

# Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih derivata imidazo[4,5-b]piridina kao potencijalnih optičkih pH senzora

---

Šljubura, Corina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:149:654844>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Corina Šljubura**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, srpanj 2023.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Corina Šljubura

Predala je izrađen diplomski rad dana: 10. srpnja 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Marijana Hranjec, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Doc. dr. sc. Dragana Vuk, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, Sveučilište u  
Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Kristina Tolić Čop, asistent, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog  
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 13. srpnja 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Corina Šljubura**

**Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih derivata  
imidazo[4,5-*b*]piridina kao potencijalnih optičkih pH senzora**

**DIPLOMSKI RAD**

**Voditelj rada:** prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

1. prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT
2. doc. dr. sc. Dragana Vuk, FKIT
3. prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, FKIT

**Zagreb, srpanj 2023.**

*Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Marijani Hranjec na na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada, svim savjetima, uloženom trudu i vremenu te strpljenju i razumijevanju tijekom pisanja i ispravljanja ovog rada.*

*Zahvaljujem se svojoj neposrednoj voditeljici Idi Boček Pavlinac, mag. appl. chem. na motivaciji, pomoći, razumijevanju, ukazanom povjerenju i prilici za samostalnost. Puno si me toga naučila.*

*Najveća zahvala obitelji i dečku na neizmjerljivoj podršci tijekom cjelokupnog studija.*

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Hranjec i neposrednim voditeljstvom Ide Boček Pavlinac, mag. appl. chem., u sklopu projekata Hrvatske nacionalne zaklade *Istraživanje antioksidativnog djelovanja benzazolskog skeleta u dizajnu novih antitumorskih agensa*" (AntioxPot) (HRZZ-IP-2018-01-4379 i „Dizajn, sinteza i računalna analiza novih optičkih kemijskih pH osjetilnih derivata benzazola“ (BenzpHSens)(HRZZ-IP-2020-02-8090)



## SAŽETAK

### Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina kao potencijalnih optičkih pH senzora

U ovom radu provedena je sinteza i spektroskopska karakterizacija benzamidnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina koji se razlikuju prema položaju, odnosno redoslijedu kojim su supstituenti vezani na dušik amidne veze. Ciljani spojevi priređeni su klasičnim reakcijama organske sinteze. Korištenje polifosforne kiseline (PPA) katalizira reakciju kondenzacije iz odgovarajućih prekursora, 2,3-diaminopiridna **1** i *p*-aminobenzojeve kiseline **2** što rezultira stvaranjem 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilina **3**. Iz odgovarajućih benozil-klorida **4-5**, te glavnog prekursora, amino derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **3**, reakcijom kondenzacije u apsolutnom toulenu uz trietilamin priređeni su konačni benzamidi **6-7**. Reakcijom amidacije iz HATU i DIPEA aktivirane 4-nitrobenzojeve kiseline **10**, te 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilina **3** sintetiziran je benzamidni nitro derivat **11**. Reakcija ciklokondenzacije 2,3-diaminopiridina **1** s 4-formilbenzojevom kiselinom **14** i natrijevim metabisulfitom u DMSO daje 4-(3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin-2-il)benzojevu kiselinu **15** koja potom u reakciji nukleofilne supstitucije s tionil-kloridom u toulenu daje 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzoil klorid **16**. Reakcijom kondenzacije spoja **16** s odgovarajućim aromatskim aminima **17-19** u apsolutnom toulenu uz trietilamin priređena je druga vrsta benzamida **20-22**. Amidino-supstituirani benzamidi **8-9** i **25-26** priređeni su iz nitrilnih benzamida **7**, odnosno **22**, Pinnerovom reakcijom u dva stupnja u kiselom mediju. Amino-supstituirani derivati **12** i **23** priređeni su reakcijom redukcije s  $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , te su s klorovodičnom kiselinom prevedeni u hidrokloridne soli **13** i **24**. Priređenim derivatima ispitana je i antiproliferativna aktivnost *in vitro* na nekoliko staničnih linija humanih karcinoma. Derivati **12** i **23** dodatno su spektroskopski okarakterizirani u nekoliko otapala različite polarosti, te su provedene spektroskopske UV/Vis pH titracije kako bi se ispitala mogućnost primjene kao optičkih pH senzora. Strukture svih priređenih produkata potvrđene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom, a nekih i masenom spektrometrijom. Tijek Pinnerovih reakcija za pripravu amidino-supstituiranih benzamida praćen je IR spektroskopijom.

**Ključne riječi:** antiproliferativna aktivnost *in vitro*, benzamidi, imidazo[4,5-*b*]piridin, kondenzacija,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija, Pinnerova reakcija, pH titracije

## SUMMARY

### Synthesis and spectroscopic characterization of new imidazo[4,5-*b*]pyridine derivatives as potential optical pH sensors

This work presents the synthesis and spectroscopic characterization of imidazo[4,5-*b*]pyridine benzamides, which differ according to the position, or the order in which the substituents are attached to the nitrogen of the amide bond. Targeted compounds were prepared by conventional reactions of organic synthesis. The use of polyphosphoric acid (PPA) catalyzes a condensation reaction from the precursors, 2,3-diaminopyridine **1** and *p*-aminobenzoic acid **2** leading to the formation of 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)aniline **3**. From the corresponding benzoyl chlorides **4-5** and the main precursor, amino derivative of imidazo[4,5-*b*]pyridine **3** by a condensation in absolute toluene with triethylamine, target benzamides **6-7** were synthesized. Nitro benzamide derivative **11** was synthesized by the amidation using HATU and DIPEA activated 4-nitrobenzoic acid **10** and 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)aniline **3**. Cyclocondensation of 2,3-diaminopyridine **1**, 4-formylbenzoic acid **14** and sodium metabisulfite in DMSO produces 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)benzoic acid **15** which then in a nucleophilic substitution with thionyl chloride in toluene gives 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)benzoyl chloride **16**. By condensation of compound **16** with the corresponding aromatic amines **17-19** in absolute toluene with triethylamine, another class of benzamide was prepared **20-22**. Amidino-substituted benzamides **8-9** and **25-26** were prepared starting from corresponding nitrile benzamides **7** and **22**, by a two-step Pinner reaction in an acidic medium. Amino-substituted derivatives **12** and **23** were prepared by a reduction with SnCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O and converted into hydrochloride salts **13** and **24**. All prepared benzamides were tested for their antiproliferative activity *in vitro* on several human cancer cells. In addition, the spectroscopic properties of derivatives **12** and **23** were studied by UV/Vis spectroscopy and pH titrations in order to determine the possibility of application as optical pH sensors. The structures of all prepared products were confirmed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, and some by mass spectrometry. The Pinner reaction for the preparation of amidino-substituted benzamides was monitored by IR spectroscopy.

**Key words:** antiproliferative activity *in vitro*, benzamides, imidazo[4,5-*b*]pyridine, condensation, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, Pinner reaction, pH titrations



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. Amidna veza .....	4
2.2. Kopulirajući agensi .....	6
2.2.1. CDI .....	8
2.2.2. DCC .....	9
2.3. Pregled reakcija dobivanja amida iz karboksilnih kiselina .....	10
2.3.1. Amidacija karboksilnih kiselina .....	11
2.4. Biološka aktivnost amidnih derivata imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina .....	23
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	36
3.1. Cilj rada .....	37
3.2. Sinteza ciljanih spojeva .....	39
3.3. Spektroskopska karakterizacija UV/Vis spektroskopijom .....	58
3.4. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva ispitivanih spojeva .....	62
3.5. Biološka aktivnost supstituiranih benzamida imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina .....	64
4. EKSPERIMENTALNI DIO .....	65
4.1. Opće napomene .....	66
4.2. Priprava benzamida imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina 6-9 i 11-13 .....	67
4.2.1. Priprava 4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)anilina 3 .....	68
4.2.2. Opći postupak priprave amido-supstituiranih derivata imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina 6-7 ....	68
4.2.3. Priprava <i>N</i> -(4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)fenil)benzamida 6 .....	68
4.2.4. Priprava <i>N</i> -(4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)fenil)-4-cijanobenzamida 7 .....	68
4.2.5. Opći postupak priprave amidinskih derivata amido-supstituiranih imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina Pinnerovom metodom .....	69
4.2.6. Priprava <i>N</i> -(4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)fenil)-4-(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)benzamid hidroklorida 8 .....	69
4.2.7. Priprava <i>N</i> -(4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)fenil)-4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)benzamid hidroklorida 9 .....	69
4.2.8. Priprava <i>N</i> -(4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)fenil)-4-nitrobenzamida 11 .....	70
4.2.9. Priprava <i>N</i> -(4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamida 12 .....	70
4.2.10. Priprava (4-((4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)fenil)karbamoil)fenil)hidroklorida 13 .....	71

4.3. Priprava benzamida imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina 20-26 .....	72
4.3.1. Priprava 4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)benzojeve kiseline 15 .....	72
4.3.2. Opći postupak priprave amida 20-22.....	73
4.3.3. Priprava 4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)- <i>N</i> -fenilbenzamida 20 .....	73
4.3.4. Priprava 4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)- <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzamida 21 .....	73
4.3.5. Priprava <i>N</i> -(4-cijanofenil)-4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)benzamida 22 .....	73
4.3.6. Priprava <i>N</i> -(4-aminofenil)-4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)benzamida 23 .....	74
4.3.7. Priprava (4-(4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)benzamido)fenil)hidroklorida 24.....	74
4.3.8. Priprava <i>N</i> -(4-(4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)fenil)-4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)benzamid hidroklorida 25 .....	75
4.3.9. Priprava 4-(3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin-2-il)- <i>N</i> -(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)benzamid hidroklorida 26.....	75
5. ZAKLJUČAK.....	76
6. POPIS KRATICA .....	79
7. LITERATURA.....	81
8. PRILOZI .....	87
9. ŽIVOTOPIS .....	104

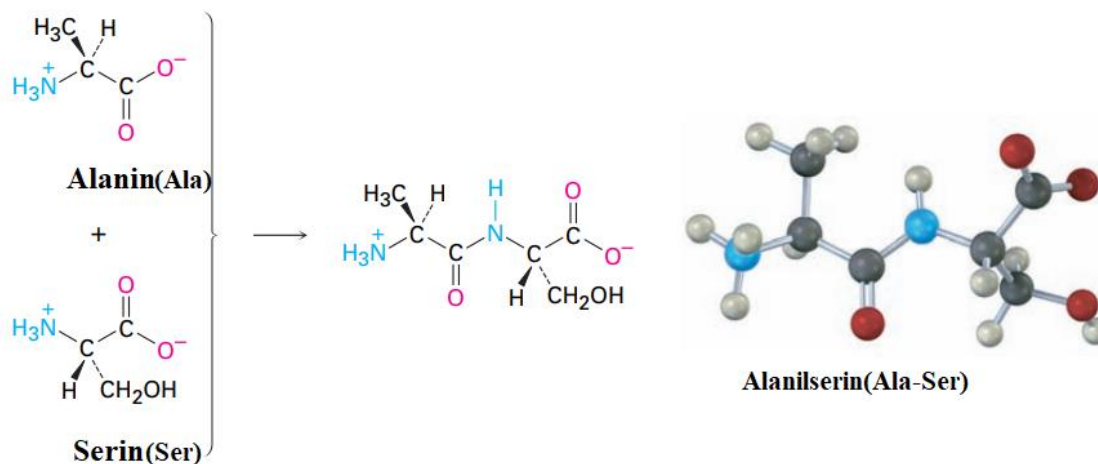
## **1. UVOD**

Amidna veza je jedan od najvažnijih kemijskih gradivnih blokova u prirodi. Molekule u kojima se nalazi amidna veza su prvenstveno biološki značajni proteini i peptidi, te veliki broj klinički odobrenih lijekova kao i sintetskih i prirodnih molekula koje se istražuju za dizajn i razvoj novih lijekova. U strukturi 25% svih farmaceutika na tržištu prisutna je amidna veza kao jedna od funkcijskih skupina. Osim toga, amidne veze sastavne su komponente mnogih polimernih materijala, kao što su poliesteri, poliuretani i poliamidi te tako, između ostalog, takve molekule nalaze primjenu u tekstilu, premazima, ljepilima i biomedicinskim uređajima. Amidna skupina općenito uživa značajnu pažnju radi svog jedinstvenog strukturnog svojstva koje joj omogućava da istovremeno bude donor i akceptor vodikove veze. Ta dualnost amidne veze predstavlja vrlo važnu strategiju u medicinskoj kemiji jer uvođenje amidne veze u strukturu molekule lijeka otvara mogućnost ostvarivanja interakcija s aminokiselinskim ostacima u katalitičkom mjestu ciljanog enzima, čime se posljedično mogu zaustaviti neželjeni biološki procesi.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Amidna veza

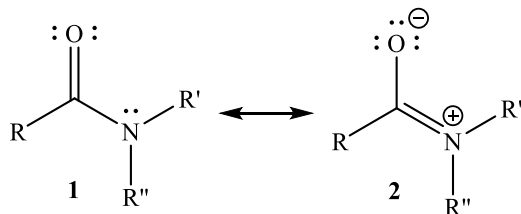
Amidna funkcijska skupina smatra se jednom od temeljnih građevnih jedinica u organskoj kemiji<sup>1</sup>, ali i biologiji<sup>2</sup> gdje je prisutna kao glavna kemijska veza, tj. peptidna veza koja povezuje aminokiselinske gradivne blokove stvarajući polipeptidne lance i proteine (Slika 1).



**Slika 1.** Dipeptid koji nastaje stvaranjem peptidne veze između karboksilne skupine alanina i amino skupine serina<sup>3</sup>

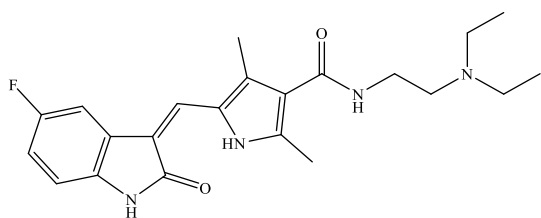
Svojstva koja karakteriziraju amidnu vezu jesu velika polarnost<sup>4</sup>, stabilnost u laboratorijskim uvjetima (cijepa se djelovanjem koncentriranih kiselina ili baza pri visokim temperaturama)<sup>5</sup>, a poznato je i da je amidna veza inertna funkcijska skupina, a razlog za njihovo rezistentno ponašanje pripisuje se njihovoj tendenciji stvaranja rezonantne strukture<sup>6</sup> (Slika 2) pri čemu dušikov atom donira svoj slobodni elektronski par istovremeno poprimajući pozitivan naboj koji mu tada onemogućava stvaranje nove veze s elektrofilima, odnosno sudjelovanje u kemijskim reakcijama. Taj djelomično dvostruki karakter veze vodi postojanju *cis* i *trans* izomera, osigurava planarnu geometriju, ali i krutost budući da je onemogućena rotacija oko C-N veze. Sveukupno gledajući, sposobnost amidne veze da poprimi drugu konfiguraciju korisno je svojstvo jer omogućava stvaranje struktura koje mogu imati važnu ulogu molekularnom vezanju ili prepoznavanju specifičnih meta<sup>7</sup>. Također, to dozvoljava i formiranje molekularnih senzora ili prekidača koji ukoliko u strukturi imaju amidnu funkcijsku skupinu mogu promjenom konfiguracije veze povoljno odgovoriti na promjenu uvjeta u kojima se nalaze<sup>8</sup>.

Njena važnost je uočena i u procesu formiranju trodimenzionalne strukture proteina, gdje je za uspostavljanje prvobitne sekundarne strukture  $\alpha$  uzvojnice i  $\beta$  listova iznimno bitna *trans* konfiguracija peptidne veze, jer se u tim strukturama okosnica proteina drži u pravilnoj konformaciji uspostavljanjem optimalno poravnatih donorskih i akceptorskih mjesta vodikovih veza između amidnih skupina, dok bi *cis* konformacija poremetila taj obrazac vodikovih veza i destabilizirala strukturu<sup>9,10,11,12</sup>.

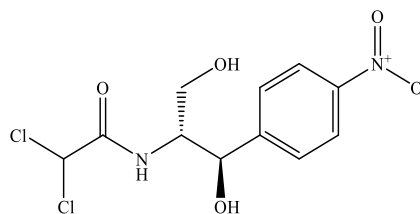


**Slika 2.** Rezonantna struktura amidne veze<sup>5</sup>

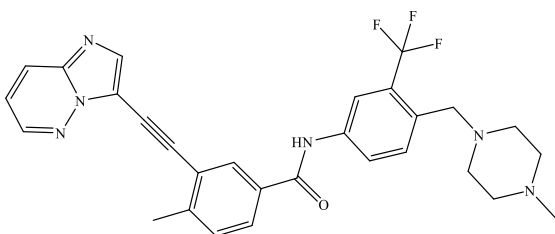
Pogrešno je davati veću vrijednost amidnoj skupini samo u biološkim sustavima jer ona služi kao ključni prekursor u industrijskim primjenama, kao što je inženjerska plastika, proizvodnja deterdženata, pesticida, maziva, parfema, agrokemikalija, hidrogelova, najlona, umjetne svile<sup>13,14,15</sup>. Prema statističkim podacima, poznato je da se amidna veza nalazi u oko 25% poznatih lijekova na tržištu koji se koriste kao antitumorski lijekovi (Sunitinib **3**, Ponatinib **5**, Regorafenib **7**, Imatinib **8**<sup>16,17</sup> te antifungalni i antibakterijski agensi (Kloramfenikol **4**, Penicilin **6**), prema Slici 3<sup>18</sup>.



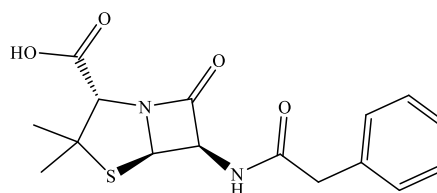
**3** Sunitinib



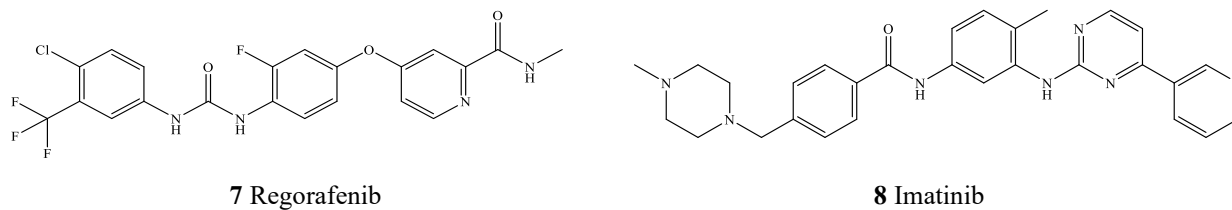
**4** Kloramfenikol



**5** Ponatinib



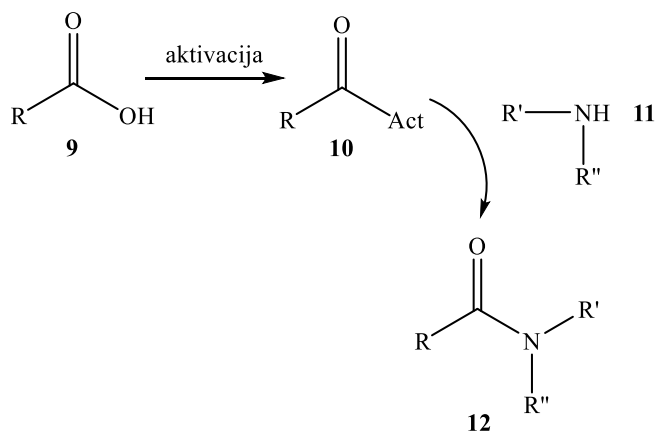
**6** Penicilin



**Slika 3.** Strukture odabranih molekula lijekova koje sadrže amidnu skupinu<sup>15,16,17</sup>

## 2.2. Kopulirajući agensi

Priprava amida iz odgovarajućih karboksilnih kiselina važna je i dobro poznata transformacija u organskoj sintezi<sup>19</sup>. Općenito, amidna veza se formira kondenzacijom karboksilne kiseline i amina uz otpuštanje jednog ekvivalenta vode. Ta reakcija se smatra izazovnom radi postojanja kompetitivne kiselobazne reakcije koja se događa kada se amin i karboksilna kiselina pomiješaju<sup>20</sup>. Iako se amidna veza može formirati iz odgovarajuće amonijeve karboksilatne soli zagrijavanjem, ta reakcija je generalno niske preparativne vrijednosti<sup>21</sup>. Nadalje, velika aktivacijska barijera za direktno spajanje karboksilne kiseline i amina jedino se može svladati koristeći žestoke reakcijske uvjete<sup>22</sup>. Kako bi se zaobišli ti problemi, amidna veza se često formira preko aktivirane karboksilne kiseline (Slika 4). Karboksilno aktiviranje se provodi uz pomoć kopulirajućeg reagensa<sup>23</sup> ili, alternativno, prevodeći karboksilnu kiselinu u odgovarajući kiselinski klorid (Schotten-Baumann reakcija). Većina kopulirajućih reagenasa prvo reagira s karboksilnom kiselinom dajući aktivirani intermedijer koji naknadno podliježe nukleofilnom napadu amina.

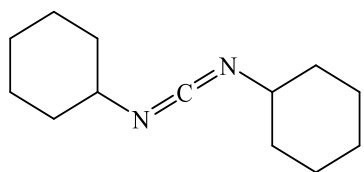


**Slika 4.** Princip aktivacijskog procesa za formiranje amidne veze<sup>2</sup>

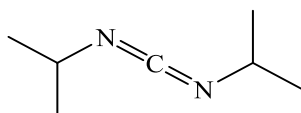


Postoji mnogo nedoumica pri odabiru kopulirajućeg reagensa za sintezu amida. Idealan reagens je jeftin, široko dostupan, netoksičan, siguran, jednostavan za rukovanje, lako se čisti iz reakcijske smjese i minimalno opterećuje otpadne tokove. Nadalje, detekcija i pročišćavanje nusprodukata kopuliranja do regulatornih granica je veliki prioritet pri izvođenju amidacije na kraju proizvodnog procesa<sup>24</sup>. Naravno, nisu svi kopulirajući reagensi jednako učinkoviti za dani par kiselinskih i aminskih supstrata, uvjeti amidacije moraju biti prilagođeni da bi rezultirali visokim prinosom i selektivnošću, izvrsnom reproducibilnošću, a u slučaju supstrata koji imaju stereocentre i niskom epimerizacijom.

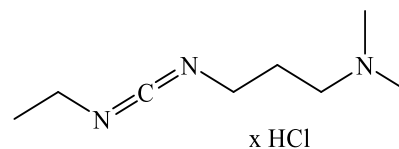
Karbodiimidi, posebno dicikloheksilkarbodiimid (DCC) **13**<sup>25,26</sup> najčešće su korišteni kondenzacijski agensi (Slika 5). Iako, korištenje DCC kao reagensa često vodi formiranju *N*-aciluree i karboksilnih anhidrida kao nusprodukata-što otežava izolaciju željenog amida. Na slične se probleme nailazi i u acil-karbamatnoj metodi<sup>27</sup> koja daje amide samo u umjerenim iskorištenjima i to nakon dugog reakcijskog vremena. *N,N'*-karbonildiimidazol<sup>28</sup> reaktivan je acilirajući agens, ali su njegovi intermedijeri vrlo osjetljivi na vlagu. Kako bi se zaobišli ti problemi, mnogo drugih kondenzirajućih agensa se koristi kao što su; *N,N'*-disukcinimidil karbonat<sup>29</sup>, *N*-sukcinimidil difenilfosfat<sup>30</sup> i derivati oksalata<sup>31</sup>, koji djeluju kao aktivacijski agensi bez nekog drugog reagensa za kopuliranje kao što je DCC. Benzotriazoli (Slika 6)<sup>32</sup>, tetrazoli<sup>33</sup>, derivati benzoksazola<sup>34</sup> i reagensi koji sadrže fosfor (Slika 7)<sup>35</sup> su učinkovita sredstva za kopuliranje, ali se moraju se pripremiti prije upotrebe. Triazin<sup>36</sup>, 2,2'-dipiridil disulfid<sup>37</sup>, piridinijeve soli<sup>38</sup> su komercijalno dostupni, ali ne pokazuju nikakvu selektivnost između primarnih i sekundarnih amina. Sultoni<sup>39</sup>, borani<sup>40</sup>, klorosulfonil izocijanati<sup>41</sup>, sulfinilamini<sup>42</sup>, di-*n*-butilkositreni<sup>43</sup> oksidi također se koriste kao kopulirajući agensi, ali, ili su dobiveni niski prinosi ili nije pronađena opća primjena.



**13** *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC)

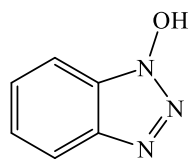


**14** *N,N'*-diizopropilkarbodiimid (DIC)

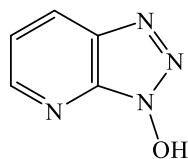


**15** 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC)

**Slika 5.** Rutinski korišteni karbodiimidi<sup>44</sup>

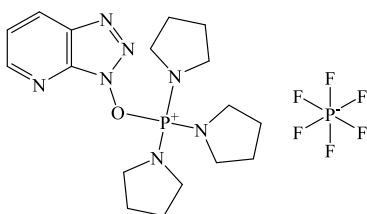


**16** 1-hidroksibenzotriazol  
(HOBt)

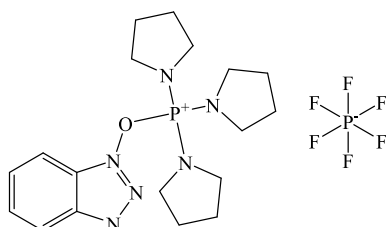


**17** 1-hidroksi-7-  
azabenzotriazol (HOAt)

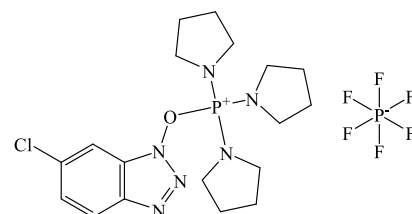
**Slika 6.** Rutinski korišteni benzotriazoli<sup>45</sup>



**18** 7-azabenzotriazol-1-  
iloksi)trisprirolidino-fosfonij  
heksafluorofosfat  
(PyAOP)



**19** benzotriazol-1-il-oksi-tris-  
pirolidino-fosfonijev  
heksafluorofosfat  
(PyBOP)

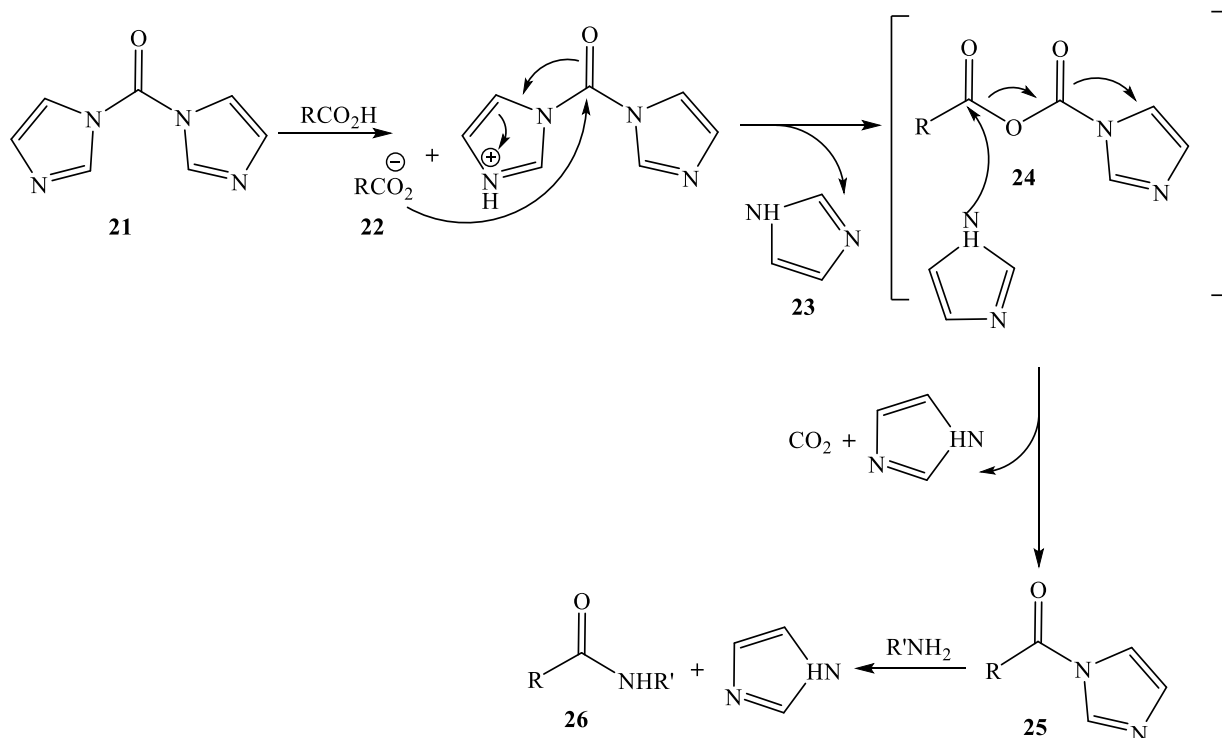


**20** 6-kloro-benzotriazol-1-iloksi-  
tris-pirolidino-fosfonijev  
heksafluorofosfat  
(PyClock)

**Slika 7.** Rutinski korišteni fosforovi reagensi<sup>2</sup>

### 2.2.1. CDI

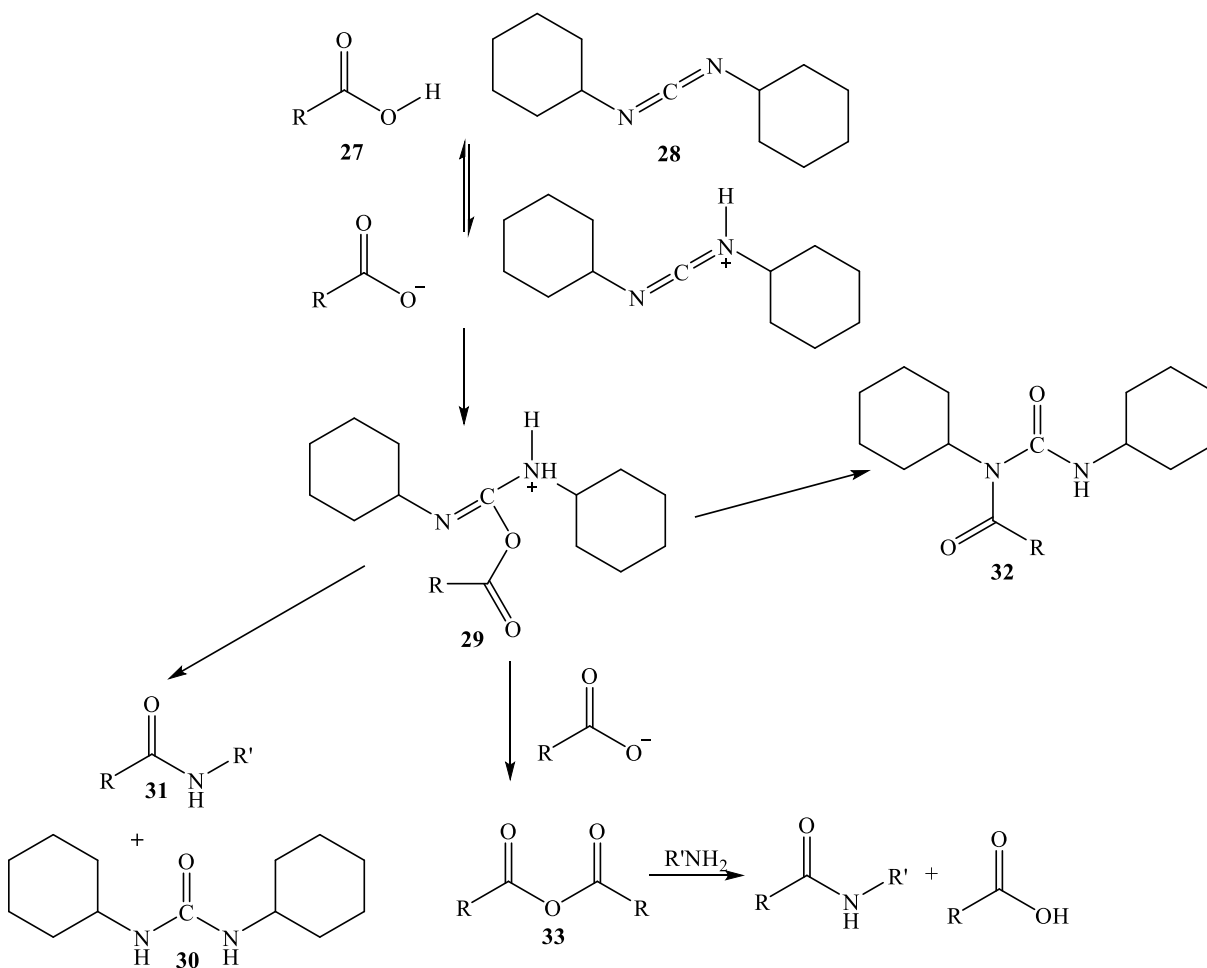
CDI, ili 1,1'-karbonildiimidazol **22**<sup>44</sup>, vrlo je atraktivan reagens za kopuliranje amida na velikoj skali. Jeftin je, široko dostupan kao kristalna krutina, relativno siguran i njegov nusprodukt imidazol se lako čisti vodenim zagrijavanjem. Reakcija karboksilne kiseline s CDI stvara međuprodukt anhidrid koji se pregrađuje u karbonilni imidazolid (Shema 1) pri čemu se stvara ekvivalent CO<sub>2</sub> koji može ubrzati kasnije spajanje amida<sup>45</sup>. Dodatna prednost CDI-ja je što se kopuliranje često izvodi bez dodatne baze, jer oslobođeni imidazol može služiti ovoj funkciji. Jedan nedostatak ovog reagensa je njegova osjetljivost prema atmosferskoj vlazi<sup>46</sup>.



**Shema 1.** Mehanizam kopuliranja posredovan CDI-jem<sup>44</sup>

### 2.2.2. DCC

Karbodiimid u svojoj strukturi sadrži dva dušikova atoma koja su slabo bazična; što je dovoljno da izazove reakciju između karbodiimida i kiseline da bi se u prvom koraku generirala *O*-acilurea **27**<sup>47,48</sup>. Ovaj međuprodukt može zatim dati više produkata: amid izravnim spajanjem s aminom (obično nastaje i nusprodukt, dicikloheksilurea (DCU ss) koji je netopljiv u reakcijskom otapalu i može se ukloniti filtracijom), zatim *N*-acilureu kao nusprodukt te anhidrid karboksilne kiseline koji naknadno daje amid reakcijom s aminom (potrebno je 2 ekv. kiseline)<sup>49</sup>. Kada se koristi DCC, može doći do stvaranja oksazolona nakon generiranja *O*-aciluree što dovodi do epimerizacije<sup>50</sup>, a to je posebno važno kada se aktiviraju kiselinske skupine u  $\alpha$  položaj amidne veze (Shema 2).



