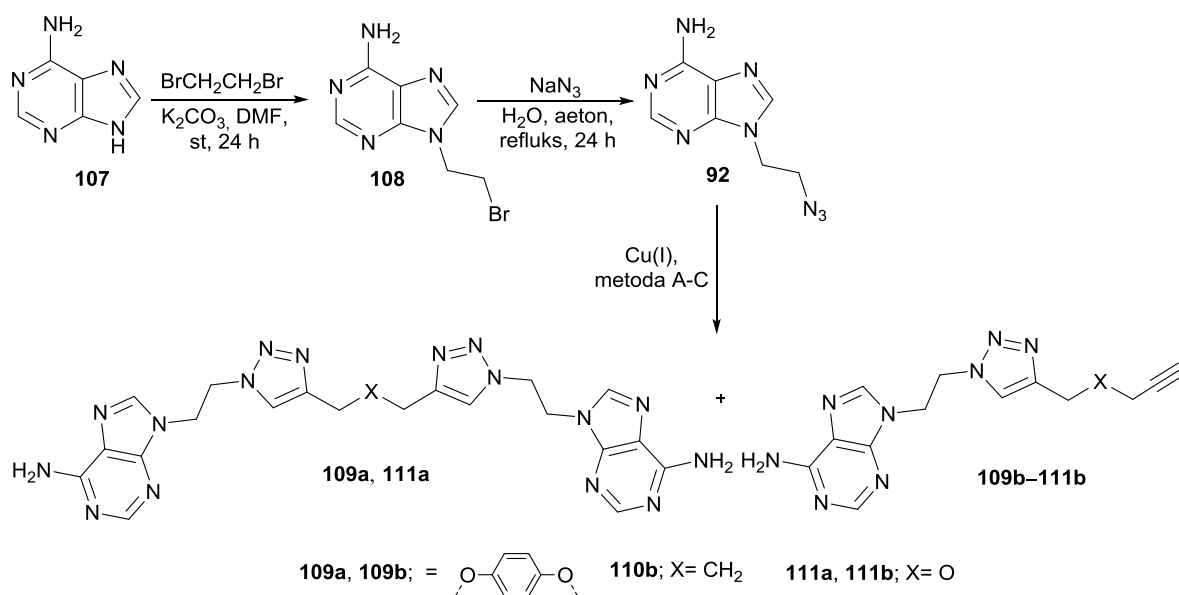
Azid-alkin cikloadicijom kataliziranom bakrom iz 6-piperidinskog (**97**) i 6-pirolidinskog (**98**) azidoetilnog purina s 1,4-bis(propiniloksi)benzenom (**73**), 4,4'-bis(propiniloksi)-1,1'-bifenilom (**74**), hepta-1,6-diinom (**75**) i propargil-eterom (**76**) zatim su sintetizirani odgovarajući 6-piperidinski (**99a–102a**) i 6-pirolidinski (**103a–106a**) bis-triazolni purinski dimeri. Ovisno o primijenjenim reakcijskim uvjetima, uz ciljane dimere također su izolirani i mono-triazolni analozi **99b–101b**, **104b** i **105b** (shema 40).



Shema 40. Sinteza 6-amino supstituiranih mono- i bis-triazolnih purina.

Nadalje, uz cikličke amine pripravljeni su mono- i bis-triazolni adeninski derivati, reakcijom azidoetilnog adenina (**92**) s odgovarajućim bis-alkinima (**73**, **75** i **76**) (shema 41). *Click* reakcijom s 4,4'-bis(propiniloksi)-1,1'-bifenilom (**74**) nisu dobiveni ciljani 1,2,3-

triazolni derivati, dok je u reakciji s hepta-1,6-dinom (**75**) pireden samo mono-triazolni derivat **110b**.



Shema 41. Sinteza mono- i bis-triazolnih adeninskih hibrida.

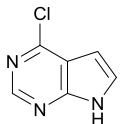
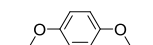
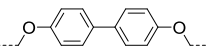
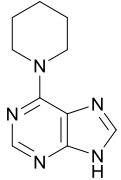
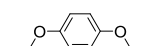
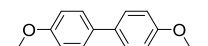
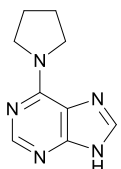
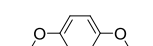
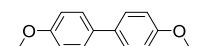
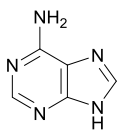
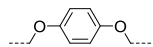
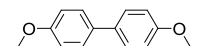
Sinteza mono- i bis-triazolnih 6-supstituiranih purina i pirolo[2,3-*d*]pirimidina provedena je Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom kataliziranom bakrom s odgovarajućim pseudopurinskim (**51**), odnosno purinskim (**92**, **97** i **98**) azidoetilnim analogima i terminalnim bis-alkinima (**73–76**). Kako bi se optimirali reakcijski uvjeti korištene su tri metode za provedbu *click* reakcije. U metodama A i B kao izvor bakra korišten je sustav CuSO₄/Cu(0) u smjesi vode i organskog otapala (*t*-BuOH:H₂O = 1:1 i 0,5 mL DMF). Kao dodatni izvor energije u metodi A korišteno je ultrazvučno zračenje pri 1000 W i 80 °C, dok je metoda B provedena klasičnom sintezom na sobnoj temperaturi. U metodi C bakrova(II) sol je zamijenjena s bakrovim(I) jodidom uz ligand *N,N*-diisopropiletilamin (DIPEA) i octenu kiselinu (HOAc). Reakcija je provedena u diklormetanu klasičnom sintezom pri sobnoj temperaturi. Zbog mogućnosti nastajanja eksplozivnih nusprodukata *click* reakcija s propargil-eterom (**76**) izvedena je samo metodom B.

U tablici 12 navedena su iskorištenja dobivenih mono- i bis-triazolnih purina i 7-deazapurina pri različitim reakcijskim uvjetima (metode A–C). Vrijeme reakcije potpomognute ultrazvučnim valovima (metoda A) značajno je kraće u odnosu na reakcije provedene pri sobnoj temperaturi (metode B i C). Dodatni izvor energije ubrzao je reakciju s 5 dana na samo 1,5 h, dok upotreba katalitičkog sustava CuI/DIPEA/HOAc smanjuje vrijeme reakcije na 3 dana. Nadalje, akustična kavitacija u heterogenom sustavu CuSO₄/Cu(0)

3. REZULTATI I RASPRAVA

povećava prijenos mase i elektrona s površine metala do organskog akceptora, te je pokazala bolju selektivnost. Tom metodom izolirani su samo bis-triazolni purinski i 7-deazapurinski dimeri. U reakcijama s CuI (metoda C) izoliran je najveći broj mono-triazolnih derivata, dok su metodom B priređeni mono-triazolni 6-klor-7-deazapurinski derivati **78b** i **79b**, te 6-piperidin-7-deazapurinski derivat **99b** u iskorištenjima 24 %, 23 % i 4 %.

Tablica 12. Iskorištenja *click* reakcije mono- i bis-triazolnih 6-supstituiranih purina i pirolo[2,3-*d*]pirimidina dobiveni metodama A–C.^{a-c}

Baza	Premosnica	Spoj	Iskorištenje (%)		
			Metoda A ^a	Metoda B ^b	Metoda C ^c
		77a	49	54	24
		-	-	-	-
		78a	34	33	35
		78b	-	24	-
	CH ₂ CH ₂ CH ₂	79a	41	45	63
		79b	-	23	35
		80a	np ^d	51	np ^d
		-	np ^d	-	np ^d
		99a	61	28	36
		99b	-	4	29
		100a	48	38	48
		100b	-	-	31
	CH ₂ CH ₂ CH ₂	101a	52	40	21
		101b	-	-	10
		102a	np ^d	46	np ^d
		-	np ^d	-	np ^d
		103a	51	28	61
		-	-	-	-
		104a	75	49	80
		104b	-	-	61
	CH ₂ CH ₂ CH ₂	105a	50	41	58
		105b	-	7	51
		106a	np ^d	46	np ^d
		-	np ^d	-	np ^d
		109a	11	-	-
		109b	-	25	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
	CH ₂ CH ₂ CH ₂	-	-	-	-
		110b	-	55	95
		111a	np ^d	8	np ^d
		111b	np ^d	7	np ^d

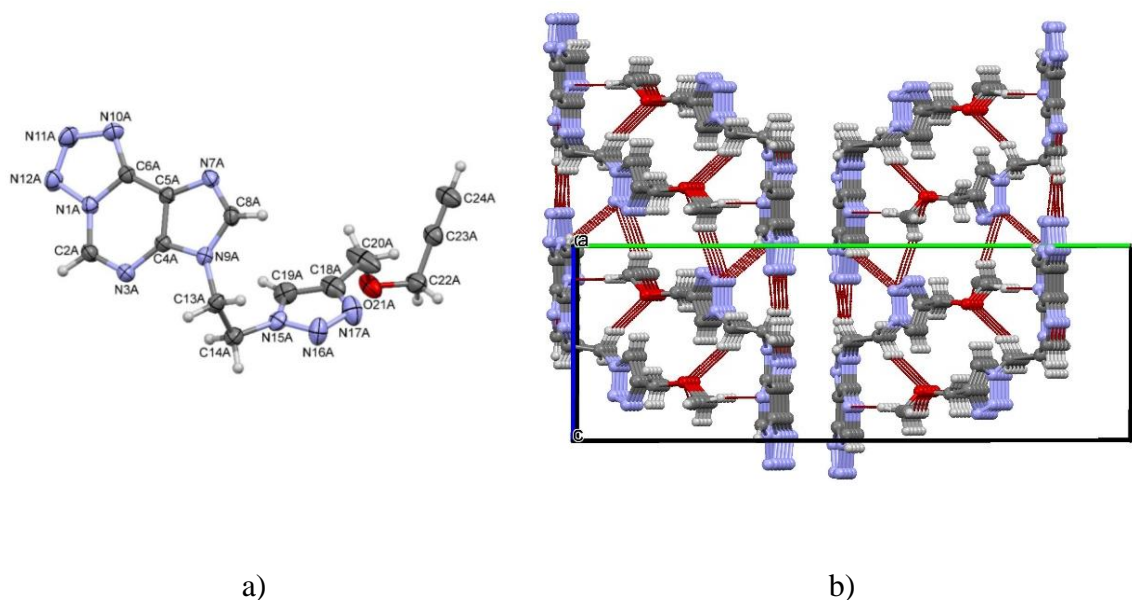
^aMetoda A, uvjeti: Cu(0), CuSO₄, US, 1000W, 80°C, 90 min. ^bMetoda B, uvjeti: Cu(0), CuSO₄, s.t., 5 dana

^cMetoda C, uvjeti: CuI, DIPEA, AcOH, CH₂Cl₂, s.t., 3 dana. ^dnp = reakcija nije provedena. - = nije izoliran.

3.4.2. Kristalna struktura spoja **91**

Kristalna struktura spoja **91** određena je rentgenskom strukturnom analizom, a njegova molekulska struktura prikazana je na slici 61a. Spoj **91** kristalizira s dvije neovisne molekule u asimetričnoj jedinici, a sastoji se od tricikličkog prstena povezanog s 1,2,3-triazolnim prstenom preko etilenske skupine. Na triazolni prsten vezan je još metiloksipropinilni lanac. Diedarski kut između ravnina dvaju cikličkih sustava iznosi $43,3(2)^\circ$.

Molekule spoja **91** međusobno su povezane iznimno velikim brojem vodikovih veza. Strukturom dominiraju C–H \cdots N vodikove veze, kojih ima četrnaest, a uz koje u supramolekulskom udruživanju sudjeluju i četiri C–H \cdots O vodikove veze. Taj veliki broj interakcija stvara dvodimenziju mrežu koja je međusobno paralelna (slika 61b).




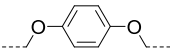
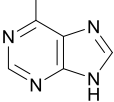
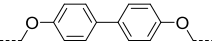
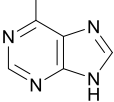
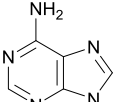
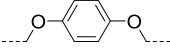
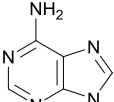
Slika 61. Molekulska struktura (a) i kristalno pakiranje (b) spoja **91**.

3.4.3. Antiproliferativna ispitivanja hibrida mono- i bis-triazolnih 6-supstituiranih purina i 7-deazapurina

Antiproliferativno djelovanje hibrida mono- i bis-triazolnih 6-supstituiranih purina i pirolo[2,3-*d*]pirimidina ispitano je na četiri zloćudne tumorske stanične linije: adenokarcinom pluća ne-malih stanica (A549), adenokarcinom gušterače (CFPAC-1), karcinom vrata maternice (HeLa) i metastatski kolorektalni adenokarcinom (SW620) kao i na normalne fibroblaste prepucija (HFF-1) kod čovjeka. Rezultati ispitivanja prikazani su u tablicama 13 i 14.

Tablica 13. Antiproliferativno djelovanje bis-triazolnih 6-supstituiranih dimera purina i pirolo[2,3-*d*]pirimidina.

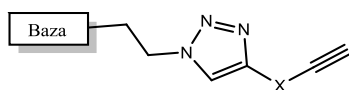
Spoj	Baza	X	IC ₅₀ ^a (μM)				
			A549	HeLa	CFPAC-1	SW620	HFF
77a			>100	77,0	>100	>100	0,85
78a			6,3	>100	>100	>100	0,14
79a		CH ₂ CH ₂ CH ₂	99,6	99,7	74,9	>100	2,3
80a		CH ₂ OCH ₂	>100	>100	36,5	53,5	16,4
81a			>100	>100	>100	>100	0,42
82a			53,9	68,5	17,4	24,7	0,82
83a		CH ₂ CH ₂ CH ₂	59,3	33,7	48,7	65,2	0,33
84a		CH ₂ OCH ₂	51,9	28,2	37,9	45,5	0,44
85a			49,3	6,4	25,8	77,9	0,89
86a			68,9	54,6	77,4	>100	4,0
87a		CH ₂ CH ₂ CH ₂	>100	80,0	65,3	>100	0,52
88a		CH ₂ OCH ₂	>100	>100	>100	>100	0,82
99a			53,5	16,2	9,2	43,5	0,90
100a			12,3	3,8	8,1	5,2	0,92
101a		CH ₂ CH ₂ CH ₂	>100	41,2	53,9	>100	0,82
102a		CH ₂ OCH ₂	73,1	34,7	56,8	66,1	0,58

Spoj	Baza	X	IC ₅₀ ^a (μM)				
			A549	HeLa	CFPAC-1	SW620	HFF
103a			94,9	60,6	48,5	98,3	12,1
104a			8,5	7,4	16,4	59,1	0,63
105a		CH ₂ CH ₂ CH ₂	88,6	60,4	49,9	>100	0,69
106a		CH ₂ OCH ₂	87,3	66,9	52,5	63,4	0,74
109a			>100	>100	>100	>100	67,1
111a		CH ₂ OCH ₂	>100	>100	>100	>100	28,5

^a IC₅₀: koncentracija spoja koja inhibira rast stanica za 50 %.

Prema rezultatima antiproliferativnog djelovanja bis-triazolnih 6-supstituiranih dimera purina i pirolo[2,3-*d*]pirimidina (tablica 13) značajniju antitumorsku aktivnost (IC₅₀ < 10 μM) pokazuju spojevi **78a**, **85a**, **99a**, **100a** i **104a**. Iz dobivenih vrijednosti može se uočiti da premosnica između triazolnih jezgri ima važnu ulogu u aktivnosti. Spojevi s alifatskim premosnicama (**79a**, **80a**, **87a**, **88a**, **101a**, **102a**, **105a** i **106a**) ne pokazuju značajnije antitumorsko djelovanje, dok spojevi s *p*-dimetiloksibifenilnom premosnicom pokazuju naj snažniju inhibiciju rasta tumorskih stanica. Nadalje, adeninski derivati **109a** i **111a** ne pokazuju djelovanje na odabrane tumorske stanice (IC₅₀ >100 μM). Na inhibiciju stanica adenokarcinoma pluća (A549) naj snažnije djeluju 6-klor-7-deazapurinski hibridi s *p*-dimetiloksifenilnom premosnicom **78a** (IC₅₀ = 6,3 μM) i 6-pirolipurinski hibrid s *p*-dimetiloksibifenilnom premosnicom **104a** (IC₅₀ = 8,5 μM), koji također pokazuje inhibitorno djelovanje na HeLa stanice (IC₅₀ = 7,4 μM). 6-Piperidinpurinski hibrid **100a** *p*-dimetiloksibifenilnom premosnicom pokazuje naj snažnije djelovanje na stanice HeLa (IC₅₀ = 3,8 μM), CFPAC-1 (IC₅₀ = 8,1 μM) i SW620 (IC₅₀ = 5,2 μM).

Nadalje, značajniju antitumorsku aktivnost mono-triazolnih 6-supstituiranih purina i pirolo[2,3-*d*]pirimidina (tablica 14) pokazuju isključivo spojevi s *p*-dimetiloksibifenilnom premosnicom **78b**, **100b** i **104b**. Poput bis-triazolnih analoga adeninski mono-triazolni hibridi (**109b–111b**) i derivati s alifatskim premosnicama (**79b**, **101b**, **105b**, i **111b**) ne pokazuju antitumorsko djelovanje. Naj snažnije djelovanje pokazuje 6-klor-7-deazapurinski derivat **78b**, koji inhibira rast stanica HeLa (IC₅₀ = 0,98 μM) i CFPAC-1 (IC₅₀ = 0,79 μM) u nanomolarnom području.

Tablica 14. Antiproliferativno djelovanje bis-triazolnih 6-supstituiranih purina i pirolo[2,3-*d*]pirimidina.

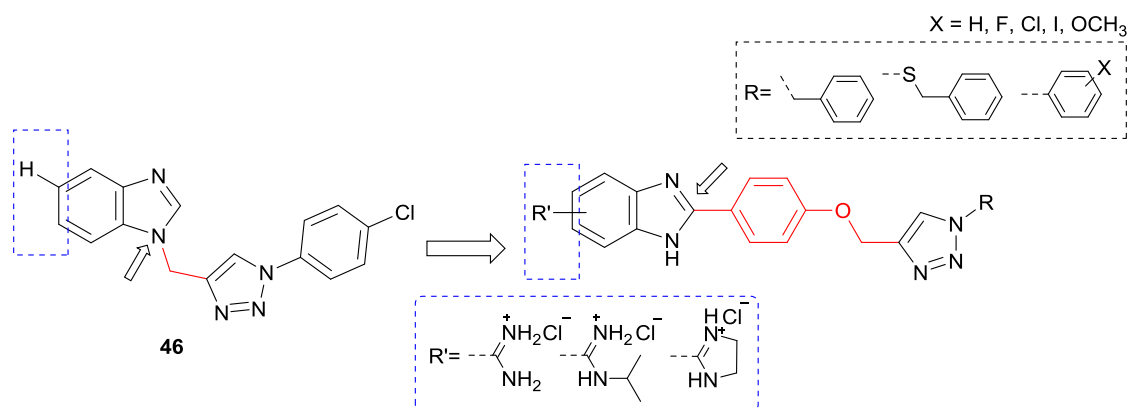
Spoj	Baza	X	IC ₅₀ ^a (μM)				
			A549	HeLa	CFPAC-1	SW620	HFF
78b			6,9	0,98	0,79	8,0	0,73
79b		CH ₂ CH ₂ CH ₂	>100	75,0	19,5	80,5	69,3
99b			58,7	17,1	23,4	35,7	29,1
100b			9,3	3,9	2,9	23,2	5,5
101b		CH ₂ CH ₂ CH ₂	>100	72,2	75,2	>100	37,3
104b			62,1	8,1	6,5	98,0	9,1
105b		CH ₂ CH ₂ CH ₂	>100	>100	>100	>100	>100
109b			>100	>100	>100	>100	58,6
110b		CH ₂ CH ₂ CH ₂	>100	>100	>100	>100	82,8
111b		CH ₂ OCH ₂	>100	>100	>100	>100	>100
91		CH ₂ OCH ₂	>100	>100	>100	>100	>100

^a IC₅₀; koncentracija spoja koja inhibira rast stanica za 50 %.

Uspoređujući antiproliferativno djelovanje hibrida mono- i bis-triazolnih 6-supstituiranih purina i pirolo[2,3-*d*]pirimidina (tablica 13 i 14) s djelovanjem bis-triazolnih 6-klor-7-deazapurinskih derivata vezanih preko *p*- (**69**) i *m*- (**70**) fenilne prenosnice (tablica 7) može se uočiti da se zamjenom fenilne prenosnice između triazolnih jezgri smanjuje i antiproliferativno djelovanje. Mono-triazolni derivat **78b** pokazuje sličnu inhibitornu aktivnost na stanice adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1) poput spoja **70**.

3.5. Hibridi 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola i 1,2,3-triazola [186, 187]

Druga skupina spojeva priređenih u ovom doktorskom radu su hibridi 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola s 1,2,3-triazolom. Benzimidazolni derivat **46** s 1-(*p*-klorfenil)-1,2,3-triazolnim supstuentom vezan za *N*-1 položaj heterocikličke baze pokazao je snažno antitumorsko djelovanje inhibirajući rast ne-malih stanica karcinoma pluća A549 ($IC_{50} = 0,79 \mu M$) s kinazom p38 MAP kao mogućom metom djelovanja (tablica 3, slika 49). Provedene su daljnje strukturne modifikacije s ciljem dobivanja linearnih spojeva koji imaju bolju topljivost. U položaj C-5(6) benzimidazolne jezgre uvedena je polarna, hidrofilna amidinska skupina, a triazolni prsten vezan je za C-2 položaj benzimidazola preko fenoksimetilenske prenosnice (slika 62).

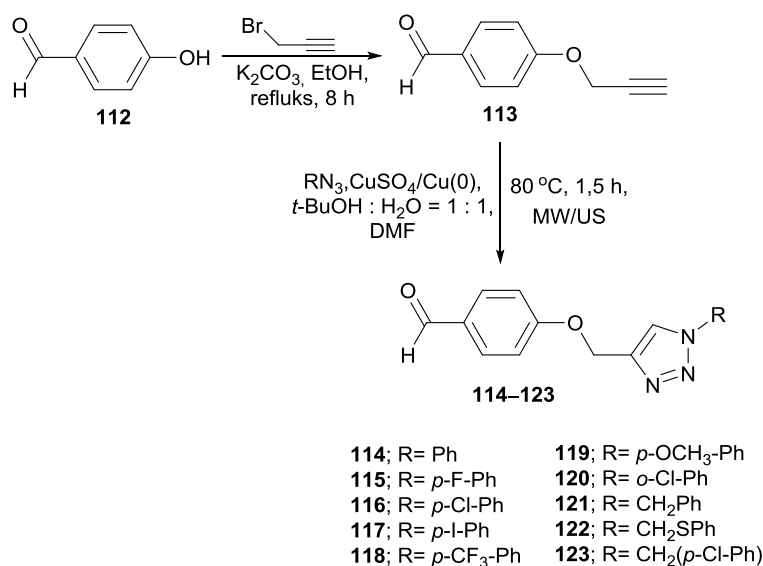


Slika 62. Opći prikaz strukture hibrida 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola s 1,2,3-triazolom.

Kao što je prikazano u literaturnom pregledu amidino-supstituirani benzimidazolni farmakofor pokazuje veliki potencijal za stvaranje kovalentnih interakcija s polinukleotidima DNA i RNA, koje su kao biološke mete povezane s antitumorskom, antibakterijskom i antitipanosomskom aktivnošću. Stoga je ovoj klasi spojeva uz antitumorsku aktivnost ispitano i djelovanje protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, te parazita *Trypanosoma brucei* (*T. Brucei*), kao i interakcije s *ctDNA* i *dsRNA* (pApU i pCpG).

3.5.1. Sinteza hibrida 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola

Reakcijom 4-hidroksibenzaldehida (**112**) s propargilnim bromidom priređen je *O*-propargilirani benzaldehid (**113**), koji je zatim korišten kao dipolarofil u regioselektivnoj Cu(I)-kataliziranoj cikloadiciji s aromatskim azidima (shema 42). U sintezi 4-triazolnih derivata benzaldehida **114–123** korištene su učinkovite i ekološki prihvatljivije metode, primjenjujući mikrovalno i ultrazvučno zračenje. Cu(I)-katalizator generiran je *in situ* iz Cu(II) sulfata i metalnog bakra.



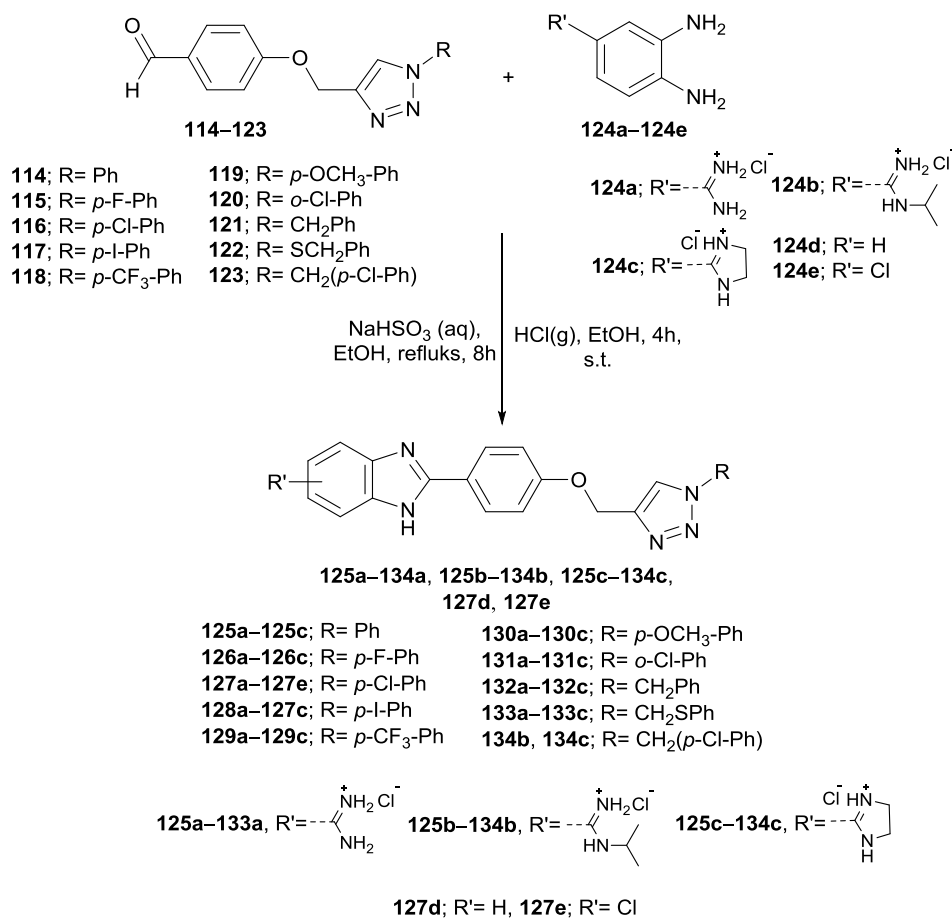
Shema 42. Sinteza 4-triazolnih derivata benzaldehida **114–123**.

Iskorištenja *click* reakcije potpomognute ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem prikazana su u tablici 15. Učinak akustične kavitacije u ultrazvučno potpomognutim reakcijama pogodniji je za heterogenu *click* reakciju, te su spojevi **114–122** priređeni u većem iskorištenju (62–99 %) u odnosu na reakcije provedene uz mikrovalno zračenje (30–71 %) (tablica 15).

Tablica 15. Iskorištenja (%) *click* reakcija u sintezi 4-triazolnih derivata benzaldehida **114–122** potpomognutih ultrazvukom (US) i mikrovalovima (MW).

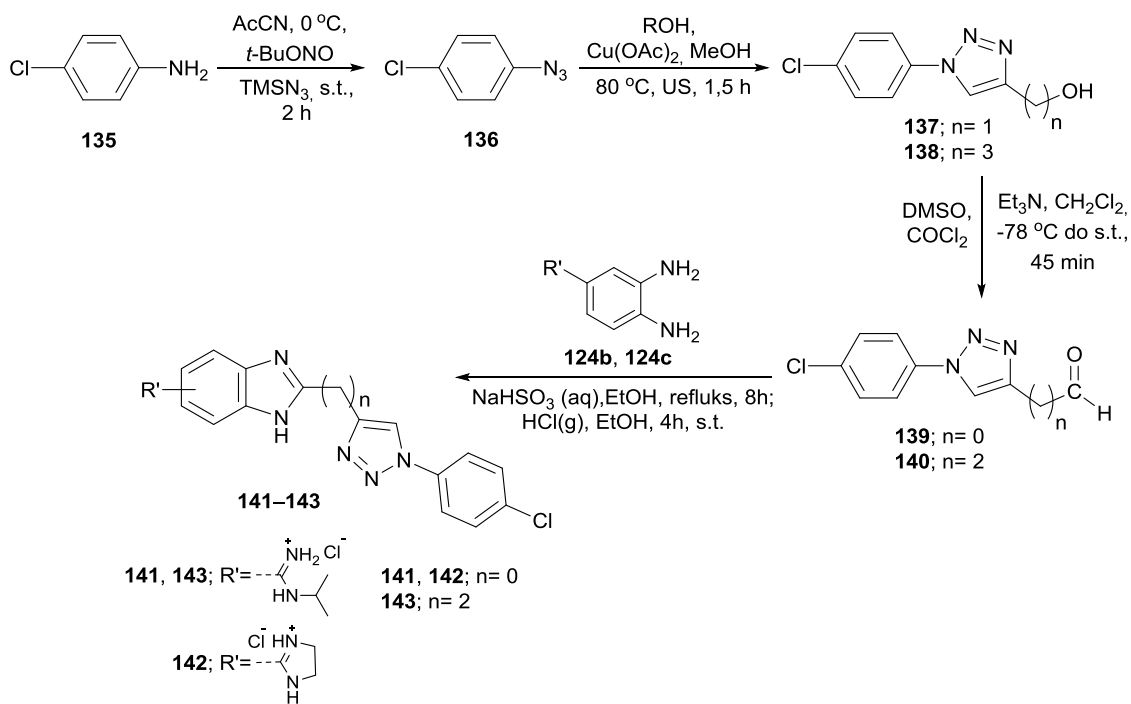
Iskorištenje (%)	Spoj	114	115	116	117	118	119	120	121	122
	US		97	95	62	82	99	76	64	90
MW		71	47	34	56	30	42	53	71	57

Ciljani benzimidazolni hibridi pripremljeni su kondenzacijom 4-(1,2,3-triazol-1-il)benzaldehida (**114–123**) i odgovarajućih *o*-fenilendiamina (**124a–124e**) uz NaHSO₃ kao oksidativni reagens. Priređeni su amidino-supstituirani benzimidazoli **125a–133a**, **125b–134b** i **125c–134c**, a kako bi se mogao usporediti utjecaj amidinske skupine na biološku aktivnost sintetizirani su nesupstituirani benzimidazol **127d** i 5(6)-klorbenzimidazol **127e** (shema 43). Amidino-supstituirani *o*-fenilendiamini (**124a–124c**) pripremljeni su Pinnerovom metodom iz 4-amino-3-nitrobenzonitrila u dva stupnja reakcijom s odgovarajućim aminima (amonijak, izopropilamin, etilendiamin) [188].



Shema 43. Sinteza 2-aril-supstituiranih hibrida benzimidazola **125a–133a**, **125b–134b**, **125c–134c**, **127d** i **127e**.

U svrhu određivanja utjecaja fenoksimetilenske prenosnice, koja povezuje benzimidazol s 1,2,3-triazolnim prstenom, na antiproliferativno djelovanje priređeni su spojevi **141** i **142**, koji direktno povezuju ta dva prstena i spoj **143**, s alifatskom etilenskom umjesto aromatske fenoksimetilenske prenosnice (shema 44).



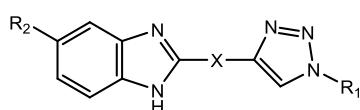
Shema 44. Sinteza benzimidazolnih hibrida **141–143**.

1-(*p*-klorfenil)-1,2,3-triazolni alifatski alkoholi (**137** i **138**) priređeni su reakcijom 4-klorfenilazida i propargilnog alkohola ili pentinola reakcijom potpomognutom ultrazvukom s Cu(OAc)_2 u metanolu. Ključni prekursori, 1-(*p*-klorfenil)-1,2,3-triazolni aldehidi **139** i **140** dobiveni su Swernovom oksidacijom iz primarnih alkohola **137** i **138** s oksalilnim kloridom (COCl_2) u dimetilsulfoksidu (DMSO) u prisutnosti trietilamina (Et_3N) kao baze pri niskoj temperaturi ($-78\text{ }^\circ\text{C}$). Mehanizam ove reakcije odvija se u tri stupnja prikazanih na shemi 45 [189]. U prvom stupnju DMSO reagira s oksalilnim kloridom i nastaje elektrofilan sumporov intermedijar (**144a**), koji se preko peterocikličkog prijelaznog stanja raspada i nastaje klorsulfonijev ion (**144b**). Zatim se dodaje alkohol koji u reakciji s **144b** daje alkoksisulfonijev intermedijar (**144c**, **144d**), kojeg baza Et_3N deprotonira, te se raspada na dimetil-sulfid i aldehyd (**139** i **140**).

3.5.2. Antiproliferativna aktivnost hibrida 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola

Rezultati antiproliferativnog ispitivanja priređenih derivata benzimidazola ispitanih na tumorskim staničnim linijama adenokarcinoma pluća ne-malih stanica (A549), adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1), karcinoma vrata maternice (HeLa) i metastatskog kolorektalnog adenokarcinoma (SW620) kao i na normalne plućne fibroblaste (WI38) kod čovjeka prikazani su u tablici 16. 5-fluoruracil (5-FU) korišten je kao referentni spoj.

Tablica 16. Antiproliferativno djelovanje hibrida 2,5(6)-disupstituiranih purinskih izostera benzimidazola **125a–133a**, **125b–134b**, **125c–134c**, **127d**, **127e** i **141–143**.



Spoj	R ₁	X	R ₂	IC ₅₀ ^a (μM)				
				A549	CFPAC-1	HeLa	SW620	WI38
125a		-PhOCH ₂ -		53,3	29,9	18,8	31,5	8,1
126a		-PhOCH ₂ -		81,0	>100	7,4	37,8	0,7
127a		-PhOCH ₂ -		0,05	18,6	0,8	7,6	5,0
128a		-PhOCH ₂ -		0,45	21,5	6,4	0,95	0,62
129a		-PhOCH ₂ -		0,84	2,1	0,32	0,36	0,52
130a		-PhOCH ₂ -		>100	7,0	7,1	>100	0,07
131a		-PhOCH ₂ -		>100	>100	20,9	>100	0,54
132a		-PhOCH ₂ -		9,5	34,4	13,7	30,9	0,89
133a		-PhOCH ₂ -		14,9	36,9	16,9	44,0	8,08
125b		-PhOCH ₂ -		>100	>100	16,6	62,1	0,99
126b		-PhOCH ₂ -		8,4	0,71	0,59	37,9	0,66
127b		-PhOCH ₂ -		0,05	>100	17,5	48,7	8,0
128b		-PhOCH ₂ -		0,08	5,1	0,51	0,69	0,20

Spoj	R ₁	X	R ₂	IC ₅₀ ^a (μM)				
				A549	CFPAC-1	HeLa	SW620	WI38
129b		-PhOCH ₂ -		85,76	>100	13,7	50,1	0,32
130b		-PhOCH ₂ -		>100	>100	>100	>100	0,08
131b		-PhOCH ₂ -		>100	82,4	22,2	88,1	0,83
132b		-PhOCH ₂ -		6,2	>100	8,8	58,6	65,4
133b		-PhOCH ₂ -		>100	15,7	24,8	60,8	8,1
134b		-PhOCH ₂ -		4,9	>100	>100	36,5	0,70
125c		-PhOCH ₂ -		49,7	26,2	7,8	29,6	0,10
126c		-PhOCH ₂ -		>100	>100	0,98	2,3	0,09
127c		-PhOCH ₂ -		0,06	16,9	0,22	3,6	2,2
128c		-PhOCH ₂ -		>100	0,86	0,42	0,37	0,22
129c		-PhOCH ₂ -		0,59	0,65	2,7	6,3	0,69
130c		-PhOCH ₂ -		>100	>100	6,2	30,2	0,08
131c		-PhOCH ₂ -		>100	>100	>100	91,6	0,72
132c		-PhOCH ₂ -		0,07	29,2	6,7	28,0	6,9
133c		-PhOCH ₂ -		9,3	9,3	6,7	20,8	1,6
134c		-PhOCH ₂ -		9,3	6,8	5,1	0,05	5,8
127d		-PhOCH ₂ -	H	7,9	>100	>100	99,3	1,1
127e		-PhOCH ₂ -	Cl	2,9	3,7	3,5	4,3	1,5
141		-		27,1	15,9	0,85	32,5	6,9
142		-		3,9	0,83	0,69	1,7	2,7
143		-CH ₂ CH ₂ -		33,4	36,1	3,1	56,8	3,7
5-FU	-	-	-	2,0	0,14	8,8	0,08	0,94

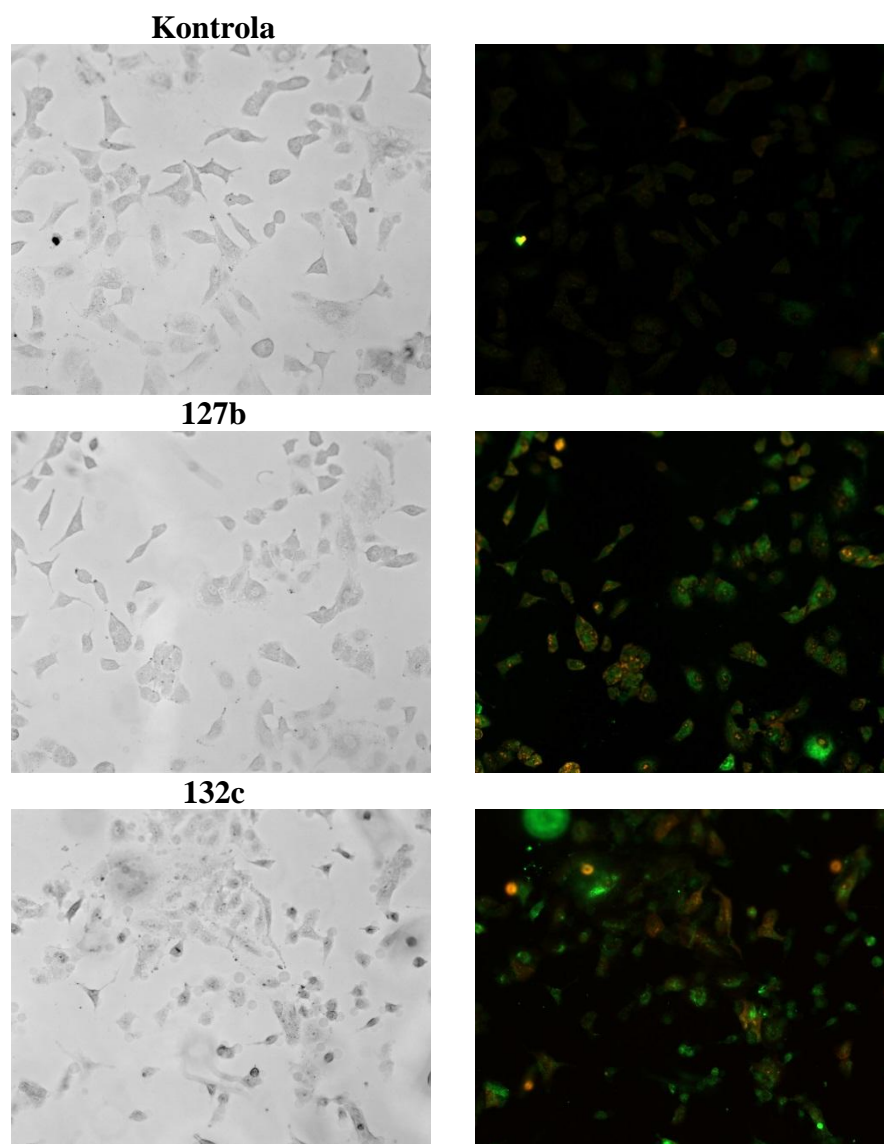
^a IC₅₀; koncentracija spoja koja inhibira rast stanica za 50 %.

Iz rezultata antiproliferativnog ispitivanja (tablica 16) razvidno je da ova klasa spojeva pokazuje snažno antiproliferativno djelovanje. Uzimajući u obzir inhibiciju tumorskih stanica u submikromolarnim i niskim mikromolarnim koncentracijama ($IC_{50} < 5 \mu M$) značajnije antiproliferativno djelovanje pokazuju derivati **127a–129a**, **126b–128b**, **126c–129c**, **127e** i **141–143**. Najznačajnije antiproliferativno djelovanje pokazuju spojevi sa supstituentima u *N*-1 položaju triazolnog prstena, odnosno spojevi s halogenim atomom u *para* položaju fenilnog prstena. Supstituenti na fenilnom prstenu smanjuju antiproliferativni učinak slijedećim redoslijedom: *o*-Cl > H > *p*-OCH₃ > *p*-I > *p*-CF₃ > *p*-Cl > *p*-F.

p-klorofenil supstituirani 1,2,3-triazolni derivati amidina **127a**, *N*-izopropilamidina **127b** i 2-imidazolina **127c** naj snažnije inhibiraju rast karcinoma pluća ne-malih stanica A549 s IC_{50} vrijednostima od 0,05 i 0,06 μM . Benzilom supstituirani 1,2,3-triazolni analog 2-imidazolina **132c** također pokazuje snažan, ali i selektivni inhibicijski učinak ($IC_{50} = 0,07 \mu M$) na stanice A549. *p*-jodfenil-supstituirani 1,2,3-triazolni derivati (**128a–128c**) pokazuju značajnu aktivnost protiv tumorskih stanica metastatskog kolorektalnog adenokarcinoma SW620 (**128a**, $IC_{50} = 0,95 \mu M$; **128b**, $IC_{50} = 0,69 \mu M$; **128c**, $IC_{50} = 0,37 \mu M$). Uvođenje metilenske i tiometilenske prenosnice između triazolnog prstena i fenilne jezgre dovelo je do smanjenja antitumorske aktivnosti, izuzev benzilom supstituiranog 1,2,3-triazolnog analoga 5(6)-(2-imidazolinil)benzimidazola **132c** i *p*-klorobenzil-supstituiranog 1,2,3-triazolnog analoga 5(6)-(2-imidazolinil)benzimidazola **134c**, koji pokazuju snažno i selektivno djelovanje na stanice A549 (**132c**, $IC_{50} = 0,07 \mu M$), odnosno SW620 (**134c**, $IC_{50} = 0,05 \mu M$).

Nadalje, amidinski supstituent na benzimidazolnoj jezgri također pokazuje utjecaj na antiproliferativnu aktivnost. Uspoređujući inhibitornu aktivnost ($IC_{50} < 5 \mu M$), općenito se može zaključiti da 2-imidazolinilni derivati benzimidazola (**125c–134c**) pokazuju naj snažnije djelovanje, a *N*-izopropilni derivati benzimidazola (**125b–134b**) naj slabiju aktivnost. Zamjenom amidinskog supstituenta s klorom (**127e**) dolazi do gubitka antiproliferativne aktivnosti, dok nesupstituirani derivat benzimidazola **127d** gotovo u potpunosti gubi djelovanje u usporedbi s njegovim 2-imidazolinilnim (**127c**), *N*-izopropilnim (**127b**) i amidinskim (**127a**) analogima.

Zamjena fenoksimetilenske prenosnice s etilenskom (**143**) ili izravno povezivanje benzimidazolnog i 1,2,3-triazolnog prstena (**141** i **142**), smanjuje aktivnost na stanice A549 u usporedbi s amidinskim analogima **127b** i **127c**. Međutim, *N*-izopropilamidin **141** u usporedbi



Slika 64. Određivanje apoptoze inducirane spojevima **127b** i **132c** na ne-malim stanicama karcinoma pluća A549 primjenom testa Aneksin V. Prikazane su slike svijetlih polja (lijevo) i kasno apoptotične/primarno nekrotične stanice (desno).

Tablica 17. Aneksin V test spojeva **127b** i **132c** u ne-malim stanicama karcinoma pluća A549.

	A549 stanice (%) ^a		
	Kontrola	127b	132c
Sekundarno nekrotične stanice	0,00	2,78	6,43
Rano apoptotične stanice	0,52	28,33	27,49
Žive stanice	99,48	28,89	49,71
Kasno apoptotične/ primarno nekrotične stanice	0,00	40,00	16,37

^aUdio živih stanica (PI-/Ann V-), rano apoptotičnih stanica (PI-/Ann V+), kasno apoptotičnih stanica (PI+/Ann V+) i sekundarno nekrotičnih stanica (PI+) nakon 48 h tretmana s $2 \times IC_{50}$ vrijednostima spojeva **127b** i **132c**.

3.5.4. Validacija predviđenih proteinskih meta spojeva 127b i 132c primjenom analize Western blot

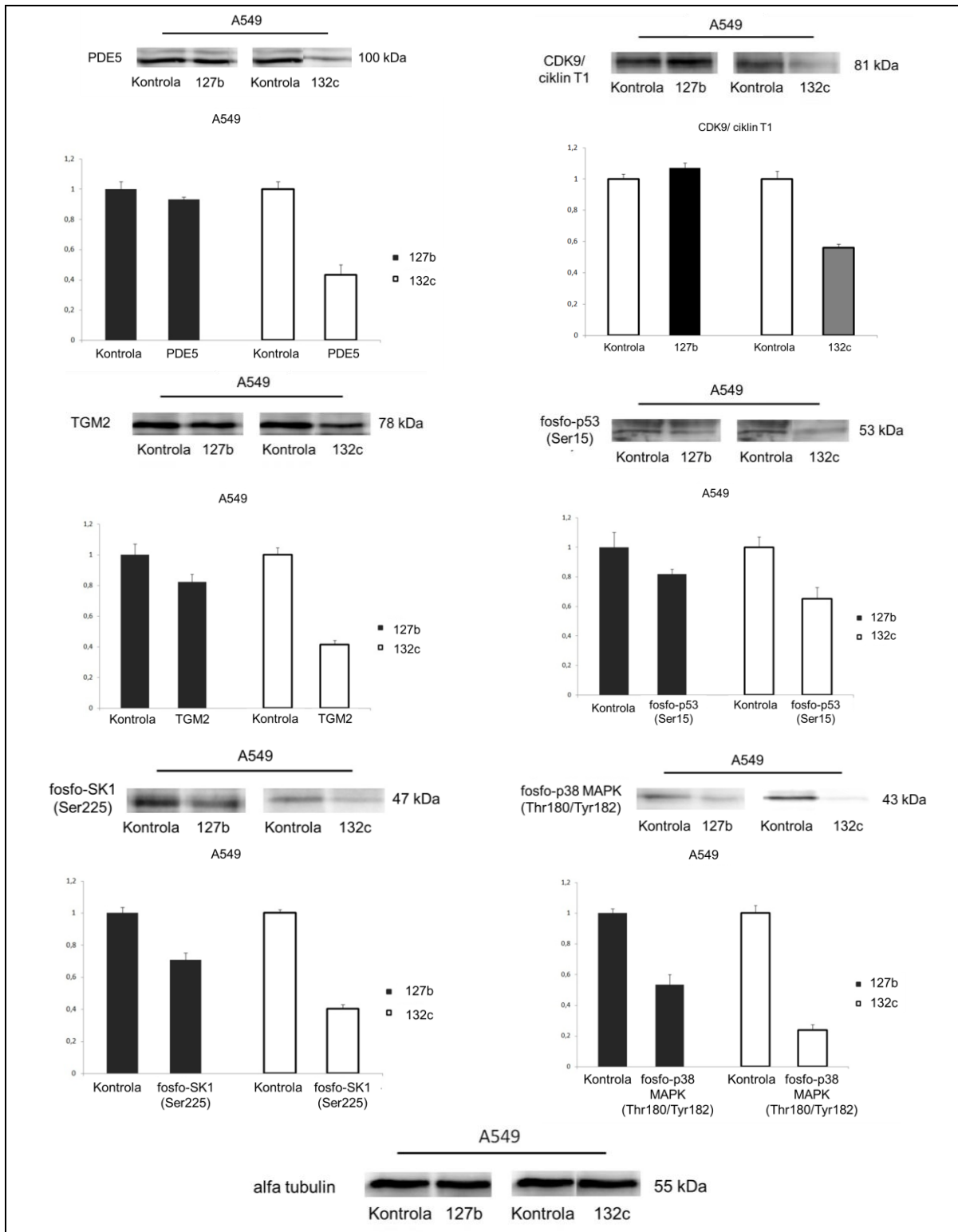
U svrhu određivanja moguće proteinske mete za odabrane kandidate provedena je *in silico* analiza predviđanja spektra aktivnosti PASS (tablica 18) [180]. Zajedno s literaturnim podacima za biološke aktivnosti strukturno srodnih kemijskih entiteta i poznatih bioloških putova povezanih s inhibicijom rasta karcinoma pluća ne-malih stanica A549, kao potencijalne mete određeni su: fosfodiesteraza 5A (PDE5), kinaza ovisna o ciklinu 9 (CDK9), transglutaminaza 2 (TGM2), p38 protienska kinaza aktivirana mitogenom (p38 MAPK) i sfingozin-kinaza 1 (SK1), a njihova ekspresija analizirana je Western blot analizom (slika 65).

Tablica 18. Predviđanje spektra aktivnosti PASS^a ($P_a \geq P_i$) za spojeve **127b** and **132c**.

<i>Biološke mete</i>	127b		<i>Biološke mete</i>	132c	
	P_a^a	P_i^a		P_a^a	P_i^a
Inhibitor cGMP fosfodiesteraze	0,236	0,053	Inhibitor sinteze leukotriena	0,486	0,004
Inhibitor MAP-kinaze	0,130	0,012	Inhibitor transglutaminaze 2	0,425	0,002
Inhibitor receptora faktora rasta trombocita (PDGFR)	0,277	0,194	Inhibitor cGMP fosfodiesteraze	0,293	0,015
Inhibitor transglutaminaze 2	0,117	0,036	Inhibitor MAP kinaze	0,221	0,004
Inhibitor sfingozin kinaze 1	0,051	0,014	Inhibitor CDK9/ciklin T1	0,307	0,121
Inhibitor p38 MAP-kinaze	0,083	0,054	Inhibitor 5-Lipooksigenaze	0,162	0,010
Inhibitor sinteze leukotriena	0,103	0,079	Inhibitor fosfodiesteraze 5A	0,062	0,038

^aSpektar aktivnosti koji predviđa PASS prikazan je popisom aktivnosti s vjerojatnostima "aktivnosti" (P_a) i "ne-aktivnosti" (P_i). Što je veća P_a i manja P_i vrijednost, to je veća vjerojanost predviđene aktivnosti.

3. REZULTATI I RASPRAVA



Slika 65. Western blot analiza predviđenih meta za spojeve **127b** i **132c** u stanicama A549.

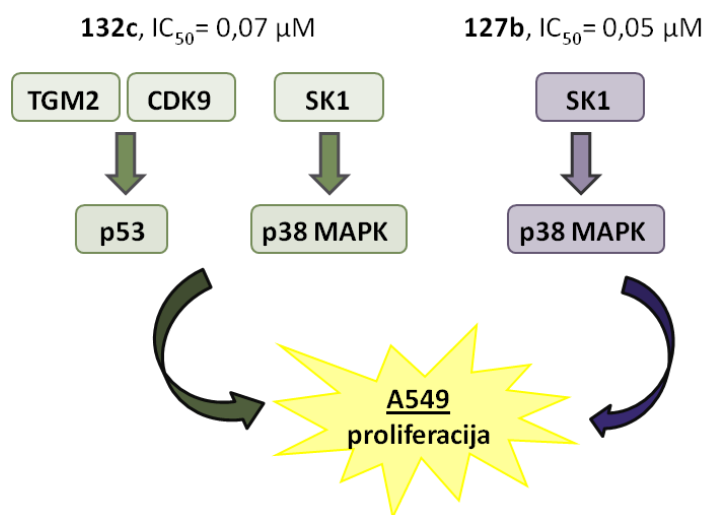
PDE5 je cGMP-specifična fosfodiesteraza koja hidrolizira cGMP u 5'-GMP čime se smanjuje unutarstanična razina cGMP. Utvrđena je prekomjerna ekspresija PDE5 u ne-malim stanicama karcinoma pluća, te je povezana s indukcijom apoptoze [191]. Rezultati Western blot analize pokazali su značajno smanjenje ekspresije PDE5 u stanicama A549 koje su tretirane spojem **132c**, dok takav učinak nije uočen kod spoja **127b**.

Prekomjerna ekspresija CDK9 može dovesti do akumulacije p53 u stanicama astroglioma što upućuje na regulaciju p53 ovisnih o CDK9 [192]. Spoj **132c** izrazito smanjuje razinu ekspresije CDK9/ciklin T1 u A549 stanicama, što je povezano ujedno sa smanjenjem razine fosfo-p53 (Ser15). Nasuprot tome, spoj **127b** ne pokazuje značajnije promjene u ekspresiji CDK9/ciklin T1, iako je opažen trend smanjenja razine fosfo-p53, što upućuje da kinaza CDK9/ciklin T1 nije uključena u regulaciju aktivnosti p53 kod tretmana stanica sa spojem **127b**.

Multifunkcionalan enzim TGM2 katalizira stvaranje intermolekularnih izopeptidnih veza između glutaminskih i lizinskih pobočnih lanaca. Ovaj enzim posjeduje intrinzičnu kinaznu aktivnost fosforiliranja serin/treonina u tumorskom supresorskom proteinu p53 čime je regulirana njegova aktivnost [193]. Western blot analizom je vidljivo da su razine TGM2 i fosfo-p53 značajno smanjene nakon tretiranja sa spojem **132c**, dok njihove razine djelovanjem spoja **127b** nisu značajno promijenjene.

Kinaza SK1 katalizira fosforilaciju sfingozina stvarajući sfingozin-1-fosfat (S1P), lipidni posrednik koji regulira proliferaciju i stanično preživljavanje. Ekspresija SK1 povećana je u tkivima i stanicama karcinoma pluća i korelira s progresijom tumora i niskom stopom preživljavanja pacijenata s NSCLC (eng. *non-small cell lung cancer*), što ukazuje da je SK1 obećavajuća farmakološka meta za liječenje NSCLC. Nadalje, utvrđeno je da SK1 aktivira p38 MAPK u normalnim i tumorskim stanicama [194]. Rezultati pokazuju da spoj **132c** značajno smanjuje razinu ekspresije fosfo-SK1, što je popraćeno padom razine fosfo-p38 MAPK. Isti učinak u nešto slabijoj mjeri opažen je sa spojem **127b**. p38 MAPK fosforilira p53 na serinu 15, što je ključno za stabilnost, reguliranje i funkcionalno aktiviranje p53 tijekom staničnog stresa.

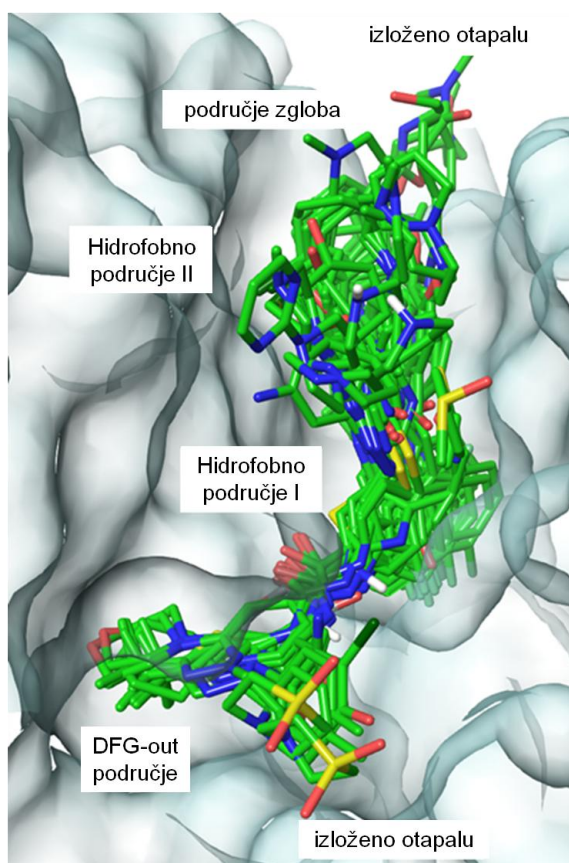
Uzimajući u obzir navedene podatke iz literature i rezultate Western blot analize, smanjenje aktivnosti p53 u stanicama A549 inducirano spojem **132c** može se povezati s nizvodnom regulacijom TGM2, CDK9/ciklin T1 i p38 MAPK. Spoj **127b** ne pokazuje značajan učinak na aktivnosti CDK9 i TGM2, već djeluje na smanjenje aktivnosti SK1 i p38 MAPK (slika 66). Kako je p38 MAPK zajednička biološka meta za spojeve **127b** i **132c** istražene su strukturne analize mogućih intramolekularnih interakcija.



Slika 66. Predloženi signalizacijski put spojeva **127b** i **132c** u stanicama A549.

3.5.5. Strukturna analiza mogućih interakcija spojeva 127b i 132c s p38 MAP kinazom

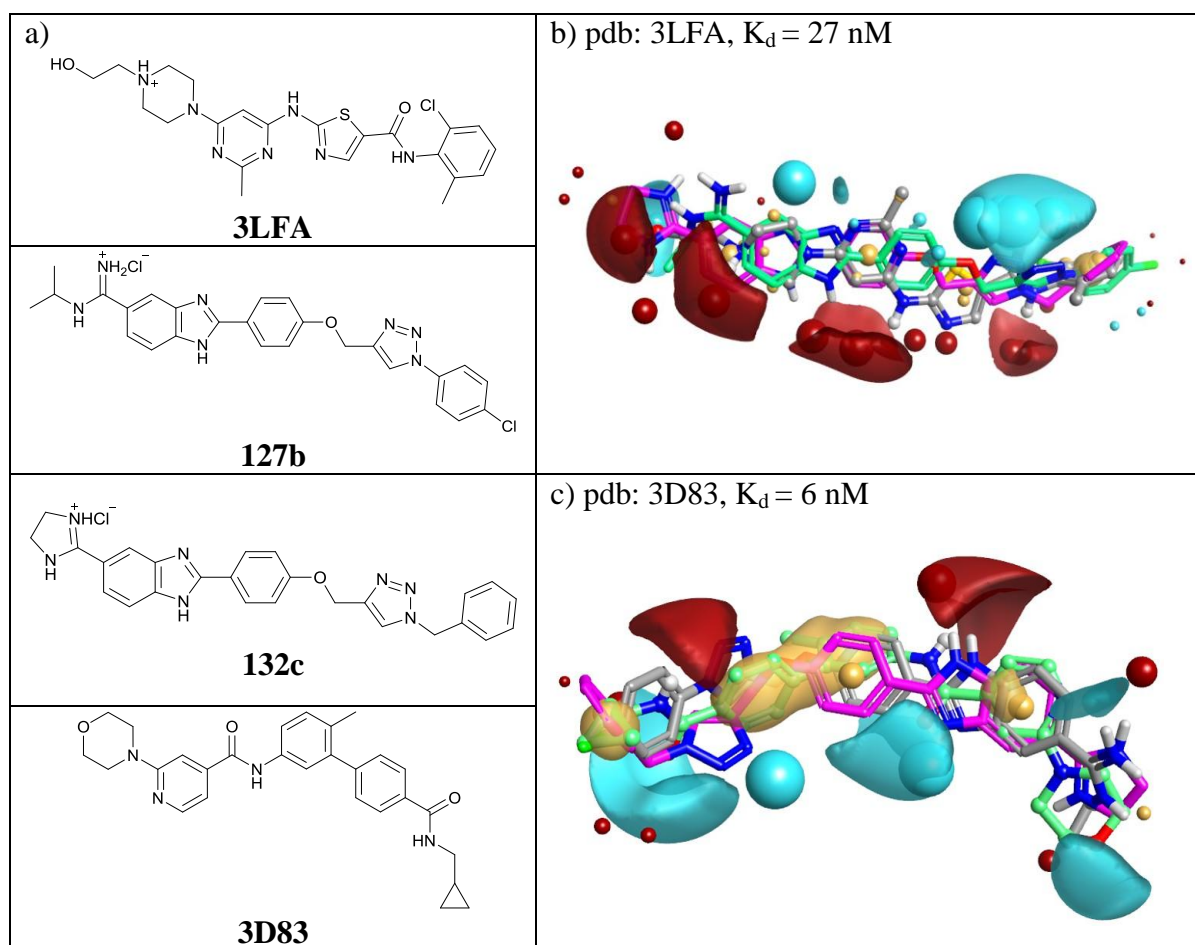
Na temelju rezultata Western blot analize, kao i strukturno srodnih purinomimetika, koji su selektivni inhibitori p38 MAPK (slika 6), provedena su daljnja *in silico* ispitivanja mogućih interakcija sa spojevima **127b** i **132c**. Zbog velikog broja dostupnih kristalnih struktura, ligandi su grupirani u 24 skupine kako bi se dobio reprezentativan, ali strukturno različit set za daljnju analizu, kao što je opisano u eksperimentalnom dijelu. Preklapanje reprezentativnih struktura (slika 67) ukazuje na strukturnu raznolikost i različite načine vezanja poznatih inhibitora u veznom mjestu ATP-a, ali i hidrofobnim područjima I i II, kao i *DFG-out* području. Korištena su dva pristupa kako bi se odredio najvjerojatniji način vezanja spojeva **127b** i **132c** u vezno mjesto ATP-a kinaze p38 MAP: pristup temeljen na interakciji s biološkom metom tj. molekulsko uklapanje (eng. *docking*) u aktivno mjesto i pristup temeljen na preklapanju molekulskih polja s bioaktivnom konformacijom poznatog inhibitora (eng. *molecular field alignment*).



Slika 67. Kristalne strukture inhibitora p38 MAPK preklapljene na p38 α apo-strukturu (pdb: 5UOJ).

3. REZULTATI I RASPRAVA

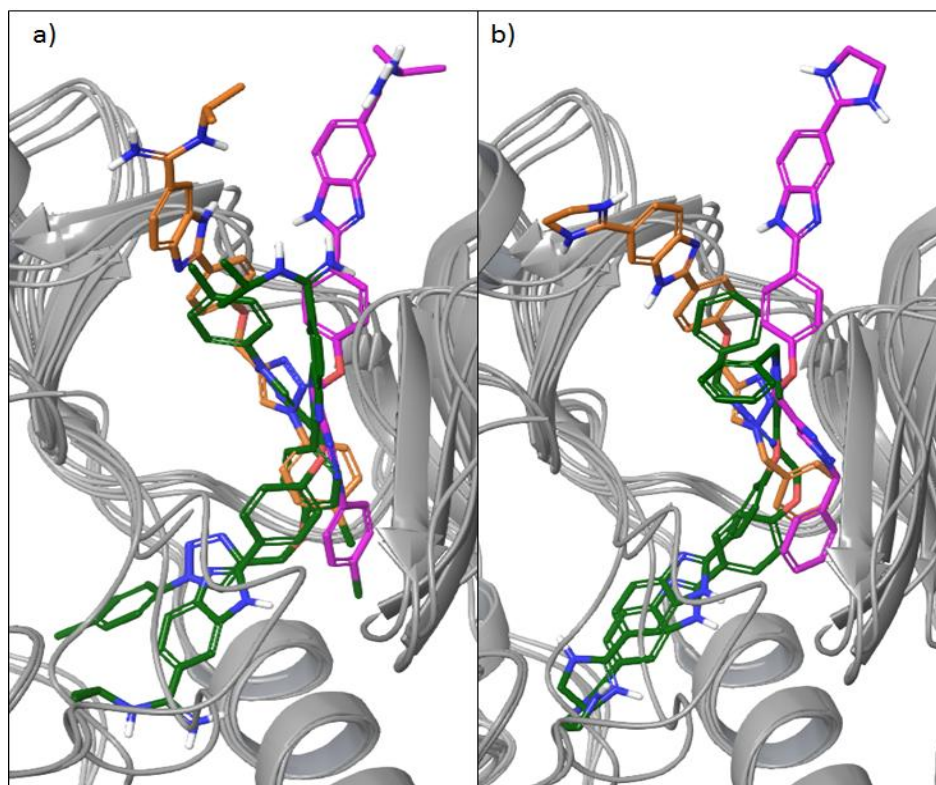
Metoda preklapanja molekularskih polja (eng. *molecular field alignment*) provedena je korištenjem bioaktivnih konformacija dobivenih iz reprezentativnih kristalnih struktura, dok su strukture spojeva **127b** i **132c** generirane konformacijskom analizom. Na slici 68 prikazane su strukture spojeva **127b** i **132c** preklapljene s 3LFA, ligandom srednje aktivnosti ($IC_{50} = 100$ nM), i ligandom 3D83, s niskom nanomolarnom aktivnošću ($IC_{50} = 8$ nM). Preklapanje glavnih farmakofornih točaka provedeno je i s 3LFA i s 3D83 referentnim ligandima. Konformacije **127b** i **132c** preklapljene s reprezentativnim ligandima korištene su za daljnju procjenu energija vezanja pomoću MM-GBSA metode.



Slika 68. Strukture spojeva **127b**, **132c**, 3LFA i 3D83 liganda (a). Konformacije spojeva **127b** (zeleni) i **132c** (ljubičasti) preklapljeni s 3LFA ligandom (sivi) koristeći metodu molekularskih polja (b) i konformacije spojeva **127b** (zeleni) i **132c** (ljubičasti) preklapljeni s 3D83 ligandom (sivi) koristeći metodu molekularskih polja (c). Polja negativnog potencijala (plava), polja pozitivnog potencijala (crvena), hidrofobna polja (žuta).

Molekulsko uklapanje (eng. *docking*) provedeno je koristeći kristalne strukture apo-p38 enzima u *DFG-in* konformaciji (pdb: 3LFA) i p38 u kompleksu s bifenilamidom (pdb: 3D83)

u *DFG-out* konformaciji. Protokol molekuskog uklapanja proveden je bez ograničenja i uz ograničenje (eng. *constrain*) pre-definiranih interakcija u zglobnom području s aminokiselinama Met109 i Gly110. Nadalje, kako bi se istražila mogućnost stvaranja interakcije sa strukturama u kojima je uočeno izvrtnje glicina (Gly110), korištene su strukture 1OUY i 2YIW (slika 69).

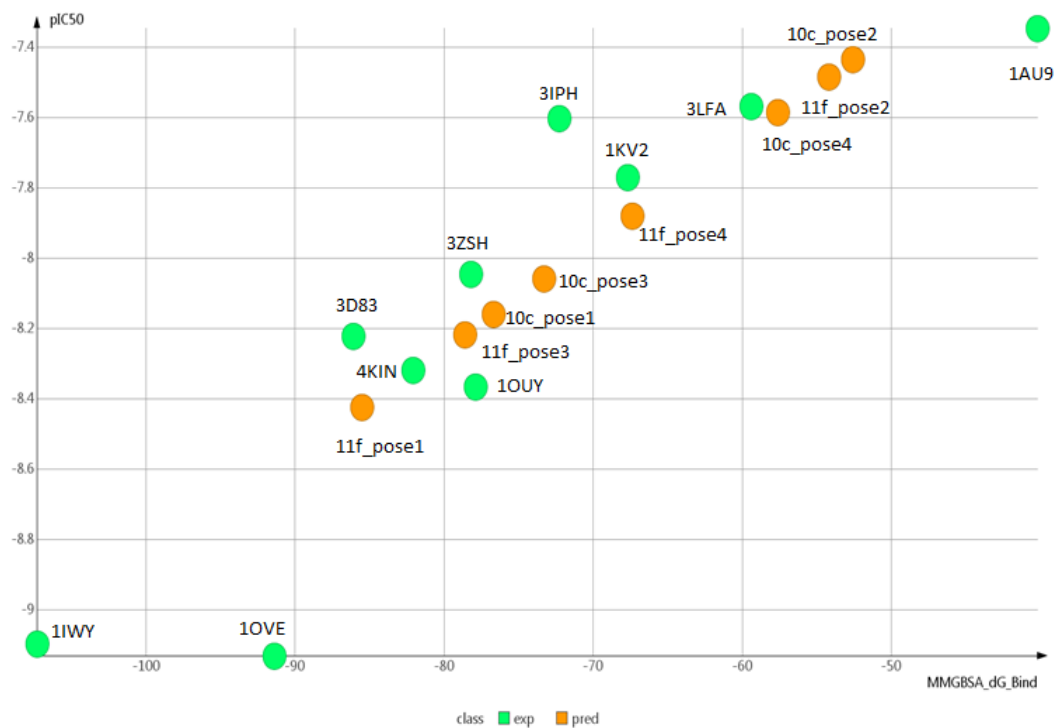


Slika 69. Različiti načini vezanja spojeva **127b** (a) i **132c** (b). Preklopljene proteinske strukture (sivo), *DFG-out* pdb:3D83 i 2IYW (zelena), *DFG-in* pdb:3LFA (ljubičasta) i *DFG-in* pdb: 1OUY (narančasta).

MM-GBSA metodom procijenjena je energija vezanja za različite vezne konformacije spojeva **127b** i **132c** koje su prikupljene molekuskim uklapanjem. S ciljem istraživanja korelacija izračunatih veznih energija MM-GBSA s eksperimentalno određenom inhibicijom, izračunate su vrijednosti ΔG za skup liganada s raspoloživim kristalnim strukturama i inhibicijskim aktivnostima na p38 MAP-kinazu, te je dobiveno dobro slaganje za deset inhibitora (slika 70). Ovi rezultati ukazuju da se primijenjenim računskim protokolima može vjerodostojno procijeniti inhibitorna aktivnost različitih veznih konformacija spojeva **127b** i **132c** u usporedbi s poznatim inhibitorima. Sve predviđene inhibitorne vrijednosti spojeva **127b** i **132c** su u području ispod 100 nM, a konformacije oba spoja vezana za *DFG-out*

3. REZULTATI I RASPRAVA

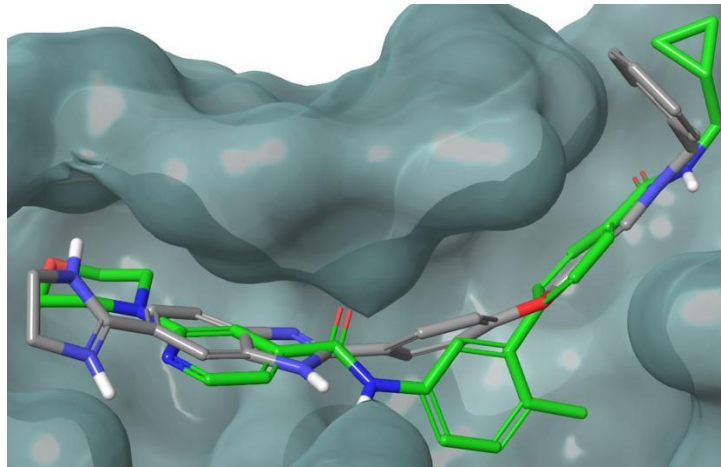
konformaciju 3D83 sličnim načinom vezanja pokazuju naj snažniju aktivnost (**127b**; $IC_{50} = 8$ nM i **132c**; $IC_{50} = 4$ nM). Predviđanje aktivnosti u skladu je s Western blot analizom, prema kojoj **132c** jače smanjuje ekspresiju fosfo-p38 MAPK u stanicama A549 (slika 65).



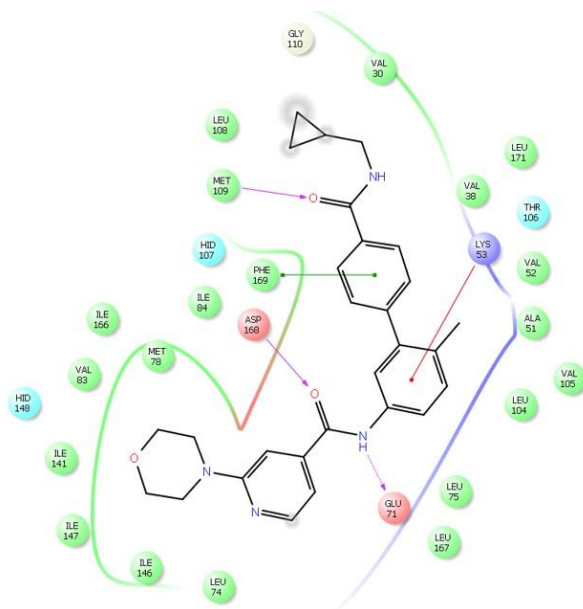
Slika 70. Korelacija eksperimentalnih pIC_{50} vrijednosti i vrijednosti dG izračunatih metodom MMGBSA za skupinu inhibitora kinaze (zeleno). Predviđene vrijednosti pIC_{50} za različite konformacije spojeva **127b** i **132c** (narančasto).

Najbolja predviđena vezna konformacija spoja **132c** u usporedbi s 3D83 ligandom prikazana je na slici 71. Imidazolinilbenzimidazolna skupina stvara tri vodikove veze s aminokiselinama prenosnog područja (Glu71, His148 i Asp168). Oba fenilna supstituenta vezana za triazolni prsten nalaze se u hidrofobnoj okolini, a benzil vezan za *N*-1 položaj triazola ostvaruje π - π interakcije s Phe169. *In silico* analiza, dakle, potvrđuje mogućnost učinkovitog inhibiranja p38 MAP-kinaze pomoću spojeva **127b** i **132c**.

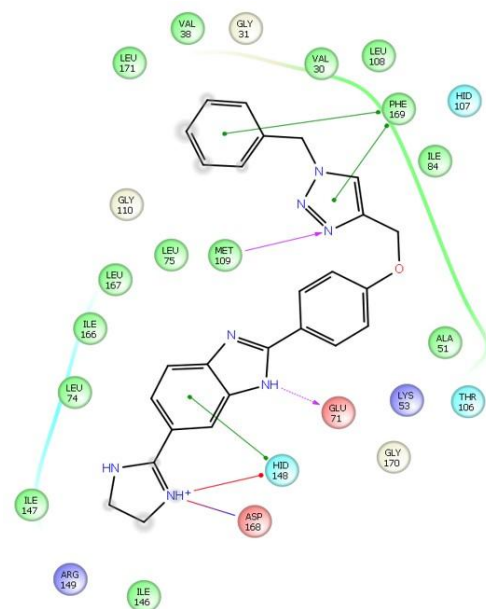
a)



b)



c)



Slika 71. Strukturno preklapanje spoja **132c** (sivo) i 3D83 liganda (zeleno) (a). 2D prikaz 3D83-p38 MAPK interakcija (b). 2D dijagram 131c- p38 MAPK interakcija (c).

3.5.6. Spektroskopska karakterizacija 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola

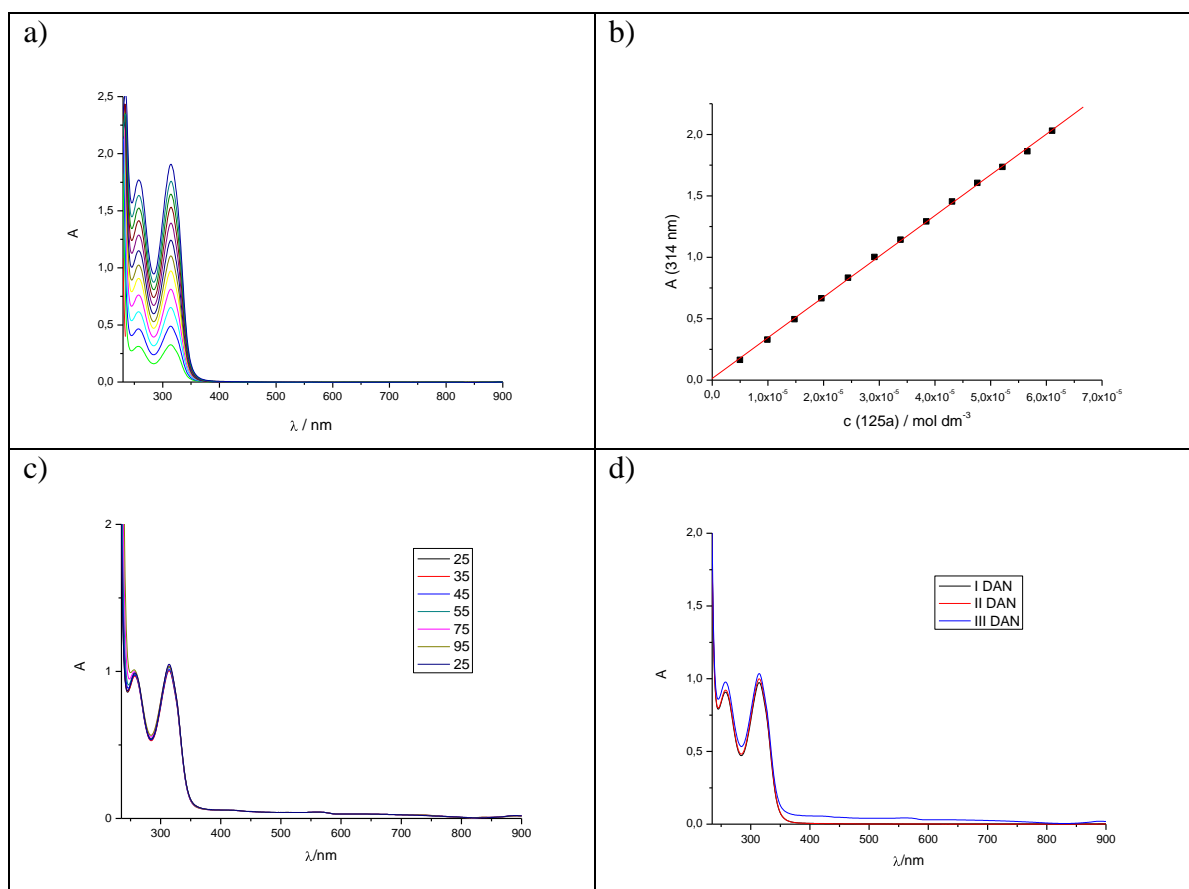
Amidino-supstituirani derivati benzimidazola okarakterizirani su UV/Vis spektroskopijom. Uočena su dva apsorpcijska maksimuma na 260 i 315 nm (tablica 19). Apsorbancije priređenih otopina proporcionalne su njihovim koncentracijama do 1×10^{-4} mol dm^{-3} , što ukazuje da ne postoji značajnije intermolekularno slaganje koje bi moglo dovesti do hipokromnih učinaka. Štoviše, UV/Vis spektri pokazali su zanemarive promjene ovisne o temperaturi (25–90 °C) ukazujući na stabilnost spojeva pri povišenoj temperaturi i nakon hlađenja na 25 °C.

Tabica 19. Molarni apsorpcijski koeficijenti (ϵ)^a određeni za 5(6)-amidino-supstituirane benzimidazole **125a–133a**, **125b–133b** i **125c–133c**.

Spoj	λ_{max} /nm	$\epsilon \times 10^3$ /dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹	Spoj	λ_{max} /nm	$\epsilon \times 10^3$ /dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹	Spoj	λ_{max} /nm	$\epsilon \times 10^3$ /dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹
125a	257	30,7	125b	255	22,4	125c	259	24,9
	314	31,4		313	23,1		313	22,4
126b	260	21,6	126b	254	21,5	126c	260	30,5
	319	11,8		312	22,7		319	26,5
127a	258	30,5	127b	257	28,7	127c	259	35,2
	313	30,5		313	27,5		318	22,6
128a	261	36,5	128b	263	28,7	128c	262	31,1
	313	33,2		313	22,4		321	22,9
129a	259	29,2	129b	257	29,5	129c	263	15,9
	313	21,9		313	30,3		321	11,8
130a	259	29,6	130b	256	28,1	130c	261	30,5
	313	27,0		312	27,5		321	25,2
131a	256	26,9	131b	255	24,3	131c	258	32,5
	313	28,7		313	30,0		317	35,9
132a	257	27,5	132b	255	22,1	132c	259	23,3
	313	35,1		313	26,9		317	26,9
133a	257	31,6	133b	254	20,6	133c	259	34,5
	314	37,7		312	24,3		319	35,3

^a Smjesa vode i DMSO (≥ 1 %).

Na slici 72 dan je primjer UV/Vis spektra spoja **125a** i njegove linearne ovisnosti apsorbcije i koncentracije, te apsorpcijski spektri temperaturne stabilnosti i stabilnosti mjerene unutar 72 h. Rezultati su pokazali da su svi ispitani spojevi stabilni i pogodni za daljnja spektroskopska i biološka ispitivanja.



Slika 72. UV/Vis spektar spoja **125a** kod različitih koncentracija (a), promjena apsorbancije na $\lambda_{\text{max}} = 314$ nm ovisna o promjeni koncentracije (b), temperaturna stabilnost (c) i stabilnost tijekom 72 h (d).

3.5.7. Interakcije 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola s polinukleotidima

3.5.7.1. UV/Vis titracija 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola s *ct*DNA i dsRNA

Interakcije priređenih 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola **125a–133a**, **125b–133b** i **125c–133c** ispitane su s dvolančanim polinukleotidima *ct*DNA, porijeklom iz timusa teleta, i sintetskim RNA polinukleotidima pApU i pCpG. UV/Vis spektroskopija jedna je od najraširenijih metoda za određivanje interakcija malih molekula s DNA. Nastanak kompleksa spoja s polinukleotidima dovodi do promjene u UV/Vis spektru. UV/Vis titracije s *ct*DNA pokazale su hipokromni učinak koji ukazuje na nestanak slobodne molekule i stvaranje kompleksa spoja i *ct*DNA (slika p-3, prilog 3). Hipokromni učinak (12–44 %) popraćen je malim batokromnim pomakom ($\Delta\lambda = 3\text{--}9$ nm).

Ispitane su interakcije spojeva i s dvolančanim dsRNA polinukleotidima (pApU i pCpG). Titracijom spojeva s pApU uočen je hipokromni (19–58 %) i mali batokromni ($\Delta\lambda = 2\text{--}11$ nm) pomak u vidljivim apsorpcijskim spektrima kao posljedica stvaranja kompleksa s polinukleotidima. UV/Vis apsorpcijski maksimum između 300–320 nm značajno se smanjuje titracijom spojeva s pCpG (27–50 %) popraćen sa slabim batokromnim pomakom ($\Delta\lambda = 2\text{--}7$ nm). Na spojevima koji su pokazali minimalne promjene ($\Delta A < 0,08$ nm pri $r = 1\text{--}0,1$) u UV/Vis spektrima tijekom titracije s DNA/RNA polinukleotidima nisu provedena daljnja spektroskopska ispitivanja. Ti spojevi pokazuju mogućnost stvaranja vrlo slabih elektrostatskih interakcija s polinukleotidima (tablica 20). Titracijom spojeva **125a** i **131c** s pApU zabilježena je jasna izosbestična točka u UV/Vis spektrima, što ukazuje na stvaranje jednog dominantnog načina vezanja (slika 73).

Tablica 20. Hipokromni učinak (H/%)^a, konstanta vezivanja ($\log K_s$)^b i omjer n^c ([spoj]/[polinukleotid]) izračunati iz UV/Vis titracija priređenih spojeva s ctDNA/dsRNA (BPE, $I = 0,015$ M, pH = 7).

Spoj	ctDNA			pApU			pCpG		
	H/% ^c	$\log K_s$	n	H/%	$\log K_s$	n	H/% ^c	$\log K_s$	n
125a	7,8	6,76	0,27	19,3	5,24	0,31	5,26	6,44	0,40 ^d
130a	22,1 ^e	-	-	27,9 ^e	-	-	13,7	6,27	0,73
131a	36,3	6,24	0,58	38,9	5,21	0,18	4,82 ^e	-	-
132a	40,4	5,78	0,59	32,5	5,94	0,11	4,96	6,56	0,36
133e	38,2	5,33	0,61	31,7	6,20	0,29	5,79	5,89	0,69
125b	41,0	6,17	0,64	46,5	5,87	0,24	5,86	6,17	0,4 ^d
126b	38,8	5,96	0,55	36,9	5,51	0,35	45,6 ^e	-	-
127b	21,2 ^e	-	-	20,3	5,92	0,21	24,7	6,55	0,39
129b	24,2 ^e	-	-	21,4	5,95	0,23	36,0	6,35	0,51
130b	29,7	6,06	0,62 ^f	57,8	5,27	0,23	5,05	6,39	0,39
131b	33,8	5,64	0,69	50,4	6,00	0,19	5,31	6,43	0,36
132b	41,2	5,93	0,47	53,8	6,13	0,30	6,13	5,54	0,40 ^d
133b	44,2	6,39	0,36 ^f	47,2	5,96	0,30	5,96	7,20	0,28
125c	25,7 ^e	-	-	32,7 ^e	-	-	-	6,21	0,40 ^d
126c	30,3 ^e	-	-	14,7	6,59	0,27	301 ^e	-	-
130c	18,9 ^e	-	-	31,6 ^e	5,46	0,30 ^d	5,46 ^e	-	-
131c	11,7	6,43	0,35	29,3	5,38	0,29	5,34	6,43	0,36
132c	24,6	5,84	0,75	55,5 ^e	5,89	0,30 ^d	5,89	6,59	0,41
133c	41,1	6,21	0,12	31,6	5,36	0,26	5,21	4,29	0,4 ^d

^aHipokromni učinak određen Scatchardovom jednadžbom; $H = (\text{Abs}(\text{spoj}) - \text{Abs}(\text{kompleks})) / \text{Abs}(\text{spoj}) \times 100$.

^b Podatci titracije obrađeni su prema Scatchardovoj jednadžbi.

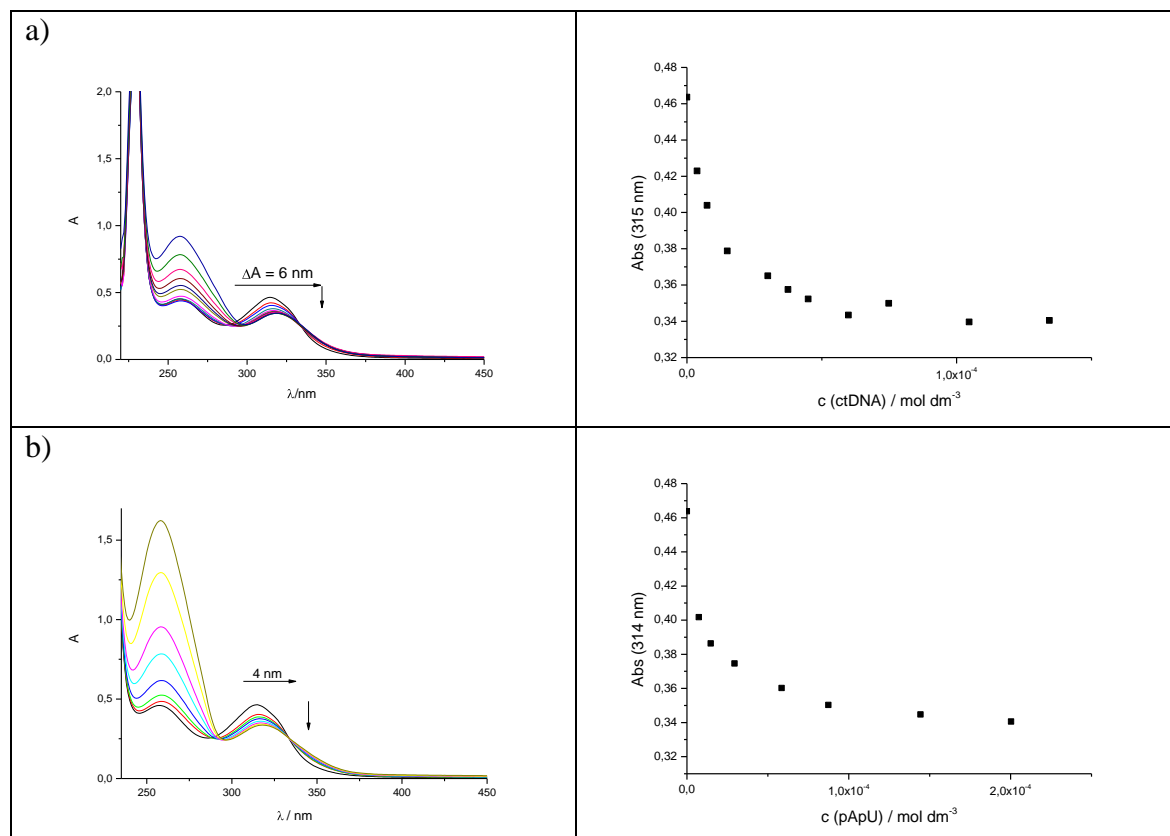
^c Točnost omjera $n \pm 10\text{--}30\%$, zbog čega $\log K_s$ vrijednosti odstupaju u istom redu veličine.

^d $n =$ fiksno.

^e Hipokromni učinak izračunat iz eksperimentalnih podataka.

- = premale promjene za računanje konsatne vezivanja.

^f mješoviti način vezanja, konsata vezivanja izračunata u rasponu $r \geq 0,1$.



Slika 73. Titracijska krivulja spoja **125a** s *ctDNA* (a) i pApU (b).

Konstante vezanja ($\log K_s$) i gustoća veznih mjesta (n) izračunate su pomoću Scatchardovih ploha. Konstante vezanja spojeva **130b** i **131b** izračunate su samo za titracijske podatke snimljene na $r \geq 0,1$, jer su ispod tog omjera promjene apsorpcijskih maksimuma premale za točan izračun ($\Delta A \leq 0,04$). Spektroskopski podaci obrađeni su pomoću Scatchardove jednadžbe za izračunavanje parametara vezanja (tablica 20). Gustoća veznih mjesta (omjer n) dobivenih titracijom spojeva s *ctDNA* ($n = 0,12-0,75$) upućuje na vezanje spojeva u mali utor DNA polinukleotida, kao dominantni način vezanja, dok vrijednosti dobivene za titracije spojeva s dsRNA (pApU, $n = 0,11-0,35$; pCpG, $n = 0,28-0,73$), zajedno sa strukturnim karakteristikama utora ukazuju na interkaliranje, kao dominantni način vezanja. Općenito se može zaključiti da uvođenje halogena u *para* položaj fenilnog prstena vezanog za *N*-1 položaj triazolnog prstena onemogućuje stvaranje nekovalentnih interakcija s polinukleotidima izuzev *N*-izopropilamidinskih derivata benzimidazola **126b**, **127b** i **129b**, te 2-imidazolinil-supstituiranog derivata benzimidazola **126c**. Pored toga, samo spojevi s *p*-fluorfenilnim (**126b** i **126c**) supstituentom na *N*-1 položaju triazolnog prstena pokazuju interakcije *ctDNA*.

3.5.7.2. Određivanje promjene temperature mekšanja (ΔT_m)

Promjena temperature mekšanja (ΔT_m) definirana je kao razlika između točke mekšanja slobodnih polinukleotida i njihovih kompleksa s malim nekovalentno vezanim molekulama. Iako je korelacija između konstante vezanja i povećanja T_m prilično složena, određivanjem točke mekšanja omogućuje se brza kvalitativna procjena relativnih afiniteta vezanja spojeva prema odabranim polinukleotidima (tablica 21). Određivanje točke mekšanja provedeno je s različitim omjerima spojeva ($r = 0,1; 0,3; 0,5$ i $0,7$ ekvivalenata, $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$) s *ctDNA* i pApU polinukleotidima. pCpG polinukleotid posjeduje previsoko vrelište, te promjene temperature mekšanja s tim polinukleotidom nije bilo moguće odrediti. Vrijednosti dobivenih promjena temperatura mekšanja za različite omjere r dane su u tablici 21.

Tablica 21. ΔT_m (°C) priređenih spojeva s polinukleotidima dodavanjem spojeva u različitim omjerima r^b (PBE, pH = 7).^a

Spoj	<i>ctDNA</i>			pApU		
	0,3	0,5	0,7	0,1	0,3	0,5
125a	2,46	4,84	4,69	1,74	1,74	2,53
131a	2,35	3,20	3,77	0,20	2,72	- ^d
132a	3,12	3,86	3,62	2,06	1,14	1,70
133a	2,19	2,62	2,66	0,39	1,11	1,11
					12,58 ^c	15,04 ^c
125b	3,35	3,94	4,25	0,32	0,64	1,11
126b	2,22	2,95	3,95	1,00	1,17	1,49
127b	-	-	-	0,85	0,85	0,85
					15,59 ^c	15,84 ^c
129b	-	-	-	0,12	0,31	1,03
					20,02 ^c	25,08 ^c
130b	4,03	3,96	4,47	1,17	1,32	1,56
					6,38 ^c	8,49 ^c
131b	3,40	3,89	4,39	0,76	0,58	1,12
132b	1,76	3,32	3,63	0,91	0,51	0,72
133b	2,22	1,72	1,71	0,52	0,23	0,26
126c	2,05	3,13	- ^d	2,06	4,09	4,74
					34,39 ^c	38,61 ^c
130c	-	-	-	2,49	2,67	2,92
					36,08 ^c	40,93 ^c
131c	3,55	3,31	3,80	2,85	4,27	5,53
					13,99 ^c	17,73 ^c
132c	3,31	3,52	2,60	1,26	1,42	2,06
					10,30 ^c	13,29 ^c
133c	2,87	3,47	3,60	1,11	0,47	0,47
					12,46 ^c	13,89 ^c

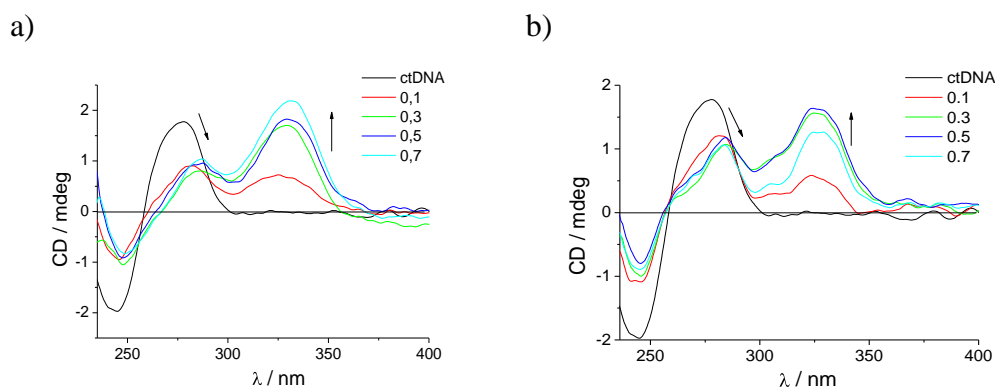
^a Sve vrijednosti su dobivene kao srednja vrijednost iz najmanje dva mjerenja. Pogreška ΔT_m : $\pm 0,5$ °C. ^b $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$. ^c Bifazne denaturacijske krivulje. ^d Nije moguće odrediti.

Utvrđena je nelinearna ovisnost ΔT_m vrijednosti u odnosu na omjer r , što upućuje na zasićenost veznih mjesta za omjer $r = 0,5-0,7$ s *ctDNA* polinukleotidom, te za $r = 0,3-0,5$ s pApU (tablica 21). Bifazne denuracijske krivulje koje se javljaju pri interakciji spojeva **132a**, **133a**, **127b**, **129b**, **130b**, **126c** i **130c–133c** s pApU kod viših omjera r ukazuju na aglomeriranje spojeva duž polinukleotidnih lanaca. Navedeni spojevi imaju monofazne krivulje za $r \leq 0,3$, koje zajedno s rezultatima UV/Vis titracija ukazuju na interkaliranje kao dominantan način vezanja.

3.5.7.3. Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD)

Vežanje akiralnih malih molekula na kiralne molekule DNA/RNA rezultira induciranim spektrom CD (ICD) [196]. Pojava ICD vrpca nakon titracije korištena je za procjenu orijentacije kromofora u veznom mjestu *ctDNA*/dsRNA i određivanje načina vezanja. *ctDNA* sadrži približno 40 % G-C i 60 % A-T parova baza i poprima B-konformaciju s uskim, dubokim i lako dostupnim malim utorom i prilično širokim i plitkim velikim utorom. RNA polimeri, pApU i pCpG, čine A-konformaciju sa širokim malim i uskim velikim utorom. Glavna razlika između dsRNA je prisutnost amino skupina na *N*-2 položaju u gvaninu koja ulazi u utore i time može utjecati na afinitet i način vezanja spojeva koji se ispituju. Uočene promjene intenziteta CD vrpca za *ctDNA*/dsRNA upućuju na djelomični prekid kiralnosti polinukleotidne uzvojnice nakon vezanja male molekule.

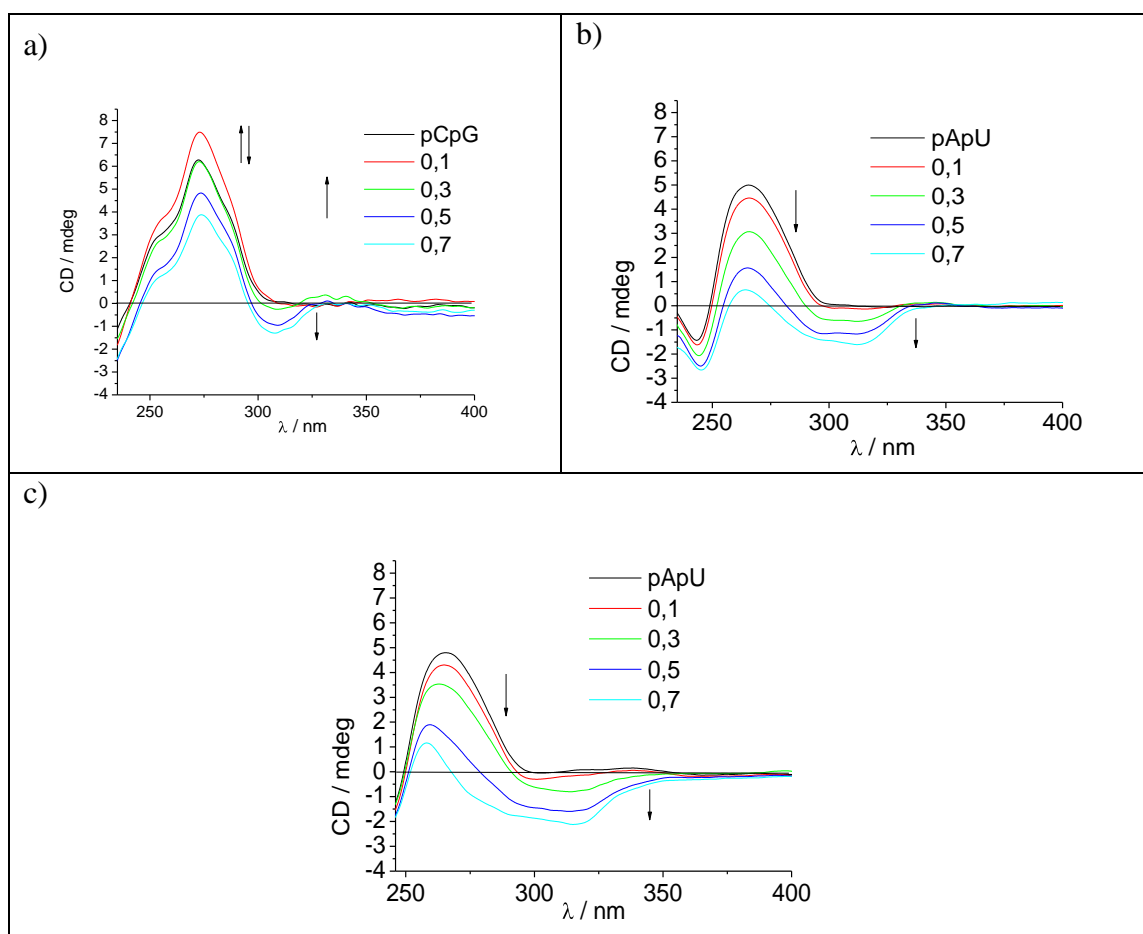
ctDNA pokazuje dva karakteristična signala: pozitivnu vrpca na 280 nm, pripisanu π - π slaganju, i negativnu vrpca na 245 nm zbog kiralnog svojstva. Dodavanjem spojeva u otopinu *ctDNA* vidljiv je snažan, pozitivno inducirani CD signal (ICD) u području od 300-350 nm, popraćen sa smanjenjem vrpce u području od 220 do 300 nm (slika 74 i slika p-4, prilog 3), što ukazuje da je vezanje u mali utor za te spojeve dominantan način vezanja [197].



Slika 74. Inducirani spektri CD spojeva **125a** (a) i **131b** (b) s *ctDNA* ($r = 0-0,7$).

3. REZULTATI I RASPRAVA

U spektrima ICD za pApU i pCpG s ispitanim spojevima dolazi do smanjenja CD vrpce u rasponu od 220-300 nm, te je uočen novi negativan signal pri $\lambda > 300$ nm (slika p-4, prilog 3) kod svih spojeva, osim za **125a**, **125b**, **130b–131b** i **132c**. Spojevi **130a–130c** pokazali su veći afinitet za dsRNA u odnosu na *ctDNA*. Spojevi **130b** i **130c** imaju veći afinitet prema pApU, a spoj **130a** prema pCpG (slika 75). Spektri ICD spojeva **130b** i **130c**, u prisutnosti pApU pokazuju intenzivan porast signala iznad $r = 0,3$, dok spektar ICD spoja **130a** s pCpG pokazuje slabiji signal interkaliranja iznad $r = 0,5$. Ti rezultati su u skladu s dobivenim vrijednostima iz UV/Vis titracija i promjenama temperature mekšanja. Minimalne promjene intenziteta CD vrpce u prisutnosti pCpG nakon titracije sa spojevima **125a**, **125b**, **127b**, **130b–132b** i **132c**, ukazuju na nespecifičan način vezanja. Najvjerojatnije se spojevi agregiraju na pCpG polinukleotid.



Slika 75. Spektri ICD u prisutnosti polinukleotida dsRNA a spojevima **130a** (a), **130b** (b) i **130c** (c).

3.5.8. Antibakterijska aktivnost *in vitro*

Provedena su ispitivanja antibakterijskog djelovanja *in vitro* 5(6)-amidino-supstituiranih derivata benzimidazola **125a–125c**, **130a–133a**, **130b–133b** i **130c–133c**, koji su pokazali interakcije s dvolančanim polinukleotidima. Ispitani su na gram-pozitivnim bakterijama *S. aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), i gram-negativnim bakterijama, *E. coli* (ATCC 25925), *K. pneumoniae* (ATCC 700803), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) i *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606). Utvrđene su minimalne koncentracije inhibicije (MIC) i uspoređene s vrijednostima antibiotika ceftazidima (CAZ), ciprofloksacina (CIP), ampicilina (AMP) i gentamicina (GEN) (tablica 22).

Tablica 22. Antibakterijska aktivnost spojeva **125a–125c**, **130a–133a**, **130b–133b** i **130c–133c** protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih sojeva.

Spoj	MIC (µg/mL)					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
	ATCC 25923	ATCC 29212	ATCC 25925	ATCC 700803	ATCC 27853	ATCC 19606
125a	32	64	32	128	128	>256
130a	>256	128	>256	>256	>256	>256
131a	64	64	256	>256	>256	>256
132a	32	64	32	64	32	>256
133a	32	128	32	128	64	>256
125b	128	256	256	>256	>256	>256
130b	128	64	256	>256	>256	>256
131b	32	64	256	>256	>256	>256
132b	64	128	>256	>256	>256	>256
133b	64	256	256	>256	>256	>256
125c	128	128	256	>256	>256	>256
130c	128	256	256	>256	>256	>256
131c	128	32	256	>256	>256	>256
132c	64	128	128	>256	128	>256
133c	32	128	64	>256	128	>256
CAZ	-	-	0,5	-	4	-
CIP	-	-	0,004	0,06	0,5	0,06
AMP	1	2	-	-	-	-
GEN	0,125	8	-	-	-	-

Spojevi su pokazali bolju aktivnost protiv gram-pozitivnih u odnosu na gram-negativne bakterije. Samo su spojevi **125a**, **132a**, **133a**, **132c** i **133c** imali aktivnost na gram-negativne sojeve. Spojevi koji su pokazali antibakterijsku aktivnost MIC < 256 µg/mL (tablica 22)

3. REZULTATI I RASPRAVA

ispitani su na klinički rezistentne gram-pozitivne sojeve: *S. aureus* rezistentan na meticilin (MRSA), *S. aureus* osjetljiv na meticilin (MSSA) i *E. faecium* rezistentan na vankomicin (VRE) (tablica 23) i gram-negativne kliničke sojeve: *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* rezistentne na β -laktamske antibiotike (ESBL, eng. *extended-spectrum β -lactamases*) (tablica 24).

Tablica 23. Antibakterijsko djelovanje odabranih spojeva protiv gram-pozitivnih kliničkih sojeva rezistentnih na antibiotike.

Spoj	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>S. aureus</i> MSSA	<i>E. faecium</i> VRE
125a	16	32	32
130a	-	-	256
131a	16	32	256
132a	16	32	32
133a	32	128	64
125b	8	128	128
130b	16	64	128
131b	8	16	32
132b	32	64	64
133b	8	64	64
125c	128	128	128
130c	256	256	256
131c	8	128	64
132c	64	64	64
133c	64	64	32
AMP	4	1	1
GEN	0,25	0,125	0,25

Tablica 24. Antibakterijsko djelovanje odabranih spojeva protiv gram-negativnih kliničkih sojeva rezistentnih na antibiotike.

Spoj	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>E. coli</i> ESBL	<i>K. pneumoniae</i> ESBL	<i>P. aeruginosa</i> ESBL
125a	4	8	128
132a	16	16	32
133a	32	16	32
132c	128	-	128
133c	64	-	64
CAZ	8	>128	32
CIP	>128	1	8

N-izopropilamidino-supstituirani benzimidazoli (**125b**, **130b–133b**) pokazali su naj snažniju aktivnost protiv soja MRSA (MIC = 8-32 µg/mL) Također su u nešto slabijoj mjeri pokazali djelovanje protiv soja MSSA (MIC = 16-128 µg/mL). 2-Imidazolinil-supstituirani derivat benzimidazola **131c** imao je i snažnu aktivnost protiv soja MRSA (MIC = 8 µg/mL). Naj snažniju aktivnost, veću od referentnih antibiotika ceftazidima i ciprofloksacina, protiv gram-negativnih kliničkih sojeva rezistentnih na antibiotike pokazao je amidino-supstituirani benzimidazol **125a** s *N*-1-fenil-1,2,3-triazolnim supstituentom (*E. coli* (*ESBL*), MIC = 4 µg/mL; *K. pneumoniae* (*ESBL*), MIC = 8 µg/mL). Utvrđena je, nadalje, povezanost antibakterijske aktivnosti i interakcije spojeva s *ctDNA*/*RNA*. Spojevi **130a**, **125c** i **130c** nisu se vezali za *ctDNA* i pokazali su samo marginalne antimikrobne aktivnosti (IC₅₀ ≥ 128 µg/mL). Nasuprot tome, amidino-supstituirani benzimidazol **125a**, koji je pokazao afinitet prema *ctDNA*, posjeduje naj snažnije djelovanje protiv *E. coli* rezistentne na β-laktamske antibiotike (*ESBL*).

3.5.9. Ispitivanje antitripanosomskog djelovanja

Rezultati *in vitro* ispitivanja protiv *Trypanosoma brucei* priređenih spojeva i nifurtimoksa (NFX), kao referentnog lijeka, prikazani su u tablici 25.

Tablica 25. Antitripanosomsko djelovanje protiv soja *T. brucei*^a.

Spoj	<i>T. brucei</i>		Spoj	<i>T. brucei</i>	
	IC ₅₀ (µM)	IC ₉₀ (µM)		IC ₅₀ (µM)	IC ₉₀ (µM)
125a	8,6 ± 0,5	16,2 ± 0,9	132b	12,9 ± 0,2	21,6 ± 0,4
130a	1,5 ± 0,3	8,1 ± 0,6	133b	13,5 ± 0,8	22,5 ± 0,3
131a	>15	-	125c	7,9 ± 0,4	17,2 ± 1,2
132a	12,9 ± 0,2	18,2 ± 1,0	130c	1,6 ± 0,4	7,3 ± 0,3
133a	10,2 ± 1,3	15,9 ± 0,4	131c	>15	-
125b	7,1 ± 0,7	16,7 ± 1,2	132c	10,8 ± 0,4	>25
130b	1,1 ± 0,3	3,5 ± 0,2	133c	9,7 ± 0,2	14,0 ± 0,3
131b	>15	-	NFX	4,4 ± 0,7 ^b	-

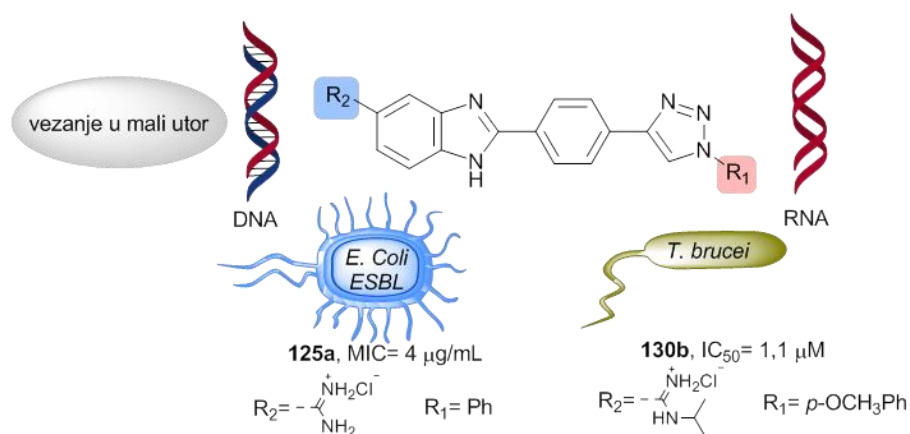
^a *In vitro* aktivnost protiv *T. brucei* izražena u koncentraciji koja inhibira rast za 50 % (IC₅₀) i 90 % (IC₉₀).

^b Iz ref. [198]

Iz dobivenih rezultata antitripanosomskog djelovanja može se uočiti snažan utjecaj supstituenta u *N*-1 položaju 1,2,3-triazolnog prsten na aktivnost spojeva. Aktivnost se smanjuje prema sljedećem redoslijedu: *p*-OCH₃ > Ph > PhSCH₂ > Bn > *o*-Cl. Amidinska skupina ne pokazuje značajan utjecaj na antitripanosomsku aktivnost. *o*-Klorfenilni

supstituent kod spojeva **131a–131c** izaziva gubitak aktivnosti protiv *T. brucei* ($IC_{50} > 15 \mu M$), dok prisutnost *p*-metoksifenilnog supstituenta kod spojeva **130a–130c** značajno povećava aktivnost protiv *T. brucei*, pri čemu *N*-izopropilamidino-supstituirani analog benzimidazola **130b** pokazuje najsnažniju aktivnost ($IC_{50} = 1,1 \mu M$; $IC_{90} = 3,5 \mu M$), četiri puta snažniju u odnosu na referentni antibiotik nifurtimoks.

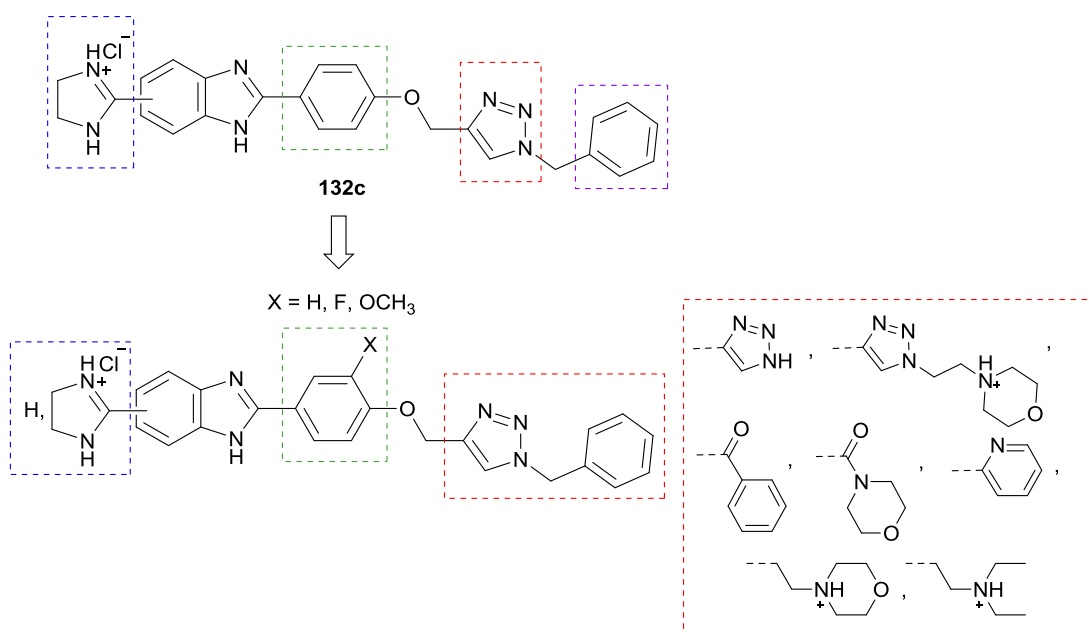
Prema rezultatima ispitivanja interakcije s *ctDNA*, UV/Vis titracijama i promjenom temperature mekšanja, može se zaključiti da spojevi **130a–130c** imaju slabi afinitet prema *ctDNA*, te da ona nije primarna meta njihovog antitripanosomskog djelovanja. Nadalje, spojevi **130a–130c** pokazuju veći afinitet prema RNA polinukleotidima (pApU i pCpG) (slika 76).



Slika 76. Mogući mehanizam djelovanja za spojeve **125a** i **130b** s najsnažnijim antibakterijskim i antitripanosomskim djelovanjem.

3.6. Strukturno modificirani 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirani hibridi benzimidazola kao potencijalni inhibitori DFG-out konformacije kinaze p38 MAP

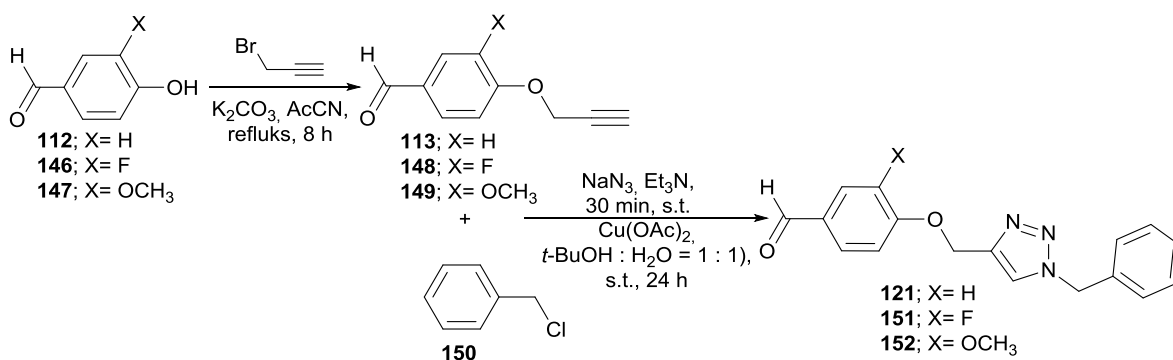
S obzirom na podatke dobivene *in silico* analizom mogućih interakcija spoja **132c** s DFG-out konformacijom kinaze p38 MAP (slika 71) priređena je virtualna biblioteka spojeva na temelju koje su dizajnirani i sintetizirani 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirani derivati benzimidazola kao analozi spoja **132c** s ciljem dobivanja boljih farmakoloških svojstava (topljivost, permeabilnost, Ro5) i snažnijeg djelovanja na potencijalnu metu p38 MAP-kinazu (slika 77). Kako bi se ispitao utjecaj imidazolne skupine na inhibitorni učinak priređen je nesupstituirani derivat benzimidazola. S ciljem poboljšanja lipofilnosti, na fenoksimetilensku prenosnicu uvedeni su kao upstituenti fluor i metoksi skupina. Priređen je nesupstituirani triazolni derivat, kao i derivati s polarnijim etilmorfolinskim supstituentom na triazolnom prstenu. Nadalje, kako bi se ispitao utjecaj triazolne jezgre na farmakokinetička svojstva priređeni su benzoilni, morfolinoilni i piridinski derivati, kao i etilmorfolinski i dietilaminoetilni derivati koji ne sadrže triazolni prsten, za koje je pretpostavljeno da će imati slabiju interakciju s p38 MAPK.



Slika 77. Opći prikaz strukturnih izmjena na spoju **132c**.

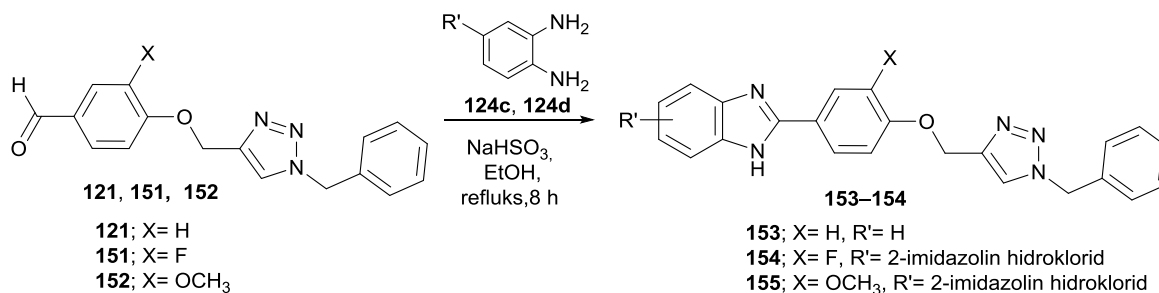
3.6.1. Sinteza strukturno modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola

O-propargilirani benzaldehidni prekursori s fluor (**148**) i metoksi supstituentom (**149**) u *para* položaju fenilnog prstena priređeni su reakcijom 3-fluor-4-hidroksibenzaldehida (**146**) i 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida (**147**) s propargilnim bromidom. Zatim su *one-pot click* reakcijom benzilnog klorida (**150**) i odgovarajućeg *O*-propargiliranog benzaldehida (**113**, **148** i **149**) pripremljeni 1-benzil-1,2,3-triazolni benzaldehidi (**121**, **151** i **152**) u dobrom iskorištenju (82–92 %). 1,3-dipol, kao odgovarajući organski azid priređen je *in situ* supstitucijom benzilnog klorida (**150**) s natrijevim azidom, a kao izvor bakra upotrijebljen je bakrov(II) acetat u smjesi otapala *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1 (shema 47).



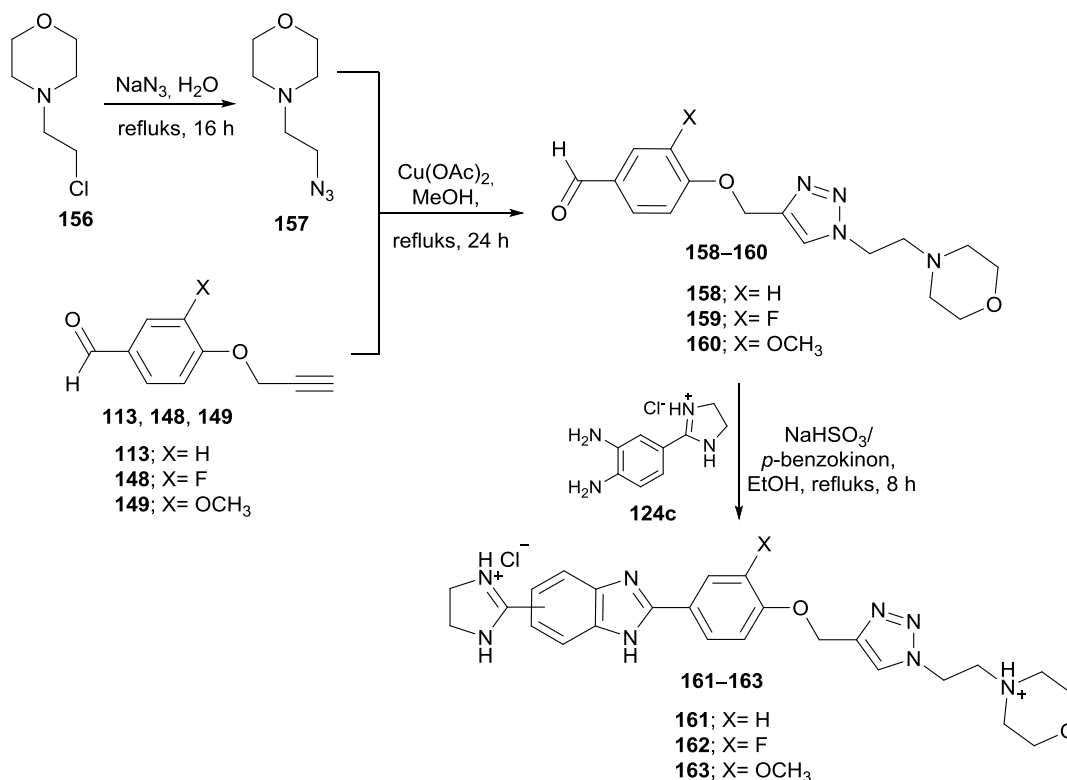
Shema 47. *One-pot* sinteza benzaldehida **121**, **151** i **152**.

Kako bi se ispitaio utjecaj amidinskog supstituenta na farmakološka i inhibitorna svojstva sintetiziran je nesupstituirani analog benzimidazola **153** reakcijom *o*-fenilendiamina **124d** s benzaldehidom **121** u iskorištenju od 94 %, dok su fluor i metoksi supstituirani 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirani analozi benzimidazola **154** i **155** priređeni reakcijom odgovarajućih benzaldehidnih prekursora **151** i **152** s *o*-fenilendiaminom **124c**. Reakcije kondenzacije provedene su korištenjem NaHSO₃ kao oksidacijskog sredstva (shema 48).



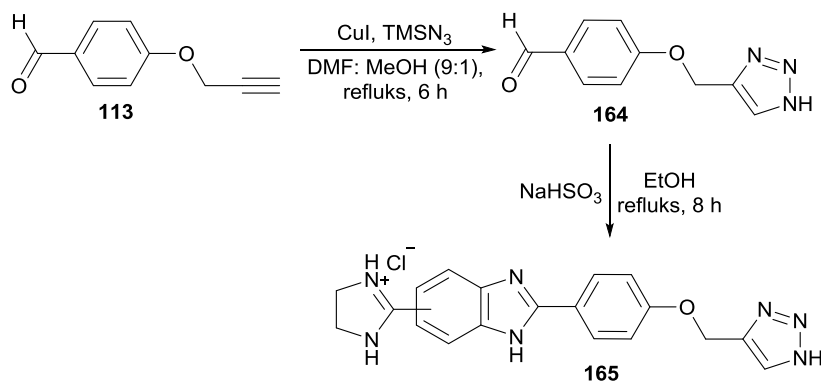
Shema 48. Sinteza benzimidazolnih hibrida **153–155**.

Radi poboljšanja topljivosti hibrida benzimidazola u *N*-1 položaj 1,2,3-triazolnog prstena uveden je polarniji etilmorfolinski supstituent. 1,3-dipolarnom cikloadicijom terminalnih alkina **113**, **148** i **149** i etilmorfolinskog azida (**157**) kataliziranom bakrom priređeni su odgovarajući 1-etilmorfolin-1,2,3-triazolni benzaldehidi (**158–160**), a kao izvor bakra korišten je sustav $\text{Cu}(\text{OAc})_2/\text{MeOH}$. Ciljani 5(6)-(2-imidazolil)-supstituirani hibridi benzimidazola (**161–163**) priređeni su ciklizacijom 4-(2-imidazolil)-1,2-fenilendiamina (**124c**) s odgovarajućim benzaldehydima (**158–160**) uz *p*-benzokinon ili NaHSO_3 (shema 49).



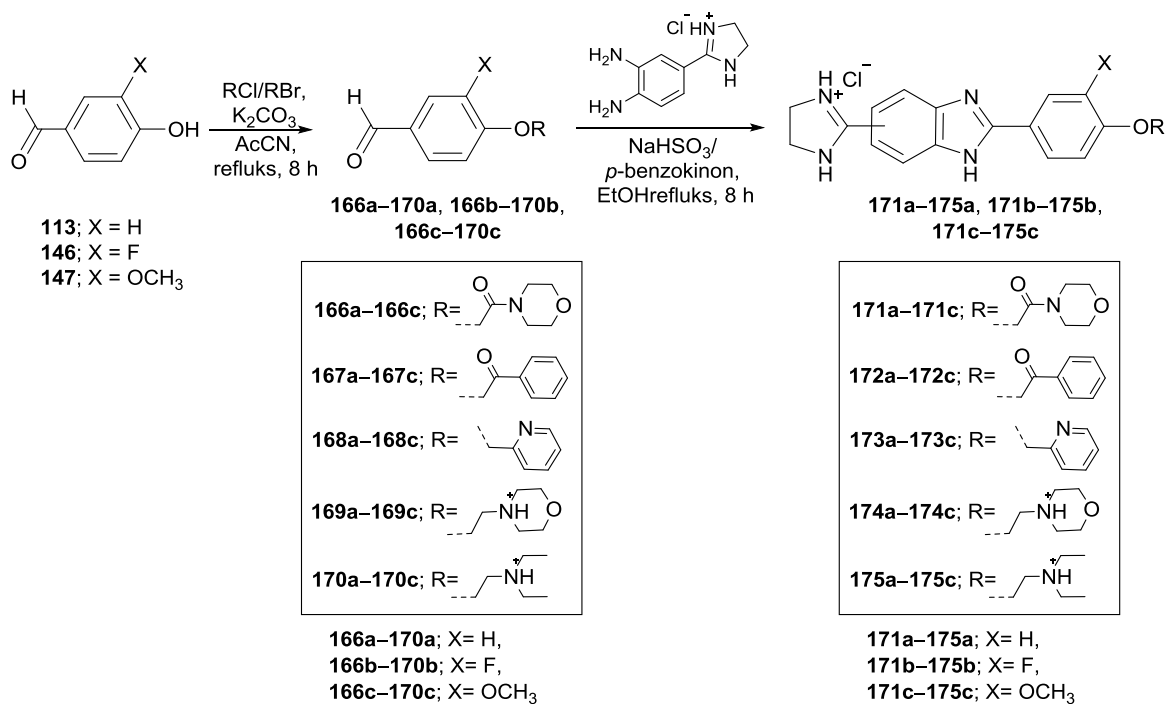
Shema 49. Sinteza benzimidazolnih hibrida **161–163**.

Nadalje, pripravljen je i nesupstituirani triazolni 5(6)-(2-imidazolil)-supstituirani hibrid benzimidazola **165**. U dipolarnoj cikloadiciji *O*-propargiliranog benzaldehida **113** s trimetilsililazidom uz CuI , kao katalizator, priređen je prekursor **164**, koji zatim kondenzacijom s **124c** daje ciljani benzimidazol **165** (shema 50).



Shema 50. Sinteza 2-imidazolinil-supstituiranog hibrida benzimidazola **165**.

Sinteza 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranog hibrida benzimidazola (**171a–175a**, **171b–175b** i **171c–175c**) koji ne sadrže triazolni prsten prikazana je na shemi 51. Reakcijom *O*-alkiliranja s odgovarajućim halogenidom, uz K_2CO_3 kao deprotonirajuće sredstvo, priređeni su benzaldehidni prekursori s morfolinilnim (**166a–166c**), benzoilnim (**167a–167c**), piridinskim (**168a–168c**), etilmorfolinskim (**169a–169c**) i dietilaminoetilnim (**170a–170c**) supstituentom. Priređeni aldehidi prevedeni su u ciljane 2-aril-5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirane hibride benzimidazola korištenjem *p*-benzokinona ili $NaHSO_3$ kao oksidacijskog sredstva.



Shema 51. Sinteza 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola **171a–175a**, **171b–175b** i **171c–175c**.

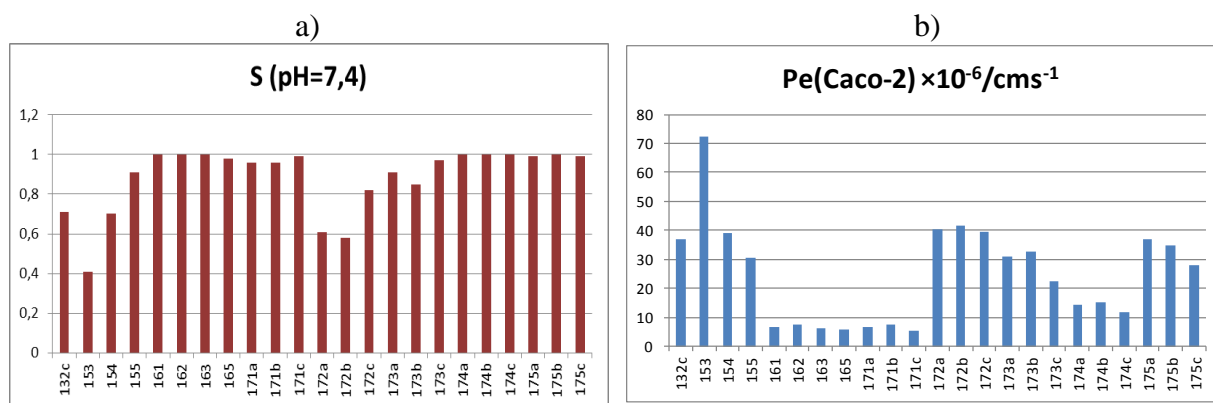
3.6.2. *In silico* predviđanje farmakokinetičkih svojstava strukturno modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola

In silico metodom određeni su farmakokinetički parametri za strukturno modificirane 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirane hibride benzimidazola **153–155**, **161–163**, **165**, **171a–175a**, **171b–175b** i **171c–175c**, koji su uspoređeni s dobivenim vrijednostima za početnu strukturu **132c**. Strukturna svojstva spojeva, poput molekulske mase ($M_r \leq 500$), broja donora vodikovih veza ($HBD \leq 5$), akceptora vodikovih veza ($HBA \leq 10$), rotabilnih veza ($ROTB \leq 10$), aromatskih prstenova ($AROM \leq 4$), koeficijenta razdjeljenja ($\log P \leq 3$), koeficijenta distribucije ($\log D \leq 3$) i ukupne polarne površine (eng. *total polar surface area*, $TPSA \leq 140 \text{ \AA}^2$) povezana su s dobrom oralnom bioraspoloživosti. U tablici 26 dane su vrijednosti navedenih strukturnih svojstava za priređene 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirane hibride benzimidazola. U odnosu na granične vrijednosti pojedinih strukturnih svojstava definirane Ro5 [199] i Veberovim [200] pravilom, vidljivo je da spoj **163** odstupa od graničnih vrijednosti ($M_r = 502,57$ i $HBA = 11$), dok spojevi **132c** i njegovi strukturni analozi **153**, **154** i **155** imaju više aromatskih jezgri.

Tablica 26. Strukturna svojstva priređenih 5(6)-imidazolinil-benzimidazolnih hibrida.

Spoj	M_r	HBD	HBA	ROTB	AROM	logP	logD	TPSA
132c	449,51	2	8	7	5	2,96	1,10	93,01
153	384,43	1	6	6	5	4,15	4,15	68,62
154	467,50	2	8	7	5	3,07	1,21	93,01
155	479,53	2	9	8	5	2,67	0,81	102,24
161	472,54	2	10	8	4	1,20	-0,70	105,48
162	490,53	2	10	8	4	1,32	-0,58	105,48
163	502,57	2	11	9	4	1,17	-0,73	114,71
165	359,38	3	8	5	4	1,58	-0,26	103,87
171a	405,45	2	8	5	3	1,14	-0,72	91,84
171b	423,44	2	8	5	3	1,27	-0,59	91,84
171c	435,48	2	9	6	3	0,98	-0,88	101,07
172a	396,44	2	6	6	4	3,09	1,23	79,37
172b	414,43	2	6	6	4	3,17	1,31	79,37
172c	426,47	2	7	7	4	3,08	1,22	88,60
173a	369,42	2	6	5	4	2,62	0,76	75,19
173b	387,41	2	6	5	4	2,70	0,84	75,19
173c	399,45	2	7	6	4	2,24	0,38	84,42
174a	391,47	2	7	6	3	1,81	-0,09	74,77
174b	409,46	2	7	6	3	1,86	-0,03	74,77
174c	421,49	2	8	7	3	1,66	-0,25	84,00
175a	395,47	2	6	8	3	2,99	-0,71	65,54
175b	377,48	2	6	8	3	2,87	-0,88	65,54
175c	407,51	2	7	9	3	2,57	-1,20	74,77

Apsorpcija ovisi o nizu fizikalno-kemijskih svojstava od kojih su najznačajniji topljivost i permeabilnost. Vrijednosti predviđene vjerojatnosti topljivosti (S) u koncentraciji od 10–60 µg/mL i permeabilnosti prikazane su u tablici 27 i na slici 78. Općenito, topljivost spojeva je podijeljena prema sljedećim koncentracijama: niska topljivost < 10 µg/mL, umjerena topljivost 10–60 µg/mL i visoka topljivost > 60 µg/mL [201]. Vrijednosti permeabilnosti određene su na modelu stanica karcinoma debelog crijeva (Caco-2) sa sljedećim parametrima: niska permeabilnost ($Pe < 1 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$), srednja permeabilnost ($Pe = 1 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1} - 10 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$), visoka permeabilnost ($Pe > 10 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$). Kako su topljivost i permeabilnost često obrnuto proporcionalne potrebno je definirati spojeve koji zadovoljavaju permeabilnost, a ujedno pokazuju dobru topljivost. Prema određenim vrijednostima topljivosti predvodni spoj **132c** kao i njegovi analozi **153**, **154**, **172a** i **172b** pokazuju slabu topljivost, istodobno pokazujući izrazito visoku permeabilnost. Nadalje, 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirani hibridi benzimidazola s morfolinskim ostatkom vezanim za triazol (**161–163**) ili preko karbonilnog kisika (**171a–171c**), te nesupstituirani triazolni analog **165** pokazuju visoku vjerojatnost topljivosti, ali srednje permeabilnosti. Najbolja fizikalno-kemijska svojstva pokazuju analozi s dietilaminoetilnim supstutentom (**175a–175c**), analozi s piridinskim supstutentom (**173a–173c**), 1-benzil-triazolilom supstituirani hibrid **155**, benzoilom supstituirani derivat **172c** i morfoliniletilom supstituirani hibridi **174a–174c**.



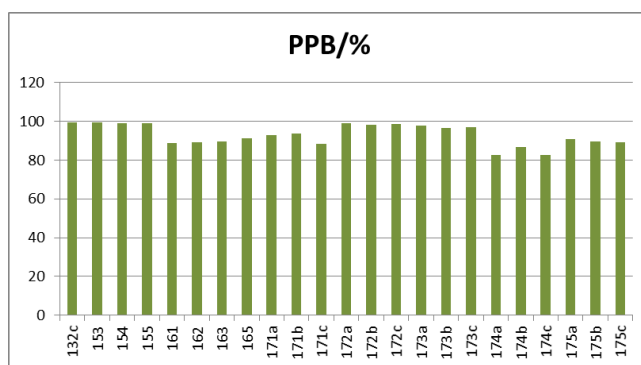
Slika 78. Histogram vjerojatnosti topljivosti u koncentraciji od 10–60 µg/mL (a) i permeabilnosti (b) 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola.

Tablica 27. Fizikalno-kemijska i biokemijska svojstva priređenih hibrida.