Shema 2. Mehanizam kopuliranja posredovan DCC<sup>2</sup>

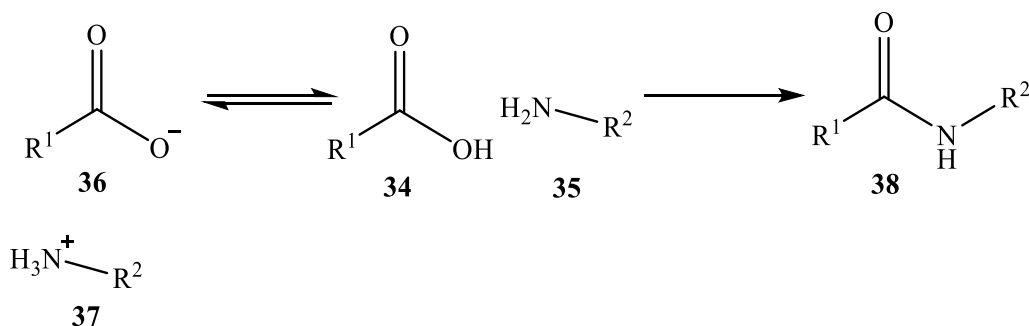
### 2.3. Pregled reakcija dobivanja amida iz karboksilnih kiselina

Sinteza amida je iznimno važna u pripravi organskih molekula u farmaceutskoj industriji. Unatoč velikoj važnosti amida u organskoj kemiji, većina dobro utvrđenih metoda za njihovo formiranje su relativno neučinkovite, s velikim količinama potencijalno opasnih otpadnih proizvoda koji se proizvode, što dovodi do štetnih utjecaja na okoliš i poteškoća u pročišćavanju željenih amidnih produkata. Industrijski značaj sinteze amida potaknuo je povećani interes istraživača u razvoju novih i učinkovitijih pristupa<sup>51</sup>. Amidi se mogu pripraviti iz širokog spektra prekursora nizom različitih reakcijskih putova. Iako je nedavno postignut napredak u reakcijama oksidativne amidacije u kojima se koriste prekursori alkohola ili aldehida, a daleko najčešći pristup je kondenzacija između karboksilne kiseline i amina.

Nedavno je otkriće učinkovitih katalizatora za izravnu amidaciju dovelo do procesa koji postižu povećanu učinkovitost<sup>52</sup>, iako imaju relativno ograničen opseg supstrata. Ipak, tijekom sljedećih nekoliko godina vjerojatno je da će reakcije katalitičke amidacije postati sve konkurentniji pristup naspram tradicionalnim kopulirajućim reagensima.

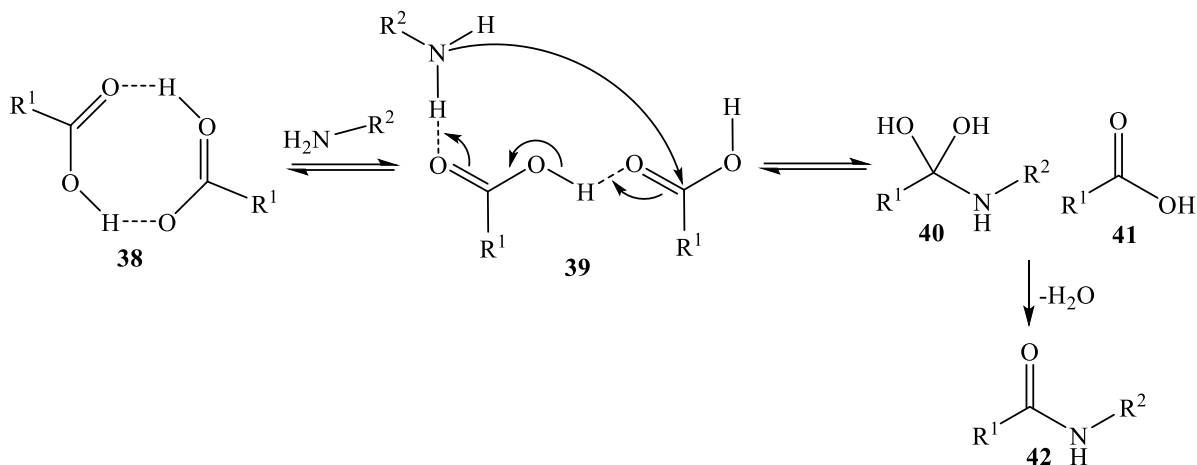
### 2.3.1. Amidacija karboksilnih kiselina

Termalna amidacija je nedavno privukla interes u sintezi amida radi učestalog stvaranja soli amonijevog karboksilata (Shema 3) u klasičnoj metodi kondenzacije, a koji znatno otežavaju separaciju iz reakcijske smjese. Stupanj formiranja soli amonijevog karboksilata jako ovisi o korištenim supstratima i samim reakcijskim uvjetima.



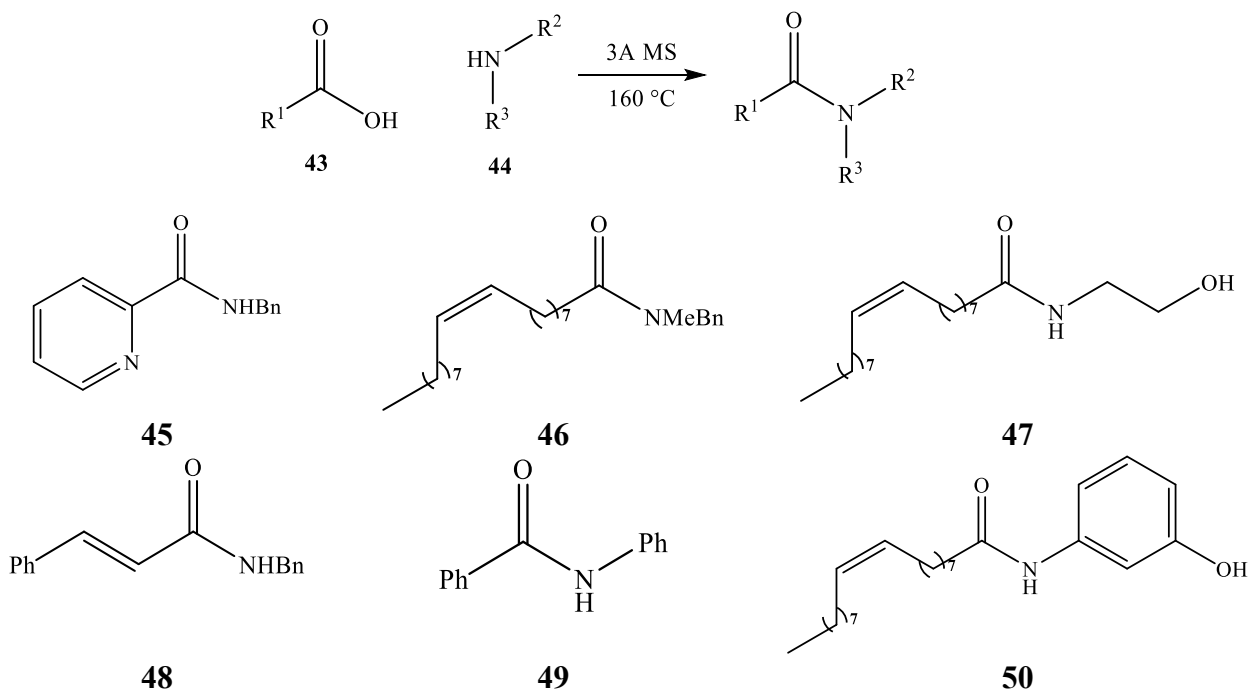
**Shema 3.** Stvaranje soli amonijevog karboksilata u odnosu na kondenzaciju<sup>53</sup>

U nedavnim računalnim studijama mehanizma reakcija termalne amidacije u nepolarnim otapalima, uočena je jaka korelacija između kiselosti karboksilne kiseline i njezine reaktivnosti, pri čemu su kiseliji sustavi uglavnom nereaktivni. To se pripisuje visokom stupnju stvaranja soli amonijevog karboksilata kod jačih kiselina. Trendove u reaktivnosti aminske komponente bilo je mnogo teže identificirati, a smatralo se da se reaktivnost amina svodi na složenu ravnotežu prostornih i elektronskih učinaka. Na temelju računalnih studija predloženo je da je ključni korak mehanizma reakcije nukleofilni napad amina na dimer karboksilne kiseline s vodikovom vezom (Shema 4)<sup>54</sup>.



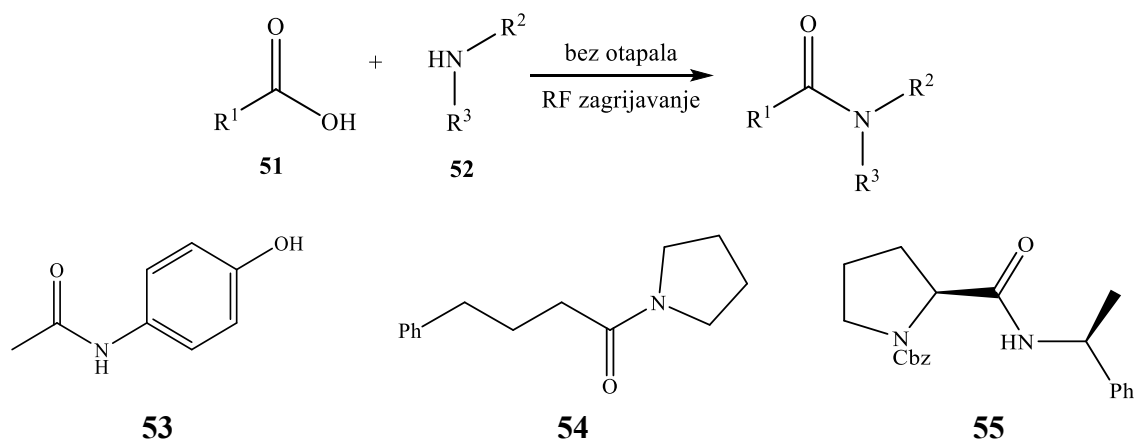
**Shema 4.** Predloženi mehanizam direktne termalne amidacije<sup>53</sup>

Izravna termalna kondenzacija karboksilnih kiselina i amina na 160 °C u prisutnosti 3 Å molekularnih sita (MS) za uklanjanje vode generirane u reakcijskoj smjesi, prikazana je na Shemi 5<sup>55</sup>. Tijekom optimiranja ove metode uočeno je da MS nisu bila potrebna za dobru konverziju, iako su ona i dalje bila korištena kako bi se ograničio porast tlaka u zatvorenoj reakcijskoj posudi. Samo je ograničen izbor funkcionaliziranih kiselina i amina istraživani, ali slobodni alkoholi i fenoli korišteni su pod ovim uvjetima reakcije, te odgovarajući esterski produkti nisu uočeni.



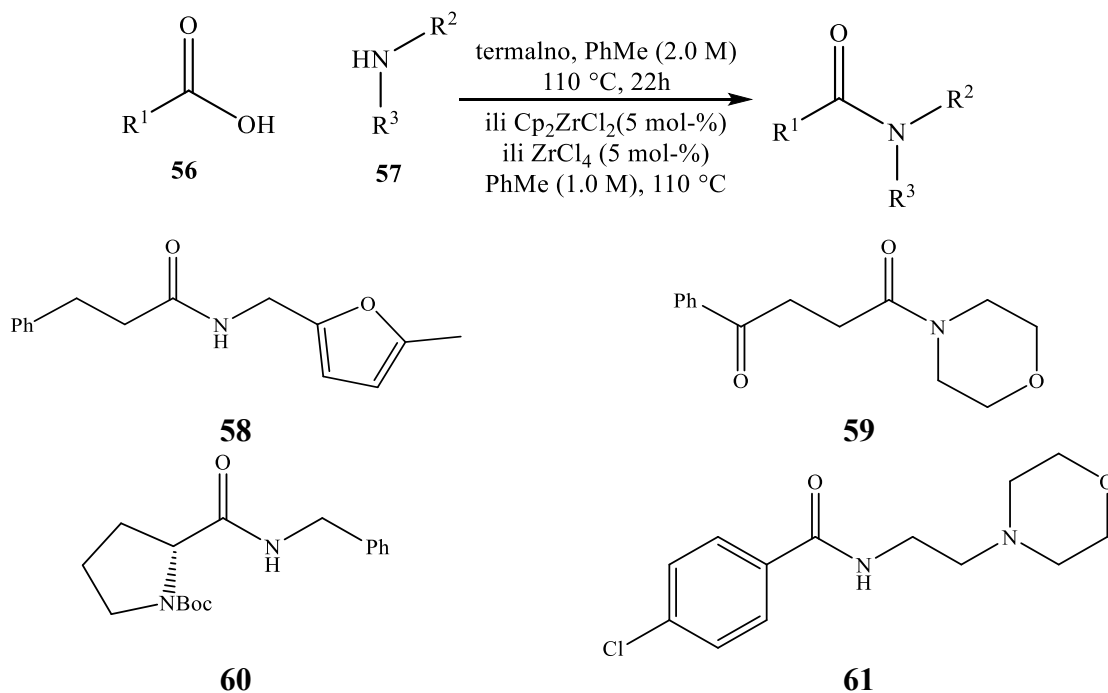
**Shema 5.** Direktna visoko-temperaturna termalna amidacija<sup>53</sup>

Provedena je i upotreba radiofrekvencijskog zagrijavanja za poticanje izravne amidacije u uvjetima bez otapala (Shema 6)<sup>56</sup>. Nanočestice nikal-ferita djeluju kao materijal koji apsorbira radiofrekvenciju i može generirati lokaliziranu toplinu u reakcijskoj smjesi u tikvici pri izlaganju izmjeničnoj struji (AC) magnetskog polja. Prednosti ove metode su brzo vrijeme reakcije (20 min) i jednostavno uklanjanje nikal feritnih nanočestica magnetskom separacijom. Može se koristiti za niz supstrata:  $\alpha$ -kiralne kiseline, benzojeve kiseline, aniline i sekundarne amine te nije uočeno narušavanje stereokemije tijekom amidacije *N*-Boc- ili *N*-Cbz-L-prolina. Zaštitne skupine osjetljive na kiseline i slobodni fenoli također su tolerirani i korišteni u ovim reakcijama.



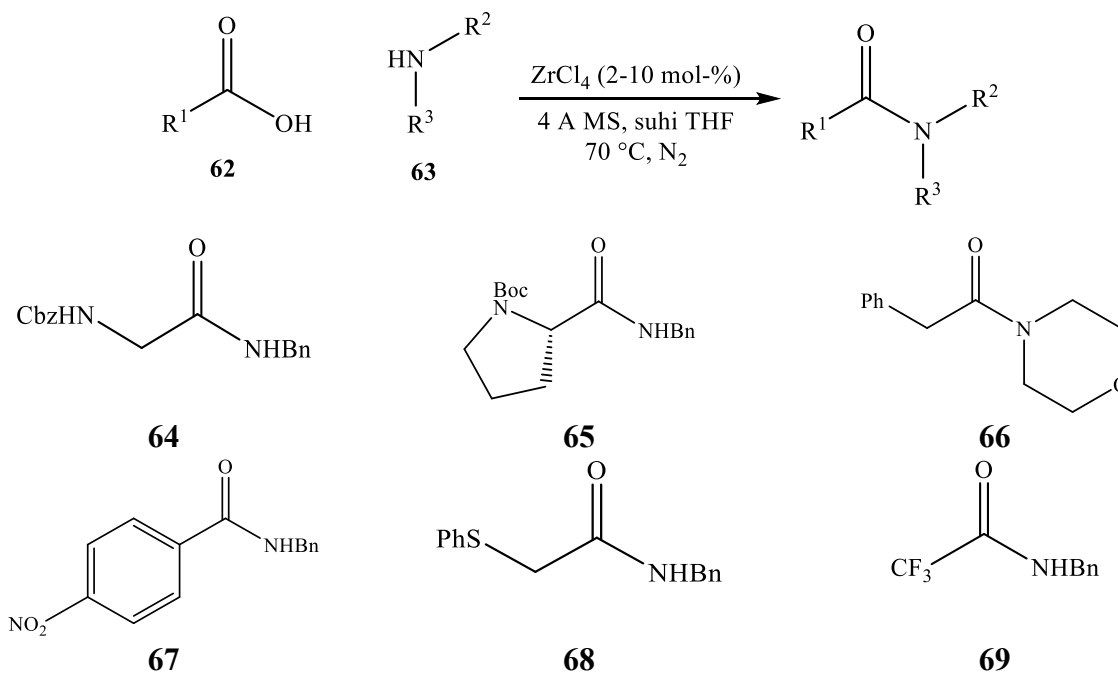
**Shema 6.** Primjeri radiofrekvencijske amidacije<sup>53</sup>

Izravno amidiranje karboksilnih kiselina događa se kod mnogih supstrata pri zagrijavanju u PhMe na 110 °C (Shema 7)<sup>57</sup>. Ova metoda ne zahtijeva uklanjanje aktivne vode (Dean–Stark, itd.), ali su korišteni bezvodni reakcijski uvjeti. Zbog nepolarne prirode otapala, stvaranje soli amonijevog karboksilata je nepoželjno. Ova metoda dobro funkcionira za sekundarne amine, alifatske, aromatske i heteroaromatske amine, ali i za niz karboksilnih kiselina. U jednom slučaju reakcija amidacije uspješno je provedena na skali od 400 mmol te je dobiveno 93 g produkta. Manje reaktivni sustavi poput anilina i benzojeve kiseline dali su manja iskorištenja pod standardnim uvjetima, iako su se iskorištenja iz manje reaktivnih supstrata mogla poboljšati povećanjem temperature reakcije na 150 °C (ksileni) ili dodatkom cirkonijevog katalizatora (ZrCl<sub>4</sub> ili Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>). Utvrđeno je da produkt amidacije iz *N*-Boc prolina ima >99% *ee*.



**Shema 7.** Primjeri termalne i Zr-katalizirane amidacije<sup>53</sup>

Izravnu amidaciju kataliziranu  $ZrCl_4$  provela je u isto vrijeme i druga istraživačka grupa<sup>58</sup>. U ovom slučaju, 4 Å MS korištena su kao sredstvo za dehidrataciju i reakcija je provedena na nižoj temperaturi (70 °C) u bezvodnim uvjetima (Shema 8).

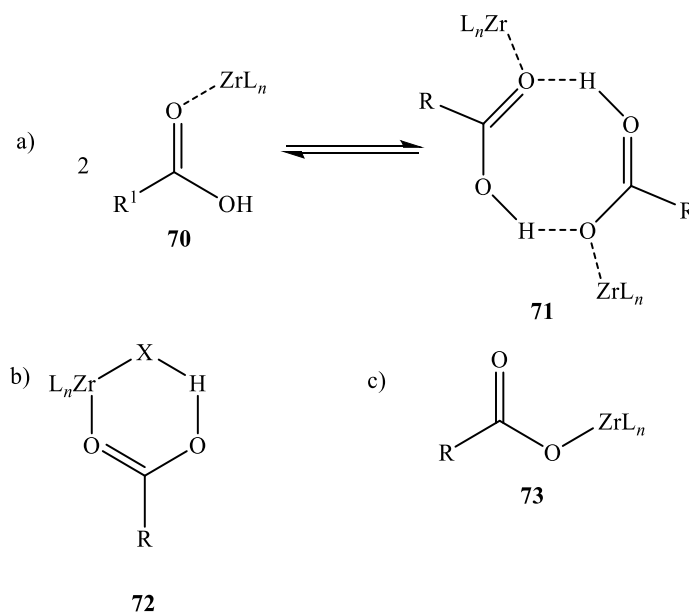


**Shema 8.** Primjeri  $ZrCl_4$ -katalizirane amidacije<sup>53</sup>



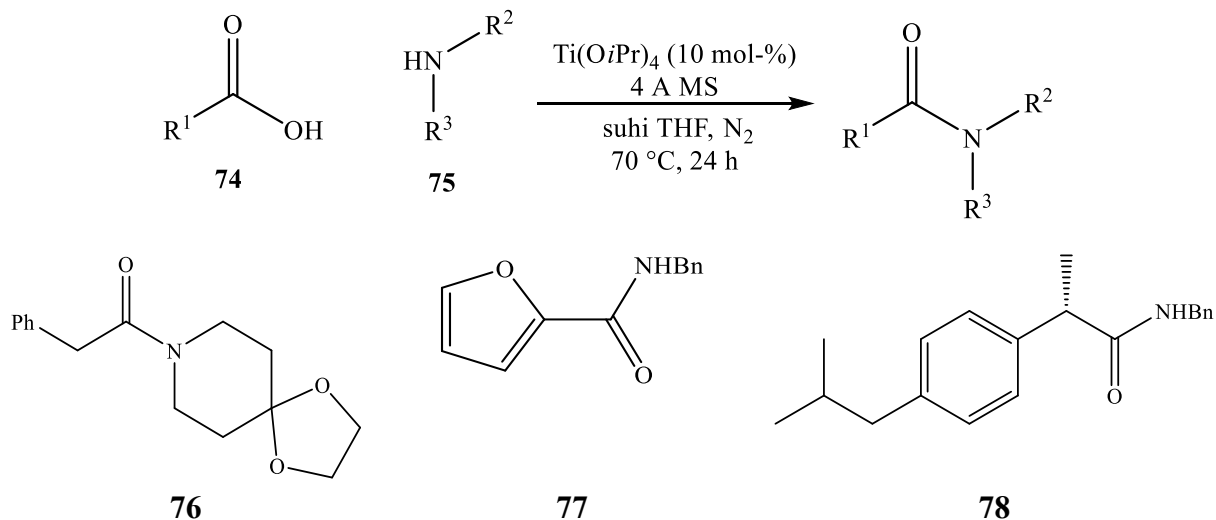
Racemizacija nije primijećena u spajanju dviju *N*-zaštićenih aminokiselina, a *N*-zaštitne skupine osjetljive na kiselinu su tolerirane. Alkilne, aromatske i heteroaromske kiseline, te amini, podvrgnuti su amidaciji uz umjerena do odlična iskorištenja pod ovim uvjetima. Međutim, manje aktivni supstrati kao što su benzojeve kiseline i sekundarni amini zahtijevaju više reakcijske temperature od 100 °C. Ova metoda je također pogodna za sintezu na velikoj skali (5 g amida).

Cirkonijevi katalizatori aktiviraju karboksilne kiseline kroz nekoliko različitih koordinacijskih načina (Slika 8), uključujući: a) aktivaciju karbonilne skupine Lewisovom kiselinom bilo u kiselini bilo dimerom vodikove veze, b) aktivacija karbonilne skupine Lewisovom kiselinom s istodobnom aktivacijom odlazeće skupine vodikovom vezom, i c) cirkonijeva aktivacija karboksilatnog kisika kao izlazeće skupine.



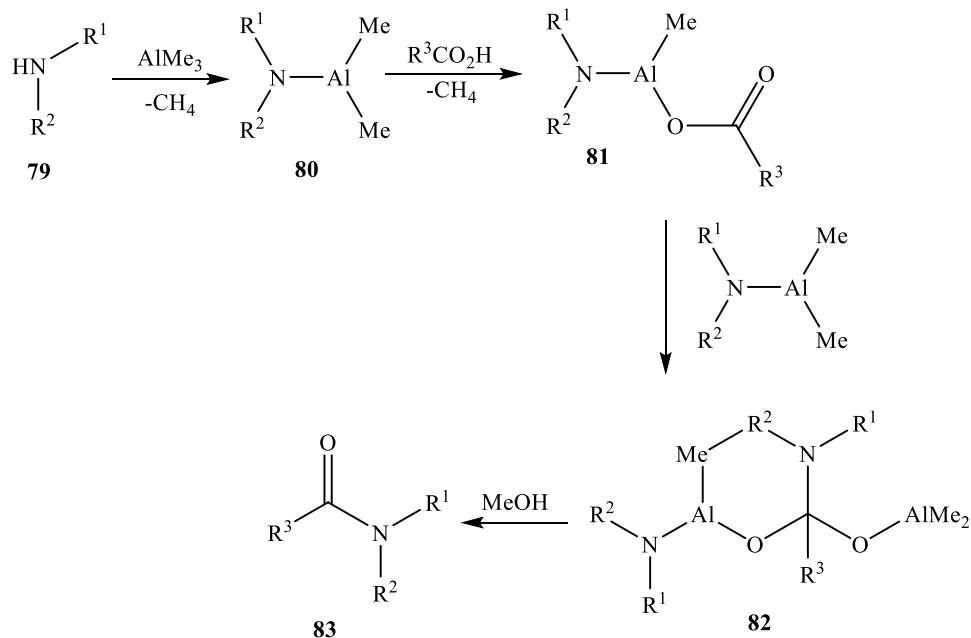
**Slika 8.** Predloženi načini karboksilne aktivacije u Zr katalizatoru<sup>53</sup>

Slično,  $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$  je isto prikladan katalizator za izravnu amidaciju<sup>59</sup>, pod reakcijskim uvjetima povezanih s  $\text{ZrCl}_4$  (Shema 9). Reakcije amidacije s primarnim i sekundarnim aminima u kombinaciji s alifatskim kiselinama, nezasićenim kiselinama, aromatskim ili heteroaromatskim kiselinama dobro su se odvijale pod ovim reakcijskim uvjetima. Skupine osjetljive na kiselinu, uključujući dušikove i ketale zaštićene Boc-om, izdržale su reakcijske uvjete. Niz prijelaznih metalnih klorida i alkoksida također su prikladni amidacijski katalizatori, iako je procijenjeno da je  $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$  najprikladniji kandidat zbog svoje gotove dostupnosti i niske cijene.



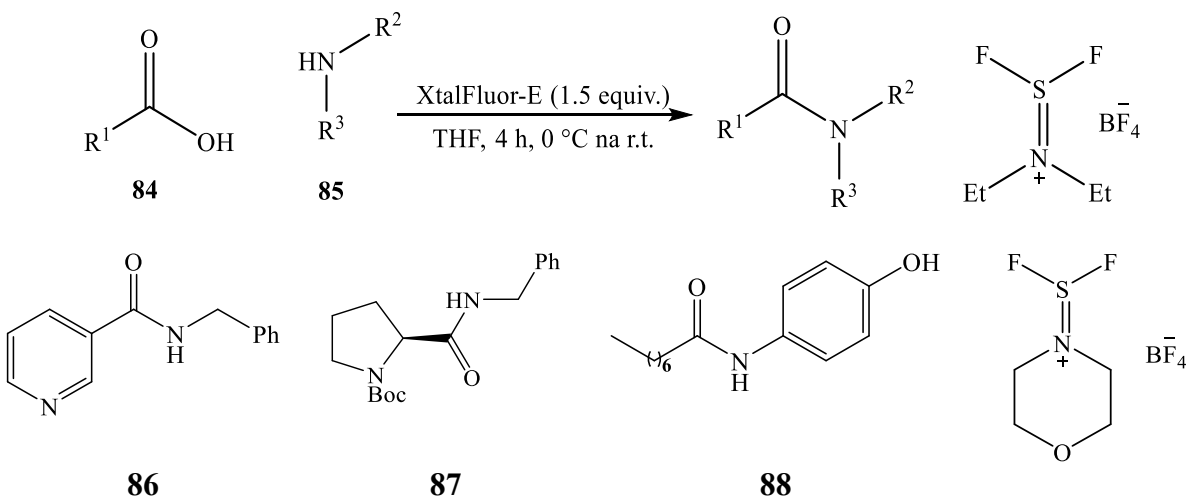
**Shema 9.** Primjeri  $\text{Ti(OiPr)}_4$ -katalizirane amidacije<sup>53</sup>

Stehiometrijske količine  $\text{AlMe}_3$  mogu posredovati u reakcijama amidacije, ali ti procesi zahtijevaju isključenje zraka ili vlage, dugo vrijeme reakcije i višak amina, te  $\text{AlMe}_3$  (3 ekviv.)<sup>60</sup>. Dimetilaluminijev amid također mora biti prethodno formiran prije dodatka kiseline u reakcijsku smjesu (Shema 10)



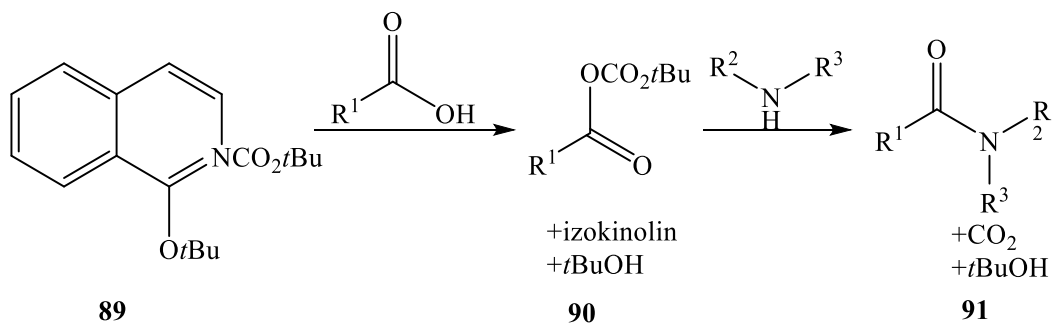
**Shema 10.** Primjeri  $\text{AlMe}_3$ -katalizirane amidacije<sup>53</sup>

XtalFluor-E (i srodni derivat XtalFluor-M) izravni su amidacijski reagensi koji se mogu koristiti u blagim uvjetima i inertnoj atmosferi (Shema 11)<sup>61</sup>. Problem je kod sterički ometenih amina koji ne prolaze lako amidaciju, i nastaje odgovarajući dietilamid kao značajan nusprodukt u nekim slučajevima.



Shema 11. Primjeri XtalFluor-E -katalizirane amidacije<sup>53</sup>

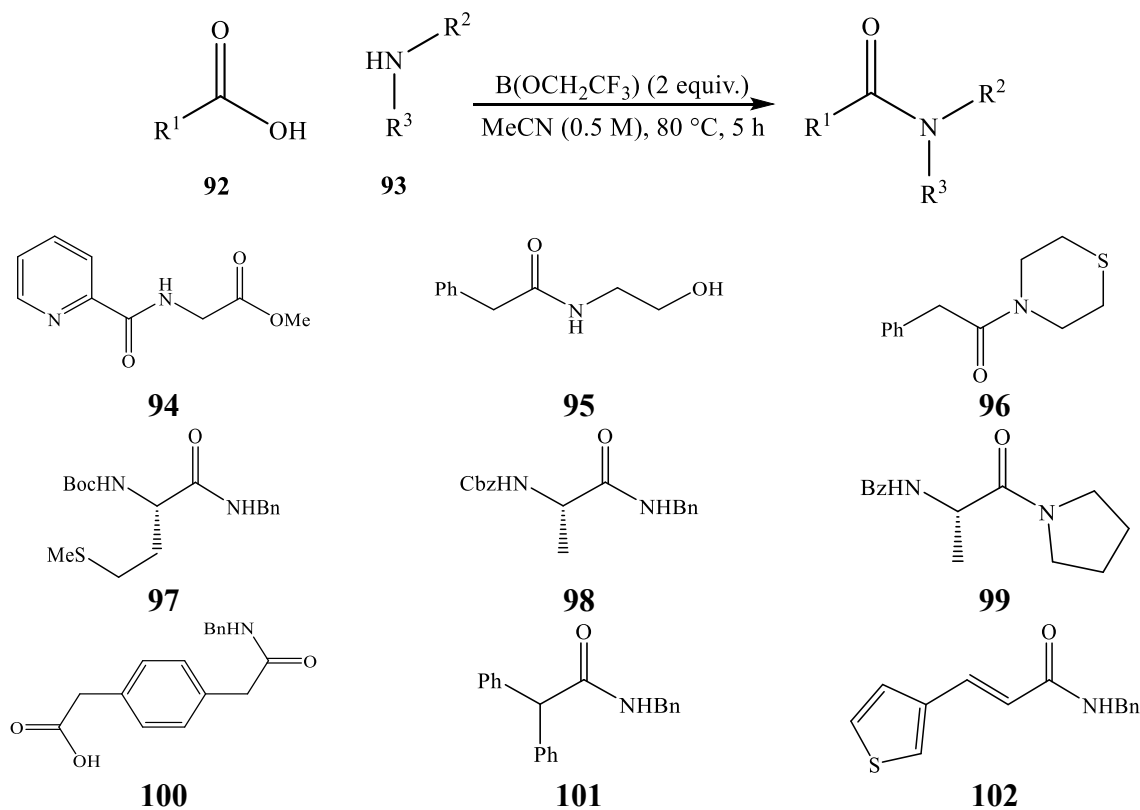
1-*tert*-butoksi-2-*tert*-butoksikarbonil-1,2-dihidroizokvinolin (BBDI, Shema 12) je isproban kao novi kopulirajući reagens koji može učinkovito posredovati u reakcijama amidacije na sobnoj temperaturi<sup>62</sup>. Karboksilna kiselina se aktivira kao miješani anhidrid nakon eliminacije izokinolinske izlazne skupine i *t*BuOH. Ovaj postupak se provodi u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i zahtijeva višak oba BBDI i amina.



Shema 12. Mehanizam BBDI -katalizirane amidacije<sup>53</sup>

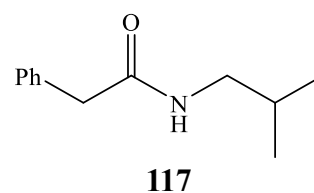
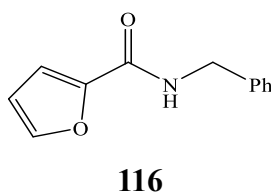
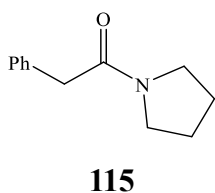
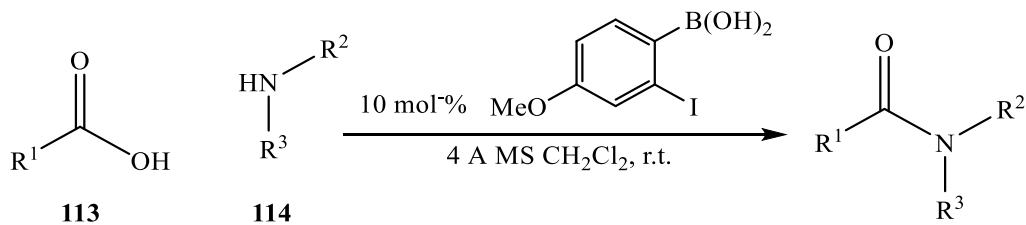
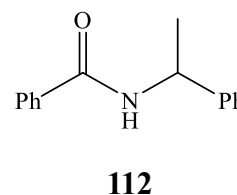
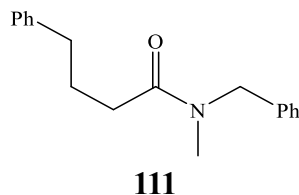
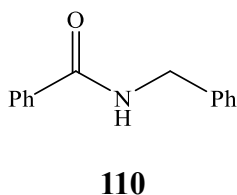
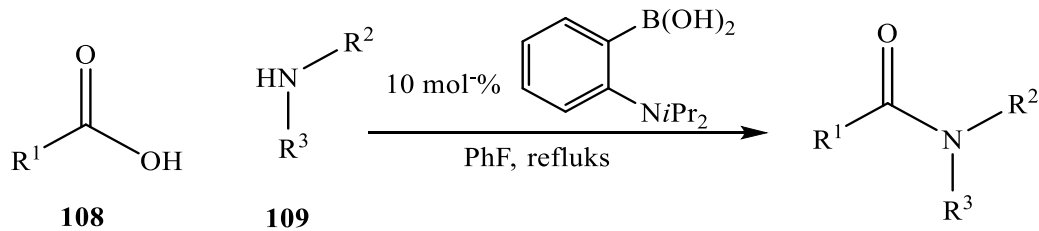
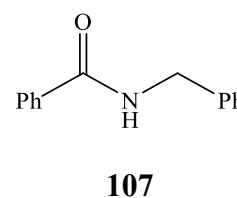
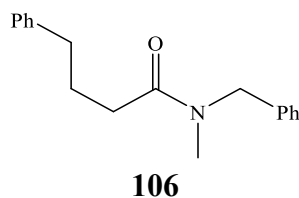
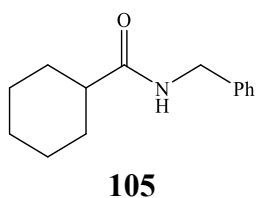
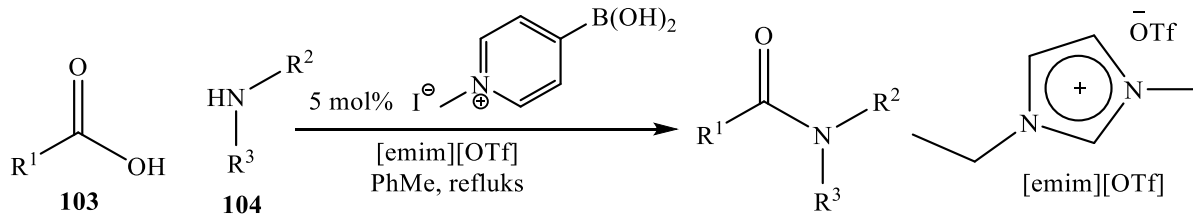
Boratni esteri su potencijalno atraktivni reagensi za amidiranje jer se lako pripremaju i lako se njima rukuje.