Spoj	X	R	S ^a (pH=7,4)	Pe(Caco-2) × 10 ⁻⁶ /cms ⁻¹	PPB/%	CYP3A4 ^b supstrat
132c	H		0,71	37,11	99,34	0,60
153	H		0,41	72,4	99,62	0,77
154	F		0,70	39,21	98,92	0,64
155	OCH ₃		0,91	30,63	98,98	0,73
161	H		1,00	6,52	88,65	0,51
162	F		1,00	7,56	89,15	0,60
163	OCH ₃		1,00	6,17	89,55	0,54
165	H		0,98	5,65	91,08	0,14
171a	H		0,96	6,55	92,85	0,47
171b	F		0,96	7,69	93,58	0,50
171c	OCH ₃		0,99	5,24	88,31	0,52
172a	H		0,61	40,30	99,20	0,50
172b	F		0,58	41,68	98,15	0,45
172c	OCH ₃		0,82	39,72	98,63	0,57
173a	H		0,91	31,00	97,68	0,26
173b	F		0,85	32,77	96,71	0,36
173c	OCH ₃		0,97	22,35	96,81	0,54
174a	H		1,00	14,23	82,86	0,54
174b	F		1,00	15,04	86,93	0,56
174c	OCH ₃		1,00	11,82	82,80	0,61
175a	H		0,99	37,08	90,82	0,74
175b	F		1,00	34,68	89,63	0,60
175c	OCH ₃		0,99	27,84	89,41	0,79

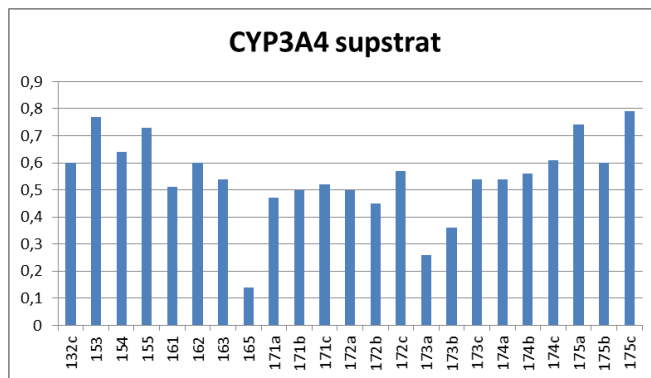
^aS = vjerojatnost topljivosti u koncentraciji od 10–60 µg/mL pri pH = 7,4 tako da je 1 najvjerojatnija, a 0 najmanje vjerojatna topljivost. ^bVjerojatnost djelovanja kao supstrat za CYP3A4: 1 je najveća vjerojatnost, a 0 najmanja vjerojatnost djelovanja.

Aktivna supstancija se u krvi može vezati za proteine plazme ili se može nalaziti u nevezanom stanju. Nevezani dio aktivne tvari može stvarati interakcije s biološkom metom i kao rezultat imati farmakološki učinak. Protein PBB (eng. *plasma preotein binding*) definiran je kao udio vezane tvari u plazmi. Idealni PPB je između 50 % i 90 %. Prema vrijednostima dobivenih *in silico* metodom (tablica 27, slika 79), vidljivo je da predvodni spoj **132c**, 1-benzil-1,2,3-triazolni analozi **153–155**, benzoilni derivati **172a–172c** i piridinski analozi **173a–173c** pokazuju visok udio vezane tvari, PPB > 95 % dok je oko 5 % spoja u nevezanom obliku te može pokazati farmakološko djelovanje.



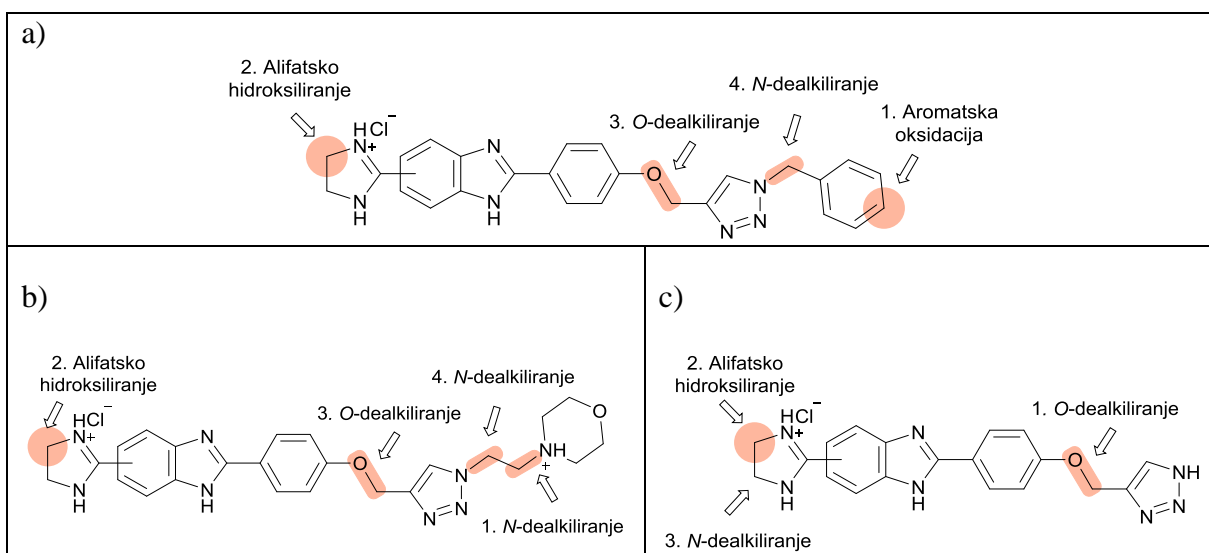
Slika 79. Histogram PPB vrijednosti za 5(6)-imidazolinil-benzimidazolne hibride.

U metabolizmu aktivnih tvari uključene su oksido-redukcijske reakcije, hidroliza i konjugacija. Kako je većina enzima uključenih u metabolizam smještena u jetri, primarna metoda određivanja metabolizma je putem enzima citokroma P450, koji posjeduje različite izoforme (CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2). Prema *in silico* predviđanju spojevi **165**, **173a** i **173b** posjeduju najmanju vjerojatnost djelovanja kao supstrati izoforme CYP3A4, dok spojevi **171a**, **171b**, **174a–174c** i **175b** pokazuju umjerenu mogućnost djelovanja (slika 80, tablica 27).



Slika 80. Histogram vjerojatnosti CYP3A4 supstrata 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola.

In silico predviđanje ukazuje da je spoj **132c** u prvoj fazi metabolizma podložan reakcijama aromatske oksidacije na benzilu, alifatske hidroksilacije imidazolnog supstituenta, te *O*- i *N*-dealkiliranju. Slično njemu, morfolinski analog **161** podložan je *N*-dealkiliranju morfolinskog supstituenta, nakon čega slijede, alifatsko hidroksiliranje, *O*- i *N*-dealkiliranje, dok je kod nesupstituiranog triazolnog derivata **165** primarni metabolički put *O*-dealkiliranje (slika 81).

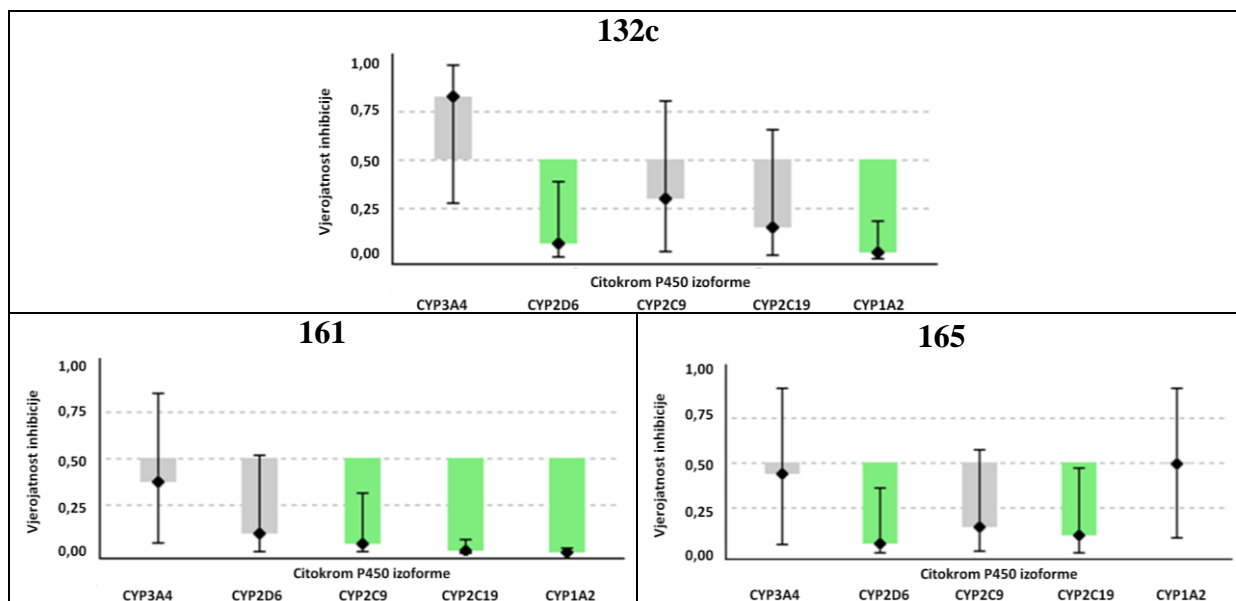


Slika 81. Predloženi metabolički put za 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirane hibride benzimidazola **132c** (a), **161** (b) i **165c** (c).

Ispitivanje djelovanja aktivne tvari kao CYP inhibitora također je značajno u određivanju hepatotoksičnosti spojeva, koja se može povezati s interakcijama aktivnih supstancija, tj. interakcijama među lijekovima (eng. *drug-drug interactions*). *In silico* predviđanje ukazuje da predvodni spoj **132c** posjeduje veliku vjerojatnost djelovanja kao CYP inhibitor, dok se strukturnim modifikacijama kod hibrida **165** i **161** ta vjerojatnost značajno smanjuje (slika 82).

Uspoređujući *in silico* predviđanja za sva navedena ADMET svojstva priređenih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola vidljivo je da su strukturnim modifikacijama spoja **132c** priređeni analozi s boljim farmakokinetičkim svojstvima. Spojevi **165**, **173a** i **173b** posjeduju najbolja ADMET svojstva, dok spojevi **161**, **171a**, **171b**, **174a**–**174c** i **175b** pokazuju dobru topljivost, permeabilnost i idealne PPB vrijednosti, ali s umjerenom mogućnošću djelovanja kao CYP3A supstrati.

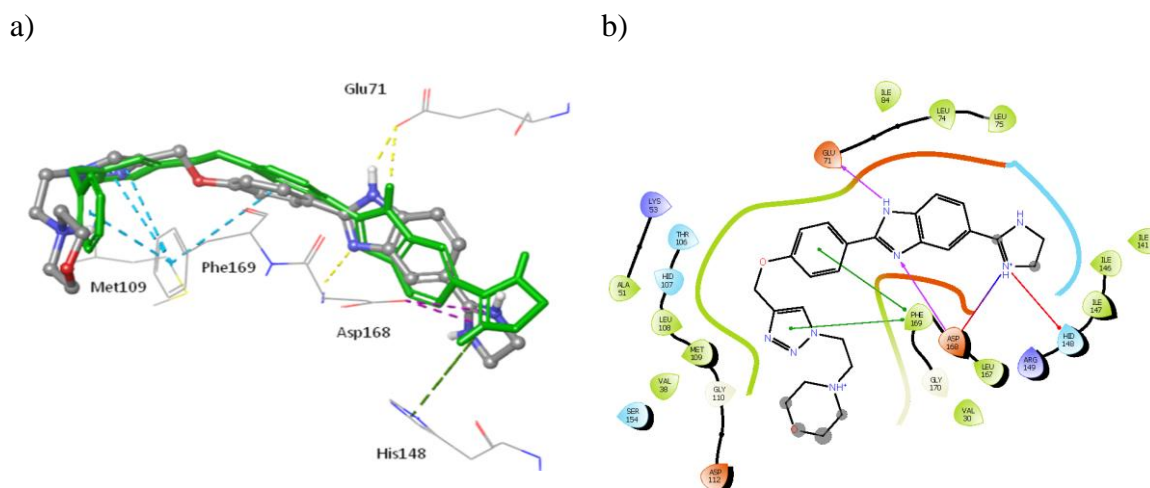
3. REZULTATI I RASPRAVA



Slika 82. Vjerojatnost djelovanja 5(6)-(2-imidazolilil)-supstuiranih hibrida benzimidazola **132c**, **161** i **165c** kao inhibitora CYP.

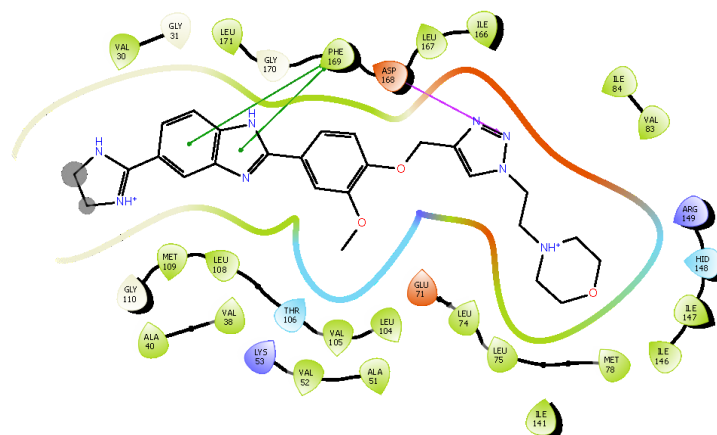
3.6.3. *In silico* predviđanje mogućih interakcija strukturno modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola s *DFG-out* konformacijom kinaze p38-MAP

U svrhu određivanja mogućih interakcija strukturno modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola **153–155**, **161–163**, **165**, **171a–175a**, **171b–175b** i **171c–175c** s *DFG-out* konformacijom liganda 3D83 korištene su metoda molekuskog uklapanja u aktivno mjesto i pristup temeljen na preklapanju molekulskih polja s bioaktivnom konformacijom poznatog inhibitora. Metoda preklapanja molekulskih polja provedena je primjenom najbolje vezujuće konformacije spoja **132c** i struktura modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola dobivenih konformacijskom analizom. Spojevi **161**, **163**, **154**, **155** i **172c** pokazuju najbolje preklapanje s predvodnim spojem **132c**, te je način vezanja tih analoga jednak načinu vezanja predvodnog spoja (slika 83, slika 71).



Slika 83. Preklopljene konformacije spojeva **161** (siva) i spoja **132c** (zeleni) koristeći metodu molekulskih polja (a). 2D dijagram 160-p38 MAPK interakcija u 3D83 ligandu (b).

Metodom molekuskog uklapanja novopripređenih hibrida s 3D83 ligandom određen je različit način vezanja za spojeve s dodatnim nabojem. 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirani hibridi benzimidazola **163**, **162**, **155**, **153** i **175a** pokazuju najbolje energije vezanja. Benzimidazolna jezgra se veže u područje zgloba stvarajući vodikovu vezu s Met109, a triazolni prsten stvara vodikovu vezu s Asp168, dok benzimidazolna jezgra ostvaruje dodatne π - π interakcije s Phe169 (slika 84).



Slika 84. Predviđene interakcije spoja **163** s 3D83 ligandom dobivene molekulskim uklapanjem.

Korištenjem određene korelacije izračunatih ΔG energija i eksperimentalnih aktivnosti (poglavlje 3.5.5), predviđa se da će 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirani hibridi benzimidazola **153–155**, **161–163**, **165**, **171a–175a**, **171b–175b** i **171c–175c** inhibirati kinazu p38 MAP s aktivnošću ispod 100 nM.

4. Eksperimentalni dio

4.1. Opće napomene

Sve kemikalije i otapala nabavljene su od komercijalnih dobavljača Aldrich i Acros. Tijek reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) korištenjem ploča prevučениh silikagelom Merck 60F-254, a izolirane komponente detektirane su pod UV svjetlom (254 i 366 nm). Pročišćavanje spojeva provedeno je primjenom kolonske kromatografije na kolonama punjenim silikagelom 0,063-0,2 mm (Kemika, Merck) pri atmosferskom tlaku. Temperature tališta priređenih spojeva određene su na instrumentu Kofler (Reichert, Beč) i nisu korigirane.

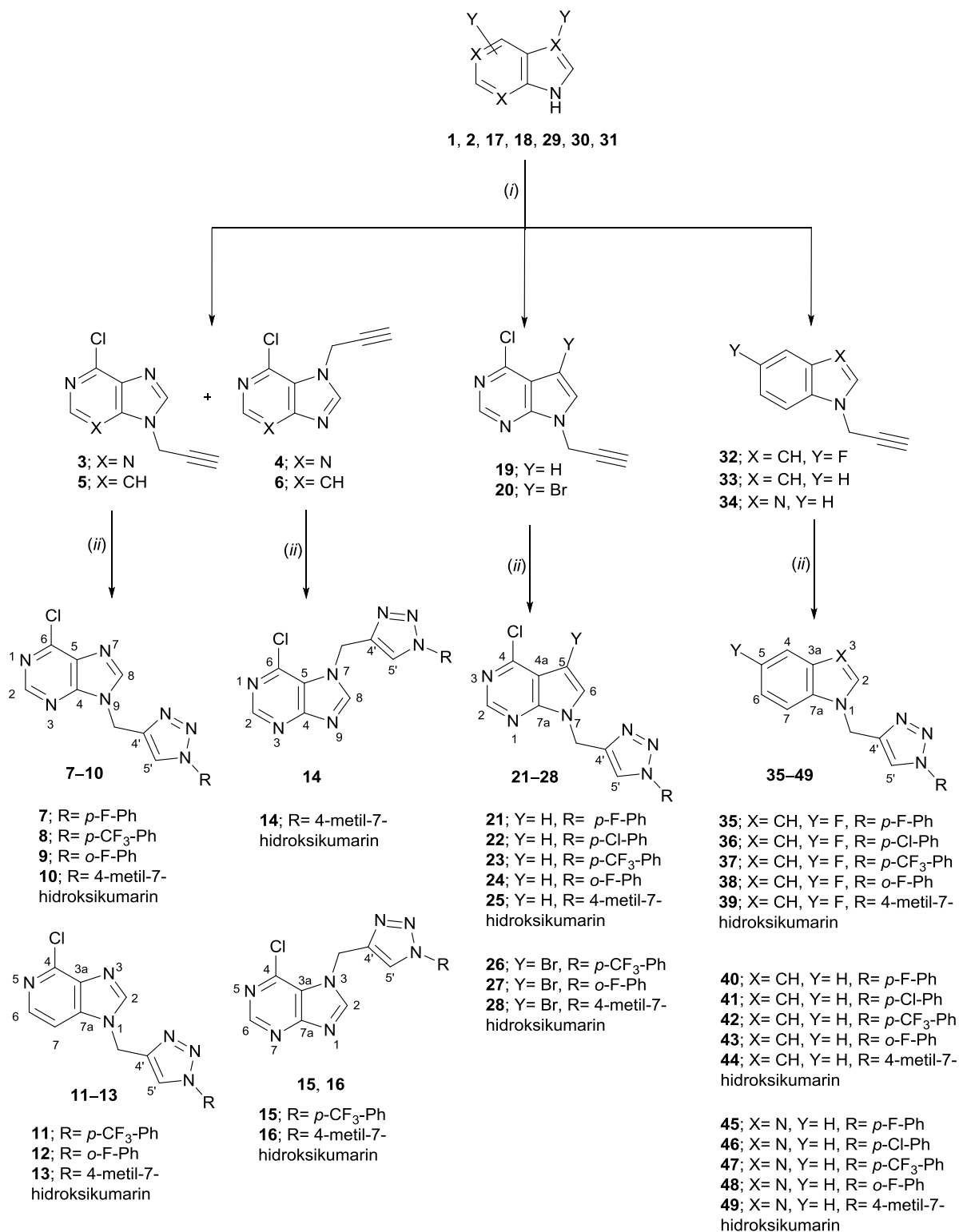
^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker Avance 300 i 600 MHz. 2D homonuklearni i heteronuklearni NMR spektri snimljeni su na 300 and 600 MHz Agilent Technologies DD2 NMR spektrometru. Svi NMR spektri snimani su u DMSO- d_6 kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. ^1H NMR spektri snimani su pri 300 i 600 MHz, dok su ^{13}C NMR spektri snimani pri 75 i 150 MHz. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS; δ 0,0 ppm), a konstante sprega (J) su izražene u Hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije su asignirane na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprega, kao i korelacijama u dvodimenzijским spektrima HSQC (eng. *heteronuclear single quantum correlation*) i HMBC (eng. *heteronuclear multiple bond correlation*).

Spektri masa spektri snimljeni su na instrumentu Agilent 6410 s elektrosprej ionizacijom i dvostrukim kvadrupolom (LC/MS/MS). Visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC) provedena je na serijskom sustavu Agilent 1100 s UV detektorom primjenom analitičke kolone reverzne faze Zorbax C18 (2,1 × 30 mm; 3,5 μm). Svi spojevi za biološka ispitivanja *in vitro* pokazali su čistoću > 95 % u navedenom HPLC sustavu.

Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u reaktoru Milestrone Start S koristeći staklene kivete pri 80 °C i 300 W, uz tlak 1 bar. Reakcije potpomognute ultrazvučnim valovima provedene su u Bandelin Bath Cleaner (Sonorex digital 10 P) s nominalnom snagom od 1000 W i frekvencijom od 35 kHz. Reakcije su provedene u tikvici od 25 mL s ravnim dnom, smještene u središtu kupelji, 5cm ispod površine tekućine.

UV/Vis spektri snimljeni su na spektrofotometru Elmer Lambda 25 u kvarcnim kivetama duljine puta 1 cm, a CD spektri na JASCO J-800 spektrometru.

4.2. Sinteza hibrida halogeniranih derivata purina i purinskih izostera s 1- aril-supsttuiranim 1,2,3-triazolima



Shema 52. Reagensi i uvjeti: (i) propargil-bromid, NaH, DMF, s.t., 24 h; (ii) RN₃, Cu(0), 1M CuSO₄, *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1, DMF, 80 °C, MW, 45 min, 300 W.

4.2.1. Opći postupak pripreve *N*-propargiliranih purinskih izostera 3–6, 19, 20 i 32–34

Otopina odgovarajuće heterocikličke baze u suhom DMF-u (8-10 mL) miješana je 30 min s NaH (1,2 ekv.), te je dodan propargil-bromid (1,2 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja je pročišćen kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 : 1.

6-klor-9-(prop-2-in-1-il)-9*H*-purin (3) [202] i 6-klor-7-(prop-2-in-1-il)-7*H*-purin (4) [203]

Spojevi **3** i **4** priređeni su prema opisanom općem postupku iz 6-klorpurina **1** (800 mg; 5,18 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli kristalinični produkt **3** (549,3 mg; 59 %; T.t. = 145–148 °C) i bijeli praškasti produkt **4** (140,3 mg; 15 %; T.t. = 109–111 °C).

3: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,83 (1H, s, H2), 8,76 (1H, s, H8), 5,21 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,55 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 153,2 (C2), 151,34 (C6), 149,2 (C4), 130,7 (C5), 77,3 (CCH), 76,7 (CCH), 33,3 (CH₂).

4: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,89 (1H, s, H2), 8,85 (1H, s, H8), 5,40 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,65 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161,6 (C6), 157,5 (C2), 152,0 (C8), 142,4 (C4), 121,8 (C5), 77,9 (CCH), 77,7 (CCH), 36,4 (CH₂).

4-klor-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin (5) i 4-klor-3-(prop-2-in-1-il)-3*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin (6)

Spojevi **5** i **6** priređeni su prema opisanom općem postupku iz 4-klorimidazo[4,5-*c*]piridina **2** (100 mg; 0,65 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli praškasti produkt **5** (44,3 mg; 67 %; T.t. = 101–103 °C) i produkt **6**, kruto ulje (24,1 mg; 36 %).

5: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,52 (1H, s, 1H, H2), 8,22 (1H, d, *J* = 5,6 Hz, H6), 7,76 (1H, d, *J* = 5,6 Hz, H7), 5,29 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,60 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 152,4 (C4), 145,9 (C8), 141,3 (C6), 141,2 (C7a), 139,8 (C3a), 107,0 (C7), 77,4 (CCH), 77,1 (CCH), 34,7 (CH₂).

6: ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 8,62 (1H, s, H2), 8,18 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H6), 7,74 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H7), 5,40 (2H, d, $J = 2,4$ Hz, CH₂), 3,58 (1H, t, $J = 2,5$ Hz, CCH). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 151,1 (C4), 148,7 (C2), 141,4 (C6), 133,2 (C7a), 127,5 (C3a), 115,1 (C7), 78,8 (CCH), 77,4 (CCH), 36,2 (CH₂).

4-klor-7-(prop-2-in-1-il)-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin (19) [204]

Spoj **19** priređen je prema opisanom općem postupku iz 4-klor-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidina **17** (800 mg; 5,21 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli kristalinični spoj **19** (810,4 mg; 92 %; T.t. = 133-135 °C). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 8,69 (1H, s, H2), 7,82 (1H, d, $J = 3,7$ Hz, H5), 6,71 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 5,17 (2H, d, $J = 2,5$ Hz, CH₂), 3,46 (1H, t, $J = 2,5$ Hz, CCH). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 150,8 (C4), 150,5 (C2), 150,1 (C7a), 130,7 (C6), 116,8 (C4a), 99,1 (C5), 78,3 (CCH), 75,8 (CCH), 33,7 (CH₂).

5-brom-4-klor-7-(prop-2-in-1-il)-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin (20)

Spoj **20** priređen je prema opisanom općem postupku iz 5-brom-4-klor-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidina **18** (400 mg; 1,72 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli praškasti produkt **18** (348,9 mg; 70 %; T.t. > 250 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 8,73 (1H, s, H2), 8,08 (1H, s, H6), 5,15 (2H, d, $J = 2,5$ Hz, CH₂), 3,50 (1H, t, $J = 2,5$ Hz, CCH). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 151,3 (C2), 150,7 (C4), 149,6 (C7a), 130,6 (C6), 114,13 (C4a), 86,3 (C6), 78,0 (CCH), 76,3 (CCH), 34,2 (CH₂).

5-fluor-1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (32)

Spoj **32** priređen je prema opisanom općem postupku iz 5-fluor-1H-indola **29** (800 mg; 5,92 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom dobiven je žuti uljasti produkt **32** (739,9 mg; 77 %). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 7,52 (1H, dd, $J = 8,9; 4,5$ Hz, H2), 7,47 (1H, d, $J = 3,2$ Hz, H7), 7,33 (1H, dd, $J = 9,9; 2,5$ Hz, H4), 7,02 (1H, td, $J = 9,3; 2,5$ Hz, H6), 6,46 (1H, d, $J = 3,0$ Hz, H3), 5,10 (2H, d, $J = 2,4$ Hz, CH₂), 3,40 (1H, t, $J = 2,4$ Hz, CCH). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 157,2 (d, $J_{CF} = 231,8$ Hz, C5), 133,2 (C7a), 130,2 (C2), 128,6 (d, $J_{CF} = 10,5$ Hz, C3a), 111,1 (d, $J_{CF} = 10,0$ Hz, C7), 109,4 (d, $J_{CF} = 26,2$ Hz, C6), 105,2 (d, $J_{CF} = 23,3$ Hz, C4), 101,4 (d, $J_{CF} = 4,7$ Hz, C3), 79,1 (CCH), 75,6 (CCH), 36,3 (CH₂).

1-(prop-2-in-1-il)-1H-indol (33) [205]

Spoj **33** priređen je prema opisanom općem postupku iz indola **30** (1,7 g; 10 mmol). NaH je dodan pri 0 °C, te se smjesa zagrije na sobnu temperaturu i dodaje propargil-bromid. Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (*n*-heksan : EtOAc = 10 : 1) izoliran je produkt **33** (1,1 g; 75 %). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 7,56 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H7), 7,51 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H4), 7,39 (1H, d, *J* = 3,1 Hz, H2), 7,18–7,13 (1H, m, H6), 7,09–6,98 (1H, m, H5), 6,46 (1H, dd, *J* = 3,1; 0,9 Hz, H3), 5,08 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,38 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 135,4 (C7a), 128,3 (C3a), 128,2 (C2), 121,2 (C6), 120,5 (C4), 119,3 (C5), 109,9 (C7), 101,2 (C3), 79,2 (CCH), 75,4 (CCH), 35,0 (CH₂).

1-(prop-2-in-1-il)-1H-benzimidazol (34) [179]

Spoj **34** priređen je prema opisanom općem postupku iz benzimidazola **31** (800 mg; 6,77 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 20 : 1) izoliran je žuti uljasti produkt **34** (890 mg; 84 %). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,27 (1H, s, H2), 7,68 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H7), 7,64 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H4), 7,31 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, H6), 7,24 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, H5), 5,20 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,48 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 143,2 (C2), 133,3 (C3a), 131,4 (C7a), 122,6 (C6), 121,9 (C5), 119,5 (C4), 110,6 (C7), 78,1 (CCH), 76,2 (CCH), 33,8 (CH₂).

4.2.2. Opći postupak za sintezu *N*-1 supstituiranih 1,2,3-triazolnih purinomimetika 7–16, 21–28 i 35–49

Odgovarajuća *N*-propargilirana heterociklička baza (**3–6**, **19**, **20** i **32–34**) otopljena je u smjesi *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1 (4 mL) i DMF-u (0,5 mL). Zatim je u reakcijsku smjesu dodana 1M CuSO₄ (0,3 ekv.), Cu(0) (0,8 ekv.) i odgovarajući organski azid (1,2 ekv.). Reakcija je provedena 45 min uz mikrovalno zračenje od 300 W i pri 80 °C. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak nakon uparavanja pročišćen je kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 : 1.

9-[[1-(4-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-6-klor-9H-purin (7)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **3** (50 mg; 0,28 mmol) i 1-azido-4-fluorbenzena (0,68 mL; 0,34 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **7** (43,4 mg; 47 %; T.t. = 170–171 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,83 (1H, s, H5'), 8,80 (1H, s, H2), 8,79 (1H, s,

H8), 7,91–7,88 (2H, m, Ph"), 7,43 (2H, t, $J = 8,8$ Hz, Ph"), 5,72 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 162,6; 161,0 (d, $J_{CF} = 246,0$ Hz, Ph-q"), 151,9 (C6), 151,8 (C2), 149,2 (C4), 143,1 (C4'), 133,0; 133,0 (d, $J_{CF} = 2,8$ Hz, Ph-q"), 130,9 (C5), 122,6; 122,6 (d, $J_{CF} = 8,8$ Hz, Ph"), 122,3 (C5'), 116,9; 116,7 (d, $J_{CF} = 23,3$ Hz, Ph"), 39,0 (CH₂), 38,9 (CH₂).

6-klor-9-[[1-(4-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-9H-purin (8)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **3** (50 mg; 0,28 mmol) i 1-azido-4-(trifluormetil)benzena (0,68 mL; 0,34 mmol) priređen je bezbojan kristaliničan produkt **8** (72,6 mg; 72 %, T.t. = 174–177 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,95 (1H, s, H5'), 8,85 (1H, s, H2), 8,81 (1H, s, H8), 8,12 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, Ph"), 7,97 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ph"), 5,75 (2H, s, CH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 151,9 (C6), 151,8 (C2), 149,2 (C4), 143,5 (C4'), 139,3 (Ph-q"), 130,9 (C5), 129,2; 129,0; 128,8; 128,6 (q, $J_{CF} = 32,4$ Hz, CCF₃), 127,3; 127,3; 127,3; 127,2 (q, $J_{CF} = 3,6$ Hz, Ph"), 124,7; 122,4 (d, $J_{CF} = 272,4$ Hz, CCF₃), 122,4 (C5'), 120,69 (C8), 39,0 (CH₂).

9-[[1-(2-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-6-klor-9H-purin (9)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **3** (50 mg; 0,28 mmol) i 1-azido-2-fluorbenzena (0,68 mL; 0,34 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **9** (36,1 mg; 39 %; T.t. = 143–145 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,85 (1H, s, H5'), 8,81 (1H, s, H2), 8,67 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H8), 7,80 (1H, td, $J = 7,8; 1,5$ Hz, Ph"), 7,64–7,50 (2H, m, Ph"), 7,42 (1H, td, $J = 8,0; 0,9$ Hz, Ph"), 5,75 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 154,7; 153,1 (d, $J_{CF} = 250,6$ Hz, Ph-q"), 151,9 (C6), 151,9 (C2), 149,3 (C4), 142,6 (C4'), 131,6; 130,9 (d, $J_{CF} = 7,9$ Hz, Ph"), 130,9 (C5), 126,1 (C8), 125,7; 125,7 (d, $J_{CF} = 3,8$ Hz, Ph"), 125,5; 125,4 (d, $J_{CF} = 4,3$ Hz, C5'), 124,7; 124,4 (d, $J_{CF} = 10,7$ Hz, Ph-q"), 117,3; 117,2 (d, $J_{CF} = 19,5$ Hz, Ph"), 38,9 (CH₂).

7-hidroksi-4-[[4-((6-klor-9H-purin-9-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]metil]-2H-kromen-2-on (10)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **3** (50 mg; 0,28 mmol) i 4-(azidometil)-7-hidroksi-2H-kromen-2-ona [206] (73,8 mg; 0,34 mmol) priređen je žuti praškasti produkt **10** (37,4 mg; 33 %; T.t. = 178–179 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 10,69 (1H, bs, OH"), 8,81 (1H, s, H8), 8,77 (1H, s, H2), 8,31 (1H, s, H5'), 7,65 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H6"), 6,81 (1H, dd, $J = 8,8; 2,2$ Hz, C7"), 6,75 (1H, s, H8"), 5,87 (2H, s, CH₂), 5,66 (2H, s, CH₂), 5,55 (1H, s, H3").

^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 161,8 (C7"), 160,1 (C2"), 155,2 (C8a"), 154,9 (C4), 151,9 (C5), 151,8 (C2), 150,5 (C6), 149,3 (C4"), 142,4 (C4'), 126,2 (C5"), 125,1 (C5'), 113,3 (C6"), 109,5 (C4a"), 109,4 (C3"), 102,6 (C8"), 49,4 (CH₂), 38,9 (CH₂).

4-klor-1-[[1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin (11)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **5** (25 mg; 0,13 mmol) i 1-azido-4-(trifluormetil)benzena (0,31 mL; 0,16 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **11** (39,5 mg; 80 %; T.t. = 151–154 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,99 (1H, s, H5'), 8,63 (1H, s, H2), 8,15 (3H, m, H6; Ph"), 7,97 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ph"), 7,79 (1H, d, J = 5.6 Hz, H7), 5,78 (2H, s, CH₂). ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 146,3 (C2), 143,4 (C4'), 141,1 (C4), 140,9 (C6), 140,0 (C7a), 139,2 (C3a), 128,7 (m, Ph-q"), 127,2 (q, J = 3,5 Hz, Ph"), 122,4 (C5'), 122,1 (m, CF₃), 120,6 (Ph"), 106,9 (C7), 40,0 (CH₂)

1-[[1-(2-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-4-klor-1*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin (12)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **5** (25 mg; 0,13 mmol) i 1-azido-2-fluorbenzena (0,31 mL; 0,16 mmol) priređen je bijeli kristaliničan produkt **12** (30,9 mg; 72 %; T.t. = 124–127 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,72 (1H, d, J = 2,2 Hz, H5'), 8,63 (1H, s, H2), 8,17 (1H, d, J = 5,6 Hz, H6), 7,85–7,77 (2H, m, H7; Ph"), 7,65–7,50 (2H, m, Ph"), 7,46–7,38 (1H, m, Ph"), 5,77 (2H, s, CH₂). ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 155,5; 152,1 (d, J_{CF} = 250,4 Hz, Ph-q"), 146,4 (C2), 142,6 (C4'), 141,0 (C6), 140,1 (C4), 137,2 (C7a), 136,3 (C3a), 131,6; 131,5 (d, J_{CF} = 8.0 Hz, Ph"), 126,0 (C5'), 125,7; 125,6 (d, J_{CF} = 3,8 Hz, Ph"), 125,5; 125,5 (d, J_{CF} = 4,7 Hz, Ph"), 117,6; 117,4 (d, J_{CF} = 15,7 Hz, Ph-q"), 117,6 (d, J = 19,5 Hz, Ph"), 107,1 (C7), 38,9 (CH₂).

7-hidroksi-4-[[4-((4-klor-1*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil]2*H*-kromen-2-on (13)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **5** (25 mg; 0,13 mmol) i 4-(azidometil)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-ona [206] (34,7 mg; 0,16 mmol) priređen je žuti praškasti produkt **13** (53,1 mg; 60 %; T.t. = 228–231 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,58 (1H, s, H2), 8,31 (1H, s, H5'), 8,14 (1H, d, J = 5,6 Hz, H6), 7,70 (1H, d, J = 5,6 Hz, H7), 7,61 (1H, d, J = 8,7 Hz, H5"), 6,78 (1H, dd, J = 8,8; 1,8 Hz, H6"), 6,73 (1H, d, J = 1,6 Hz, H8"), 5,86 (2H, s, CH₂), 5,69 (2H, s, CH₂), 5,55 (1H, s, H3"). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 161,8 (C7"), 159,9 (C2"),

155,1 (C8a"), 150,2 (C4"), 146,3 (C2), 142,4 (C4'), 141,0 (C4), 140,8 (C6), 140,0 (C7a), 137,1 (C3a), 126,0 (C5"), 124,9 (C5'), 113,2 (C6"), 109,4 (C3"), 109,2 (C4a"), 106,9 (C7), 102,5 (C8"), 49,3 (CH₂), 40,1 (CH₂).

7-hidroksi-4-[[4-((6-klor-7H-purin-7-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]metil]-2H-kromen-2-on (14)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **4** (50 mg; 0,28 mmol) i 4-(azidometil)-7-hidroksi-2H-kromen-2-ona [206] (29,3 mg; 0,14 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **14** (14,9 mg; 33 %; T.t. > 250 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,96 (1H, s, H8), 8,82 (1H, s, H2), 8,30 (1H, s, H5'), 7,63 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H5"), 6,80 (1H, dd, *J* = 8,8; 2,3 Hz, H6"), 6,76 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H8"), 5,87 (2H, s, CH₂"), 5,85 (2H, s, CH₂), 5,55 (1H, s, H3"). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161,8 (C7"), 161,6 (C4), 160,1 (C2"), 155,1 (C8a"), 151,8 (C2), 151,1 (C8), 150,3 (C4"), 143,3 (C4'), 126,2 (C5"), 124,4 (C5'), 122,1 (C5), 113,2 (C6"), 109,5 (C4a"), 109,2 (C3"), 102,6 (C8"), 49,3 (CH₂"), 42,0 (CH₂).

4-klor-3-[[1-(4-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-3H-imidazo[4,5-*c*]piridin (15)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **6** (20 mg; 0,10 mmol) i 1-azido-4-(trifluormetil)benzena (0,24 mL; 0,12 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **15** (30,1 mg; 79 %; T.t. = 183–185 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,98 (1H, s, H5'), 8,76 (s, 1H, H2), 8,16 (1H, d, 1H, *J* = 5,4 Hz, H6), 8,14 (2H, m, Ph"), 7,97 (2H, m, Ph), 7,76 (1H, d, *J* = 5,4 Hz, H7), 5,97 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 151,0 (C6), 149,3 (C2), 144,8 (C4'), 140,7 (C6), 139,2 (Ph-q"), 132,9 (C4), 128,7 (q, *J*_{CF} = 32,6 Hz, CCF₃"), 127,2 (C7a), 127,1 (q, *J*_{CF} = 3,8 Hz, Ph"), 122,0 (m, CCF₃), 121,8 (C5'), 120,6 (Ph"), 114,9 (C7), 41,3 (CH₂).

7-hidroksi-4-[[4-((4-klor-3H-imidazo[4,5-*c*]piridin-3-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]metil]-2H-kromen-2-on (16)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **6** (15 mg; 0,08 mmol) i 4-(azidometil)-7-hidroksi-2H-kromen-2-ona [206] (19,5 mg; 0,09 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **16** (23,8 mg; 74 %; T.t. > 250 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,73 (1H, s, H2), 8,25 (1H, s, H5'), 8,15 (1H, d, *J* = 5,4 Hz, H6), 7,74 (1H, d, *J* = 5,4 Hz, H7), 7,63 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H5"), 6,79 (1H, dd, *J* = 8,8; 2,1 Hz, H6"), 6,74 (1H, d, *J* = 2,1 Hz, H8"), 5,88 (2H, s, CH₂"), 5,86

(2H, s, CH₂), 5,51 (1H, s, H³). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161,7 (C7"), 159,9 (C2"), 155,1 (C8a"), 150,4 (C7a), 150,2 (C4"), 143,8 (C4'), 140,7 (C6), 133,2 (C4), 127,5 (C3a), 126,0 (C5"), 124,2 (C5'), 114,9 (C7), 113,2 (C6"), 109,1 (C4a"), 109,1 (C3"), 102,5 (C8"), 49,2 (CH₂"), 41,5 (CH₂).

7-[[1-(4-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin (21)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **19** (100 mg; 0,56 mmol) i 1-azido-4-fluorbenzena (1,34 mL; 0,67 mmol) izoliran je bijeli praškasti produkt **21** (131,6 mg; 74 %; T.t. = 176–178 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,74 (1H, s, H⁵'), 8,68 (1H, s, H₂), 7,93–7,84 (3H, m, H₆; Ph"), 7,43 (2H, t, *J* = 8,8 Hz, Ph"), 6,71 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H₅), 5,68 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 163,4; 160,1 (d, *J*_{CF} = 245,8 Hz, Ph-q") 152,1 (C4), 150,8 (C7a), 150,6 (C2), 143,9 (C4'), 133,1; 133,0 (d, *J*_{CF} = 2,8 Hz, Ph-q"), 131,4 (C6), 122,7; 122,6 (d, *J*_{CF} = 8,9 Hz, Ph"), 122,2 (C5'), 117,0; 116,6 (d, *J*_{CF} = 23,3 Hz, Ph"), 113,1 (C4a), 99,1 (C5), 39,6 (CH₂).

4-klor-7-[[1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin (22)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **19** (100 mg; 0,56 mmol) i 1-azido-4-klorbenzena (1,34 mL; 0,67 mmol) izoliran je bijeli praškasti produkt **22** (107,8 mg; 56 %; T.t. = 221–223 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,79 (1H, s, H⁵'), 8,68 (1H, s, H₂), 7,90 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph"), 7,86 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H₆), 7,65 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph"), 6,71 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H₅), 5,68 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 150,7 (C4), 150,5 (C7a), 150,5 (C2), 144,0 (C4'), 135,3 (Ph-q"), 133,0 (Ph-q"), 131,3 (C6), 129,8 (Ph"), 121,9 (C5'), 121,8 (Ph"), 116,9 (C4a), 99,0 (C5), 39,5 (CH₂).

4-klor-7-[[1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin (23)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **19** (50 mg, 0,28 mmol) i 1-azido-4-(trifluormetil)benzena (0,67 mL; 0,34 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **23** (84,2 mg; 80 %; T.t. = 202–204 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,91 (1H, s, C⁵'), 8,68 (1H, s, H₂), 8,13 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph"), 7,96 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph"), 7,87 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H₆), 6,72 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H₅), 5,71 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 150,9 (C4), 150,7 (C7a), 150,7 (C2), 144,4 (C4'), 139,4 (Ph-q"), 131,5 (C6), 129,3; 128,8 (d, *J*_{CF} =

32,3 Hz, \underline{CCF}_3), 127,4; 127,4; 127,3; 127,3 (q, $J_{CF} = 3,6$ Hz, Ph"), 122,7; 122,1 (d, $J_{CF} = 272,3$ Hz, \underline{CCF}_3), 122,3 (C5'), 120,9 (Ph"), 117, (C4a), 99,3 (C5), 39,6 (CH₂).

7-[[1-(2-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (24)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **19** (100 mg; 0,56 mmol) i 1-azido-2-fluorbenzena (1,34 mL; 0,67 mmol) izoliran je bijeli kristaliničan produkt **24** (53,3 mg; 29 %; T.t. = 112–114 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,68 (1H, s, H2), 8,61 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H5'), 7,88 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 7,84–7,75 (1H, m, Ph"), 7,64–7,52 (2H, m, Ph"), 7,45–7,38 (1H, m, Ph"), 6,71 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 5,70 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 163,9; 160,3 (d, $J_{CF} = 246,0$ Hz, Ph-q"), 152,1 (C4), 150,4 (C2), 150,1 (C7a), 143,2 (C4'), 132,1; 131,9 (d, $J_{CF} = 19,5$ Hz, Ph-q"), 131,4 (Ph"), 131,3 (C6), 127,6 (C5'), 125,9 (Ph"), 125,5; 125,4 (d, $J_{CF} = 3,8$ Hz, Ph"), 117,2; 116,9 (d, $J_{CF} = 19,6$ Hz, Ph"), 117,0 (C4a), 99,0 (C5), 39,3 (CH₂).

7-hidroksi-4-[[4-((4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-7-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]metil]-2H-kromen-2-on (25)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **19** (50 mg; 0,28 mmol) i 4-(azidometil)-7-hidroksi-2H-kromen-2-ona [206] (74,0 mg; 0,34 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **25** (15,1 mg; 40 %; T.t. = 202–204 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,65 (1H, s, H2), 8,22 (1H, s, H5'), 7,84 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 7,63 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H5"), 6,78 (1H, dd, $J = 9,0$; 1,7 Hz, H6"), 6,71 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H8"), 6,69 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 5,84 (2H, s, CH₂), 5,62 (2H, s, CH₂), 5,49 (1H, s, H3"). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161,8 (C7"), 160,2 (C2"), 156,6 (C4), 155,2 (C8a"), 150,7 (C2), 150,6 (C4"), 145,0 (C7a), 143,4 (C4'), 131,6 (C6), 126,2 (C5"), 124,9 (C5'), 117,0 (C4a), 113,4 (C6"), 109,5 (C4a"), 109,4 (C3"), 102,7 (C8"), 99,1 (C5), 49,4 (CH₂).

5-brom-4-klor-7-[[1-(4-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (26)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **20** (50 mg; 0,18 mmol) i 1-azido-4-(trifluormetil)benzena (0,43 mL; 0,22 mmol) dobiven je bijeli praškasti produkt **26** (21,2 mg; 26 %; T.t. = 220–221 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,91 (1H, s, H5'), 8,72 (1H, s, H2), 8,16–8,10 (3H, m, H6; Ph"), 7,97 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph"), 5,69 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 151,3 (C2), 150,1 (C7a), 147,6 (C4), 144,0 (C4'), 139,4 (Ph-q"),

131,3 (C6), 128,8 (Ph-q"). 127,4; 127,4; 127,3; 127,3 (q, $J_{CF} = 3,8$ Hz, Ph"), 125,7; 122,2 (d, $J_{CF} = 281,9$ Hz, \underline{CCF}_3), 122,4 (C5'), 120,8 (Ph"), 119,1 (C4a), 86,3 (C5), 38,9 (CH₂).

5-brom-7-[[1-(2-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (27)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **20** (50 mg; 0,18 mmol) i 1-azido-2-fluorbenzena (0,43 mL; 0,22 mmol) izoliran je bijeli praškasti produkt **27** (18,4 mg; 25 %; T.t. = 145–147 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,72 (1H, s, H2), 8,62 (1H, d, $J = 1,4$ Hz, H5'), 8,12 (1H, s, H6), 7,82–7,78 (1H, m, Ph"), 7,63–7,53 (2H, m, Ph"), 7,42 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, Ph"), 5,69 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,2; 160,4 (d, $J_{CF} = 265,4$ Hz, Ph-q"), 151,3 (C2), 150,7 (C4), 150,0 (C7a), 143,0 (C4'), 131,6; 131,6 (d, $J_{CF} = 8,0$ Hz, Ph"), 131,3 (C6), 126,1 (C5'), 125,7; 125,7 (d, $J_{CF} = 3,6$ Hz, Ph"), 125,5; 125,4 (d, $J_{CF} = 4,4$ Hz, Ph"), 124,7; 124,6 (d, $J_{CF} = 10,9$ Hz, Ph-q"), 117,3; 117,2 (d, $J_{CF} = 19,6$ Hz, Ph"), 114,2 (C4a), 86,3 (C5), 40,0 (CH₂).

4-[[4-((5-brom-4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-7-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]metil]-7-hidroksi-2H-kromen-2-on (28)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **20** (50 mg; 0,18 mmol) i 4-(azidometil)-7-hidroksi-2H-kromen-2-ona [206] (47,7 mg; 0,22 mmol) priređen je žuti praškasti produkt **28** (30,7 mg; 35 %; T.t. > 250°C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,69 (1H, s, H2), 8,25 (1H, s, H5'), 8,09 (1H, s, H6), 7,65 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H5"), 6,81 (1H, dd, $J = 8,7; 2,4$ Hz, H6"), 6,75 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H8"), 5,85 (2H, s, CH₂), 5,60 (2H, s, CH₂), 5,55 (1H, s, H3"). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161,7 (C7"), 160,0 (C2"), 155,1 (C8a"), 150,4 (C4"), 149,2 (C2), 146,1 (C4), 144,1 (C7a), 142,9 (C4'), 131,3 (C6), 126,1 (C5"), 124,9 (C5'), 114,1 (C4a), 113,3 (C6"), 109,6 (C4a"), 109,4 (C3"), 102,6 (C8"), 93,7 (C5), 49,3 (CH₂), 40,0 (CH₂).

5-fluor-1-[[1-(4-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1H-indol (35)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **32** (50 mg; 0,29 mmol) i 1-azido-4-fluorbenzena (0,70 mL; 0,35 mmol) izoliran je žuti uljasti spoj **35** (19,1 mg; 21 %). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,77 (1H, s, H5'), 7,94–7,85 (2H, m, Ph), 7,65–7,60 (1H, m, H7), 7,56 (1H, d, $J = 3,2$ Hz, H2), 7,43 (2H, t, $J = 8,8$ Hz, Ph"), 7,31 (1H, dd, $J = 9,9; 2,5$ Hz, H4), 6,99 (1H, td, $J = 9,3; 2,5$ Hz, H6), 6,46 (1H, d, $J = 3,1$ Hz, H3), 5,55 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 163,4; 160,1 (d, $J_{CF} = 246,0$ Hz, Ph-q"), 155,7 (C5), 144,6 (C4'), 135,5 (Ph-q"),

132,4 (C7a), 130,6 (C2), 124,3 (C3a), 122,7; 122,5 (d, $J_{CF} = 8,8$ Hz, Ph"), 122,0 (C5'), 116,9; 116,6 (d, $J_{CF} = 23,3$ Hz, Ph"), 111,2; 111,1 (d, $J_{CF} = 9,8$ Hz, C7), 109,5; 109,2 (d, $J_{CF} = 26,2$ Hz, C6), 105,2; 104,9 (d, $J_{CF} = 23,2$ Hz, C4), 101,3; 101,3 (d, $J_{CF} = 4,5$ Hz, C3), 41,0 (CH₂).

5-fluor-1-[[1-(4-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1H-indol (36)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **32** (50 mg; 0,29 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **36** (33,3 mg; 35 %; T.t. = 117–120 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,82 (1H, s, H5'), 7,90 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, Ph"), 7,65 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, Ph"), 7,61 (1H, d, $J = 4,6$ Hz, H7), 7,56 (1H, d, $J = 3,1$ Hz, H2), 7,31 (1H, dd, $J = 9,9; 2,5$ Hz, H4), 6,99 (1H, td, $J = 9,3; 2,5$ Hz, H6), 6,46 (1H, dd, $J = 3,1; 0,7$ Hz, H3), 5,55 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 158,7 (C5), 144,6 (C4'), 135,3 (Ph-q"), 133,0 (C7a), 132,3 (Ph-q"), 130,6 (C2), 130,0 (C5'), 129,8 (Ph"), 126,2 (C3a), 121,8 (Ph"), 111,2; 111,1 (d, $J_{CF} = 9,9$ Hz, C7), 109,5; 109,1 (d, $J_{CF} = 26,1$ Hz, C6), 105,2; 104,9 (d, $J_{CF} = 23,3$ Hz, C4), 101,2; 101,2 (d, $J_{CF} = 4,7$ Hz, C3), 40,9 (CH₂).

5-fluor-1-[[1-(4-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1H-indol (37)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **32** (50 mg; 0,29 mmol) i 1-azido-4-(trifluormetil)benzena (0,70 mL; 0,35 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **37** (73,2 mg; 70 %; T.t. = 151–154 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,95 (1H, s, H5'), 8,12 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, Ph"), 7,96 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ph"), 7,63 (1H, dd, $J = 8,9; 4,6$ Hz, H7), 7,57 (1H, d, $J = 3,1$ Hz, H2), 7,31 (1H, dd, $J = 9,9; 2,5$ Hz, H4), 6,99 (1H, td, $J = 9,2; 2,5$ Hz, H6), 6,47 (1H, d, $J = 3,1$ Hz, H3), 5,58 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 158,7 (C5), 144,9 (C4'), 139,3 (Ph-q"), 132,3 (C7a), 130,6 (C2), 128,9; 128,5 (d, $J_{CF} = 32,5$ Hz, CCF₃), 128,6 (C3a) 127,3; 127,20; 127,2; 127,1 (q, $J_{CF} = 3,7$ Hz, Ph"), 125,3; 121,6 (d, $J_{CF} = 285,4$ Hz, CCF₃), 122,0 (C5'), 120,6 (Ph"), 111,2; 111,1 (d, $J_{CF} = 9,8$ Hz, C7), 109,5; 109,1 (d, $J_{CF} = 26,1$ Hz, C6), 105,2; 104,9 (d, $J_{CF} = 23,2$ Hz, C4), 101,3; 101,2 (d, $J_{CF} = 4,7$ Hz, C3), 40,9 (CH₂).

5-fluor-1-[[1-(2-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1H-indol (38)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **32** (50 mg; 0,29 mmol) i 1-azido-2-fluorbenzena (0,70 mL; 0,35 mmol) priređen je žuti uljasti spoj **38** (19 mg; 21 %). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,61 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H5'), 7,84–7,77 (1H, m, Ph"), 7,66 (1H, dd, $J = 9,0; 4,4$ Hz, H7), 7,58 (2H, d, $J = 3,1$ Hz, H2; Ph"), 7,40 (1H, dd, $J = 6,9; 2,5$ Hz, Ph"), 7,31 (1H, dd, J

= 10,0; 2,5 Hz, H4), 7,03–6,94 (2H, m, Ph^{''}; H6), 6,46 (1H, d, $J = 3,1$ Hz, H3), 5,57 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 158,3 (C5), 155,6; 152,0 (d, $J_{CF} = 271,7$ Hz, Ph-q^{''}), 146,7 (C4'), 132,3 (C7a), 131,3; 131,2 (d, $J_{CF} = 8,0$ Hz, Ph^{''}), 130,5 (C2), 125,8 (C5'), 125,5; 125,5 (d, $J_{CF} = 3,7$ Hz, Ph^{''}), 125,1 (Ph^{''}), 124,5; 124,5 (d, $J_{CF} = 4,7$ Hz, Ph-q^{''}), 117,2; 116,9 (d, $J_{CF} = 19,4$ Hz, Ph^{''}), 111,2; 111,1 (d, $J_{CF} = 8,8$ Hz, C7), 109,4; 109,1 (d, $J_{CF} = 26,4$ Hz, C6), 105,1; 104,8 (d, $J_{CF} = 23,3$ Hz, C4), 101,2; 101,1 (d, $J_{CF} = 4,5$ Hz, C3), 40,7 (CH₂).

4-[[4-((5-fluor-1*H*-indol-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil]-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (39)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **32** (50 mg; 0,29 mmol) i 4-(azidometil)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-ona [206] (74,3 mg; 0,35 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **39** (67,3 mg; 59 %; T.t. = 181–184 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 10,69 (1H, s, OH^{''}), 8,17 (1H, s, H5'), 7,64 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H5^{''}), 7,60–7,54 (1H, m, H7), 7,53 (1H, d, $J = 3,2$ Hz, H2), 7,31 (1H, dd, $J = 9,9$; 2,5 Hz, H4), 6,97 (1H, td, $J = 9,2$; 2,5 Hz, H6), 6,81 (1H, dd, $J = 8,7$; 2,4 Hz, H6^{''}), 6,76 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H8^{''}), 6,45 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H3), 5,86 (2H, s, CH₂), 5,54 (2H, s, CH₂), 5,51 (1H, s, H3^{''}). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 161,6 (C7^{''}), 159,9 (C2^{''}), 158,7; 155,6 (d, $J_{CF} = 231,7$ Hz, C5), 155,1 (C8a^{''}), 150,5 (C4^{''}), 144,1 (C4'), 132,3 (C7a), 130,6 (C2), 128,6; 128,4 (d, $J_{CF} = 10,2$ Hz, C3a), 126,0 (C5^{''}), 124,4 (C5'), 113,2 (C6^{''}), 111,2; 111,0 (d, $J_{CF} = 10,0$ Hz, C7), 109,4; 109,1 (d, $J_{CF} = 25,5$ Hz, C6), 109,3 (C4a^{''}), 109,3 (C3^{''}), 105,2; 104,9 (d, $J_{CF} = 23,2$ Hz, C4), 102,5 (C8^{''}), 101,1; 101,1 (d, $J_{CF} = 4,5$ Hz, C3), 49,1 (CH₂), 41,1 (CH₂).

1-[[1-(4-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1*H*-indol (40)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **33** (70 mg; 0,45 mmol) i 1-azido-4-fluorbenzena (0,81 mL; 0,66 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **40** (88,5 mg; 67 %; T.t. = 141–144 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,77 (1H, s, H5'), 7,90 (2H, dd, $J = 9,1$; 4,7 Hz, Ph^{''}), 7,62 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H7), 7,54 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H4), 7,48 (1H, d, $J = 3,1$ Hz, H2), 7,42 (2H, t, $J = 8,8$ Hz, Ph^{''}), 7,16–7,12 (1H, m, H5), 7,04–7,01 (1H, m, H6), 6,47 (1H, dd, $J = 3,3$; 0,5 Hz, H3), 5,54 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 163,2; 156,0 (d, $J_{CF} = 245,7$ Hz, Ph-q^{''}), 144,6 (C4'), 135,5 (C7a), 133,1; 133,0 (d, $J_{CF} = 2,9$ Hz, Ph-q^{''}), 128,6 (C2), 128,2 (C3a), 122,5; 122,4 (d, $J_{CF} = 8,8$ Hz, Ph^{''}), 121,9 (C5'), 121,1 (C6), 120,4 (C4), 119,2 (C5), 116,8; 116,5 (d, $J_{CF} = 23,2$ Hz, Ph^{''}), 110,1 (C7), 101,1 (C3), 40,6 (CH₂).

1-[[1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1*H*-indol (41)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **33** (70 mg; 0,45 mmol) i 1-azido-4-klorbenzena priređen je bijeli praškasti produkt **41** (83,2 mg; 60 %; T.t. = 168–171 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,83 (1H, s, H5'), 7,90 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph"), 7,71–7,59 (3H, m, Ph"; H7), 7,54 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H4), 7,48 (1H, d, *J* = 3,1 Hz, H2), 7,14 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, H5), 7,02 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, H6), 6,47 (1H, d, *J* = 3,0 Hz, H3), 5,55 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 144,8 (C4'), 135,5 (C7a), 135,3 (Ph-q"), 132,9 (Ph-q"), 129,8 (Ph"), 128,6 (C2), 128,2 (C3a), 121,8 (Ph"), 121,7 (C5'), 121,1 (C6), 120,4 (C4), 119,1 (C5), 110,0 (C7), 101,1 (C3), 40,6 (CH₂).

1-[[1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1*H*-indol (42)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **33** (70 mg; 0,45 mmol) i 1-azido-4-(trifluormetil)benzena (0,81 mL; 0,66 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **42** (110,9 mg; 72 %; T.t. = 185–187 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,95 (1H, s, H5'), 8,12 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph"), 7,96 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph"), 7,63 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H7), 7,55 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, H4), 7,49 (1H, d, *J* = 3,2 Hz, H2), 7,17–7,12 (1H, m, H5), 7,04–7,01 (1H, m, H6), 6,47 (1H, dd, *J* = 3,1, 0,6 Hz, H3), 5,57 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 145,0 (C4'), 139,3 (Ph-q"), 135,5 (C7a), 129,2; 128,9; 128,4; 128,0 (q, *J*_{CF} = 32,4 Hz, CCF₃), 128,7 (C2), 128,3 (C3a), 127,2; 127,2; 127,1; 127,1 (q, *J*_{CF} = 3,8 Hz, Ph"), 125,6; 122,0 (q, *J*_{CF} = 272,0 Hz, CCF₃), 121,9 (C5'), 121,2 (C6), 120,5 (Ph"), 120,4 (C4), 119,2 (C5), 110,0 (C7), 101,1 (C3), 40,6 (CH₂).

1-[[1-(2-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1*H*-indol (43)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **33** (70 mg; 0,45 mmol) i 1-azido-2-fluorbenzena (0,81 mL; 0,66 mmol) priređen je uljasti produkt **43** (37,4 mg; 28 %). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,60 (1H, d, *J* = 1,8 Hz, H5'), 7,80 (1H, td, *J* = 7,8, 1,4 Hz, Ph"), 7,65 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H7), 7,61–7,57 (1H, m, Ph"), 7,56–7,52 (2H, m, Ph"; H4), 7,50 (1H, d, *J* = 3,1 Hz, H2), 7,41 (1H, t, *J* = 7,7 Hz, Ph"), 7,14 (1H, t, *J* = 7,6 Hz, H5), 7,03 (1H, dt, *J* = 7,8; 3,9 Hz, H6), 6,46 (1H, d, *J* = 3,1 Hz, H3), 5,57 (2H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 154,5; 152,8 (d, *J*_{CF} = 250,2 Hz, Ph-q"), 144,1 (C4'), 135,5 (C7a), 131,3; 131,2 (d, *J*_{CF} = 8,0 Hz, Ph-q"), 128,6 (C2), 128,2 (C3a), 125,8 (C5'), 125,5; 125,5 (d, *J*_{CF} = 3,7 Hz, Ph"), 124,9;

124,8 (d, $J_{CF} = 4,6$ Hz, Ph"), 124,7; 124,6 (d, $J_{CF} = 10,9$ Hz, Ph"), 121,1 (C6), 120,4 (C4), 119,2 (C5), 117,1; 117,0 (d, $J_{CF} = 19,5$ Hz, Ph"), 110,1 (C7), 101,1 (C3), 40,5 (CH₂).

7-hidroksi-4-[[4-((1H-indol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]metil]-2H-kromen-2-on (44)

Prema opisanom općem postupku iz spoja **33** (70 mg; 0,45 mmol) i 4-(azidometil)-7-hidroksi-2H-kromen-2-ona [206] (87,9 mg; 0,66 mmol) priređen je žuti praškasti produkt **44** (78,8 mg; 47 %; T.t. = 155–158 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,69 (1H, s, OH"), 8,15 (1H, s, H7), 7,63 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H5"), 7,53 (2H, d, $J = 8,9$ Hz; H4; H5'), 7,44 (1H, d, $J = 3,2$ Hz, H2), 7,15–7,08 (1H, m, H5), 7,04–6,97 (1H, m, H6), 6,80 (1H, dd, $J = 8,7; 2,3$ Hz, H6"), 6,75 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H8"), 6,44 (1H, d, $J = 3,1$ Hz, H3), 5,84 (2H, s, CH₂), 5,53 (1H, s, H3"), 5,50 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161,6 (C7"), 159,8 (C2"), 155,1 (C8a"), 150,4 (C4"), 144,2 (C4'), 135,5 (C7a), 128,6 (C2), 128,2 (C3a), 126,0 (C5"), 124,3 (C5'), 121,1 (C6), 120,4 (C4), 119,1 (C5), 113,1 (C6"), 110,0 (C7), 109,3 (C4a"), 109,2 (C3"), 102,5 (C8"), 101,0 (C3), 49,1 (CH₂), 40,8 (CH₂).

1-[[1-(4-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1H-benzimidazol (45) [179]

Prema opisanom općem postupku iz spoja **34** (40 mg; 0,26 mmol) i 1-azido-4-fluorbenzena (43 mg; 0,31 mmol) priređen je žuti uljasti produkt **45** (57 mg; 76 %). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,80 (1H, s, H2) 8,47 (1H, s, H5'), 7,87–7,91 (2H, m, Ph), 7,66 (2H, s, H4; H7), 7,31–7,44 (2H, m, Ph), 7,09–7,30 (2H, m, H5; H6), 5,61 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,2 (d, $J_{CF} = 243,8$ Hz, Ph-q), 144,1 (C2), 133,5 (Ph), 123,1 (C3a), 123,0 (d, $J_{CF} = 9,0$ Hz, Ph), 122,8 (C7a), 122,6 (d, $J_{CF} = 74,3$ Hz, Ph), 122,20 (d, $J_{CF} = 15,8$ Hz, Ph), 120,0 (C5), 119,0 (C-6), 117,3 (d, $J_{CF} = 23,3$ Hz, C4), 111,3 (Ph), 76,6 (C7) 68,2 (CH₂). MS (ESI): $m/z = 294.1$ ([M+H]⁺).

1-[[1-(4-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1H-benzimidazol (46) [179]

Prema opisanom općem postupku iz spoja **34** (50 mg; 0,32 mmol) i 1-azido-4-klorbenzena (59 mg; 0,38 mmol) priređen je praškasti produkt **46** (88 mg; 89 %; T.t. = 158–160 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,91 (1H, s, H2), 8,41 (1H, s, H5'), 7,90 (2H, d, $J = 7,6$ Hz, Ph), 7,63–7,68 (4H, m, H4; H7; Ph), 7,20–7,28 (2H, m, H5, H6), 5,67 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 143,8 (C2), 141,8 (C4'), 135,3 (C3a), 133,0 (Ph), 131,3 (C7a), 130,1 (Ph), 129,8 (Ph), 122,4 (C5), 122,1 (C6), 121,8 (Ph), 121,6 (C5'), 119,5 (C4), 110,7 (C7), 39,9 (CH₂). MS (ESI): $m/z = 310.1$ ([M+H]⁺).

1-[[1-(4-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1H-benzimidazol (47) [179]

Prema opisanom općem postupku iz spoja **34** (50 mg; 0,32 mmol) i 1-azido-4-(trifluormetil)benzena (71 mg; 0,38 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **47** (92 mg; 84 %; T.t. = 188–190 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,97 (1H, s, H2), 8,50 (1H, s, H5'), 8,08 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph), 7,92 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph), 7,68 (2H, s, H4; H7), 7,19–7,28 (2H, m, H5; H6), 5,65 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 143,9 (C2), 141,8 (C4'), 139,2 (C3a), 129,2 (C7a), 128,8 (q, *J*_{CF} = 129,3 Hz, Ph), 127,15 (d, *J*_{CF} = 12,0 Hz, Ph), 126,5 (q, *J*_{CF} = 181,0 Hz, CF₃), 124,7 (C5), 122,6 (d, *J*_{CF} = 30 Hz, Ph), 122,4 (C6), 121,8 (d, *J*_{CF} = 66 Hz, Ph), 120,6 (C5'), 119,3 (C4), 116,6 (C7), 76,2 (CH₂). MS (ESI): *m/z* = 344.1 ([M+H]⁺).