Otkriveno je da su  $B(OMe)_3$  i  $B(OCH_2CF_3)_3$  vrlo učinkoviti reagensi za izravne reakcije amidiranja u MeCN, u nedostatku bilo kakvih dodanih kiselina<sup>63,64</sup>. Oba estera  $B(OMe)_3$  i  $B(OCH_2CF_3)_3$  su komercijalno dostupni. Reagens  $B(OCH_2CF_3)_3$  je znatno učinkovitiji od  $B(OMe)_3$  i može se koristiti za reakcije amidacije sa širokim rasponom amina i karboksilnih kiselina uključujući mnoge funkcionalizirane primjere, koji pokazuju nisku ili lošu reaktivnost s drugim sustavima na bazi bora (Shema 13).



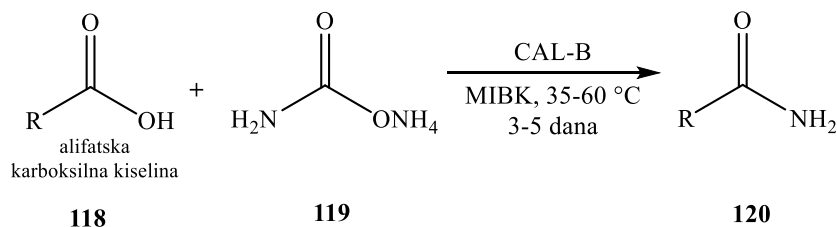
**Shema 13.** Primjer  $B(OCH_2CF_3)_3$  vođene amidacijske reakcije<sup>53</sup>

Borne se kiseline kao katalizatori za amidaciju karboksilnih kiselina aminima, koriste od 1996. i ovo je područje istraživanja privuklo značajan interes (Shema 14). Ove reakcije zahtjevaju zagrijavanje uz refluks u PhMe, ksilenu ili mezitilenu s MS kao sredstvom za sušenje. Iako su općenito postignuta izvrsna iskorištenja, postojao je ograničen opseg supstrata i u mnogim su slučajevima bila potrebna duga vremena reakcije (do 29 sati). Toplinske pozadinske amidacije pod ovim uvjetima vjerojatno biti značajne za one slučajeve koji uključuju relativno reaktivne kombinacije kiseline i amina<sup>57</sup>.



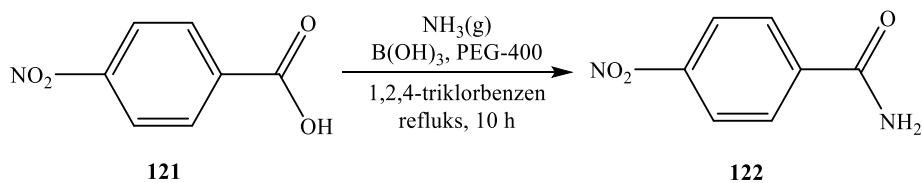
**Shema 14.** Bornom kiselinom katalizirane amidacijske reakcije<sup>53</sup>

Direktna sinteza primarnih amida uz korištenje katalizatora predstavlja atraktivan pristup. Kao relevantna metodologija pokazalo se korištenje enzima, odnosno biokatalizatora *Candida antarctica lipase* (CAL-B) za reakciju karboksilne kiseline s amonijakom u organskom otapalu (metil izobutil ketonu (MIBK))<sup>65</sup> prema Shemi 15.



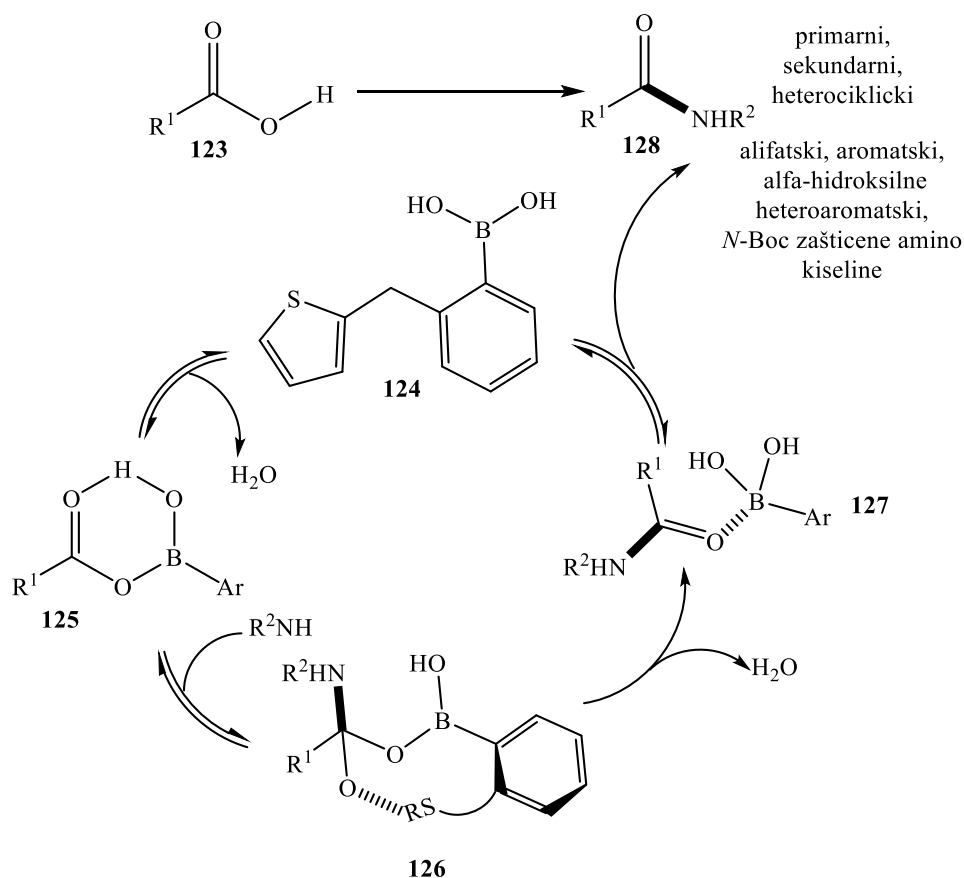
**Shema 15.** Biokatalizirana sinteza primarnog amida<sup>65</sup>

Korištenje učinkovitog katalizatora faznog prijenosa PEG-400 s amonijakom uz  $\text{Ti}(\text{O}i\text{Bu})_4$  i  $\text{H}_3\text{BO}_3$  u timu Shteinberga i suradnika, rezultiralo je odličnim iskorištenjima pri sintezi 4-nitrobenzamida (Shema 16)<sup>66</sup>.



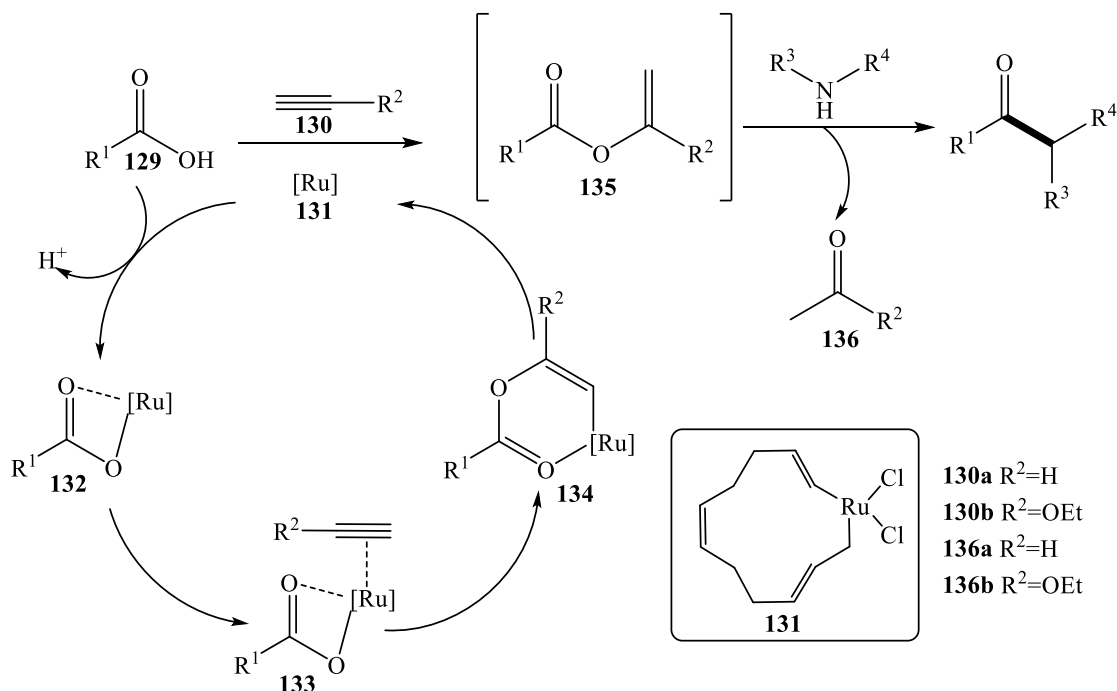
**Shema 16.** Sinteza 4-nitrobenzamida<sup>66</sup>

Među nedavno proučenim učinkovitim borovim katalizatorima ističe se (2-(tiofen-2-ilmetil)fenil) borna kiselina **124**<sup>67</sup>. Ovaj katalizator je uspješno primijenjen za izravnu amidaciju alifatskih,  $\alpha$  hidroksilnih, aromatskih, heteroaromatskih kiselina i *N*-Boc-zaštićenih aminokiselina kao i primarnih, sekundarnih i heterocikličkih amina. Pretpostavljalo se da atom sumpora u katalizatoru igra dvostruku ulogu olakšavajući formiranje aciloksiborovog intermedijera **125** i kolaps **126**, prema Shemi 17.



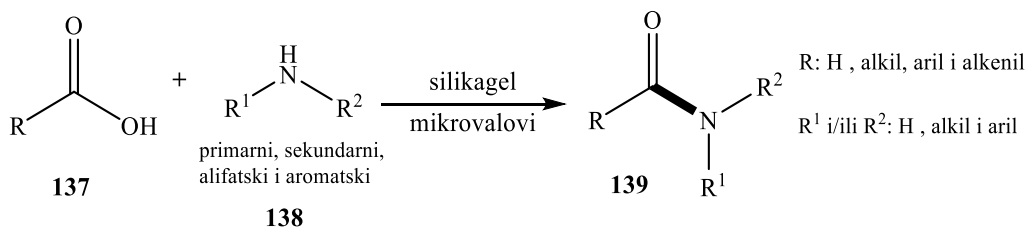
**Shema 17.** Katalitički ciklus za izravnu amidaciju karboksilnih kiselina kataliziranih **124**<sup>67</sup>

Goossen i suradnici<sup>68</sup> u svom radu bavili su se novom metodom za izravnu amidaciju karboksilnih kiselina preko acetilena **130a** ili aktivacijom etoksiacetilena **130b** i kataliziranu rutenijevim kompleksom **131**. U ovom slučaju, nakon početne koordinacije acetilena i karboksilata na rutenijev atom, nastaje enolni ester **135** koji djeluje kao acilirajuće sredstvo za amin. Željeni amid se dobiva s u izvrsnim iskorištenjima, zajedno s hlapljivim acetaldehidom **136a** ili etil-acetatom **136b** kao jedinim nusproduktima (Shema 18). Metoda pruža izvrsna iskorištenja s aromatskim, heteroaromatskim i alifatskim karboksilnim kiselinama, kao i primarnim i sekundarnim aminima.



**Shema 18.** Izravna katalitička amidacija rutenija preko enolnih estera<sup>68</sup>

Izravna kondenzacija karboksilnih kiselina i amina pod mikrovalnim zračenjem provedena je i s čvrstim kromatografskim silikagel nosačem<sup>69</sup> (Shema 19). Na taj način veliki broj amida može biti lako sintetiziran s izvrsnim iskorištenjima korištenjem primarnih ili sekundarnih alifatskih amina. Ova se metoda također može primijeniti i na aromatskim aminima s umjerenim iskorištenjima. Uspješno se mogu koristiti i alifatske, aromatske i nezasićene karboksilne kiseline. Mezoporozni silicij SBA-15<sup>70</sup> i spojevi na bazi S-triazina<sup>71</sup> mogu katalizirati ovu transformaciju, ali sa širim opsegom supstrata.



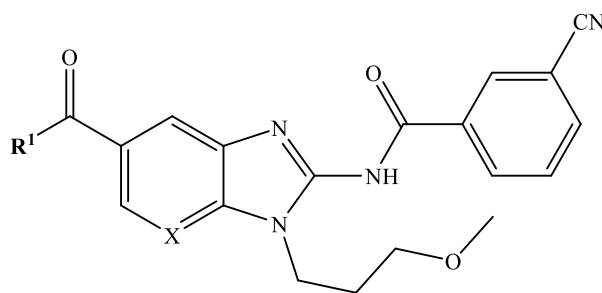
**Shema 19.** Izravna amidacija pod mikrovalnim zračenjem korištenje silikagela kao čvrste potpore<sup>69</sup>



## 2.4. Biološka aktivnost amidnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

Istraživačkoj skupini znanstvenika McGuinnessa<sup>72</sup> cilj je bio dizajnirati i prirediti nove organske spojeve koji bi mogli blokirati adenzinske A<sub>2A</sub> receptore, pri čemu se ostvaruje posljedica na dopaminergičke signalne putove jer je A<sub>2A</sub> receptor lokaliziran zajedno s dopaminskim receptorima u regiji mozga striatumu, pa je tako ta modulacija relevantna primjerice za Parkinsonovu bolest.

Nakon sistematičnog proučavanja odnosa strukture i reaktivnosti (SAR), te *in vitro* mikrosomalne stabilnosti u jetri, tim je identificirao ključne molekularne segmente koji pridonose veznoj aktivnosti ( $K_i$  (nM)) i selektivnosti spoja na adenzinski A<sub>2A</sub> receptor. Jedan od njih je 3-cijanobenzoilna skupina na 2-azabenzimidazolnom prstenu i 3-metoksipropilna skupina na N3 poziciji imidazolnog prstena koja je držana konstantnom u daljnjim pokušajima optimiranja.

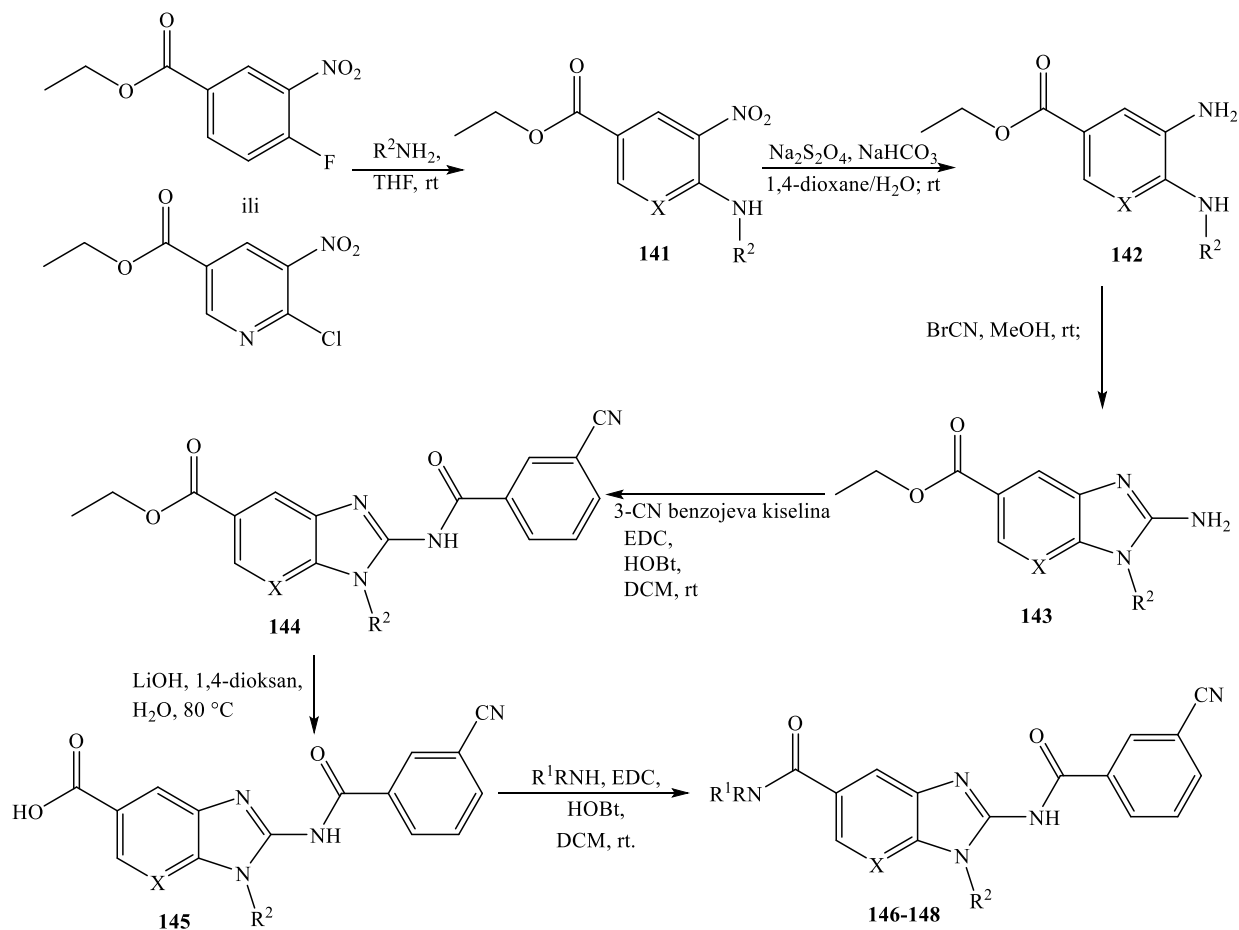


**Tablica 1.** Efekt središnjeg prstena na *in vitro* mikrosomalnu stabilnost

spoj	R <sup>1</sup>	X	A <sub>2A</sub> vezanje $K_i$ (nM)	mikrosomalna stabilost u jetri (% ostao-0,5h)
<b>146a</b>	<i>n</i> -butilamino	CH	48	27%
<b>146b</b>	<i>n</i> -butilamino	N	40	95%
<b>146c</b>	piperidinil	CH	48	67%
<b>146d</b>	piperidinil	N	9,6	90%

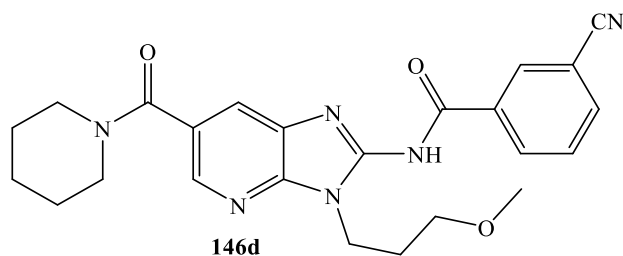
Podaci iz Tablice 1. sugeriraju povećanje mikrosomane stabilnosti kada je benzimidazolska jezgra zamijenjena imidazo[4,5-*b*]piridinskom jezgrom. Kako ta promjena nije negativno utjecala na afinitet vezanja, dapače, viša  $K_i$  vrijednost bi zapravo ukazivala na slabiji afinitet vezanja lijeka i njegovog ciljnog receptora, odnosno znači da je potrebna veća koncentracija lijeka kako bi se postiglo 50% popunjenosti aktivnog mjesta receptora: lijek ima manji afinitet za receptor i teže se natječe s drugim ligandima ili spojevima koji se vežu na isti receptor<sup>73,74</sup>.

Sintetski put u fazi otopine (Shema 20) korišten je za generaciju imidazo-piridinskih analoga s ciljem razumijevanja SAR za supstituente  $R^1$  i  $R^2$ . Odgovarajući *orto*-nitro, i halogeno-supstituirani benzojev ester reagirao je s aminom da bi se dobio međuprodukt **141**. Redukcija nitro-supstituiranog derivata u diamin **142**, ciklizacija s cijanogenim bromidom do **143**, i vezanje s 3-cijanobenzojevom kiselinom, dala je ester **144**. Hidrolizom je dobivena kiselina **145** koja je uz pomoć karbodiimida pretvorena u amidne analoge u analoge **146-148**.



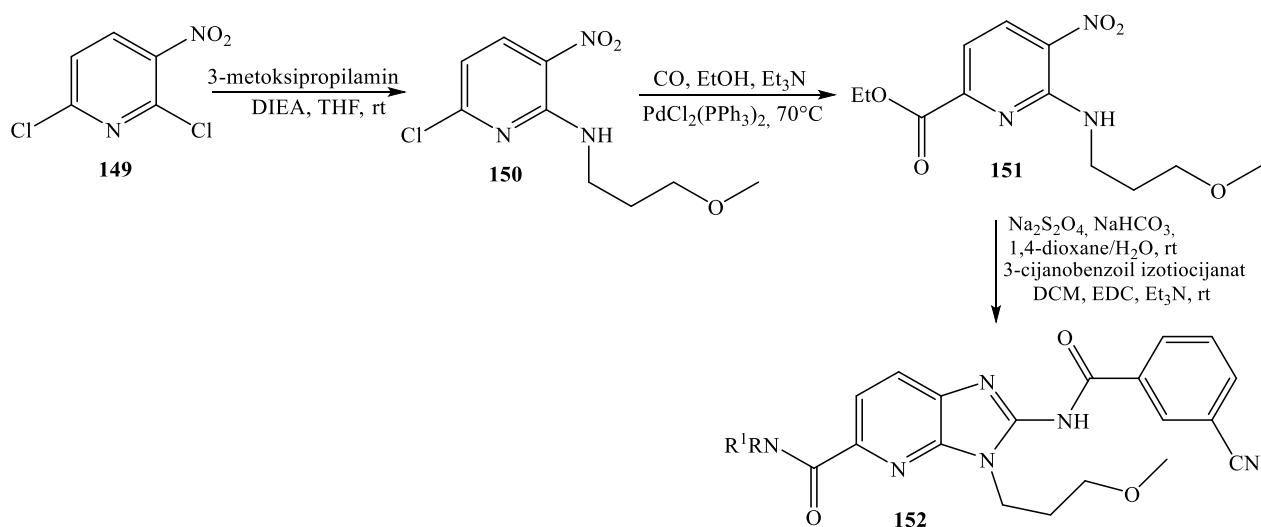
**Shema 20.** Sinteza analoga **146-148**

SAR je proučavan za  $R^1$  supstituente na poziciji 5 piridinskog prstena pri čemu je na temelju dobivene  $K_i$  vrijednosti tijekom varijacija od primarnog amida, tercijarnog amida, te sterički zbijenih amida utvrđeno da *N*-piperidinlna supstitucija produkta **146d** vidljiva na Slici 8, daje najbolje rezultate, te je kao takva zadržana fiksnom u daljnoj studiji SAR.



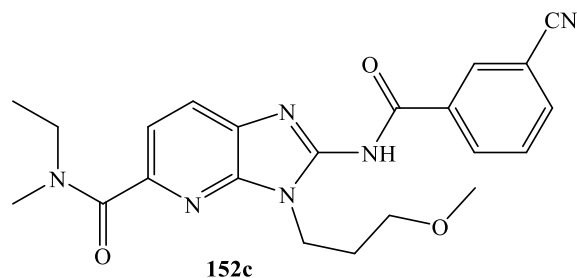
**Slika 8.** Struktura molekule zadržana nakon provedbe SAR za R<sup>1</sup>

Zatim su paralelno provedeni pokušaji modifikacija za R<sup>2</sup> poziciju (N3 atom imidazalnog prstena), te *para* poziciju R<sup>1</sup> *N*-piperidinlnog supstituenta. Smanjivanje 3-metoksipropilnog lanca do jednostavnijeg metilnog ili zamjena kisika s metilenskom skupinom, dovela je do 15x smanjenog afiniteta prema A<sub>2A</sub> receptoru. Radi toga je pretpostavljeno da kisikov atom nužan na tom lancu te da služi kao akceptor vodikove veze s A<sub>2A</sub> receptorom. Provedeno je i uvođenje *N* atoma u *para* poziciju kako bi se dobio *N*-morfolinski amid na R<sup>1</sup> poziciji uz relativno neznatnu promjenu (relokaciju kisika bliže imidazopiridinskoj jezgri), pri čemu je ostvaren i najbolji omjer A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub>, no ipak je odlučeno zadržati izvorni 3-metoksipropilni lanac kao u **146d** jer on zadovoljava optimalne elektronske i steričke karakteristike pogodne za A<sub>2A</sub> receptor. Budući da se R<sup>1</sup> amid pokazao najtolerantnijim prema promjena, istražena je mogućnost premještanja ove funkcionalne skupine iz položaj od 6 u položaj 5 imidazopiridina. Sinteza ovih analoga **152a-152d** prikazana je u Shemi 21. Reakcija 2,6-diklor-3-nitropiridina **149** s 3-metoksipropilaminom dala je međuprodukt **150**. Karboniranje katalizirana paladijem dala je ester **151** koji je preveden u željene analoge **152a-152d**.



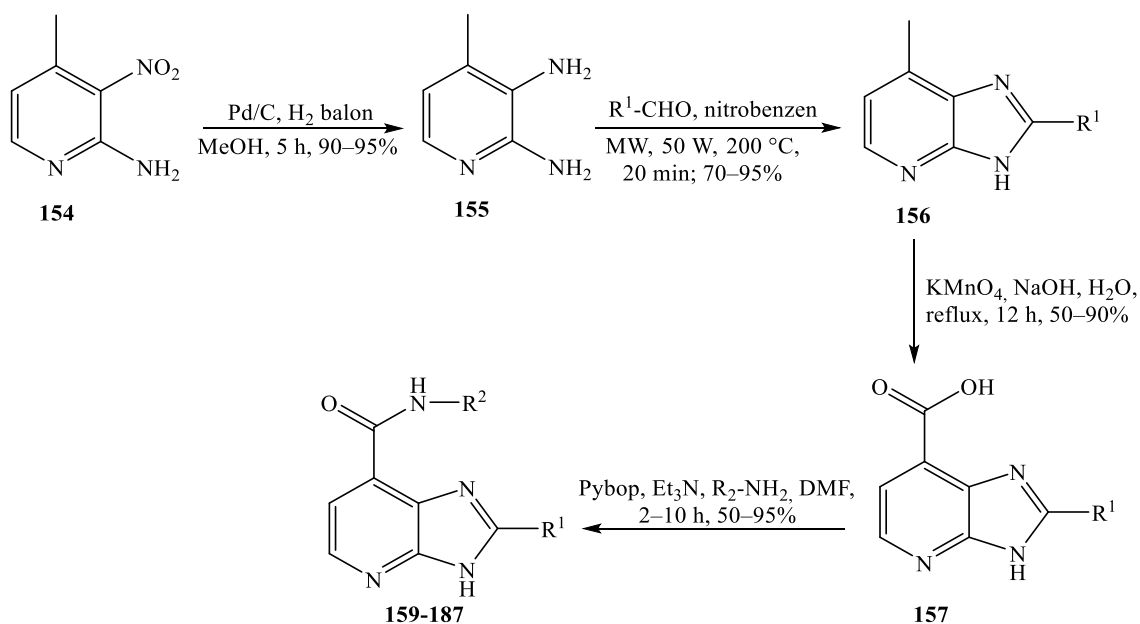
**Shema 21.** Sinteza analoga **152a-152d**

SAR-om je utvrđeno da su mali alkil-tercijarni amidi poželjni na R<sup>1</sup> poziciji pri čemu je analog **152c** (Slika 9) pokazao najbolji ukupni profil željene *in vitro* cAMP test aktivnosti, dobre plazma izloženosti, umjerene stabilnost u testu jetrenih mikrosoma, skromne razine u mozgu nakon oralnog doziranja u štakorima, 80-struke selektivnosti prema A<sub>1</sub> receptoru te je tako postao oralno dostuppan antagonist A<sub>2A</sub> s  $K_i = 12$  nM.



**Slika 9.** Dobivena molekula antagonist A<sub>2A</sub> receptora

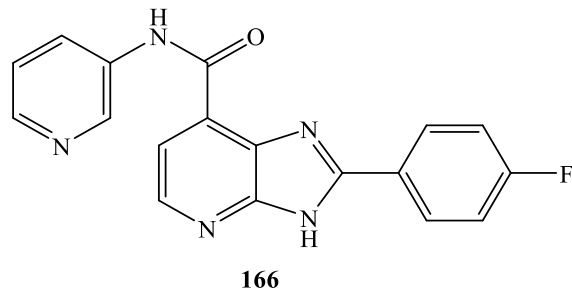
Tim korejskih znanstvenika predvođen Seung-Chul Lee-jem osmislilo je i sintetizirao seriju imidazo-piridinskih analoga kao inhibitora GSK3 $\beta$  enzima<sup>75</sup>. GSK3 je serin/treonin kinaza, izvorno identificirana kao enzim odgovoran za inaktivaciju glikogen-sintaze<sup>76</sup>. Uključen je u mnoge različite biološke procese uključujući glukozu homeostazu, preživljavanje stanica, tumorogenezu i Alzheimerovu bolest<sup>77</sup>. Strategija je uključivala strukturnu modifikaciju prethodno sintetizirane 7-hidroksibenzimidazolne jezgre, jer je utvrđeno kako C7-hidroksi skupina funkcionira kao donor i akceptor vodikove veze u interakciji s Asp133 i Val135 aminokiselinama u katalitičkoj domeni GSK3 $\beta$ . Odlučeno je promijeniti 7-hidroksibenzimidazolnu jezgru u imidazo-piridinsku, koja ima manju molekulsku masu i tolerantija je prema potencijalnoj glukuronidaciji<sup>78</sup>. Sinteza derivata prikazana je na Shemi 22. Komercijalno dostupan 2-amino-3-nitro-4-metilpiridin **154** preveden je u diamin **155** paladijem kataliziranom redukcijom. Kondenzacija **155** s različitim aldehidima pod mikrovalnim zračenjem na 200 °C, dala je odgovarajući imidazo-piridinski međuprodukt **156**. Oksidacija **156** s KMnO<sub>4</sub> i NaOH u H<sub>2</sub>O na refkusu dala je kiselinu **157**. Amidacijom s odgovarajućim amina u prisutnosti Pybop i Et<sub>3</sub>N u DMF dobiveni su imidazo-piridini **158-187**.



<b>159</b> R <sup>1</sup> = Ph	<b>166</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph	<b>173</b> R <sup>1</sup> =2-tiofenil	<b>180</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph
<b>160</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph	<b>167</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph	<b>174</b> R <sup>1</sup> =3-tiofenil	<b>181</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph
<b>161</b> R <sup>1</sup> =2,4-di-F-Ph	<b>168</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph	<b>175</b> R <sup>1</sup> =3-furanil	<b>182</b> R <sup>1</sup> =4-OMe-Ph
<b>162</b> R <sup>1</sup> =2-tiofenil	<b>169</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph	<b>176</b> R <sup>1</sup> =3-tiofenil	<b>183</b> R <sup>1</sup> =3-OMe-Ph
<b>163</b> R <sup>1</sup> =3-tiofenil	<b>170</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph	<b>177</b> R <sup>1</sup> =4-fenilpirolidin	<b>184</b> R <sup>1</sup> =3-piridinil
<b>164</b> R <sup>1</sup> =3-furanil	<b>171</b> R <sup>1</sup> =4-Cl-Ph	<b>178</b> R <sup>1</sup> =4-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N-Ph	<b>185</b> R <sup>1</sup> =3-OMe-Ph
<b>165</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph	<b>172</b> R <sup>1</sup> =3-furanil	<b>179</b> R <sup>1</sup> =4-F-Ph	<b>186</b> R <sup>1</sup> =3-Cl-Ph
			<b>187</b> R <sup>1</sup> =4-piridin

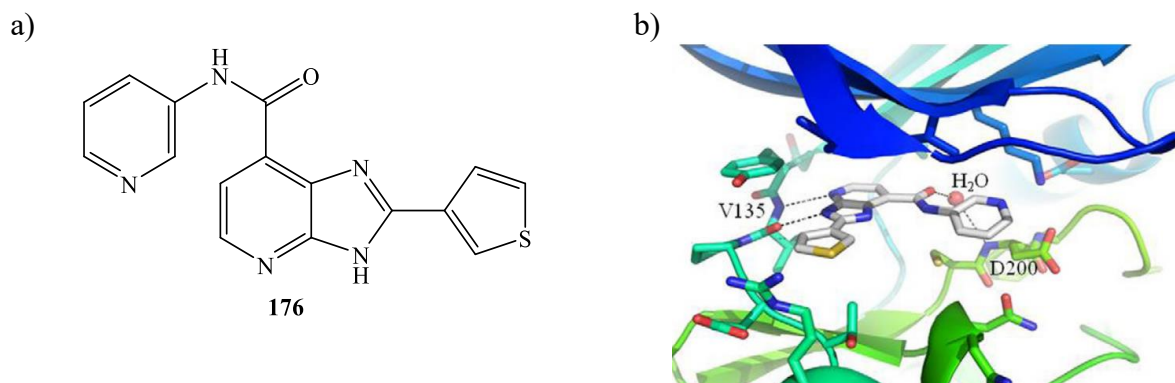
### Shema 22. Sinteza imidazo[4,5-*b*]piridinskih analoga

Svi sintetizirani analozi su pokazali izvrsnu inhibitornu aktivnost (IC<sub>50</sub> 9– 44 nM) i prihvatljivu koncentraciju u izazivanju učinkovitog staničnog odgovora (EC<sub>50</sub> 56–300 nM), no najviše se istaknuo analog **166** (Slika 10), koji ne samo da je imao prihvatljivu vrijednost (EC<sub>50</sub> 130 nM) i izvrsnu inhibitornu aktivnost (IC<sub>50</sub> 8 nM), ali i optimalna fizikalno-kemijska svojstva s clogP (2,73) i PSA (83,56 Å<sup>2</sup>) koja označava površinu molekule koja sposobna za interakciju s polarnim otapalima ili biološkim metama.



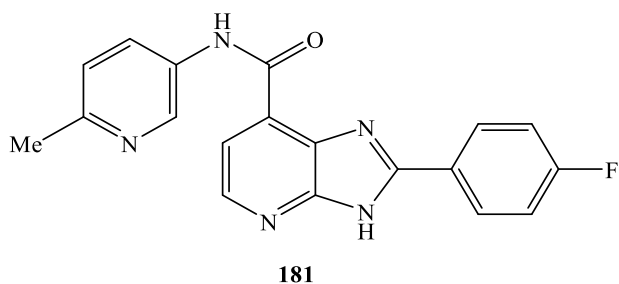
**Slika 10.** Struktura spoja **166**

Nadalje, sintetizirani su analozi temeljeni na strukturi **166** (Slika 11 a). Način vezivanja imidazo-piridinskih analoga u katalitičkoj domeni GSK3 $\beta$  (Slika 11 b) opisan je korištenjem analoga **176**, i to rendgenskom kristalografijom. Imidazo-piridin djeluje kao donor i akceptor vodikove veze s karbonilnom i amino skupinom Val 135.



**Slika 11.** a) Struktura spoja **176**; b) Interakcija H-veza amina piridina i NH imidazopiridina s NH Val 135, karbonilom Val 135; karbonil amidnog linkera stupa u interakciju s NH od Asp200 putem H<sub>2</sub>O

Spoj **181** (Slika 12) priređen je kao hidrokloridna sol za oralnu primjenu kod ICR miševa, te je podvrgnut farmakokinetičkoj studiji. Glukoza je oralno ubrizgana nakon 30 minuta primjene analoga **181** i kao što se očekivalo, on je učinkovito snizio glukozu u plazmi pri dozama od 100 mg/kg i 10 mg/kg. Trenutno se provode daljnja biološka i farmakološka istraživanja analoga **181** za terapijske implikacije.

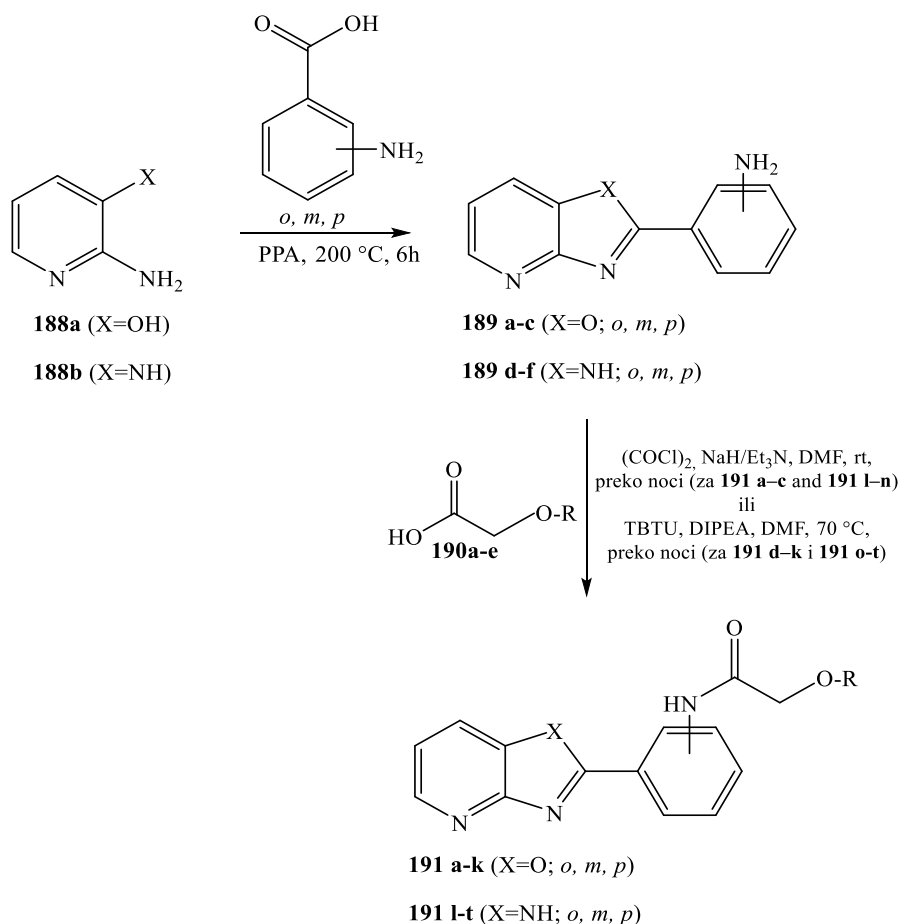


**Slika 12.** Struktura spoja **181**

2017. godine znanstvenik Naresh Sunduru i suradnici sintetizirali su novu vrstu derivata imidazopiridina kao potencijalnih inhibitora enzima FAAH<sup>79</sup>. Pri sintezi spojeva vodili su se činjenicom da njihov spoj mora imati određene strukturne sličnosti s prirodnim supstratima FAAH enzima, a to su AEA i 2-AG. Budući da je FAAH enzim koji specifično prepoznaje i hidrolizira te molekularne strukture, molekule lijeka dizajnirane da inhibiraju FAAH moraju ostvariti slične interakcije s aktivnim mjestom enzima.

Neke važne funkcijske skupine koje se obično koriste u inhibitorima FAAH jesu **amidna skupina** jer i 2-AG i AEA sadrže amidnu vezu, koja je podložna hidrolizi pomoću FAAH-a, zatim **masnokiselinski dio** jer se ti prirodni supstrati sastoje se od dugolančanih masnih kiselina te je stoga poželjno u dizajnu spojeva uključiti nezasićene alkilne lance, **aromatski prstenovi** jer AEA posjeduje aromatski prsten, te **hidrofobne skupine** jer i 2-AG i AEA imaju hidrofobne regije koje stupaju u interakciju s hidrofobnim ostacima unutar FAAH<sup>80,81,82</sup>.

Derivati oksazolo[4,5-*b*]piridina (**191 a–k**) i 1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina (**191 l–t**) s 2-alkoksi i 2-ariloksiacetamidnim supstituentima u *orto*, *meta* i *para* položaju sintetizirani su kratkom i učinkovitom rutom prikazanom na Shemi 23. Ovaj sintetski put učinkovito daje pristup ariloksi- i alkil-oksi acetamidima u svim položajima izomera bez potrebe za zaštitom imidazolne NH skupine.

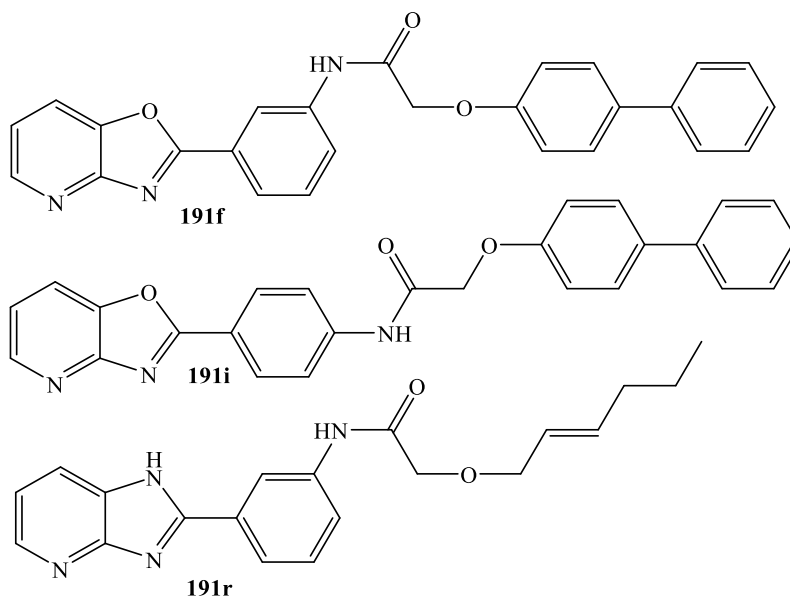


**Shema 23.** Sintetizirani spojevi, reagensi i uvjeti

Intermedijeri **189 a–c** i **189 d–f** dobiveni su kondenzacijom odgovarajućih aminopiridina **188a** i **188b** s odgovarajućim derivatima aminobenzojeve kiseline, u prisutnosti polifosforne kiseline kiselina (PPA)<sup>83,84</sup>. Sintetizirane kiseline **190 b–e** iz modificiranog postupka reakcijom arilnih- ili alifatskih alkohola s natrijevim jodoacetatom u prisutnosti NaH u umjerenim iskorištenjima<sup>85</sup>. Konačni *meta* i *para* spojevi **191 d–k** i **191 o–t** dobiveni su u umjerenim iskorištenjima iz odgovarajućih amina **189b**, **189c**, **189e** i **189f**, te kiselinskih derivata **190 a–e** pomoću TBTU kao sredstva za spajanje i DIPEA kao baze. *Orto*-oksazolopiridinanilidi **191 a–c** sintetizirani su reakcijom odgovarajućeg kiselinskog klorida sa spojem **189a** u prisutnosti NaH kao baze i *orto*-imidazopiridinanilida **191 l–n** reakcijom odgovarajućeg kiselinskog klorida s **189d** pomoću Et<sub>3</sub>N kao baze. Svi sintetiziranim spojevima **191 a–t** procijenjen je *in vitro* inhibicijski profil FAAH korištenjem homogenata mozga štakora kao izvora enzima i 0,5 μM [3H] AEA kao supstrata<sup>86,87</sup>.



SAR analiza je utvrdila kako među skupinom oksazolo[4,5-*b*]piridin-*meta*-anilida **191 d-h** spoj **191f** s bifenilnom eterskom skupinom najjače i potpuno blokira AEA hidrolizu s IC<sub>50</sub> vrijednošću od 0,63 μM. Među oksazolo[4,5-*b*]piridin-*para*-anilidima **191 i-k**, oksazolo[4,5-*b*]piridin-*para*-anilid s bifenilnom eterskom skupinom **191i** imao je IC<sub>50</sub> od 0,35 μM. U seriji **191 l-t** važna je oksazolo [4,5-*b*]piridinska jezgra te *orto*, *meta* i *para* izomeri s heks-2-en-1-ilom, bifenilom i 4-cikloheksilfenilnom skupinom na 1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridinskon anilidu. U ovom skupu, najaktivniji spoj je bio bifenil *para*-supstituirani derivat **191r** s IC<sub>50</sub> od 0,62 μM. Proveden je i molekularni docking (Slika 13).



**Slika 13.** Strukture produkata s najvećom IC<sub>50</sub> vrijednošću

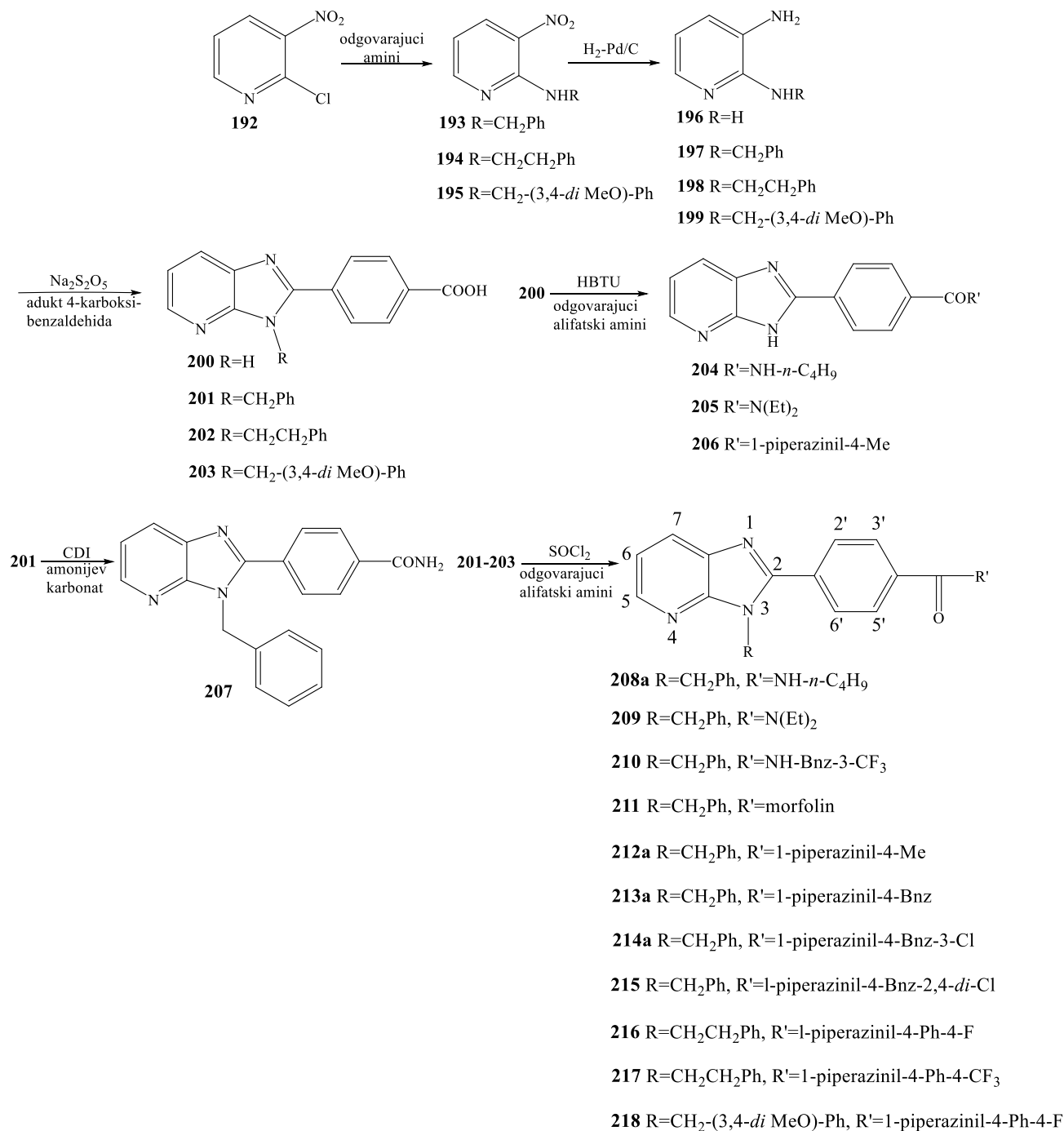
Izmjerene su i ΔG vrijednosti koje se, međutim, ne mogu koristiti kao pouzdan pokazatelj snage vezivanja između molekula i FAAH. Štoviše, snažan inhibitor **191f** smatra se slabim prema ΔG (-47 kcal/mol), dok je ekvipotentni inhibitori **191i** i **191r** imali su ΔG od -71, odnosno -67 kcal/mol. Dakle, vezanje ovih inhibitora na FAAH vjerojatno uključuje i interakcije posredovane vodom koja nije uračunata u energetske proračun.

Skupina turskih znanstvenika 2021. godine provela je sintezu amidnih derivata imidazo-piridna kao potencijalnih inhibitora enzima Aurora kinaze<sup>88</sup>. Aurora A, B i C kinaze pripadaju serin/treonin kinazama te je utvrđeno kako je prekomjerna ekspresija Aurore A pristuna u 94% invazivnog tkiva kod raka dojke, dok su okolna, zdrava tkiva imala normalne razine ekspresije Aurore A<sup>89</sup>.

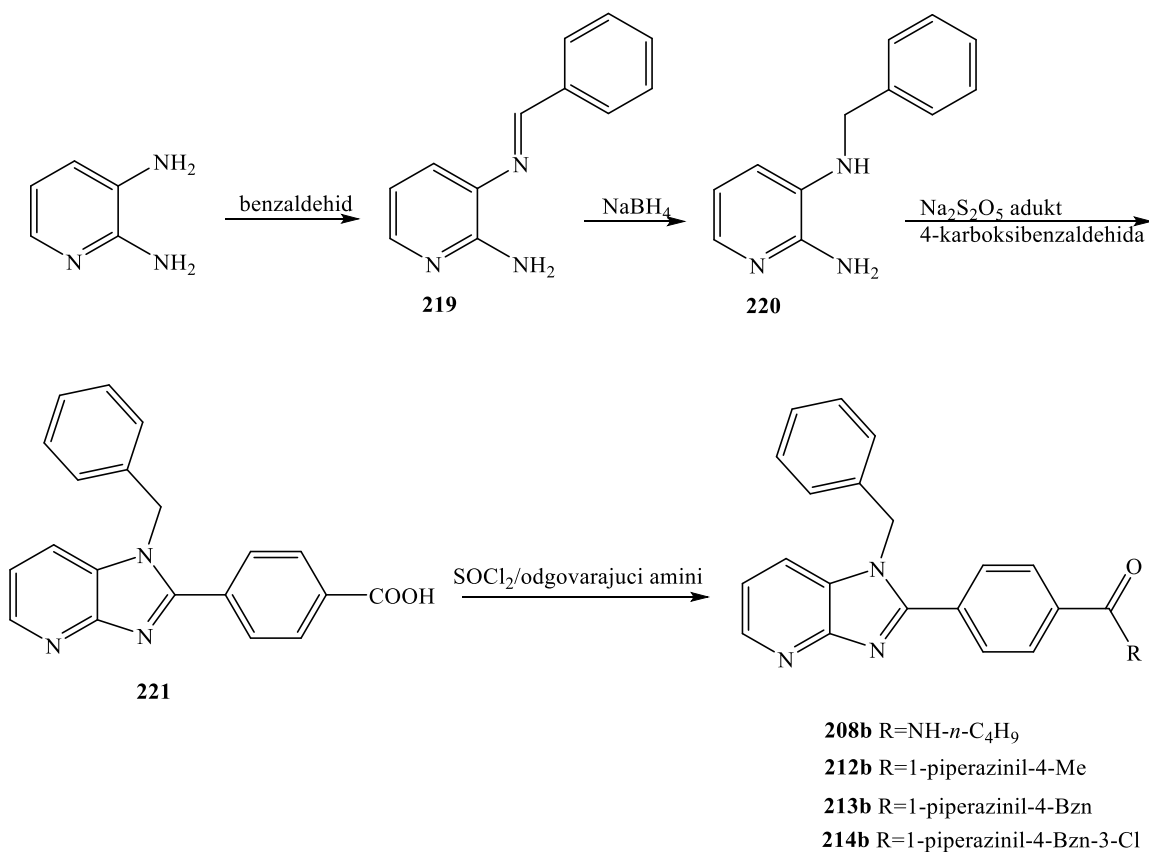
Kako je ATP prirodni supstrat ovog enzima, on u svojoj katalitičkoj domeni ima ATP vezni džep koji posjeduje različite aminokiselinske ostatke. Ključni cilj razvoja molekula kompetitivnih inhibitora ATP-a je dizajn molekula koje mogu učinkovito oponašati ili poremetiti ove interakcije (koje uključuju vodikove veze, elektrostatske interakcije i hidrofobne interakcije), čime se posljedično sprječava vezanje ATP-a i inhibira aktivnost kinaze. Vezanje ATP-a na Aurora kinaze uključuje interakcije sa specifičnim aminokiselinskim ostacima unutar ATP-vezujućeg džepa<sup>90,91,92</sup>.

Pretvorbom atoma klora u 2-klor-3-nitropiridinu u alkilamino skupinu aromatskom nukleofilnom supstitucijom i naknadnom redukcijom nitro skupine u spojevima **193–195**, pripremljeni su piridindiamini **196–199** (Shema 24). Ciklizacijom ovih spojeva s Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> adukt 4-karboksibenzaldehida u DMF-u dao je ciljane imidazo-piridine **200–203**. Nesupstituirani imidazo-karboksamidi **204–206** pripremljeni su amidifikacijom spoja **200** s odgovarajućim aminima, korištenjem HBTU. Amid **207** je pripravljen pomoću (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i CDI. Spojevi **201–203** prevedeni su u acilne kloride sa SOCl<sub>2</sub> i reakcija između odgovarajućih acilnih klorida i amina rezultirala je potrebnim benzamidima **208a–218** kao *N*3 regioizomerima.

Za sintezu **208b**, **212b–214b**, prvo je 2,3-diaminopiridin reagirao s benzaldehidom i dobiven je **219** (Shema 25). Redukcija spoja **219** s NaBH<sub>4</sub> dala je **220**. Reakcija **220** s aduktom Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 4-karboksibenzaldehida daje **221**. Konačno, konverzija karboksilne skupine spoja **221** u amid daje produkte **208b**, **212b–214b**.

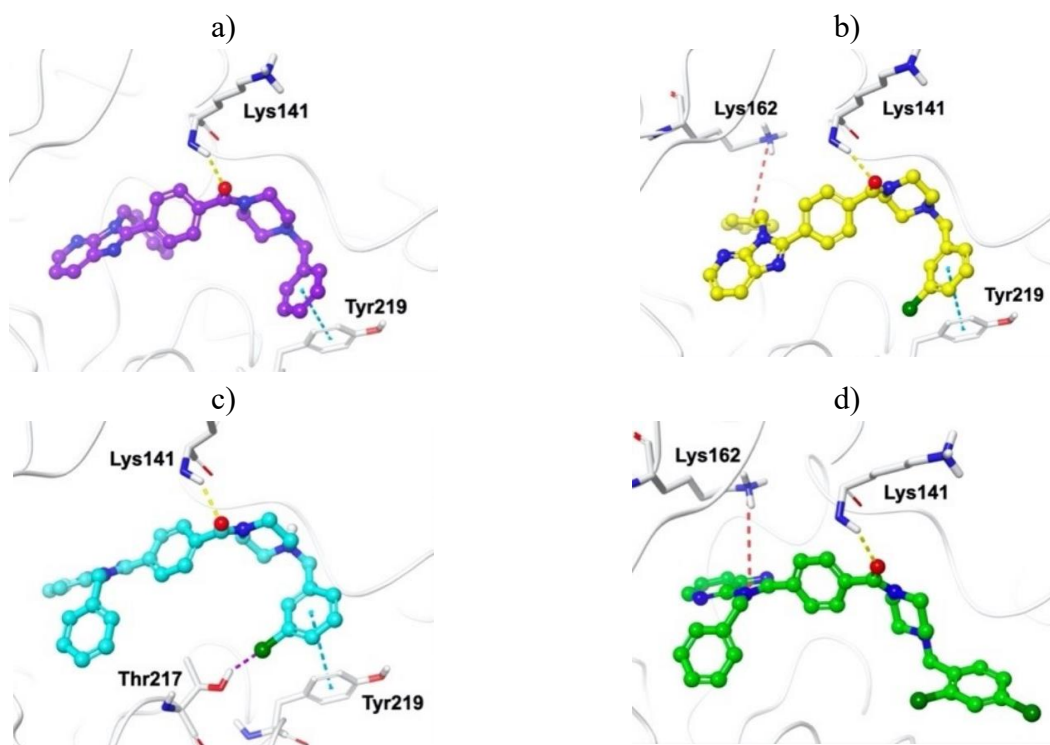


**Shema 24. Sinteza spojeva 204-218**



**Shema 25.** Sinteza spojeva **208b, 212b-214b**

Ispitana je *in vitro* citotoksična aktivnost prema staničnim linijama humane leukemije (K562 i HL-60), humanog raka debelog crijeva (HCT-116), humanog multiplog mijeloma (U266 i H929) i normalnoj staničnoj liniji mišjih fibroblasta (L929). Rezultati su izraženi kao vrijednosti inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>). Sintetizirani spojevi **213a-215** koji imaju benzilnu skupinu na imidazolnoj jezgri i (4-benzil piperazin) karbonil-fenil na C-2 položaju imidazo-piridina su najaktivniji derivati s IC<sub>50</sub> vrijednostima 5,9–9,8 μM. Također, napravljen je i docking spojeva **213a, 214a, 214b** i **215** u AURKA aktivno mjesto te je u slučaju svih spojeva karbonilni kisik amidne skupine djelovao kao akceptor vodikove veze stvaranjem H-veze s Lys141 (Slika 14).

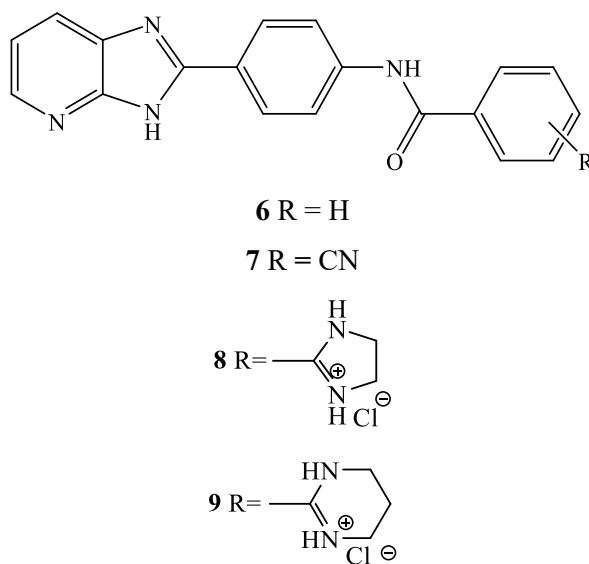


**Slika 14.** Predloženi način vezanja za spojeve **213a** (a), **214a** (b), **214b** (c), **215** (d) u aktivnom mjestu AURKA

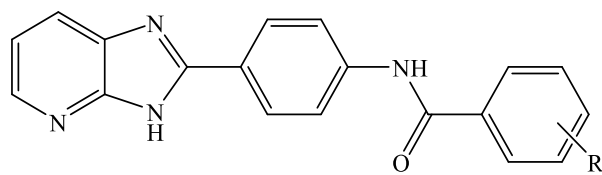
### **3. REZULTATI I RASPRAVA**

### 3.1. Cilj rada

U ovom radu priređene su dvije vrste amidnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina koji se razlikuju prema položaju amidne veze. Svi spojevi priređeni su klasičnim metodama organske sintetske kemije, dok je nitro-supstituirani derivat **11** priređen u reakciji s kopulirajućim reagensima, DIPEA i HATU. 4-supstituirani derivati *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)benzamida **6-9** pripremljeni su u reakciji između glavnog prekursora 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilina **3** i odgovarajućih benzoil-klorida **4-5** uz prisutnost trietilamina, dok je glavni prekursor, benzoil-kloridni derivat imidazo[4,5-*b*]piridina **16** za reakciju s odgovarajućim aromatskim aminima **17-19** prethodno aktiviran iz polazne kiseline **15** pomoću tionil-klorida u toluenu kako bi uz trietilamin u reakciji nukleofilne supstitucije dao 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-fenilbenzamide **20-26**. Iz odgovarajućih amidnih cijano-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **7** i **22** Pinnerovom reakcijom u dva stupnja u 2-metoksietanolu, priređeni su supstituirani 2-imidazolinski **8** i **25** i 1,4,5,6-tetrahidropirimidinski amidino spojevi **9** i **26**. Strukture svih priređenih spojeva, prikazane na Slikama 15-17 potvrđene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom, a neki spojevi su dodatno okarakterizirani masenom spektrometrijom i IR spektroskopijom. Spojevima **12** i **23** provedena je i spektroskopska karakterizacija korištenjem UV/Vis spektroskopije u šest otapala, a pH titracije provedene su u 13 različitih pH vrijednosti u svrhu potencijalne primjene kao optičkih pH senzora.



Slika 15. Ciljani benzamidi dobiveni iz amina

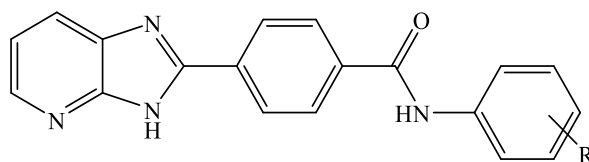


**11** R = NO<sub>2</sub>

**12** R = NH<sub>2</sub>

**13** R = NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>

**Slika 16.** Ciljani benzamidi dobiveni pomoću HATU i DIPEA



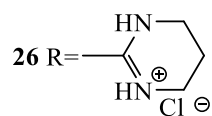
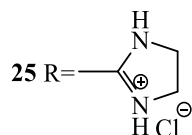
**20** R = H

**21** R = NO<sub>2</sub>

**22** R = CN

**23** R = NH<sub>2</sub>

**24** R = NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>

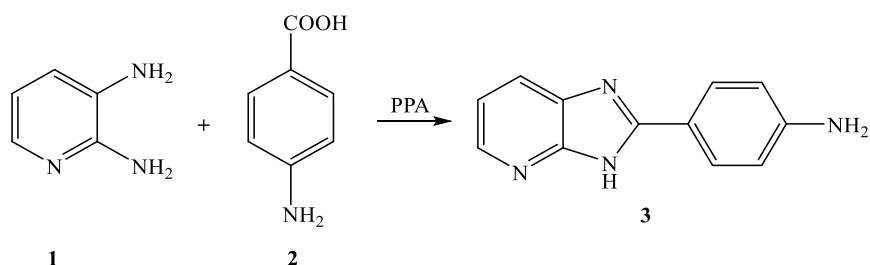


**Slika 17.** Ciljani benzamidi iz kiseline

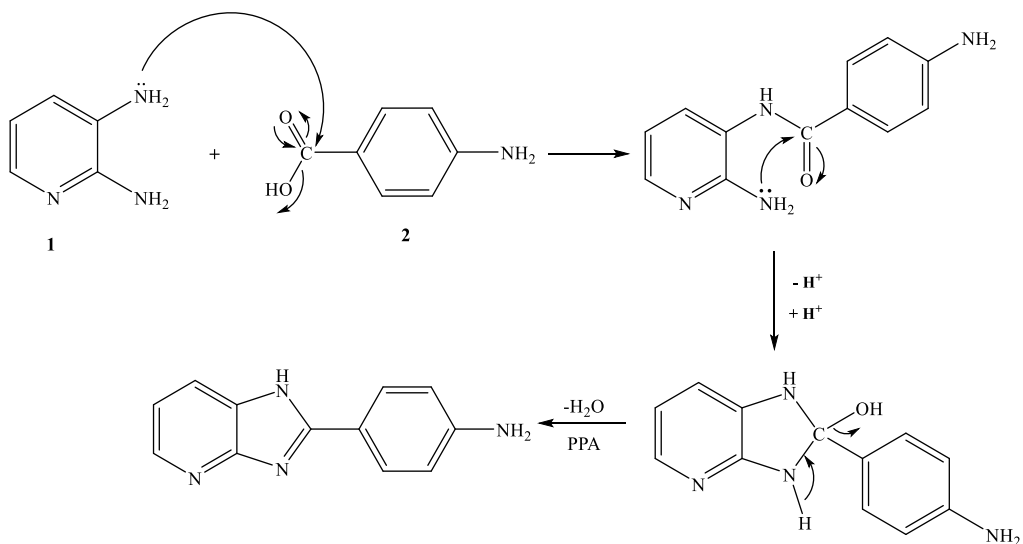


### 3.2. Sinteza ciljanih spojeva

Za sintezu ciljanih spojeva **6-9** prvo je bilo potrebno prirediti 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilin **3** kao glavni prekursor. Priređen je reakcijom kondenzacije 2,3-diaminopiridina s 4-aminobenzojevom kiselinom (PABA) u prisutnosti polifosforne kiseline (PPA). PPA je ujedno i dobro otapalo za organske spojeve, ali i donor protona koji pogoduje reakcijama kondenzacije i ciklodehidrirajući agens koji osigurava sporu intramolekularnu ciklizaciju u širokom rasponu temperatura<sup>93</sup>. Poznat je reagens u sintezi polimera, te dušikovih heterocikala<sup>94</sup>. Shema 26 prikazuje reakciju dobivanja, a na Slici 18 prikazan je mehanizam reakcije dobivanja spoja **3**.

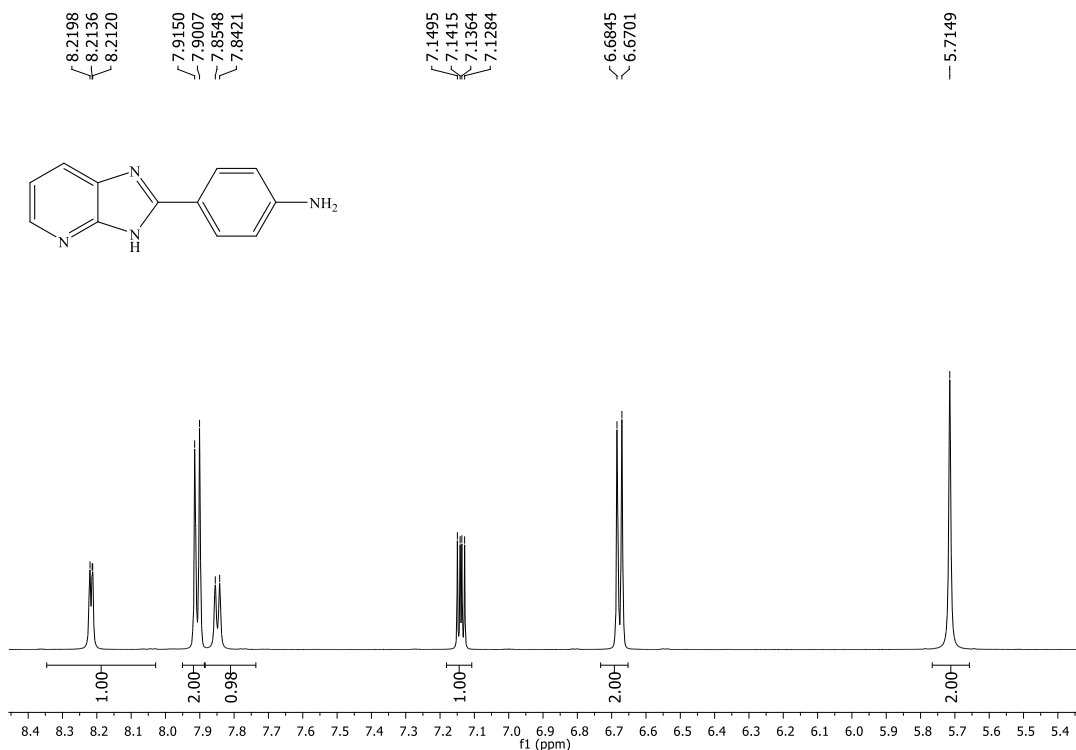


Shema 26. Sinteza 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilina **3**



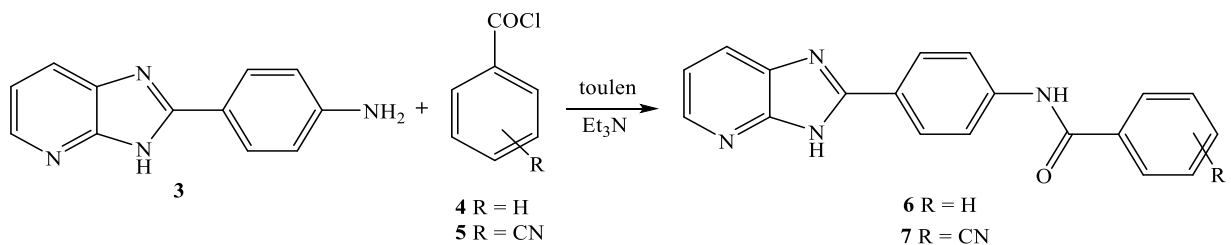
Slika 18. Mehanizam reakcije sinteze 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilina **3**<sup>95</sup>

Struktura spoja **3** potvrđena je <sup>1</sup>H NMR spektroskopijom, dobiven je u iskorištenju od 49,1%, te je sa Slike 19 na kemijskom pomaku 5,71 ppm vidljiv signal singleta integrala 2H koji se pripisuje protonima NH<sub>2</sub> skupine, a signali dvaju dubleta na kemijskim pomacima 8,17 i 7,85 ppm i dubleta dubleta na 7,14 ppm odgovaraju signalima piridinskih protona.