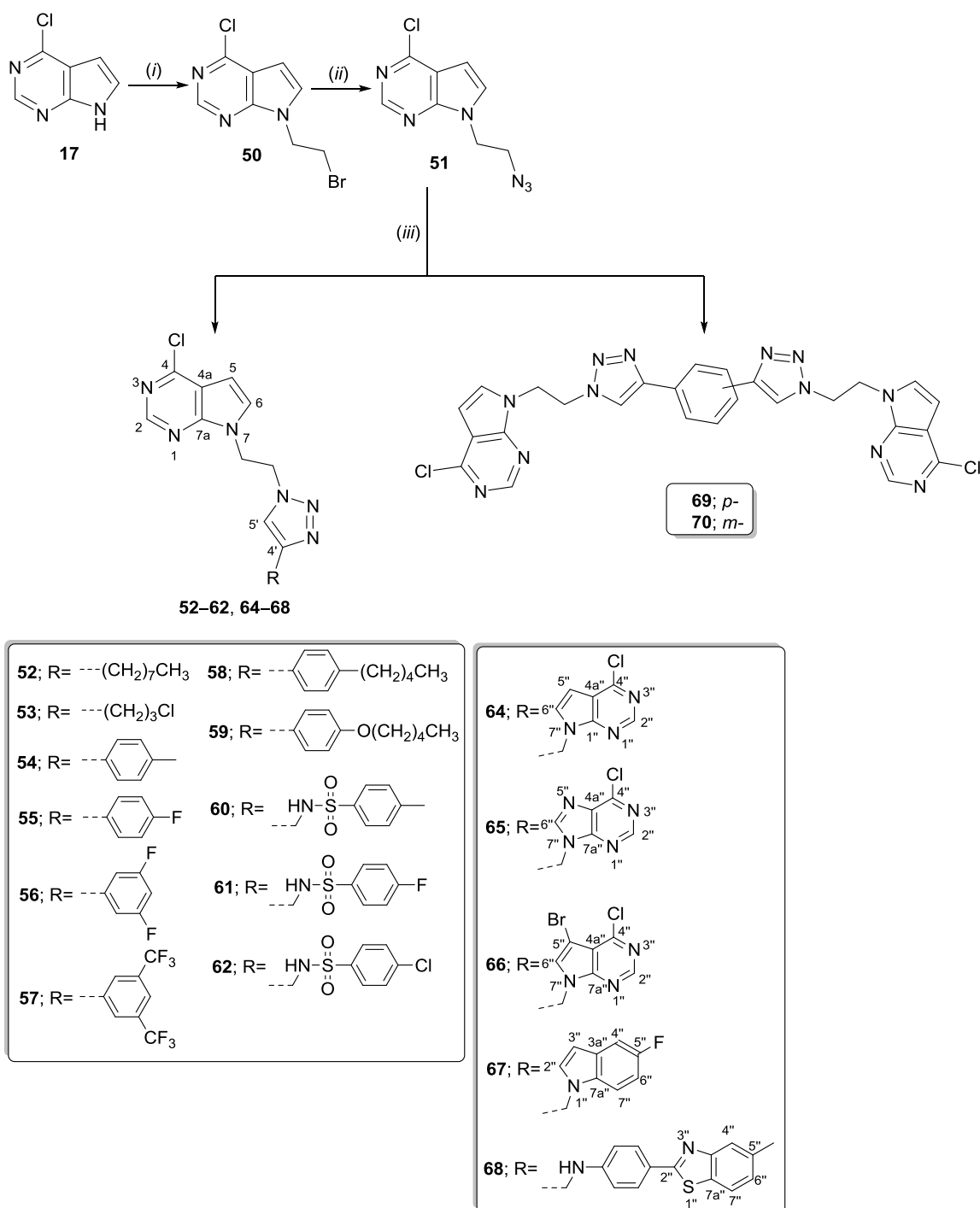
1-[[1-(2-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-1H-benzimidazol (48) [179]

Prema opisanom općem postupku iz spoja **34** (40 mg; 0,26 mmol) i 1-azido-2-fluorbenzena (43 mg; 0,31 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **48** (64 mg; 85 %; T.t. = 144–146 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,66 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H5'), 8,40 (1H, s, H2), 7,76 (1H, td, *J* = 7,8; 1,6 Hz, Ph), 7,66 (2H, d, *J* = 14,7 Hz, H4; H7), 7,45–7,59 (2H, m, Ph), 7,30–7,42 (2H, m, Ph), 7,19 (2H, dd, *J* = 15,2; 7,5 Hz, H5; H6), 5,63 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 153,7 (d, *J*_{CF} = 250,4 Hz, Ph-q), 143,1 (C3a; C7a), 138,1 (Ph), 131,3 (d, *J*_{CF} = 7,9 Hz, Ph), 125,8 (C2), 125,6 (C5'), 125,5 (d, *J*_{CF} = 3,7 Hz, Ph), 124,6 (d, *J*_{CF} = 10,8 Hz, Ph), 122,4 (C6), 121,6 (C4), 119,5 (Ph), 117,1 (Ph), 117,1 (d, *J*_{CF} = 19,5 Hz, Ph), 117,0 (C5), 110,7 (C7), 67,7 (CH₂). MS (ESI): *m/z* = 294.1 ([M +H]⁺).

4-{4-(((1H-benzimidazol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil}-7-hidroksi-2H-kromen-2-on (49) [179]

Prema opisanom općem postupku iz spoja **34** (50 mg; 0,32 mmol) 4-(azidometil)-7-hidroksi-2H-kromen-2-ona [206] (82 mg; 0,38 mmol) dobiven je žuti praškasti produkt **49** (91 mg; 76 %; T.t. = 184–187 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,69 (1H, s, OH), 8,28–8,33 (2H, m, H-; H5'), 7,57–7,66 (3H, m, H4; H7, "), 7,10–7,30 (2H, m, H5; H6), 6,71–6,85 (3H, m, H " ; H " ; H "), 5,86 (2H, s, CH₂), 5,58 (2H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161,6 (C "), 159,9 (C "), 155,1 (C "), 150,3 (C "), 143,6 (C "), 143,1 (C3a), 137,1 (C7a), 126,0 (C "), 124,7 (C4), 122,4 (C5; C6), 121,6 (C5'), 119,4 (C2), 113,2 (C"), 110,6 (C "), 109,3 (C7), 109,3 (C"), 102,5 (C"), 49,2 (CH₂), 40,4 (CH₂). MS (ESI): *m/z* = 376.1 ([M+H]⁺).

4.3. Sinteza hibrida mono- i bis-6-klor-7-dezapurina i 1,2,3-triazola



Shema 53. Reagensi i uvjeti: (i) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, K_2CO_3 , DMF, s.t., 24 h; (ii) NaN_3 , AcCN, 24 h, refluks, (iii) odgovarajući terminalni alkin, $\text{Cu}(0)$, 1M CuSO_4 , $t\text{-BuOH} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 1$, DMF, 80°C , MW, 45 min, 300 W.

4.3.1. Priprava 7-(2-brometil)-4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidina (50)

6-Klor-7-deazapurin **17** (500 mg; 3,26 mmol) otopljen je u suhom DMF-u (8 mL), te je dodan K₂CO₃ (540 mg; 3,91 mmol). Nakon 1 h dodan je 1,2-dibrometan (0,34 mL; 3,91 mmol) i miješanje je nastavljeno 24 h na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu *n*-heksan : EtOAc = 8 : 1, pri čemu je izoliran bijeli praškasti produkt **50** (347,4 mg; 41 %; T.t. = 91–93 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,66 (1H, s, H2), 7,85 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H6), 6,69 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5), 4,71 (2H, t, *J* = 6,2 Hz, CH₂), 3,96 (2H, t, *J* = 6,2 Hz, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 150,7 (C4), 150,6 (C7a), 150,3 (C2), 131,3 (C6), 116,8 (C4a), 98,6 (C5), 45,9 (CH₂), 31,6 (CH₂).

4.3.2. Priprava 7-(2-azidoetil)-4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidina (51)

Reakcijska smjesa spoja **50** (247,8 mg; 0,95 mmol) i NaN₃ (167,4 mg; 1,90 mmol) u acetonitrilu (10 mL) miješana je preko noći na temperaturi refluksa. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu *n*-heksan : EtOAc = 1 : 1. Dobiven je bezbojan uljasti produkt **51** (189,2 mg; 95 %). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,67 (1H, s, H2), 7,83 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H6), 6,71 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5), 4,49 (2H, t, *J* = 6,2 Hz, CH₂), 3,81 (2H, t, *J* = 6,2 Hz, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 151,0 (C4), 150,8 (C7a), 150,5 (C2), 131,5 (C6), 116,9 (C4a), 98,9 (C5), 50,1 (CH₂), 43,9 (CH₂).

4.3.3. Opći postupak priprave hibrida 6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom (52–68)

Spoj **51** otopljen je u smjesi *t*-BuOH: H₂O = 1: 1 (2-3 mL) i DMF-a (0,5 mL). Zatim su dodani Cu(0) (0,3 ekv.), 1M CuSO₄ (0,8 ekv.) i odgovarajući terminalni alkin (1,2 ekv.). Reakcija je provedena 1,5 h uz mikrovalno zračenje od 300 W pri 80 °C. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom.

4-klor-7-[2-(4-oktil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil]-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (52)

Spoj **52** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (30 mg; 0,14 mmol) i dekina (0,03 mL; 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1 izoliran je smeđi praškasti produkt **52** (13,6 mg; 29 %; T.t. = 115–118 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,55 (1H, s, H2), 7,55 (1H, s, H5'), 7,52 (1H, d, *J*

= 3,6 Hz, H6), 6,59 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,84–4,76 (2H, m, CH₂), 4,75–4,68 (2H, m, CH₂), 2,46 (2H, t, $J = 7,4$ Hz, CH₂"), 1,46–1,38 (2H, m, CH₂"), 1,31–1,22 (8H, m, CH₂"), 1,17–1,12 (2H, m, CH₂"), 0,86 (3H, t, $J = 7,1$ Hz, CH₃"). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 153,2 (C4), 150,7 (C7a), 150,3 (C2), 147,1 (C4'), 131,2 (C6), 122,2 (C5'), 116,8 (C4a), 99,0 (C5), 49,0 (CH₂), 44,8 (CH₂), 31,5 (CH₂"),

4-klor-7-{2-[4-(3-klorpropil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin (53)

Spoj **53** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (30 mg; 0,14 mmol) i 5-klorpent-1-ina (0,02 mL; 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1 izoliran je bijeli kristaliničan produkt **53** (34,9 mg; 77 %; T.t. = 114–116 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,55 (1H, s, H2), 7,66 (1H, s, H5'), 7,53 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 6,60 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,80 (2H, m, CH₂), 4,77–4,70 (2H, m, CH₂), 3,54 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, CH₂"), 2,64 (2H, t, $J = 7,3$ Hz, CH₂"), 2,03–1,77 (2H, m, CH₂"). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 150,8 (C4), 150,7 (C7a), 150,3 (C2), 145,5 (C4'), 131,2 (C6), 122,5 (C5'), 116,8 (C4a), 99,0 (C5), 49,0 (CH₂), 44,8 (CH₂), 44,5 (CH₂"), 31,8 (CH₂"), 22,1 (CH₂").

4-klor-7-{2-[4-(*p*-tolil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin (54)

Spoj **54** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (30 mg; 0,14 mmol) i 1-etinil-4-metilbenzena (0,02 mL; 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1 izoliran je bijeli praškasti produkt **54** (15 mg; 31 %; T.t. = 198–201 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,56 (1H, s, H2), 8,32 (1H, s, H5'), 7,60 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, Ph"), 7,56 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 7,22 (2H, d, $J = 7,9$ Hz, Ph"), 6,61 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,93–4,85 (2H, m, CH₂), 4,85–4,76 (2H, m, CH₂), 2,31 (3H, s, CH₃"). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 150,8 (C4), 150,7 (C7a), 150,3 (C2), 146,5 (C4'), 137,3 (Ph-q"), 131,3 (C6), 129,5 (Ph"), 127,8 (Ph-q"), 125,1 (Ph"), 121,3 (C5'), 116,9 (C4a), 98,9 (C5), 49,2 (CH₂), 44,8 (CH₂), 20,9 (CH₃").

7-{2-[4-(4-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-4-klor-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin (55)

Spoj **55** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (30 mg; 0,14 mmol) i 1-etinil-4-fluorbenzena (0,02 mL; 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 40 : 1 izoliran je bezbojan kristaliničan produkt **55** (25,8 mg; 54 %; T.t. = 200–202 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,56 (1H,

s, H2), 8,38 (1H, s, H5'), 7,79–7,73 (2H, m, Ph"), 7,56 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 7,26 (2H, t, $J = 8,9$ Hz, Ph"), 6,61 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,93–4,87 (2H, m, CH₂), 4,84–4,78 (2H, m, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 162,7; 161,1 (d, $J_{CF} = 244,6$ Hz, Ph-q"), 150,8 (C4), 150,7 (C7a), 150,3 (C2), 145,6 (C4'), 131,3 (C6), 127,3; 127,2 (d, $J_{CF} = 8,2$ Hz, Ph"), 127,2 (Ph-q"), 121,7 (C5'), 116,9 (C4a), 116,0; 115,8 (d, $J_{CF} = 21,7$ Hz, Ph"), 99,0 (C5), 49,3 (CH₂), 44,8 (CH₂).

7-{2-[4-(3,5-difluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-4-klor-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin (56)

Spoj **56** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (30 mg; 0,14 mmol) i 1-etinil-3,5-difluorbenzena (0,02 mL; 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 : 1 izoliran je bijeli kristaliničan product **56** (37,3 mg; 74 %; T.t. = 187–190 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,56 (1H, s, H2), 8,52 (1H, s, H5'), 7,57 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 7,47–7,42 (2H, m, Ph"), 7,27–7,13 (1H, m, Ph"), 6,61 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,96–4,89 (2H, m, CH₂), 4,84–4,78 (2H, m, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 164,7; 161,4 (d, $J_{CF} = 245,7$ Hz, Ph-q") 164,5; 161,3 (d, $J_{CF} = 245,7$ Hz, Ph-q"), 150,9 (C4), 150,7 (C7a), 150,3 (C2), 144,5 (C4'), 134,1 (Ph-q"), 131,4 (C6), 123,2 (C5'), 116,9 (C4a), 108,3; 108,2; 108,1; 108,0 (dd, $J_{CF} = 26,25$; 8,6 Hz, Ph-q"), 103,6; 103,3; 102,9 (t, $J_{CF} = 25,9$ Hz, Ph-q"), 99,0 (C5), 49,5 (CH₂), 44,8 (CH₂).

7-{2-[4-(3,5-bis(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-4-klor-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin (57)

Spoj **57** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (30 mg; 0,14 mmol) i 1-etinil-3,5-bis(trifluormetil)benzena (0,03 mL; 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 70 : 1 izoliran je bijeli praškasti produkt **57** (60,9 mg; 94 %; T.t. = 215–218 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,80 (1H, s, H5'), 8,55 (1H, s, H2), 8,39 (2H, s, Ph"), 8,05 (1H, s, Ph"), 7,58 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 6,61 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,96–4,94 (2H, m, CH₂), 4,84–4,80 (2H, m, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 150,9 (C4), 150,9 (C7a), 150,4 (C2), 143,9 (C4'), 133,2 (Ph-q"), 131,6; 131,4; 131,2; 131,0 (q, $J_{CF} = 33,3$ Hz, Phq"), 131,4 (C6), 126,1; 124,3; 122,5; 120,7 (q, $J_{CF} = 273,0$ Hz, CF₃"), 125,5; 125,4 (d, $J_{CF} = 3,6$ Hz, Ph"), 123,9 (C5'), 121,4, 121,4; 121,4 (m, Ph"), 117,0 (C4a), 99,2 (C5), 49,7 (CH₂), 44,9 (CH₂).

4-klor-7-{2-[4-(4-pentilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]etil}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin (58)

Spoj **58** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (30 mg; 0,14 mmol) i 1-etinil-4-pentilbenzena (0,03 mL; 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izolirano je bezbojni uljasti produkt **58** (40,2 mg; 72 %; T.t. = 170–173 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,57 (1H, s, H₂), 8,33 (1H, s, H_{5'}), 7,62 (2H, d, *J* = 8,1 Hz, Ph"), 7,54 (1H, d, *J* = 3,7 Hz, H₆), 7,23 (2H, d, *J* = 8,1 Hz, Ph"), 6,60 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H₅), 4,92–4,86 (2H, m, CH₂), 4,84–4,78 (2H, m, CH₂), 2,61–2,54 (2H, m, CH₂"), 1,58 (2H, dt, *J* = 14,5; 7,1 Hz, CH₂"), 1,35–1,24 (4H, m, CH₂"), 0,86 (3H, t, *J* = 6,8 Hz, CH₃"). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 150,9 (C₄), 150,7 (C_{7a}), 150,4 (C₂), 146,6 (Ph-q"), 142,3 (C_{4'}), 131,4 (C₆), 128,9 (Ph"), 128,1 (Ph-q"), 125,2 (Ph"), 121,4 (C_{5'}), 116,9 (C_{4a}), 99,0 (C₅), 49,2 (CH₂), 44,8 (CH₂), 35,0 (CH₂"), 31,0 (CH₂"), 30,7 (CH₂"), 22,1, 14,1 (CH₃").

4-klor-7-{2-[4-(4-(pentiloksi)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]etil}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin (59)

Spoj **59** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (30 mg; 0,14 mmol) i 1-etinil-4-(pentiloksi)benzena (0,03 mL; 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je bijeli praškasti produkt **59** (49,7 mg; 86 %; T.t. = 166–168 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,57 (1H, s, H₂), 8,26 (1H, s, H_{5'}), 7,62 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph"), 7,55 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H₆), 6,96 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph"), 6,60 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H₅), 4,91–4,85 (2H, m, CH₂), 4,83–4,77 (2H, m, CH₂), 3,98 (2H, t, *J* = 6,5 Hz, CH₂"), 1,78–1,65 (2H, m, CH₂"), 1,46–1,28 (4H, m, CH₂"), 0,90 (3H, t, *J* = 7,0 Hz, CH₂"). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 158,5 (Ph-q"), 150,8 (C₄), 150,6 (C_{7a}), 150,3 (C₂), 146,3 (C_{4'}), 131,3 (C₆), 126,5 (Ph"), 123,0 (Ph-q"), 120,7 (C_{5'}), 116,8 (C_{4a}), 114,8 (Ph"), 98,8 (C₅), 67,5 (CH₂"), 49,1 (CH₂), 44,7 (CH₂), 28,4 (CH₂"), 27,7 (CH₂"), 21,9 (CH₂"), 14,0 (CH₃").

4-klor-7-{2-[4-(4-metilbenzensulfonamid)metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]etil}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin (60)

Spoj **60** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (20 mg; 0,1 mmol) i 4-metil-*N*-(prop-2-inil)benzensulfonamida [173] (24,1 mg; 0,12 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je bijeli praškasti

produkt **60** (30,3 mg; 73 %; T.t. = 190–192 °C). ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,59 (1H, s, H2), 7,98 (1H, t, $J = 5,6$ Hz, NH"), 7,78 (1H, s, H5"), 7,65 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, Ph"), 7,46 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 7,37 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, Ph"), 6,59 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,79 (2H, t, $J = 5,8$ Hz, CH₂), 4,71 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂), 3,92 (2H, d, $J = 5,5$ Hz, CH₂"), 2,38 (3H, s, CH₃"). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 150,7 (C4), 150,5 (C7a), 150,3 (C2), 143,6 (C4'), 142,6 (Ph-q"), 137,4 (Ph-q"), 131,1 (C6), 129,5 (Ph"), 126,6 (Ph"), 123,5 (C5'), 116,7 (C4a), 98,7 (C5), 48,7 (CH₂), 44,5 (CH₂), 38,0 (CH₂"), 20,9 (CH₃").

4-klor-7-{2-[4-(4-fluorbenzensulfonamid)metil-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (61)

Spoj **61** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (20 mg; 0,1 mmol) i 4-fluor-*N*-(prop-2-inil)benzensulfonamida [173] (26,60 mg; 0,12 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je bijeli praškasti produkt **61** (10,1 mg; 24 %; T.t. = 178–179 °C). ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,58 (1H, s, H2), 8,13 (1H, s, NH"), 7,85–7,79 (3H, m, $J = 9,5$; 6,2 Hz, H5', Ph"), 7,47 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H6), 7,40 (2H, t, $J = 8,8$ Hz, Ph"), 6,59 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H5), 4,79 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂), 4,72 (2H, t, $J = 5,8$ Hz, CH₂), 3,96 (2H, s, CH₂"). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 164,9; 163,2 ($J_{CF} = 251,0$ Hz, Ph-q"), 150,7 (C4), 150,6 (C7a), 150,2 (C2), 143,4 (C4'), 136,8; 136,7 ($J_{CF} = 3,4$ Hz, Ph-q"), 131,1 (C6), 129,6; 129,5 ($J_{CF} = 9,5$ Hz, Ph"), 123,6 (C5'), 116,7 (C4a), 116,3; 116,1 ($J_{CF} = 22,7$ Hz, Ph"), 98,7 (C5), 48,7 (CH₂), 44,5 (CH₂), 37,9 (CH₂").

4-klor-7-{2-[4-(4-klorbenzensulfonamid)metil-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (62)

Spoj **62** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **51** (25 mg; 0,11 mmol) i 4-klor-*N*-(prop-2-inil)benzensulfonamida [173] (28,83 mg; 0,13 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je bijeli praškasti produkt **62** (35,3 mg; 71 %; T.t. = 195–197 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,59 (1H, s, H2), 8,20 (1H, bs, NH"), 7,80 (1H, s, H5'), 7,76 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph"), 7,64 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph"), 7,47 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 6,60 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,86–4,74 (2H, m, CH₂), 4,74–4,63 (2H, m, CH₂), 3,97 (2H, s, CH₂"). ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 150,8 (C4), 150,7 (C7a), 150,3 (C2), 143,4 (C4'), 139,3 (Ph-q"), 137,3 (Ph-q"), 131,2 (C6), 129,3 (Ph"), 128,6 (Ph"), 123,7 (C5'), 116,8 (C4a), 98,8 (C5), 48,9 (CH₂), 44,6 (CH₂), 37,9 (CH₂").

4-klor-7-[[1-(2-(4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-7-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (64)

Spoj **64** priređen je prema navedenom općem postupku iz spojeva **51** (40 mg; 0,18 mmol) i **19** (38,6 mg; 0,22 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je bezbojan kristaliničan produkt **64** (57,2 mg; 77 %; T.t. = 202–204 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,64 (1H, s, H2"), 8,41 (1H, s, H2), 7,82 (1H, s, H5'), 7,61 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H6"), 7,47 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H6), 6,65 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5"), 6,51 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5), 5,46 (2H, s, CH₂"), 4,81 (2H, t, *J* = 5,7 Hz, CH₂), 4,70 (2H, t, *J* = 5,7 Hz, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 150,7 (C4), 150,7 (C4"), 150,5 (C7a), 150,4 (C2), 150,3 (C7a"), 150,1 (C2"), 142,6 (C4'), 131,0 (C6; C6"), 123,9 (C5'), 116,8 (C4a), 116,6 (C4a"), 98,8 (C5), 98,8 (C5"), 49,1 (CH₂), 44,6 (CH₂), 39,4 (CH₂").

6-klor-9-[[1-(2-(4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-7-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-9H-purin (65)

Spoj **65** priređen je prema navedenom općem postupku iz spojeva **51** (16 mg; 0,09 mmol) i **3** (24,0 mg; 0,11 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je bezbojan kristaliničan produkt **65** (30,9 mg; 83 %; T.t. = 214–216 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,77 (1H, s, H2"), 8,68 (1H, s, H2), 8,40 (1H, s, H8"), 7,94 (1H, s, H5'), 7,46 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H6), 6,51 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5), 5,51 (2H, s, CH₂"), 4,85–4,80 (2H, m, CH₂), 4,73–4,67 (2H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 151,6 (C2"), 151,5 (C6"), 150,6 (C4), 150,5 (C7a), 150,0 (C2), 149,1 (C4"), 147,2 (C8"), 141,7 (C4'), 131,0 (C6), 130,7 (C5"), 124,1 (C5'), 116,6 (C4a), 98,7 (C5), 49,1 (CH₂), 44,6 (CH₂), 38,7 (CH₂").

5-brom-4-klor-7-[[1-(2-(4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-7-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (66)

Spoj **66** priređen je prema navedenom općem postupku iz spojeva **51** (15 mg; 0,07 mmol) i **20** (22,7 mg; 0,08 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je kristaliničan produkt **66** (26,2 mg; 76 %; T.t. = 168–171 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,68 (1H, s, H2), 8,41 (1H, s, H2"), 7,91 (1H, s, H5'), 7,86 (1H, s, H8"), 7,46 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H6), 6,51 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5), 5,45 (2H, s, CH₂"), 4,82–4,80 (2H, m, *J* = 6,6; 4,7 Hz, CH₂), 4,72–4,68 (2H, m, *J* = 6,6; 4,8 Hz, CH₂). ¹³C (151

MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 151,0 (C2"), 150,6 (C4; C4"), 150,5 (C7a), 150,0 (C2), 149,6 (C7a") 142,1 (C4'), 131,0 (C6"), 130,8 (C6), 124,0 (C5'), 116,6 (C4a), 113,9 (C4a"), 98,6 (C5), 85,9 (C7"), 49,0 (CH₂), 44,5 (CH₂), 39,5 (CH₂").

7-{2-[4-((5-fluor-1H-indol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (67)

Spoj **67** priređen je prema navedenom općem postupku iz spojeva **51** (40 mg; 0,18 mmol) i **32** (37,4 mg; 0,22 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je bijeli praškasti produkt **67** (70,2 mg; 98 %; T.t. = 169–171 °C). ¹H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,44 (1H, s, H2), 7,78 (1H, s, H5'), 7,46–7,41 (2H, m, H6, H7"), 7,33 (1H, d, J = 3,1 Hz, H2"), 7,29 (1H, dd, J = 9,9; 2,4 Hz, H4"), 6,95 (1H, td, J = 9,3; 2,5 Hz, H6"), 6,51 (1H, d, J = 3,6 Hz, H5), 6,41 (1H, dd, J = 3,2; 0,6 Hz, H3"), 5,35 (2H, s, CH₂"), 4,82–4,79 (2H, m, CH₂), 4,72–4,68 (2H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 158,7; 155,6 (d, J_{CF} = 231,6 Hz, C5"), 150,7 (C4), 150,6 (C7a), 150,2 (C2), 143,4 (C4'), 132,3 (C7a"), 131,0 (C6), 130,3 (C2"), 128,5; 128,4 (d, J = 10,4 Hz, C3a"), 123,6 (C5"), 116,6 (C3a), 111,1; 111,0 (d, J_{CF} = 9,9 Hz, C7"), 109,4; 109,0 (d, J_{CF} = 26,1 Hz, C6"), 105,1; 104,8 (d, J_{CF} = 23,1 Hz, C4"), 101,0; 101,0 (d, J_{CF} = 4,7 Hz, C3"), 98,8 (C5), 49,0 (CH₂), 44,6 (CH₂), 40,9 (CH₂").

4-klor-7-{2-[4-((4-(6-metilbenzo[d]tiazol-2-il)fenilamino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (68).

Spoj **68** priređen je prema navedenom općem postupku iz spojeva **51** (30 mg; 0,14 mmol) i spoja **63** [179] (48,74 mg; 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 : 1 izoliran je žuti praškasti produkt **68** (27,3 mg; 38 %; T.t. = 228–230 °C). ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,54 (1H, s, H2), 7,83–7,74 (5H, m, H5'; H4"; H7"; Ph"), 7,40 (1H, d, J = 3,6 Hz, H6), 7,27 (1H, dd, J = 8,3; 1,2 Hz, H6"), 6,82 (1H, t, J = 5,9 Hz, NH"), 6,68 (2H, d, J = 8,8 Hz, Ph"), 6,52 (1H, d, J = 3,6 Hz, H5), 4,87–4,76 (2H, m, CH₂), 4,77–4,67 (2H, m, CH₂), 4,31 (2H, d, J = 5,9 Hz, CH₂"), 2,43 (3H, s, CH₃"). ¹³C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 167,1 (C5"), 152,0 (C3a"), 151,4 (Ph-q"), 150,9 (C4), 150,7 (C7a), 150,3 (C2), 145,4 (C4'), 134,1 (C5"), 133,9 (C7a"), 131,2 (C6), 128,7 (Ph"), 127,7 (C6"), 123,1 (5'), 121,6 (C4"), 121,4 (C7"), 120,8 (Ph-q"), 116,8 (C4a), 114,1 (Ph"), 99,1 (C5), 49,7 (CH₂), 44,6 (CH₂), 38,0 (CH₂"), 21,1 (CH₃").

4.3.4. Opći postupak pripreve bis-6-klor-7-deazapurina s 1,2,3-triazolom (69 i 70)

U smjesi otapala *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1 (2-3 mL) i DMF-u (0,5 mL) otopljen je odgovarajući dietinilbenzen (1 ekv.). Zatim su dodani Cu(0) (0,5 ekv.), 1M CuSO₄ (1 ekv.) i spoj **51** (2,1 ekv.). Reakcija je provođena 1,5 h uz mikrovalno zračenje od 300 W pri 80 °C. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak nakon uparavanja pročišćen kolonskom kromatogrijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1.

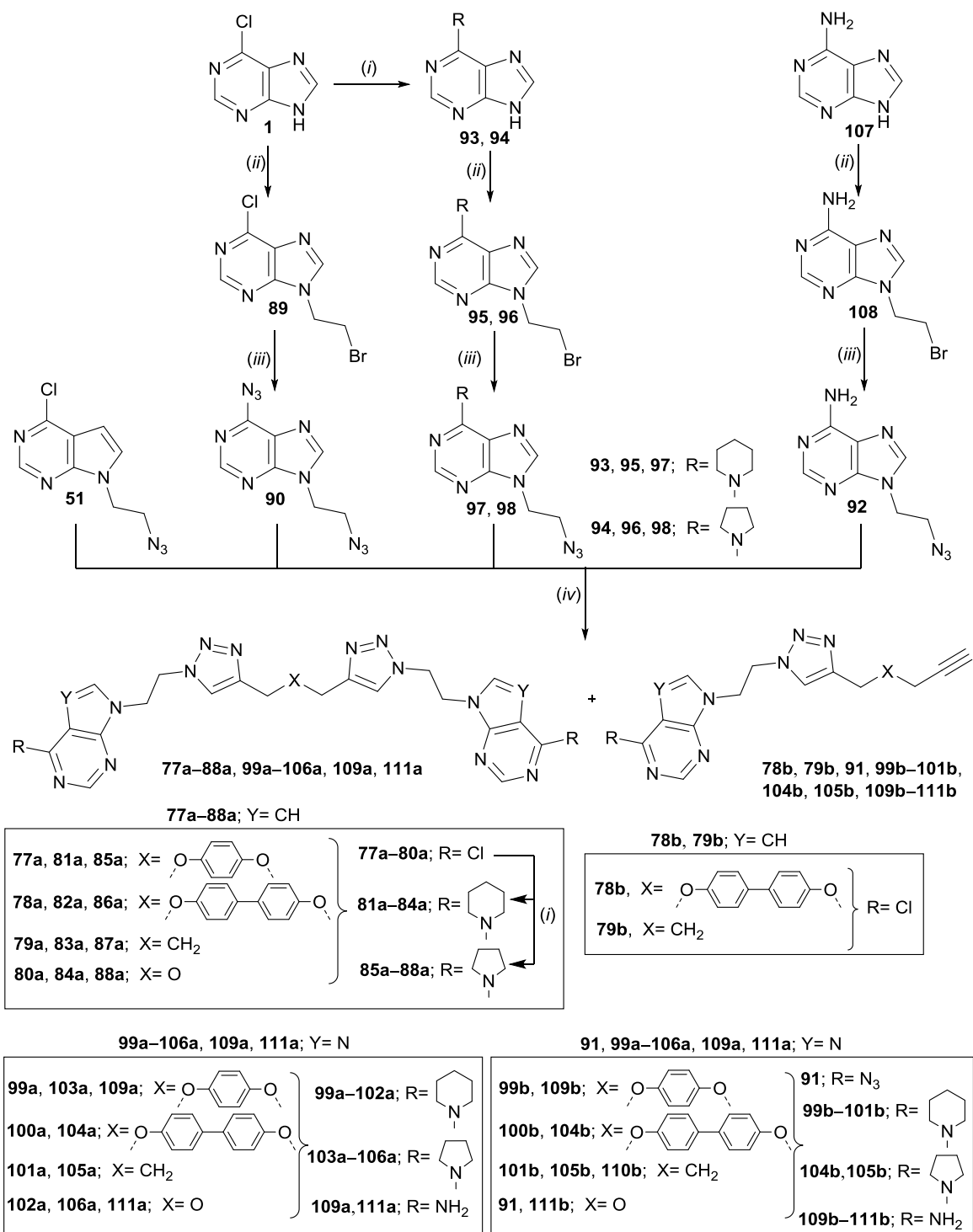
1,4-bis{1-[2-(4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}benzen (69)

Spoj **69** priređen je prema navedenom općem postupku iz 1,4-dietinilbenzena (11,3 mg; 0,09 mmol) i spoja **51** (44,1 mg; 0,20 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je bijeli praškasti produkt **69** (20,4 mg; 39 %; T.t. > 250 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,57 (2H, s, H2, H2''), 8,44 (2H, s, H5'), 7,78 (4H, s, Ph), 7,58 (2H, d, *J* = 3,6 Hz, H6, H6''), 6,61 (2H, d, *J* = 3,6 Hz, H5, H5''), 5,06–4,84 (4H, m, CH₂, CH₂''), 4,87–4,73 (4H, m, CH₂, CH₂''). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 151,0 (C4, C4''), 150,7 (C7a), 150,6 (C2), 145,9 (C4'), 131,2 (C6, C6''), 130,0 (Ph-q), 125,5 (Ph), 122,1 (C5'), 116,8 (C4a, C4a''), 98,8 (C5, C5''), 49,1 (CH₂, CH₂''), 44,6 (CH₂, CH₂'').

1,3-bis{1-[2-(4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}benzen (70)

Spoj **70** priređen je prema navedenom općem postupku iz 1,3-dietinilbenzena (13,9 mg; 0,11 mmol) i spoja **51** (53,9 mg; 0,24 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je bijeli praškasti produkt **70** (50,2 mg; 81 %; T.t. = 193–196 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,59–8,54 (2H, m, H2, H2''), 8,51–8,47 (2H, m, H5'), 7,80–7,75 (1H, m, Ph), 7,66 (1H, dd, *J* = 7,7; 1,5 Hz, Ph), 7,58–7,53 (2H, m, *J* = 3,6; 1,3 Hz, H6, H6''), 7,51–7,42 (2H, m, Ph), 6,69–6,56 (2H, m, H5, H5''), 4,97–4,75 (8H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 150,7 (C4, C4''), 150,6 (C7a, C7a''), 150,2 (C2, C2''), 146,0 (C4), 145,3 (C4''), 131,3 (C6), 131,1 (Ph-q), 131,0 (C6''), 129,4 (Ph), 128,1 (Ph), 125,5 (Ph), 124,6 (Ph), 122,3 (Ph-q), 122,2 (C5'), 122,0 (C5''), 116,8 (C4a; C4a''), 98,8 (C5, C5''), 49,2 (CH₂, CH₂''), 44,7 (CH₂''), 44,7 (CH₂).

4.4. Sinteza mono- i bis-triazolnih 6-supstituiranih purina i 7-dezapurina



Shema 54. Reagensi i uvjeti: (i) odgovarajući amin, H₂O, MW, 100 °C, 400 W, 10 min; (ii) BrCH₂CH₂Br, K₂CO₃, DMF, s.t. preko noći; (iii) NaN₃, acetone, refluks, preko noći; (iv) odgovarajući terminalni alkin (**73–76**), Metoda A: Cu(0), 1M CuSO₄, *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1, DMF, 80 °C, US, 45 min, 1000 W; Metoda B: Cu(0), 1M CuSO₄, *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1, DMF, s.t., 5 dana; Metoda C: CuI, DIPEA, AcOH, CH₂Cl₂, s.t., 3 dana.

4.4.1. Priprava 1,4-bis(prop-2-in-1-iloksi)benzena (73) [207]

Hidrokinon **71** (1 g; 9,08 mmol) je otopljen u 15 mL etanola i dodan je K₂CO₃ (1,88 g; 13,62 mmol). Suspenzija je miješana pri sobnoj temperaturi 30 min, a zatim je dodan propargilbromid (2,42 mL; 21,8 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri temperaturi refluksa. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kolonskom kromatografijom uz eluens CH₂Cl₂. Izoliran je žuti kristaliničan produkt **73** (1,38 g; 82 %; T.t. = 50–53 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 6,93 (4H, s, Ph), 4,72 (4H, d, *J* = 2,4 Hz, CH₂), 3,53 (2H, t, *J* = 2,3 Hz, CH). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 151,7 (Ph-q), 115,8 (Ph), 79,5 (CCH), 78,0 (CCH), 55,8 (CH₂).

4.4.2. Priprava 4,4'-bis(prop-2-in-1-iloksi)-1,1'-bifenila (74) [208]

Bisfenol **72** (1 kg; 5,37 mmol) je otopljen u 20 mL etanola i dodan je K₂CO₃ (1,11 g; 8,06 mmol). Suspenzija se miješa pri sobnoj temperaturi 30 min, a zatim je dodan propargilbromid (1,43 mL; 12,9 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri temperaturi refluksa. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kromatografijom na koloni uz eluens CH₂Cl₂. Izoliran je bijeli praškasti spoj **74** (922,0 mg; 65 %). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 7,56 (4H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,05 (4H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 4,83 (4H, d, *J* = 2,3 Hz, CH₂), 3,58 (2H, t, *J* = 2,3 Hz, CH). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 156,4 (Ph-q), 132,9 (Ph-q), 127,3 (Ph), 115,2 (Ph), 79,3 (CCH), 78,2 (CCH), 55,4 (CH₂).

4.4.3. Opći postupak za pripravu 6-amino-supstituiranih purinskih baza 93 i 94 [209, 210]

6-klorpurin **1** (1,5 mmol) i odgovarajući amin (4 ekv.) otopljeni su u 3 mL vode. Reakcijska smjesa je miješana 10 min u mikrovalnom reaktoru pri 100 °C i 400 W. Po završetku reakcije smjesa je isprana vodom, a nastali talog odfiltriran kroz sinter lijevak i osušen u sušioniku na 100 °C.

6-(piperidin-1-il)-9H-purin (93) [209]

Prema navedenom općem postupku iz 6-klorpurina **1** (200 mg; 1,29 mmol) i piperidina (0,51 mL; 5,18 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **93** (200 mg; 76 %; T.t. = 286–287 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 12,89 (1H, bs, NH), 8,18 (1H, s, H2), 8,07 (1H, s, H8), 4,18

(4H, m, CH₂), 1,66–1,63 (2H, m, CH₂), 1,57–1,48 (4H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 153,1 (C6), 151,8 (C2), 151,3 (C4), 137,7 (C8), 118,6 (C5), 25,6 (CH₂), 24,3 (CH₂). MS (ESI, m/z) 204,1 [M+H]⁺.

6-(pirolidin-1-il)-9H-purin (94) [210]

Prema navedenom općem postupku iz 6-klorpurina **1** (250 mg; 1,62 mmol) i pirolidina (0,55 mL; 6,48 mmol) dobiven je bijeli praškasti produkt **94** (272,5 mg; 89 %; T.t. = 284–286 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 12,88 (1H, bs, NH), 8,16 (1H, s, H2), 8,05 (1H, s, H8), 3,63–4,05 (4H, m, CH₂), 1,95 (4H, s, CH₂). MS (ESI, m/z) 190,1 [M+H]⁺.

4.4.4. Opći postupak za pripremu N-brometilnih purinskih baza 89, 95, 96 i 108

Odgovarajuća heterociklička baza (6-klorpurin, 6-piperidinopurin, 6-pirolidinopurin ili adenin) otopljena je u suhom DMF-u (8 mL) i dodan je K₂CO₃ (1,2 ekv.). U reakcijsku smjesu je nakon 1 h miješanja pri sobnoj temperaturi dodan dibrometan (1,2 ekv.) i miješanje je nastavljeno preko noći pri sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kromatografijom na koloni.

9-(2-brometil)-6-klor-9H-purin (89)

Spoj **89** priređen je prema navedenom općem postupku iz 6-klorpurina **1** (1 g; 7,40 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1) izoliran je bijeli kristaličan produkt **89** (1,24 g; 74 %, T.t. = 110–112 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,81 (1H, s, H2), 8,76 (1H, s, H8), 4,74 (2H, t, *J* = 6,0 Hz, CH₂CH₂), 4,01 (2H, t, *J* = 6,0 Hz, CH₂CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 151,9 (C6), 151,6 (C2), 149,1 (C4), 147,5 (C8), 130,8 (C5), 45,3 (CH₂), 31,1 (CH₂).

9-(2-brometil)-6-(piperidin-1-il)-9H-purin (95)

Spoj **95** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **93** (550 mg; 2,71 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **95** (650 mg; 76 %, T.t. = 148–150 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,22 (1H, s, H2), 8,19 (1H, s, H8), 4,57 (2H, t, *J* = 6,1 Hz, CH₂CH₂), 4,19 (4H, bs, CH₂), 3,94 (2H, t, *J* = 6,1 Hz, CH₂CH₂), 1,78–1,42 (6H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 152,1 (C6), 150,9 (C2), 149,4 (C4), 138,7 (C8), 117,83 (C5), 44,6 (CH₂), 43,6 (CH₂), 30,4 (CH₂), 24,6 (CH₂), 23,2 (CH₂). MS (ESI, m/z) 310,1 [M+H]⁺.

9-(2-brometil)-6-(pirolidin-1-il)-9H-purin (96)

Spoj **96** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **94** (650 mg; 3,44 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **96** (650 mg; 64 %; T.t. = 162–164 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8.21 (1H, s, H2), 8.16 (1H, s, H8), 4.57 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, CH₂CH₂), 4.04 (2H, s, CH₂), 3.94 (2H, t, *J* = 6.1 Hz, CH₂CH₂), 3.63 (2H, s, CH₂), 1.95 (6H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 150,7 (C2), 149,4 (C4), 140,9 (C8), 119,2 (C5), 59,2 (CH₂), 45,9 (CH₂), 44,7 (CH₂), 31,5 (CH₂). MS (ESI, *m/z*) 296,1 [M+H]⁺.

6-amino-9-(2-brometil)-9H-purin (108) [211]

Spoj **108** priređen je prema navedenom općem postupku iz adenina (200 mg; 1,48 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **108** (301,7 mg; 84 %; T.t. = 210–215 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,17 (1H, s, H2), 8,14 (1H, s, H8), 7,24 (2H, s, NH₂), 4,56 (2H, t, *J* = 6,1 Hz, CH₂CH₂), 3,94 (2H, t, *J* = 6,1 Hz, CH₂CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 156,0 (C6), 152,5 (C2), 149,5 (C4), 140,8 (C8), 118,7 (C5), 44,6 (CH₂), 31,5 (CH₂). MS (ESI, *m/z*) 242,0 [M+H]⁺.

4.4.5. Opći postupak za pripremu *N*-azidoetilnih purinskih baza 90, 97, 98 i 92

Odgovarajući brometilni purinski derivat (**2a–2e**) otopljen je u acetonu. U reakcijsku smjesu je dokapan NaN₃ (4 ekv.) otopljen u vodi (~ 3 mL). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na temperaturi refluksa. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a suhi ostatak otopljen je u 60 mL etil-acetata i ekstrahiran zasićenom otopinom natrijevog klorida (3 × 30 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog magnezijevog sulfata, filtriran, a filtrat uparen pri sniženom tlaku.

6-azido-9-(2-azidoetil)-9H-purin (90)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **89** (652 mg; 2,49 mmol) izoliran je bijeli kristaliničan produkt **90** (230,2 mg; 63 %; T.t. = 108–112 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,14 (1H, s, H2), 8,70 (1H, s, H8), 4,62 (2H, t, *J* = 5,6 Hz, CH₂CH₂), 3,93 (2H, t, *J* = 5,6 Hz, CH₂CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 145,4 (C6), 144,5 (C2), 142,4 (C4), 135,9 (C8), 119,7 (C5), 49,9 (CH₂), 43,6 (CH₂). MS (ESI, *m/z*) 357,1 [M+H]⁺.

9-(2-azidoetil)-6-(piperidin-1-il)-9H-purin (97)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **95** (650 mg; 2,10 mmol) izoliran je bijeli praškasti produkt **97** (566,3 mg; 99 %, T.t. = 78–80 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,22 (1H, s, H2), 8,18 (1H, s, H8), 4,35 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 4,19 (4H, s, CH₂), 3,81 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 1,72–1,52 (6H, m, CH₂CH₂). ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 153,1 (C6), 151,9 (C2), 150,6 (C4), 139,7 (C8), 118,9 (C5), 49,6 (CH₂), 42,4 (CH₂), 25,7 (CH₂), 24,2 (CH₂).

9-(2-azidoetil)-6-(pirolidin-1-il)-9H-purin (98)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **96** (400 mg; 1,35 mmol) izoliran je bijeli praškasti produkt **98** (345,1 mg; 99 %; T.t. = 96–101 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,21 (1H, s, H2), 8,15 (1H, s, H8), 4,35 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 4,05 (2H, s, CH₂), 3,80 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 3,63 (2H, s, CH₂), 1,95 (4H, s, CH₂). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 152,5 (C6), 152,2 (C2), 150,0 (C4), 140,2 (C8), 119,3 (C5), 49,7 (CH₂), 42,3 (CH₂).

6-amino-9-(2-azidoetil)-9H-purin (92)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **108** (1,28 g; 5,28 mmol) izoliran je bijeli praškasti produkt **92** (1,25 mg; 78,19 %; T.t. = 188–190 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,16 (1H, s, H2), 8,15 (1H, s, H8), 7,23 (2H, s, NH₂), 4,34 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 3,81 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 156,0 (C6), 152,5 (C2), 149,6 (C4), 140,8 (C8), 118,7 (C5), 49,7 (CH₂), 42,4 (CH₂). MS (ESI, m/z) 205,1 [M+H]⁺.

4.4.6. Opći postupak za sintezu mono- i bis-1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih hibrida purina (77a–80a, 78b i 79b) i 7-deazapurina purini (91, 99a–106a, 99b–101b, 104b, 105b, 109a, 111a i 109b–111b)

Metoda A: U smjesi DMF-a (1 mL) i *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1 (2 mL) otopljeni su odgovarajući bis-alkin (1 ekv.), azidoetilpurinska baza (2,2 ekv.), Cu(0) (1 ekv.) i CuSO₄ (1M, 0,5 ekv.). Reakcijska smjesa smještena je u ultrazvučnu kupelj pri 80 °C, 1000 W i 35 kHz, 90 min. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu diklormetan-metanol.

Metoda B: U smjesi DMF-a (1 mL) i *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1 (2 mL) otopljen je odgovarajući bis-alkin (1 ekv.), azidoetilpurinska baza (2,2 ekv.), Cu(0) (1 ekv.) i CuSO₄ (1M, 0,5 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je 5 dana na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu diklormetan-metanol.

Metoda C: Odgovarajući bis-alkin (1 ekv.), azidoetilni purinski izoster (2,2 ekv.), CuI (0,2 ekv.), *N,N*-diizopropiletilamin (4 ekv.) i octena kiselina (4 ekv.) otopljeni su u diklormetanu (1 mL). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 3 dana. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu diklormetan-metanol.

1,4-bis{[1-(2-(4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}benzene (77a)

Spoj **77a** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **73** (Metoda A: 50 mg, 0,27 mmol; Metoda B: 21,97 mg; 0,11 mmol; Metoda C: 50 mg, 0,27 mmol;) i spoja **51** (Metoda A: 132,24 mg, 0,59 mol; Metoda B: 58 mg; 0,44 mmol; Metoda C: 123,24 mg, 0,59 mmol;). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **77a** (Metoda A: 83,5 mg; 49 %; Metoda B: 40,0 mg; 54 %, Metoda C: 40,4 mg; 24 %; T.t. = 234–239 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,54 (2H, s, H2), 8,01 (2H, s, H5'), 7,49 (2H, d, *J* = 3.6 Hz, H6), 6,89 (4H, s, Ph), 6,57 (2H, d, *J* = 3,6 Hz, H5), 4,98 (4H, s, CH₂), 4,89–4,83 (4H, m, CH₂CH₂), 4,79–4,73 (4H, m, CH₂CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 152,2 (Ph-q), 150,7 (C4), 150,5 (C7a), 150,3 (C2), 143,0 (C4'), 131,1 (C6), 124,7 (C5'), 116,7 (C4a), 115,6 (Ph), 98,8 (C5), 61,4 (CH₂), 49,0 (CH₂), 44,7 (CH₂). MS (ESI, m/z) 631,2 [M+H]⁺.

4,4'-bis{[1-(2-(4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}-1,1'-bifenil (78a) i 4-klor-7-(2-(4-(((4'-(prop-2-in-1-iloksi)-[1,1'-bifenil]-4-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin (78b)

Spojevi **78a** i **78b** priređeni su prema navedenom općem postupku iz spoja **74** (Metoda A: 50 mg, 0,19 mmol; Metoda B: 29,37 mg; 0,11 mmol; Metoda C: 50 mg, 0,19 mmol) i spoja **51** (Metoda A: 93,06 mg, 0,42 mol; Metoda B: 55 mg; 0,24 mmol; Metoda C: 93,06 mg, 0,42 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **78a** (Metoda A: 46,4 mg, 34 %; Metoda B: 47,2 mg; 33 %; Metoda

C: 26,2 mg 35 %; T.t. > 260 °C) i žuti praškasti spoj **78b** (Metoda B: 13,2 mg; 24 %; T.t. = 234–238 °C).

78a: ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 8,54 (2H, s, H2), 8,06 (2H, s, H5'), 7,54 (4H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 7,49 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 7,03 (6H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 6,56 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 5,08 (4H, s, CH_2), 4,90–4,86 (4H, m, CH_2CH_2), 4,79–4,75 (4H, m, CH_2CH_2). ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 157,1 (Ph-q), 150,7 (C4), 150,5 (C7a), 150,2 (C2), 142,8 (C4'), 132,5 (Ph-q), 131,1 (C5), 127,2 (Ph), 124,8 (C5'), 116,7 (C4a), 115,1 (Ph), 98,7 (C6), 61,0 (CH_2), 49,0 (CH_2), 44,6 (CH_2). MS (ESI, m/z) 707,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

78b: ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 8,54 (1H, s, H2), 8,05 (1H, s, H5'), 7,62–7,49 (4H, m, Ph), 7,49 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 7,16–6,92 (4H, m, Ph), 6,57 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 5,08 (2H, s, OCH_2), 4,91–4,84 (2H, m, $J = 5,4$ Hz, CH_2CH_2), 4,82 (2H, d, $J = 2,3$ Hz, CH_2CCH), 4,80–4,74 (2H, m, CH_2CH_2), 3,58 (1H, t, $J = 2,3$ Hz, CH_2CCH). ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 157,1 (Ph-q), 150,5 (C7a), 150,2 (C2), 142,8 (C4'), 132,5 (Ph-q), 131,1 (Ph), 127,2 (Ph), 124,7 (C5'), 116,7 (C4a), 115,1 (Ph, C5), 98,8 (C6), 61,0 (CH_2), 49,0 (CH_2), 45,7 (CH_2), 44,6 (CH_2). MS (ESI, m/z) 485,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1,3-bis{1-[2-(4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-7-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}propan (79a) i 4-klor-7-{2-[4-(pent-4-in-1-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (79b)

Spojevi **79a** i **79b** priređeni su prema navedenom općem postupku iz hepta-1,6-diina (Metoda A: 100 mg, 1,09 mmol; Metoda B: 10,51 mg; 0,11 mmol; Metoda C: 50 mg, 0,54 mmol) i spoja **51** (Metoda A: 534,31 mg, 2,4 mol; Metoda B: 56,0 mg; 0,25 mmol; Metoda C: 264,48 mg, 1,19 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : MeOH = 50 : 1) dobiven je bijeli praškasti produkt **79a** (Metoda A: 238,6 mg, 41 %; Metoda B: 26,6 mg; 45 %; Metoda C: 183,0 mg; 63 %; T.t. = 208 – 210 °C) i uljasti spoj **79b** (Metoda B: 7,8 mg; 23 %; Metoda C: 51,5 mg; 35 %).

79a: ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 8,54 (2H, s, H2), 7,62 (2H, s, H5'), 7,52 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 6,59 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,87–4,67 (8H, m, CH_2CH_2), 2,43 (4H, t, $J = 7,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,75–1,57 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 150,7 (C4), 150,5 (C7a), 150,2 (C2), 146,3 (C4'), 131,1 (C6), 122,1 (C5'), 116,7 (C3a), 98,7 (C5), 48,8 (CH_2), 45,0 (CH_2), 28,7 (CH_2), 24,0 (CH_2). MS (ESI, m/z) 537,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

79b: ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8.55 (1H, s, H2), 7.65 (1H, s, H5'), 7.52 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H6), 6.60 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H5), 4.97–4.64 (4H, m, CH_2CH_2), 2.78 (1H, t, $J = 2.6$ Hz, CH), 2.58 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH_2), 2.08 (2H, td, $J = 7.1, 2.6$ Hz, CH_2), 1.71–1.53 (2H, m, CH_2). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 150.78 (C4), 150.63 (C7a), 150.20 (C2), 146.05 (C4'), 131.11 (C6), 122.28 (C5'), 116.73 (C4a), 98.83 (C5), 84.06 (CCH), 71.42 (CCH), 48.88 (CH_2), 44.71 (CH_2), 27.85 (CH_2), 23.78 (CH_2), 17.01 (CH_2). MS (ESI, m/z) 315,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1,3-bis{1-[2-(4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-7-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}dimetileter (80a)

Spoj **80a** priređen je prema navedenom općem postupku za metodu C iz propargil-etera (100 mg; 1,06 mmol) i spoja **51** (495,57 mg; 2,33 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : MeOH = 50 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **80a** (Metoda C: 290,1 mg; 51 %; T.t. = 206–208 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,54 (2H, s, H2), 7,93 (2H, s, H5'), 7,52 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 6,59 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,89–4,83 (4H, m, CH_2CH_2), 4,80–4,74 (4H, m, CH_2CH_2), 4,34 (4H, s, CH_2OCH_2). ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 150,7 (C4), 150,5 (C7a), 150,2 (C2), 143,5 (C4'), 131,1 (C6), 124,3 (C5'), 116,7 (C4a), 98,8 (C5), 62,0 (CH_2), 48,9 (CH_2), 44,6 (CH_2). MS (ESI, m/z) 539,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-(2-(4-((prop-2-in-1-iloksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)-7H-tetrazolo[5,1-*i*]purin (91)

Spoj **91** priređen je prema navedenom općem postupku za metodu B iz propargil-eter (0,10 mL; 1,01 mmol) i spoja **90** (513,08 mg; 2,23mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH_2Cl_2 : CH_3OH = 10 : 1 izoliran je kristaliničan produkt **91** (189,4 mg; 59 %; T.t. = 149–148 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 10,07 (1H, s, H2), 8,39 (1H, s, 8H), 7,95 (1H, s, H5'), 4,99–4,87 (4H, m, CH_2CH_2), 4,46 (2H, s, CH_2), 4,06 (2H, d, $J = 2,4$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CCH}}$), 3,44 (1H, t, $J = 2,4$ Hz, $\text{CH}_2\underline{\text{CCH}}$). ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 145,4 (C6), 143,3 (C4), 142,3 (C4'), 135,2 (C8), 124,6 (C5'), 119,6 (C5), 79,9 (CCH), 77,4 (CCH), 61,7 (CH_2), 56,4 (CH_2), 48,9 (CH_2), 44,5 (CH_2). MS (ESI, m/z) 325,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1,4-bis{[1-(2-(6-(piperidin-1-il)-9H-purin-9-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}benzen (99a) i 6-(piperidin-1-il)-9-{2-[4-((4-(prop-2-in-1-iloksi)fenoksi)-metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-9H-purin (99b)

Spojevi **99a** i **99b** priređeni su prema navedenom postupku iz spoja **73** (50 mg; 0,27 mmol) i spoja **97** (160,67 mg; 0,59 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) izolirani su bijeli praškasti spojevi **99a** (Metoda A: 121,1 mg, 61 %; Metoda B: 58,1 mg; 28 %; Metoda C: 67,5 mg; 36 %; T.t. = 233–236 °C) i **99b** (Metoda B: 4,9 mg; Metoda C: 34,4 mg; 28 %, 4 %; T.t. = 158–160 °C).

99a: ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,18 (2H, s, H₂), 8,12 (2H, s, H₈), 7,83 (2H, s, H_{5'}), 6,90 (4H, s, Ph), 5,01 (4H, s, CH₂), 4,87 (4H, t, *J* = 5,7 Hz, CH₂CH₂), 4,65 (4H, t, *J* = 5,7 Hz, CH₂CH₂), 4,16 (8H, s, CH₂), 1,70–1,51 (12H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 153,2 (C₆), 152,4 (Ph-q), 152,1 (C₂), 150,6 (C₄), 143,3 (C_{4'}), 139,5 (C₈), 124,8 (C_{5'}), 118,9 (C₅), 115,9 (Ph), 61,7 (CH₂), 48,8 (CH₂), 43,2 (CH₂), 25,8 (CH₂), 24,4 (CH₂). MS (ESI, m/z) 731,4 [M+H]⁺.

99b: ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,19 (1H, s, H₂), 8,12 (1H, s, H₈), 7,83 (1H, s, H_{5'}), 6,92 (4H, d, *J* = 1,9 Hz, Ph), 5,02 (2H, s, CH₂), 4,87 (2H, t, *J* = 5,7 Hz, CH₂CH₂), 4,71 (2H, d, *J* = 2,4 Hz, CH₂CCH), 4,66 (2H, t, *J* = 5,7 Hz, CH₂CH₂), 4,17 (4H, s, CH₂), 3,53 (1H, t, *J* = 2,4 Hz, CH₂CCH), 1,74–1,48 (6H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 153,0 (C₆), 152,6 (Ph-q), 151,9 (C₂), 151,4 (Ph-q), 150,5 (C₄), 143,0 (C_{4'}), 138,5 (C₈), 124,6 (C_{5'}), 118,7 (C₅), 115,8 (Ph), 115,6 (Ph), 78,0 (CCH), 61,5 (CH₂), 55,9 (CH₂), 48,5 (CH₂), 43,0 (CH₂), 25,6 (CH₂), 24,2 (CH₂). MS (ESI, m/z) 459,2 [M+H]⁺.

4,4'-bis{[1-(2-(6-(piperidin-1-il)-9H-purin-9-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}-1,1'-bifenil (100a) i 6-(piperidin-1-il)-9-{2-[4-(((4'-(prop-2-in-1-iloksi)-[1,1'-bifenil]-4-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil}-9H-purin (100b)

Spojevi **100a** i **100b** priređeni su prema navedenom općem postupku iz spoja **73** (50 mg; 0,19 mmol) i spoja **97** (113,83 mg; 0,42 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) izolirani su bijeli praškasti spojevi **100a** (Metoda A: 70,4 mg, 46 %; Metoda B: 74,0 mg; 48 %, Metoda C: 53,4 mg; 38 %; T.t. = 221–225 °C) i **100b** (Metoda C: 31,2 mg; 31 %; T.t. = 184–185 °C).

100a: ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 8,18 (2H, s, H2), 8,16 (2H, s, H8), 7,83 (2H, s, H5'), 7,53 (4H, d, $J = 8,8$ Hz, Ph), 7,05 (4H, d, $J = 8,8$ Hz, Ph), 5,12 (4H, s, CH₂), 4,91–4,86 (4H, m, CH₂CH₂), 4,74–4,62 (4H, m, CH₂CH₂), 4,16 (8H, bs, CH₂), 1,69–1,51 (12H, m, CH₂). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 157,1 (Ph-q), 153,0 (C6), 151,8 (C2), 150,5 (C4), 142,9 (C4'), 132,6 (Ph-q), 127,2 (Ph), 124,7 (C5'), 118,7 (C5), 115,1 (Ph), 61,1 (CH₂), 48,6 (CH₂), 43,0 (CH₂), 25,6 (CH₂), 24,2 (CH₂).

100b: ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 8,18 (1H, s, H2), 8,16 (1H, s, H8), 7,83 (1H, s, H5'), 7,55 (4H, dd, $J = 8,7; 6,4$ Hz, Ph), 7,05 (4H, dd, $J = 8,8; 1,9$ Hz, Ph), 5,12 (2H, s, CH₂), 4,88 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 4,82 (2H, d, $J = 2,3$ Hz, CH₂CCH), 4,66 (2H, t, $J = 5,8$ Hz, CH₂CH₂), 4,16 (4H, bs, CH₂), 3,58 (1H, t, $J = 2,3$ Hz, CH₂CCH), 1,73–1,50 (6H, m, CH₂). ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 157,3 (Ph-q), 156,4 (Ph-q), 153,2 (C6), 152,0 (C2), 150,6 (C4), 143,0 (C4'), 139,4 (C8), 133,1 (Ph-q), 132,6 (Ph-q), 127,4 (Ph), 127,3 (Ph), 124,8 (C5'), 118,8 (C5), 115,3 (Ph), 115,2 (Ph), 79,4 (CCH), 78,3 (CCH), 61,2 (CH₂), 55,5 (CH₂), 48,7 (CH₂), 43,1 (CH₂), 25,7 (CH₂), 24,3 (CH₂). MS (ESI, m/z) 535,2 [M+H]⁺.

1,3-bis{1-[2-(6-(piperidin-1-il)-9H-purin-9-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}propan (101a) i 9-{2-[4-(pent-4-in-1-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-6-(piperidin-1-il)-9H-purin (101b)

Spojevi **101a** i **101b** priređeni su prema navedenom općem postupku iz hepta-1,6-diina (0,06 mL; 0,54 mmol) i spoja **97** (324,06 mg; 1,19 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) izolirani su bijeli praškasti produkti **101a** (Metoda A: 178,6 mg, 52 %; Metoda B: 137,3 mg; 40 %; Metoda C: 78,4 mg; 21 %, T.t. = 218–220 °C) i **101b** (Metoda C: 20,7 mg, 10 %; T.t. = 171–174 °C).

101a: ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 8,17 (2H, s, H2), 7,81 (2H, s, H8), 7,72 (2H, s, H5'), 4,80 (4H, t, $J = 5,6$ Hz, CH₂CH₂), 4,62 (4H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 4,14 (4H, s, CH₂), 1,86–1,69 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,68–1,50 (12H, m, CH₂). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 153,0 (C6), 151,8 (C2), 150,5 (C4), 146,5 (C4'), 139,3 (C8), 122,2 (C5'), 118,7 (C5), 48,4 (CH₂), 43,1 (CH₂), 28,7 (CH₂), 25,6 (CH₂), 24,2 (CH₂), 24,1 (CH₂). MS (ESI, m/z) 637,3 [M+H]⁺.

101b: ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 8,18 (1H, s, H2), 7,81 (1H, s, H8), 7,72 (1H, s, H5'), 4,86–4,72 (2H, m, CH₂CH₂), 4,68–4,57 (2H, m, CH₂CH₂), 4,16 (4H, bs, CH₂), 2,78 (1H, t, $J = 2,6$ Hz, CCH), 2,62 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,12 (2H, td, $J = 7,0; 2,6$ Hz,

CH₂CH₂CH₂), 1,77–1,43 (8H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 153,5 (C6), 152,3 (C2), 150,9 (C4), 146,3 (C4'), 138,0 (C8), 122,8 (C5'), 119,2 (C5), 78,1 (CCH), 48,9 (CH₂), 43,5 (CH₂), 28,1 (CH₂), 26,1 (CH₂), 24,7 (CH₂), 24,4 (CH₂), 18,1 (CH₂). MS (ESI, m/z) 364,3 [M+H]⁺.

Bis{1-[2-(6-(piperidin-1-il)-9H-purin-9-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}dimetileter (102a)

Spoj **102a** priređen je prema navedenom općem postupku za metodu B iz propargil-etera (0,05 mL; 0,53 mmol) i spoja **97** (301,17 mg; 1,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1) izoliran je žuti praškasti produkt **102a** (Metoda C: 156,1 mg; 46 %; T.t. = 107–109 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,17 (2H, s, H₂), 8,03 (2H, s, H₈), 7,82 (2H, s, H_{5'}), 4,88–4,84 (4H, m, CH₂CH₂), 4,67–4,64 (4H, m, CH₂CH₂), 4,42 (4H, s, CH₂OCH₂), 4,13 (8H, bs, CH₂), 1,67–1,62 (4H, m, CH₂), 1,57–1,51 (8H, m, CH₂). MS (ESI, m/z) 639,3 [M+H]⁺.

1,4-bis((1-(2-(6-(pirolidin-1-il)-9H-purin-9-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)benzen (103a)

Spoj **103a** priređen je prema navedenom postupku iz spoja **73** (50 mg; 0,27 mmol) i spoja **98** (152,84 mg; 0,59 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **103a** (Metoda A: 100,7 mg; 61 %; Metoda B: 53,2 mg; 28 %; Metoda C: 101,9 mg; 61 %, T.t. = 253–256 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,17 (2H, s, H₂), 8,09 (2H, s, H₈), 7,79 (2H, s, H_{5'}), 6,90 (4H, s, Ph), 5,00 (4H, s, CH₂), 4,94–4,76 (4H, m, CH₂CH₂), 4,76–4,59 (4H, m, CH₂CH₂), 4,01 (4H, bs, CH₂), 3,62 (4H, bs, CH₂), 1,93 (8H, bs, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 152,4 (Ph-q), 152,3 (C6), 152,2 (C2), 149,9 (C4), 143,0 (C4'), 124,5 (C5'), 119,2 (C5), 115,7 (Ph), 61,6 (CH₂), 48,6 (CH₂), 42,9 (CH₂). MS (ESI, m/z) 703,3 [M+H]⁺.

4,4'-bis{[1-(2-(6-(pirolidin-1-il)-9H-purin-9-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}-1,1'-bifenil (104a) i 9-{2-[4-(((4'-(prop-2-in-1-iloksi)-[1,1'-bifenil]-4-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)-6-(pirolidin-1-il)-9H-purin (104b)

Spojevi **104a** i **104b** priređeni su prema navedenom općem postupku iz spoja **74** (50 mg; 0,19 mmol) i spoja **98** (107,25 mg; 0,42 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **104a** (Metoda A: 110,5 mg, 75

%; Metoda B: 118,4 mg, 80 %, Metoda C: 71,5 mg, 49 %; T.t. = 259–262 °C) i žuti praškasti spoj **104b** (Metoda B: 60,5 mg, 61 %; T.t. = 134–137 °C).

104a: ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,17 (2H, s, H2), 8,14 (2H, s, H8), 7,80 (2H, s, H5'), 7,53 (4H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 7,04 (4H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 5,12 (4H, s, CH₂), 4,92–4,85 (4H, m, CH₂CH₂), 4,70–4,63 (4H, m, CH₂CH₂), 4,00 (4H, bs, CH₂), 3,61 (4H, bs, CH₂), 1,92 (8H, bs, CH₂). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 157,1 (Ph-q), 152,4 (C6), 152,1 (C2), 149,8 (C4), 142,8 (C4'), 136,3 (C8), 132,6 (Ph-q), 127,1 (Ph), 124,5 (C5'), 119,1 (C5), 115,1 (Ph), 61,2 (CH₂), 48,5 (CH₂), 42,8 (CH₂), 41,4 (CH₂). MS (ESI, m/z) 779,40 [M+H]⁺.

104b: ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,17 (1H, s, H2), 8,14 (1H, s, H8), 7,80 (1H, s, H5'), 7,55 (4H, dd, $J = 8,7; 7,1$ Hz, Ph), 7,04 (4H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 5,12 (2H, s, CH₂), 4,91–4,86 (2H, m, CH₂CH₂), 4,83 (2H, d, $J = 2,3$ Hz, CH₂CCH), 4,70–4,64 (m, $J = 5,6$ Hz, CH₂CH₂), 3,69–3,53 (3H, m, CH₂, CCH), 3,14 (2H, s, CH₂), 1,93 (4H, s, CH₂). MS (ESI, m/z) 535,2 [M+H]⁺.

1,3-Bis{1-[2-(6-(pirolidin-1-il)-9H-purin-9-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}propan (105a) i 9-{2-[4-(pent-4-in-1-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-6-(pirolidin-1-il)-9H-purin (105b)

Spojivi **105a** i **105b** priređeni su prema navedenom postupku iz hepta-1,6-diina (50 mg; 0,54 mmol) i spoja **98** (305,7 mg; 1,19 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **105a** (Metoda A: 163,5 mg, 50 %; Metoda B: 125,4 mg; 41 %; Metoda C: 196,2 mg; 58 %; T.t. = 217–220 °C) i žuti uljasti spoj **105b** (Metoda B: 13,2 mg; 7 %; Metoda C: 95,1 mg; 51 %).