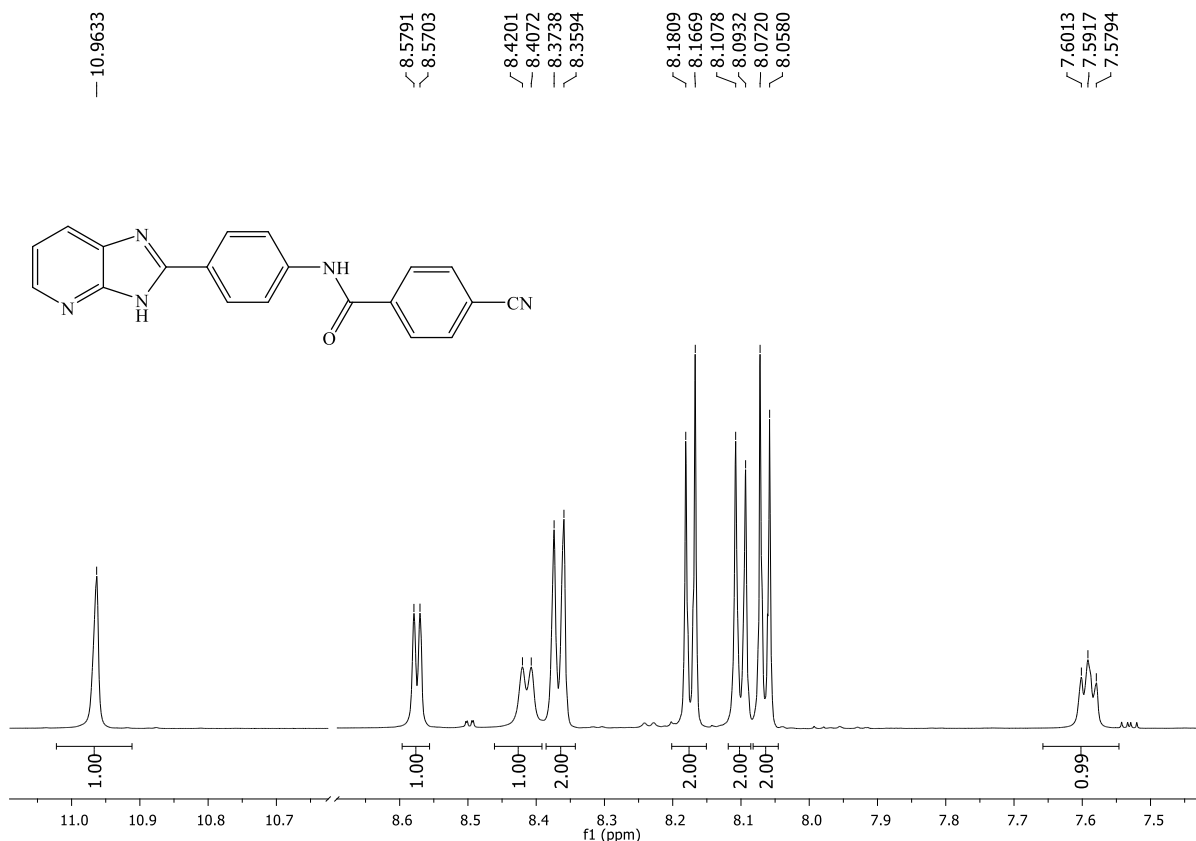
Slika 19. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 3

Iz dobivenogaminskogimidazo[4,5-*b*]piridinskogprekursora **3** nadalje su uz korištenje odgovarajućihbenzoil-klorida **4-5** u smjesiapsolutnogtoulena i DMFa, uz dodatak suviška trietilamina sintetizirani 4-supstituiraniderivati *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)benzamida **6-7** (Shema 27) u iskorištenjima od 69,4 i 48,0%. Riječ je o reakciji kondenzacije u kojoj amidnaveza nastaje na način da trietilamin djeluje kao baza i deprotoniraaminskugrupinu što zatim dovodi do stvaranja NH<sup>-</sup> aniona koji djeluje kao nukleofil i napadaelektrofilnikarbonilni ugljikov atom benzoil-klorida. Istovremeno atom klora izlazi kao dobra izlazeća skupina i stvara se nova veza između atoma dušika i ugljika, tj. amidni intermedijer kojeg ponovno Et<sub>3</sub>N sada protonira i djeluje kao slaba „kiselina“ pri čemu nastaje amidnaveza.

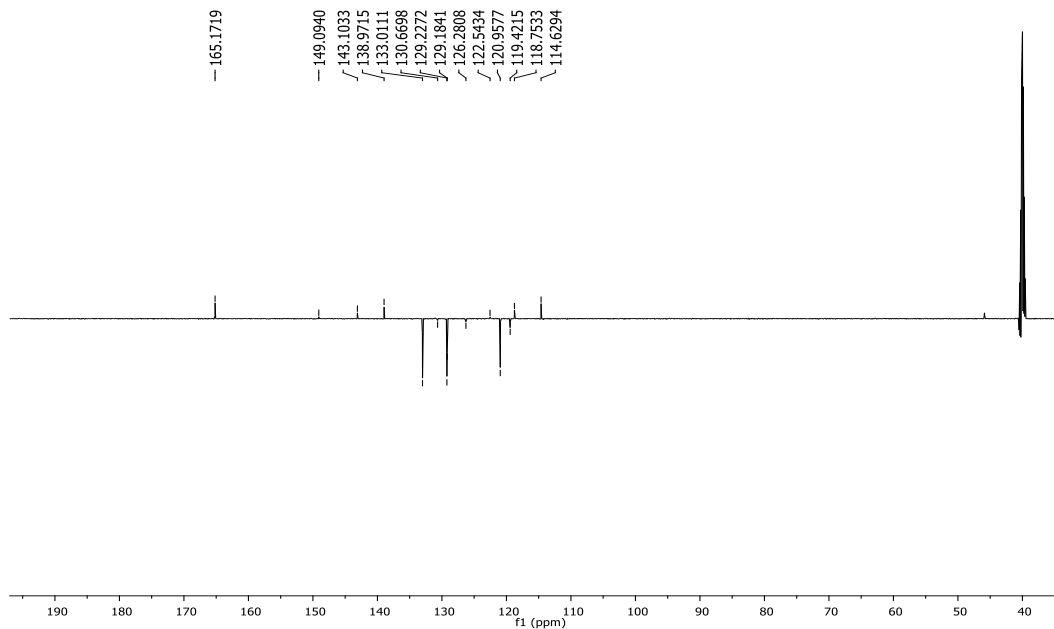


Shema 27. Sinteza ciljanih spojeva **6** i **7**

Slika 20 a) prikazuje  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4 cijanobenzamida **7**. U nezasjenjenom dijelu spektra na kemijskom pomaku 10,96 ppm nalazi se signal protona amidne veze, a u aromatskom dijelu spektra u području od 7,59 do 8,57 ppm mogu se uočiti signali za osam protona fenilne jezgre integrala 2H, te signali tri protona integrala 1H na piridinskoj jezgri. Slika 20 b) također potvrđuje strukturu spoja **7** pri čemu signal na kemijskom pomaku 165,17 ppm odgovara kvaternom ugljiku amidne veze.

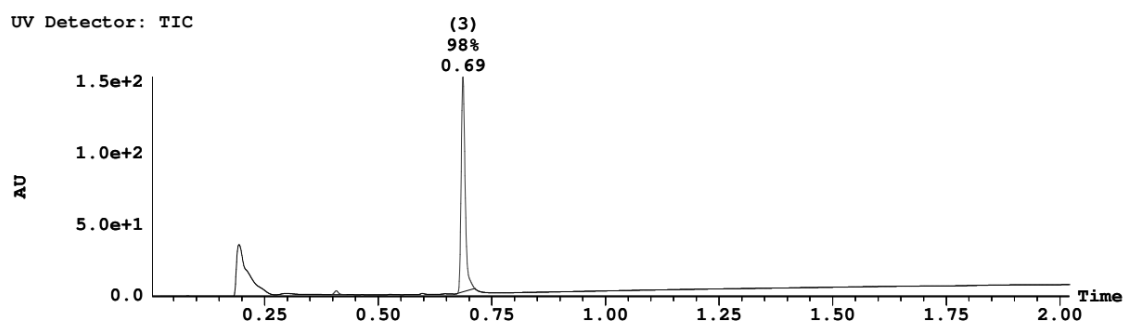


Slika 20. a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **7**



**Slika 20. b)**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **7**

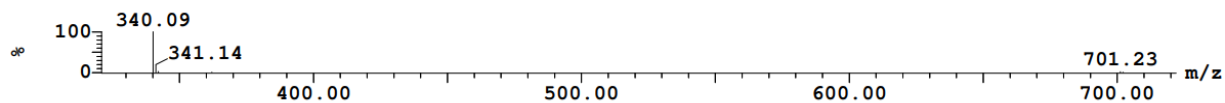
Radi provjere čistoće i dodatne potvrde strukture početnog cijano-spoja **7** za sintezu amidinskih derivata **8** i **9** provedena je dodatna potvrda masenom spektrometrijom, pri čemu je vidljivo da je sintetiziran spoj visoke čistoće (98,0%), te se u masenom spektru uočava pik molekulskog iona od 340 m/z, prikazano na Slikama 21 i 22.



**Slika 21.** Maseni kromatogram spoja **7**

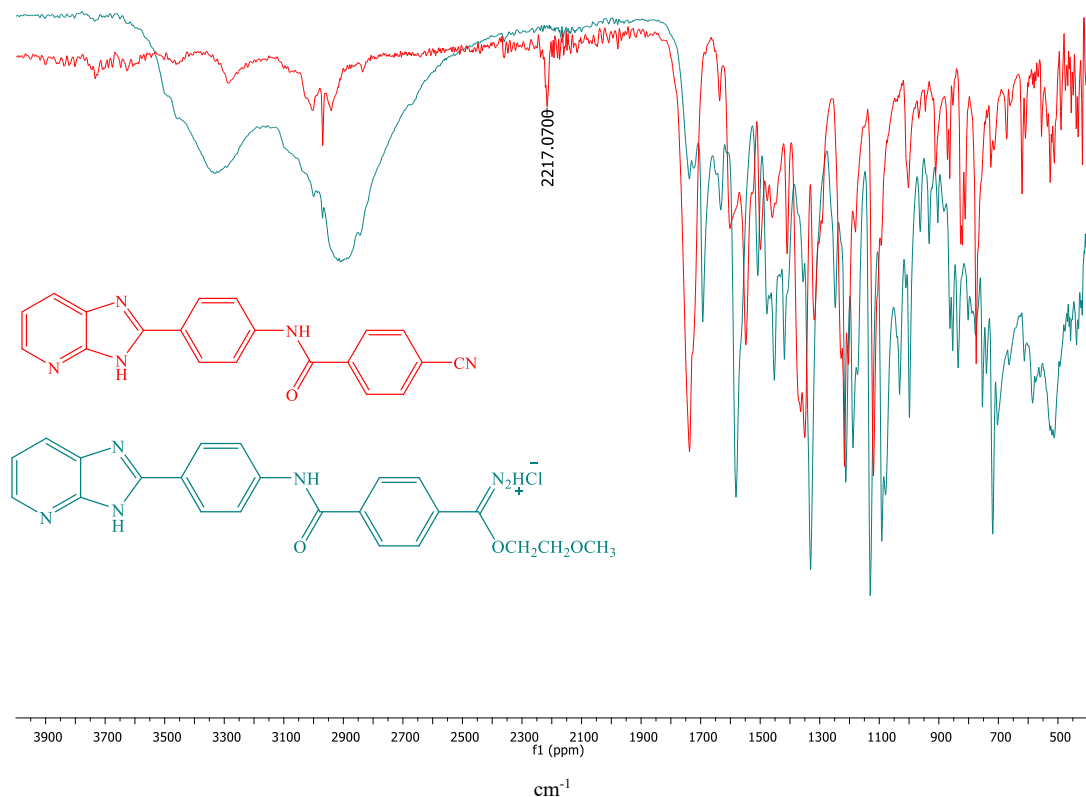
Peak ID	Compound	Time	Mass Found
3		0.69	

SAMPLE: 2:33 Combine (77:89-(59:64+102:107))

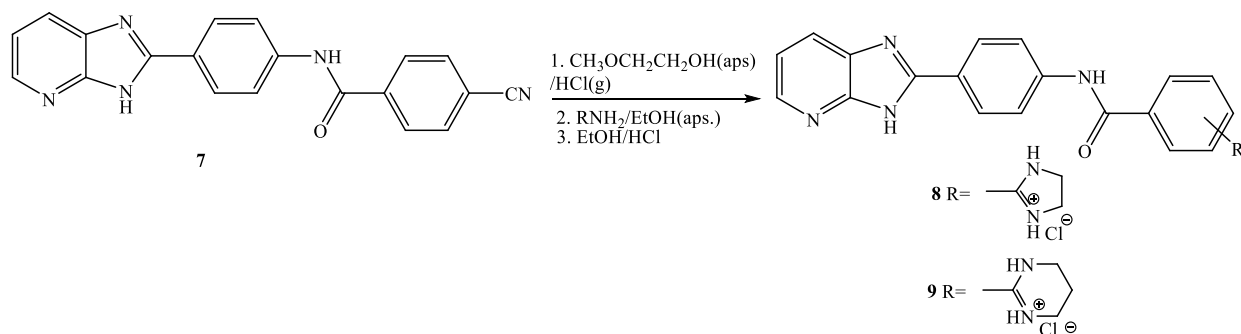


Slika 22. Maseni spektar spoja 7

Amidino-supstituirani spojevi **8** i **9** priređeni su kiselim Pinnerovom reakcijom u dva stupnja (Shema 28). Prvi stupanj sadrži uvođenje plinovitog HCl u otopinu cijano supstituiranog spoja **7** u 2-metoksietanolu do zasićenja reakcijske smjese. Nakon toga, smjesa se miješa nekoliko dana na sobnoj temperaturi, a tijekom reakcije prati se IR spektroskopijom do nestanka -CN vrpce na  $2200\text{ cm}^{-1}$  što upućuje na nastanak međuprodukta imino-estera, te ujedno i završetak reakcije (Slika 23). U drugom stupnju reakcije se dobivenom imino-esteru dodaje u suvišku etilendiamin za sintezu amidina **8**, odnosno 1,3-propilendiamin za sintezu spoja **9** u apsolutnom etanolu. Imidazolinilski derivat **8** priređen je u iskorištenju od 28,0%, a spoj **9** supstituiran šesterocikličkim amidinom u iskorištenju od 73,0%.

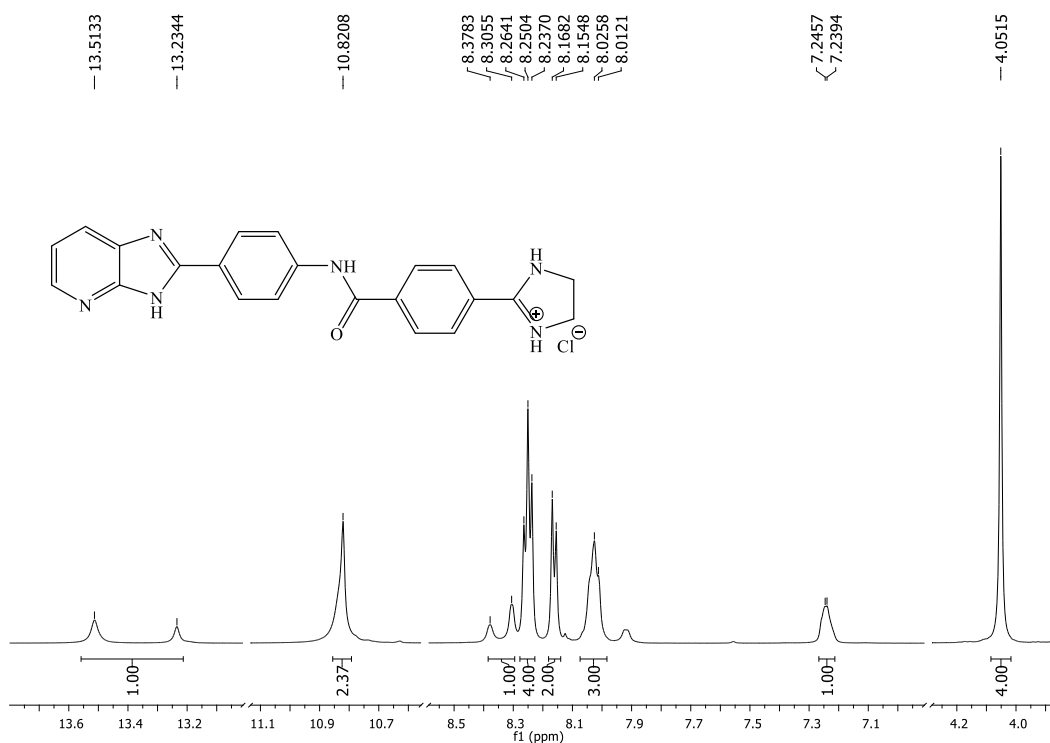


Slika 23. IR cijano supstituiranog spoja **7** i pripadajućeg međuprodukta imino-estera



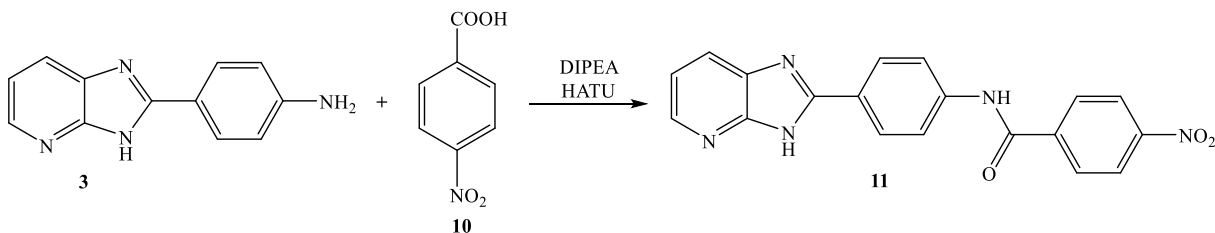
### Shema 28. Priprava amidino-supstituiranih derivata amida **8-9**

Na Slici 24. prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **8**, na kemijskom pomaku 13,51 i 13,23 ppm vidljiv je dvostruki broj signala protona. Riječ je o tautomeriji, tj. premještanju protona koji pripada dušikovom atomu na imidazo[4,5-*b*]piridinskoj jezgri s jednog na drugi dušik u strukturi. Kao potvrda strukture spoja **8**, na kemijskom pomaku 10,82 ppm vidljiv je signal širokog singleta dušikovog protona amidinske skupine, te signal metilenskih protona integrala 4H na kemijskom pomaku 4,05 ppm. Odgovarajući broj aromatskih protona nalazi se u području od 7,24 do 8,34 ppm.

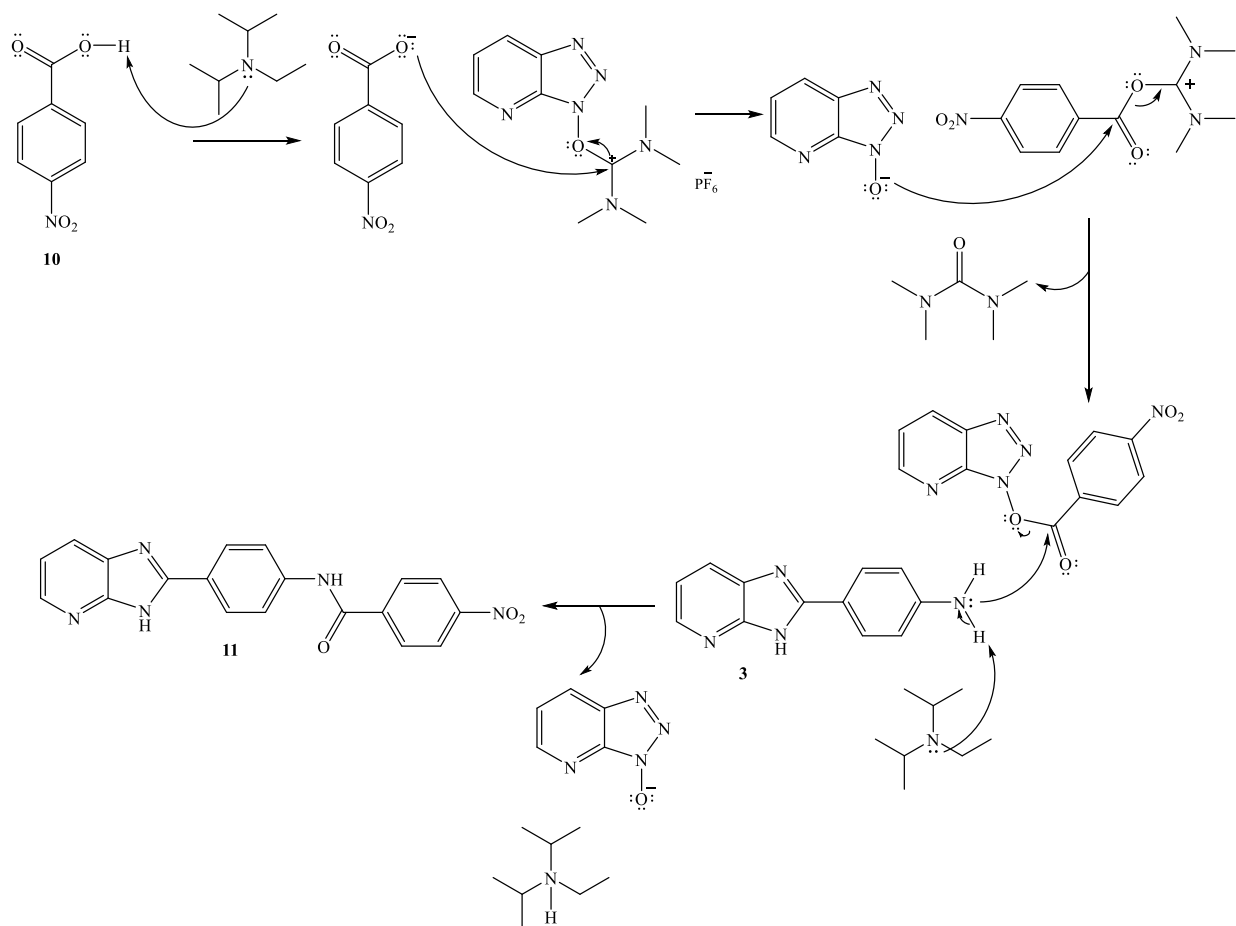


Slika 24.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **7**

Na Shemi 29 prikazana je sinteza nitro supstituiranog amidnog derivata imidazo[4,5-*b*]piridina uz korištenje HATU (1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3 triazolo[4,5-*b*]piridin 3-oksid heksafluorofosfata) kao kopulirajućeg reagensa te DIPEA (*N,N*-diizopropiletilamin) kao baze, a prikaz mehanizma reakcije aktivacije nalazi se na Slici 25<sup>96</sup>.



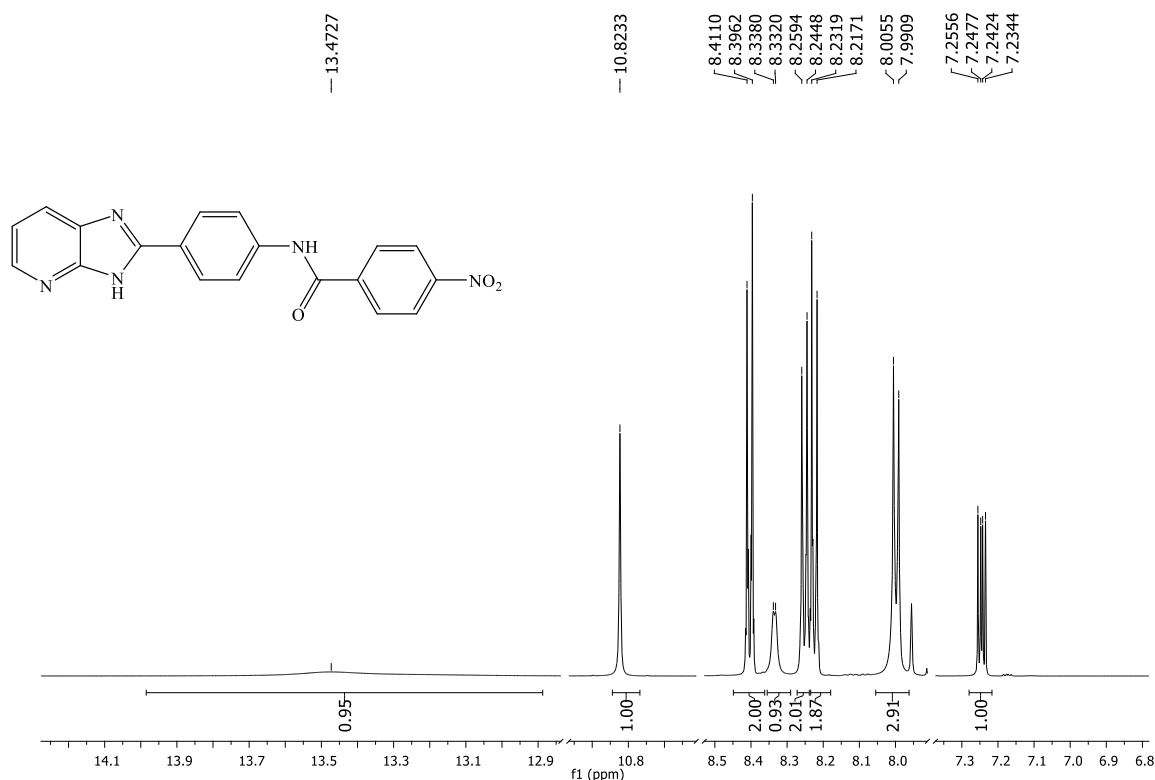
**Shema 29.** Aktivacija kiseline pomoću HATU i DIPEA, te nastajanje nitro-amida **11**



**Slika 25.** Mehanizam reakcije s HATU i DIPEA<sup>96,97</sup>

Ono što se događa jest da<sup>97</sup> u prvom koraku baza deprotonira *p*-nitrobenzojevu karboksilnu kiselinu **10**, pri čemu formirani karboksilatni anion napada elektrofilni atom ugljika u HATU. Rezultirajući HOAt anion reagira s novonastalim intermedijerom aktivirane karboksilne kiseline kako bi se formirao OAt aktivirani ester. Amin imidazo[4,5-*b*]piridinskog prekursora deprotonira DIPEA, te on kao nukleofil napada karbonilni ugljikov atom esterskog međuprodukta te nastaje *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-nitrobenzamid **11** u iskorištenju od 64,8%.

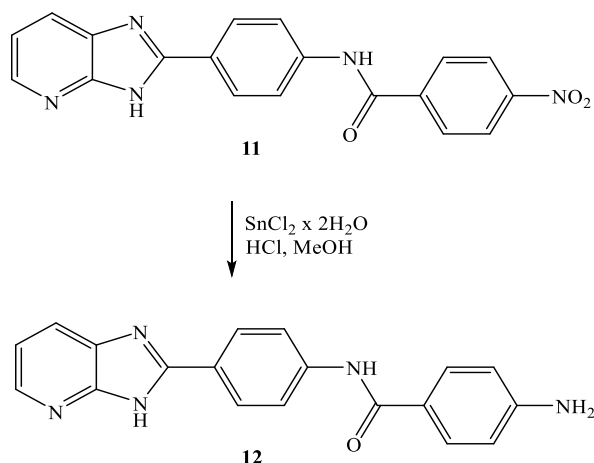
Na Slici 26 nalazi se <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **11**. U području od 7,25 do 8,40 ppm vidljiv je odgovarajući broj aromatskih protona, dok se na kemijskim pomacima 10,82 i 13,47 ppm nalaze singleti protona amidne veze i protona na imidazo[4,5-*b*]piridinskom prstenu.



Slika 26. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **11**

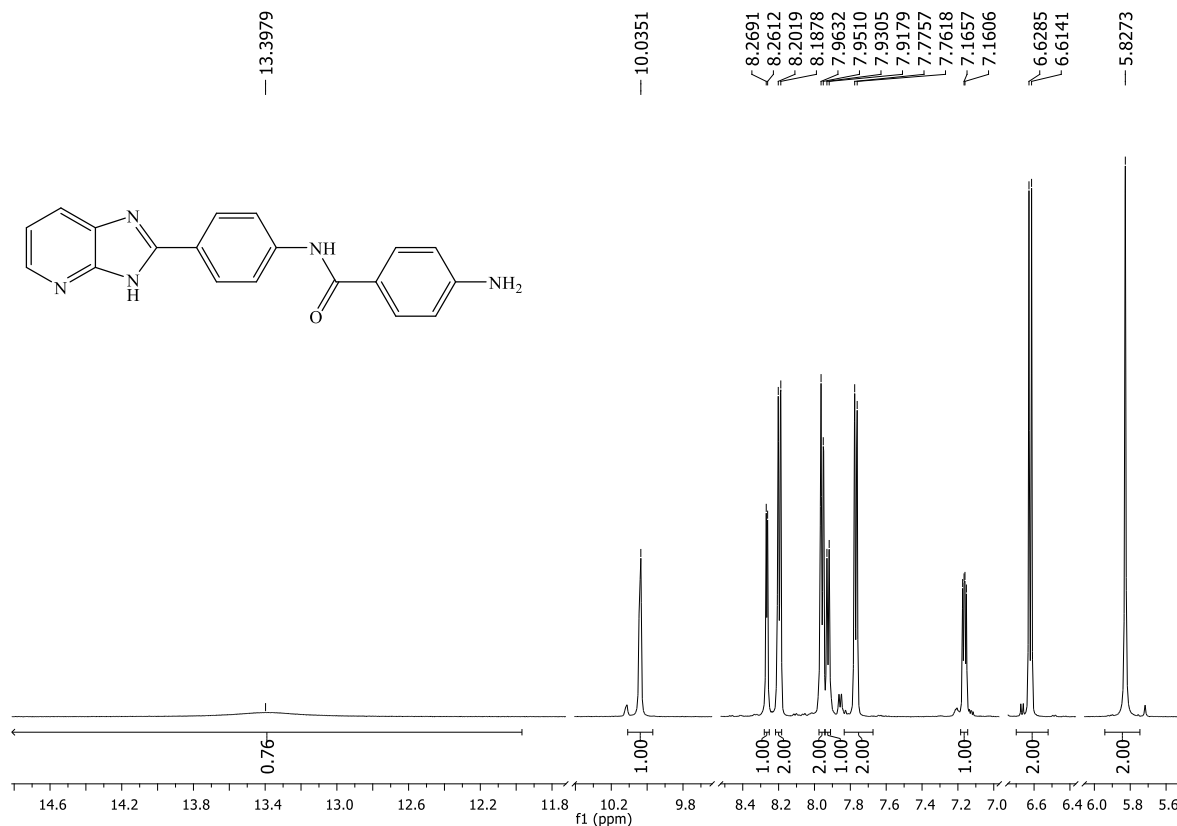
Shema 30 prikazuje sintezu amino supstituiranog derivata **12** redukcijom u smjesi SnCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O i klorovodične kiseline u metanolu iz odgovarajućeg nitro derivata **11**.





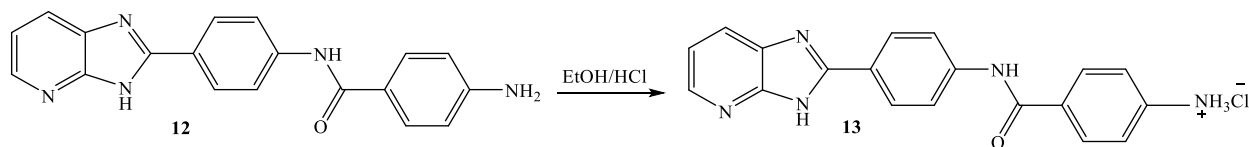
**Shema 30.** Sinteza amino derivata **12** redukcijom spoja **11**

*N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamid **12** sintetiziran je u iskorištenju od 74,0%, a njegov pripadajući  $^1\text{H}$  NMR spektar prikazan je na Slici 27. Signal singleta integrala 2H na kemijskom pomaku 5,83 ppm označava uspješnost redukcije, tj. nastanak amino skupine. Na kemijskom pomaku 10,03 ppm vidljiv je signal protona amidne skupine, a na 13,39 ppm signal dušikovog protona imidazo[4,5-*b*]piridinske jezgre. Također se ponovno uočava odgovarajući broj signala aromatskih protona u području od 6,62 do 8,27 ppm, koji su u odnosu na nitro-supstituirani derivat **11** pomaknuti prema nižim vrijednostima kemijskog pomaka. Razlog tomu je što je amino skupina elektron-donorska zbog prisutnosti dušikovog slobodnog elektronskog para koji tako stvara veću lokalnu gustoću elektrona oko jezgre protona koji se tako djelomično suprotstavlja jačini primijenjenog vanjskog magnetskog polja-osjeća niže efektivno magnetsko polje, što znači da posljedično, s obzirom na to kemijsko okruženje, zasjenjene aromatske jezgre protona imaju nižu rezonantnu frekvenciju i pojavljuju se u području višeg magnetskog polja (na desnoj strani  $^1\text{H}$  NMR spektra).



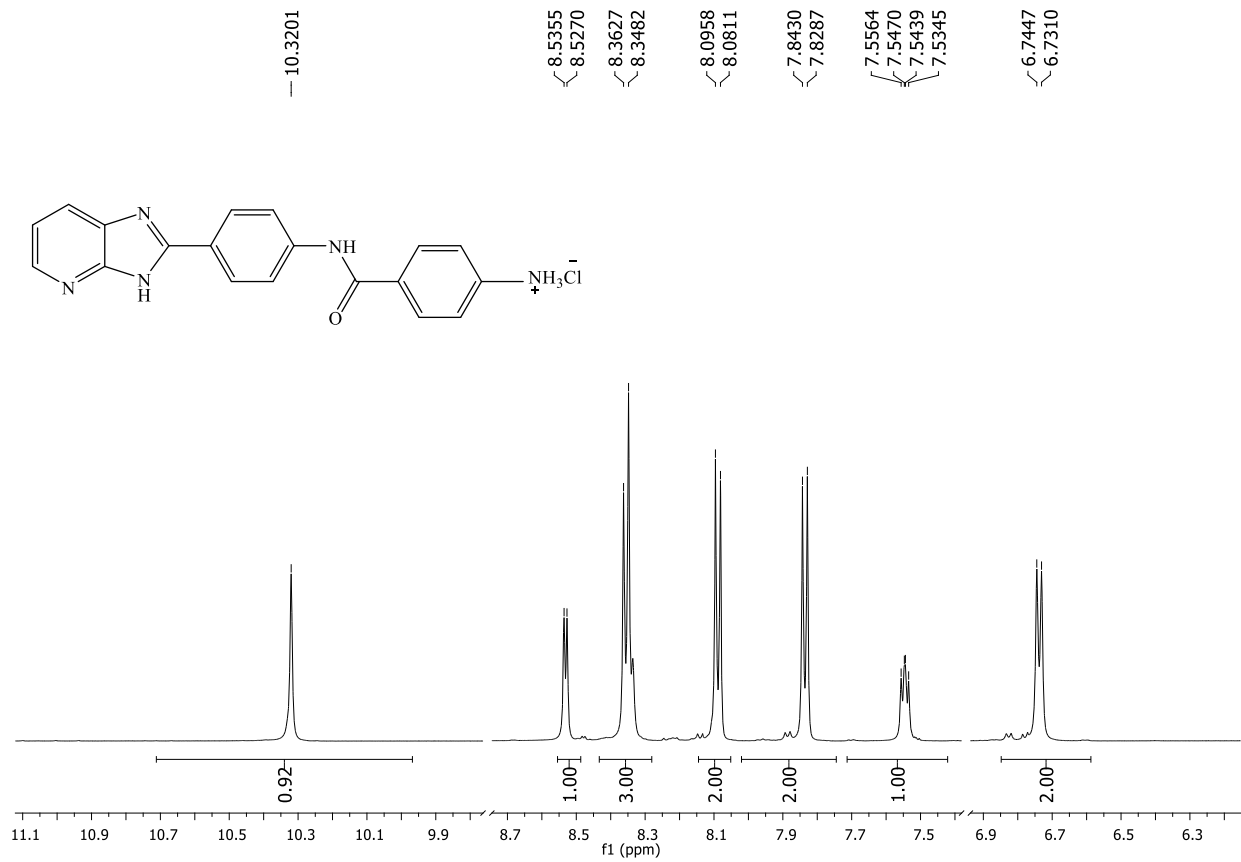
**Slika 27.**  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **12**

Shema 31 prikazuje reakciju protoniranja amino supstituiranog amida **12** u apsolutnom etanolu zasićenom s HCl-om priređena je hidrokloridna sol **13** u iskorištenju od 45,0%.