105a: ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,15 (1H, s, H2), 7,76 (1H, s, H8), 7,69 (1H, s, H5'), 4,90–4,69 (4H, m, CH₂CH₂), 4,75–4,52 (4H, m, CH₂CH₂), 3,98 (4H, bs, CH₂), 3,58 (4H, bs, CH₂), 2,48 (m, CH₂CH₂CH₂ u DMSO), 1,90 (8H, bs, CH₂), 1,83–1,70 (2H, m, CH₂CH₂CH₂). ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 152,4 (C6), 152,2 (C2), 149,9 (C4), 146,5 (C4'), 139,9 (C8), 122,2 (C5'), 119,2 (C5), 48,5 (CH₂), 43,1 (CH₂), 28,7 (CH₂), 24,1 (CH₂). MS (ESI, m/z) 609,1 [M+H]⁺.

105b: ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,17 (1H, s, H2), 7,79 (1H, s, H8), 7,73 (1H, s, H5'), 4,80 (2H, t, $J = 5,8$ Hz, CH₂CH₂), 4,63 (2H, t, $J = 5,8$ Hz, CH₂CH₂), 4,02 (2H, bs, CH₂), 3,64–3,56 (4H, m, CH₂; CH₂CH₂CH₂), 2,78 (1H, t, $J = 2,6$ Hz, CCH), 2,62 (2H, t, $J = 7,4$ Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,11 (2H, td, $J = 7,1, 2,6$ Hz, CH₂CH₂CH₂), 1,96 (4H, bs, CH₂). ^{13}C (151 MHz,

DMSO- d_6) (δ /ppm): 151,4 (C6), 149,9 (C2), 149,8 (C4), 146,0 (C4'), 139,8 (C8), 122,2 (C5'), 119,1 (C5), 84,0 (CCH), 71,4 (CCH), 48,4 (CH₂), 43,0 (CH₂), 41,6 (CH₂), 27,8 (CH₂), 23,8 (CH₂). MS (ESI, m/z) 351,1 [M+H]⁺.

Bis{1-[2-(6-(pirolidin-1-il)-9H-purin-9-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}dimetileter (106a)

Spoj **106a** priređen je prema navedenom općem postupku za metodu B iz propargil-etera (50 mg; 0,53 mmol) i spoja **98** (301,3 mg; 1,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) izoliran je žuti praškasti produkt **106a** (Metoda C: 164,2 mg; 48 %; T.t. = 112–115 °C). ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,16 (2H, s, H₂), 8,05 (2H, s, H₈), 7,81 (2H, s, H_{5'}), 4,86 (4H, s, CH₂), 4,66 (4H, s, CH₂), 4,40 (4H, s, CH₂), 3,97 (4H, s, CH₂), 3,59 (4H, s, CH₂), 1,91 (8H, s, CH₂). MS (ESI, m/z) 611,1 [M+H]⁺.

4,4'-bis{[1-(2-(6-amino-9H-purin-9-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}-1,1'-bifenil

(109a) i 6-amino-9-{2-[4-(((4'-(prop-2-in-1-iloksi)-[1,1'-bifenil]-4-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)-9H-purin (109b)

Spoj **109a** i **109b** priređeni su prema navedenom općem postupku iz spoja **73** (100 mg; 0,49 mmol) i spoja **92** (200,73 mg; 1,08 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) izolirani su bijeli praškasti produkti **109a** (Metoda A: 28,9 mg; 11 %; T.t. > 280 °C) i **109b** (Metoda B: 47,4 mg; 25 %; T.t. > 250 °C).

109a: ¹H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,11 (2H, s, H₂), 8,09 (2H, s, H₈), 7,80 (2H, s, H_{5'}), 7,20 (4H, s, NH₂), 6,90 (4H, s, Ph), 5,01 (4H, s, CH₂), 4,87 (4H, t, $J = 5,8$ Hz, CH₂CH₂), 4,65 (4H, t, $J = 5,8$ Hz, CH₂CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 155,6 (Ph-q), 152,2 (C6), 152,1 (C2), 149,3 (C4), 142,9 (C4'), 124,0 (C5'), 118,5 (C5), 115,7 (Ph), 61,7 (CH₂), 48,3 (CH₂), 42,6 (CH₂). MS (ESI, m/z) 595,30 [M+H]⁺.

109b: ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,11 (2H, s, H₂; H₈), 7,80 (1H, s, H_{5'}), 7,20 (2H, s, NH₂), 6,92 (4H, d, $J = 1,6$ Hz, Ph), 5,01 (2H, s, CH₂), 4,87 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 4,72 (2H, d, $J = 2,3$ Hz, CH₂CCH), 4,65 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 3,53 (t, $J = 2,3$ Hz, CH₂CCH). ¹³C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 155,9 (Ph-q), 152,6 (C6), 152,5 (C2), 151,4 (Ph-q), 149,5 (C4), 143,0 (C4'), 140,5 (C8), 124,6 (C5'), 118,6 (C5), 115,8 (Ph), 115,6 (Ph), 79,5 (CCH), 78,0 (CCH), 61,5 (CH₂), 55,9 (CH₂), 48,6 (CH₂), 43,0 (CH₂). MS (ESI, m/z) 391,20 [M+H]⁺.

6-amino-9-{2-[4-(pent-4-in-1-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-9H-purin (110b)

Spoj **110b** priređen je prema navedenom općem postupku iz hepta-1,6-diina (50 mg; 0,53 mmol) i spoja **92** (243,74 mg; 1,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **110b** (Metoda C: 89,3 mg; 57 %; Metoda B: 153,7 mg; 97 %; T.t. = 226–228 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,11 (1H, s, H2), 7,78 (1H, s, H8), 7,74 (1H, s, H5'), 7,18 (2H, s, NH_2), 4,80 (2H, t, $J = 5,8$ Hz, CH_2CH_2), 4,61 (2H, t, $J = 5,8$ Hz, CH_2CH_2), 2,78 (1H, t, $J = 2,6$ Hz, CCH), 2,63 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_2), 2,14 (2H, td, $J = 7,1$; 2,6 Hz, CH_2), 1,72–1,65 (2H, m, CH_2). ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 156,9 (C6), 152,4 (C2), 149,4 (C4), 146,0 (C4'), 140,5 (C8), 122,2 (C5'), 118,5 (C5), 84,0 (CCH), 71,5 (CCH), 48,5 (CH_2), 43,0 (CH_2), 27,8 (CH_2), 23,8 (CH_2), 17,1 (CH_2). MS (ESI, m/z) 297,40 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bis{1-[2-(6-amino-9H-purin-9-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}dimetileter (111a) i 6-amino-9-{2-[4-((prop-2-in-1-iloksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-9H-purin (111b)

Spojevi **111a** i **111b** priređeni su prema navedenom općem postupku za metodu B iz propargil-etera (100 mg; 1,06 mmol) i spoja **92** (432,88 mg; 2,12 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 :MeOH = 20:1) izoliran je žuti praškasti produkt **111a** (Metoda B: 48,9 mg; 8 %, T.t. = 191–193 °C) i spoj **111b** (Metoda B: 20,8 mg; 7 %, T.t. = 175–180 °C).

111a: ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,17 (2H, s, H2), 8,02 (2H, s, H8), 7,89 (2H, s, H5'), 7,57 (4H, bs, NH_2), 4,86 (4H, t, $J = 5,7$ Hz, CH_2CH_2), 4,66 (4H, t, $J = 5,7$ Hz, CH_2CH_2), 4,50 (4H, s, CH_2OCH_2). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 155,8 (C6), 152,4 (C2), 149,4 (C4), 143,6 (C4'), 124,1 (C5'), 118,5 (C5), 62,1 (CH_2), 48,5 (CH_2), 42,9 (CH_2).

111b: ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,11 (1H, s, H2), 8,02 (1H, s, H8), 7,80 (1H, s, H5'), 7,20 (2H, s, NH_2), 4,85 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH_2CH_2), 4,64 (2H, t, $J = 5,7$ Hz, CH_2CH_2), 4,50 (2H, s, OCH_2), 4,09 (2H, d, $J = 2,4$ Hz, CH_2CCH), 3,46 (1H, t, $J = 2,4$ Hz, CH_2CCH). ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 155,9 (C6), 152,4 (C2), 149,5 (C4), 143,2 (C4'), 140,4 (C8), 124,4 (C5'), 118,6 (C5), 79,9 (CCH), 77,4 (CCH), 61,8 (CH_2), 56,3 (CH_2), 48,6 (CH_2), 43,0 (CH_2).

4.4.7. Opći postupak za pripremu bis-pirololo[2,3-*d*]pirimidinskih derivata 81a–88a

Odgovarajući bis-pirololo[2,3-*d*]pirimidinski derivat (**77a–80a**) i ciklički amin (4 ekv.) otopljeni su u 3 mL vode. Reakcijska smjesa je miješana 10 min u mikrovalnom reaktoru pri 100 °C i 400 W. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije u reakcijsku smjesu je dodan acetonitril, a nastali talog odfiltriran

1,4-bis{[1-(2-(4-(piperidin-1-il)-7*H*-pirololo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}benzene (81a**)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **77a** (100 mg; 0,16) i piperidina (0,06 mL; 0,64 mmol) priređen je bezbojan uljasti produkt **81a** (68,9 mg; 59 %). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,13 (2H, s, H₂), 8,01 (2H, s, H_{5'}), 6,97–6,78 (6H, m, Ph; H₆), 6,49 (2H, d, *J* = 3,7 Hz, H₆), 5,01 (4H, s, OCH₂), 4,80 (4H, t, *J* = 5,9 Hz, CH₂CH₂), 4,62 (4H, t, *J* = 5,9 Hz, CH₂CH₂), 3,92–3,74 (8H, m, CH₂), 1,69–1,50 (12H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 157,5 (Ph-q), 153,5 (C₄), 152,0 (C₂), 151,9 (C_{7a}), 144,2 (C_{4'}), 125,8 (C_{5'}), 125,2 (C₆), 116,9 (Ph), 103,4 (C_{4a}), 102,2 (C₅), 62,8 (OCH₂), 50,3 (CH₂), 47,5 (CH₂CH₂), 45,2 (CH₂CH₂), 26,7 (CH₂), 25,5 (CH₂). MS (ESI, *m/z*) 729,1 [M+H]⁺.

4,4'-bis{[1-(2-(4-(piperidin-1-il)-7*H*-pirololo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}-1,1'-bifenil (82a**)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **78a** (70 mg; 0,09) i piperidina (0,04 mL; 0,37 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **82a** (51,9 mg; 73 %; T.t. = 137–139 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,54 (1H, s, H₂), 8,05 (1H, s, H_{5'}), 7,54 (4H, d, *J* = 8,4 Hz, Ph), 7,49 (2H, d, *J* = 3,5 Hz, H₆), 7,03 (4H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 6,57 (2H, d, *J* = 3,3 Hz, H₅), 5,08 (4H, s, OCH₂), 4,92–4,83 (4H, m, CH₂CH₂), 4,84–4,72 (4H, m, CH₂CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 157,1 (Ph-q), 156,2 (C₄), 150,7 (C_{7a}), 150,7 (C₂), 142,8 (C_{4'}), 132,5 (Ph-q), 127,2 (Ph), 124,6 (C₅), 123,9 (C_{5'}), 115,2 (Ph), 102,1 (C_{4a}), 100,9 (C₆), 61,1 (OCH₂), 49,1 (CH₂CH₂), 46,2 (CH₂CH₂), 43,9 (CH₂), 25,4 (CH₂), 24,2 (CH₂).

1,3-bis{1-[2-(4-(piperidin-1-il)-7*H*-pirololo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}propan (83a**)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **79a** (50 mg; 0,09 mmol) i piperidina (0,04 mL, 0,37 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **83a** (51,3 mg; 87 %; T.t. = 145–147 °C). ¹H

(600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,11 (2H, s, H₂), 7,57 (2H, s, H_{5'}), 6,92 (2H, d, $J = 3,7$ Hz, H₆), 6,50 (2H, d, $J = 3,7$ Hz, H₅), 4,73 (4H, t, $J = 5,9$ Hz, CH₂CH₂), 4,60 (4H, t, $J = 5,9$ Hz, CH₂CH₂), 3,98–3,64 (8H, m, CH₂), 2,47 (8H, t, $J = 7,4$ Hz, CH₂CH₂CH₂), 1,76–1,69 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,66–1,60 (4H, m, CH₂), 1,56–1,50 (8H, m, CH₂). MS (ESI, m/z) 635,4 [M+H]⁺.

Bis{1-[2-(4-(piperidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}dimetileter (84a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **80a** (50 mg; 0,09) i piperidina (0,04 mL, 0,37 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **84a** (34,7 mg; 59 %; T.t. = 141–143 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,12 (2H, s, H₂), 7,90 (2H, s, H_{5'}), 6,95 (2H, d, $J = 3,1$ Hz, H₆), 6,51 (2H, d, $J = 3,1$ Hz, H₅), 4,84–4,75 (4H, m, CH₂CH₂), 4,66–4,58 (4H, m, CH₂CH₂), 4,38 (4H, s, CH₂OCH₂), 3,92–3,66 (4H, m, CH₂), 1,73–1,43 (8H, m, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 156,1 (C₄), 150,7 (C_{7a}), 150,7 (C₂), 143,5 (C_{4'}), 124,2 (C_{5'}), 123,9 (C₆), 102,1 (C_{4a}), 100,9 (C₅), 62,0 (OCH₂), 49,0 (CH₂), 46,2 (CH₂CH₂), 44,0 (CH₂CH₂), 25,4 (CH₂), 24,2 (CH₂). MS (ESI, m/z) 637,4 [M+H]⁺.

1,4-bis{[1-(2-(4-(pirolidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}benzen (85a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **77a** (50 mg; 0,10) i pirolidina (0,04 mL; 0,40 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **85a** (46,3 mg; 65 %; T.t. = 193–195 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,09 (2H, s, H₂), 8,00 (2H, s, H_{5'}), 6,89 (4H, s, Ph), 6,84 (2H, d, $J = 3,5$ Hz, H₆), 6,48 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H₅), 5,00 (4H, s, OCH₂), 4,80 (4H, t, $J = 5,6$ Hz, CH₂CH₂), 4,62 (4H, t, $J = 5,6$ Hz, CH₂CH₂), 3,67 (8H, s, CH₂), 1,93 (8H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 154,7 (C₄), 152,2 (C_{7a}), 151,2 (C₂), 149,8 (Ph-q), 142,9 (C_{4'}), 124,5 (C_{5'}), 123,4 (C₆), 115,7 (Ph), 102,6 (C_{4a}), 100,7 (C₅), 61,5 (OCH₂), 49,0 (CH₂), 47,42 (CH₂), 43,83 (CH₂). MS (ESI, m/z) 701,4 [M+H]⁺.

4,4'-bis{[1-(2-(4-(pirolidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metoksi}-1,1'-bifenil (86a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **78a** (70 mg; 0,10) i pirolidina (0,04 mL; 0,40 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **86a** (46,3 mg; 65 %; T.t. = 187–189 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,09 (2H, s, H₂), 8,04 (2H, s, H_{5'}), 7,53 (4H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph),

7,04 (4H, d, $J = 8,8$ Hz, Ph), 6,82 (2H, d, $J = 3,5$ Hz, H5), 6,45 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 5,12 (4H, s, OCH₂), 4,80 (4H, t, $J = 5,9$ Hz, CH₂CH₂), 4,62 (4H, t, $J = 5,9$ Hz, CH₂CH₂), 3,65 (8H, s, CH₂), 1,91 (8H, s, CH₂). ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 157,1 (Ph-q), 154,6 (C4), 151,1 (C2), 149,7 (C7a), 142,8 (C4'), 132,5 (Ph-q), 127,2 (Ph), 124,6 (C5), 123,4 (C5'), 115,2 (Ph), 102,6 (C4a), 100,8 (C6), 61,1 (OCH₂), 49,1 (CH₂), 47,4 (CH₂), 43,8 (CH₂).

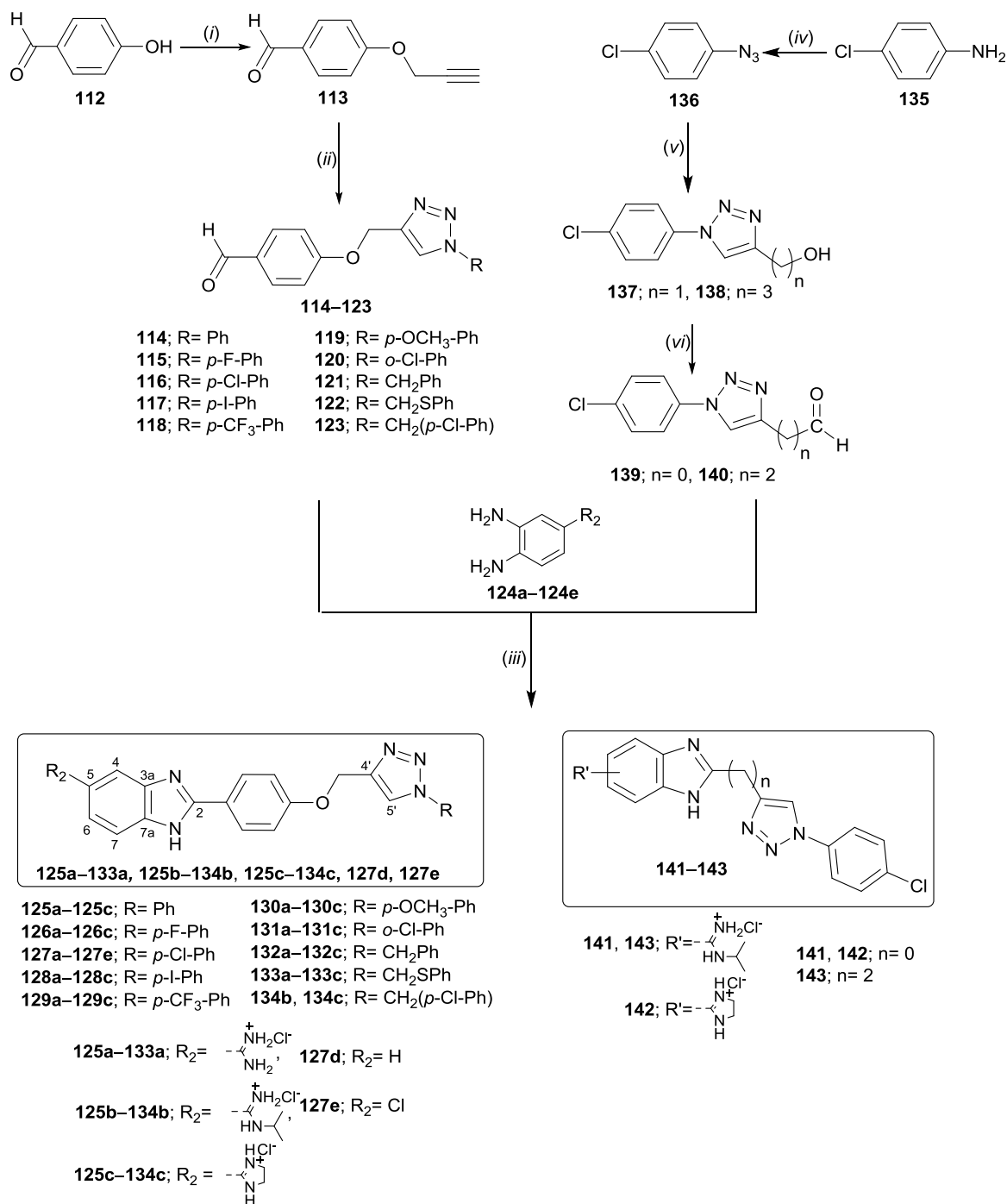
1,3-bis{1-[2-(4-(pirolidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}propan (87a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **79a** (50 mg; 0,09) i pirolidina (0,04 mL; 0,37 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **87a** (53,1 mg; 97 %; T.t. = 170–172 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,07 (2H, s, H2), 7,54 (2H, s, H5'), 6,87 (2H, d, $J = 3,5$ Hz, H6), 6,48 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 4,73 (4H, t, $J = 5,7$ Hz, CH₂CH₂), 4,59 (4H, t, $J = 5,6$ Hz, CH₂CH₂), 3,64 (8H, s, CH₂), 2,46 (4H, t, $J = 7,4$ Hz, CH₂CH₂CH₂ u DMSO), 1,91 (8H, s, CH₂), 1,79–1,62 (2H, m, CH₂CH₂CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 154,6 (C4), 151,1 (C2), 149,7 (C7a), 146,2 (C4'), 123,3 (C5), 122,0 (C5'), 102,6 (C4a), 100,7 (C6), 48,8 (CH₂), 47,3 (CH₂), 43,9 (CH₂), 28,6 (CH₂), 24,0 (CH₂).

Bis{1-[2-(4-(pirolidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il}dimetileter (88a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **80a** (50 mg; 0,09) i pirolidina (0,04 mL; 0,37 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **88a** (35,9 mg; 65 %; T.t. = 131–135 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 8,07 (2H, s, H2), 7,85 (2H, s, H5'), 6,89 (2H, d, $J = 2,2$ Hz, H6), 6,50 (2H, d, $J = 2,6$ Hz, H5), 4,84–4,73 (4H, m, CH₂CH₂), 4,69–4,56 (4H, m, CH₂CH₂), 4,36 (4H, s, CH₂OCH₂), 3,64 (8H, s, CH₂), 1,92 (8H, s, CH₂). ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 154,7 (C4), 151,2 (C2), 149,8 (C7a), 143,4 (C4'), 124,1 (C5'), 123,3 (C6), 102,6 (C4a), 100,8 (C5), 62,0 (CH₂), 49,0 (CH₂), 47,4 (CH₂), 43,8 (CH₂). MS (ESI, m/z) 609,3 [M+H]⁺.

4.5. Sinteza 2,5(6)-disupstituiranih benzimidazola



Shema 55. *Reagensi i uvjeti:* (i) propargil-bromid, K₂CO₃, EtOH, refluks, 8 h; (ii) odgovarajući azid, Cu(0), 1M CuSO₄, *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1, DMF, 80 °C, 90 min, US/MW; (iii) odgovarajući *o*-fenilendiamin, NaHSO₃ (aq), EtOH, refluks, 8 h; (iv) AcCN, *t*-BuONO, 0 °C, TMSN₃, s.t., 2 h; (v) ROH, Cu(OAc)₂, MeOH, 80 °C, US, 90 min; (vi) DMSO, COCl₂, Et₃N, CH₂Cl₂, -78 °C do s.t., 45 min.

4.5.1. Priprava 4-(prop-2-in-1-iloksi)benzaldehyda (**113**) [212]

4-Hidroksibenzaldehid **112** (2,0 g; 16,4 mmol) otopljen je u suhom etanolu (10 mL) i dodan je K₂CO₃ (2,6 g; 19,6 mmol). Nakon 30 min u reakcijsku smjesu je dodan propargil-bromid (2,19 mL; 19,6 mmol) i miješanje je nastavljeno 8 h na temperaturi refluksa. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂. Priređen je bijeli praškasti produkt **113** (2,2 g; 78 %; T.t. = 85–87 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,89 (1H, s, CHO), 7,89 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,18 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 4,94 (2H, d, *J* = 2,4 Hz, CH₂), 3,63 (1H, t, *J* = 2,4 Hz, CCH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,5 (CHO), 162,1 (Ph-q), 131,8 (Ph), 130,2 (Ph-q), 115,4 (Ph), 78,9 (CCH), 78,6 (CCH), 55,9 (CH₂).

4.5.2. Opći postupak priprave 4-[(1,2,3-triazol-4-il)metoksi]benzaldehyda **114–123**

Spoj **113**, Cu(0) (0,8 ekv.), 1M CuSO₄ (0,3 ekv.) i odgovarajući azid (1,2 ekv.) otopljeni su u 1 mL DMF-a i smjesi *t*-BuOH : H₂O = 1 : 1 (3 mL). Metoda A: Reakcija je provedena 1,5 h u mikrovalnom reaktoru pri 300 W i 80 °C. Metoda B: Reakcijska je provedena 1,5 h u ultrazvučnoj kupelji (1000 W, 35 kHz) pri 80 °C. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak nakon uparavanja pročišćen kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂.

4-[(1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]benzaldehyd (**114**) [213]

Spoj **114** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i azidobenzena (2,76 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli praškasti produkt **114** (Metoda A: 229,5 mg; 71 %; Metoda B: 310,1 mg; 97 %; T.t. = 99–101 °C (T.t._{lit.} = 101–103 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,89 (1H, s, CHO), 8,99 (1H, s, H5'), 7,93–7,89 (4H, m, Ph), 7,61 (2H, t, *J* = 7,9 Hz, Ph), 7,51 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, Ph), 7,29 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,38 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,6 (CHO), 163,0 (Ph-q), 143,4 (C4'), 136,6 (Ph-q), 132,0 (Ph), 130,1 (Ph), 129,0 (Ph), 123,3 (C5'), 120,4 (Ph), 115,4 (Ph), 61,5 (OCH₂).

4-[[1-(4-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (**115**) [213]

Spoj **115** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i 1-azido-4-fluorbenzena (2,76 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli praškasti produkt **115** (Metoda A: 161,1 mg; 47 %; Metoda

B: 325,6 mg; 95 %; T.t. = 140–142 °C, T.t._{lit.} = 138–140 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,89 (1H, s, CHO), 8,96 (1H, s, H5'), 8,00–7,85 (4H, m, Ph), 7,47 (2H, t, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,28 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,38 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,5 (CHO), 163,4; 160,2 (d, *J*_{CF} = 248,8 Hz, Ph-q), 162,9 (Ph-q), 143,3 (C4'), 133,2; 133,1 (d, *J*_{CF} = 2,9 Hz, Ph-q), 131,9 (Ph), 130,0 (Ph-q), 123,5 (C5'), 122,8; 122,7 (d, *J*_{CF} = 8,8 Hz, Ph), 117,0; 116,7 (d, *J*_{CF} = 23,2 Hz, Ph), 115,3 (Ph), 61,4 (OCH₂).

4-[[1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (**116**) [213]

Spoj **116** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i 1-azido-4-klorbenzen (2,76 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli praškasti produkt **116** (Metoda A: 122,3 mg; 34 %; Metoda B: 224,2 mg; 62 %; T.t. = 151–154 °C, T.t._{lit.} = 151–153 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,89 (1H, s, CHO), 9,01 (1H, s, H5'), 7,96 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,90 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,69 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,28 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,38 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,4 (CHO), 162,9 (Ph-q), 143,5 (C4'), 135,3 (Ph-q), 133,2 (Ph-q), 131,9 (Ph), 130,0 (Ph), 129,9 (Ph-q), 123,3 (C5'), 122,0 (Ph), 115,3 (Ph), 61,4 (OCH₂).

4-[[1-(4-jodfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (**117**)

Spoj **117** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i 1-azido-4-jodobenzena (2,76 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli praškasti produkt **117** (Metoda A: 270,6 mg; 56 %; Metoda B: 381,7 mg; 82 %; T.t. = 259–261 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,89 (1H, s, CHO), 9,01 (1H, s, H5'), 7,97 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,90 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,74 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,28 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,38 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,7 (CHO), 163,0 (Ph-q), 143,6 (C4'), 138,8 (Ph-q), 136,3 (Ph-q), 132,0 (Ph), 130,1 (Ph-q), 123,3 (C5'), 122,3 (Ph), 115,4 (Ph), 94,6 (Ph-q), 61,4 (OCH₂).

4-[[1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (**118**)

Spoj **118** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i 1-azido-4-(trifluormetil)benzena (2,76 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli praškasti produkt **118** (Metoda A: 120,4 mg; 30 %; Metoda B: 396,3 mg; 99 %; T.t. = 251–253 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,90 (1H, s,

CHO), 9,14 (1H, s, H5'), 8,19 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, Ph), 8,01 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ph), 7,91 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 7,29 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 5,41 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 191,6 (CHO), 162,9 (Ph-q), 143,8 (C4'), 132,0 (Ph-q), 130,1 (Ph-q), 129,3; 129,1; 128,9; 128,7 (q, $J_{CF} = 32,4$ Hz, Ph-g), 127,4; 127,4; 127,4; 127,3 (q, $J_{CF} = 3,5$ Hz, Ph), 124,8; 123,0 (d, $J_{CF} = 271,4$ Hz, CF₃), 123,5 (C5'), 120,9 (Ph), 115,4 (Ph), 61,4 (OCH₂).

4-[[1-(4-metoksifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (119) [213]

Spoj **119** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i 1-azido-4-metoksibenzena (2,76 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli kristaliničan produkt **119** (Metoda A: 149,3 mg; 42 %; Metoda B: 271,2 mg; 76 %; T.t. 127–130 °C) (T.t._{lit.} = 126–127 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 9,89 (1H, s, CHO), 8,87 (1H, s, H5'), 7,90 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ph), 7,81 (2H, d, $J = 9,1$ Hz, Ph), 7,28 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 7,14 (2H, d, $J = 9,1$ Hz, Ph), 5,36 (2H, s, OCH₂), 3,83 (3H, s, OCH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 191,6 (CHO), 163,0 (Ph-q), 159,5 (Ph-q), 143,1 (C4'), 132,0 (Ph), 130,0 (Ph-q), 130,0 (Ph-q), 123,3 (C5'), 122,0 (Ph), 115,4 (Ph), 115,0 (Ph), 61,5 (OCH₂), 55,7 (OCH₃).

4-[[1-(2-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (120)

Spoj **120** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i 1-azido-2-klorbenzena (2,76 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli praškasti produkt **120** (Metoda A: 194,2 mg; 53 %; Metoda B: 231,7 mg; 64 %; T.t. = 127–129 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 9,90 (1H, s, CHO), 8,76 (1H, s, H5'), 7,91 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 7,79 (1H, dd, $J = 8,0; 1,2$ Hz, Ph), 7,73 (1H, dd, $J = 7,8; 1,6$ Hz, Ph), 7,65 (1H, td, $J = 7,8; 1,6$ Hz, Ph), 7,60 (1H, td, $J = 7,6; 1,3$ Hz, Ph), 7,30 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 5,40 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 191,8 (CHO), 163,2 (Ph-q), 142,5 (C4'), 134,5 (Ph-q), 132,1 (Ph), 132,1 (Ph), 130,8 (Ph), 130,2 (Ph-q), 128,8 (Ph-q), 128,7 (Ph), 128,6 (Ph), 127,4 (C5'), 115,5 (Ph), 61,4 (OCH₂).

4-[[1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (121) [213]

Spoj **121** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i benzilazida (2,76 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran

je bijeli praškasti produkt **121** (Metoda A: 239,1 mg; 71 %; Metoda B: 303,6 mg; 90 %; T.t. = 101–103 °C, T.t._{lit.} = 99–100 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,88 (1H, s, CHO), 8,33 (1H, s, H5'), 7,87 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,44–7,27 (5H, m, Ph), 7,23 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,62 (2H, s, CH₂), 5,27 (2H, s, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,3 (CHO), 162,9 (Ph-q), 142,3 (C4'), 135,9 (Ph-q), 131,8 (Ph), 129,8 (Ph-q), 128,8 (Ph), 128,2 (Ph), 128,0 (Ph), 125,0 (C5'), 115,2 (Ph), 61,4 (OCH₂), 52,8 (CH₂).

4-[[1-((feniltio)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (**122**)

Spoj **122** priređen je prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i feniltiometilazida (0,19 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je uljasti produkt **122** (Metoda A: 214,3 mg; 57 %; Metoda B: 273,6 mg; 73 %). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,88 (1H, s, CHO), 8,21 (1H, s, 1H, H5'), 7,87 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,43–7,26 (5H, m, Ph), 7,21 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,96 (2H, s, 2H, CH₂), 5,26 (2H, s, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,6 (CHO), 162,9 (Ph-q), 142,6 (C4'), 132,4 (Ph-q), 131,9 (Ph), 130,7 (Ph), 130,0 (Ph-q), 129,4 (Ph), 127,9 (Ph), 124,7 (C5'), 115,4 (Ph), 61,3 (OCH₂), 51,9 (SCH₂).

4-[[1-(4-klorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (**123**) [214]

Spoj **123** priređen je prema navedenom općem postupku za metodu B iz spoja **113** (200 mg; 1,15 mmol) i 4-klorbenzilazida (2,76 mL; 1,38 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom izoliran je bijeli praškasti produkt **123** (Metoda B: 302,2 mg; 80 %; T.t. = 106–108 °C, T.t._{lit.} = 108–111 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,88 (1H, s, CHO), 8,33 (1H, s, H5'), 7,87 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,45 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ph), 7,35 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ph), 7,23 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,63 (2H, s, CH₂), 5,27 (2H, s, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,3 (CHO), 162,9 (Ph-q), 142,4 (C4'), 134,9 (Ph-q), 132,9 (Ph-q), 131,8 (Ph), 129,9 (Ph), 129,9 (Ph), 128,8 (Ph-q), 125,0 (C5'), 115,2 (Ph), 61,4 (OCH₂), 52,0 (CH₂).

4.5.3. Opći postupak za pripremu 5(6)-amidino-supstituiranih hibrida benzimidazola **125a–133a**, **125b–134b** i **125c–134c**

Odgovarajući 4-triazolni-benzaldehid (**114–123**) otopljen je u apsolutno suhom etanolu (15 mL) i dodan je 40 % NaHSO₃ (1 mL). Smjesa je miješana 30 min na temperaturi refluksa te je dodan odgovarajući *o*-fenilendiamin **124a–124c** (1 ekv.) i miješanje je nastavljeno 8 h na

temperaturi refluksa. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a u ostatak nakon uparavanja dodana je voda (5 mL). Heterogena smjesa miješana je preko noći, zatim je filtrirana a dobiveni talog je osušen u sušioniku. Kruti ostatak je otopljen u etanolu zasićenim s HCl-om (8-10 mL) i miješan 4 h. U otopinu je dodan dietil-eter, nastali talog je odfiltriran i osušen u sušioniku.

2-4-{f1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (125a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **114** (200 mg; 0,72 mmol) i *o*-fenilendiamina **124a** (113,4 mg; 0,64 mmol) izoliran je smeđi praškasti produkt **125a** (100,3 mg; 28 %; T.t. = 159–162 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,42 (2H, bs, NH), 9,13–8,99 (3H, m, NH, H5'), 8,33 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 8,18 (1H, s, H4), 7,92 (2H, d, *J* = 7,6 Hz, Ph), 7,86 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H7), 7,76 (1H, dd, *J* = 8,6; 1,4 Hz, H6), 7,62 (2H, t, *J* = 7,7 Hz, Ph), 7,56–7,45 (1H, m, Ph), 7,37 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 5,40 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,5 (CNH), 162,1 (Ph-q), 151,8 (C5), 143,2 (C4'), 136,6 (Ph-q), 136,2 (C7a), 132,7 (C3a), 130,6 (Ph), 130,0 (Ph), 128,9 (Ph), 125,0 (C5'), 124,6 (C2), 123,3 (C6), 120,3 (Ph), 116,2 (Ph-q), 116,0 (Ph), 114,7 (C4), 114,3 (C7), 61,52 (OCH₂). Anal. izračunato za C₂₃H₁₉N₇O × 2 HCl × 5 H₂O (*M_r* = 572,45): C 48,26; H 5,46; N 17,13; nađeno: C 48,53; H 5,76; N 17,28 %. HRMS: izračunato za C₂₃H₁₉N₇O (M + H)⁺: 410,1729; nađeno: 410,1740.

2-{4-[(1-(4-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (126a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **115** (200 mg; 0,67 mmol) i *o*-fenilenediamina **124a** (101,0 mg; 0,67 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **126a** (87 mg; 27 %; T.t. = 218–220 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,37 (2H, bs, NH), 9,02–8,94 (3H, m, NH, H5'), 8,28 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 8,15 (1H, s, H4), 7,90 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,83 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H7), 7,72 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H6), 7,35 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 7,28 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,38 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,8 (CNH), 163,3; 160,1 (d, *J_{CF}* = 245,8 Hz, Ph-q), 162,8 (Ph-q), 153,5 (C5), 143,4 (Ph-q), 143,2 (C4'), 133,0 (C7a), 131,8 (C3a), 129,9 (C2), 129,2 (C6), 123,4 (C5'), 122,7; 122,5 (d, *J_{CF}* = 8,8 Hz, Ph), 116,6; 116,9 (d, *J_{CF}* = 23,3 Hz, Ph), 115,5 (C7, C4), 115,2 (Ph), 61,3 (OCH₂). Anal. izračunato za C₂₃H₁₈FN₇O × 2 HCl × 3 H₂O (*M_r* = 554,41): C 49,83; H 4,73; N 17,68; nađeno:

C 49,82; H 4,78; N 17,54 %. HRMS: izračunato za $C_{23}H_{18}FN_7O$ ($M + H$)⁺: 428,1635; nađeno: 428,1619.

2-{4-[(1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (127a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **116** (200 mg; 0,64 mmol) i spoja **124a** (86,5 mg; 0,58 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **127a** (142,1 mg; 41 %, T.t. = 212–213 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,53 (2H, bs, NH), 9,22 (2H, bs, NH), 9,07 (1H, s, H5'), 8,45 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 8,23 (1H, s, H4), 7,98 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 7,91 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H7), 7,83 (1H, dd, *J* = 8,6; 1,4 Hz, H6), 7,69 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 7,40 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 5,42 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,6 (CNH), 161,4 (Ph-q), 152,4 (C5), 143,4 (C4'), 135,3 (Ph-q, C7a), 133,1 (Ph-q, C4a), 130,0 (Ph), 129,9 (Ph), 124,0 (C5'), 123,4 (C2), 121,9 (Ph), 115,7 (Ph), 115,0 (C4), 114,3 (C7), 61,4 (OCH₂). Anal. izračunato za $C_{23}H_{18}ClN_7O \times 2 HCl \times 2,6 H_2O$ ($M_r = 536,66$): C 49,01; H 4,51; N 17,39; nađeno: C 49,33; H 4,27; N 17,48 %. HRMS: izračunato za $C_{23}H_{18}ClN_7O$ ($M + H$)⁺: 444,1340; nađeno: 444.1346.

2-{4-[(1-(4-jodfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (128a)

Prema navedenom općem postupku iz produkt **117** (100 mg, 0.25 mmol) i **124a** (37.06 mg, 0.25 mmol) priređen je smeđi praškasti spoj **128a** (63,2 mg; 42 %, T.t. = 229–231 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,41 (2H, bs, NH), 9,05 (3H, bs, NH, H5'), 8,32 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph), 8,17 (1H, s, H4), 7,98 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H7), 7,79–7,73 (3H, m, H6, Ph), 7,36 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 5,39 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,7 (CNH), 160,9 (Ph-q), 153,1 (C5), 143,5 (C4'), 138,6 (Ph), 136,2 (Ph-q), 130,0 (C6), 129,5 (Ph), 123,2 (Ph), 123,1 (C5'), 122,6 (C2), 122,1 (Ph), 115,8 (C4), 115,6 (C7), 94,5 (Ph-q), 61,3 (OCH₂). Anal. izračunato za $C_{23}H_{18}N_7IO \times 2 HCl \times 3,75 H_2O$ ($M_r = 675,82$): C 40,88; H 4,10; N 14,51; nađeno: 40,64; H 3,96; N 14,78 %. HRMS: izračunato za $C_{23}H_{18}N_7IO$ ($M + H$)⁺: 536,0696; nađeno: 536,0679.

2-{4-[(1-(4-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1H-benzo[d]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (129a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **118** (200 mg; 0,58 mmol) i **124a** (86,5 mg; 0,58 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **129a** (144,0 mg; 39 %; T.t. = 247–250 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,43 (2H, bs, NH), 9,18 (1H, s, H5') 9,07 (2H, bs, NH), 8,35 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 8,26–8,14 (3H, m, H4, Ph), 8,02 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,88 (1H, *J* = 8,7 Hz, H7), 7,78 (1H, dd, *J* = 8,5; 1,6 Hz, H6), 7,39 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 5,44 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 166,0 (CNH), 160,9 (Ph-q), 153,7 (C5), 144,0 (C4'), 140,4 (C7a), 139,5 (C3a), 137,4 (Ph-q), 130,0 (Ph), 129,8; 129,4; 128,9; 128,9 (q, *J*_{CF} = 32,4 Hz, Ph), 129,5 (Ph), 127,6, 127,54; 127,50; 127,45 (q, *J*_{CF} = 3,7 Hz, Ph), 127,45, 125,81; 122,21 (d, *J*_{CF} = 272 Hz, CF₃), 123,6 (C5'), 123,2 (C6), 122,6 (C2), 121,0 (Ph), 120,2 (Ph-q), 115,8 (Ph), 114,7 (C7/C4), 61,4 (OCH₂). Anal. izračunato za C₂₄H₁₈F₃N₇O × 2 HCl × 2,6 H₂O (*M*_r = 597,21): C 48,27; H 4,25; N 16,42; nađeno: 48,52; H 4,32; N 16,18 %. HRMS: izračunato za C₂₄H₁₈F₃N₇O (M + H)⁺: 478,1603; nađeno: 478,1611.

2-{4-[(1-(4-metoksifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1H-benzo[d]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (130a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **119** (200 mg; 0,65 mmol) i spoja **124a** (96,51 mg; 0,65 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **130a** (122,7 mg; 53 %, T.t. = 195–197 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,35 (2H, s, NH), 8,94 (2H, s, NH), 8,90 (1H, s, H5'), 8,26 (2H d, *J* = 8,2 Hz, Ph), 8,15 (1H, s, H4), 7,84–7,80 (3H, m, Ph; H7), 7,71 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H6), 7,34 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,15 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, Ph), 5,37 (2H, s, OCH₂), 3,84 (3H, s, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,9 (CNH), 160,6 (Ph-q), 159,4 (Ph-q), 153,8 (C5), 143,2 (C4'), 140,8 (C7a, C3a), 134,7 (Ph-q), 129,9 (C5), 129,1 (Ph), 123,1 (C5'), 122,7 (C6), 121,9 (Ph), 120,6 (Ph-q), 115,6 (Ph), 115,0 (C4, C7), 61,3 (OCH₂), 55,6 (OCH₃). MS (ESI, *m/z*) 440,1 [M+H]⁺. Anal. Izračunato za C₂₄H₂₁N₇O₂ × 2 HCl × 2,5 H₂O (*M*_r = 557,44): C 51,71; H 5,06; N 17,59; nađeno: C 51,60; H 4,72; N 17,34 %.

2-{4-[(1-(2-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1H-benzo[d]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (131a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **120** (200 mg; 0,64 mmol) i **124a** (96,51 mg; 0,64 mmol) dobiven je bijeli praškasti produkt **131a** (210,3 mg; 58 %, T.t. = 176–177 °C). ¹H (300

MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 9,36 (2H, s, NH), 8,96 (2H, s, NH), 8,77 (1H, s, 1H, H5'), 8,28 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ph), 8,16 (1H, s, H4), 7,88–7,55 (6H, m, Ph; H5; H6), 7,36 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ph), 5,40 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 165,6 (CNH), 161,3 (Ph-q), 152,7 (C5), 142,3 (C4'), 134,4 (C3a, C7a), 131,8 (Ph), 131,3 (C6), 130,6 (Ph), 129,8 (C5'), 128,5 (Ph), 127,2 (Ph-q), 123,8 (Ph), 123,2 (Ph-q), 122,2 (Ph-q), 115,9 (C4), 115,7 (Ph), 114,8 (C7), 61,2 (OCH₂). MS (ESI, m/z) 444,0 [M+H]⁺. Anal. izračunato za C₂₃H₁₈ClN₇O × 2 HCl × 3 H₂O ($M_r = 570,86$): C 48,39; H 4,59; N 17,17; nađeno: 48,11; H 4,47; N 17,38 %.

2-{4-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (132a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **121** (90 mg; 0,31 mmol) i spoja **124a** (46,56 mg; 0,31 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **132a** (140,6 mg; 90 %; T.t. = 204–206 °C). ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 9,48 (2H, s, NH), 9,12 (2H, s, NH), 8,40–8,32 (3H, m H5', Ph), 8,20 (1H, s, H4), 7,89 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H7), 7,80 (1H, dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, H6), 7,47–7,27 (7H, m, Ph), 5,64 (2H, s, CH₂), 5,30 (2H, s, CH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 166,3 (CNH), 161,2 (Ph-q), 154,0 (C5), 143,0 (C4'), 140,5 (Ph-q), 137,6 (C3a), 136,2 (C7a), 129,6 (Ph), 129,3 (Ph), 128,7 (C6), 128,4 (Ph), 125,4 (C4'), 123,4 (C4), 122,8 (C2), 120,1 (Ph-q), 116,0 (Ph), 115,9 (Ph), 115,0 (C7), 61,6 (OCH₂), 53,4 (CH₂). Anal. izračunato za C₂₄H₂₁N₇O × 2 HCl × 0,3 H₂O ($M_r = 501,80$): C 47,44; H 4,74; N 19,54; nađeno: C 47,71; H 4,58; N 19,27 %. HRMS: izračunato za C₂₄H₂₁N₇O (M + H)⁺: 424,1886; nađeno: 424,1881.

2-{4-[(1-((feniltio)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (133a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **122** (200 mg; 0,64 mmol) i spoja **124a** (96,51 mg; 0,64 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **133a** (324,8 mg; 90 %; T.t. = 173–176 °C). ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 9,46 (2H, s, NH), 9,08 (2H, s, NH), 8,34 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ph), 8,25 (1H, s, H5'), 8,20 (1H, s, H4), 7,89 (2H, t, $J = 7,8$ Hz, Ph), 7,80 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, H6), 7,45–7,29 (6H, m, H7, Ph), 5,99 (2H, s, OCH₂), 5,30 (2H, s, SCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 165,7 (CNH), 161,1 (Ph-q), 153,1 (C5), 142,6 (C4'), 139,2 (C7a), 132,4 (C3a), 131,8 (C6), 130,6 (Ph), 129,6 (Ph-q), 129,4 (Ph), 127,8 (Ph), 124,7 (C5'), 123,6 (C4), 123,0 (C2), 115,7 (Ph), 115,3 (C7), 61,3 (OCH₂), 51,8 (SCH₂). MS (ESI, m/z)

456,1 [M+H]⁺. Anal. izračunato za C₂₄H₂₁N₇OS × 2 HCl × 1,7 H₂O (M_r = 559,09): C 51,56; H 4,76; N 17,54; nađeno: 51,80; H 4,68; N 17,22 %.

2-{4-[(1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-*N*-izopropil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (125b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **114** (200 mg; 0,72 mmol) i *o*-fenilenediamina **124b** (114,2 mg; 0,72 mmol) dobiven je smeđi praškasti produkt **125b** (144,5 mg; 34 %; T.t. = 194–197 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,65 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, NH), 9,50 (1H, s, NH), 9,10–9,01 (2H, m, NH, H5'), 8,38 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph), 8,08 (1H, s, H4), 7,99–7,82 (3H, m, H7, Ph), 7,56–7,48 (1H, m, H6), 7,39 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,41 (2H, s, OCH₂), 4,22–3,97 (1H, m, CH), 1,31 (6H, d, *J* = 6,2 Hz, CH₃CCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,8 (CNH), 160,9 (Ph-q), 154,0 (C5), 143,9 (C4'), 140,7 (Ph-q), 138,1 (C7a), 136,8 (C3a), 130,5 (Ph), 129,4 (Ph), 123,9 (C2), 123,5 (C5'), 123,3 (C6), 120,8 (Ph-q), 120,7 (Ph), 116,0 (Ph), 114,9 (C4, C7), 61,5 (OCH₂), 45,5 (CH), 21,6 (CH₃CCH₃). Anal. izračunato za C₂₆H₂₅N₇O × 2 HCl × 3,75 H₂O (M_r = 592,01): C 52,75; H 5,87; N 16,56; nađeno: 52,78; H 5,72; N 16,50 %. HRMS: izračunato za C₂₆H₂₅N₇O (M + H)⁺: 452,2199; nađeno: 452,2202.

2-4-{[1-(4-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-*N*-izopropil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (126b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **115** (200 mg; 0,67 mmol) i spoja **124b** (119,2 mg; 0,67 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **126b** (243,7 mg; 60 %; T.t. = 214–216 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,65 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NH), 9,50 (1H, s, NH), 9,07 (1H, s, NH), 9,01 (1H, s, H5'), 8,38 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 8,08 (1H, s, H4), 8,02–7,93 (2H, m, Ph), 7,87 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H7), 7,67 (1H, dd, *J* = 8,5; 1,1 Hz, H6), 7,48 (2H, t, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,38 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 5,40 (2H, s, OCH₂), 4,31–3,94 (1H, m, CH), 1,32 (6H, d, *J* = 6,3 Hz, CH₃CCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 163,5; 160,2 (d, *J*_{CF} = 245,9 Hz, Ph-q), 162,2 (CNH), 161,0 (Ph-q), 153,0 (C5), 143,5 (C4'), 133,2; 133,1 (d, *J*_{CF} = 2,9 Hz, Ph-q; C3a, C7a), 130,1 (C6), 129,6 (Ph), 124,1 (C2), 123,5 (C5'), 122,8; 122,7 (d, *J*_{CF} = 8,8 Hz, Ph), 119,5 (Ph-q); 117,1; 116,8 (d, *J*_{CF} = 23,3 Hz, Ph), 115,7 (Ph), 115,5 (C4), 114,4 (C7), 61,4 (OCH₂), 45,2 (CH), 21,4 (CH₃CCH₃). Anal. izračunato za C₂₆H₂₄FN₇O × 2 HCl × 3,5 H₂O (M_r = 605,40): C 51,57; H 5,49; N 16,19; nađeno: C 51,57; H 5,24; N 16,48 %. HRMS: izračunato za C₂₆H₂₄FN₇O (M + H)⁺: 470,2105; nađeno: 470,2082.

***N*-izopropil-2-{4-[(1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (127b)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **116** (200 mg; 0,64 mmol) i spoja **124b** (113,4 mg; 0,64 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **127b** (92,7 mg; 25 %; T.t. = 218–220 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,65 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, NH), 9,50 (1H, s, NH), 9,07 (2H, s, NH and H5'), 8,38 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 8,08 (1H, s, H4), 7,98 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,87 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H7), 7,73–7,64 (3H, m, H6, Ph), 7,37 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 5,40 (2H, s, OCH₂), 4,16–3,95 (1H, m, CH), 1,31 (6H, d, *J* = 6,3 Hz, CH₃CCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,0 (CNH), 161,1 (Ph-q), 152,5 (C5), 143,5 (C4'), 135,3 (Ph-q, C7a), 133,1 (Ph-q, C3a), 129,9 (Ph), 129,7 (Ph), 126,5 (C6), 124,4 (C2), 123,8 (C5'), 123,3 (C4), 121,9 (Ph), 116,4 (C7), 61,3 (OCH₂), 45,1 (CH), 21,3 (CH₃CCH₃). Anal. izračunato za C₂₆H₂₄ClN₇O × 2 HCl × 0,75 H₂O (*M*_r = 572,41): C 54,56; H 4,84, N 17,13; nađeno: C 54,25; H 4,92; N 17,16 %. HRMS: izračunato za C₂₆H₂₄ClN₇O (M + H)⁺: 486,1809; nađeno: 486,1818.

***N*-izopropil-2-{4-[(1-(4-jodfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (128b)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **117** (200 mg; 0,49 mmol) i spoja **124b** (86,8 mg; 0,49 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **128b** (93,2 mg; 28 %; T.t. = 219–221 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,70 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NH), 9,55 (1H, s, NH), 9,16 (1H, s, NH), 9,07 (1H, s, H5'), 8,46 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 8,09 (1H, s, H4), 7,97 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,88 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H7), 7,79–7,67 (3H, m, H6, Ph), 7,38 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 5,40 (2H, s, OCH₂), 4,18–4,06 (1H, m, CH), 1,31 (6H, d, *J* = 6,3 Hz, CH₃CCH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,2 (CNH), 161,1 (Ph-q), 153,0 (C5), 147,7 (Ph-q), 143,6 (C4'), 142,8 (C7a), 138,6 (Ph), 136,2 (C3a), 131,1 (C6), 129,6 (Ph), 124,3 (C2), 123,7 (C4), 123,2 (C5'), 122,2 (Ph), 115,8 (Ph), 114,4 (Ph), 94,6 (Ph-q), 61,4 (OCH₂), 45,2 (CH), 21,3 (CH₃CCH₃). Anal. izračunato za C₂₆H₂₄IN₇O × 2 HCl × 1,3 H₂O (*M*_r = 673,77): C 46,35; H 4,28; N 14,55; nađeno: C 46,68; H 4,33; N 14,84 %. HRMS: izračunato za C₂₆H₂₄IN₇O (M + H)⁺: 578,1165; nađeno: 578,1140.

2-{4-[(1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-*N*-izopropil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (129b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **118** (200 mg; 0,58 mmol) i spoja **124b** (78,1 mg; 0,52 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **129b** (139,4 mg; 34 %; T.t. = 204–206 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,69 (1H, d, *J* = 7,7 Hz, NH), 9,53 (1H, s, NH), 9,20 (1H, s, H5'), 9,11 (1H, s, NH), 8,43 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 8,20 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ph), 8,09 (1H, s, H4), 8,01 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph), 7,89 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H7), 7,70 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H6), 7,40 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,44 (2H, s, CH₂), 4,17–4,03 (1H, m, CH), 1,31 (6H, d, *J* = 6,3 Hz, CH₃CCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,5 (CNH), 160,8 (Ph-q), 153,6 (C5), 144,0 (C4'), 140,1 (C7a), 139,5 (C3a), 137,5 (Ph-q), 132,1 (C6), 129,4 (Ph), 129,1; 128,9; 128,5; 128,2 (q, *J*_{CF} = 33,0 Hz, Ph-q), 127,6; 127,6; 127,5; 127,5 (q, *J*_{CF} = 3,8 Hz, Ph), 125,8; 122,2 (d, *J*_{CF} = 272,4 Hz, CF₃), 123,8 (C2), 123,6 (C4), 123,3 (C5'), 121,0 (Ph), 120,4 (Ph-q), 115,8 (Ph), 114,6 (C7), 61,4 (OCH₂), 45,3 (CH), 21,5 (CH₃CCH₃). Anal. izračunato za C₂₇H₂₄F₃N₇O × 2 HCl × 3,75 H₂O (*M*_r = 696,47): C 49,47; H 5,07; N 14,96; nađeno: C 49,56; H 4,99; N 14,88 %. HRMS: izračunato za C₂₇H₂₄F₃N₇O (M + H)⁺: 520,2073; nađeno: 520,2059.

***N*-izopropil-2-{4-[(1-(4-metoksifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (130b)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **119** (200 mg; 0,65 mmol) i spoja **124b** (115,2 mg; 0,65 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **130b** (225,8 mg; 58 %; T.t. = 188–191 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,66 (1H, d, *J* = 7,7 Hz, NH), 9,51 (1H, s, NH), 9,08 (1H, s, NH), 8,92 (1H, s, H5'), 8,39 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 8,08 (1H, s, H4), 7,88 (d, *J* = 8,5 Hz, H7), 7,83 (d, *J* = 9,0 Hz, Ph), 7,69 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, H6), 7,39 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,15 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, Ph), 5,39 (2H, s, OCH₂), 4,15–4,02 (1H, m, CH), 3,84 (3H, s, OCH₃), 1,32 (6H, d, *J* = 6,3 Hz, CH₃CHCH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,2 (CNH), 161,1 (Ph-q), 159,5 (Ph-q), 153,0 (C5), 143,2 (C4'), 130,0 (C7a, C3a), 129,6 (Ph), 124,3 (Ph-q), 124,2 (C2), 123,7 (C6), 123,3 (C5'), 122,0 (Ph), 115,8 (Ph), 115,4 (C4), 115,1 (C7), 61,4 (OCH₂), 55,7 (OCH₃), 45,3 (CH), 21,4 (CH₃CCH₃). MS (ESI, *m/z*) 482,1 [M+H]⁺. Anal. izračunato za C₂₇H₂₇N₇O₂ × 2 HCl × 2,6 H₂O (*M*_r = 601,32): C 53,93; H 5,73; N 16,30; nađeno: C 53,62; H 5,71; N 16,39 %.

***N*-izopropil-2-{4-(1-[(2-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (131b)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **120** (200 mg; 0,64 mmol) i spoja **124b** (101,0 mg; 0,57 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **131b** (105,5 mg; 28 %; T.t. = 210–213 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,58 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, NH), 9,43 (1H, s, NH), 8,99 (1H, s, NH), 8,78 (1H, s, H5'), 8,30 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 8,04 (1H, s, H4), 7,87–7,57 (6H, m, H7; H6; Ph), 7,37 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ph), 5,40 (2H, s, OCH₂), 4,13–4,00 (1H, m, CH), 1,31 (6H, d, *J* = 6,1 Hz, CH₃CHCH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,4 (CHN), 160,4 (Ph-q), 153,7 (C5), 142,5 (C4'), 134,4 (C7a, C3a), 131,8 (Ph), 130,6 (Ph), 128,9 (C2), 128,6 (C5'), 128,6 (C6), 128,5 (Ph), 127,1 (Ph), 123,1 (Ph-q), 122,6 (C4), 120,2 (Ph), 116,1 (Ph), 115,5 (C7), 61,1 (OCH₂), 45,1 (CH), 21,3 (CH₃CHCH₃). MS (ESI, *m/z*) 486,1 [M+H]⁺. Anal. izračunato za C₂₆H₂₄ClN₇O × 2 HCl × 2,3 H₂O (*M_r* = 600,33): C 52,02; H 5,14; N 16,33; nađeno: C 52,22; H 5,03; N 16,59 %.

2-{4-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-*N*-izopropil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (132b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **121** (200 mg; 0,68 mmol) i spoja **124b** (120,5 mg; 0,68 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **132b** (195,9 mg; 53 %; T.t. = 198–201 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,75 (1H, d, *J* = 7,7 Hz, NH), 9,59 (1H, s, NH), 9,21 (1H, s, NH), 8,51 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph), 8,37 (1H, s, H5'), 8,12 (1H, d, *J* = 0,9 Hz, H4), 7,90 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H7), 7,74 (1H, dd, *J* = 8,3; 1,1 Hz, H6), 7,40–7,32 (7H, m, Ph), 5,64 (2H, s, OCH₂), 5,31 (2H, s, CH₂), 4,17–4,10 (1H, m, CH), 1,31 (6H, d, *J* = 6,4 Hz, CH₃CCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,6 (CNH), 161,9 (Ph-q), 152,3 (C5), 145,8 (C7a), 142,4 (C4'), 142,4 (C3a), 136,0 (Ph-q), 129,8 (Ph), 129,7 (C6), 128,8 (Ph), 128,2 (Ph), 128,0 (Ph), 125,0 (C5'), 124,6 (C4), 124,0 (C2), 115,6 (Ph), 114,2 (C7), 61,4 (OCH₂), 52,9 (CH₂), 45,1 (CH), 21,3 (CH₃CCH₃). Anal. izračunato za C₂₇H₂₇N₇O × 2 HCl × 0,2 H₂O (*M_r* = 542,08): 59,82; H 5,47; N 18,09; nađeno: C 59,81; H 5,79; N 18,41 %. HRMS: izračunato za C₂₇H₂₇N₇O (M + H)⁺: 466,2355; nađeno: 466,2374.

2-{4-[(1-(feniltiometil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-*N*-izopropil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (133b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **122** (200 mg; 0,61 mmol) i spoja **124b** (108,9 mg; 0,61 mmol) dobiven je žuti praškasti produkt **133b** (73.1 mg, 21 %, T.t. = 152–154 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,66 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, NH), 9,51 (1H, s, NH), 9,09 (1H, s, NH), 8,39 (2H, d, *J* = 7,9 Hz, Ph), 8,25 (1H, s, H5'), 8,08 (1H, s, H4), 7,87 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H7), 7,68 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6), 7,40 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, Ph), 7,36–7,15 (5H, m, Ph), 5,98 (2H, s, OCH₂), 5,29 (2H, s, SCH₂), 4,24–3,99 (1H, m, CH), 1,31 (6H, d, *J* = 6,4 Hz, CH₃CHCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,9 (CNH), 160,5 (Ph-q), 154,4 (C5), 145,4 (Ph-q), 143,2 (C4'), 132,8 (C7a, C3a), 131,0 (Ph), 129,8 (Ph), 129,1 (C6), 128,2 (Ph), 125,0 (C5'), 123,2 (C2), 122,7 (C4), 122,1 (Ph-q), 115,9 (Ph, C7), 61,6 (OCH₂), 52,2 (SCH₂), 45,4 (CH), 21,8 (CH₃CHCH₃). MS (ESI, *m/z*) 498,1 [M+H]⁺. Anal. izračunato za C₂₇H₂₇N₇OS × 2 HCl × 0,3 H₂O (*M*_r = 575,95): C 56,31; H 5,18; N 17,02; nađeno: C 56,33; H 5,37; N 17,28 %.

***N*-izopropil-2-{4-[(1-(4-klorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (134b)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **123** (200 mg; 0,61 mmol) i spoja **124b** (117,32 mg; 0,61 mmol) dobiven je bijeli praškasti produkt **134b** (184,6 mg; 53 %; T.t. = 183–186 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,84 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, NH), 9,67 (1H, s, NH), 9,30 (1H, s, NH), 8,60 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 8,40 (1H, s, H5'), 8,15 (1H, s, H4), 7,96 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H7), 7,80 (1H, dd, *J* = 8,5; 1,0 Hz, H6), 7,45 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ph), 7,41–7,30 (4H, m, Ph), 5,65 (2H, s, CH₂), 5,33 (2H, s, CH₂), 4,22–4,07 (1H, m, CH), 1,31 (6H, d, *J* = 6,3 Hz, CH₃CCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,2 (CNH), 161,5 (Ph-q), 151,1 (C5), 142,3 (C4'), 135,2 (C7a), 134,9 (C3a), 132,9 (Ph-q), 131,9 (Ph-q), 130,7 (Ph), 130,0 (Ph), 128,8 (Ph), 125,9 (C2), 125,4 (C6), 125,1 (C5'), 115,8 (Ph), 115,6 (Ph-q), 114,5 (C4), 113,9 (C7), 61,5 (OCH₂), 52,1 (CH₂), 45,3 (CH), 21,3 (CH₃CCH₃). Anal. izračunato za C₂₇H₂₆ClN₇O × 2 HCl × 0,2 H₂O (*M*_r = 576,53): C 56,25, H 4,97, N 17,00; nađeno: C 56,21; H 4,16; N 16,88 %. HRMS: izračunato za C₂₇H₂₆ClN₇O (M + H)⁺: 500,1966; nađeno: 500,1956.

2-{4-[(1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (125c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **114** (200 mg; 0,72 mmol) i *o*-fenilenediamina **124c** (127,6 mg; 0,64 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **125c** (199,6 mg; 50 %; T.t. = 171–173 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,69 (2H, s, NH), 9,02 (1H, s, H5'), 8,38 (1H, s, H4), 8,33 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph), 7,94–7,86 (4H, m, H6, H7, Ph), 7,62 (2H, t, *J* = 7,8 Hz, Ph), 7,52 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, Ph), 7,36 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,40 (2H, s, OCH₂), 4,03 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,1 (CNH), 160,8 (Ph-q), 153,7 (C5), 143,3 (C4'), 138,4 (C7a), 137,8 (C3a), 136,5 (Ph-q), 129,9 (Ph), 129,5 (Ph), 128,8 (Ph), 123,3 (C6), 123,1 (C5'), 121,4 (C2), 120,2 (Ph), 116,4 (Ph-q), 115,5 (Ph), 115,5 (C4), 114,9 (C7), 61,3 (OCH₂), 44,3 (CH₂CH₂). Anal. izračunato za C₂₅H₂₁N₇O × 2 HCl × 2,5 H₂O (*M_r* = 553,45): C 54,25; H 5,10; N 17,72; nađeno: C 54,71; H 4,95; N 17,62 %. HRMS: izračunato za C₂₅H₂₁N₇O (M + H)⁺: 436,1886; nađeno: 436,1880.

2-{4-[(1-(4-fuorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (126c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **115** (200 mg; 0,67 mmol) i spoja **124c** (106,87 mg; 0,60 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **126c** (103,3 mg; 27 %; T.t. = 215–218 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,74 (2H, s, NH), 9,00 (1H, s, H5'), 8,40 (1H, s, H4), 8,36 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 8,00–7,92 (3H, m, H7, Ph), 7,89 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6), 7,47 (2H, t, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,36 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,39 (2H, s, CH₂), 4,03 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,4 (CNH), 163,4; 160,2 (d, *J_{CF}* = 245,9 Hz, Ph-q), 160,5 (Ph-q), 154,3 (C5), 143,5 (C4'), 143,3 (C7a), 134,2 (C3a), 133,2; 133,1 (d, *J_{CF}* = 2,9 Hz, Ph-q), 129,6 (C6), 129,2 (Ph), 123,4 (C5'), 122,8 (C4), 122,7; 122,6 (d, *J_{CF}* = 8,8 Hz, Ph), 120,8 (C2), 117,0; 116,7 (d, *J_{CF}* = 23,3 Hz, Ph), 116,2 (C7), 115,9 (Ph-q), 115,5 (Ph), 61,3 (OCH₂), 44,4 (CH₂CH₂). Anal. izračunato za C₂₅H₂₀FN₇O × 2 HCl × 1,7 H₂O (*M_r* = 563,66): C 59,91; H 4,60; N 17,60; nađeno: C 59,73; H 4,66; N 17,93 %. HRMS: izračunato za C₂₅H₂₀FN₇O (M + H)⁺: 454,1792; nađeno: 454,1805.

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (127c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **116** (200 mg; 0,64 mmol) i spoja **124c** (112,98 mg; 0,64 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **127c** (227,3 mg; 63 %; T.t. = 207–209 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,77 (2H, s, NH), 9,06 (1H, s, H5'), 8,42 (1H, s, H4), 8,37 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 8,03–7,92 (4H, m, H7, H6, Ph), 7,69 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,38 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,40 (2H, s, OCH₂), 4,04 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,5 (CNH), 160,4 (Ph-q), 154,4 (C5), 143,7 (C4'), 135,4 (C7a), 133,8 (C3a), 133,2 (Ph-q), 131,9 (C6), 130,0 (Ph), 129,1 (Ph), 123,3 (C5'), 122,7 (C4), 122,0 (Ph), 121,0 (C2), 115,7 (Ph-q), 115,5 (Ph), 115,3 (C7), 61,3 (OCH₂), 44,4 (CH₂CH₂). Anal. izračunato za C₂₅H₂₀ClN₇O × 2 HCl × 1,3 H₂O (*M_r* = 566,27): C 53,03; H 4,38; N 17,31; nađeno: C 52,82; H 4,33; N 17,33 %. HRMS: izračunato za C₂₅H₂₀ClN₇O (M + H)⁺: 470,1496; nađeno: 470,1492.

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1-(4-jodfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (128c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **117** (200 mg; 0,49 mmol) i spoja **124c** (87,5 mg; 0,49 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **128c** (95,0 mg; 28 %; T.t. = 152–154 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,67 (2H, s, NH), 9,04 (1H, s, H5'), 8,37 (1H, s, H4), 8,31 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 7,97 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 7,90 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H7), 7,85 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H6), 7,75 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 7,34 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,38 (2H, s, CH₂), 4,03 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,2 (CNH), 160,6 (Ph-q), 153,9 (C5), 143,6 (C4'), 138,6 (Ph), 136,2 (Ph-q, C7a, C3a), 129,3 (Ph), 128,4 (C6), 126,6 (C2), 123,0 (C5'), 122,0 (C4), 121,0 (Ph), 116,0 (C2), 115,5 (Ph, C7), 94,5 (Ph-q), 61,2 (OCH₂), 44,3 (CH₂CH₂). Anal. izračunato za C₂₅H₂₀IN₇O × 2 HCl × 1,9 H₂O (*M_r* = 688,53): C 44,91; H 3,89; N 14,66; nađeno: C 45,18; H 3,93; N 14,82 %. HRMS: izračunato za C₂₅H₂₀IN₇O (M + H)⁺: 562,0852; nađeno: 562,0850.

2-{4-[(1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (129c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **118** (200 mg; 0,58 mmol) i spoja **124c** (92,2 mg; 0,52 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **129c** (77,4 mg; 22 %; T.t. = 169–171 °C). ¹H

(300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 10,50 (2H, s, NH), 9,17 (1H, s, H5'), 8,32–8,18 (5H, m, H4, Ph), 8,02 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 7,83 (2H, s, H7, H6), 7,34 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ph), 5,41 (2H, s, OCH₂), 4,05 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 165,1 (CNH), 160,7 (Ph-q), 153,7 (C5), 143,8 (C4'), 1393 (Ph-q), 138,6 (C7a), 135,6 (C6), 131,8 (C3a), 129,4 (Ph), 129,1; 128,9; 128,7; 128,5 (q, $J_{CF} = 32,4$ Hz, Ph-q), 127,2; 127,2; 127,2; 127,2 (q, $J_{CF} = 3,5$ Hz, Ph-q), 124,66; 122,9 (d, $J_{CF} = 272,4$ Hz, CF₃), 123,4 (C5'), 123,3 (C4), 121,0 (C2), 120,7 (Ph), 116,3 (Ph), 115,5 (Ph), 115,2 (C7), 61,2 (OCH₂), 44,3 (CH₂CH₂). Anal. izračunato za C₂₆H₂₀F₃N₇O × 2 HCl × 2 H₂O ($M_r = 612,44$): C 50,99; H 4,28; N 16,01; nađeno: 51,13; H 4,21; N 15,87 %. HRMS: izračunato za C₂₆H₂₀F₃N₇O (M + H)⁺: 504,1760; nađeno: 504,1741.

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1-(4-metoksifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1H-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (130c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **119** (200 mg; 0,65 mmol) i spoja **124c** (114,9 mg; 0,65 mmol) dobiven je žuti praškasti produkt **130c** (279,1 mg; 70 %; T.t. = 197–199 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 10,68 (2H, s, NH), 8,91 (1H, s, H5'), 8,37 (1H, s, H4), 8,32 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, Ph), 7,88 (1H, d, $J = 4,3$ Hz, H7), 7,82 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, Ph), 7,35 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, Ph), 7,28 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H6), 7,15 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, Ph), 5,37 (2H, s, OCH₂), 4,03 (4H, s, CH₂CH₂), 3,83 (3H, s, OCH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 165,5 (CNH), 160,7 (Ph-q), 159,5 (Ph-q), 154,3 (C5), 143,3 (C4'), 143,1 (Ph-q), 136,4 (C7a), 132,0 (C6), 130,0 (C3a), 129,3 (Ph), 123,21 (C4), 123,0 (C5'), 122,04 (Ph), 120,62 (C2), 116,1 (Ph-q), 115,6 (Ph), 115,4 (Ph), 115,1 (C7), 61,4 (OCH₂), 55,7 (OCH₃), 44,4 (CH₂CH₂). MS (ESI, m/z) 466,1 [M+H]⁺. Anal. izračunato za C₂₆H₂₃N₇O₂ × 2 HCl × 0,9 H₂O ($M_r = 554,65$): C 56,30; H 4,87; N 17,68; nađeno: 56,04; H 4,72; N 17,97 %.

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1-(2-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1H-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (131c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **120** (200 mg; 0,64 mmol) i spoja **124c** (112,9 mg; 0,64 mmol) priređen je crvenkasti praškasti produkt **131c** (115,3 mg; 30 %; T.t. = 194–196 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 10,82 (2H, s, NH), 8,81 (1H, s, H5'), 8,45 (1H, s, H4), 8,40 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ph), 7,98 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H7), 7,93 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H6), 7,81 (1H, dd, $J = 8,0; 1,2$ Hz, Ph), 7,75 (1H, dd, $J = 7,8; 1,6$ Hz, Ph), 7,67 (1H, td, $J = 7,8; 1,6$ Hz, Ph), 7,62 (1H, td, $J = 7,7; 1,3$ Hz, Ph), 7,40 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ph), 5,43 (2H, s, OCH₂),

4,04 (4H, s, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 165,2 (CNH), 161,1 (Ph-q), 153,7 (C5), 142,4 (C4'), 138,8 (C7a), 136,9 (Ph-q), 134,4 (C3a), 131,9 (C6), 130,7 (Ph), 130,2 (Ph), 129,6 (Ph), 128,6 (Ph), 128,5 (Ph), 127,2 (C2), 123,6 (C5'), 119,5 (Ph-q), 116,7 (Ph-q), 116,4 (C7), 115,7 (Ph), 61,2 (OCH₂), 44,4 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$). MS (ESI, m/z) 470.1 [M+H]⁺. Anal. izračunato za C₂₅H₂₀ClN₇O × 2 HCl × 1,9 H₂O ($M_r = 577,08$): C 52,03; H 4,51; N 16,99; nađeno: 52,31; H 4,66; N 16,63 %.

2-{4-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (132c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **121** (125 mg; 0,43 mmol) i spoja **124c** (70,9 mg; 0,40 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **132c** (130,2 mg; 51 %; T.t. = 198–201 °C). ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 10,92 (2H, s, NH), 8,49 (1H, s, H5'), 8,44 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, Ph), 8,38 (1H, s, H4), 8,04 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H7), 7,96 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H6), 7,41–7,32 (7H, m, Ph), 5,64 (2H, s, OCH₂), 5,31 (2H, s, CH₂), 4,04 (4H, s, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 165,0 (CNH), 161,5 (Ph-q), 153,2 (C5), 142,5 (C4'), 139,1 (C7a), 136,0 (Ph-q), 135,6 (C3a), 129,9 (Ph), 128,9 (Ph, C6), 128,3 (Ph), 128,1 (Ph), 125,1 (C5'), 124,2 (C4), 118,3 (C2), 117,3 (Ph-q), 115,7 (Ph), 114,8 (C7), 61,5 (OCH₂), 53,0 (CH₂), 44,5 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$). Anal. izračunato za C₂₆H₂₃N₇O × 2 HCl × 2,4 H₂O ($M_r = 594,93$): C 55,21; H 5,31; N 17,33; nađeno: C 52,13; H 4,99; N 17,58 %. HRMS: izračunato za C₂₆H₂₃N₇O (M + H)⁺: 405,2042; nađeno: 405,2029.

2-{4-[(1-(feniltiometil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (133c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **122** (200 mg; 0,61 mmol) i spoja **124c** (108,9 mg; 0,61 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **133c** (149,4 mg; 41 %; T.t. = 162–164 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 10,57 (2H, s, NH), 8,34–8,18 (4H, m, H5'; H4; Ph), 7,85 (2H, s, H7; H6), 7,44–7,21 (7H, m, Ph), 5,97 (2H, s, OCH₂), 5,26 (2H, s, SCH₂), 4,03 (4H, s, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 165,1 (CNH), 162,8 (Ph-q), 160,8 (Ph-q), 153,8 (C5), 142,6 (C4'), 132,4 (C7a, C3a), 131,8 (C6), 130,5 (Ph), 129,9 (C2), 129,4 (C4), 129,3 (Ph), 127,7 (Ph), 124,6 (C5'), 116,4 (Ph-q), 115,5 (Ph), 115,2 (C7), 61,2 (OCH₂), 51,7 (SCH₂), 44,3 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$). MS (ESI, m/z) 482.0 [M+H]⁺. Anal. izračunato za C₂₆H₂₃N₇OS × 2 HCl × 2,2 H₂O ($M_r = 594,14$): C 52,56; H 4,99; N 16,50; nađeno: 52,64; H 5,12; N 16,29 %.

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1-(4-klorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (134c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **123** (200 mg, 0,61 mmol) i spoja **124c** (139,52 mg; 0,61 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **134c** (321,3 mg; 92 %, T.t. > 250 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,89 (2H, s, NH), 8,47 (1H, s, H5'), 8,42 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, Ph), 8,38 (1H, s, H4), 8,02 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H6), 7,92 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H7), 7,45 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, Ph), 7,36 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, Ph), 7,33 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ph), 5,64 (2H, s, CH₂), 5,30 (2H, s, OCH₂), 4,03 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,1 (CNH), 161,1 (Ph-q), 153,5 (C2), 142,5 (C4'), 135,5 (Ph-q), 135,0 (Ph-q), 132,9 (Ph-q), 130,0 (Ph), 129,6 (Ph), 128,8 (Ph), 125,0 (C5'), 123,7 (C6), 116,7 (C5), 115,6 (Ph, C4), 114,8 (C7), 61,4 (OCH₂), 52,1 (CH₂), 44,3 (CH₂CH₂). Anal. izračunato za C₂₆H₂₂ClN₇O × 2 HCl × 0,7 H₂O (*M*_r = 569,49): C 54,84, H 4,49, N 17,22; nađeno: C 55,09, H 4,20, N 17,28 %. HRMS: izračunato za C₂₆H₂₂ClN₇O (M + H)⁺: 484,1653; nađeno: 484,1638.

4.5.4. Opći postupak za pripravu benzimidazolnih derivata 127d i 127e

4-triazolni-benzaldehid **115**, *o*-fenilendiamin (**123d** ili **123e**) i 40 % NaHSO₃ (1 mL) otopljeni su u apsolutno suhom etanolu (15 mL). Reakcijska smjesa je miješana 6 h na temperaturi refluksa. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a u ostatak nakon uparavanja dodana je voda (4 mL). Heterogena smjesa je miješana preko noći, zatim je filtrirana, a dobiveni talog je osušen i prekrizaliziran u acetonu.

2-{4-[(1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol (127d)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **116** (200 mg; 0,64 mmol) i spoja **124d** (69,21 mg; 0,64 mmol) priređen je bijeli kristaliničan produkt **127d** (205,8 mg; 80 %, T.t. > 250 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 12,76 (1H, s, NH), 9,03 (1H, s, H5'), 8,14 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,97 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,69 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,60–7,52 (2H, m, H5, H6), 7,26 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,21–7,14 (2H, m, H4, H7), 5,34 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 159,3 (Ph-q), 151,2 (C2), 143,8 (C4'), 135,3 (Ph-q, C7a), 133,1 (Ph-q, C3a), 129,9 (Ph, C6), 128,0 (Ph), 123,1 (Ph-q), 123,1 (C5'), 121,9 (C4), 121,8 (Ph), 115,2 (Ph, C7), 61,1 (OCH₂). Anal. izračunato za C₂₂H₁₆ClN₅O × 2,6 H₂O (*M*_r = 448,69): C 58,89; H 4,76; N 15,61; nađeno: C 58,62; H 4,55; N 15,67 %. HRMS: izračunato za C₂₂H₁₆ClN₅O (M + H)⁺: 402,1122; nađeno: 402,1134.

5-klor-2-{4-[(1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol (127e)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **116** (200 mg; 0,64 mmol) i spoja **124e** (90,90 mg; 0,64 mmol) priređen je žućkasti produkt **127e** (185 mg; 66 %; T.t. > 250 °C). ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 12,96 (1H, bs, NH), 9,01 (1H, s, H5'), 8,13 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 7,97 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,68 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 7,60 (1H, s, H4), 7,56 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H7), 7,27 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 7,20 (1H, dd, *J* = 8,6; 1,3 Hz, H6), 5,35 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 159,5 (Ph-q), 152,6 (C2), 143,7 (C4'), 135,3 (Ph-q, C3a), 133,1 (Ph-q, C7a), 129,8 (Ph, C6), 128,2 (Ph), 126,1 (C5), 123,1 (C5'), 122,5 (Ph-q), 122,0 (C4), 121,8 (Ph), 115,2 (Ph, C7), 61,1 (OCH₂). Anal. izračunato za C₂₂H₁₅Cl₂N₅O × 0,6 H₂O (*M_r* = 476,21): C 59,10; H 3,65; N 15,66; nađeno: C 58,95; H 3,55; N 15,63 %. HRMS: izračunato za C₂₂H₁₅Cl₂N₅O (M + H)⁺: 436,0732; nađeno: 436,0743.

4.5.5. Priprava 1-azido-4-klorbenzena (136) [215]

4-kloranilin **135** (2g; 15,7 mol) otopljen je u acetonitrilu (60 mL) pri 0 °C i dokapan je *t*-BuONO (2,81 mL; 53,5 mol). Zatim je dodan TMSN₃ (2,48 mL; 18,8 mol), te je reakcijska smjesa zagrijana do sobne temperature i miješanje je nastavljeno 2 h [216]. Po završetku reakcije upareno je uparena, a ostatak nakon uparavanja pročišćen kolonskom kromatografijom u eluensu *n*-heksan. Nestabilan azid **136** odmah je korišten u sljedećem stupnju.

4.5.6. Opći postupak priprave 1-(4-klorfenil)-1,2,3-triazolnih alkohola 137 i 138

1-azido-4-klorbenzen **136** (1 ekv.), odgovarajući terminalni alkin (propargil-alkohol ili 4-pentin-1-ol; 1 ekv.) i Cu(OAc)₂ (0,05 ekv.) otopljeni su u metanolu (5 mL) Reakcijska smjesa je provedena 1,5 h u ultrazvučnoj kupelji (1000 W, 35 kHz) pri 55 °C. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak nakon uparavanja pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1.

[1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metanol (137)

Prema navedenom općem postupku iz propargil-alkohola (0,07 mL; 1.2 mmol) i 1-azido-4-klorbenzena (2,76 mL; 1,2 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **137** (184,4 mg; 88 %; T.t. = 145–146 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,71 (1H, s, H5'), 7,95 (2H, d, *J* = 8.9

Hz, Ph), 7,66 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ph), 5,34 (1H, t, $J = 5,6$ Hz, OH), 4,61 (2H, d, $J = 5,5$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{OH}}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 149,3 (C4'), 135,5 (Ph-q), 132,7 (Ph-q), 129,8 (Ph), 121,6 (C5'), 121,1 (Ph), 54,9 (CH_2). MS (m/z) 210,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-[1-(4-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]propan-1-ol (138)

Prema navedenom općem postupku iz 4-pentin-1-ola (0,11 mL; 1,2 mmol) i 1-azido-4-klorbenzena (2,76 mL; 1,2 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **138** (235 mg; 99 %; T.t. = 96–99 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 8,60 (1H, s, H5'), 7,92 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ph), 7,66 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ph), 4,53 (1H, t, $J = 5,1$ Hz, OH), 3,48 (2H, dd, $J = 11,6; 6,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{OH}}$), 2,74 (2H, t, $J = 7,7$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}}$), 1,93–1,71 (1H, m, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 148,2 (C4'), 135,6 (Ph-q), 132,5 (Ph-q), 129,8 (Ph), 121,4 (C5'), 120,2 (Ph), 60,0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{OH}}$), 32,0 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}}$), 21,6 ($\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}}$). MS (m/z) 238,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.5.7. Opći postupak pripreme 1-(4-klorfenil)-1,2,3-triazolilnih aldehida 139 i 140 [217]

DMSO (8 mmol) je polako dokapan u otopinu oksalil-klorida (4 mmol) u CH_2Cl_2 (4 mL) pri -78 °C. Nakon 2 min u reakcijsku smjesu je kroz 5 minuta dodana otopina odgovarajućeg 1,2,3-triazolilnog alkohola **137** ili **138** (1 mmol) u 0,11 mL CH_2Cl_2 . Reakcijska smjesa je miješana 15 min, te je dodan Et_3N (8 mmol) i miješanje je nastavljeno 5 min pri -78 °C nakon čega je smjesa zagrijana na sobnu temperaturu. Reakcijska smjesa je razrijeđena s EtOAc (150 mL) i ekstrahirana s zasićenom vodenom otopinom NaCl. Organski sloj je sušen iznad MgSO_4 , filtriran i uparen. Kruti ostatak nakon uparavanja pročišćen je kolonskom kromatografijom u eluensu $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 50 : 1$.

1-(4-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (139)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **137** (165 mg; 0,79 mmol) dobiven je bijeli praškasti produkt **139** (101,5 mg; 62 %; T.t. = 165–169 °C). ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 10,12 (1H, s, CHO), 9,60 (1H, s, H5'), 8,03 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ph), 7,73 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ph). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ/ppm): 185,0 (CHO), 147,6 (C4'), 134,8 (Ph-q), 133,9 (Ph-q), 129,9 (Ph), 126,3 (Ph), 122,5 (C5'). MS (m/z) 208,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propanal (140)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **138** (150 mg, 0.63 mmol) dobiven je bijeli praškasti produkt **140** (96,1 mg; 65 %; T.t. = 57–62 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,77 (1H, s, CHO), 8,60 (1H, s, H5'), 7,90 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,66 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 2,98 (1H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₂), 2,89 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 202,4 (CHO); 147,0 (C4'), 135,5 (Ph-q), 132,6 (Ph-q), 129,8 (Ph), 121,5 (C5'), 120,4 (Ph), 41,8 (CH₂), 17,9 (CH₂). MS (*m/z*) 236,0 [M+H]⁺.

4.5.8. Opći postupak za pripremu 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola 141–143

1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)aldehidni derivat (**139** ili **140**) otopljen je u apsolutno suhom etanolu (15 mL) i dodan je 40 % NaHSO₃ (1 mL). Reakcijska smjesa je miješana 30 min na temperaturi refluksa te je dodan odgovarajući *o*-fenilendiamin **124b** ili **124c** (1 ekv.) i miješanje je nastavljeno 6 h na temperaturi refluksa. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a u ostatak nakon uparavanja dodana je voda (4 mL). Heterogena smjesa je miješana preko noći, zatim je filtrirana a dobiveni talog je osušen u sušioniku. Kruti ostatak je otopljen u etanolu zasićenim s HCl-om (8-10 mL) i miješan 4 h. U otopinu je zatim dodan dietil-eter, a nastali talog je odfiltriran i osušen u sušioniku.

***N*-izopropil-2-[1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karamid hidroklorid (141)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **139** (200 mg; 0,96 mmol) i spoja **124b** (204,87 mg; 0,96 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **141** (280,7 mg; 77 %; T.t. > 250 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,67 (1H, s, NH), 9,56 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, NH), 9,41 (1H, s, NH), 9,02 (1H, s, H5'), 8,15–7,97 (3H, m, H4, Ph), 7,84–7,69 (3H, m, Ph, H7), 7,59 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H6), 4,24–3,90 (1H, m, CH), 1,31 (6H, d, *J* = 5,8 Hz, CH₃CCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162,4 (CNH), 146,6 (C4'), 139,8 (C3a, C7a), 135,1 (Ph-q), 133,6 (Ph-q), 130,0 (Ph, C6), 123,4 (C5'), 123,1 (C2), 122,5 (C4, C7), 122,3 (Ph), 45,0 (CH), 21,3 (CH₃CCH₃). Anal. izračunato za C₁₉H₁₈ClN₇ × 2 HCl × 5,2 H₂O (*M_r* = 546,45): C 41,76; H 5,61; N 17,94; nađeno: C 42,00; H 5,24; N 17,88 %. HRMS: izračunato za C₁₉H₁₈ClN₇ (M + H)⁺: 380,1390; nađeno: 380,1375.

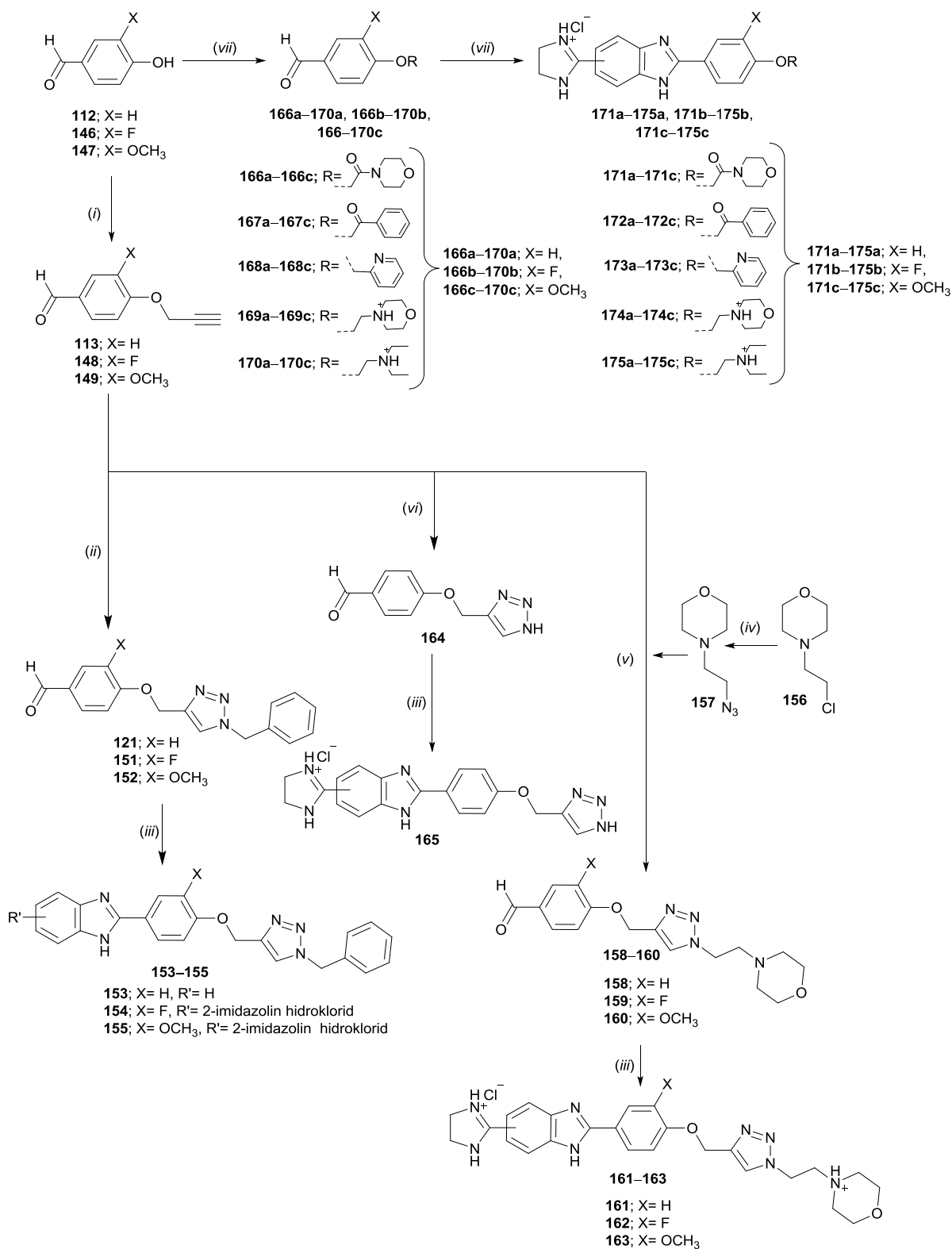
5(6)-(imidazolin-2-il)-2-[1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (142)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **139** (150 mg; 0,72 mmol) i spoja **124c** (165,24 mg; 0,72 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **142** (135 mg; 52 %; T.t. > 250 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,62 (2H, s, NH), 9,70 (1H, s, H5'), 8,39 (1H, bs, H4), 8,10 (2H, d, *J* = 7,4 Hz, Ph), 7,93–7,68 (4H, m, H6, H7, Ph), 4,03 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,4 (CNH), 139,7 (C4'), 135,1 (Ph-q, C7a), 133,6 (Ph-q, C3a), 130,0 (Ph), 129,8 (C6), 123,5 (C5'), 122,7 (Ph), 122,2 (C4), 121,8 (C7), 115,7 (C2), 44,3 (CH₂CH). Anal. izračunato za C₁₈H₁₄ClN₇ × 2 HCl × 7 H₂O (*M_r* = 562,84): C 38,41; H 5,37; N 17,40; nađeno: C 38,37, H 5,25; N 17,64 %. HRMS: izračunato za C₁₈H₁₄ClN₇ (M + H)⁺: 364,1077; nađeno: 364,1083.

***N*-izopropil-2-{2-[1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]etil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5(6)-karbamid hidroklorid (143)**

Prema navedenom općem postupku iz spoja **140** (180 mg; 0,76 mmol) i spoja **124b** (162,44 mg; 0,76 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **143** (150,3 mg; 48 %; T.t. = 199–201 °C). ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,6 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, NH), 9,48 (1H, s, NH), 9,08 (1H, s, NH), 8,74 (1H, s, H5'), 8,09 (1H, s, H4), 7,90 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 7,87 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H7), 7,71 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6), 7,66 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 4,13–4,05 (1H, m, CH), 3,55 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂), 3,42 (2H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂), 1,31 (6H, d, *J* = 6,4 Hz, CH₃CCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161,7 (CNH), 156,6 (C2), 145,9 (C4'), 141,0 (C7a), 138,1 (C3a), 135,4 (Ph-q), 132,8 (Ph-q), 129,9 (Ph, C6), 126,5 (C5), 124,3 (C5'), 121,5 (Ph), 120,9 (C4), 114,1 (C7), 45,2 (CH), 26,6 (CH₂), 22,7 (CH₂), 21,2 (CH₃CCH₃). Anal. izračunato za C₂₁H₂₂ClN₇ × 2 HCl × 1,5 H₂O (*M_r* = 507,85): C 49,67; H 5,36; N 19,31; nađeno: C 49,73, H 5,32; N 18,98 %. HRMS: izračunato za C₂₁H₂₂ClN₇ (M + H)⁺: 408,1703 nađeno: 408,1687.

4.6. Sinteza strukturno modificiranih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola



Shema 56. Reagensi i uvjeti: (i) propargil-bromid, AcCN, K₂CO₃, refluks, 8 h; (ii) **148**, NaN₃, Et₃N, 30 min, s.t., Cu(OAc)₂, *t*-BuOH: H₂O = 1 : 1, 24 h; (iii) NaHSO₃/*p*-benzokinon, EtOH, refluks, 8 h; (iv) NaN₃, H₂O, refluks, 16 h; (v) Cu(OAc)₂, MeOH, refluks, 24 h; (vi) CuI, TMSN₃, DMF : H₂O = 9 : 1, refluks, 6 h; (vii) RCl/RBr, AcCN, K₂CO₃, refluks, 8 h.

4.6.1. Opći postupak pripreve *O*-propargiliranih benzaldehida **148** i **149**

U otopinu odgovarajućeg hidroksibenzaldehida **146** ili **147** u suhom etanolu (8-10 mL) dodan je K_2CO_3 (1,2 ekv.) i smjesa je miješana 30 min te je dodan propargil-bromid (1,2 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na temperaturi refluksa. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja pročišćen je kolonskom kromatografijom u eluensu CH_2Cl_2 .

3-fluor-4-(prop-2-in-1-iloksi)benzaldehyd (**148**)

Prema navedenom općem postupku iz 3-fluor-4-hidroksibenzaldehida **146** (5,0 g; 35,7 mmol) priređen je žuti praškasti product **148** (4,5 g; 66 %, T.t. = 111–115 °C). 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) (δ /ppm): 9,88 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, CHO), 7,80 (1H, dd, $J = 8,4; 0,9$ Hz, Ph), 7,73 (1H, dd, $J = 11,3; 1,9$ Hz, Ph), 7,45 (1H, t, $J = 8,3$ Hz, Ph), 5,04 (2H, d, $J = 2,4$ Hz, CH_2), 3,70 (1H, t, $J = 2,4$ Hz, CCH).

3-metoksi-4-(prop-2-in-1-iloksi)benzaldehyd (**149**)

Prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida **147** (5,0 g; 32,7 mmol) priređen je žuti praškasti produkt **149** (4,7 g; 75 %, T.t. = 121–125 °C). 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) (δ /ppm): 9,85 (1H, s, CHO), 7,55 (1H, dd, $J = 8,3; 1,9$ Hz, Ph), 7,41–7,31 (2H, m, Ph), 5,04 (2H, d, $J = 2,4$ Hz, CH_2), 3,70 (1H, t, $J = 2,4$ Hz, CCH), 3,80 (3H, s, OCH_2). 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) (δ /ppm): 9,86 (1H, s, CHO), 7,56 (1H, dd, $J = 8,3; 1,8$ Hz, Ph), 7,43 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, Ph), 7,23 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, Ph), 4,94 (2H, d, $J = 2,4$ Hz, $\underline{CH_2}CCH$), 3,84 (3H, s, OCH_3), 3,63 (1H, t, $J = 2,3$ Hz, $\underline{CH_2}CCH$). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) (δ /ppm): 191,4 (CHO), 151,8 (Ph-q), 149,4 (Ph-q), 130,3 (Ph-q), 125,4 (Ph), 112,9 (Ph), 109,9 (Ph), 78,9 (CCH), 78,5 (CCH), 56,1 ($\underline{CH_2}CCH$), 55,6 (OCH_3).

4.6.2. Opći postupak one-pot sinteze *N*-1-benzil-1,2,3-triazolnih benzaldehida (**121**, **151** i **152**) [218]

Benzil-klorid **150** (1,1 ekv.), NaN_3 (0,9 ekv.) i Et_3N (1,3 ekv.) miješani su u smjesi *t*-BuOH : $H_2O = 1 : 1$ (4 mL) pola sata. Dodan je odgovarajući *O*-propargilirani benzaldehid (**113**, **148** ili **149**) i $Cu(OAc)_2$ (0,05 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri

sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja pročišćen je kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂.

4-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]benzaldehyd (121) [213]

Prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (250 g; 1,43 mmol) priređen je žuti praškasti produkt **121** (385,9 mg; 92 %). Analiza ¹H i ¹³C NMR spektara dana je u poglavlju 4.5.2.

4-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metoksi]-3-fluorbenzaldehyd (151)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **148** (250 g; 1,40 mmol) priređen je bezbojan uljasti produkt **151** (378,7 mg; 87 %). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,87 (1H, d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,35 (1H, s, H5'), 7,81–7,77 (1H, m, Ph), 7,70 (1H, dd, *J* = 11,3; 1,9 Hz, Ph), 7,60 (1H, t, *J* = 8,3 Hz, Ph), 7,39–7,29 (5H, m, Ph), 5,63 (2H, s, CH₂), 5,37 (2H, s, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,0; 190,9 (d, *J*_{CF} = 1,7 Hz, CHO), 153,4; 150,1 (d, *J*_{CF} = 247,1 Hz, Ph-q) 151,2; 151,1 (d, *J*_{CF} = 10,9 Hz, Ph-q), 1141,9 (C4'), 135,9 (Ph-q), 130,0; 130,0 (d, *J*_{CF} = 5,0 Hz, Ph-q), 128,9 (Ph), 128,3 (Ph), 128,0 (Ph), 125,3 (C5'), 115,5; 115,3 (d, *J*_{CF} = 18,3 Hz, Ph), 115,2; 115,1 (d, *J*_{CF} = 1,5 Hz, Ph), 62,3 (OCH₂), 53,0 (CH₂).

4-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]-3-metoksibenzaldehyd (152)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **149** (250 g; 1,31 mmol) priređen je bezbojan uljasti produkt **152** (345,6 mg; 82 %). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,85 (1H, s, CHO), 8,31 (1H, s, H5'), 7,55 (1H, dd, *J* = 8,3; 1,9 Hz, Ph), 7,41–7,31 (8H, m, Ph), 5,62 (2H, s, CH₂), 5,26 (2H, s, CH₂), 3,80 (3H, s, OCH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,4 (CHO), 152,8 (Ph-q), 149,4 (Ph-q), 142,3 (C4'), 135,9 (Ph-q), 123,0 (Ph-q), 128,8 (Ph), 128,2 (Ph), 128,0 (Ph), 125,7 (Ph), 125,0 (C5'), 112,8 (Ph), 109,9 (Ph), 61,8 (OCH₂), 55,5 (CH₃), 52,9 (CH₂).

4.6.3. Priprava 2-{4-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazola (153)

Spoj **121** (150 mg; 0,51 mmol) otopljen je u apsolutno suhom etanolu (15 mL) i dodan je 40 % NaHSO₃ (1 mL). Smjesa je miješana na temperaturi refluksa 30 min te je dodan *o*-fenilendiamin **124d** (55,30 mg; 0,51 mmol) i miješanje je nastavljeno 6 h na temperaturi refluksa. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri nižem tlaku, a u kruti ostatak nakon uparavanja dodana je voda (5 mL). Heterogena smjesa je miješana 4 h, a potom je filtrirana, a

nastali talog je sušen u sušioniku. Izoliran je žuti praškasti produkt **153** (182,3 mg; 94 %; T.t. > 250 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,32 (1H, s, H5'), 8,11 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,59–7,55 (2H, m, H4; H7), 7,40–7,36 (2H, m, H5; H6), 7,36–7,31 (3H, m, Ph), 7,24–7,17 (4H, m, Ph), 5,63 (2H, s, OCH₂), 5,24 (2H, s, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 159,4 (Ph-q), 142,7 (C4'), 135,9 (Ph-q, C3a, C7a), 128,7 (Ph), 128,1 (Ph), 128,0 (Ph), 127,9 (Ph), 124,7 (C5'), 122,6 (C2), 121,9 (C5; C6), 115,1 (C4; C7), 61,2 (OCH₂), 52,8 (CH₂).

4.6.4. Opći postupak za sinteza 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih benzimidazola **154** i **155**

Odgovarajući benzaldehid (**151** i **152**) otopljen je u apsolutno suhom etanolu (15 mL) i dodan je 40 % NaHSO₃ (1 mL). Smjesa je miješana 30 min te je dodan odgovarajući *o*-fenilendiamin (1 ekv.) i miješanje je nastavljeno 8 h na temperaturi refluksa. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku. U ostatak nakon uparavanja dodana je voda (5 mL). Heterogena smjesa je miješana 4 h, zatim je filtrirana, a nastali talog je sušen u sušioniku. Dobiveni talog miješan je 4 h u etanolu zasićenim s HCl-om. U otopinu je dodan dietil-eter, a nastali talog je filtrira i sušen u sušioniku.

2-{4-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]-3-fluorfenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (**154**)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **151** (150 mg; 0,48 mmol) i spoja **124c** (110,2 mg; 0,48 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **154** (79,5 mg; 35 %, T.t. = 200–203 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,83 (2H, s, NH), 8,45 (1H, s, H4), 8,38 (1H, s, H5'), 7,99–7,96 (2H, m, Ph), 7,98 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H7), 7,88 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H6), 7,65 (1H, t, *J* = 8,6 Hz, Ph), 7,40–7,36 (2H, m, Ph), 7,35–7,32 (3H, m, Ph), 5,64 (2H, s, OCH₂), 5,37 (2H, s, CH₂), 4,02 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,0 (CNH), 153,1; 149,9 (d, *J*_{CF} = 244,9 Hz, Ph-q), 152,5; 152,5 (d, *J*_{CF} = 2,4 Hz, C2), 148,8; 148,7 (d, *J*_{CF} = 10,3 Hz, Ph-q), 142,0 (C4'), 135,9 (Ph-q, C7a, C3a), 128,8 (Ph), 128,2 (Ph), 128,0 (Ph), 125,2 (Ph), 128,8 (C4), 123,6 (C5'), 116,6 (C5), 115,8 (C4, C7), 115,4; 115,1 (d, *J*_{CF} = 20,9 Hz, Ph), 62,2 (OCH₂), 52,9 (CH₂), 44,3 (CH₂CH₂).

2-{4-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]-3-metoksifenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (155)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **152** (150 mg; 0,46 mmol) i spoja **124c** (106,1 mg; 0,46 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **155** (179,4 mg; 81 %, T.t. = 197–200 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,88 (1H, s, NH), 8,46 (1H, s, H4), 8,35 (1H, s, H5'), 8,16 (1H, s, Ph), 8,08 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H6), 8,02 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H7), 7,92 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, Ph), 7,45 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 7,40–7,29 (5H, m, Ph), 5,63 (2H, s, OCH₂), 5,28 (2H, s, CH₂), 4,03 (4H, s, CH₂CH₂), 3,90 (3H, s, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,2 (CNH), 153,6 (C2), 151,0 (Ph-q), 149,5 (Ph-q), 142,6 (C4'), 139,6 (C3a, C7a), 136,1 (Ph-q), 129,0 (Ph), 128,5 (Ph), 128,2 (Ph), 125,3 (C6), 124,0 (C5'), 121,5 (Ph), 118,8 (Ph-q), 117,2 (C5), 115,8 (C4), 114,9 (C7), 113,7 (Ph), 111,1 (Ph), 61,9 (OCH₂), 56,1 (OCH₃), 53,1 (CH₂), 44,6 (CH₂CH₂).

4.6.5. Priprava 4-(2-azidoetil)morfolina (157) [219]

4-(2-kloretil)morfolin **156** (3,0 g; 16,12 mmol) otopljen u vodi (16,12 mL) i dodan je NaN₃ (3,15 g; 48,37 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 16 h pri 80 °C. Po završetku reakcije smjesa je ohlađena, te je pH namješten na 10 pomoću KOH. Smjesa je ekstrahirana s dietil-eterom (3 × 50 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog MgS, filtriran, a filtrat je uparen pri sniženom tlaku na sobnoj temperaturi. Nestabilan azid **157** odmah je korišten dalje za *click* reakciju.

4.6.6. Opći postupak priprave *N*-1-morfolinetilnih 1,2,3-triazolnih benzaldehida 158–160

Spoj **157** (600 mg, 3,84 mmol), odgovarajući *O*-propargilirani benzaldehid (**113**, **148** ili **149**) (3,84 mmol) i Cu(OAc)₂ (34,9 mg; 0,19 mmol) otopljeni su u metanolu (4 mL). Reakcijska smjesa je miješana na temperaturi refluksa preko noći. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja je pročišćen kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1.

4-[(1-(2-morfolinetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]benzaldehyd (158)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **113** (615,06 mg; 3,84 mmol) priređen je bezbojan kristaliničan produkt **158** (1,01 g; 83 %, T.t. = 109–113 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,88 (1H, s, CHO), 8,26 (1H, s, H5'), 7,88 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,24

(2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 5,29 (2H, s, CH₂), 4,50 (2H, t, $J = 6,3$ Hz, CH₂CH₂), 3,55–3,47 (4H, m, CH₂-morfolin), 2,73 (2H, t, $J = 6,3$ Hz, CH₂CH₂), 2,44–2,37 (4H, m, CH₂-morfolin). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 191,3 (CHO), 162,9 (Ph-q), 141,7 (C4'), 131,7 (Ph), 129,9 (Ph-q), 125,1 (C5'), 115,2 (Ph), 66,1 (CH₂-morfolin), 61,5 (OCH₂), 57,2 (CH₂CH₂), 52,9 (CH₂-morfolin), 46,6 (CH₂CH₂).

3-Fluor-4-[[1-(2-morfolinetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (159)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **148** (684,13 mg; 3,84 mmol) priređen je žuti kristaliničan produkt **159** (1,03 g; 80 %, T.t. = 89–93°C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 9,87 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, CHO), 8,29 (1H, s, H5'), 7,79 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, Ph), 7,70 (1H, dd, $J = 11,3; 1,8$ Hz, Ph), 7,61 (1H, t, $J = 8,3$ Hz, Ph), 5,38 (2H, s, CH₂), 4,50 (2H, t, $J = 6,2$ Hz, CH₂CH₂), 3,57–3,42 (4H, m, CH₂-morfolin), 2,73 (2H, t, $J = 6,2$ Hz, CH₂CH₂), 2,44–2,32 (4H, m, CH₂-morfolin). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 190,8; 190,8 (d, $J_{CF} = 1,7$ Hz, CHO), 153,3; 150,0 (d, $J_{CF} = 247,0$ Hz, Ph-q), 151,2; 151,0 (d, $J_{CF} = 10,8$ Hz, Ph-q), 141,2 (C4'), 129,9; 129,9 (d, $J_{CF} = 5,0$ Hz, Ph-q), 128,2; 128,1 (d, $J_{CF} = 3,0$ Hz, Ph), 125,5 (C5'), 115,4; 115,2 (d, $J_{CF} = 18,3$ Hz, Ph), 115,1; 115,1 (d, $J_{CF} = 1,5$ Hz, Ph), 66,1 (CH₂-morfolin), 62,3 (OCH₂), 57,3 (CH₂CH₂), 52,9 (CH₂-morfolin), 46,5 (CH₂CH₂).

3-metoksi-4-[[1-(2-morfolinetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metoksi]benzaldehyd (160)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **149** (729,83 mg; 3,84 mmol) priređen je bijeli praškasti produkt **160** (1,3 g; 98 %, T.t. = 142–146 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 9,85 (1H, s, CHO), 8,25 (1H, s, H5'), 7,56 (1H, dd, $J = 8,2; 1,8$ Hz, Ph), 7,45–7,33 (2H, m, Ph), 5,27 (2H, s, CH₂), 4,50 (2H, t, $J = 6,3$ Hz, CH₂CH₂), 3,81 (3H, s, OCH₃), 3,54–3,49 (4H, m, CH₂-morfolin), 2,74 (2H, t, $J = 6,3$ Hz, CH₂CH₂), 2,44–2,37 (4H, m, CH₂-morfolin). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 191,3 (CHO), 152,8 (Ph-q), 149,3 (C4'), 141,7 (Ph-q), 129,9 (Ph-q), 125,7 (Ph), 125,3 (C5'), 112,6 (Ph), 109,7 (Ph), 66,0 (CH₂-morfolin), 61,7 (OCH₂), 57,3 (CH₂CH₂), 55,5 (OCH₃), 52,9 (CH₂-morfolin), 46,5 (CH₂CH₂).

4.6.7. Opći postupak za sintezu 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola 161–163

Odgovarajući aldehid (**158–160**) otopljen je u apsolutno suhom etanolu (15 mL) i dodan je *p*-benzokinon (1 ekv.). Smjesa je miješana na temperaturi refluksa 30 min te je dodan *o*-fenilendiamin **124c** (1 ekv.) i miješanje je nastavljeno 8 h na temperaturi refluksa. Po

završetku reakcije, u smjesu je dodan dietil-eter, nastali talog je odfiltriran i osušen u sušioniku.

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1-(2-morfolinetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]-fenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (161)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **158** (150 mg; 0,47 mmol) priređen je sivi praškasti produkt **161** (74,5; 33 %, T.t. = 207–210 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 11,98 (1H, bs, NH), 10,94 (2H, s, NH), 8,50–8,40 (4H, m, H4, H5', Ph) 8,04 (1H, dd, *J* = 8,6; 1,4 Hz, H6), 7,90 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H7), 7,33 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, Ph), 5,33 (2H, s, OCH₂), 4,98 (2H, t, *J* = 7,0 Hz, CH₂CH₂), 4,02 (4H, s, CH₂CH₂), 3,97–3,80 (4H, m, CH₂-morfolin), 3,69 (2H, t, *J* = 7,0 Hz, CH₂CH₂), 3,50–3,33 (2H, m, CH₂-morfolin), 3,22–3,03 (2H, m, CH₂-morfolin). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 164,9 (CNH), 161,3 (Ph-q), 153,0 (C2), 142,5 (C4'), 139,1 (Ph-q), 136,5 (C7a), 135,4 (C3a), 129,9 (Ph), 125,5 (C5'), 124,0 (C6), 117,1 (C5), 115,7 (C4), 115,6 (Ph), 114,7 (C7), 63,1 (CH₂-morfolin), 61,4 (OCH₂), 54,1 (CH₂CH₂), 51,2 (CH₂-morfolin), 44,3 (CH₂CH₂), 43,6 (CH₂CH₂).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1-(2-morfolinetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]-3-fluorfenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (162)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **159** (150 mg; 0,45 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **162** (169,6 mg; 72 %, T.t. = 202–206 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 14,17–13,55 (1H, m, NH), 10,66 (2H, s, NH), 8,45–8,26 (2H, m, H5', H4), 8,20–8,05 (2H, m, Ph. H6), 7,92–7,72 (2H, m, Ph, H7), 7,60 (2H, t, *J* = 8,6 Hz, Ph), 5,36 (2H, s, OCH₂), 4,52 (2H, t, *J* = 6,1 Hz, CH₂CH₂), 4,02 (4H, s, CH₂CH₂), 3,60–3,41 (4H, m, CH₂-morfolin), 2,75 (2H, t, *J* = 5,5 Hz, CH₂CH₂), 2,41 (4H, bs, H₂-morfolin). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,4 (CNH), 153,3 (C2), 153,2; 150,1 (d, *J*_{CF} = 244,1 Hz, Ph-q), 148,0; 147,9 (d, *J*_{CF} = 6,1 Hz, Ph-q), 141,6 (C4'), 125,4 (C5'), 124,1 (C6), 123,9 (Ph), 122,5; 122,4 (d, *J*_{CF} = 7,2 Hz, Ph-q), 115,8 (Ph), 115,7 (C4), 115,3 (C5), 114,7; 114,5 (d, *J*_{CF} = 17,3 Hz, Ph), 112,2 (C7), 66,0 (CH₂-morfolin), 62,2 (OCH₂), 57,2 (CH₂CH₂), 52,9 (CH₂-morfolin), 46,5 (CH₂CH₂), 44,3 (CH₂CH₂).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1-(2-morfolinetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]-3-metoksifenil}-1*H*-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (163)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **160** (150 mg; 0,43 mmol) priređen je sivi praškasti produkt **163** (184,1 mg; 85 %, T.t. = 180–184 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 13,94–13,44 (2H, m, NH), 10,60 (2H, m, NH), 8,42–8,18 (2H, m, H5', H4), 7,98–7,70 (4H, m, Ph, H6, H7), 7,36 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, Ph), 5,24 (2H, s, OCH₂), 4,52 (2H, t, *J* = 5,6 Hz, CH₂CH₂), 4,02 (4H, s, CH₂CH₂), 3,89 (3H, s, OCH₃), 3,53 (4H, s, CH₂-morfolin), 2,75 (2H, bs, CH₂CH₂), 2,42 (4H, s, CH₂-morfolin). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 164,8 (CNH), 153,0 (Ph-q), 150,9 (C5), 149,2 (Ph-q), 142,4 (C4'), 125,5 (Ph), 124,1 (C6), 121,6 (C5'), 117,2 (C5), 115,6 (C4), 113,5 (Ph, C7), 111,4 (Ph), 63,0 (CH₂-morfolin), 61,7 (OCH₂), 56,1 (OCH₃), 54,1 (CH₂CH₂), 51,2 (CH₂-morfolin), 44,3 (CH₂CH₂), 43,6 (CH₂CH₂).

4.6.8. Priprava 4-[(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]benzaldehida (164)

Spoj **113** (400 mg; 2,30 mmol) otopljen je u smjesi DMF : MeOH = 9: 1 (4,60 mL), te su dodani TMSN₃ (0,45 mL; 3,44 mmol) i CuI (21,9 mg; 0,12 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na 100 °C preko noći. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku. Ostatak nakon uparavanja je pročišćen kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1. Izoliran je bijeli praškasti produkt **164** (355,8 mg; 76 %; T.t. = 120–123 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 15,13 (1H, bs, NH), 9,88 (1H, s, CHO), 8,09–7,99 (1H, m, *J* = 7,4 Hz, H5'), 7,88 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 7,24 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,32 (2H, s, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,4 (CHO), 162,9 (Ph-q), 131,8 (Ph), 129,3 (Ph-q), 128,0 (C5'), 115,3 (Ph), 61,2 (CH₂).

4.6.9. Priprava 5(6)-(imidazolin-2-il)-2-{4-[(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi]fenil}benzimidazolnog hidroklorida (165)

Spoj **164** (150 mg; 0,74 mmol) otopljen je u apsolutno suhom etanolu (15 mL) i dodan je 40 % NaHSO₃ (1 mL). Reakcijska smjesa je miješana 30 min te je dodan *o*-fenilendiamin **124c** (168,83 mg; 0,74 mmol) i miješanje je nastavljeno 8 h na temperaturi refluksa. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku. U kruti ostatak dodana je voda (5 mL). Heterogena smjesa je miješana 4 h, zatim je filtrirana, a nastali talog je sušen u sušioniku. Dobiveni talog miješan je 4 h u etanolu zasićenim s HCl-om. U smjesu je dodan dietil-eter, nastali talog je filtriran i sušen u sušioniku. Dobiven je bijeli praškasti produkt **165** (251,5 mg;

94 %, T.t. = 229–232 °C). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 10,90 (2H, s, NH), 8,47 (1H, s, H5'), 8,43 (2H, d, J = 8,9 Hz, Ph), 8,07–8,01 (2H, m, H4; H6), 7,94 (1H, d, J = 8,6 Hz, H7), 7,35 (2H, d, J = 8,9 Hz, Ph), 5,35 (2H, s, CH₂), 4,03 (4H, s, CH₂CH₂). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 164,7 (CNH), 161,6 (C2), 152,7 (Ph-q), 130,1 (Ph), 124,4 (C5'), 117,6 (C4), 115,7 (Ph), 115,5 (C7), 114,6 (C6), 61,2 (CH₂), 44,3 (CH₂CH₂).

4.6.10. Opći postupak pripreve *O*-propargiliranih benzaldehida **166a–170a**, **166b–170b** i **166c–170c**

Odgovarajući hidroksibenzaldehid (**112**, **146** ili **147**) otopljen je u suhom acetonitrilu (15-20 mL) i dodan je K₂CO₃ (1,5 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 30 min, dodan je odgovarajući halogenid (1 ekv.) i miješanje je nastavljeno preko noći na temperaturi refluksa. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja je pročišćena kolonskom kromatografijom.

4-(2-morfolino-2-oksoetoksi)benzaldehyd (**166a**)

Spoj **166a** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksibenzaldehida **112** (250 mg; 2,05 mmol) i *N*-(kloracetil)morfolina (0,27 mL; 2,05 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **166a** (506,7 mg; 99 %, T.t. = 147–150 °C). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 9,87 (1H, s, CHO), 7,85 (2H, d, J = 8,8 Hz, Ph), 7,11 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ph), 5,01 (2H, s, OCH₂), 3,68–3,52 (4H, m, CH₂-morfolin), 3,51–3,40 (4H, m, CH₂-morfolin). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 191,3 (CHO), 165,4 (CO), 163,1 (Ph-q), 131,6 (Ph), 129,8 (Ph-q), 115,1 (Ph), 66,0 (CH₂-morfolin), 65,6 (OCH₂), 44,6 (CH₂-morfolin).

3-fluor-4-(2-morfolino-2-oksoetoksi)benzaldehyd (**166b**)

Spoj **166b** priređen je prema navedenom općem postupku iz 3-fluor-4-hidroksibenzaldehida **146** (250 mg; 1,78 mmol) i *N*-(kloracetil)morfolina (0,23 mL; 1,78 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **166b** (473,9 mg; 99 %, T.t. = 84–88 °C). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 9,86 (1H, d, J = 2,0 Hz, CHO), 7,80–7,67 (2H, m, Ph), 7,28 (1H, t, J = 8,5 Hz, Ph), 5,13 (2H, s, OCH₂), 3,64–3,54 (4H, m, CH₂-morfolin), 3,47–3,42 (4H, m, CH₂-morfolin). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 190,8; 190,8 (d, J_{CF} = 1,9 Hz, CHO), 165,0 (CO), 153,2; 149,9 (d, J_{CF} = 247,0 Hz, Ph-q) 151,4; 151,3 (d, J_{CF} = 10,5 Hz, Ph-q), 129,9; 129,8 (d, J_{CF} = 5,2 Hz,

Ph-q), 127,8; 127,8 (d, $J_{CF} = 2,9$ Hz, Ph), 115,5; 115,3 (d, $J_{CF} = 18,3$ Hz, Ph), 115,0; 115,0 (d, $J_{CF} = 1,5$ Hz), 66,1 (CH₂-morfolin), 65,9 (OCH₂), 44,5 (CH₂-morfolin).

3-metoksi-4-(2-morfolino-2-oksoetoksi)benzaldehyd (166c)

Spoj **166c** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida **147** (250 mg; 1,64 mmol) i *N*-(kloracetil)morfolina (0,21 mL; 1,64 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **166c** (452,3 mg; 99 %, T.t. = 80–85 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,84 (1H, s, CHO), 7,51 (1H, dd, $J = 8,3; 1,9$ Hz, Ph), 7,42 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, Ph), 7,06 (d, $J = 8,3$ Hz, Ph), 5,0 (2H, s, OCH₂), 3,85 (3H, s, OCH₂), 3,71–3,52 (4H, m, CH₂-morfolin), 3,50–3,39 (4H, m, CH₂-morfolin). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,4 (CHO), 165,3 (CO), 152,9 (Ph-q), 149,2 (Ph-q), 129,9 (Ph-q), 125,5 (Ph), 112,7 (Ph), 110,0 (Ph), 66,1 (OCH₂, CH₂-morfolin), 55,6 (OCH₃), 44,7 (CH₂-morfolin).

4-(2-fenil-2-oksoetoksi)benzaldehyd (167a)

Spoj **167a** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksibenzaldehida **112** (250 mg; 2,5 mmol) i 2-bromacetofenona (352,4 mg; 1,78 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran je žuti praškasti produkt **167a** (324,7 mg; 71 %, T.t. = 81–85 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,87 (1H, s, CHO), 8,04 (2H, d, $J = 7,1$ Hz, Ph), 7,86 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ph), 7,71 (1H, t, $J = 7,4$ Hz, Ph), 7,58 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, Ph), 7,17 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 5,77 (2H, s, OCH₂).

3-fluor-4-(2-fenil-2-oksoetoksi)benzaldehyd (167b)

Spoj **167b** priređen je prema navedenom općem postupku iz 3-fluor-4-hidroksibenzaldehida **146** (250 mg; 1,78 mmol) i 2-bromacetofenona (322,4 mg; 1,78 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran je žuti praškasti produkt **167b** (365,9 mg; 72 %, T.t. = 115–120 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,86 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, CHO), 8,06–7,89 (2H, m, Ph), 7,83–7,65 (3H, m, Ph), 7,59 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, Ph), 7,35 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, Ph), 5,89 (2H, s, OCH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 193,4 (CO), 190,8; 190,8 (d, $J_{CF} = 1,8$ Hz, CHO), 153,2; 149,9 (d, $J_{CF} = 247,1$ Hz, Ph-q), 151,3; 151,1 (d, $J_{CF} = 10,6$ Hz, Ph-q), 134,0 (Ph), 130,0; 129,9 (d, $J_{CF} = 5,0$ Hz, Ph-q), 128,9 (Ph), 128,0 (Ph), 127,9 (Ph), 115,6 (Ph), 115,4; 115,1 (d, $J_{CF} = 18,3$ Hz, Ph), 115,0 (Ph), 70,9 (OCH₂).

3-metoksi-4-(2-fenil-2-oksoetoksi)benzaldehyd (167c)

Spoj **167c** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida **147** (250 mg; 1,64 mmol) i 2-bromacetofenona (324,7 mg; 1,64 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 50 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **167c** (424,7 mg; 96 %, T.t. = 130–134 °C). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ /ppm): 9,84 (1H, s, CHO), 8,03 (2H, d, J = 7,2 Hz, Ph), 7,70 (1H, d, J = 7,4 Hz, Ph), 7,58 (2H, t, J = 7,5 Hz, Ph), 7,52–7,40 (2H, m, Ph), 7,10 (1H, d, J = 8,3 Hz, Ph), 5,77 (2H, s, OCH_2), 3,88 (3H, s, OCH_3). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ /ppm): 193,7 (CO), 191,3 (CHO), 152,8 (Ph-q), 149,2 (Ph-q), 134,2 (Ph-q), 133,9 (Ph), 130,0 (Ph-q), 128,8 (Ph), 127,9 (Ph), 125,5 (Ph), 112,7 (Ph), 110,1 (Ph), 70,5 (OCH_2), 55,6 (OCH_3).

4-(2-piridin-2-il-metoksi)benzaldehyd (168a)

Spoj **168a** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksibenzaldehida **112** (250 mg; 2,5 mmol) i 2-klormetilpiridina (403,5 mg; 2,05 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 100 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **168a** (385,3 mg; 88 %, T.t. = 94–97 °C). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ /ppm): 9,87 (1H, s, CHO), 8,59 (1H, d, J = 4,2 Hz, H6'), 7,92–7,80 (3H, , m, Ph, H4'), 7,53 (1H, d, J = 7,8 Hz, H3'), 7,36 (1H, dd, J = 6,8; 5,0 Hz, H5'), 7,23 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ph), 5,31 (2H, s, OCH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ /ppm): 191,3 (CHO), 163,1 (Ph-q), 155,9 (C2'), 149,2 (C6'), 137,1 (Ph), 131,81 (Ph-q), 129,9 (C4'), 123,2 (C3'), 121,9 (C5'), 115,3 (Ph), 70,6 (OCH_2).

3-fluor-4-(2-piridin-2-il-metoksi)benzaldehyd (168b)

Spoj **168b** priređen je prema navedenom općem postupku iz 3-fluor-4-hidroksibenzaldehida **146** (250 mg; 1,78 mmol) i 2-klormetilpiridina (351,02 mg; 1,78 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 100 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **168b** (307,6 mg; 75 %, T.t. = 82–85 °C). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ /ppm): 9,87 (1H, d, J = 2,1 Hz, CHO), 8,76–8,33 (1H, m, 6'), 7,87 (1H, td, J = 7,7; 1,8 Hz, Ph), 7,80–7,70 (2H, m, Ph, H4'), 7,55 (1H, d, J = 7,8 Hz, H3'), 7,47 (1H, t, J = 8,2 Hz, Ph), 7,41–7,32 (1H, m, H5'), 5,39 (2H, s, OCH_2). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ /ppm): 190,8 (CHO), 155,3 (Ph-q, C2') 152,5; 150,8 (d, J_{CF} = 246,9 Hz, Ph-q), 151,3; 151,2 (d, J_{CF} = 10,5 Hz, Ph-q), 149,2 (C6'), 137,1 (Ph), 130,0; 129,9 (d, J_{CF} = 5,1 Hz, Ph-q), 128,2 (C4'), 123,3 (C5'), 121,9 (C5'), 115,4; 115,3 (d, J_{CF} = 18,2 Hz, Ph), 115,1 (Ph), 71,3 (OCH_2).

3-metoksi-4-(2-piridin-2-il-metoksi)benzaldehyd (168c)

Spoj **168c** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksi-3-metoksi-benzaldehida **147** (250 mg; 1,64 mmol) i 2-klormetilpiridina (323,14 mg; 1,64 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 100 : 1) izoliran je bijeli praškasti produkt **168c** (398,67 mg; 60 %, T.t. = 77–81 °C). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 9,85 (1H, s, CHO), 8,59 (1H, d, J = 4,2 Hz, H6'), 7,86 (1H, td, J = 7,7; 1,7 Hz, Ph), 7,58–7,48 (2H, m, H4', H3'), 7,44 (1H, d, J = 1,8 Hz, Ph), 7,37 (1H, dd, J = 6,8; 5,1 Hz, H5'), 7,26 (1H, d, J = 8,3 Hz, Ph), 5,29 (2H, s, OCH_2), 3,87 (3H, s, OCH_3). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 191,3 (CHO), 155,8 (Ph-q), 152,8 (Ph-q), 149,3 (C2'), 149,1 (C6'), 137,0 (Ph), 129,9 (Ph-q), 125,7 (C4'), 123,1 (C3'), 121,8 (C5'), 112,7 (Ph), 109,8 (Ph), 70,9 (OCH_2), 55,6 (OCH_3).

4-(2-morfolinetoksi)benzaldehyd (169a)

Spoj **169a** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksibenzaldehida **112** (250 mg; 2,5 mmol) i 2-kloretilmorfolina (340 mg; 2,05 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 50 : 1) izoliran je bezobojan uljasti produkt **169a** (425,2 mg; 88 %). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 9,86 (1H, s, CHO), 7,85 (2H, d, J = 8,8 Hz, Ph), 7,13 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ph), 4,20 (2H, t, J = 5,7 Hz, CH_2CH_2), 3,70–3,47 (4H, m, CH_2 -morfolin), 2,71 (2H, t, J = 5,7 Hz, CH_2CH_2), 2,49–2,43 (4H, m, CH_2 -morfolin). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 191,3 (CHO), 163,4 (Ph-q), 131,2 (Ph), 129,6 (Ph-q), 115,0 (Ph), 66,1 (CH_2 -morfolin), 65,8 (CH_2CH_2), 56,8 (CH_2CH_2), 53,5 (CH_2 -morfolin).

3-fluor-4-(2-morfolinetoksi)benzaldehyd (169b)

Spoj **169b** priređen je prema navedenom općem postupku iz 3-fluor-4-hidroksibenzaldehida **146** (250 mg; 1,78 mmol) i 2-kloretilmorfolina (331,22 mg; 1,78 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 50 : 1) izoliran je žuti uljasti produkt **169b** (430,4 mg; 95 %). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 9,86 (1H, d, J = 2,1 Hz, CHO), 7,79–7,74 (1H, m, Ph), 7,68 (1H, dd, J = 11,4; 1,9 Hz, Ph), 7,41 (1H, t, J = 8,3 Hz, Ph), 4,29 (2H, t, J = 5,7 Hz, CH_2CH_2), 3,64–3,46 (4H, m, CH_2 -morfolin), 2,74 (2H, t, J = 5,7 Hz, CH_2CH_2), 2,49–2,43 (4H, m, CH_2 -morfolin). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 190,8 (CHO), 153,3; 150,0 (d, J_{CF} = 246.9 Hz), 151,8; 151,6 (J_{CF} = 10.7 Hz), 129,7; 129,6 (d, J_{CF} =

4.9 Hz), 128,3; 128,3 (d, $J_{CF} = 3.1$ H), 115; 115,1 (d, $J_{CF} = 18.3$ Hz), 114,7; 114,7 (d, $J_{CF} = 1.6$ Hz), 67,0 (CH₂-morfolin), 66,1 (CH₂CH₂), 56,6 (CH₂CH₂), 53,5 (CH₂-morfolin).

3-metoksi-4-(2-morfolinetoksi)benzaldehyd (169c)

Spoj **169c** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida **147** (250 mg; 1,64 mmol) i 2-kloretilmorfolina (305,17 mg; 1,64 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran je žuti uljasti produkt **169c** (415,9 mg; 96 %). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,84 (1H, s, CHO), 7,53 (1H, dd, $J = 8,2; 1,9$ Hz, Ph), 7,39 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, Ph), 7,20 (d, $J = 8,3$ Hz, Ph), 4,19 (2H, t, $J = 5,9$ Hz, CH₂CH₂), 3,83 (3H, s, OCH₃), 3,62–3,45 (4H, m, CH₂-morfolin), 2,72 (t, $J = 5.8$ Hz, CH₂CH₂), 2,49–2,43 (4H, m, CH₂-morfolin). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,4 (CHO), 153,4 (Ph-q), 149,3 (Ph-q), 129,7 (Ph-q), 126,0 (Ph), 112,3 (Ph), 109,7 (Ph), 66,4 (CH₂CH₂), 66,2 (CH₂-morfolin), 56,8 (CH₂CH₂), 55,6 (OCH₃), 53,6 (CH₂-morfolin).

4-(2-(dietilamin)etoksi)benzaldehyd (170a)

Spoj **170a** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksibenzaldehida **112** (250 mg; 2,5 mmol) i dietilaminoetil-klorid (339,42 mg; 2,05 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran je uljasti produkt **170a** (136,4 mg; 30 %). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,86 (1H, s, CHO), 7,85 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ph), 7,12 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ph), 4,14 (2H, t, $J = 6,0$ Hz, CH₂CH₂), 2,81 (2H, t, $J = 5,9$ Hz, CH₂CH₂), 2,62–2,51 (4H, m, CH₂CH₃), 0,97 (6H, t, $J = 7,1$ Hz, CH₂CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 191,3 (CHO), 163,5 (Ph-q), 131,8 (Ph), 129,6 (Ph-q), 115,0 (Ph), 66,8 (CH₂CH₂), 51,1 (CH₂CH₂), 47,0 (CH₂CH₃), 11,8 (CH₂CH₃).

4-(2-(dietilamin)etoksi)-3-fluorbenzaldehyd (170b)

Spoj **170b** priređen je prema navedenom općem postupku iz 3-fluor-4-hidroksibenzaldehida **146** (250 mg; 1,78 mmol) i dietilaminoetil-klorid (295,87 mg; 1,78 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran je žuti uljasti produkt **170b** (335,1 mg; 79 %). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,82 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, CHO), 7,72 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, Ph), 7,64 (1H, dd, $J = 11,4; 1,9$ Hz, Ph), 7,37 (1H, t, $J = 8,3$ Hz, Ph), 4,17 (2H, t, $J = 5,9$ Hz, CH₂CH₂), 2,92–2,70 (2H, m, CH₂CH₂), 2,48–2,41 (4H, m, CH₂CH₃), 0,93 (6H, t, $J = 7,1$ Hz, CH₂CH₃).

4-(2-(dietilamin)etoksi)-3-metoksibenzaldehid (170c)

Spoj **170c** priređen je prema navedenom općem postupku iz 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida **147** (250 mg; 1,64 mmol) i dietilaminoetil-klorid (271,98 mg; 1,64 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 50 : 1) izoliran je žuti uljasti produkt **170c** (354,2 mg; 66 %). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 9,83 (1H, s, CHO), 7,53 (1H, dd, J = 8,2; 1,9 Hz, Ph), 7,39 (1H, d, J = 1,8 Hz, Ph), 7,19 (1H, d, J = 8,3 Hz, Ph), 4,12 (2H, t, J = 6,2 Hz, CH_2CH_2), 3,82 (3H, s, OCH_3), 2,81 (2H, t, J = 6,2 Hz, CH_2CH_2), 2,66–2,50 (4H, m, CH_2CH_3), 0,97 (6H, t, J = 7,1 Hz, CH_2CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 191,4 (CHO), 153,5 (Ph-q), 149,3 (Ph-q), 129,6 (Ph-q), 126,1 (Ph), 112,2 (Ph), 109,7 (Ph), 67,3 (CH_2CH_2), 55,6 (OCH_3), 51,1 (CH_2CH_2), 47,0 (CH_2CH_3), 11,8 (CH_2CH_3).

4.6.11. Opći postupak za sinteza 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih benzimidazola 171a–175a, 171b–175b i 171c–175c

Odgovarajući benzaldehid (**166a–170a**, **166b–170b** i **166c–170c**) otopljen je u apsolutno suhom etanolu (15 mL) i dodan je 40 % NaHSO_3 (1 mL). Smjesa je miješana 30 min te je dodan *o*-fenilendiamin **124c** (1 ekv.) i miješanje je nastavljeno 8 h na temperaturi refluksa. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak nakon uparavanja je pročišćen kolonskom kromatografijom u eluensu CH_2Cl_2 : CH_3OH = 4 : 1. Dobiveni produkt miješan je 4 h u etanolu zasićenim s HCl-om. (7 mL) U smjesu je dodan dietil-eter, a nastali talog je filtrira i osušen u sušioniku.

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-[4-(2-morfolino-2-oksoetoksi)fenil]-1H-benzo[*d*]imidazol hidroklorid (171a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **166a** (200 mg; 0,80 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **171a** (118,6; 37 %, T.t. = 220–223 °C). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 10,82 (2H, s, NH), 8,45 (1H, s, H4), 8,39 (2H, d, J = 8,5 Hz, Ph), 8,00 (1H, d, J = 8,3 Hz, H7), 7,89 (1H, d, J = 8,5 Hz, H6), 7,20 (2H, d, J = 8,9 Hz, Ph), 5,01 (2H, s, CH_2), 4,03 (4H, s, CH_2CH_2), 3,73–3,35 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-morfolin}$). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 165,6 (CNH), 165,1 (CO), 161,3 (Ph-q), 153,5 (C2), 129,5 (Ph), 123,7 (C6), 118,9 (C5), 116,8 (Ph-q), 115,9 (C4), 115,5 (Ph), 114,8 (C7), 66,1 ($\text{CH}_2\text{-morfolin}$), 65,7 (OCH_2), 44,4 (CH_2CH_2), 41,6 ($\text{CH}_2\text{-morfolin}$).