**Shema 31.** Sinteza spoja **13**

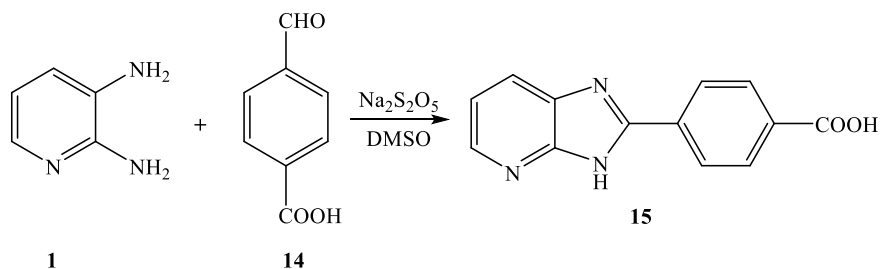
Slika 28 Prikazuje  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **13**, na kemijskom pomaku 10,32 ppm nalazi se signal protona amidne veze, nije moguće detektirati signal protonirane amino skupine, što ne znači da spoj nije protoniran jer je spektar dobivenog spoja **13** različit u odnosu na  $^1\text{H}$  NMR spektar početnog spoja **12** vidljivog na Slici 27. Za spoj **13** se u području od 6,74 do 8,53 ppm nalazi se odgovarajući broj signala aromatskih protona, a za spoj **12** u području od 6,62 do 8,27 ppm.



**Slika 28.** <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **13**

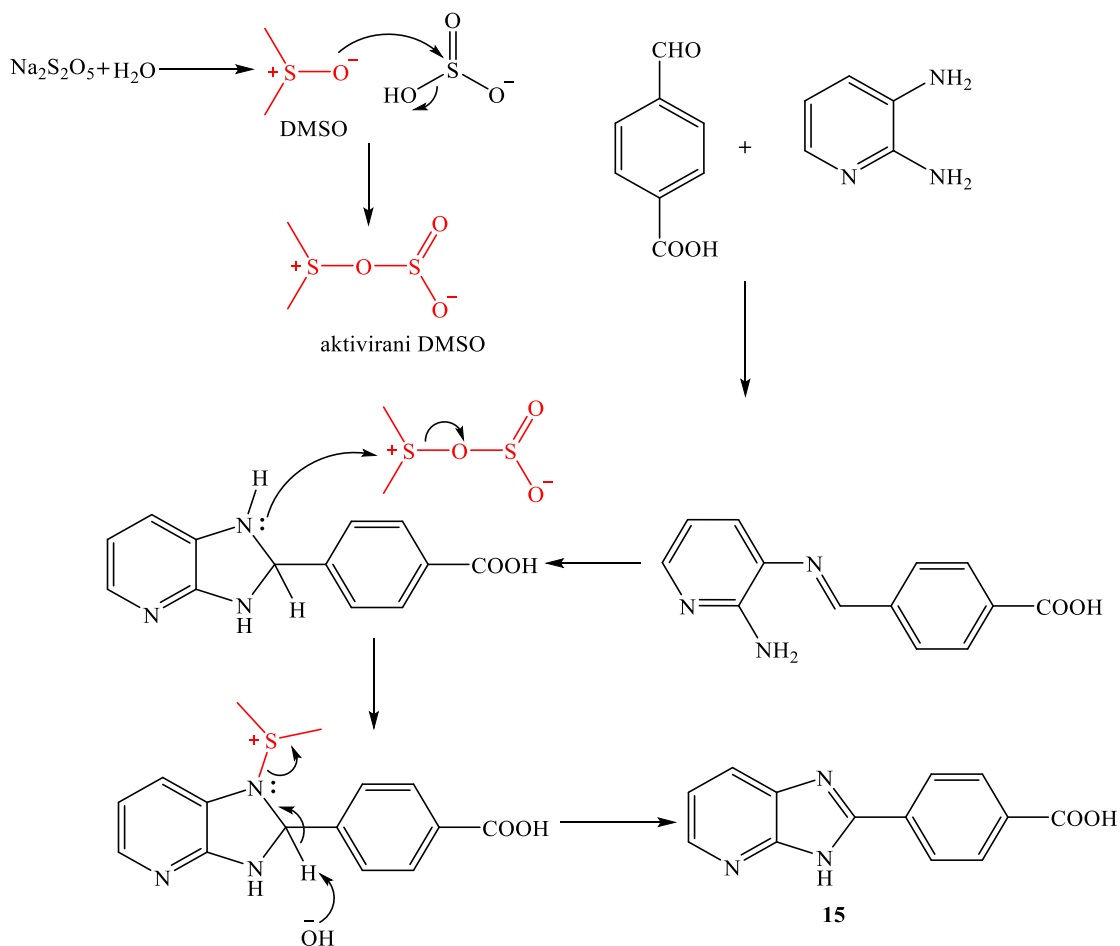
Nešto drugačiji kemijski pomak potencijalno može biti uzrokovan stvaranjem intramolekularne vodikove veze s tom protoniranom amino skupinom i drugim atomom ili skupinom u molekuli. Prisutnost te vodikove veze „remeti“ normalnu distribuciju elektrona oko protona, čineći ga podložnijim utjecaju obližnjih elektronegativnih atoma. To rezultira većom vrijednošću kemijskog pomaka u spektru jer je jezgra susjednih aromatskih protona djelomično odsjenjena, tj. pomaknuta prema višim frekvencijama (u niže polje) u usporedbi sa spektrom spoja **12**.

Na Shemi 32 prikazana je reakcija kondenzacije 2,3-diaminopiridina **1** s 4-formilbenzaldehydom **14** u prisutnosti Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i DMSO. Spoj **15** dobiven je u iskorištenju od 56,1%.



**Shema 32.** Reakcija nastajanja kiselnog derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

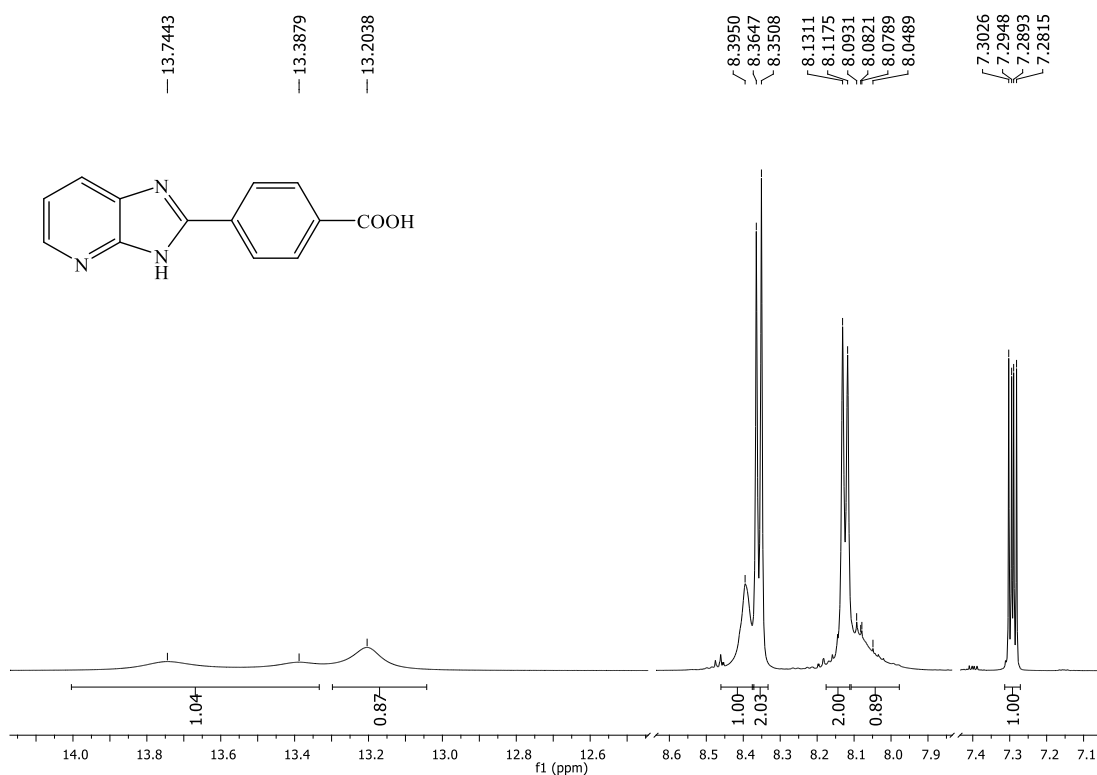
Slika 29 prikazuje mehanizam reakcije dobivanja spoja **15**. U prvom stupnju se pretpostavlja da reakcije nukleofilne acilne adicije jedne amino skupine spoja **1**, te nastaje otvoreni spoj- Schiffova baza (imin).



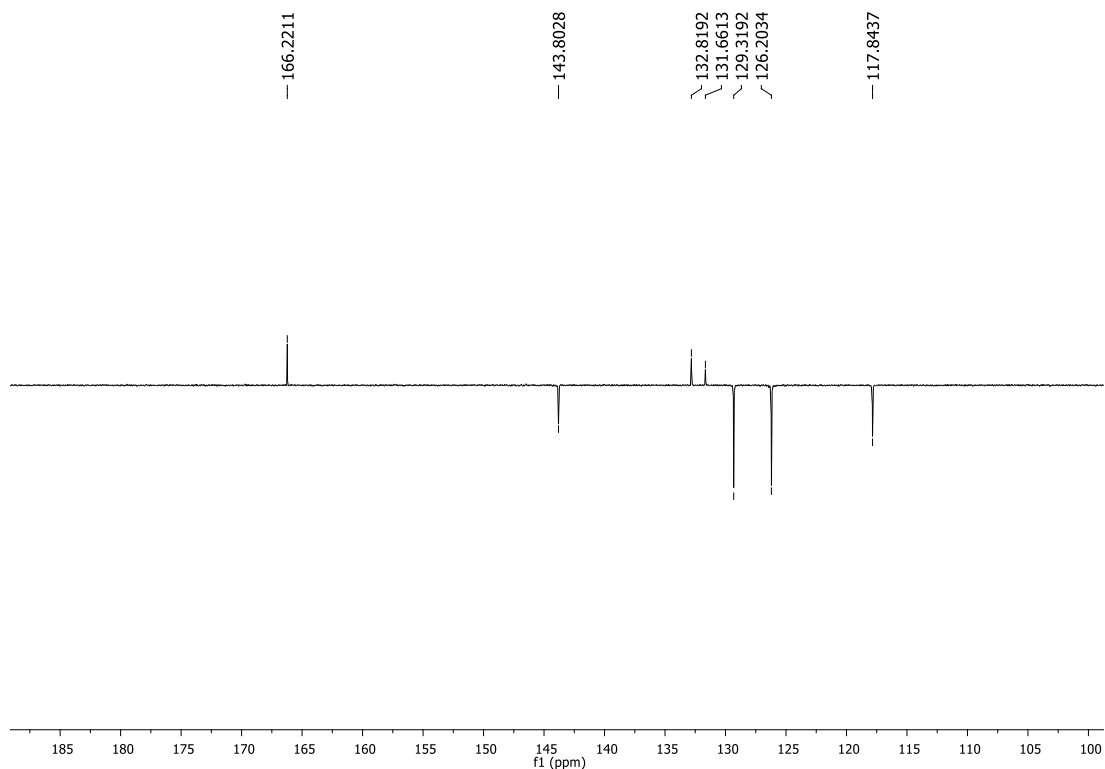
**Slika 29.** Mehanizam reakcije ciklizacije u spoj **15**<sup>98</sup>

Pritom oslobođena molekula vode reagira sa prisutnim  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  te u toj reakciji nastaje  $2 \text{NaHSO}_3$  i  $\text{SO}_2$ .  $\text{HSO}_3^-$  ion reagira s DMSO, te nastaje aktivirani intermedijer. U međuvremenu, u toj imino-formi u prisutnim žestokim uvjetima ( $165^\circ\text{C}$ ) dolazi do reakcije i druge nukleofilne amino skupine na iminski ugljik (intermolekulske ciklizacije). Ta struktura reagira s aktivnim intermedijerom DMSO-a te u zadnjem koraku nastaje spoj **15**.

Slika 30 a) prikazuje  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **15**. Kao potvrdu uspješne ciklizacije nalazimo široki singlet kiselog H protona na kemijskom pomaku 13,20 ppm, signal na kemijskom pomaku 13,57 ppm pripada dušikovom protonu imidazo[4,5-*b*]piridinskog prstena, te se na području od 7,29 do 8,40 ppm nalazi odgovarajući broj signala aromatskih protona. Također na  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prikazanom na slici ispod vidljiv je karbonilni C atom karboksilne skupine na kemijskom pomaku 166,22 ppm, što je isto potvrda uspješne ciklizacije.

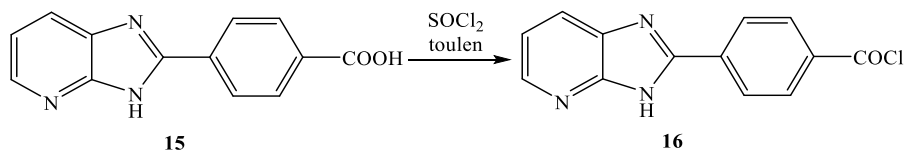


**Slika 30. a)**  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **15**



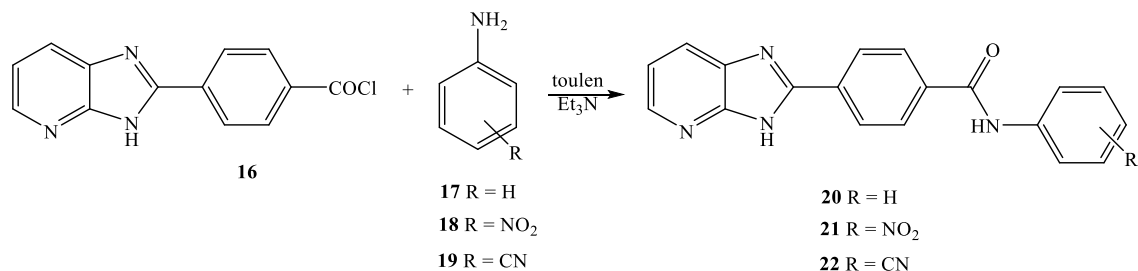
Slika 30. b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **15**

4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzoil klorid **16**, kao glavni prekursor ove reakcije priređen je u reakciji nukleofilne supstitucije s tionil-kloridom u apsolutnom toulenu kao otapalu, u iskorištenju od 98,4% (Shema 33)



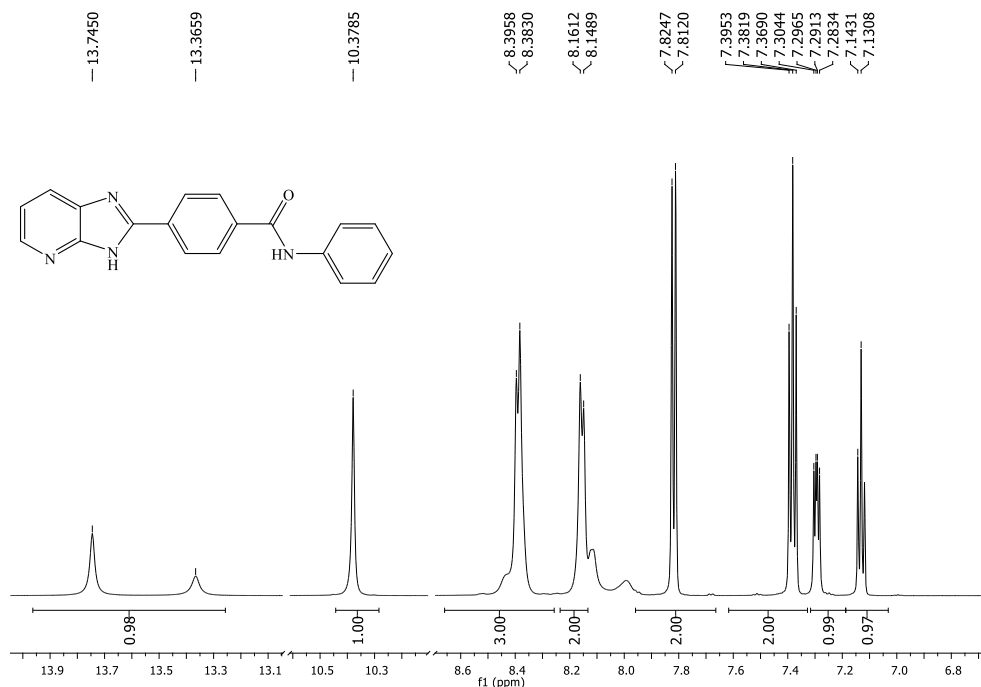
Shema 33. Priprava glavnog prekursora **16**

Reakcijom kondenzacije 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzoil klorida **16** s odgovarajućim aromatskim aminima **17-19** u smjesi apsolutnog toulena i DMFa, uz dodatak trietilamina u suvišku na temperaturi refluksa sintetizirani su 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-fenilbenzamid **20**, 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-nitrofenil)benzamid **21**, *N*-(4-cijanofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid **22** u iskorištenju od 39,5%, 21,1%, te 57,1% (Shema 34)



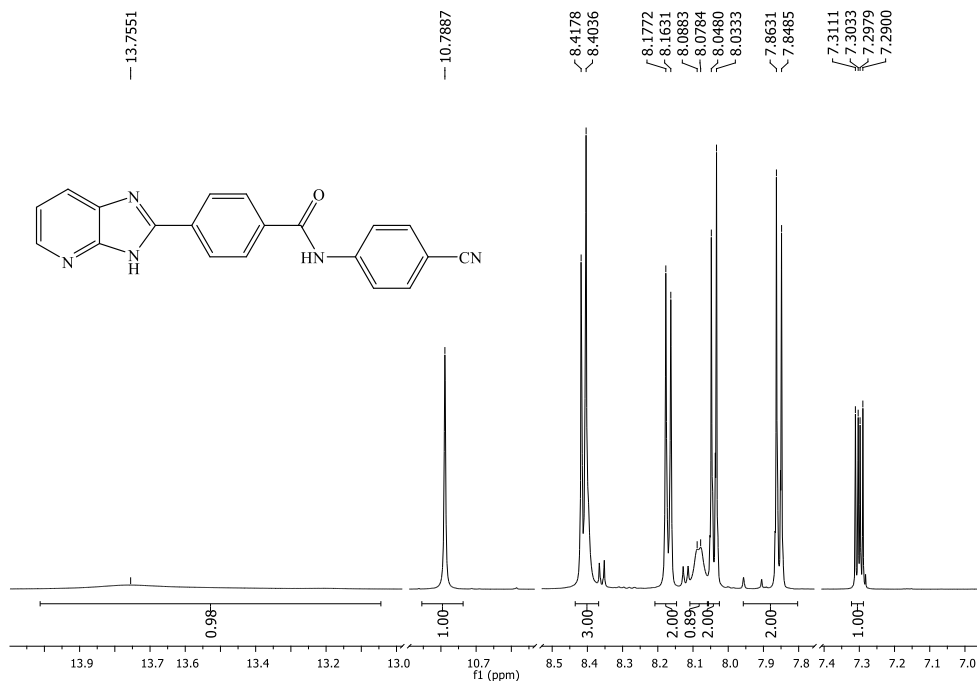
### Shema 34. Priprava ciljanih spojeva 20-22

Na Slici 31 a) prikazan je <sup>1</sup>H NMR spektar nesupstituiranog amidnog derivata **20**, dok je na Slici 31 b) prikazan <sup>1</sup>H NMR spektar cijano derivata **22**. S obzirom na prirodu supstituentata, pristuna je razlika u kemijskom pomaku u oba spektra, za aromatsko područje za spoj **20** vidljiv je odgovarajući broj signala aromatskih protona u području od 7,14 do 8,39 ppm, a za spoj **22** u području od 7,30 do 8,41 ppm. CN skupina, kao elektron odvlačeća djeluje tako da odsjenjuje jezgru susjednih aromatskih protona, smanjuje im elektronsku gustoću čineći ih osjetljivijima na utjecaj primijenjenog vanjskog magnetskog polja što uzrokuje pomak na veće vrijednosti kemijskog pomaka, odnosno veće rezonantne frekvencije u <sup>1</sup>H NMR spektru.



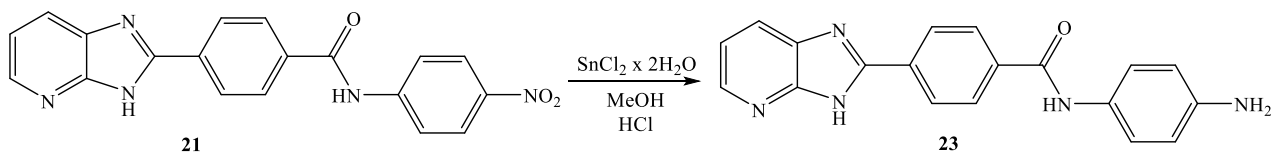
Slika 31. a) <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **20**

Taj efekt je vidljiv i na kemijske pomake signala protona amidne veze, za spoj **20** na kemijskom pomaku 10,38 ppm, a za spoj **22** nalazi se na nešto većim vrijednostima kemijskih pomaka, 10,79 ppm. Slično je i za proton imidazo[4,5-*b*]piridinske jezgre, u spoju **20** on se nalazi na kemijskom pomku 13,56 ppm, a u spoju **22** na 13,76 ppm.



Slika 31. b)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **22**

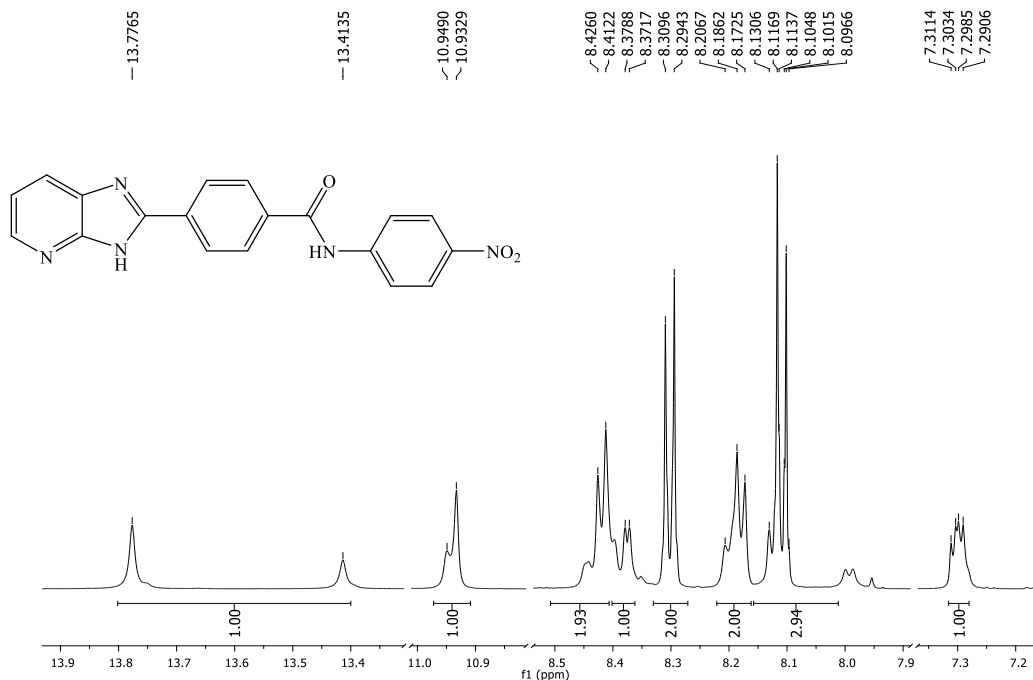
Shema 35 prikazuje redukciju nitro spoja **21** korištenjem  $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  i klorovodične kiseline u metanolu. Dobiveni spoj **23** izoliran je u iskorištenju od 82,0%.



Shema 35. Priprava amino derivata benzamida **23**

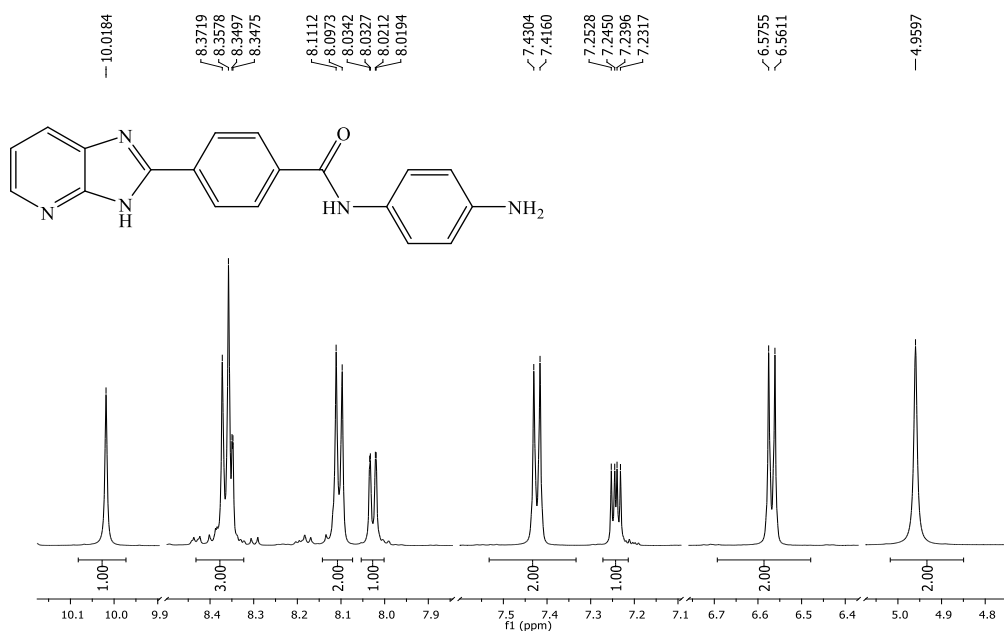
Na Slici 32 nalazi se  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **21**. Signal tautomera NH protona na imidazo[4,5-*b*]piridinskoj jezgri nalazi se kemijskom pomaku 13,60 ppm, signal na 10,94 ppm pripada protonu amidne veze, a signali na području 7,30 do 8,42 ppm aromatskim protonima.





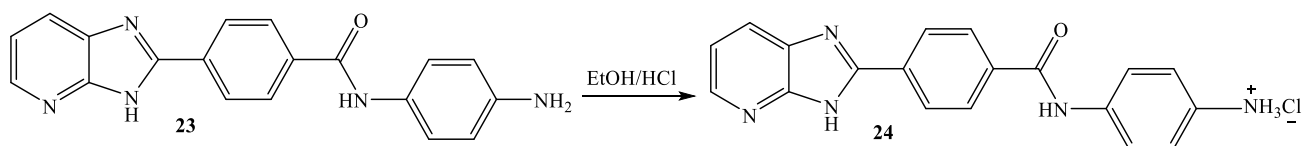
**Slika 32.** <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 21

Nakon redukcije, nitro skupina prelazi u amino skupinu čiji je signal vidljiv na kemijskom pomaku 4,96 ppm (singlet integrala 2H), te su signali aromatskih protona i amidnog NH protona na  $\delta = 10,02$  ppm pomaknuti u na niže vrijednosti od 6,57 do 8,36 ppm, prema području nižih frekvencija, odnosno u više magnetsko polje (Slika 33).



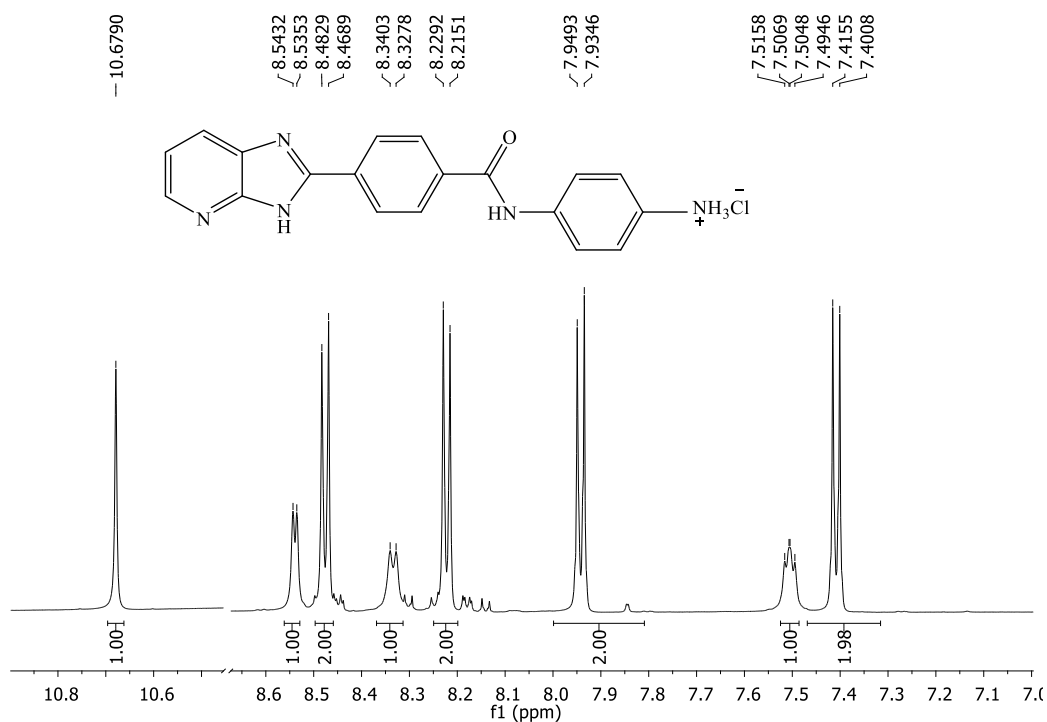
**Slika 33.** <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 23

Na Shemi 36 prikazano je provedeno protoniranje spoja **23** u apsolutnom etanolu i klorovodičnoj kiselini te je dobiven spoj **24** u iskorištenju od 63,9%.



**Shema 36.** Priprava hidrokloridne soli spoja **23**

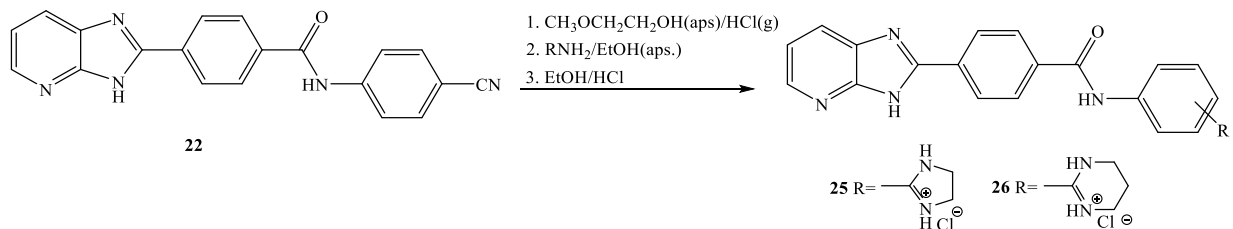
Na Slici 34 prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **24**. U području od 7,41 do 8,54 ppm nalazi se odgovarajući broj signala aromatskih protona, signal singleta na kemijskom pomaku 10,68 ppm pripada protonu amidne veze, singal protonirane amino skupine nije vidljiv, no u odnosu na spektar spoja **23** prisutna je razlika u kemijskim pomacima što znači da zasigurno nije dobiven početni spoj.



**Slika 34.**  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **24**

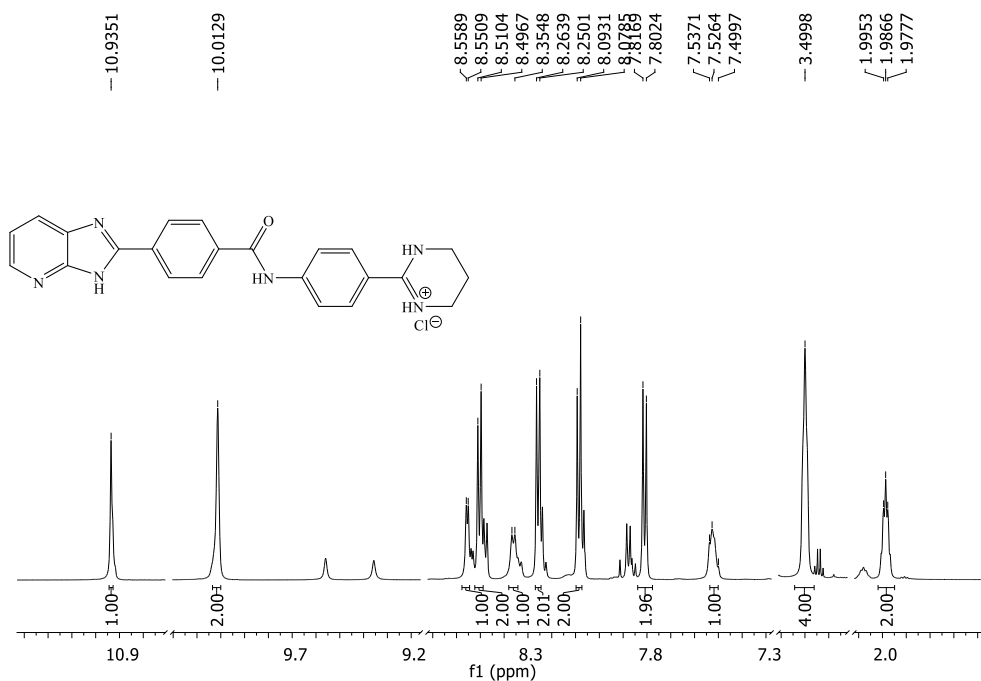
Shema 37 prikazuje pripremu amidinskih benzamida **25** i **26** iz pripadajućeg cijano-supstituiranog prekursora **22**.