2-[3-fluor-4-(2-morfolino-2-oksoetoksi)fenil]-5(6)-(imidazolin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (171b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **166b** (200 mg; 0,74 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **171b** (265,4; 85 %, T.t. = 211–215 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 13,87 (1H, s, NH), 10,67 (2H, s, NH), 8,36 (1H, s, H4), 8,17–8,01 (2H, m, H6, Ph), 7,91–7,72 (2H, m, H7, Ph), 7,29 (1H, t, *J* = 8,7 Hz, Ph), 5,09 (2H, s, CH₂), 4,01 (4H, s, CH₂CH₂), 3,69–3,40 (8H, m, CH₂-morfolin). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,4 (CNH), 165,3 (CO), 152,2; 150,6 (d, *J*_{CF} = 244,3 Hz, Ph-q), 149,7 (Ph-q), 148,1; 148,1 (d, *J*_{CF} = 10,2 Hz, Ph-q), 123,7 (Ph, C6), 122,4; 122,3 (d, *J*_{CF} = 7,1 Hz, Ph-q), 115,6 (C4, Ph), 115,5 (C5), 115,3 (C7), 114,6; 114,5 (d, *J*_{CF} = 20,9 Hz, Ph), 66,1 (CH₂-morfolin), 66,0 (OCH₂), 44,6 (CH₂-morfolin), 44,2 (CH₂CH₂).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-[3-metoksi-4-(2-morfolino-2-oksoetoksi)fenil]-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (171c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **166c** (200 mg; 0,72 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **171c** (269,7; 86 %, T.t. = 202–205 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 13,78 (1H, bs, NH), 10,67 (2H, s, NH), 8,36 (1H, s, H4), 8,00–7,70 (4H, m, Ph, H7, H6), 7,07 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 4,94 (2H, s, OCH₂), 4,01 (4H, s, CH₂CH₂), 3,92 (3H, s, OCH₃), 3,73–3,40 (8H, m, CH₂-morfolin). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,7 (CNH), 165,4 (Ph-q), 149,7 (C2), 149,0 (Ph-q), 122,3 (C6), 122,2 (Ph-q), 119,9 (Ph), 115,6 (C4, C7), 115,0 (Ph-q), 113,4 (Ph), 110,7 (Ph), 66,3 (CH₂-morfolin), 66,0 (OCH₂), 55,9 (OCH₃), 44,8 (CH₂CH₂), 44,2 (CH₂-morfolin).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-[4-(2-fenil-2-oksoetoksi)fenil]-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (172a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **167a** (150 mg; 0,62 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **172a** (205,0 mg; 83 %, T.t. = 255–258 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 13,67 (1H, s, NH), 10,62 (2H, s, NH), 8,33 (1H, s, H4), 8,22 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 8,06 (2H, d, *J* = 7,2 Hz, Ph), 7,88–7,65 (3H, m, H6, H7, Ph), 7,59 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, Ph), 7,19 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 5,73 (2H, s, OCH₂), 4,01 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 194,2 (CO), 165,4 (CNH), 160,1

(Ph-q, C2), 134,3 (Ph-q), 133,9 (Ph), 128,9 (Ph), 128,7 (Ph), 127,9 (Ph), 122,2 (C6), 122,0 (C5), 115,2 (Ph, C4, C7), 115,0 (Ph-q), 70,3 (OCH₂), 44,2 (CH₂CH₂).

2-[3-fluor-4-(2-fenil-2-oksoetoksi)fenil]-5(6)-(imidazolin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (172b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **167b** (150 mg; 0,66 mmol) priređen je žuti praškasti produkt **172b** (187,2 mg; 68 %, T.t. = 205–208 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,91 (2H, s, NH), 8,48 (1H, s, H4), 8,39 (1H, dd, *J* = 12,3; 1,9 Hz, Ph), 8,25 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H7), 8,09–7,97 (3H, m, Ph, H6), 7,91 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 7,72 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, Ph), 7,60 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, Ph), 7,47 (1H, t, *J* = 8,8 Hz, Ph), 5,90 (2H, s, OCH₂), 4,02 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 193,5 (CO), 165,2 (CNH), 152,9 (C2), 152,9; 149,7 (d, *J*_{CF} = 238,2 Hz, Ph-q), 148,5; 148,3 (d, *J*_{CF} = 10,3 Hz, Ph-q), 134,1 (Ph-q), 133,6 (Ph), 128,6 (Ph), 127,6 (Ph), 124,1; 124,1 (d, *J*_{CF} = 1,3 Hz, Ph), 122,9 (C6), 121,0 (Ph-q), 116,3 (C4), 116,0 (C5), 115,6 (C7), 115,1; 114,8 (d, *J*_{CF} = 20,9 Hz, Ph), 114,8; 114,7 (d, *J*_{CF} = 5,1 Hz, Ph), 70,9 (OCH₂), 44,1 (CH₂CH₂).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-[3-metoksi-4-(2-fenil-2-oksoetoksi)fenil]-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (172c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **167c** (150 mg; 0,55 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **172c** (183,6 mg; 78 %, T.t. = 206–210 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,66 (2H, s, NH), 8,34 (1H, s, H4), 8,05 (2H, d, *J* = 7,2 Hz, Ph), 7,97–7,67 (5H, m, Ph), 7,59 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, Ph), 7,11 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 5,71 (2H, s, OCH₂), 4,01 (4H, s, CH₂CH₂), 3,95 (3H, s, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 194,2 (CO), 165,5 (CNH), 153,7 (C2), 149,7 (Ph-q), 149,0 (Ph-q), 134,3 (Ph-q), 133,9 (Ph), 128,9 (Ph), 127,9 (Ph), 122,3 (Ph), 122,0 (Ph), 120,0 (C6), 115,8 (C4), 115,1 (C5), 113,4 (Ph, C7), 110,7 (Ph), 70,6 (OCH₂), 55,9 (OCH₃), 44,2 (CH₂CH₂).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-(4-(piridin-2-il-metoksi)fenil)-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (173a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **168a** (150 mg; 0,70 mmol) priređen je sivkasti praškasti produkt **173a** (175,0 mg; 46 %, T.t. = 208–211 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,64 (2H, s, NH), 8,60 (1H, d, *J* = 4,5 Hz, H6'), 8,34 (1H, s, H4), 8,24 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 7,93–7,79 (2H, m, H4', H6), 7,76 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H7), 7,56 (1H, d, *J* = 7,8

Hz, H3'), 7,37 (1H, dd, $J = 7,1; 5,1$ Hz, H5'), 7,24 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ph), 5,29 (2H, s, OCH₂), 4,01 (4H, s, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 164,8 (CNH), 161,1 (Ph-q), 154,2 (C2'), 152,8 (C2), 146,8 (C6'), 139,7 (Ph), 135,3 (Ph-q), 129,9 (C4'), 124,0 (C3'), 123,0 (C5'), 117,0 (C5), 115,6 (C4), 115,6 (Ph), 114,4 (C7), 69,0 (OCH₂), 44,2 (CH₂CH₂).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-[3-fluor-4-(piridin-2-il-metoksi)fenil]-1H-benzo[d]imidazo (173b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **168b** (150 mg; 0,65 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **173b** (187,2 mg; 74 %, T.t. = 200–203 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 10,91 (2H, s, NH), 8,74 (1H, d, $J = 4,5$ Hz, H6'), 8,48 (1H, s, H4), 8,39 (1H, dd, $J = 12,3; 1,9$ Hz, H6), 8,28 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H7), 8,14 (1H, td, $J = 7,8; 1,5$ Hz, Ph), 8,01 (1H dd, $J = 8,5; 1,5$ Hz, H4'), 7,88 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H3'), 7,79 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, Ph), 7,65–7,51 (2H, m, Ph, H5'), 5,52 (2H, s, OCH₂), 4,02 (4H, s, CH₂CH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 165,1 (CNH), 154,9 (C2'), 154,1 (C2), 153,2; 149,9 (d, $J_{CF} = 245,1$ Hz, Ph-q), 152,7 (C2), 148,7; 148,6 (d, $J_{CF} = 10,5$ Hz, Ph-q), 147,4 (C6'), 139,8 (Ph), 136,4 (Ph-q), 124,8, 124,8 (d, $J_{CF} = 3,1$ Hz, Ph), 124,6 (C4'), 124,3 (C3'), 123,5 (C6), 123,1 (C5'), 118,2 (C5), 116,8 (C4), 115,8 (C7), 115,5; 115,2 (d, $J_{CF} = 21,2$ Hz, Ph), 70,0 (OCH₂), 44,4 (CH₂CH₂).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-[3-metoksi-4-(piridin-2-il-metoksi)fenil]1-H-benzo[d]imidazol hidroklorid (173c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **168c** (150 mg; 0,62 mmol) priređen je crveni praškasti produkt **173c** (181,7 mg; 73 %, T.t. = 265–268 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 13,52 (1H, s, NH), 10,67 (1H, s, NH), 8,60 (1H, d, $J = 4,6$ Hz, H6'), 8,35 (1H, s, H4), 7,96 (1H, s, Ph), 7,92–7,81 (3H, m, Ph, H4', H6), 7,77 (1H; d, $J = 8,2$ Hz, H7), 7,56 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H3'), 7,37 (1H, dd, $J = 7,2; 5,1$ Hz, H5'), 7,24 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, Ph), 5,27 (2H, s, OCH₂), 4,01 (4H, s, CH₂CH₂), 3,94 (s, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 165,4 (CNH), 156,4 (C2), 149,8 (Ph-q), 149,2 (Ph-q), 149,1 (C6'), 137,1 (Ph), 123,1 (C4'), 122,3 (C6), 122,2 (C5), 121,8 (C5'), 120,1 (C3'), 115,1 (Ph-q), 113,4 (C4, C7, Ph), 110,6 (Ph), 70,9 (OCH₂), 55,9 (OCH₃), 44,2 (CH₂CH₂).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-[4-(2-morfolinetoksi)fenil]1-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (174a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **169a** (150 mg; 0,64 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **174a** (248,5 mg; 74 %, T.t. = 203–207 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,96 (2H, s, NH), 8,49 (1H, s, H4), 8,46 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ph), 8,04 (1H, dd, *J* = 8,6; 1,3 Hz, H6), 7,89 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H7), 7,28 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ph), 4,02 (4H, s, CH₂CH₂), 3,96–3,87 (6H, m, CH₂-morfolin, CH₂CH₂), 3,64–3,40 (6H, m, CH₂-morfolin, CH₂CH₂). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,2 (CNH), 159,6 (Ph-q), 154,0 (C2), 129,0 (Ph), 122,6 (C6), 121,3 (Ph-q), 115,5 (C5), 115,2 (Ph), 115,0 (C4), 114,7 (C7), 62,9 (CH₂-morfolin), 62,4 (CH₂CH₂), 54,5 (CH₂CH₂), 51,5 (CH₂-morfolin), 44,0 (CH₂CH₂).

2-[3-fluor-4-(2-morfolinetoksi)fenil]-5(6)-(imidazolin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (174b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **169b** (150 mg; 0,59 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **174b** (301,4 mg; 74 %, T.t. = 204–208 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 12,00 (1H, bs, NH), 10,99 (2H, s, NH), 8,50 (1H, s, H4), 8,44–8,25 (2H, m, Ph), 8,04 (1H, dd, *J* = 8,6; 1,4 Hz, H6), 7,86 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H7), 7,53 (1H, t, *J* = 8,7 Hz, Ph), 4,75–4,68 (2H, m, CH₂CH₂), 4,01 (4H, s, CH₂CH₂), 3,98–3,80 (4H, m, CH₂-morfolin), 3,70–3,45 (4H, m, CH₂-morfolin), 3,33–3,18 (2H, m, CH₂CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,1 (CNH), 153,1; 149,8 (d, *J*_{CF} = 244,9 Hz, Ph-q), 152,8 (C2), 147,8; 147,5 (*J*_{CF} = 10,0 Hz, Ph-q), 124,3; 124,3 (*J*_{CF} = 1,5 Hz, Ph), 122,9 (C6), 121,9; 121,7 (*J*_{CF} = 7,5 Hz, Ph-q), 116,5 (C4), 115,8 (C5), 115,7 (Ph), 115,1; 114,8 (d, *J*_{CF} = 20,6 Hz, Ph), 114,7 (C7), 63,8 (CH₂CH₂), 62,9 (CH₂-morfolin), 54,4 (CH₂CH₂), 51,5 (CH₂-morfolin), 44,0 (CH₂CH₂).

5(6)-(imidazolin-2-il)-2-[3-metoksi-4-(2-morfolinetoksi)fenil]-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (174c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **169c** (150 mg; 0,56 mmol) priređen je žuti praškasti produkt **174c** (237,7 mg; 87 %, T.t. = 217–223 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12,08 (1H, bs, NH), 10,97 (2H, s, NH), 8,50 (1H, s, H4), 8,24 (1H, d, *J* = 1,8 Hz, Ph), 8,15–8,01 (2H, m, Ph, H6), 7,87 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H7), 7,31 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 4,63 (2H, t, *J* = 5,1 Hz, CH₂CH₂), 4,02 (4H, s, CH₂CH₂), 3,97 (3H, s, OCH₃), 3,97–3,88 (4H, m, CH₂-morfolin), 3,65–3,40 (6H, m, CH₂-morfolin, CH₂CH₂). ¹³C

NMR (151 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 165,0 (CNH), 153,3 (C2), 149,8 (Ph-q), 149,4 (Ph-q), 123,3 (Ph), 121,0 (C6), 120,5 (Ph-q), 116,2 (C5), 115,9 (C4), 114,4 (Ph, C7), 111,9 (Ph), 63,6 (CH₂CH₂), 62,8 (CH₂-morfolin), 56,2 (OCH₃), 54,5 (CH₂CH₂), 51,5 (CH₂-morfolin), 44,0 (CH₂CH₂).

2-{4-[2-(dietilamino)etoksi]fenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (175a)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **170a** (150 mg; 0,68 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **175a** (126,8 mg; 49 %, T.t. = 214–218 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 10,98 (2H, s, NH), 8,54–8,40 (3H, m, Ph, H4), 8,06 (1H, dd, J = 8,6; 1,3 Hz, H6), 7,90 (1H, d, J = 8,6 Hz, H7), 7,28 (2H, d, J = 8,9 Hz, Ph), 4,56 (2H, t, J = 4,8 Hz, CH₂CH₂), 4,02 (4H, s, CH₂CH₂), 3,63–3,44 (2H, m, CH₂CH₂), 3,29–3,10 (4H, m, CH₂CH₃), 1,28 (6H, t, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 164,9 (CNH), 160,6 (Ph-q), 153,2 (C2), 129,8 (Ph), 123,9 (C6), 119,2 (Ph-q), 116,8 (C5), 115,9 (C4), 115,4 (Ph), 114,7 (C7), 62,7 (CH₂CH₂), 49,5 (CH₂CH₂), 46,9 (CH₂CH₃), 44,3 (CH₂CH₂), 8,4 (CH₂CH₃).

2-{4-[2-(dietilamino)etoksi]-3-fluorfenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (175b)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **170b** (150 mg; 0,63 mmol) priređen je smeđi praškasti produkt **175b** (157,0 mg; 63 %, T.t. = 205–207 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 10,90 (2H, s, NH), 8,48 (1H, s, H4), 8,40–8,26 (2H, m, Ph), 8,00 (1H, dd, J = 8,6; 1,5 Hz, H6), 7,87 (1H, d, J = 8,6 Hz, H7), 7,52 (1H, t, J = 8,7 Hz, Ph), 4,64 (2H, t, J = 4,8 Hz, CH₂CH₂), 4,02 (4H, s, CH₂CH₂), 3,67–3,52 (2H, m, CH₂CH₂), 3,32–3,14 (4H, m, CH₂CH₃), 1,28 (6H, t, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) (δ /ppm): 165,1 (CNH), 153,1; 149,8 (d, J_{CF} = 245,0 Hz, Ph-q), 152,7 (C2), 148,3; 148,1 (d, J_{CF} = 10,7 Hz, Ph-q), 124,8, 124,8 (J_{CF} = 1,2 Hz, Ph), 123,4 (C6), 121,1; 121,0 (d, J_{CF} = 7,5 Hz, Ph-q), 116,5 (C4), 116,4 (C5), 115,5 (Ph), 115,3; 115,1 (d, J_{CF} = 20,7 Hz, Ph), 115,0 (C7), 63,9 (CH₂CH₂), 49,5 (CH₂CH₂), 47,3 (CH₂CH₃), 44,3 (CH₂CH₂), 8,5 (CH₂CH₃).

2-{4-[2-(dietilamino)etoksi]-3-metoksifenil}-5(6)-(imidazolin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol hidroklorid (175c)

Prema navedenom općem postupku iz spoja **170c** (150 mg; 0,60 mmol) priređen je žuti praškasti produkt **175c** (183,0 mg; 75 %, T.t. = 227–229 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6)

(δ /ppm): 10,92 (1H, bs, NH), 10,78 (2H, s, NH), 8,43 (1H, s, 4H), 8,12 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, Ph), 8,01 (1H, dd, $J = 8,4; 1,8$ Hz, Ph), 7,95 (1H, dd, $J = 8,6; 1,5$ Hz, H6), 7,83 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H7), 7,27 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, Ph), 4,03 (4H, s, CH₂CH₂), 3,97 (3H, s, OCH₃), 4,76–4,36 (2H, m, CH₂CH₂), 3,60–3,45 (4H, m, CH₂CH₃), 3,32–3,20 (2H, m, CH₂CH₂), 1,30 (6H, t, $J = 7,2$ Hz, CH₂CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ /ppm): 165,1 (CNH), 153,6 (C2), 149,3 (Ph-q), 123,0 (Ph), 120,8 (C6), 117,3 (C5), 115,8 (C4), 114,5 (C7), 113,9 (Ph), 111,5 (Ph), 63,5 (CH₂CH₂), 56,2 (OCH₃), 49,5 (CH₂CH₂), 47,1 (CH₂CH₃), 44,1 (CH₂CH₂), 8,3 (CH₂CH₃).

4.7. Rentgenska strukturna analiza

Jedinični kristali spojeva **8**, **12**, **58**, **64**, **65** i **91** dobiveni su iz otopina etanola, metanola i acetona laganim isparavanjem pri sobnoj temperaturi. Podaci su prikupljeni na temperaturi od 295 K na Oxford Diffraction Xcalibur Nova R difraktometru uz monokromatsko CuK_α zračenje ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$) na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Prikupljanje i obrada podataka provedeni su korištenjem programa *CrysAlisPro* [220]. Strukture svih spojeva riješene su direktnim metodama primijenom programa SIR-2004 [221] i utočnjene metodom najmanjeg kvadrata temeljenog na F^2 korištenjem programa SHELXL-2016 [222], integriranog u programski paket WinGX [223]. Analiza struktura i njihovi grafički prikazi načinjeni su programima *PLATON* [224] i *Mercury* [225].

4.8. Biološka ispitivanja

4.8.1. Antitumorska ispitivanja *in vitro*

Antitumorska ispitivanja novopriredjenih spojeva ispitana su na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci u suradnji s izv. prof. dr. sc. Sandrom Kraljević Pavelić.

4.8.1.1. Uzgoj staničnih kultura *in vitro*

Antitumorska aktivnost ispitana je na staničnim linijama zloćudnih tumora porijeklom iz čovjeka, A549 (adenokarcinom pluća ne-malih stanica), CFPAC-1 (adenokarcinom gušterače), HeLa (karcinom vrata maternice), SW620 (metastatski kolorektalni adenokarcinom) i na normalnim fibroblastima WI38 (plućni fibroblasti čovjeka) ili HFF-1 (fibroblaste ljudskog prepucija), koji su kupljeni od tvrtke ATCC (The American Type Culture Collection, SAD). Za uzgoj stanica korištena je tekuća hranjiva podloga DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO Invitrogen, SAD) koja je prethodno kompletirana s 10 %-tnim serumom govedeg fetusa (FBS, eng. *Fetal bovine serum*, GIBCO Invitrogen, SAD), 2mM L-glutaminom (Sigma, Njemačka), 100 jedinica/mL penicilinom i 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycinom (GIBCO Invitrogen, SAD). Stanice su uzgajane u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i 5 % CO_2 u plastičnim bocama za stanične kulture (Falcon, SAD). Broj i vijabilnost stanica utvrđena je pomoću automatskog brojača stanica (Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen SAD).

4.8.1.2. MTT Test

Stanične linije nasadene su na standardne mikrotitarske pločice s 96 jažica (TPP[®], Švicarska) nasadeno je 150 μ L stanične suspenzije u koncentraciji 3×10^3 stanica/jažici. Nakon 24 h u jažice su dodani ispitivani spojevi u razrjeđenjima od 10^{-8} do 10^{-4} μ M i stanice su inkubirane 72 h. Kontrolne stanice su rasle u mediju za rast bez i uz dodatak otapala u kojem su otopljeni uzorci za analizu (DMSO). Nakon 72 h inkubacije rast stanica je određen pomoću metode MTT [226]. Apsorbancija je mjerena pri valjnoj duljini od 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Sunrise[™], Tecan, Švicarska). Postotak rasta stanica (PG, eng. *cell percentage of growth*) izračunat je iz eksperimentalno dobivenih apsorbancija prema protokolu NCI-a (eng. *National Cancer Institute*, SAD). Pomoću PG vrijednosti dobivene su "dose-response" krivulje, odnosno krivulja ovisnosti preživljenja stanica o koncentraciji. Interpolacijom na apscisi izračunate su vrijednosti IC_{50} (koncentracija spoja koja inhibira rast 50 % stanica) i LC_{50} (koncentracija spoja koja izaziva smrt 50 % stanica) vrijednosti za svaki od ispitivanih spojeva. Vrijednosti IC_{50} dobiveni su iz tri nezavisna eksperimenta i statistički analizirani pomoću ANOVA, Tukey post-hoc testa ($p < 0,05$).

4.8.1.3. Analiza apoptoze Aneksin-V testom

Stanice su nasadene na pločice s 8 komorica (Lab-tek II Chamber Slides) u koncentraciji od 2×10^4 stanica po jažici i tretirane su s odabranim spojevima u koncentracijama $2 \times IC_{50}$ tijekom 48 h. Bojanje stanica provedeno je dodatkom Annexin-V-FITC boje (Santa Cruz Biotechnology) prema uputama proizvođača. Stanice su vizualizirane na fluorescentnom mikroskopu (Olympus) pri povećanju od 40 \times .

4.8.1.4. Western blot analiza

Stanice su nasadene na pločice sa 6 jažica (FALCON[®], SAD) u koncentraciji od $1,5 \times 10^5$ do 2×10^5 stanica po jažici. Stanice su tretirane 48 h s $2 \times IC_{50}$ koncentracijama odabranih spojeva. Nakon inkubacije od 48 h stanice su lizirane s RIPA puferom (eng. *Radio Immuno Precipitation Assay*), koji je nadopunjen s proteazama i inhibitorima fosfataze (Roche). Ukupni proteini (50 μ g) razdvojeni su na 10 % ili 12 % poliakrilamidnom gelu, ovisno o veličini proteina, i preneseni na membrane PVDF (eng. *polyvinylidene fluoride*) koje su blokirane 1 h s 4 % BSA ili 5 % nemasnog mlijeka pripremljenog u TBST (eng. *Tris Buffered Saline with Tween*[®] 20, pH 7,5). Elektroforeza je provedena u Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD, SAD) pri konstantnom naponu od 100 V do trena kada su proteini doputovali do gela za razdvajanje, a potom 200 V do kraja gela za razdvajanje. Membrane su

ispitane primarnim antitijelima na GPLD1 (Abcam), PDGFR β (Cell Signaling Technology), p-IGF-1R β (Cell Signaling Technology), p-p38 MAPK (Cell Signaling Technology), p-NF- κ B-p65 (Cell Signaling Technology), CDK9/Ciklin T1 (Cell Signaling Technology), p-C-Raf (Abcam), PDE5 (Cell Signaling Technology), TGM2 (Cell Signaling Technology), p-p53 (Ser15) (Abcam) i p-SK1 (ECM Biosciences) na + 4 °C preko noći. Nakon 24 h membrane su isprane u TBST i ispitane s hranjivom peroksidazom konjugiranom sekundarnim kozjim protutijelima protiv mišjih (Santa Cruz Biotechnology) ili zečjih protutijela (Santa Cruz Biotechnology). Proteinski bendovi su vizualizirani korištenjem kemiluminescentnog supstrata na ImageQuant LAS 500 (GE Zdravstvo), a gustoća bendova proteina analizirana je pomoću programa Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad, USA).

4.8.2. Antibakterijska ispitivanja

Priređeni spojevima ispitano je antibakterijsko djelovanje *in vitro* na gram-pozitivne bakterije: *S. aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) i gram-negativne bakterije: *E. coli* (ATCC 25925), *K. pneumoniae* (ATCC 700803), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) i *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), te na na klinički rezistentne gram-pozitivne sojeve: *S. aureus* rezistentan na meticilin (MRSA), *S. aureus* osjetljiv na meticilin (MSSA) i *E. faecium* rezistentan na vankomicin (VRE) i gram-negativne kliničke sojeve: *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* rezistentne na β -laktamske antibiotike (ESBL, eng. *extended-spectrum β -lactamases*), prema standardnoj metodi mikrodilucije kao što je preporučeno u smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde [227, 228], te je određena minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Ispitivanje je provedeno u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica (Falcon 3077, Becton Dickinson Labware, New Jersey, SAD) u kationskom (Ca²⁺ i Mg²⁺) mediju Mueller-Hinton (Becton Dickinson i Co., Cockeysville MD, SAD) za miješanje. Raspon koncentracije ispitivanih spojeva iznosio je 256–0,25 μ g/mL. Standardizirani početni inokulum pripremljen je izravnom metodom suspenzije kolonija do konačnog inokuluma od 5×10^5 CFU/mL kao što je opisano (CLSI M7-A7). Posude su inkubirane pri 35 \pm 2 °C preko noći (16 do 20 h). Također, *E. coli* ATCC 25922 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 poslužili su kao kontrola kvalitete u postupku određivanja MIC vrijednosti. MIC je određen kao najniža koncentracija ispitivanog spoja koja potpuno inhibira rast organizma u jažicama. Na ispitanim spojevima su zapažene MIC "prateći" fenomeni [227–229]. Sva testiranja su provedena u triplikatu. Antibakterijska ispitivanja provedene su u suradnji s doc. dr. sc. Domagojem Drenjačevićem s Katedre za

mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

4.8.3. Antitripanosomska ispitivanja

Krvotok *T. brucei* (soja 221) kultiviran je u modificiranom Iscoveovom mediju, kako je opisano [230], a tripanosomatski testovi izvedeni su pomoću mikrotitarskih ploča sa 96 jažica. Utvrđene su koncentracije spojeva koje inhibiraju rast od 50 % (IC_{50}) i 90 % (IC_{90}). Paraziti su sub-kultivirani pri $2,5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, ispitani spojevi dodani su u rasponu koncentracija, a ploče inkubirane pri 37 °C. Nakon 48 h dodan je resazurin, a ploče su inkubirane daljnjih 16 h, te očitane na uređaju Spectramax. Podaci su analizirani koristeći GraphPad Prism. Svaka koncentracija ispitanih spojeva testirana je u triplikatu. Citotoksičnost protiv stanica sisavaca također je određena pomoću mikrotitarskih pločica. Stanična linija mioblasta štakora (L6) zasađena je pri $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ u 200 μL medija za rast koji sadrži različite koncentracije spojeva. Ploče su inkubirane 6 dana pri 37 °C i dodano je 20 μL resazurina u svaku jažicu. Nakon daljnjih 8 h inkubacije, fluorescencija je određena pomoću Spectramax čitača ploče, kao što je gore navedeno. Antitripanosomska ispitivanja provedena su u suradnji sa istraživačkom grupom prof. dr. sc. John M. Kelly-a, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Velika Britanija.

4.9. Ispitivanje interakcija odabranih spojeva s polinukleotidima

4.9.1. Polinukleotidi

Interakcije priređenih spojeva ispitane su korištenjem sljedećih polinukleotida: polyG–polyC, polyA–polyU (Sigma-Aldrich, St. Louis. USA), *calf thymus ctDNA* (Aldrich). Polinukleotidi su otopljeni u BPE puferu (6,0 mM Na_2HPO_4 , 2,0 mM NaH_2PO_4 i 1,0 mM EDTA), $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$; pH = 7,0). *ctDNA* dodatno je sonificirana i filtrirana preko 0,45 mm filtera. Koncentracija polinukleotida određena je spektroskopski kao koncentracija nukleobaza [231].

4.9.2. UV/Vis spektroskopija

UV/Vis spektri snimljeni su na spektrofotometru Elmer Lambda 25. Apsorbancija je određena u kvarcnim kivetama duljine puta 1 cm. UV/Vis titracijama praćene su promjene spektara ispitivanih spojeva na valnim duljinama $\lambda = 220\text{--}450 \text{ nm}$, na kojima upotrebljeni

polinukleotidi ne apsorbiraju UV/Vis zračenje. Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi u puferu BPE. Prvo se snimi UV/Vis spektar slijepe probe (0,999 mL BPE i 1 μ L DMSO). Zatim se snimi apsorpcijski spektar otopine ispitivanog spoja u kvarcnoj kivetu ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}) i dodaju alikvoti otopine polinukleotida u puferu BPE ($I = 0,05$ mol dm^{-3} , pH= 7,0). Nakon svakog dodatka promiješa se otopina i pričekava da se kompleks uravnoteži (2-3 min), te se snimi apsorpcijski spektar. Koncentracija polinukleotida mijenja se u području od 10^{-5} do 10^{-4} mol dm^{-3} i korigira za razrjeđenje. Dobiveni podaci obrađeni su u programu ORIGIN 9.0. Konstante stabilnosti (K_s) i omjeri n ([vezani spoj]/[polinukleotid]) izračunati su prema Scatchardovoj jednadžbi [232, 233].

4.9.3. Određivanje promjene temperature mekšanja (ΔT_m)

Promjena temperature mekšanja ispitana je na Perkin Elmer Lambda 25 spektrofotometru u kvarcnim kivetama duljine puta 1 cm. Apsorbancija kompleksa DNA/RNA polinukleotida s ispitivanim spojevima praćena je na $\lambda = 260$ nm u ovisnosti o temperature (25–98 °C). Temperature “mekšanja” određene su kao točke infleksije temperaturnih krivulja na osnovu prve derivacije. Promjena temperature mekšanja (ΔT_m) određena je kao razlika temperature mekšanja kompleksa DNA/RNA-ispitani spoj i temperature mekšanja slobodnog polinukleotida. Mjerenja su provedena pri omjerima r (ispitivani spoj/polinukleotid) 0,1, 0,5 i 0,7 za *ct*DNA i 0,1, 0,3 i 0,5 za pApU. ΔT_m vrijednosti su određene iz najmanje dva neovisna mjerenja s pogreškom ± 0.5 °C. Dobiveni podaci obrađeni su u programu ORIGIN 9.0.

4.9.4. Cirkularni dikroizam (CD)

CD spektri snimani su na JASCO J-800 spektrometru. Titracijama su praćene promjene u intenzitetu CD spektra polinukleotida (koncentracije 2×10^{-5} M) dodatkom ispitivanog spoja u području $\lambda = 220$ –450 nm. Mjerenja su provedena pri omjerima r ([ispitivani spoj]/[polinukleotid]) 0,1; 0,3; 0,5 i 0,7 na sobnoj temperaturi u BPE puferu ($I = 0.05$ mol dm^{-3} , pH= 7). Sva mjerenja su provedena na sobnoj temperaturi, a podatci obrađeni u programu ORIGIN 9.0.

4.10. *In silico* analize

Predviđanje potencijalnih bioloških meta i farmakoloških učinaka provedeno je primjenom web-servisa PASS (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>), koje se temelji na identificiranju strukturnih značajki karakterističnih za aktivne spojeve [180].

Dostupne kristalne strukture apo i ko-kristalizirane kinaze p38- α s različitim inhibitorima preuzete su iz proteinske baze podataka, PDB (eng. *protein data bank*) [234, 235]. Kako bi se dobile kemijski različite i reprezentativne strukture, zbog velikog broja raspoloživih kristalnih struktura (384 strukture), ligandi su grupirani po sličnosti Canvas i protokolu za određivanje klastera [236,237]. Korišteni su ligandi sljedećih *DFG-in* kristalnih struktura: 3LFA, 3MW1, 4EH3, 4FA2, 4KIN, 4ZTH, 4R3C, 3ZSH, 3C5U, 3FMK, 3HP5, 3BX5, 3ZYA, 1ZZ2 i 3GFE, te reprezentativni ligandi sljedećih *DFG-out* kristalnih struktura: 3HV6, 3HEC, 3LFE, 3IW8, 3P79, 3D83, 3K3J, 3P5K, 3P7A, 3P7b, 3P7C. Korištene su *DFG-in* konformacije s uočenim zakretanjem glicina (eng. *Gly flip*): 1OUK, 1OUY i 1OVE i 2GTN, te 2YIW i 4KIN za *DFG-out* konformaciju. Iz PDB baze podataka su prikupljene njihove IC₅₀ vrijednosti [238]. Metoda preklapanja molekularskih polja (eng. *field based alignment*) bioaktivnih konformacija reprezentativnih liganada provedena je korištenjem programa Torch tvrtke Cresset [239]. Konformacijska analiza priređenih spojeva ispitana je s fiksnim PDB inhibitorima p38 MAPK u bioaktivnoj konformaciji. Molekularsko uklapanje (eng. *docking*) provedeno je korištenjem Glide protokola [240–242] u programu Schrodinger [243] uz dodatnu preciznost(XP). Metoda usmjerenih (eng. *constrain*) interakcija s aminokiselinama zglobnog područja (eng. *hinge region*), Met109 i Gly110, korištena je uz standardni protokol molekularskog uklapanja. Vezne konformacije dodatno su re-optimirane *Embrace* protokolom i energija vezanja je određena metodom MM-GBSA [244–246] te pomoću polja sila OPLS3 s fleksibilnim aminokiselinama unutar veznog mjesta radijusa 5Å. Sva farmakokinetička svojstva određena su u program ACD percepta.

Sve *in silico* analize provedene su u suradnji s prof. dr. sc. Sanjom Koštrun iz Fidelte.

5. Zaključak

- Regioselektivnom Cu(I)-kataliziranom *click* reakcijom potpomognutom mikrovalnim zračenjem iz prethodno pripremljenih *N*-propargiliranih heterocikličkih baza i odgovarajućeg azida sintetizirani su ciljani 1,4-disupstituirani triazoli halogeniranih purina i purinskih izostera s različitim arilnim supstituentima na 1,2,3-triazolnom prstenu (**7–16**, **21–28** i **35–49**).
- Rezultati antitumorskog ispitivanja *in vitro* pokazali su da 7-deazapurinski derivat s 1-(4-fluorfenil)-1,2,3-triazolnim supstituentom **21** selektivno djeluje na stanice karcinoma debelog crijeva SW620 ($IC_{50} = 8,5 \mu M$), dok je benzimidazolni derivat s 1-(4-klorfenil)-1,2,3-triazolnim supstituentom **46** pokazao najizraženiji i selektivan inhibicijski učinak na karcinom pluća ne-malih stanica A549 ($IC_{50} = 0,79 \mu M$).
- Dodatna biološka ispitivanja pokazala su da su meta spoja **46** protein plazmatske membrane GPLD1 i receptori faktora rasta PDGFR i IGF-1R što je povezano s inhibicijom stanične proliferacije i indukcijom apoptoze posredovane p38 MAP kinazom i transkripcijskim faktorom NF- κ B.
- *In silico* analizom molekuskog uklapanja potvrđeno je da je p38 MAP-kinaza potencijalna meta hibrida benzimidazola **46**. Kompleksi spoja **46** s neaktivnom konformacijom (*DFG-out*) enzima i liganda 3D83 i liganda 2GTN s zakrenutim Gly 110 imaju sličnu stabilnost, te je inhibitorna aktivnost spoja **46** procijenjena ispod 100 nM.
- Priređeni su mono-6-klor-7-deazapurini s alkilnim (**52**, **53**), arilnim (**53–59**) i sulfonamidnim (**60–62**) supstituentima vezanim za C-4 položaj triazolnog prstena, nesimetrični pseudopurini (**64–68**) i simetrični 6-klor-7-dezapurini povezani fenilnom premosnicom (**69**, **70**). *Click* reakcija azidoetilnog 7-deazapurina **51** s odgovarajućim terminalnim alkinima provedena je mikrovalovima potpomognutom reakcijom u katalitičkom sustavu $CuSO_4/Cu(0)$.
- Selektivno antitumorsko djelovanje na stanice karcinoma vrata maternice HeLa pokazali su mono-6-klor-7-deazapurinski derivat **58** ($IC_{50} = 9,5 \mu M$) i nesimetrični pseudopurinski dimer **68** ($IC_{50} = 5,3 \mu M$), dok je bis-6-klor-7-deazapurinski derivat **70** pokazao snažan inhibitorni učinak na stanice karcinoma gušterače CFPAC-1 ($IC_{50} = 0,95 \mu M$).
- Dodatna biološka ispitivanja Aneksin V testom pokazala su da spoj **70** inducira kasnu apoptozu i primarnu nekrozu u stanicama CFPAC-1, povezanu sa značajno smanjenom

ekspresijom proteinskih kinaza CDK9/ciklin T1, p38 MAPK i c-Raf. Antitumorska aktivnost spojeva **58** i **68** također je povezana sa smanjenjem ekspresije CDK9/ciklin T1 u HeLa stanicama, dok je spoj **58** pokazao smanjenje ekspresije p38 MAPK.

- *Click* reakcijom pripremljeni su mono- i bis-triazolni 6-supstituirani purini (**77a–88a**, **78b** i **79b**) i 7-deazapurini (**99a–106a**, **99b–101b**, **104b**, **105b**, **109a**, **111a** i **109b–111b**) s *p*-dimetiloksifenilom, *p*-dimetiloksibifenilnom, propilenskom i dimetileterskom premosnicom. U svrhu optimiranja reakcijskih uvjeta 1,3-dipolarna cikloadicija odgovarajućih purinskih (**90**, **92**, **97** i **98**) i deazapurinskih azidoetilnih derivata (**51**) s bis-alkinima (**73–75**) provedena je u različitim reakcijskim uvjetima. Primjenom CuSO₄/Cu(0) katalitičkog sustava u *click* reakciji potpomognutom ultrazvučnim valovima dobiveni su isključivo bis-triazolni derivati, te je vrijeme reakcije u odnosu na klasičnu sintezu smanjeno s 5 dana na 1,5 h.
- Reakcijom supstitucije s piperidinom i pirolidinom potpomognute mikrovalnim zračenjem bis-triazolni-6-klor-7-deazapurini (**77a–80a**) prevedeni su u odgovarajuće piperidinske (**81a–84a**) i pirolidinske analoge (**85a–88a**).
- U reakciji brometilnog 6-klorpurina (**89**) s natrijevim azidom došlo je do neželjene supstitucije klora u položaju 6 purinske jezgre. Stoga je predložen drugi sintetski put u kojem je 6-klorpurinska baza u prvom stupnju prevedena u odgovarajuće piperidinske i pirolidinske baze (**93** i **94**), što je omogućilo pripravu odgovarajućih azidoetilnih analoga (**97** i **98**).
- Azidoetilni adeninski derivat (**92**) pokazao je izuzetno slabu reaktivnost u *click* reakciji s odabranim bis-alkinima, te su uspješno priređeni hibridi s *p*-dimetiloksifenilom (**109a**) i dietil-eterskom (**111a**) premosnicom u izuzetno slabom iskorištenju (11 % i 8 %), dok je u reakciji s hepta-1,6-diinom dobiven isključivo mono-triazolni produkt **110b**.
- Uspoređivanjem odnosa antitumorske aktivnosti i strukture priređenih spojeva utvrđeno je da bis-triazolni spojevi s alifatskim premosnicama (**79a**, **80a**, **87a**, **88a**, **101a**, **102a**, **105a** i **106a**) ne pokazuju antitumorsko djelovanje, dok su spojevi s *p*-dimetiloksibifenilnom premosnicom (**78a**, **78b**, **100a**, **100b**, **104a** i **140b**) pokazali najizraženiju inhibiciju rasta tumorskih stanica. Među priređenim mono-triazolnim 6-supstituiranim purinima i 7-deazapurinima antitumorsku aktivnost su pokazali samo spojevi s *p*-dimetiloksibifenilnom premosnicom **78b**, **100b** i **104b**. Naj snažnije djelovanje pokazao je 6-klor-7-deazapurinski

derivat **78b**, koji je inhibirao rast tumorskih stanica HeLa ($IC_{50}= 0,98 \mu\text{M}$) i CFPAC-1 ($IC_{50}= 0,79 \mu\text{M}$) u nanomolarnom području.

- Zamjenom fenilne prenosnice između triazolnih jezgri 6-klor-7-deazapurinskih derivata (**69** i **70**) s *p*-dimetiloksifenilnom (**77a**), *p*-dimetiloksibifenilnom (**78a**), propilnom (**79a**) i dimetil-eterskom (**80a**) prenosnicom smanjeno je antiproliferativno djelovanje.
- Sintetizirani su 2-aril-supstituirani 5(6)-amidinobenzimidazoli **125a–133a**, **125b–134b**, **125c–134c**, nesupstituirani benzimidazol **127d** i 5(6)-klorbenzimidazol **127e**, kao i amidino-supstituirani benzimidazoli direktno povezani (**141**, **142**) i povezani preko etilenske prenosnice (**143**) za triazolni prsten. Benzimidazoli su priređeni ciklizacijom odgovarajućih triazolnih aldehida i *o*-fenilendiamina (**124a–124e**).
- 4-(1,2,3-triazol-1-il)benzaldehidi (**114–122**) priređeni su *click* reakcijama potpomognutim mikrovalovima i ultrazvukom, pri čemu su ultrazvukom potpomognutim reakcijama priređeni ciljani produkti u boljem iskorištenju.
- Ispitani spojevi iz serije 2,5(6)-disupstituiranih hibrida benzimidazola pokazali su izraženo antitumorsko djelovanje. Uspoređujući odnos strukture priređenih spojeva s antitumorskom aktivnošću može se zaključiti da najznačajniji doprinos na antiproliferativno djelovanje imaju supstituenti u *N*-1 položaju triazolnog prstena. Atomi halogena u *para* položaju fenilnog prstena značajno doprinose povećanju antitumorske aktivnosti. Imidazolinilni supstituent u položaju C-5(6) benzimidazolne jezgre također je povećao antitumorski učinak.
- Spojevi **127b** i **132c** pokazali su selektivno i izraženo antitumorsko djelovanje inhibirajući rast karcinom pluća ne-malih stanica u nanomolarnom području (**127b**, $IC_{50}= 0,05 \mu\text{M}$; **132c**, $IC_{50}= 0,07 \mu\text{M}$). Dodatna biološka ispitivanja su provedena kako bi se utvrdio mehanizam njihovog djelovanja. Spoj **132c** inducirao je smanjenje aktivnosti p53 u A549 što je povezano s nizvodnom regulacijom enzima TGM2, CDK9/ciklin T1 i p38 MAPK, dok je spoj **127b** smanjio aktivnosti SK1 i p38 MAPK.
- Provedena je analiza *in silico* mogućih interakcija spojeva **127b** i **132c** s biološkom metom p38 MAPK. Sve predviđene inhibitorne vrijednosti spojeva **127b** i **132c** su u koncentracijskom području ispod 100 nM, pri čemu su oba spoja pokazala sličan način vezanja i najsnažniju aktivnost u *DFG-out* formi s ligandom 3D83.

- Ispitane su moguće interakcije 5(6)-amidino-supstituiranih benzimidazola **125a–133a**, **125b–133b**, **125c–133c** s *ctDNA* i dsRNA (pApU i pCpG).
- Prema rezultatima ispitivanja interakcija s *ctDNA* i dsRNA, UV/Vis titracijama, promjenom temperature mekšanja i CD spektroskopijom, može se zaključiti da, osim *N*-izopropilamidinskih derivata **126b**, **127b** i **129b**, uvođenje halogenog supstituenta u *para* položaj fenilnog prstena vezanog za *N*-1 položaj triazola dovodi do gubitka interakcija s odabranim polinukleotidima. Vezanje u mali utor *ctDNA* utvrđen je kao dominantan način vezanja. Spojevi **130a–130c** s *p*-metoksifenilnim supstuentom u *N*-1 položaju triazolnog prstena pokazao je veći afinitet prema polinukleotidima RNA (pApU i pCpG).
- Spojevima **125a–125c**, **130a–133a**, **130b–133b** i **130c–133c** ispitano je *in vitro* antibakterijsko djelovanje na gram-pozitivne bakterije *S. aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), gram-negativne bakterije, i *E. coli* (ATCC 25925), *K. pneumoniae* (ATCC 700803), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) i *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), kao i antitripanosomsko djelovanje.
- Spojevima koji su pokazali antibakterijsku aktivnost MIC < 256 mg/L ispitano je djelovanje na klinički rezistentne gram-pozitivne sojeve: meticilin-otporne *S. aureus* (MRSA), meticilin-osjetljive *S. aureus* (MSSA) i vankomicin-otporne *E. faecium* (VRE) i gram-negativne kliničke sojeve otporne na β -laktamske antibiotike (*ESBL*) *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*.
- *N*-izopropilamidino-supstituirani benzimidazoli **125b**, **130b–133b** pokazali su najsnažniju aktivnost protiv rezistentnog soja MRSA, a spoj **125a** najsnažniju inhibitornu aktivnost protiv gram-negativnih rezistentnih sojeva *E. coli* (*ESBL*) i *K. pneumoniae*, snažniju od referentnih antibiotika ceftazidima i ciprofloksacina.
- Iz rezultata antitripanosomskog djelovanja može se zaključiti da je *p*-metoksifenilni supstituent u *N*-1 položaju triazolnog prstena ključan za povećanu aktivnost protiv *T. brucei*. Spojevi **130a–130c** koji pokazuju najznačajnije antitripanosomsko djelovanje, snažnije od referentnog nifurtimoksa. Ti spojevi posjeduju također veći afinitet prema polinukleotidima RNA (pApU i pCpG) u odnosu na *ctDNA*.

- Priređeni su 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirani hibridi benzimidazola kao modificirane strukture predvodnog spoja **132c** kako bi se dobili spojevi s boljim farmakokinetičkim svojstvima i inhibitornom aktivnošću u konformaciji *DFG-out* enzima p38 MAPK.
- Usporedbom strukturnih svojstava određenih *in silico* metodom i definiranih s pravilima Lipinskog (Ro5), vidljivo je da spoj **163** odstupa od graničnih vrijednosti. *In silico* predviđanja ADMET svojstva priređenih 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola ukazuju da su strukturnim modifikacijama spoja **132c** priređeni analozi s boljim farmakokinetičkim svojstvima. Spojevi **165**, **173a** i **173b** posjeduju najbolja ADMET svojstva.
- Analizom *in silico* molekuskog uklapanja mogućih interakcija 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituiranih hibrida benzimidazola najbolje energije vezanja pokazali su spojevi **161**, **163**, **154**, **155** i **172c**, a predviđeno je da svi 5(6)-(2-imidazolinil)-supstituirani hibridi benzimidazola **153–155**, **161–163**, **165**, **171a–175a**, **171b–175b** i **171c–175c** inhibiraju p38 MAP kinazu s aktivnošću ispod 100 nM.

6. Literatura

1. M. Mintas, *Medicinska kemija protutumorskih lijekova*, Medicinska naklada, Zagreb, 2013, str. 4–11.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (pristup 21.09.2017.)
3. M. H. Forouzanfar, A. Afshin, L. T. Alexander, H. R. Anderson, Z. A. Bhutta, S. Biryukov, M. Brauer, R. Burnett, K. Cercy, F. J. Charlson, A. J. Cohen, Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388 (2016) 1659–1724.
4. D. E. Gerber, Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am. Fam. Physician*. 77 (2008) 311–319.
5. N. Saijo, T. Tamura, K. Nishio, Strategy for the development of novel anticancer drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 52 (2003) 97–101.
6. S. Kumar, M. K. Ahmad, M. Waseem, A. K. Pandey, Drug targets for cancer treatment: an overview. *Med. Chem*, 5 (2015) 115–123.
7. M. Mintas, S. Raić, *Medicinska kemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2009, str. 28–50.
8. P. Ranjitkar, A. M. Brock, D. J. Maly, Affinity reagents that target a specific inactive form of protein kinases. *Chem. Biol.* 17 (2010) 195–206.
9. A. Talevi, Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the “skeleton key approach” from a medicinal chemist perspective. *Front Pharmacol*, 6 (2015) 205.
10. Y. Bansal, O. Silakari, Multifunctional compounds: Smart molecules for multifactorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* 76 (2014) 31–42.
11. S. Giordano, A. Petrelli, From single-to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage. *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 422–432.
12. R. G. Fu, Y. Sun, W. B. Sheng, D. F. Liao, Designing multi-targeted agents: An emerging anticancer drug discovery paradigm. *Eur. J. Med. Chem.* 136 (2017) 195–211.
13. N. Kerru, P. Singh, N. Koorbanally, R. Raj, V. Kumar, Recent advances (2015–2016) in anticancer hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* 142 (2017) 179–212.
14. K. Nepali, S. Sharma, M. Sharma, P. M. S. Bedi, K. L. Dhar, Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* 77 (2014) 422–487.
15. S. Mishra, P. Singh, Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals. *Eur. J. Med. Chem.* 124 (2016) 500–536.
16. G. Bérubé, An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 11 (2016) 281–305.

17. L. Y. Ma, B. Wang, L. P. Pang, M. Zhang, S. Q. Wang, Y. C. Zheng, K. P. Shao, D. Q. Xue, H. M. Liu, Design and synthesis of novel 1, 2, 3-triazole–pyrimidine–urea hybrids as potential anticancer agents. *Bioorg, Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 1124–1128.
18. Y. C. Duan, Y. C. Zheng, X. C. Li, M. M. Wang, X. W. Ye, Y. Y. Guan, G. Z. Liu, J. X. Zheng, H. M. Liu, Design, synthesis and antiproliferative activity studies of novel 1,2,3-triazole-dithiocarbamate-urea hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 99–110.
19. J. Kim, H. Kim, S. B. Park, Privileged structures: efficient chemical “Navigators” toward unexplored biologically relevant chemical spaces. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 14629–14638.
20. R. W. DeSimone, K. S. Currie, S. A. Mitchell, J. W. Darrow, D. A. Pippin, Privileged structures: applications in drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 7 (2004) 473–493.
21. M. E. Welsch, S. A. Snyder, B. R. Stockwell, Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 347–361.
22. C. A. Lipinski, Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* 1(2004) 337–341.
23. G. Caron, G. Ermondi, Updating molecular properties during early drug discovery. *Drug Discov.* 22 (2017) 835–840.
24. B. C. Doak, J. Kihlberg, Drug discovery beyond the rule of 5-Opportunities and challenges. *Expert Opin. Drug Discov.* 12 (2017) 115–119.
25. M. Q. Zhang, B. Wilkinson, Drug discovery beyond the ‘rule-of-five’. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 478–488.
26. B. R. Smith, C. M. Eastman, J. T. Njardson, Beyond C, H, O, and N! Analysis of the Elemental Composition of US FDA Approved Drug Architectures: Miniperspective. *J. Med. Chem* 57 (2014) 9764–9773.
27. R. Wilcken, M. O. Zimmermann, A. Lange, A. C. Joerger, F. M. Boeckler, Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *J. Med. Chem.* 56 (2012) 1363–1388.
28. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144 (2011) 646–674.
29. C. Avendano, J. C. Mendez, *Medicinal chemistry of anticancer drugs*, Elsevier, 2008
30. A. Bononi, C. Agnoletto, E. De Marchi, S. Marchi, S. Patergnani, M. Bonora, C. Giorgi, S. Missiroli, F. Poletti, A. Rimessi, P. Pinton, Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res.* 2011 (2011) Article ID: 329098

31. J. A. Adams, Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* 101 (2001) 2271–2290.
32. P. Cohen, Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 309–315.
33. G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298 (2002) 1912–1934.
34. <https://www.cellsignal.com/contents/science-protein-kinases/protein-kinases-human-protein-kinases-overview/kinases-human-protein> (pristup 02.02.18)
35. R. S. K. Vijayan, P. He, V. Modi, K. C. Duong-Ly, H. Ma, J. R. Peterson, R. L. Dunbrack Jr, R.M. Levy, Conformational analysis of the *DFG-out* kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors. *J. Med. Chem.* 58 (2015) 466–479.
36. M. Huse, J. Kuriyan, The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 109 (2002) 275–282.
37. M. García-Aranda, M. Redondo, Protein Kinase Targets in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2543.
38. J. Dancey, E. A. Sausville, Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 296–313.
39. S. Gross, R. Rahal, N. Stransky, C. Lengauer, K. P. Hoeflich, Targeting cancer with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 1780–1789.
40. Z. Zhao, H. Wu, L. Wang, Y. Liu, S. Knapp, Q. Liu, N. S. Gray, Exploration of type II binding mode: a privileged approach for kinase inhibitor focused drug discovery? *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 1230–1241.
41. Z. Fang, C. Grutter, D. Rauh, Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: exploiting exclusive structural features. *ACS Chem. Biol.* 8 (2012) 58–70.
42. R. Mah, J. R. Thomas, C. M. Shafer, Drug discovery considerations in the development of covalent inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 33–39.
43. S. Kumar, J. Boehm, J. C. Lee, p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 717–726.
44. E. F. Wagner, Á. R. Nebreda, Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 537–549.

45. C. Ambrosino, Á. R. Nebreda. Cell Cycle Regulation by p38 MAP Kinases. *Biol. Cell.* 93 (2001) 47–51.
46. R. Sanchez-Prieto, J. M. Rojas, Y. Taya, J. S. Gutkind, A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 60 (2000) 2464–2472.
47. K. E. Martz, A. Dorn, B. Baur, V. Schattel, M. I. Goettert, S. C. Mayer-Wrangowski, D. Rauh, S. A. Laufer, Targeting the hinge glycine flip and the activation loop: novel approach to potent p38 α inhibitors. *J. Med. Chem.* 55 (2012) 7862–7874.
48. A. Astolfi, N. Iraci, G. Manfroni, M. L. Barreca, V. Cecchetti, A comprehensive structural overview of p38 α MAPK in complex with type I inhibitors. *Chem. Med. Chem.* 10 (2015) 957–969.
49. A. Patnaik, P. Haluska, A. W. Tolcher, C. Erlichman, K. P. Papadopoulos, J. L. Lensing, M. Beeram, J. R. Molina, D. W. Rasco, R. R. Arcos, C. S. Kelly, S. R. Wijayawardana, X. Zhang, L. F. Stancato, R. Bell, P. Shi, P. Kulanthaivel, C. Pitou, L. B. Mulle, D. L. Farrington, E. M. Chan, M. P. Goetz, A first-in-human phase I study of the oral p38 MAPK inhibitor, Ralimetinib (LY2228820 Dimesylate), in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* 22 (2016) 1095–1102.
50. L. Bachegowda, K. Morrone, S. L. Winski, I. Mantzaris, M. Bartenstein, N. Ramachandra, O. Giricz, V. Sukrithan, G. Nwankwo, S. Shahnaz, T.D. Bhagat, Pexmetinib: A novel dual inhibitor of Tie2 and p38 MAPK with efficacy in preclinical models of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 76 (2016) 4841–4849.
51. J. C. Bendell, M. Javle, T. S. Bekaii-Saab, R. S. Finn, Z. A. Wainberg, D. A. Laheru, C. D. Weekes, B. R. Tan, G. N. Khan, M. M. Zalupski, J. R. Infante, A phase 1 dose-escalation and expansion study of binimetinib (MEK162), a potent and selective oral MEK1/2 inhibitor. *Br. J. Cancer* 116 (2017) 575–583.
52. P. M. LoRusso, J. R. Infante, K. B. Kim, H. A. Burris, G. Curt, U. Emeribe, D. Clemett, H. K. Tomkinson, R. B. Cohen, A phase I dose-escalation study of selumetinib in combination with docetaxel or dacarbazine in patients with advanced solid tumors. *BMC Cancer*, 17 (2017) 173.
53. S. Kalra, G. Joshi, A. Munshi, R. Kumar, Structural insights of cyclin dependent kinases: Implications in design of selective inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 142 (2017) 424–458.

54. G. Mariaule, P. Belmont, Cyclin-dependent kinase inhibitors as marketed anticancer drugs: Where are we Now? A short survey. *Molecules* 19 (2014) 14366–14382.
55. Y. A. Sonawane, M. A. Taylor, J. V. Napoleon, S. Rana, J. I. Contreras, A. Natarajan, Cyclin dependent kinase 9 inhibitors for cancer therapy. *J. Med. Chem.* 59 (2016) 8667–8684.
56. U. Asghar, A. K. Witkiewicz, N. C. Turner, E. S. Knudsen, The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 130–146.
57. J. Cicenias, K. Kalyan, A. Sorokinas, E. Stankunas, J. Levy, I. Meskinyte, V. Stankevicius, A. Kaupinis, M. Valius, Roscovitine in cancer and other diseases. *Ann. Transl. Med.* 3 (2015) 135.
58. J. Flynn, J. Jones, A. J. Johnson, L. Andritsos, K. Maddocks, S. Jaglowski, J. Hessler, M. R. Grever, E. Im, H. Zhou, Dinaciclub is a novel cyclin-dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 29 (2015) 1524–1529.
59. H. Iwata, Clinical development of CDK4/6 inhibitor for breast cancer. *Breast Canc.* (2018) 1–5.
60. <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm578081.htm> (pristup 07.01.2018)
61. Y. Y. Syed, Ribociclib: First global approval. *Drugs* 77 (2017) 799–807.
62. D. Dheer, V. Singh, R. Shankar, Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg. Chem.* 71 (2017) 30–54.
63. C. H. Zhou, Y. Wang, Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 239–280.
64. A. Lauria, R. Delisi, F. Mingoia, A. Terenzi, A. Martorana, G. Barone, A. M. Almerico, 1,2,3-Triazole in heterocyclic compounds, endowed with biological activity, through 1, 3-dipolar cycloadditions. *Eur. J. Org. Chem.* 2014 (2014) 3289–3306.
65. S. Raić-Malić, A. Meščić, Recent trends in 1, 2, 3-triazolo-nucleosides as promising anti-infective and anticancer agents. *Curr. Med. Chem.* 22 (2015) 1462–1499.
66. J. Zeidler, D. Baraniak, T. Ostrowski, Bioactive nucleoside analogues possessing selected five-membered azaheterocyclic bases. *Eur. J. Med. Chem.* 97 (2015) 409–418.
67. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001), 2004–2021.

68. J. E. Hein, V. V. Fokin, Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper (I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1302–1315.
69. R. Huisgen, "Centenary Lecture-1,3-Dipolar Cycloadditions". *Proceedings of the Chemical Society of London*: (1961) 357.
70. N. M. Meghani, H. H. Amin, B. J. Lee, Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery. *Drug. Discov. Today.* 22 (2017) 1604–1619.
71. M. S. Singh, S. Chowdhury, S. Koley, Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade. *Tetrahedron.* 72 (2016) 5257–5283.
72. M. Meldal, C. W. Tornøe, Cu-catalyzed azide– alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* 108 (2008) 2952–3015.
73. B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science*,340 (2013) 457–460.
74. C. Wang, D. Ikhlef, S. Kahlal, J. Y. Saillard, D. Astruc, Metal-catalyzed azide-alkyne “click” reactions: Mechanistic overview and recent trends. *Coord. Chem. Rev.* 316 (2016) 1–20.
75. C. Shao, X. Wang, Q. Zhang, S. Luo, J. Zhao, Y. Hu, Acid–base jointly promoted copper (I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition. *J. Org. Chem.* 76 (2011) 6832–6836.
76. S. Díez-González, Well-defined copper (I) complexes for click azide–alkyne cycloaddition reactions: One click beyond. *Catal. Sci. Technol.* 1 (2011) 166–178.
77. R. N. Baig, R. S. Varma, Alternative energy input: mechanochemical, microwave and ultrasound-assisted organic synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 1559–1584.
78. C. O. Kappe, E. Van der Eycken, Click chemistry under non-classical reaction conditions. *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1280–1290.
79. A. Barge, S. Tagliapietra, A. Binello, G. Cravotto, Click chemistry under microwave or ultrasound irradiation. *Cur. Org. Chem.* 15 (2011) 189–203.
80. G. Cravotto, V. V. Fokin, D. Garella, A. Binello, L. Boffa, A. Barge, Ultrasound-Promoted Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *J. Comb. Chem.* 12 (2009) 13–15.
81. P. Cintas, G. Palmisano, G. Cravotto, Power ultrasound in metal-assisted synthesis: From classical Barbier-like reactions to click chemistry. *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 836–841.

82. A. A. Alzahrani, A. H. Erbse, C. N. Bowman, Evaluation and development of novel photoinitiator complexes for photoinitiating the copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition reaction. *Polym. Chem.*, 5 (2014) 1874–1882.
83. M. A. Tasdelen, Y. Yagci, Light-Induced Click Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 5930–5938.
84. M. Tireli, S. Maračić, S. Lukin, M. J. Kulcsár, D. Žilić, M. Cetina, I. Halasz, S. Raić-Malić, K. Užarević, Solvent-free copper-catalyzed click chemistry for the synthesis of N-heterocyclic hybrids based on quinoline and 1, 2, 3-triazole. *Beilstein J. Org. Chem.* 13 (2017) 2352–2363.
85. O. A. Stasyuk, H. Szatyłowicz, T. M. Krygowski, Effect of the H-bonding on aromaticity of purine tautomers. *J. Org. Chem.* 77 (2012) 4035–4045.
86. M. Legraverend, D. S. Grierson, The purine: potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 3987–4006.
87. Z. Wang, Traube Purine Synthesis in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, 2010, str. 2789–2792.
88. E. Vitaku, D. T. Smith, J. T. Njardson, Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 10257–10274.
89. Z. Demir, E. B. Guven, S. Ozbey, C. Kazak, R. C. Atalay, M. Tuncbilek, 2015. Synthesis of novel substituted purine derivatives and identification of the cell death mechanism. *Eur. J. Med. Chem.* 89 (2015) 701–720.
90. Z. V. Peitsinis, A. G. Mitrakas, E. A. Nakiou, D. A. Melidou, D. Kalamida, C. Kakouratos, M. I. Koukourakis, A. E. Koumbis, Trachycladines and Analogues: Synthesis and Evaluation of Anticancer Activity. *Chem. Med. Chem.* 12 (2017) 448–455.
91. A. Kucukdumlu, M. Tuncbilek, E. B. Guven, R. C. Atalay, Synthesis of Some Substituted 6-Phenyl Purine Analogues and Their Biological Evaluation as Cytotoxic Agents. *Acta Chim. Slov.* 64 (2017) 621–632.
92. T. C. Kuo, L. Li, S. H. Pan, J. M. Fang, J. H. Liu, T. J. Cheng, C. J. Wang, P. F. Hung, H. Y. Chen, T. M. Hong, Y. L. Hsu, Purine-Type Compounds Induce Microtubule Fragmentation and Lung Cancer Cell Death through Interaction with Katanin. *J. Med. Chem.* 59 (2016) 8521–8534.

93. Z. Z. Zhou, X. D. Shi, H. F. Feng, Y. F. Cheng, H. T. Wang, J. P. Xu, Discovery of 9H-purins as potential tubulin polymerization inhibitors: Synthesis, biological evaluation and structure–activity relationships. *Eur. J. Med. Chem.* 138 (2017) 1126–1134.
94. M. Derudas, C. Vanpouille, D. Carta, S. Zicari, G. Andrei, R. Snoeck, A. Brancale, L. Margolis, J. Balzarini, C. McGuigan, Virtual Screening of acyclovir derivatives as potential antiviral agents: design, synthesis, and biological evaluation of new acyclic nucleoside ProTides. *J. Med. Chem.* 60 (2017) 7876–7896.
95. A. Venkatesham, M. Saudi, S. Kaptein, J. Neyts, J. Rozenski, M. Froeyen, A. Van Aerschot, Aminopurine and aminoquinazoline scaffolds for development of potential dengue virus inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 126 (2017) 101–109.
96. L. H. Yan, A. Le Roux, K. Boyapelly, A. M. Lamontagne, M. A. Archambault, F. Picard-Jean, D. Lalonde-Seguine, E. St-Pierre, R. J. Najmanovich, L. C. Fortier, D. Lafontaine, Purine analogs targeting the guanine riboswitch as potential antibiotics against *Clostridioides difficile*. *Eur. J. Med. Chem.* 143 (2018) 755–768.
97. S. Schwarz, R. Csuk, A. P. Rauter, Microwave-assisted synthesis of novel purine nucleosides as selective cholinesterase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* 12 (2014) 2446–2456.
98. H. J. Patel, P. D. Patel, S. O. Ochiana, P. Yan, W. Sun, M. R. Patel, S. K. Shah, E. Tramentozzi, J. Brooks, A. Bolaender, L. Shrestha, Structure–activity relationship in a purine-scaffold compound series with selectivity for the endoplasmic reticulum Hsp90 paralog Grp94. *J. Med. Chem.* 58 (2015) 3922–3943.
99. L. Chen, D. Chen, L. Tang, J. Ren, J. Chen, X. Zhen, Y. C. Liu, C. Zhang, H. Luo, J. Shen, B. Xiong, Design and optimization of purine derivatives as in vivo active PDE10A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 3315–3329
100. S. Sharma, J. Singh, R. Ojha, H. Singh, M. Kaur, P. M. S. Bedi, K. Nepali, Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 112 (2016) 298–346.
101. L. Zhang, J. Fan, K. Vu, K. Hong, J. Y. Le Brazidec, J. Shi, M. Biamonte, D. J. Busch, R. E. Lough, R. Grecko, Y. Ran, 7-Substituted benzothiazolothio- and pyridinobenzothiazolothio-purines as potent heat shock protein 90 inhibitors. *J. Med. Chem.* 49 (2006) 5352–5362.
102. A. Sharma, V. Luxami, K. Paul, Purine-benzimidazole hybrids: Synthesis, single crystal determination and in vitro evaluation of antitumor activities. *Eur. J. Med. Chem.* 93 (2015) 414–422.

103. M. G. Kallitsakis, M. Yañez, E. Soriano, J. Marco-Contelles, D. J. Hadjipavlou-Litina, K. E. Litinas, Purine homo-N-nucleoside+ coumarin hybrids as pleiotropic agents for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Future Med. Chem* 7 (2015) 103–110.
104. E. V. Aleksandrova, P. M. Kochergin, The use of protecting groups in the synthesis of purine derivatives. *Chem. Heterocycl. Comp.* 45 (2009) 1–27.
105. S. Schwarz, B. Siewert, R. Csuk, A. P. Rauter, New antitumor 6-chloropurine nucleosides inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *Eur. J. Med. Chem.* 90 (2015) 595–602.
106. P. Plačková, N. Rozumová, H. Hrebabecky, M. Šála, R. Nencka, T. Elbert, A. Dvorakova, I. Votruba, H. Mertlikova-Kaiserova, 9-Norbornyl-6-chloropurine is a novel antileukemic compound interacting with cellular GSH. *Anticancer Res.* 33 (2013) 3163–3168.
107. O. Caba, M. Díaz-Gavilán, F. Rodríguez-Serrano, H. Boulaiz, A. Aránega, M. A. Gallo, J. A. Marchal, J. M. Campos, Anticancer activity and DNA microarray studies of a (RS)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl]-6-chloro-9H-purine, and an acyclic (RS)-O,N-acetalic 6-chloro-7H-purine. *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 3802–3809.
108. M. Ikejiri, T. Ohshima, A. Fukushima, K. Shimotohno, T. Maruyama, Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 4638–4641
109. K. V. Narayana, D. S. Rao, G. Madhava, N. Venkateswarlu, T. Vijaya, C. N. Raju, Sulfonamide and carbamate derivatives of 6-chloropurine: synthesis, characterization and antimicrobial activity evaluation. *Org. Commun.* 9 (2016) 42–53.
110. V. P. Krasnov, A. Y. Vigorov, D. A. Gruzdev, G. L. Levit, M. A. Kravchenko, S. N. Skornyakov, O. B. Bekker, D. A. Maslov, V. N. Danilenko, V. N. Charushin, Tuberculostatic Activity of 2-Amino-6-Chloropurine Derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 51 (2017) 769–772.
111. T. Gazivoda, M. Plevnik, J. Plavec, S. Kraljević, M. Kralj, K. Pavelić, J. Balzarini, E. De Clerq, M. Mintaa, S. Raić-Malić, The novel pyrimidine and purine derivatives of L-ascorbic acid: synthesis, one- and two-dimensional ¹H and ¹³C NMR study, cytostatic and antiviral evaluation, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 131–139.
112. G. H. Hakimelahi, N. W. Mei, A. A. Mosavi-Movahedi, H. Davari, S. Hakimelahi, K. Y. King, J. R. Whu, Y. S. Wen, Synthesis and biological evaluation of purine-containing butenolides, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 1749–1757.

113. N. Kode, L. Chen, D. Murthy, D. Adewumi, S. Phadtare, New bis-N9-(methylphenylmethyl) purine derivatives: Synthesis and antitumor activity. *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 327–333.
114. A. Thalassitis, A. M. Katsori, K. Dimas, D. J. Hadjipavlou-Litina, F. Pyleris, N. Sakellaridis, K. E. Litinas, Synthesis and biological evaluation of modified purine homo-N-nucleosides containing pyrazole or 2-pyrazoline moiety. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* 29 (2014) 109–117.
115. N. M. Meghani, H. H. Amin, B. J. Lee, Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery. *Drug. Discov. Today.* 22(2017) 1604–1619.
116. L. Cosyn, L., K. K. Palaniappan, S.-K. Kim, H. T. Duong, Z. G. Gao, K. A. Jacobson, S. Van Calenbergh, 2-Triazole-substituted adenosines: a new class of selective A3 adenosine receptor agonists, partial agonists, and antagonists. *J. Med. Chem.* 49 (2006), 7373–7383.
117. S. C. Mathew, Y. By, A. Berthault, M. A. Virolleaud, L. Carrega, G. Chouraqui, L. Commeiras, J. Condo, M. Attolini, A. Gaudel-Siri, J. Ruf, J. Rodriguez, J.-L. Parrain, R. Guieu, Expeditious synthesis and biological evaluation of new C-6 1,2,3-triazole adenosine derivatives A1 receptor antagonists or agonists, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 3874–3881.
118. P. Minetti, M. O. Tinti, P. Carminati, M. Castorina, M. A. Di Cesare, S. Di Serio, G. Gallo, O. Ghirardi, F. Giorgi, L. Giorgi, G. Piersanti, F. Bartoccini, G. Tarzia, 2-*n*-Butyl-9-methyl-8-[1,2,3]triazol-2-yl-9*H*-purin-6-ylamine and analogues as A_{2A} adenosine receptore antagonists. Design, synthesis, and pharmacological characterization. *J. Med. Chem.* 48 (2005) 6887–6896.
119. G. Piersanti, F. Bartoccini, S. Lucarini, W. Cabri, M. A. Stasi, T. Riccioni, F. Borsini, G. Tarzia, P. Minetti, Synthesis and Biological Evaluation of Metabolites of 2-*n*-Butyl-9-methyl-8-[1,2,3]triazol-2-yl-9*H*-purin-6-ylamine (ST1535), a potent Antagonist of the A_{2A} Adenosine Receptor for the Treatment of Parkinson's Disease, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 5456–5463.
120. N. Nair, W. Kudo, M. A. Smith, R. Abrol, W. A. Goddard, V. Parkash Reddy, Novel purine-based fluoroaryl-1,2,3-triazoles as neuroprotecting agents: synthesis, neuronal cell culture investigations, and CDK5 docking studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 3957–3961.
121. S. Fernicola, I. Torquati, A. Paiardini, G. Giardina, G. Rampioni, M. Messina, L. Leoni,

- F. Del Bello, R. Petrelli, S. Rinaldo, L. Cappellacci, F. Cutruzzolà, Synthesis of triazole-linked analogues of c-di-GMP and their interactions with diguanylate cyclase. *J. Med. Chem.* 58 (2015) 8269–8284.
122. R. R. Ruddaraju, A. C. Murugulla, R. Kotla, M. C. B. Tirumalasetty, R. Wudayagiri, S. Donthabakthuni, R. Maraju, K. Baburao, L. S. Parasa, Design, synthesis, anticancer, antimicrobial activities and molecular docking studies of theophylline containing acetylenes and theophylline containing 1, 2, 3-triazoles with variant nucleoside derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 123 (2016) 379–396.
123. C. Dyrager, K. Börjesson, P. Dinér, A. Elf, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, M. Grøtli, Synthesis and photophysical characterisation of fluorescent 8-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)adenosine derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* 10 (2009) 1515–1521.
124. N. Brown, Bioisosteres and scaffold hopping in medicinal chemistry. *Mol. Inform.* 33(2014) 458–462.
125. J. R. Brown, How I treat CLL patients with ibrutinib. *Blood*.131 (2018) 379–386.
126. L. Shelledy, D. Roman, Vemurafenib: first-in-class BRAF-mutated inhibitor for the treatment of unresectable or metastatic melanoma. *J. Adv. Pract. Oncol.* 6 (2015) 361–365
127. M. K. Bollinger, A. S. Agnew, G. P. Mascara, Osimertinib: A third-generation tyrosine kinase inhibitor for treatment of epidermal growth factor receptor-mutated non-small cell lung cancer with the acquired Thr790Met mutation. *J. Oncol. Pharm. Pract.* (2017) p.1078155217712401.
128. L. J. Lombardo, F. Y. Lee, P. Chen, D. Norris, J. C. Barrish, K. Behnia, S. Castaneda, L. A. Cornelius, J. Das, A. M. Doweiko, C. Fairchild, Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J. Med. Chem.* 47 (2004) 6658–6661.
129. G. Sonpavde, T.E. Hutson, Pazopanib: A novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor, *Curr. Oncol. Rep.* 9 (2007) 115–119.
130. A. Petrelli, G. Valabrega, Multitarget drugs: the present and the future of cancer therapy, *Expert Opin. Pharmacother.* 10 (2009) 589–600.
131. L. M. De Coen, T. S. A. Heugebaert, D. Garcia, C. V. Stevens, Synthetic entries to and biological activity of pyrrolopyrimidines, *Chem. Rev.* 116 (2016) 80–139.
132. P. Perlíková, M. Hocek, Pyrrolo [2,3-d] pyrimidine (7-deazapurine) as a privileged scaffold in design of antitumor and antiviral nucleosides. *Med. Res. Rev.* (2017) 1–32.

133. P. Naus, O. Caletkova, P. Konecny, P. Dzubak, K. Bogdanova, M. Kolar, J. Vrbkova, L. Slavetinska, E. Tloustova, P. Perlikova, M. Hajduch, Synthesis, cytostatic, antimicrobial, and anti-HCV activity of 6-substituted 7-(Het) aryl-7-deazapurine ribonucleosides. *J. Med. Chem.* 57 (2014) 1097–1110.
134. M. S. Mohamed, R. Kamel, S. S. Fatahala, Synthesis and biological evaluation of some thio containing pyrrolo [2,3-d] pyrimidine derivatives for their anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Eur. J. Med. Chem.* 45(2010) 2994–3004.
135. Y. Liu, Y. Yin, Z. Zhang, C. J. Li, H. Zhang, D. Zhang, C. Jiang, K. Nomie, L. Zhang, M. L. Wang, G. Zhao, Structural optimization elaborates novel potent Akt inhibitors with promising anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* 138 (2017) 543–551.
136. F. Musumeci, M. Sanna, G. Grossi, C. Brullo, A. L. Fallacara, S. Schenone, Pyrrolo [2,3-d] pyrimidines as kinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 2059–2085.
137. Y. Li, Q. Guo, C. Zhang, Z. Huang, T. Wang, X. Wang, X. Wang, G. Xu, Y. Liu, S. Yang, Y. Fan, Discovery of a highly potent, selective and novel CDK9 inhibitor as an anticancer drug candidate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 3231–3237.
138. J. S. Pudlo, M. R. Nassiri, E. R. Kern, L. L. Wotring, J. C. Drach, L. B. Townsend, Synthesis, antiproliferative, and antiviral activity of certain 4-substituted and 4,5-disubstituted 7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]pyrrolo[2,3-d]pyrimidines. *J. Med. Chem.* 33 (1990) 1984–1992.
139. M. Gehringer, M. Forster, S. A. Laufer, Solution-Phase Parallel Synthesis of Ruxolitinib-Derived Janus Kinase Inhibitors via Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition, *ACS Comb. Sci.* 17 (2015) 5–10.
140. J. Catalan, R. M. Claramunt, J. Elguero, J. Laynez, M. Menendez, F. Anvia, J. H. Quian, M. Taagepera, R. W. Taft, Basicity and acidity of azoles: the annelation effect in azoles. *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 4105–4111.
141. Y. Bansal, O. Silakari, The therapeutic journey of benzimidazoles: a review. *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 6208–6236.
142. R. S. Keri, A. Hiremathad, S. Budagumpi, B. M. Nagaraja, Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole-Based Medicinal Chemistry. *Chem. Biol. Drug Des.* 86 (2015) 19–65.
143. W. Akhtar, M. F. Khan, G. Verma, M. Shaquiquzzaman, M. A. Rizvi, S. H. Mehdi, M. Akhter, M. M. Alam, Therapeutic evolution of benzimidazole derivatives in the last quinquennial period. *Eur. J. Med. Chem.* 126 (2017) 705–753.

144. G. Yadav, S. Ganguly, Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. *Eur. J. Med. Chem.* 97 (2015) 419–443.
145. M. Munde, M. Lee, S. Neidle, R. Arafa, D. W. Boykin, Y. Liu, C. Bailly, W. D. Wilson, Induced fit conformational changes of a “reversed amidine” heterocycle: optimized interactions in a DNA minor groove complex. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 5688–5698.
146. L. Garuti, M. Roberti, G. Bottegoni, Benzimidazole derivatives as kinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 2284–2298.
147. P. Singla, V. Luxami, K. Paul, Benzimidazole-biologically attractive scaffold for protein kinase inhibitors. *RSC Adv.* 4 (2014) 12422–12440.
148. Y. A. Sonawane, M. A. Taylor, J. V. Napoleon, S. Rana, J. I. Contreras, A. Natarajan, Cyclin Dependent Kinase 9 Inhibitors for Cancer Therapy: Miniperspective. *J. Med. Chem.* 59 (2016) 8667–8684.
149. R. L. Coleman, M. W. Sill, K. Bell-McGuinn, C. Aghajanian, H. J. Gray, K. S. Tewari, S. C. Rubin, T. J. Rutherford, J. K. Chan, A. Chen, E. M. Swisher, A phase II evaluation of the potent, highly selective PARP inhibitor veliparib in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer in patients who carry a germline BRCA1 or BRCA2 mutation—an NRG oncology/gynecologic oncology group study. *Gynecol. Oncol.* 137 (2015) 386–391.
150. B. B. Hasinoff, X. Wu, J. L. Nitiss, R. Kanagasabai, J.C. Yalowich, The anticancer multi-kinase inhibitor dovitinib also targets topoisomerase I and topoisomerase II. *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 1617–1626.
151. B. Tolner, J. A. Hartley, D. Hochhauser, Transcriptional regulation of topoisomerase II α at confluence and pharmacological modulation of expression by bis-benzimidazole drugs. *Mol. Pharmacol.* 59 (2001) 699–706.
152. M. Singh, V. Tandon, Synthesis and biological activity of novel inhibitors of topoisomerase I: 2-Aryl- substituted 2-bis-1*H*-benzimidazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 659–669.
153. V. F. Roche, Improving pharmacy students' understanding and long-term retention of acid-base chemistry. *Am. J. Pharm. Edu.* 71 (2007) 122.
154. G. W. Clayden, *Organic chemistry*, Oxford university press, 2001, str. 202.

155. S. Bhattacharya, P. Chaudhuri, Medical implications of benzimidazole derivatives as drugs designed for targeting DNA and DNA associated processes. *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 1762–1777.
156. R. R. Tidwell, D. W. Boykin, Dicationic DNA Minor Groove Binders as Antimicrobial Agents, u: M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson (eds.), *DNA and RNA Binders: From Small Molecules to Drugs*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, str. 414–460.
157. G. Qiu, J. Jiang, X. S. Liu, Pentamidine sensitizes chronic myelogenous leukemia K562 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Leuk. Res.* 36 (2012) 1417–1421.
158. R. A. Abou-Elkhair, A. E. Hassan, D. W. Boykin, W. D. Wilson, Lithium hexamethyldisilazane transformation of transiently protected 4-aza/benzimidazole nitriles to amidines and their dimethyl sulfoxide mediated imidazole ring formation. *Org. Lett.* 18 (2016) 4714–4717.
159. M. Cindrić, S. Jambon, A. Harej, S. Depauw, M. H. David-Cordonnier, S. K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, M. Hranjec, Novel amidino substituted benzimidazole and benzothiazole benzo[b]thieno-2-carboxamides exert strong antiproliferative and DNA binding properties. *Eur. J. Med. Chem.* 136 (2017) 468–479.
160. C. Karaaslan, F. Bakar, H. Goker, Antiproliferative activity of synthesized some new benzimidazole carboxamidines against MCF-7 breast carcinoma cells. *Z. Naturforsch. C.* 73 (2017) 137–145.
161. A. A. Farahat, C. Bennett-Vaughn, E. M. Mineva, A. Kumar, T. Wenzler, R. Brun, Y. Liu, W. D. Wilson, D. W. Boykin, Synthesis, DNA binding and antitrypanosomal activity of benzimidazole analogues of DAPI. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 5907–5910.
162. A. A. Farahat, M. A. Ismail, A. Kumar, T. Wenzler, R. Brun, A. Paul, W. D. Wilson, D. W. Boykin, Indole and Benzimidazole Bichalcophenes: Synthesis, DNA Binding and Antiparasitic Activity. *Eur. J. Med. Chem.* 143 (2018) 1590–1596.
163. S. T. Nguyen, J. D. Williams, M. M. Butler, X. Ding, D. M. Mills, T. F. Tashjian, R. G. Panchal, S. K. Weir, C. Moon, H. O. Kim, J. A. Marsden, Synthesis and antibacterial evaluation of new, unsymmetrical triaryl bisamidine compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 3366–3372.
164. L. Hu, M. L. Kully, D. W. Boykin, N. Abood, Optimization of the central linker of dicationic bis-benzimidazole anti-MRSA and anti-VRE agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 3374–3377.

165. B. G. Youssif, Y. A. Mohamed, M. T. Salim, F. Inagaki, C. Mukai, H. H. Abdu-Allah, Synthesis of some benzimidazole derivatives endowed with 1, 2, 3-triazole as potential inhibitors of hepatitis C virus. *Acta Pharm.* 66 (2016), 219–231.
166. I. I. Sahay, P. S. Ghalsasi, Synthesis of new 1,2,3-triazole linked benzimidazole molecules as anti-proliferative agents. *Synth. Commun.* 47 (2017) 825–834.
167. K. J. Harkala, L. Eppakayala, T. C. Maringanti, Synthesis and biological evaluation of benzimidazole-linked 1,2,3-triazole congeners as agents. *Org. Med. Chem. Lett.* 4 (2014) 14.
168. Y. Kumar, V. Bahadur, A. K. Singh, V. S. Parmar, E. V. Van der Eycken, B. K. Singh, Microwave-assisted Cu(I)-catalyzed, three-component synthesis of 2-(4-((1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-1H-benzo[d]imidazoles. *Beilstein J. Org. Chem.* 10 (2014) 1413–1420.
169. A. Ouahrouch, H. Ighachane, M. Taourirte, J. W. Engels, M. H. Sedra, H. B. Lazrek, Benzimidazole-1,2,3-triazole Hybrid Molecules: Synthesis and Evaluation for Antibacterial/Antifungal Activity. *Arch. Pharm.* 347 (2014) 748–755.
170. N. Ranjan, S. Story, G. Fulcrand, F. Leng, M. Ahmad, A. King, S. Sur, W. Wang, Y. C. Tse-Dinh, D. P. Arya, Selective Inhibition of Escherichia coli RNA and DNA Topoisomerase I by Hoechst 33258 Derived Mono-and Bisbenzimidazoles. *J. Med. Chem.* 60 (2017) 4904–4922.
171. N. Ranjan, S. Kumar, D. Watkins, D. Wang, D. H. Appella, D. P. Arya, Recognition of HIV-TAR RNA using neomycin–benzimidazole conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 5689–5693.
172. S. Nahar, N. Ranjan, A. Ray, D. P. Arya, S. Maiti, Potent inhibition of miR-27a by neomycin–bisbenzimidazole conjugates. *Chem. Sci.* 6 (2015) 5837–5846.
173. T. G. Kraljević, A. Harej, M. Sedić, S. K. Pavelić, V. Stepanić, D. Drenjančević, J. Talapko, S. Raić-Malić, Synthesis, in vitro anticancer and antibacterial activities and in silico studies of new 4-substituted 1, 2, 3-triazole–coumarin hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* 124 (2016) 794–808.
174. C. P. Kaushik, K. Kumar, D. Singh, D. Kumar Jindal, R. Luxmi, Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Potential of Some 1,4-Disubstituted 1,2,3-Bistriazoles. *Synth. Comm.* 45 (2015) 1977–1985.
175. C. Gill, G. Jadhav, M. Shaikh, R. Kale, A. Ghawalkar, D. Nagargoje, M. Shiradkar, Clubbed[12,3]triazoles by fluorine benzimidazole: A novel approach to H37Rv inhibitors as potential treatment for tuberculosis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008)

6244–6247.

176. D. Ramsbeck, M. Buchholz, B. Koch, L. Böhme, T. Hoffmann, H. U. Demut, U. Heiser, Structure-Activity-Relationships of Benzimidazole-based Glutaminyl Cyclase Inhibitors Featuring a Heteroaryl-scaffold, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 6613–6625 .
177. A. Bistrović, P. Grbčić, A. Harej, M. Sedić, S. Kraljević-Pavelić, S. Koštrun, J. Plavec, D. Makuc, S. Raić-Malić, Small molecule purine and pseudopurine derivatives: synthesis, cytostatic evaluations and investigation of growth inhibitory effect in non-small cell lung cancer A549. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 33 (2019) 271–285.
178. T. Gregorić, M. Sedić, P. Grbčić, A. T. Paravić, S. K. Pavelić, M. Cetina, R. Vianello, S. Raić-Malić, Novel pyrimidine-2, 4-dione-1, 2, 3-triazole and furo [2, 3-d] pyrimidine-2-one-1,2,3-triazole hybrids as potential anti-cancer agents: Synthesis, computational and X-ray analysis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 125 (2017) 1247–1267.
179. S. Maračić, T. G. Kraljević, H. Č. Paljetak, M. Perić, M. Matijašić, D. Verbanac, M. Cetina, S. Raić-Malić, 1,2,3-Triazole pharmacophore-based benzofused nitrogen/sulfur heterocycles with potential anti-Moraxella catarrhalis activity. *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 7448–7463.
180. D. A. Filimonov, V. V. Poroikov, Probabilistic approaches in activity prediction. In: Varnek A, Tropsha A, eds. *Chemoinformatics approaches to virtual screening*. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2008, str. 182–216.
181. X. He, M. J. Hannocks, I. Hampson, G. Brunner, GPI-specific phospholipase D mRNA expression in tumor cells of different malignancy. *Clin. Exp. Metastasis.* 19 (2002) 291–299.
182. A. Bistrović, A. Harej, P. Grbčić, M. Sedić, S. Kraljević Pavelić, M. Cetina, S. Raić-Malić, Synthesis and Anti-Proliferative Effects of Mono-and Bis-Purinomimetics Targeting Kinases. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) e2292.
183. M. K. Lakshman, M. K. Singh, D. Parrish, R. Balachandran, D. W. Day, Azide–Tetrazole Equilibrium of C-6 Azidopurine Nucleosides and Their Ligation Reactions with Alkynes. *J. Org. Chem.* 75 (2010) 2461–2473.
184. H. Peng, K. H. Dornevil, A. B. Draganov, W. Chen, C. Dai, W. H. Nelson, A. Liu, B. Wang, An unexpected copper catalyzed ‘reduction’ of an arylazide to amine through the formation of a nitrene intermediate. *Tetrahedron.* 69 (2013) 5079–5085.
185. K. Komodziński, J. Lepczyńska, Z. Gdaniec, L. Bartolotti, B. Delley, S. Franzen, B. Skalski, Photochemistry of 6-amino-2-azido, 2-amino-6-azido and 2, 6-diazido

- analogues of purine ribonucleosides in aqueous solutions. *Photochem. Photobiol. Sci.* 13 (2014) 563–573.
186. A. Bistrović, L. Krstulović, A. Harej, P. Grbčić, M. Sedić, S. Koštrun, S. K. Pavelić, M. Bajić, S. Raić-Malić, Design, synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole amidines as potent multi-target inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *Eur. J. Med. Chem.* 143 (2018) 1616–1634.
187. A. Bistrović, L. Krstulović, I. Stolić, D. Drenjačević, J. Talapko, M. C. Taylor, J. M. Kelly, M. Bajić, S. Raić-Malić, Synthesis, anti-bacterial and anti-protozoal activities of amidinobenzimidazole derivatives and their interactions with DNA and RNA, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* (2018), u postupku objavljivanja.
188. M. Hranjec, K. Starcevic, B. Zamola, S. Mutak, M. Derek, G. Karminski-Zamola, New amidino-benzimidazolyl derivatives of tylosin and desmycosin. *J. Antibiot.* 55 (2002) 308–314.
189. K. Omura, D. Swern, Oxidation of alcohols by “activated” dimethyl sulfoxide. A preparative, steric and mechanistic study. *Tetrahedron* 34 (1978) 1651–1660.
190. S. E. López, J. Restrepo, B. Pérez, S. Ortiz, J. Salazar, One Pot Microwave Promoted Synthesis of 2-Aryl-1*H*-Benzimidazoles Using Sodium Hydrogen Sulfite. *Bull. Korean Chem. Soc.* 30 (2009) 1628–1630.
191. C. M. Whitehead, K. A. Earle, J. Fetter, S. Xu, T. Hartman, D. C. Chan, T. L. Zhao, G. Piazza, A. J. Klein-Szanto, R. Pamukcu, H. Alila, Exisulind-induced apoptosis in a non-small cell lung cancer orthotopic lung tumor model augments docetaxel treatment and contributes to increased survival. *Mol. Cancer Ther.* 2 (2003) 479–488.
192. A. Bagashev, S. Fan, R. Mukerjee, P. Paolo Claudio, T. Chabrashvili, R. P. Leng, S. Benchimol, B. E. Sawaya, Cdk9 phosphorylates Pirh2 protein and prevents degradation of p53 protein. *Cell Cycle*, 12 (2013) 1569–1577.
193. C. M. Choi, S. J. Jang, S. Y. Park, Y. B. Choi, J. H. Jeong, D. S. Kim, H. K. Kim, K. S. Park, B. H. Nam, H. R., Kim, S. Y. Kim, Transglutaminase 2 as an independent prognostic marker for survival of patients with non-adenocarcinoma subtype of non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* 10 (2011) 119.
194. M. M. Adada, K. A. Orr-Gandy, A. J. Snider, D. Canals, Y. A. Hannun, L. M. Obeid, C. J. Clarke, Sphingosine kinase 1 regulates tumor necrosis factor-mediated RANTES induction through p38 mitogen-activated protein kinase but independently of nuclear factor κ B activation. *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 27667–27679.

195. R. Sanchez-Prieto, J. M. Rojas, Y. Taya, J. S. Gutkind, A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 60 (2000) 2464–2472.
196. P. O'Sullivan, I. Rozas, Understanding the Guanidine-Like Cationic Moiety for Optimal Binding into the DNA Minor Groove. *Chem. Med. Chem.* 9 (2014) 2065–2073.
197. P. S. Nagle, S. J. Quinn, J. M. Kelly, D. H. O'Donovan, A. R. Khan, F. Rodriguez, B. Nguyen, W. D. Wilson, I. Rozas, Understanding the DNA binding of novel non-symmetrical guanidinium/2-aminoimidazolium derivatives. *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 5558–5567.
198. D. Havrylyuk, B. Zimenkovsky, O. Karpenko, P. Grellier, R. Lesyk, Synthesis of pyrazoline–thiazolidinone hybrids with trypanocidal activity. *Eur. J. Med. Chem.* 85 (2014) 245–254.
199. C. A. Lipinski, F. Lombardo, D. W. Dominy, P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug D reviews*, 46 (2001) 3–26.
200. D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623.
201. R. Guha, T. S. Dexheimer, A. N. Kestranek, A. Jadhav, A. M. Chervenak, M. G. Ford, A. Simeonov, G. P. Roth, C. J. Thomas, Exploratory analysis of kinetic solubility measurements of a small molecule library. *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 4127–4134.
202. R. Yan, K. Sander, E. Galante, V. Rajkumar, A. Badar, M. Robson, E. El-Emir, M. F. Lythgoe, R. B. Pedley, E. Årstad, A one-pot three-component radiochemical reaction for rapid assembly of ¹²⁵I-labeled molecular probes. *Journal of the American Chemical Society*, 135 (2013) 703–709.
203. E. Galante, B. W. Schoultz, M. Koeppe, E. Årstad, Chelator-accelerated one-pot 'click' labeling of small molecule tracers with 2-[¹⁸F] fluoroethyl azide. *Molecules.* 18 (2013) 5335–5347.
204. W. E. Lindsell, C. Murray, P. N. Preston, T. A. Woodman, Synthesis of 1, 3-diynes in the purine, pyrimidine, 1, 3, 5-triazine and acridine series. *Tetrahedron.* 56 (2000) 1233–1245.
205. Y. Dürüst Y, A. Sağrılı, B. M. Kariuki, D. W. Knight, [1,3]-Dipolar cycloaddition of N-aryl sydnones to benzothiophene 1,1-dioxide, 1-cyclopropylprop-2-yn-1-ol and 1-(prop-2-ynyl)-1H-indole. *Tetrahedron.* 70 (2014) 6012–6019.

206. Y. C. Duan, Y. C. Ma, E. Zhang, X. J. Shi, M. M. Wang, X. W. Ye, H. M. Liu, Design and synthesis of novel 1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 62 (2013) 11–19.
207. A. Anand, R. J. Naik, H. M. Revankar, M. V. Kulkarni, S. R. Dixit, S. D. Joshi, A click chemistry approach for the synthesis of mono and bis aryloxy linked coumarinyl triazoles as anti-tubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* 105 (2015) 194–207.
208. Q. Li, K. Han, J. Li, X. Jia, C. Li, Synthesis of dendrimer-functionalized pillar[5]arenes and their self-assembly to dimeric and trimeric complexes. *Tetrahedron Lett.* 56 (2015) 3826–3829.
209. L. K. Huang, Y. C. Cherng, Y. R. Cheng, J. P. Jang, Y. L. Chao, Y. J. Cherng, An efficient synthesis of substituted cytosines and purines under focused microwave irradiation. *Tetrahedron.* 63 (2007) 5323–5327.
210. G. R. Qu, L. Zhao, D. C. Wang, J. Wu, H. M. Guo, Microwave-promoted efficient synthesis of C6-cyclo secondary amine substituted purine analogues in neat water. *Green Chem.* 10 (2008) 287–289.
211. B. Roy, S. Dutta, A. Chowdhary, A. Basak, S. Dasgupta, Design, synthesis and RNase A inhibition activity of catechin and epicatechin and nucleobase chimeric molecules. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 5411–5414.
212. N. T. Chandrika, S. K. Shrestha, H. X. Ngo, S. Garneau-Tsodikova, Synthesis and investigation of novel benzimidazole derivatives as antifungal agents, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 3680–3686.
213. R. Kumar, J. Arora, A. K. Prasad, N. Islam, A. K. Verma, Synthesis and antimicrobial activity of pyrimidine chalcones. *Med. Chem. Res.* 22 (2013) 5624–5631.
214. P. V. Chavan, K. S. Pandit, U. V. Desai, M. A. Kulkarni, P. P. Wadgaonkar, Cellulose supported cuprous iodide nanoparticles (Cell-CuI NPs): a new heterogeneous and recyclable catalyst for the one pot synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles in water. *RSC Adv.* 4 (2014) 42137–42146.
215. M. Hu, J. Li, S. Q. Yao, In situ “click” assembly of small molecule matrix metalloprotease inhibitors containing zinc-chelating groups. *Org. Lett.* 10 (2008) 5529–5531.
216. K. Barral, A. D. Moorhouse, J. E. Moses, Efficient conversion of aromatic amines into azides: a one-pot synthesis of triazole linkages. *Org. Lett.* 9 (2007) 1809–1811.
217. N. R. Glover, G. C. MacDonald, J. Entwistle, J. Cizeau, D. G. Bosc, F. C. Chahal, Viventia Bio Inc. 2015. Tumor specific antibody. U.S. Patent Application

218. M. Saeedi, M. Safavi, E. Karimpour-Razkenari, M. Mahdavi, N. Edraki, F. H. Moghadam, M. Khanavi, T. Akbarzadeh, Synthesis of novel chromenones linked to 1,2,3-triazole ring system: Investigation of biological activities against Alzheimer's disease. *Bioorg. Chem.* 70 (2017) 86–93.
219. C. Xiao, Y. Cheng, Y., Zhang, J. Ding, C. He, X. Zhuang, X. Chen, Side chain impacts on pH-and thermo-responsiveness of tertiary amine functionalized polypeptides. *J. Polym. Sci. A* 52 (2014) 671–679.
220. Oxford Diffraction, Xcalibur CCD System, CrysAlisPro, Agilent Technologies, Abingdon, England, 2015.
221. M. C. Burla, R. Caliandro, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Casciarano, L. De Caro, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, SIR2004: an improved tool for crystal structure determination and refinement. *J. Appl. Crystallogr.* 38 (2005) 381–388.
222. G. M. Sheldrick, Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr.* C71 (2015) 3–8.
223. L. J. Farrugia, WinGX and ORTEP for Windows: an update. *J. Appl. Crystallogr.* 45 (2012) 45, 849–854.
224. A. L. Spek, Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 65 (2009) 148–155.
225. C. F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P. A. Wood, Mercury CSD 2.0–new features for the visualization and investigation of crystal structures. *J. Appl. Crystallogr.* 41(2008) 466–470.
226. T. Gazivoda, S. Raić-Malić, V. Krištafor, D. Makuc, J. Plavec, S. Kraljević-Pavelić, K. Pavelić, L. Naesens, G. Andrei, R. Snoeck, J. Balzarini, M. Mintas, Synthesis, cytostatic and anti-HIV evaluations of the new unsaturated acyclic C-5 pyrimidine nucleoside analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 5624–5634.
227. Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M7-A7, Wayne, PA, 2006.
228. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S17, Wayne, PA, 2007.
229. R. J. Harbeck, Y. S. McCarter, J. H. Ortez, I. D. Rankin, R. L. Sautter, S. E. Sharp, C.A. Spiegel, Manual of antimicrobial susceptibility testing, American Society for Microbiology, Washington, 2005.

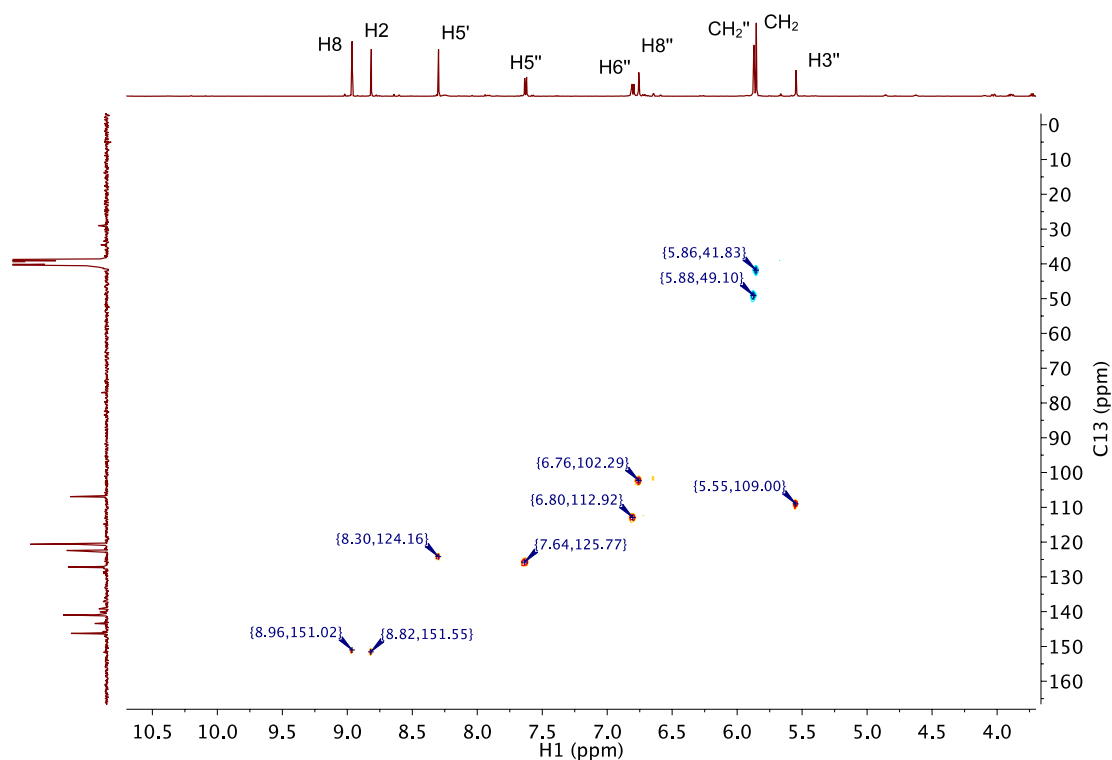
230. M. C. Taylor, M. D. Lewis, A. Fortes Francisco, S. R. Wilkinson, J. M. Kelly, The *Trypanosoma cruzi* vitamin C dependent peroxidase confers protection against oxidative stress but is not a determinant of virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (4) (2015) e0003707.
231. I. Stolić, K. Mišković, A. Magdaleno, A. Mariano Silber, I. Piantanida, M. Bajić, L. Glavaš-Obrovac, Effect of 3,4-ethylenedioxy-extension of thiophene core on the DNA/RNA binding properties and biological activity of bisbenzimidazole amidines. *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 2544–54.
232. G. Scatchard, The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51 (1949) 660–672.
233. J. D. McGhee, P. H. von Hippel, Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 469–489. Erratum: McGhee, J. D.; von Hippel, P. H. *J. Mol. Biol.* 1976, 103, 679.
234. RSC PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>, 2017 (pristup 31.03.17)
235. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235–242.
236. J. Duan, S. L. Dixon, J. F. Lowrie, W. Sherman, Analysis and comparison of 2D fingerprints: insights into database screening performance using eight fingerprint methods. *J. Mol. Graph. Model.* 29 (2010) 157–170.
237. M. Sastry, J. F. Lowrie, S. L. Dixon, W. Sherman, Large-scale systematic analysis of 2D fingerprint methods and parameters to improve virtual screening enrichments. *J. Chem. Inf. Model.* 50 (2010) 771–784.
238. X. Chen, Y. Lin, M. K. Gilson, The binding database: overview and user's guide. *Biopolymers*, 61 (2001) 127–141.
239. Torch, version 10.4.1., Cresset, Litlington, Cambridgeshire, UK, <http://www.cresset-group.com/torch/>
240. R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein–ligand complexes. *J. Med. Chem.* 49 (2006), 6177–6196.

241. T. A. Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner, H. S. Beard, L. L. Frye, W. T. Pollard, J. L. Banks, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1750–1759.
242. R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1739–1749.
243. Schrödinger Release 2017-1: MacroModel, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
244. J. Li, R. Abel, K. Zhu, Y. Cao, S. Zhao, R. A. Friesner, The VSGB 2.0 model: a next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins* 79 (2011) 2794–2812.
245. W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 11225–11236.
246. D. Shivakumar, J. Williams, Y. Wu, W. Damm, J. Shelley, W. Sherman, Prediction of absolute solvation free energies using molecular dynamics free energy perturbation and the OPLS force field. *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010) 1509–1519.

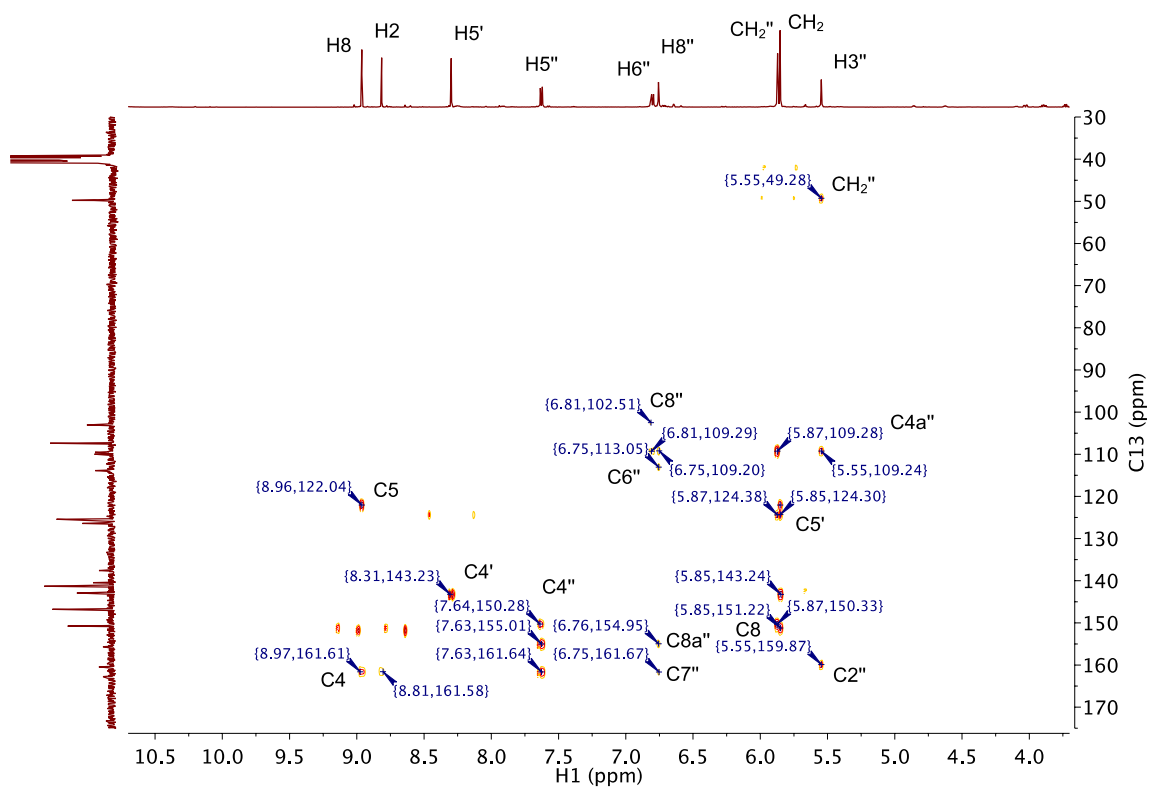
7. Prilozi

Prilog 1. 2D NMR spektri spoja 14

a)

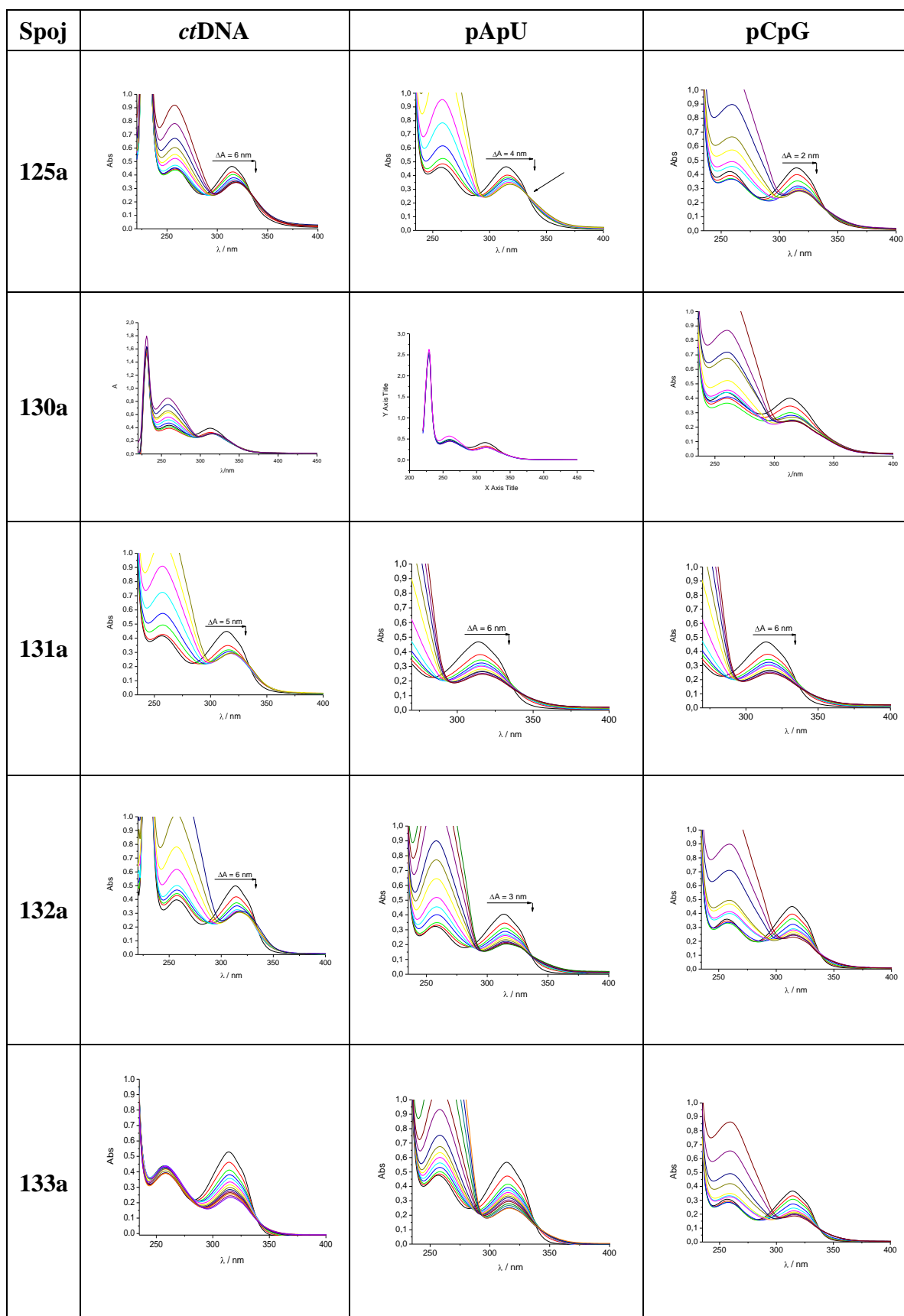


b)

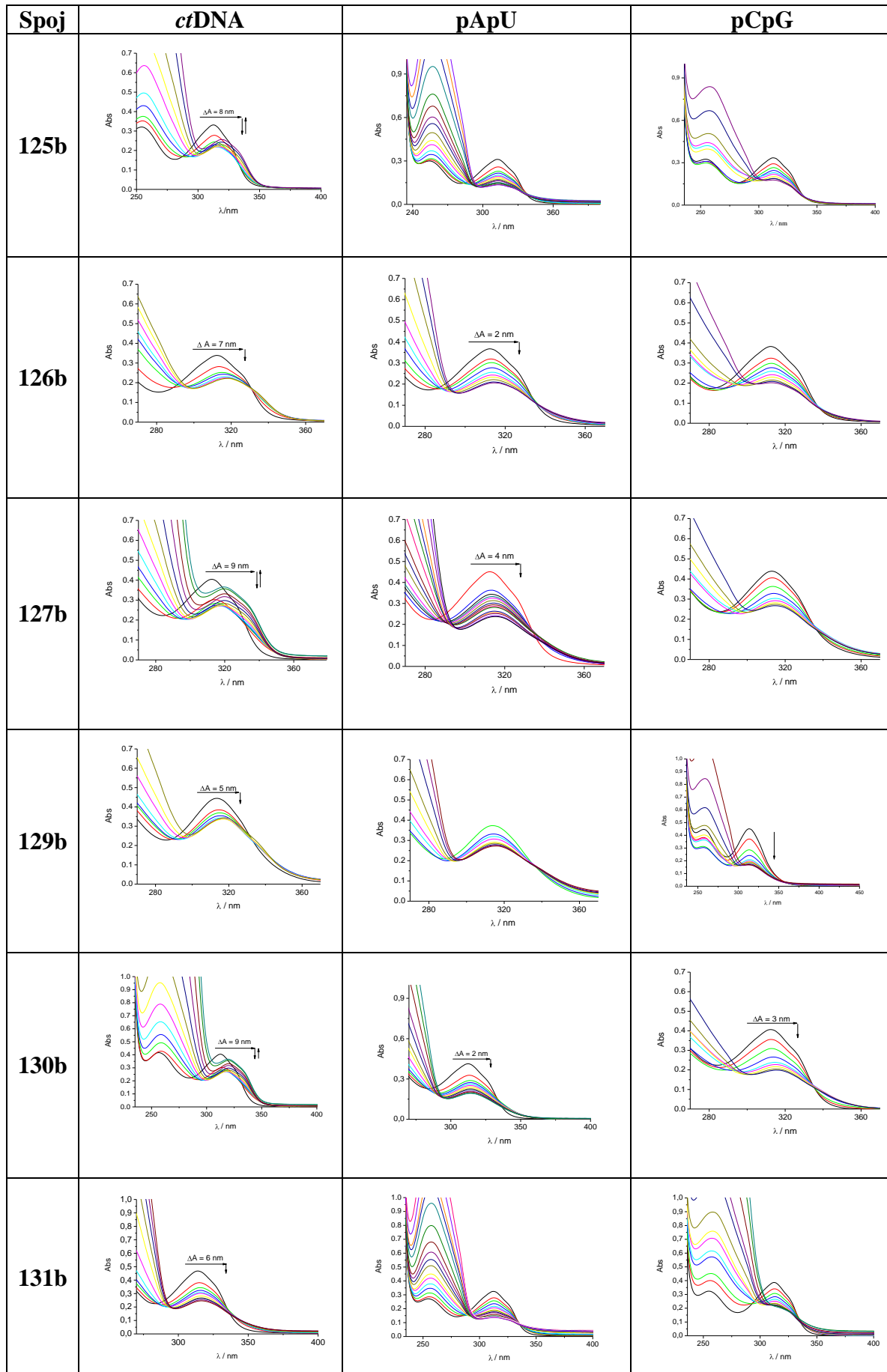
Slika p-1. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (a) i ^1H - ^{13}C HMBC NMR (b) spektri spoja 14.

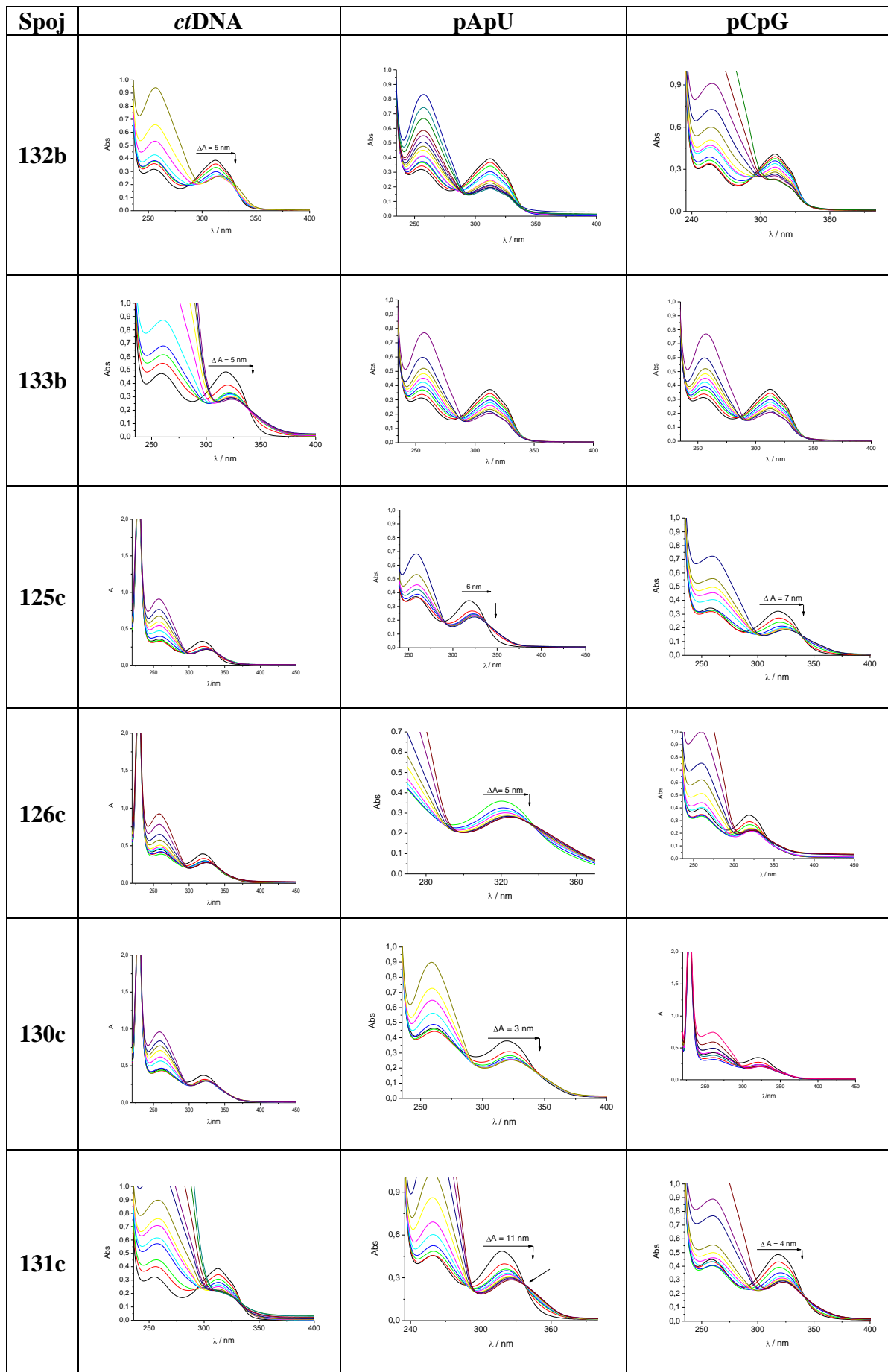
Prilog 3. Ispitivanje interakcija s polinukleotidima

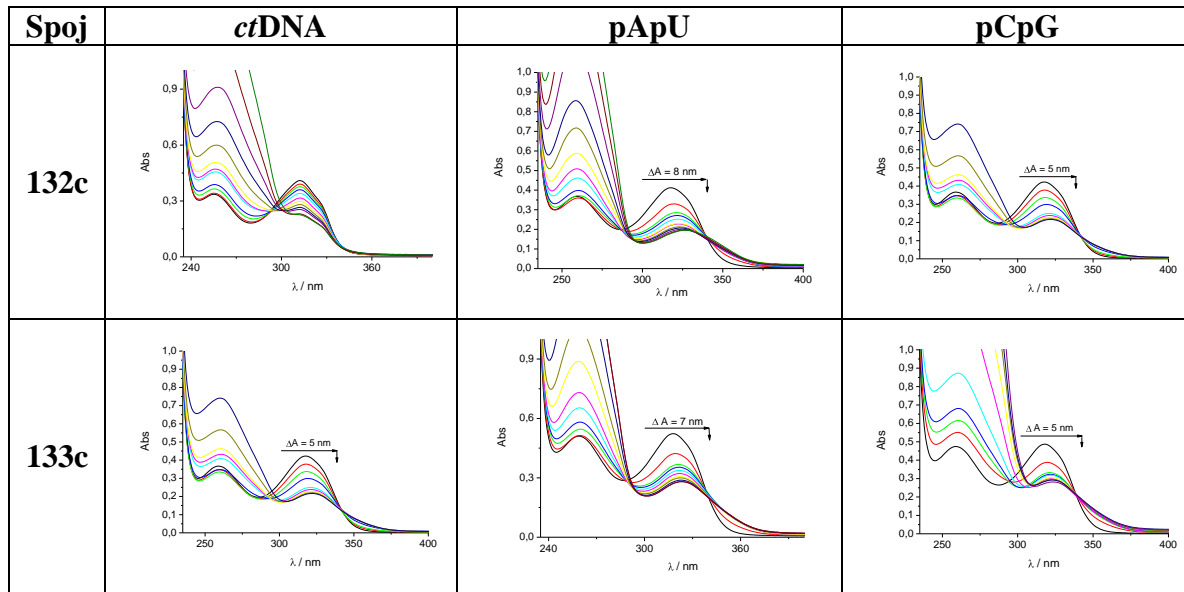
Slika p-3. UV/Vis spektri titracija ispitivanih spojeva s polinukleotidima



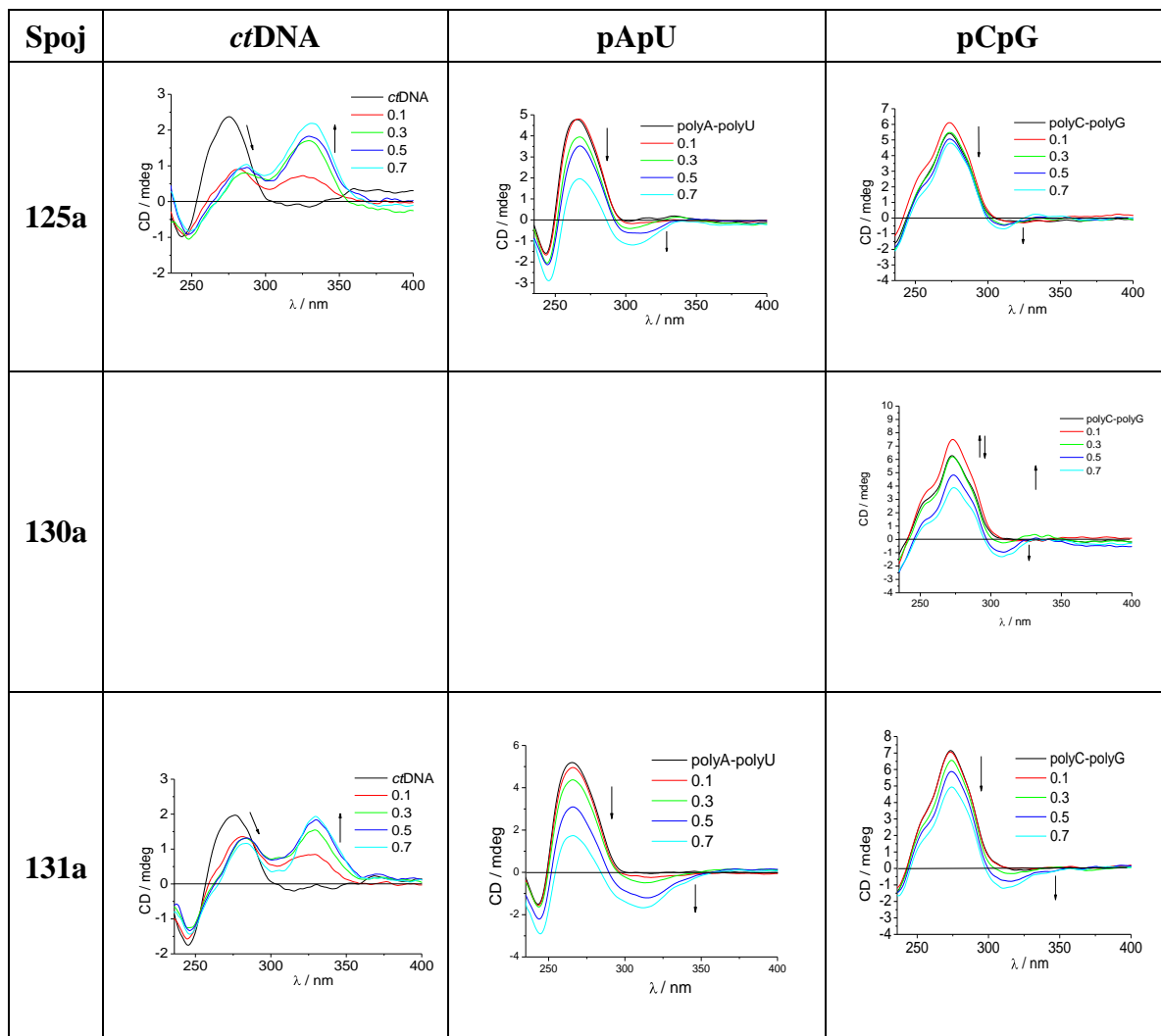
7. PRILOZI







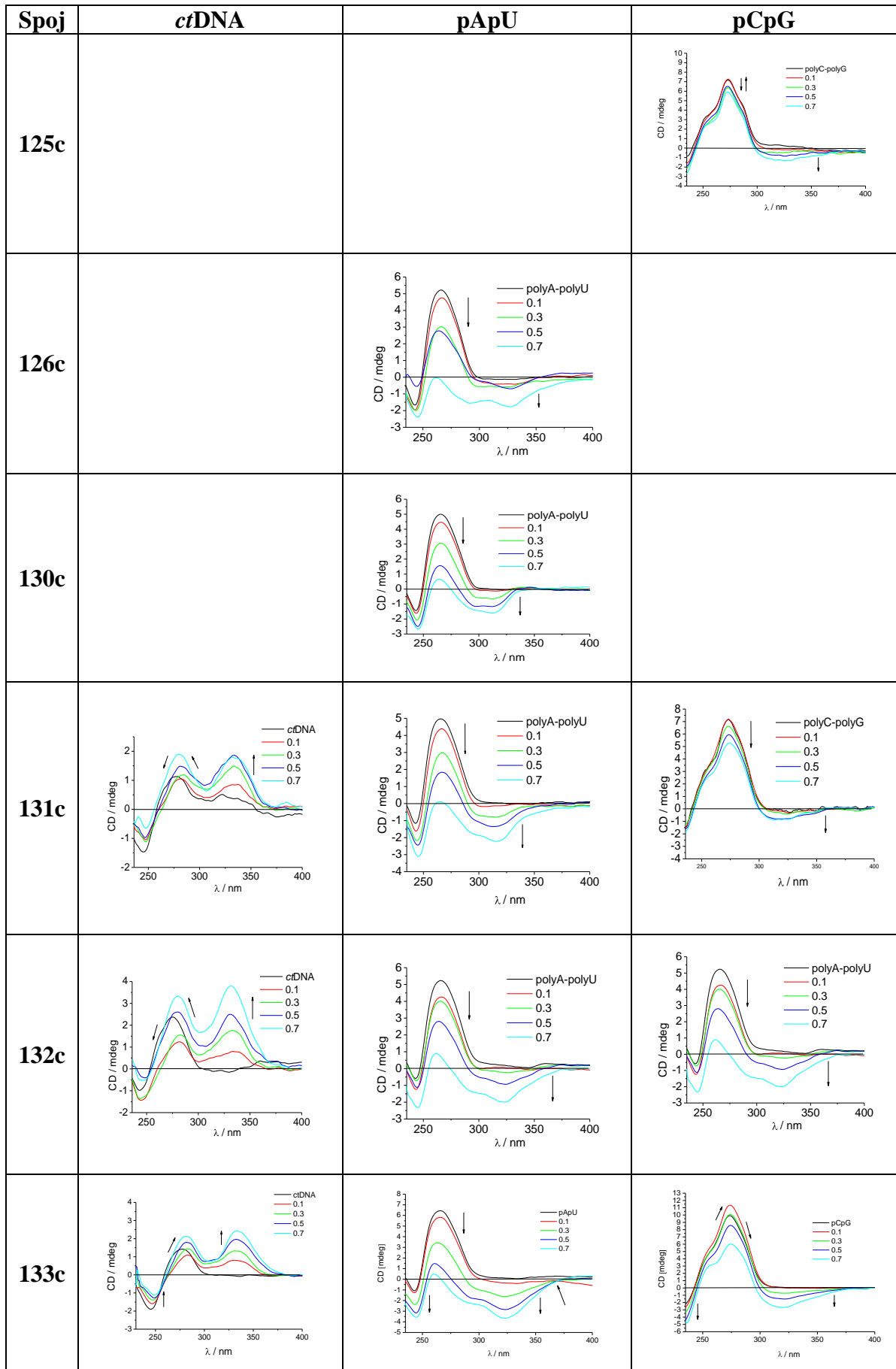
Slika p-4. CD titracije polinukleotida s ispitivanim spojevima



Spoj	<i>ctDNA</i>	pApU	pCpG
132a			
133a			
125b			
126b			
127b			

7. PRILOZI

Spoj	<i>ct</i> DNA	pApU	pCpG
129b			
130b			
131b			
132b			
133b			



Oznake i kratice

AChE	acetilkolin-esteraza
AcCoA	acetyl-koenzim A
ADMET	apropcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost
AR	adenozinski receptor
Asp	asparaginska kiselina
AST	aril-sulfon-transferaza
ATP	adenozin-trifosfat
BTK	Burton-tirozin-kinaza
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat
CD	cirkularni dikroizam
CDK	kinaza ovisna o ciklinu
c-di-GMP	ciklički di-gvanozin-monofosfat
cGMP	ciklički gvanozin-monofosfat
CLK	CDC-slične kinaze
CK	kasein-kinaza
CMV	citomegalovirus
CuAAC	azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom
CYP	citokrom P450
DFG	Asp-Phe-Gly aminokiselinski motiv u veznom mjestu ATP-a
<i>DFG-in</i>	aktivna konformacija protein-kinaze
<i>DFG-out</i>	ne-aktivna konformacija protein-kinaze
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
<i>ctDNA</i>	deoksiribonukleinska kiselina izolirana iz timusa teleta
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta
ekv.	ekvivalenta
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalima
Et ₃ N	triethylamin
EtOH	etanol
ESBL	rezistentnost na β -laktamske antibiotike

OZNAKE I KRATICE

FAD	flavin-adenin-dinukleotid
Glu	glutaminska kiselina
Gly	glicin
GSK	glikogen-sintaza
GTP	gvanozin-trifosfat
GPLD1	glikozil-fosfatidil-inozitol specifična fosfolipaza D1
HMBC	eng. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOAc	octena kiselina
HOMO	najviša popunjena molekulska orbitala
HSP	protein toplinskog šoka
HSQC	eng. <i>heteronuclear single quantum correlation</i>
HSV	herpes simpleks virus
IC ₅₀	koncentracija koja uzrokuje 50 % inhibiciju rasta stanica
IC ₉₀	koncentracija koja uzrokuje 90 % inhibiciju rasta stanica
IGFR	receptor faktora rasta sličan inzulinu
IPK	inozitol-fosfat-kinaza
JAK	Janus-kinaza
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
log D	distribucijski koeficijent
log P	particijski koeficijent
LUMO	najniža ne popunjena molekulska orbitala
MAAC	azid-alkin cikloadicija katalizirana metalima
MAO	monoamino-oksidaza
MAPK	kinaza aktivirana mitogenom
MCR	mutikomponentna reakcija
MEK	MAPK kinaza
MeOH	metanol
Met	metionin
MM-GBSA	eng. <i>molecular mechanics generalized surface area</i>
M _r	molekulska masa
MRSA	<i>S. aureus</i> rezistentan na meticilin
MSSA	<i>S. aureus</i> osjetljiv na meticilin
MW	mikrovalno zračenje

NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NF- κ B	nukleinski faktor κ B
NiAAC	azid-alkin cikloadicija katalizirana niklom
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PARP	poli-(ADP-ribozna)-polimeraza
pApU	poliA-poliU
pCpG	poliC-poliG
PDE	fosfodiesteraza
PDGFR	receptor faktora rasta deriviran iz trombocita
Phe	fenilalanin
pol	polimeraza
PPB	vezanje za proteine plazme
Raf	kinaza brzo rastućih fibrosarkoma
RNA	ribonukleinska kiselina
dsRNA	dvolančana ribonukleinska kiselina
miRNA	mikro-ribonukleinska kiselina
Ro5	Lipinskijevo pravilo 5
SK1	sfingozin kinaza 1
ST	sulfontransferaza
s.t.	sobna temperatura
TAR	protein trans-aktivirajućeg područja
<i>t</i> -BuONO	<i>tert</i> -butil-nitrit
TGM2	transglutaminaza 2
Thr	treonin
TK	tirozin-kinaza
TMSN ₃	trimetilsilil azid
ΔT_m	promjena temperature mekšanja
TPSA	ukupna polarna površina
US	ultrazvučno zračenje
UV/Vis	ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija
VEGFR	receptor vaskularnog endotelijalnog faktora rasta
VRE	<i>E. faecium</i> rezistentan na vankomicin
VZV	varicela zoster virus

Životopis

3. **A. Bistrović**, A. Harej, P. Grbčić, M. Sedić, S. Kraljević Pavelić, M. Cetina, S. Raić-Malić, Synthesis and anti-proliferative effects of mono- and bis-purinomimetics targeting kinases. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) e2292. (IF 3,226; Q2)
4. **A. Bistrović**, N. Stipaničev, T. Opačak-Bernardi, M. Jukić, S. Martinez, Lj. Glavaš-Obrovac, S. Raić-Malić, Synthesis of 4-aryl-1,2,3-triazolyl appended natural coumarin-related compounds with antiproliferative and radical scavenging activities and intracellular ROS production modification. *New J. Chem.* 41 (2017) 7531–7543. (IF 3,269; Q2)
5. S. Krištafor, **A. Bistrović**, J. Plavec, D. Makuc, T. Martinović, S. Kraljević Pavelić, S. Raić-Malić, One-pot click synthesis of 1,2,3-triazole embedded unsaturated uracil derivatives and hybrids of 1,5- and 2,5-disubstituted tetrazoles and pyrimidines. *Tetrahedron Lett.* 56 (2015) 1222–1228. (IF 2,347; Q2)
6. T. Gazivoda Kraljević, **A. Bistrović**, M. Dedić, S. Kraljević Pavelić, M. Sedić, S. Raić-Malić, Efficient palladium-mediated or base-induced 5-endo-dig cyclisation of C5-alkynylated pyrimidine derivatives: conventional and microwave-assisted synthesis of novel furo [2, 3-d] pyrimidines. *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 5144–5147. (IF 2,397; Q2)

Sudjelovanja na kongresima

1. **A. Bistrović**, L. Krstulović, P. Grbčić, A. Harej, M. Sedić, S. Kraljević Pavelić, M. Bajić, S. Raić-Malić, Novel triazole-linked 5-amidino benzimidazoles as potent multi-target inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer” VII. EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Beč, Austrija, 27.–31.08.2017, Knjiga sažetaka, str. 128.
2. **A. Bistrović**, L. Krstulović, P. Grbčić, A. Harej, M. Sedić, S. Kraljević Pavelić, M. Bajić, S. Raić-Malić, Novel 5-amidino benzimidazoles as selective cytostatic agents against lung cancer cells, XXV. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Poreč, Hrvatska, 19.–22.04.2017, Knjiga sažetaka, str. 190.
3. N. Stipaničev, I. Krošl, **A. Bistrović**, S. Raić-Malić, Synthesis of novel coumarin and 1,2,3-triazole hybrids as potential antioxidants, XI. Skup mladih kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska, 18.–19.02.2016, Knjiga sažetaka, str. 160.

4. **A. Bistrović**, Pharmacophore-based hybrids of nucleosides and 1,2,3-triazoles, European School of Medicinal Chemistry, Urbino, Italija, 28.06.–03.07.2015, Knjiga sažetaka, str. 16.
5. T. Gregorić, **A. Bistrović**, A. Tomljenović Paravić, M. Sedić, S. Kraljević Pavelić, T. Gazivoda Kraljević, S. Raić-Malić, 1,2,3-Triazole pharmacophore-based derivatives of purine bioisosters and pyrimidines, XXIV. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska, 21.–24.04.2015, Knjiga sažetaka, str. 185.