Imidazolinski amidinski derivat **25** priređen je u reakciji intermedijera imino-estera te suviška etilendiamina u iskorištenju od 67,3%, a šesterociklički u reakciji s 1,3-propilendiaminom u iskorištenju od 46,1%.

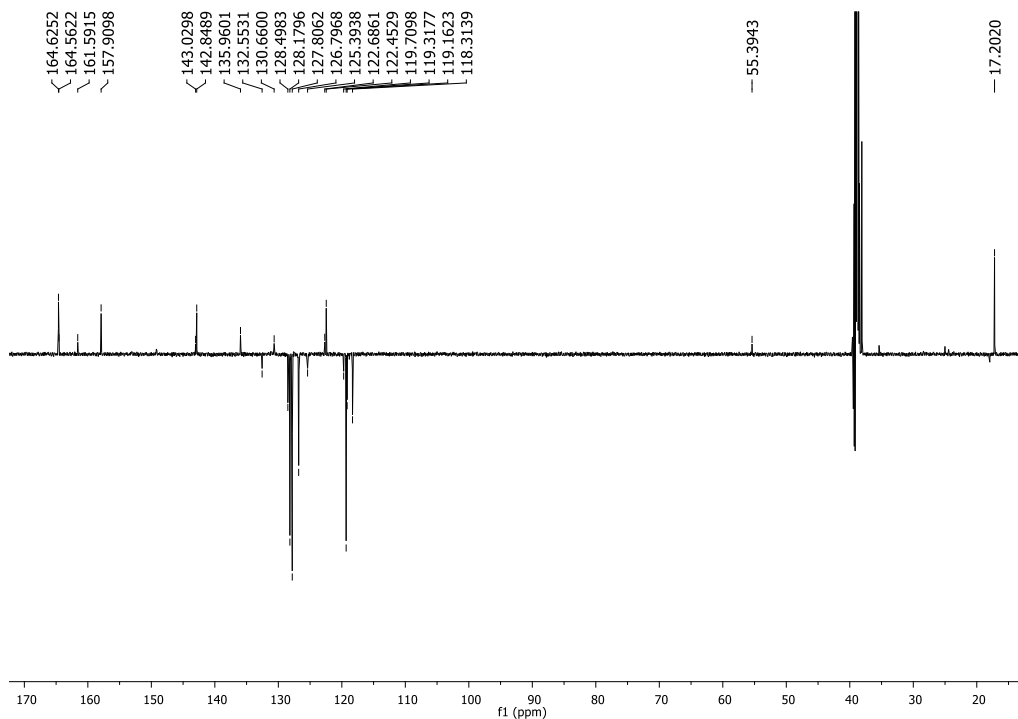


### Shema 37. Sinteta amidinskih derivata benzamida **25-26**

Na  $^1\text{H}$  NMR spektru spoja **26**, prikazanom na Slici 35 a) u području od 7,53 do 8,55 ppm uočava se odgovarajući broj signala aromatskih protona, na kemijskom pomaku 10,94 ppm singlet amidnog NH protona, te na signali potvrde amidinske jezgre: široki singlet integrala 2H na 10,01 ppm koji pripada dušikovim protonima amidina i u alifatskom području signali za šest protona metilenske skupine šesterocikličkog prstena. Slika 35 b) prikazuje  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **26**, pri čemu se može uočiti odgovarajući broj signala kvaternih C atoma, tercijarnih CH na aromatskim jezgrama te sekundarnih metilenskih  $\text{CH}_2$  atoma šesterocikličkog prstena u alifatskom području.



Slika 35. a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **26**

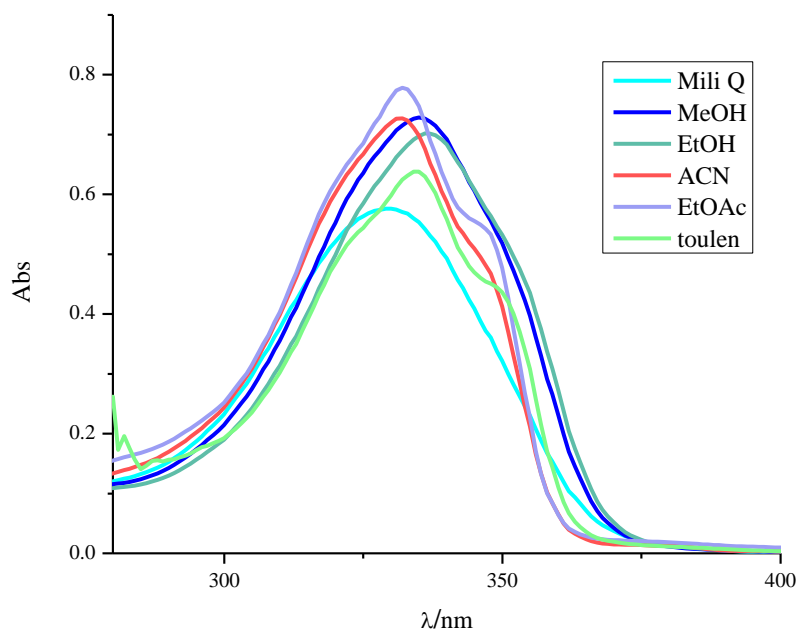
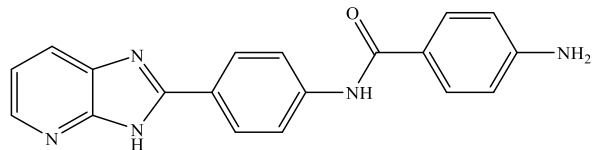


Slika 35. b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 26

### 3.3. Spektroskopska karakterizacija UV/Vis spektroskopijom

Kako bi se ispitale spektroskopske karakteristike spojeva **12** i **23**, UV-Vis apsorpcijski spektri snimljeni su u nekoliko organskih otapala različitih polarnosti kako bi se osigurala dobra topljivost spojeva te kako bi se utvrdio utjecaj polarnosti otapala na intenzitet i maksimum apsorpcije. U tu svrhu, stock otopine spojeva pripremljene su u DMSO, a UV/Vis spektri snimljeni su u rasponu od 250-550 nm u istim koncentracijama spojeva  $2 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  na sobnoj temperaturi. Apsorpcijski spektri kod oba snimljena spoja pokazali su jednu glavnu apsorpcijsku vrpču u svim otapalima u području između 300 i 550 nm. Cilj spektroskopske karakterizacije je provjera potencijalne uporabe sintetiziranih spojeva kao optičkih pH senzora u otopinama u širokom rasponu pH vrijednosti u biološkim i kemijskim procesima<sup>98,99</sup>.

Na Slici 36 prikazani su kvantitativni apsorpcijski spektri spoja **12**.



**Slika 36.** Apsorpcijski spektar spoja **12** u otapalima različite polarnosti

Razmatranjem apsorpcijskih spektara za spoj **12**, uočena je najintenzivnija apsorpcija s hiperkromnim efektom i blagim batokromnim pomakom u etil-acetatu, a najmanja sa hipokromnim efektom u Mili Q vodi, kao najpolarnijem otapalu. Isto tako, u svim otapalima, osim Mili Q vode vidljivi su batokromni pomaci za minimalno 3 nm.

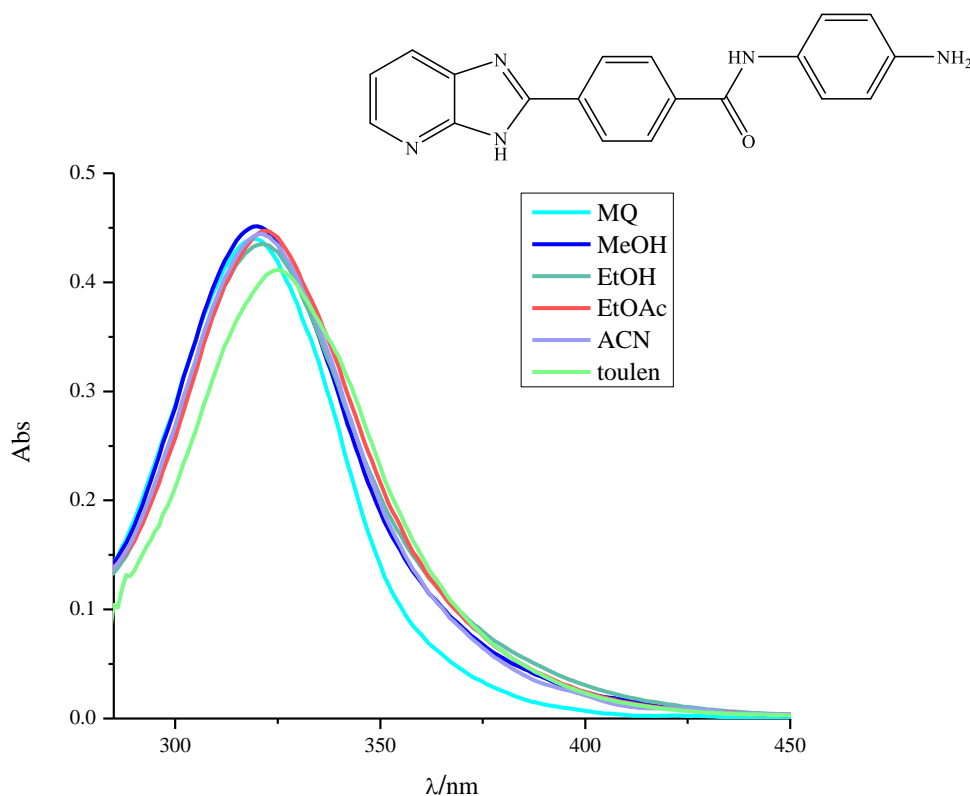
Mogući razlozi ovih opažanja jesu slijedeći:

- **Polarnost otapala:** Etil-acetat je umjereno polarno otapalo, dok je Milli Q voda visoko polarno otapalo. Moguće je da se kromofori spoja **12** (aromatski prstenovi, amidna skupina) bolje preklapaju s elektronskim svojstvima otapala u etil-acetatu, što rezultira većim intenzitetom apsorpcije u usporedbi s Milli Q vodom. To „podudaranje“ elektronskih svojstava između spoja i otapala odnosi se na sposobnost otapala da stupa u interakciju i stabilizira elektronske prijelaze spoja ( $\pi$ - $\pi^*$  i  $n$ - $\pi^*$ ).

- **Interakcije otapalo-otopljena tvar:** Etil-acetat bi mogao ostvarivati povoljnije interakcije sa spojem, dopuštajući jače interakcije otopljene tvari i otapala koje povećavaju intenzitet apsorbancije. Suprotno tome, Milli Q voda, budući da je visoko polarno otapalo, možda neće stvarati jake interakcije sa spojem, što dovodi do slabije apsorpcije.
- **Hidrofobni/hidrofilni efekt:** Dotični spoj **12**, sadrži i polarne i nepolarne dijelove u strukturi zbog svog aromatskog sustava i amidne skupine. Etil-acetat, budući da je otapalo srednje polarnosti, može se učinkovitije prilagoditi i polarnim i nepolarnim regijama spoja **12**, što rezultira većom apsorbancijom. Nasuprot tome, voda Milli Q, budući da je visoko polarno otapalo, može imati poteškoća s otapanjem nepolarnih područja, što može dovesti do smanjene apsorbancije.

Intenzitet apsorbancije spoja **12** u otapalima raste u nizu: Mili Q < toulen < EtOH < MeOH, ACN < EtOAc.

Na Slici 37 prikazani su kvantitativni apsorpcijski spektri spoja **23**.



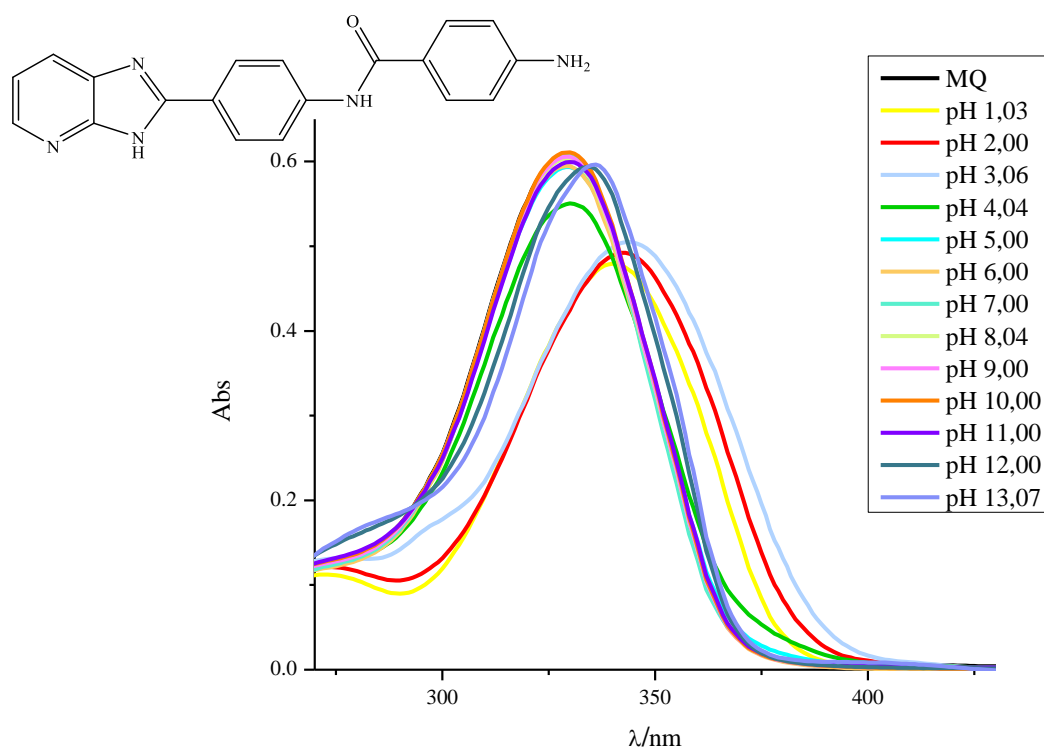
**Slika 37.** Apsorpcijski spektar spoja **23** u otapalima različite polarnosti

Općenito, na temelju dobivenih spektara za spoj **23** može se zaključiti da UV/Vis apsorpcijski spektri pokazuju malu ovisnost o polarnosti ispitivanih otapala. Najveći intenzitet apsorbancije spoj pokazuje u metanolu i etil-acetatu, a najniži s blagim batokromnim i hipokromnim pomakom u toluenu.

U odnosu na struktru spoja na Slici 36 prisutne su razlike u položajima amidne veze koje mogu rezultirati varijacijama u konjugaciji i delokalizaciji  $\pi$ -elektrona unutar aromatskih prstenova te mogu promijeniti razine energije molekularnih orbitala uključenih u elektronske prijelaze, što naknadno može utjecati na apsorpcijske spektre. Isto tako, promjena položaja vezanja može utjecati na orijentaciju i dostupnost funkcionalnih skupina, potencijalno utječući na interakcije otopljene tvari i otapala, pri čemu ta interferencija u interakciji otapalo-otopljena tvar može utjecati na stabilizaciju elektronskih prijelaza, što dovodi do varijacija u intenzitetu apsorpcije opaženom u ovim otapalima.

### 3.4. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva ispitivanih spojeva

Pomoću UV/Vis spektroskopije ispitane su promjene spektroskopskih svojstava odabranih spojeva **12** i **23** koji u strukturi sadrže amino supstituente radi proučavanja njihovih optičkih svojstava i moguće primjene kao optičkih pH senzora<sup>100</sup>. Apsorpcijski spektri navedenih spojeva snimani su pri koncentraciji  $2 \times 10^{-5}$  mol/dm<sup>-3</sup> u otopinama pufera različitih pH vrijednosti od 1 do 13. Apsorpcijski spektri spoja **12** snimljenog u otopinama pufera različitih pH vrijednosti prikazani su na Slici 38.



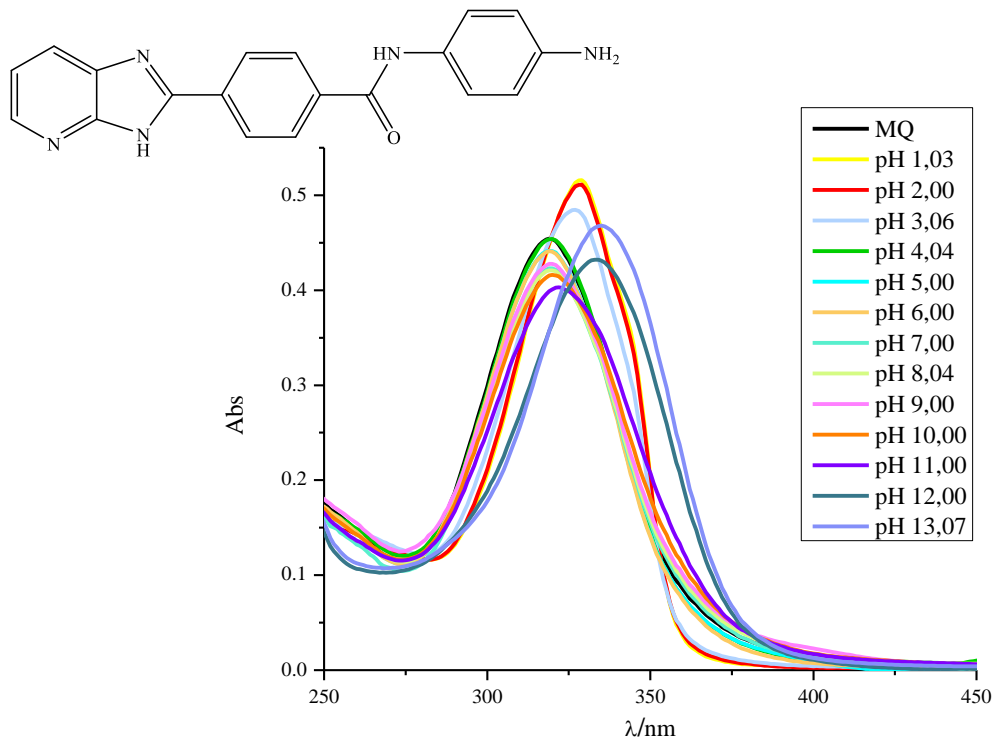
**Slika 38.** Apsorpcijski spektri spoja **12** u otopinama pufera različitih pH vrijednosti

Iz dobivene krivulje apsorpcijskog spektra u intervalu valnih duljina od 250 do 400 nm, vidljiva je spektralna promjena pri pH vrijednostima od 1,03 do 3,06, što sugerira na protoniranje bazičnog atoma dušika u molekuli spoja **12**. Moguće je da se upravo radi o iminskom dušiku unutar imidazo[4,5-*b*]piridinske jezgre.

Protoniranje dušikovog atoma imidazola može utjecati na promjenu elektronske strukture (distribuciju gustoće elektrona) što dovodi do delokalizacije elektrona unutar molekule i rezonancije.



Protoniranje također može utjecati na intermolekularne interakcije (vodikove veze ili elektrostatske interakcije), koje mogu utjecati na apsorpcijska svojstva. Najveći intenzitet apsorpcije uz hipsokromni pomak postignut je za pH vrijednosti od 9,00 do 13,07 jer pri ovim pH vrijednostima medij sadrži suvišak hidroksidnih iona ( $\text{OH}^-$ ) koji mogu deprotonirati primjerice aminsku skupinu u spoju uz formiranje amidnog aniona ( $\text{NH}^-$ ). Time se povećavava gustoća elektrona na atomu dušika što utječe na apsorpcijska svojstva spoja. Na Slici 39 prikazane su apsorpcijske pH krivulje spoja **23**.



**Slika 39.** Apсорpcijski spektri spoja **23** u otopinama pufera različitih pH vrijednosti

Na temelju dobivene krivulje apсорpcijskog spektra u intervalu valnih duljina od 250 do 450 nm, može se zaključiti da spoj **23** ima najveći intenzitet apсорbancije (uz blagi batokromni pomak u odnosu na neutralan pH) u otopini pufera kiselih pH vrijednosti od 1,03 do 3,06. Moguće je da je za ovu strukturu, u usporedbi sa ranije spomenutom povoljnije protoniranje  $-\text{NH}_2$  skupine što vodi do pojave većeg apсорpcijskog intenziteta. Pri višim pH vrijednostima (12,00 i 13,07) prisutan je veći batokromni pomak uz prateći hiperkromni efekt, dok je za pH vrijednosti od 4 do 11 vidljiv postupni hipokromni efekt.

### 3.5. Biološka aktivnost supstituiranih benzamida imidazo[4,5-*b*]piridina

Prirednim benzamidima ispitana je antiproliferativna aktivnost *in vitro* na osam staničnih linija humanih karcinoma: LN-229 (glioblastom), Capan-1 (adenokarcinom gušterače), HCT-116 (kolorektalni karcinom), NCI-H460 (karcinom pluća), DND-41 (akutna limfoblastična leukemija), HL-60 (akutna mijeloidna leukemija), K-562 (kronična mijeloidna leukemija), Z-138 (non Hodgkinov limfom). Ispitivanja su provedena u suradnji s istraživačkom grupom dr. sc. Dirka Daelemansa s Rega instituta u Belgiji. Rezultati su prikazani u tablici 2, a izraženi su kao IC<sub>50</sub> vrijednosti (koncentracija spoja koja je potrebna za inhibiciju 50%-tnog rasta tumorskih stanica), te uspoređeni s poznatim antitumorskim lijekovima *etopozidom* i *vinkristinom*.

Iz Tablice 2. je vidljivo kako većina spojeva ima IC<sub>50</sub> vrijednost >100 μM, što što upućuje na to da spojevi imaju jako slabu ili nikakvu antiproliferativnu aktivnost prema ispitanim staničnim linijama. Spoj 7 supstituiran cijano skupinom pokazuje izraženu antiproliferativnu aktivnost i selektivnost (IC<sub>50</sub> 9,15 i 9,45 μM) prema staničnim linijama LN229, odnosno Capan-1. Derivat 7 najaktivniji je spoj, dok je nesupstituirani derivat 6 pokazao umjereno djelovanje prema nekim staničnim linijama.

**Tablica 2.** *In vitro* antiproliferativna aktivnost ispitanih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

spoj	IC <sub>50</sub> (μM)							
	Capan-1	HCT-116	LN-229	NCI-H460	DND-41	HL-60	K562	Z138
<b>6</b>	38,9	72,1	64,8	>100	>100	82,25	>100	97,5
<b>7</b>	<b>9,45</b>	>100	<b>9,15</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>8</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>9</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>11</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>12</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>13</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>20</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>22</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>21</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>23</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	68,4
<b>24</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	74,65
<i>Etopozid</i>	0,1	8,4	7,6	5,7	0,6	0,2	2,2	0,2
<i>Nokodazol</i>	0,02	0,26	0,08	0,14	0,03	0,02	0,01	0,10

## **4. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### 4.1. Opće napomene

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

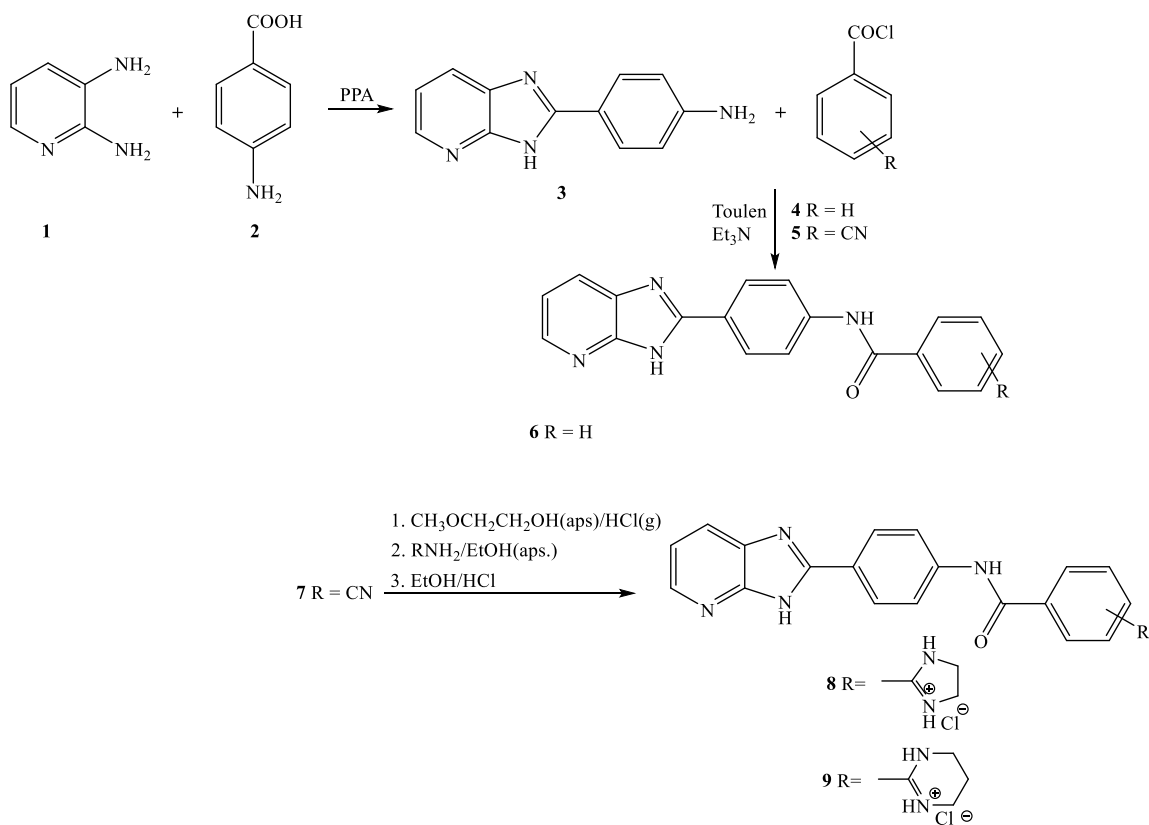
Tališta priređenih spojeva određena su na SMP10 Bibby aparatu te nisu korigirana.

UV/Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 50 spektrofotometru te su korištene kvarcne kivete promjera 0,5 cm te volumena 3 cm<sup>3</sup>.

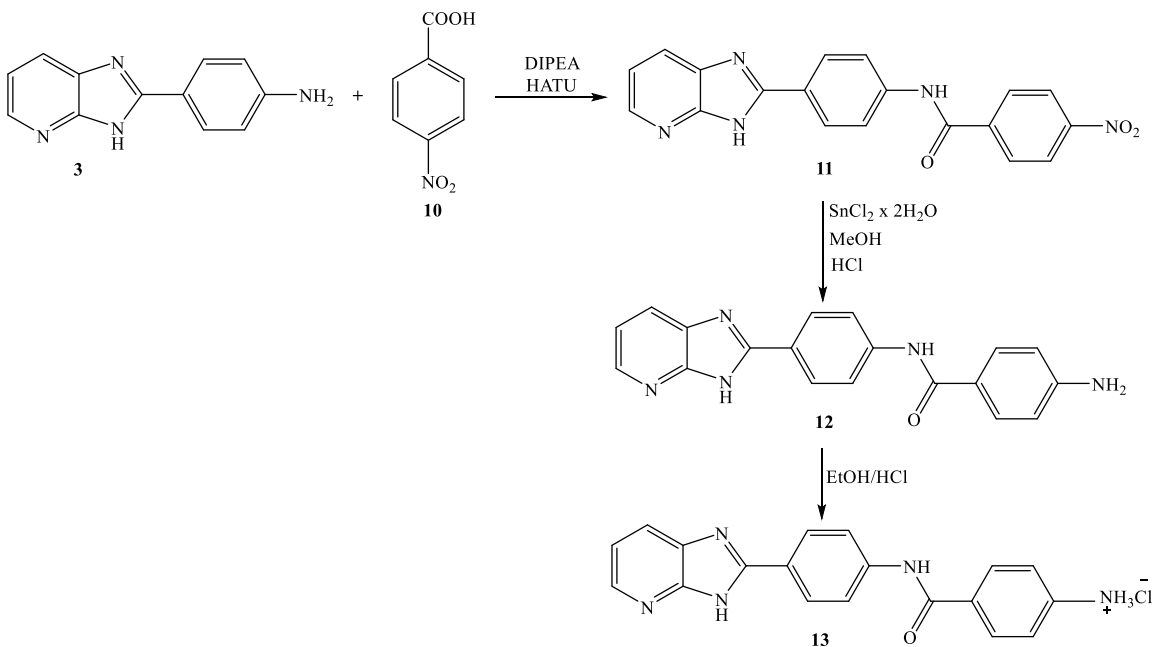
Svi spojevi provjeravani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) prilikom čega su upotrebljene pločice presvučene silikagelom Merck 60F-254, a detektirani su pod UV svjetlom (254 i 366 nm).

FTIR spektri snimljeni su na spektrofotometru Bruker Vertex 70 u ATR načinu snimanja.

## 4.2. Priprava benzamida imidazo[4,5-*b*]piridina 6-9 i 11-13



**Shema 38.** Priprava amidnih derivata 6-9 imidazo[4,5-*b*]piridina iz amina



**Shema 39.** Priprava nitro-amidnog derivata 11 te spojeva 12 i 13

#### 4.2.1. Priprava 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilina 3

U okruglu tikvicu stavi se 2,3-diaminopiridin **1** (2,000 g, 18,00 mmol), 4-aminobenzojeva kiselina **2** (2,510 g, 18,00 mmol) te polifosfosforna kiselina (PPA) (30,00 g). Reakcijska smjesa se zagrijava u uljnoj kupelji 3 h na 220 °C te se nakon hlađenja izlije na 10% ledenu otopinu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,000 L). Formirani produkt se profiltrira i ispere s vodom te se prekrizalizira iz smjese vode i etanola pri čemu je dobiveno 1,891 g (49,1%) ljubičastog praškastog produkta. T.t. > 300°C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 8,25 – 8,17 (m, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,91 (d, 2H, *J* = 8,58 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,85 (d, 1H, *J* = 7,62 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,14 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7,86 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4,80 Hz, H<sub>arom</sub>), 6,68 (d, 2H, *J* = 8,64 Hz), 5,71 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 150,64, 141,83, 127,54, 116,64, 115,87, 112,87.

#### 4.2.2. Opći postupak priprave amido-supstituiranih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina 6-7

Otopini spoja **3** u *N,N*-dimetilformamidu (DMF) i toulenu dodaju se odgovarajući benzoil-kloridi **4-5** te suvišak baze (Et<sub>3</sub>N) Reakcijska smjesa se zagrijava u uljnoj kupelji 24 h na temperaturi vrenja. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Nakon hlađenja, reakcijska smjesa se profiltrira te se talog ispere s 10% HCl ili vodom.

#### 4.2.3. Priprava *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)benzamida 6

Spoj **6** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **3** (0,100 g, 0,47 mmol), **4** (0,055 mL, 0,47 mmol) u 1,000 mL DMF, 7,500 mL toulena i Et<sub>3</sub>N (0,093 mL, 0,66 mmol). Nakon ispiranja vodom, dobiveno je 0,103 g (69,5%) sivog praškastog produkta. T.t. >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 10,72 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,64 – 8,54 (m, 1H, H<sub>arom</sub>), 8,42 (d, 1H, *J* = 7,68 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,36 (d, 2H, *J* = 8,76 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,11 (d, 2H, *J* = 8,82 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,07 – 7,99 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7,64 (t, 1H, *J* = 7,35 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,60 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7,95, *J*<sub>2</sub> = 5,49 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,57 (t, 2H, *J* = 7,53 Hz, H<sub>arom</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 166,57, 148,93, 143,67, 134,98, 132,46, 129,21, 128,97, 128,35, 126,20, 120,80, 119,78, 119,47.

#### 4.2.4. Priprava *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-cijanobenzamida 7

Spoj **7** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **3** (0,300 g, 1,42 mmol), **5** (0,236 g, 1,47 mmol) u 3,000 mL DMF, 20,000 mL toulena i Et<sub>3</sub>N (0,279 mL, 1,99 mmol). Nakon ispiranja 10% HCl i vodom, dobiveno je 0,232 g (48,0%) bež praškastog produkta. T.t. = >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 10,96 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,57 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,41 (d, 1H, *J* = 7,74 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,37 (d, 2H, *J* = 8,64 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,17 (d, 2H, *J* = 8,40 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,10 (d, 2H, *J* = 8,76

Hz,  $H_{\text{arom}}$ ), 8,06 (d, 2H,  $J = 8,40$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ), 7,59 (t, 1H,  $J = 6,57$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm} = 165,17, 149,09, 143,10, 138,97, 133,01, 130,67, 129,23, 129,18, 126,28, 122,54, 120,96, 119,42, 118,75, 114,63$ .

#### **4.2.5. Opći postupak pripreve amidinskih derivata amido-supstituiranih imidazo[4,5-*b*]piridina Pinnerovom metodom**

Cijano-supstituirani spojevi **7** i **22** suspendiraju se u bezvodnom 2-metoksietanolu te se reakcijska smjesa ohladi na 0 °C. Plinoviti HCl uvodi se u ohlađenu suspenziju do zasićenja. Tijek reakcije se prati IR spektroskopijom i miješa na sobnoj temperaturi sve do nestanka -CN vrpce na 2200  $\text{cm}^{-1}$  pri čemu se dobiva međuprodukt imino-ester. U suspenziju se doda bezvodni dietil-eter, talog se profiltrira i osuši pod sniženim tlakom. Suhi produkt se suspendira u bezvodnom etanolu te se dodaje odgovarajući amin u suvišku. Sirovi produkt se profiltrira i ispere dietil-eterom pri čemu se dobiju praškasti produkti, koji se suspendiraju u bezvodnom etanolu i konc. HCl.

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

#### **4.2.6. Priprava *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)benzamid hidroklorida **8****

Spoj **8** sintetiziran je iz spoja **7** (0,115 g, 0,25 mmol) i etilendiamina (0,060 mL, 0,89 mmol) pri čemu je dobiveno 0,030 g (28,3%) bijelog praškastog produkta. T.t. >300 °C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm} = 13,37$  (s, 1H, NH), 10,82 (s, 2H,  $\text{NH}_{\text{amidin}}$ ), 8,34 (s, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ), 8,25 (t, 4H,  $J = 8,13$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ), 8,16 (d, 2H,  $J = 8,04$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ), 8,02 (d, 3H,  $J = 8,22$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ), 7,24 (d, 1H,  $J = 3,78$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ), 4,05 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm} = 164,97, 164,75, 152,69, 143,97, 141,34, 140,15, 129,15, 129,07, 127,83, 126,47, 125,63, 125,34, 120,87, 118,55, 45,04$ .

#### **4.2.7. Priprava *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)benzamid hidroklorida **9****

Spoj **9** je sintetiziran je iz spoja **7** (0,119 g, 0,26 mmol) i 1,3-propilendiamina (0,044 mL, 0,52 mmol) pri čemu je dobiveno 0,082 g (72,5%) bijelog praškastog produkta. T.t. >300 °C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm} = 11,03$  (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{amid}}$ ), 10,30 (s, 2H,  $\text{NH}_{\text{amidin}}$ ), 8,54 (d, 1H,

$J = 4,98$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $8,39$  (d, 2H,  $J = 8,70$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $8,35$  (d, 1H,  $J = 7,44$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $8,25$  (d, 2H,  $J = 8,40$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $8,14$  (d, 2H,  $J = 8,82$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $7,95$  (d, 2H,  $J = 8,34$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $7,54$  (t, 1H,  $J = 6,45$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $3,52$ – $3,46$  (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ),  $2,05$ – $1,97$  (m, 2H,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm} = 165,26, 158,99, 138,79, 131,72, 129,00, 128,90, 128,40, 120,99, 119,28, 36,47, 25,52$ .

#### 4.2.8. Priprava *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-nitrobenzamida **11**

4-nitrobenzojeva kiselina **10** (0,158 g, 0,95 mmol) otopi se u 5,000 mL DMF-a te se miješa na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta dodaje se HATU (0,397 g, 1,05 mmol) i DIPEA (0,1822 mL, 1,05 mmol) te na kraju 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilin **3** (0,200 g, 0,95 mmol). Reakcijska smjesa se miješa 24 h na sobnoj temperaturi, a tijekom reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Nastali talog je profiltriran te ispran vodom pri čemu je dobiveno 0,254 g (74,2%) žutog praškastog produkta. T.t.  $>300$  °C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm} = 13,47$  (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{arom}}$ ),  $10,82$  (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{amid}}$ ),  $8,40$  (d, 2H,  $J = 8,88$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $8,33$  (d, 1H,  $J = 3,60$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $8,25$  (d, 2H,  $J = 8,76$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $8,22$  (d, 2H,  $J = 8,88$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $8,00$  (d, 3H,  $J = 8,76$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $7,25$  (dd, 1H,  $J_1 = 7,95, J_2 = 4,77$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm} = 164,68, 162,78, 149,74, 144,08, 141,27, 140,85, 129,80, 127,88, 125,66, 124,10, 120,89, 118,48$ .

#### 4.2.9. Priprava *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamida **12**

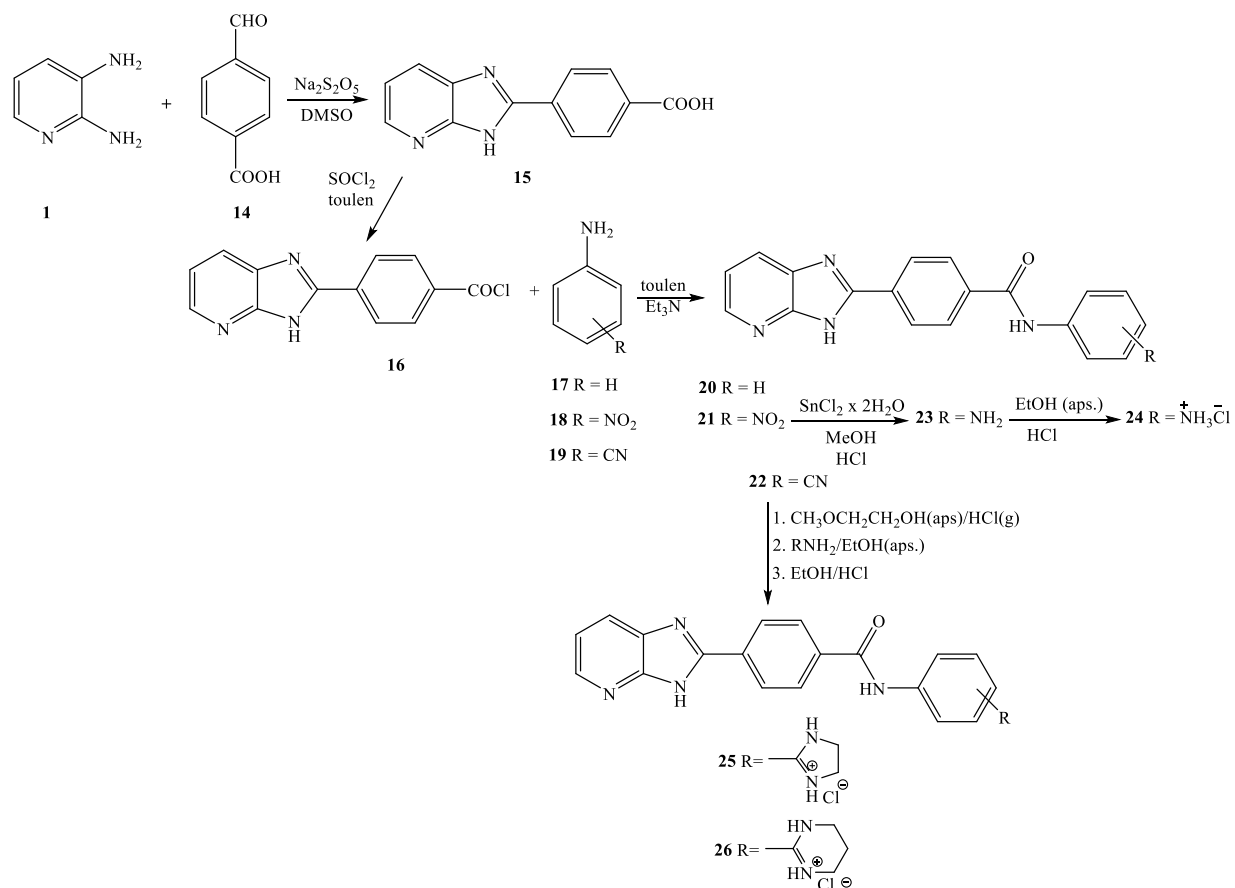
U okruglu tikvicu stavi se 0,200 g (0,55 mmol) početnog spoja *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-nitrobenzamida **11**, 0,501 g (2,22 mmol)  $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 15,000 mL metanola i 5,000 mL otopine HCl. Reakcijska smjesa se zagrijava u uljnoj kupelji 1 h na temperaturi vrenja. Tijekom reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Nakon hlađenja, reakcijska smjesa se upari do suha pri čemu zaostaje žuto-zeleno ulje. Doda se 10,00 mL destilirane vode i zaluži s 20% otopinom NaOH do pH 14. Nastali talog se profiltrira preko Büchnerovog lijevka te se dobije 0,170 g (92,8%) bež praškastog produkta **12**. T.t.  $>300$  °C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm} = 13,40$  (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{arom}}$ ),  $10,04$  (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{amid}}$ ),  $8,27$  (d, 1H,  $J = 4,74$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $8,19$  (d, 2H,  $J = 8,46$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $7,96$  (d, 2H,  $J = 7,32$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $7,92$  (d, 1H,  $J = 7,56$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $7,77$  (d, 2H,  $J = 8,34$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $7,16$  (dd, 1H,  $J_1 = 7,83, J_2 = 4,77$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $6,62$  (d, 2H,  $J = 8,64$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ),  $5,83$  (s, 2H,  $\text{NH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm} = 164,87, 151,78, 142,33, 141,14, 128,94, 126,58, 120,11, 119,30, 119,24, 116,74, 111,97, 111,92$ .



**4.2.10. Priprava (4-((4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)karbamoil)fenil)hidroklorida 13**

*N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamid **12** (0,050 g, 0,15 mmol) suspendira u 1,000 mL bezvodnog etanola i 15,000  $\mu$ L (0,15 mmol) konc. HCl. Smjesa se miješa 24 h na sobnoj temperaturi te se profiltrira. Dobiveno je 0,025 g (45,0%) žutog praškastog produkta **13**. T.t. >300 °C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm = 10,32 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,53 (d, 1H,  $J$  = 5,10 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,36 (d, 3H,  $J$  = 8,70 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,09 (d, 2H,  $J$  = 8,82 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,84 (d, 2H,  $J$  = 8,58 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,55 (dd, 1H,  $J_1$  = 7,50,  $J_2$  = 5,64 Hz, H<sub>arom</sub>), 6,74 (d, 2H,  $J$  = 8,22 Hz, NH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm = 166,10, 144,19, 130,17, 129,05, 125, 56, 121,31, 120,44, 119,34, 114,22.

### 4.3. Priprava benzamida imidazo[4,5-*b*]piridina 20-26



**Shema 40.** Priprava amidnih derivata **20-26** imidazo[4,5-*b*]piridina iz kiseline

#### 4.3.1. Priprava 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzojeve kiseline **15**

Spoj **15** pripravljen je zagrijavanjem ekvimolarne količine 2,3-diaminopiridina **1** (2,000 g, 18,00 mmol) i 4-formilbenzojeve kiseline **14** (2,750 g, 18,00 mmol) dodatkom 0,55 ekvivalenata Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1,882 g, 9,90 mmol) u 15,000 mL DMSO na 165 °C u uljnoj kupelji. Nakon 15 minuta, reakcijska se smjesa ohladi na sobnu temperaturu te se doda voda. Nakon 10 minuta miješanja, nastali talog se profiltrira i dobro ispere vodom. Nakon sušenja, talog je ispran sa 500,000 mL vrućeg etanola i 30,000 mL DMF-a. Smjesa je ostavljena preko noći u hladnjaku te je nakon filtracije dobiveno 2,420 g bež praškastog produkta. T.t. >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 13,57 (s, 1H, NH<sub>arom</sub>), 13,20 (s, 1H, OH<sub>kis</sub>), 8,40 (s, 1H, H<sub>arom</sub>), 8,36 (d, 2H, *J* = 8,34 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,13 (d, 2H, *J* = 8,16 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,08 (s, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,29 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7,98, *J*<sub>2</sub> = 4,68 Hz, H<sub>arom</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 166,22, 143,80, 132,82, 131,66, 129,32, 126,20, 117,84.

#### 4.3.2. Opći postupak priprave amida 20-22

Otopini 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzoil klorida **16** u *N,N*-dimetilformamidu (DMF) i toulenu dodaju se odgovarajući aromatski amini **17-19** te suvišak baze (Et<sub>3</sub>N) Reakcijska smjesa se zagrijava u uljnoj kupelji 24 h na temperaturi vrenja. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Nakon hlađenja, reakcijska smjesa se profiltira preko sintera te se talog ispire s vodom.

#### 4.3.3. Priprava 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-fenilbenzamida **20**

Spoj **20** sintetiziran je prethodno opisanom metodom, iz spoja **16** (0,108 g, 0,42 mmol), **17** (0,038 mL, 0,42 mmol) u 2,000 mL DMF, 10,000 mL toulena i Et<sub>3</sub>N (0,082 mL, 0,59 mmol) Nakon ispiranja vodom i prekrizalizacije iz 100,000 mL etanola dobiveno je 0,052 g (39,5%) bež kristaličnog praškastog produkta. T.t. >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 13,56 (s, 1H, NH<sub>arom</sub>), 10,38 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,39 (d, 3H, *J* = 7,68 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,16 (d, 2H, *J* = 7,38 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,82 (d, *J* = 7,62 Hz, 2H H<sub>arom</sub>), 7,38 (t, 2H, *J* = 7,89 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,29 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7,9, *J*<sub>2</sub> = 4,7 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,14 (d, 1H, *J* = 7,38 Hz, H<sub>arom</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 165,29, 151,94, 149,83, 144,79, 139,53, 136,77, 136,10, 132,78, 129,33, 129,18, 129,14, 129,12, 128,86, 127,07, 124,31, 120,92, 120,87, 120,02, 118,89.

#### 4.3.4. Priprava 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **21**

Spoj **21** sintetiziran prethodno opisanom metodom iz spoja **16** (0,500 g, 1,94 mmol), **18** (0,268 g, 1,94 mmol) u 10,000 mL DMF, 25,00 mL toulena i Et<sub>3</sub>N (0,379 mL, 2,72 mmol). Nakon ispiranja vodom dobiveno je 0,147 g (21,2%) bež praškastog produkta. T.t. >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 13,60 (d, 1H, NH<sub>arom</sub>), 10,94 (d, 1H, *J* = 9,66 Hz, NH<sub>amid</sub>), 8,42 (d, 2H, *J* = 8,28 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,38 (d, 1H, *J* = 4,26 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,30 (d, 2H, *J* = 9,18 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,19 (t, 2H, *J* = 10,26 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,14 – 8,09 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 7,30 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7,71, *J*<sub>2</sub> = 4,77 Hz, H<sub>arom</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 166,06, 145,85, 144,89, 143,07, 135,94, 133,35, 129,16, 127,21, 127,14, 125,37, 125,33, 120,46, 120,42, 118,93.

#### 4.3.5. Priprava *N*-(4-cijanofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamida **22**

Spoj **22** sintetiziran je prethodno opisanom metodom iz spoja **16** (0,393 g, 1,52 mmol), **19** (0,180 g, 1,52 mmol) u 2,00 mL DMF, 15,000 mL toulena i Et<sub>3</sub>N (0,298 mL, 2,13 mmol) Nakon ispiranja vodom, i prekrizalizacije iz 250,000 mL etanola i 50 mL DMF-a dobiveno je 0,296 g (57,1%) bež praškastog produkta. T.t. >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 13,76 (s, 1H, NH<sub>arom</sub>),

10,79 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,41 (d, 3H,  $J = 8,52$  Hz, H<sub>arom</sub>), 8,17 (d, 2H,  $J = 8,46$  Hz, H<sub>arom</sub>), 8,08 (d, 1H,  $J = 5,94$  Hz, H<sub>arom</sub>), 8,04 (d, 2H,  $J = 8,82$  Hz, H<sub>arom</sub>), 7,86 (d, 2H,  $J = 8,76$  Hz, H<sub>arom</sub>), 7,30 (dd, 1H,  $J_1 = 7,95$ ,  $J_2 = 4,71$  Hz, H<sub>arom</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm = 165,29, 151,94, 149,83, 144,79, 139,53, 136,77, 136,10, 132,78, 129,33, 129,18, 129,14, 129,12, 128,86, 127,07, 124,31, 120,92, 120,87, 120,02, 118,89.

#### 4.3.6. Priprava *N*-(4-aminofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamida **23**

U okruglu tikvicu stavi se 0,144 g (0,40 mmol) početnog spoja 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **21**, 0,362 g (1,60 mmol) SnCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 11,000 mL metanola i 4,000 mL otopine HCl. Reakcijska smjesa se zagrijava u uljnoj kupelji 1 h na temperaturi vrenja. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Nakon hlađenja, reakcijska smjesa se upari do suha pri čemu zaostaje žuto-zeleno ulje. Doda se 10,00 mL destilirane vode i zaluži s 20% otopinom NaOH do pH 14. Nastali talog se profiltrira preko Büchnerovog lijevka te se dobije 0,108 g (82,0%) žutog praškastog produkta **23**. T.t. >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm = 10,02 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,36 (dd, 3H,  $J_1 = 9,75$ ,  $J_2 = 4,89$  Hz, H<sub>arom</sub>), 8,10 (d, 2H,  $J = 8,34$  Hz, H<sub>arom</sub>), 8,03 (dd, 1H,  $J_1 = 7,89$ ,  $J_2 = 0,99$  Hz, H<sub>arom</sub>), 7,42 (d, 2H,  $J = 8,64$  Hz, H<sub>arom</sub>), 7,24 (dd, 1H,  $J_1 = 7,95$ ,  $J_2 = 4,71$  Hz, H<sub>arom</sub>), 6,57 (d, 2H,  $J = 8,64$  Hz, H<sub>arom</sub>), 4,96 (s, 2H, NH<sub>2</sub>);

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm = 164,41, 153,11, 145,80, 144,33, 136,92, 133,04, 130,14, 128,59, 128,54, 128,50, 127,35, 127,11, 127,00, 122,67, 120,42, 118,43, 114,15.

#### 4.3.7. Priprava (4-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamido)fenil)hidroklorida **24**

*N*-(4-aminofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid **23** (0,050 g, 0,15 mmol) suspendira u 1,000 mL bezvodnog etanola i 15,000  $\mu$ L (0,15 mmol) konc. HCl. Smjesa se miješa 24 h na sobnoj temperaturi te se profiltrira preko sintera. Dobiveno je 0,035 g (63,9%) žutog praškastog produkta **24**. T.t. >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm = 10,68 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,54 (d, 1H,  $J = 4,74$  Hz, H<sub>arom</sub>), 8,48 (d, 2H,  $J = 8,40$  Hz, H<sub>arom</sub>), 8,33 (d, 1H,  $J = 7,50$  Hz, H<sub>arom</sub>), 8,22 (d, 2H,  $J = 8,46$  Hz, H<sub>arom</sub>), 7,94 (d, 2H,  $J = 8,82$  Hz, H<sub>arom</sub>), 7,51 (dd, 1H,  $J_1 = 6,99$ ,  $J_2 = 5,73$  Hz, H<sub>arom</sub>), 7,41 (d, 2H,  $J = 8,82$  Hz, H<sub>arom</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm = 165,30, 139,14, 137,25, 129,11, 127,79, 123,98, 121,87, 119,34.

#### 4.3.8. Priprava *N*-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid hidroklorida 25

Spoj **25** sintetiziran prema 3.2.5. Općem postupku priprave amidinskih derivata, iz spoja **22** (0,101 g, 0,22 mmol) i etilendiamina (0,052 mL, 0,78 mmol) pri čemu je 0,040 g (68,0%) bijelog praškastog produkta. T.t. >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 11,02 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 10,63 (s, 2H, NH<sub>amidin</sub>), 8,56 (d, 1H, *J* = 4,44 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,50 (d, 2H, *J* = 8,40 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,38 (d, 1H, *J* = 6,48 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,25 (d, 2H, *J* = 8,34 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,12 (d, 2H, *J* = 8,88 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,07 (d, 2H, *J* = 8,82 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,54 (s, 1H, H<sub>arom</sub>), 4,00 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 164,79, 163,60, 144,02, 135,93, 132,56, 129,05, 128,25, 126,84, 119,71, 119,33, 118,35, 116,08, 55,39, 43,61, 17,95.

#### 4.3.9. Priprava 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)benzamid hidroklorida 26

Spoj **9** je sintetiziran je prema 3.2.5. Općem postupku priprave amidinskih derivata, iz spoja **22** (0,101 g, 0,22 mmol) i 1,3-propilendiamina (0,038 mL, 0,44 mmol) pri čemu je dobiveno dobiveno 0,030 g (46,0%) bijelog praškastog produkta. T.t. >300 °C. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm = 10,94 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 10,01 (s, 2H, NH<sub>amidin</sub>), 8,55 (d, 1H, *J* = 4,80 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,50 (d, 2H, *J* = 8,22 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,38 – 8,34 (m, 1H, H<sub>arom</sub>), 8,26 (d, 2H, *J* = 8,28 Hz, H<sub>arom</sub>), 8,09 (d, 2H, *J* = 8,76 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,81 (d, 2H, *J* = 8,70 Hz, H<sub>arom</sub>), 7,53 (d, 1H, *J* = 6,42 Hz, H<sub>arom</sub>), 3,48 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,03 – 1,95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 164,63, 164,56, 161,59, 157,91, 143,03, 142,85, 135,96, 132,55, 130,66, 128,50, 128,18, 127,81, 126,80, 125,39, 122,69, 122,45, 119,71, 119,32, 119,16, 118,31, 55,39, 17,20.

## **5. ZAKLJUČAK**

- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)benzamid **6**, *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-cijanobenzamid **7**, *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)benzamid hidroklorid **8**, *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)benzamid hidroklorid **9**, *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-nitrobenzamid **11**, *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamid **12**, *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamid hidroklorid **13**, 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-fenilbenzamid **20**, 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-nitrofenil)benzamid **21**, *N*-(4-cijanofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid **22**, *N*-(4-aminofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid **23**, *N*-(4-aminofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid hidroklorid **24**, *N*-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid hidroklorid **25**, 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)benzamid hidroklorid **26**.
- 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilin **3** priređen je reakcijom kondenzacije 2,3-diaminopiridina **1** s PABA **2** u prisutnosti PPA kao ciklizacijskog reagensa, kao glavni prekursor za reakciju kondenzacije s odgovarajućim benzoil-kloridima **4-5** u apsolutnom toulenu uz Et<sub>3</sub>N za sintezu ciljanih benzamida imidazo[4,5-*b*]piridina **6-7**.
- *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-nitrobenzamid **11** sintetiziran u reakciji 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilina **3** te HATU i DIPEA aktivirane *p*-nitrobenzojeve karboksilne kiseline **10**.
- Reakcijom ciklokondenzacije 2,3-diaminopiridina **1**, te 4-formilbenzaldehida **14** uz Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, zagrijavanjem na visokoj temperaturi nastaje 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzojeva kiselina **15** koja u reakciji nukleofilne supstitucije s tionil-kloridom u toulenu daje glavni prekursor za sintezu benzamida **20-22**, 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzoil klorid **16**.
- Benzamidi **20**, **21** i **22** priređeni su kondenzacijom odgovarajućih aromatskih amina **17-19** i 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzoil klorida **16** u apsolutnom toulenu uz Et<sub>3</sub>N.
- Reakcijom redukcije nitro derivata **11** i **21** sa SnCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O kiseline priređeni su *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamid **12** te *N*-(4-aminofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid **23**.
- Amino derivati benzamida **12** i **23** prevedeni su u hidrokloridne soli **13** i **24** u apsolutnom etanolu sa zasićenom s HCl-om.

- Iz odgovarajućih cijano-supstituiranih prekursora; *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-cijanobenzamida **7**, odnosno *N*-(4-cijanofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamida **22** kiselom Pinnerovom reakcijom u dva stupnja u 2-metoksietanolu priređeni su *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)benzamid hidroklorid **8**, *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)benzamid hidroklorid **9**, odnosno *N*-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid hidroklorid **25** i 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)benzamid hidroklorid **26**.
- Svim sintetiziranim spojevima struktura je potvrđena korištenjem <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektroskopije, a nekim spojevima struktura je dodatno okarakterizirana i masenom spektrometrijom i IR spektroskopijom.
- Svim priređenim derivatima benzamida imidazo[4,5-*b*]piridina ispitana je antiproliferativna aktivnost *in vitro*, te su ispitani spojevi pokazali slabu aktivnost, osim derivata **7** koji pokazuje selektivno i izraženo djelovanje prema staničnim linijama Capan-1 i LN-229.
- Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **12** i **23** kao optičkih pH senzora, korištenjem UV/Vis spektroskopije ispitana je promjena njihovih spektroskopskih svojstava u otapalima različite polarnosti, te ovisno o različitim vrijednostima pH otopine
- Iz dobivenih rezultata pH titracija zaključuje se da ispitivani spojevi ne pokazuju značajnu promjenu spektroskopskih karakteristika u ovisnosti o pH vrijednostima otopina.



## **6. POPIS KRATICA**

UV/Vis – ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO – dimetil sulfoksid

PPA – polifosforna kiselina

HATU – (1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinium-3-oksid  
heksafluorofosfat

DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamin

DCC – dicikloheksilkarbodiimid

TBTU – 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminijev tetrafluoroborat

FAAH – hidrolaze amida masnih kiselina

ATP – adenzin trifosfat

ICR – ionska ciklotronska rezonancija

AURKA – Aurora A kinaza

AEA – arahidonoil etanolamid

HBTU – heksafluorofosfat benzotriazol tetrametil uronij

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

BBDI – 1-*tert*-butoksi-2-*tert*-butoksikarbonil-1,2-dihidroizokinolin

## **7. LITERATURA**



1. A. Ojeda-Porras, D. Gamba-Sanchez, *J. Org. Chem.* **81** (2016) 11555.
2. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 631.
3. J. E. McMurry, *Cengage Learning* (2010).
4. V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Nature* **480** (2011) 479.
5. J. Thorner, S.D. Emr, J.N. Abelson, *Methods Enzymol.* **326** (2000) 617.
6. S. Mahesh, K.-C. Tang, M. Raj, *Molecules* **23** (2018) 2615.
7. R. Parthasarathy, V. Subramanian, K. K. Kannan, *Tetrahedron Lett.* **33** (1992) 5922.
8. H.-R. Tseng, Y. Wang, M.-P. Nieh, R.-S. Liu, *J Am Chem Soc.* **125** (2003) 4723.
9. D. L. Nelson, M. M. Cox, *W. H. Freeman.* (2008).
10. T. E. Creighton, *Garland Science* (2010).
11. G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, *Adv Protein Chem Struct Biol* **37** (1985) 109.
12. K. A. Dill, *Biochemistry*, **29** (1990) 7155.
13. T. Narendar Reddy, A. Beatriz, V. Jayathirtha Rao, D. P. de Lima, *Chem Asian J.* **14** (2019) 388.
14. R. M. de Figueiredo, J. S. Suppo, J. M. Campagne, *Chem Rev.* **116** (2016) 12122.
15. C. E. Mobermann, *Wiley* **1** (1991) 266.
16. S. Kumari, A. V. Carmona, A.K. Tiwari, P. C. Trippier, *J. Med. Chem.* **63** (2020) 12358.
17. K. Pedrood, S. Bahadorikhalili, V. Lotfi, *Mol Divers* **26** (2022) 1344.
18. K. N. Kumar, K. Sreeramamurthy, S. Palle, *Tetrahedron Lett* **51** (2010) 902.
19. J. March, *John Wiley* (2001) 510.
20. H. Lundberg, F. Tinnis, N. Selander, H. Adolfsson, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 2742.
21. M. B. Smith, J. March, *Wiley* (2000) 510.
22. C. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10852.
23. S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **60** (2004) 2467.
24. L. Wigman, T. Remarchuk, S. R. Gomez, A. Kumar, M. W. Dong, C. D. Medley, N. P. Chetwyn, *Am. Pharm. Rev.* **17** (2014) 20.
25. M. Bodansky, Y. S. Klausner, M. A. Ondetti, *Wiley* (1976) 89.
26. M. Bodansky, E. Gross, J. Meienhafer, *AP* (1979) 105.
27. V. Voinescu, M. Herman, E. Ramontian, *Rev. Chem.* **19** (1968) 678.
28. H.A. Staab, W. Rohr, *Wiley-VCH* **5** (1967) 74.
29. H. Ogura, T. Kbbayashi, K. Shimizu, K. Kawabe, K. Takeda, *Tetrahedron Lett.* (1979) 4745.

30. H. Ogura, S. Nagai, K. Takeda, *Tetrahedron Lett.* **2** (1980) 1467.
31. K. Takeda, I. Sawada, A. Suzuki, H. Ogura, *Tetrahedron Lett.* **3** (1983) 4451.
32. H. Takabu, M. Yoshida, *J. Org. Chem.* **5** (1981) 589.
33. W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* (1970) 788.
34. M. Ueda, H. Oikawa, N. Kawaharasaki, Y. Imai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56** (1983) 2485.
35. H. W. Grimmel, A. Guenther, J. F. Morgan, *J. Am. Chem. Soc.* **68** (1946) 539.
36. Z. J. Kaminski, *Tetrahedron Lett.* **24** (1985) 2901.
37. T. Mukaiyama, R. Matsueda, M. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* (1970) 1901.
38. T. Mukaiyama; S. Ikeda, S. Kobayashi, *Chem. Lett.* (1975) 1159.
39. M. Wakselman, F. Acher, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (1981) 632.
40. G. Trafani, A. Reho, A. Latrofa, *Synthesis* (1983) 1013.
41. K. S. Keshavamurthy, Y. D. Vankar, D. N. Dhar, *Synthesis* (1982) 506.
42. J. M. Shim, Y. H. Kim, *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 1921.
43. K. Steliou, M.-A. Poupart, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 7130.
44. J. R. Dunetz, J. Magano, G. A. Weisenburger, *Org. Process Res. Dev.* **20** (2016) 177.
45. R. Vaidyanathan, V. G. Kalthod, D. P. Ngo, J. M. Manley, S. P. Lapekas, *J. Org. Chem.* **69** (2004) 2565.
46. K. M. Engstrom, A. Sheikh, R. Ho, R. W. Miller, *Org. Process Res. Dev.* **18** (2014) 488.
47. J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **77** S(1955) 1067.
48. N. L. Benoiton, F. M. F. Chen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **11** (1981) 543.
49. W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **103** (1970) 788.
50. G. W. Anderson, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 2903.
51. I. Andrews, J. Cui, J. DaSilva, L. Dudin, P. Dunn, J. Hayler, B. Hinkley, D. Hughes, B. Kaptein, K. Lorenz, S. Mathew, T. Rammeloo, L. Wang, A. Wells, T. White, F. Zhang, *Org. Process Res. Dev.* **14** (2010) 29.
52. H. Charville, D. Jackson, G. Hodges, A. Whiting, *Chem. Commun.* **46** (2010) 1823.
53. R. M. Lanigan, T. D. Sheppard, *Eur. J. Org. Chem.* **2013** (2013) 7465.
54. H. Charville, D. A. Jackson, G. Hodges, A. Whiting, M. R. Wilson, *Eur. J. Org. Chem.* **2011** (2011) 5990.
55. L. J. Gooßen, D. M. Ohlmann, P. P. Lange, *Synthesis* **1** (s2009) 164.

56. T. K. Houlding, K. Tchabanenko, M. T. Rahman, E. V. Rebrov, *Org. Biomol. Chem.* **11** (2013) 4177.
57. C. L. Allen, A. R. Chhatwal, J. M. J. Williams, *Chem. Commun.* **48** (2012) 668.
58. H. Lundberg, F. Tinnis, H. Adolfsson, *Chem. Eur. J.* **18** (2012) 3826.
59. H. Lundberg, F. Tinnis, H. Adolfsson, *Synlett* **23** (2012) 2204.
60. J. Li, K. Subramaniam, D. Smith, J. X. Qiao, J. J. Li, J. Qian-Cutrone, J. F. Kadow, G. D. Vite, B.-C. Chen, *Org. Lett.* **14** (2012) 217.
61. A. Orliac, D. G. Pardo, A. Bombrun, J. Cossy, *Org. Lett.* **15** (2013) 905.
62. Y. Saito, H. Ouchi, H. Takahata, *Tetrahedron* **64** (2008) 11135.
63. P. Starkov, T. D. Sheppard, *Org. Biomol. Chem.* **9** (2011) 1323.
64. R. M. Lanigan, P. Starkov, T. D. Sheppard, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 4523.
65. M. J. J. Litjens, A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, J. J. Heijnen, *Tetrahedron* **55** (1999) 12418.
66. L. Y. Shteinberg, *Russ. J. Org. Chem.* **39** (2003) 974.
67. T. Mohy El Dine, W. Erb, Y. Berhault, J. Rouden, J. Blanchet, *J. Org. Chem.* **80** (2015) 4544.
68. T. Krause; S. Baader, B. Erb, L. J. Goossen, *Nat. Commun.* **7** (2016) 11732.
69. A. Ojeda-Porras, A. Hernandez-Santana, D. Gamba-Sanchez, *Green Chem.* **17** (2015) 3163.
70. M. Tamura, D. Murase, K. Komura, *Synthesis* **47** (2015) 776.
71. S. K. Mangawa, S. K. Bagh, K. Sharma, S. K. Awasthi, *Tetrahedron Lett.* **56** (2015) 1963.
72. B. F. McGuinness, A. G. Cole, G. Dong, M.-R. Brescia, Y. Shao, I. Henderson, L. L. Rokosz, T. M. Stauffer, N. Mannava, E. F. Kimble, C. Hicks, N. White, P. G. Wines, E. Quadros, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2010) 6849.
73. Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol* **22** (1973) 3108.
74. R. A. Copeland, *Wiley* (2016) 576.
75. S.-C. Lee, H. Tae Kim, C.-H. Park, D. Young Lee, H.-J. Chang, S. Park, J. Myung Cho, S. Ro, Y.-Ger Suh, *Bioorg. Med. Chem* **22** (2012) 4224.
76. P. Cohen, D. Yellowlees, A. Aitken, A. Donella-Deana, B. A. Hemmings, P. Parker, *Eur. J. Biochem.* **124** (1982) 21.
77. A. Martinez, A. Castro, I. Dorronsoro, M. Alonso, *Med. Res. Rev.* **22** (2002) 373.
78. A. Mutlib, T. C. Goosen, J. N. Bauman, *Chem. Res. Toxicol.* **19** (2006) 701.
79. N. Sunduru, M. Svensson, M. Cipriano, S. Marwaha, C. D. Andersson, R. Svensson, C. J. Fowler, M. Eloffson, *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **32** (2017) 521.

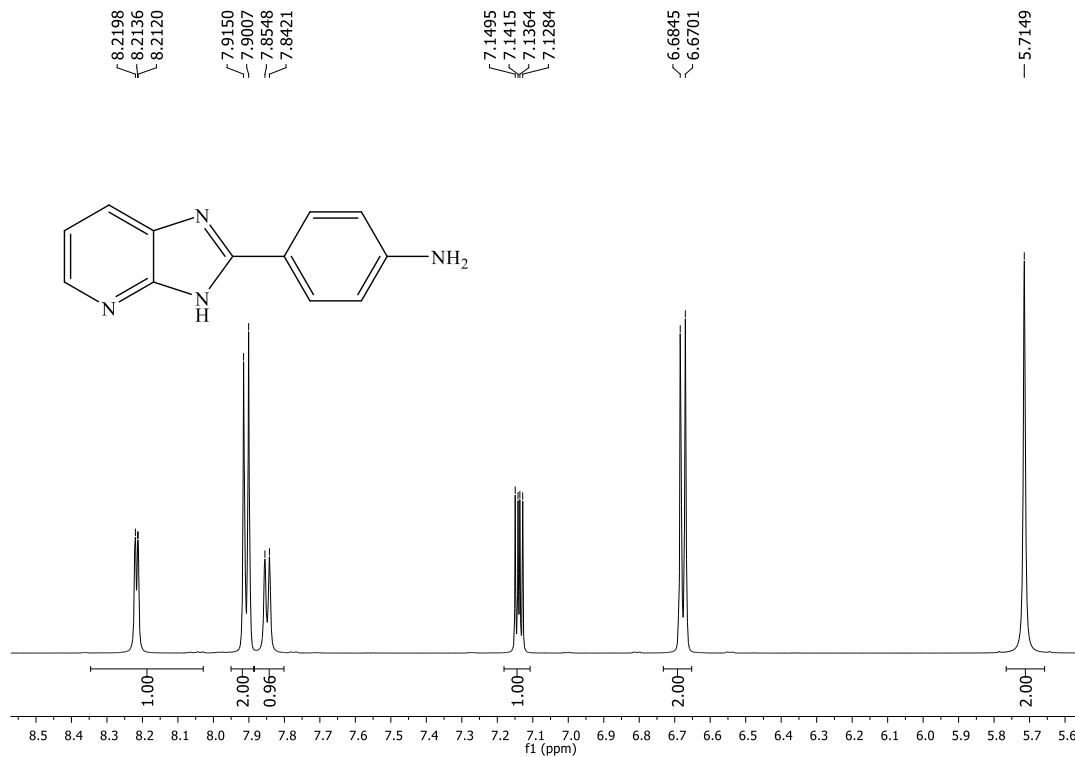
80. D. L. Boger, Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitors. (2007) Patent US7279562 B2
81. X. Min, S. T. Thibault, A. C. Porter, D. J. Gustin, T. J. Carlson, H. Xu, M. Lindstrom, G. Xu, C. Uyeda, Z. Ma, Y. Li, *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (2011) 7384.
82. K. Ahn, D. S. Johnson, B. F. Cravatt, *Expert Opin Drug Discov.* **4** (2009) 784.
83. J. J. Nunes, J. C. Milne, J. E. Bemis, (2007) Patent WO2007/019345 A1
84. D. L. Garmaise, J. Komlossy, *J Org Chem* **29** (1964) 3405.
85. U. Eichelberger, I. Neundorf, L. Hennig, *Tetrahedron* **58** (2002) 549.
86. L. Boldrup, S. J. Wilson, A. J. Barbier, *J Biochem Biophys Methods* **60** (2004) 177.
87. M. Cipriano, E. Bjorklund, A. A. Wilson, *Eur J Pharmacol* **720** (2013) 390.
88. F. Doganc, M. Alp, A. Karabay, A. Koç, G. Eren, H. Göker, *ChemistrySelect* **6** (2021) 1525.
89. R. Crane, B. Gadea, L. Littlepage, H. Wu, J. V. Ruderman, *Biol. Cell* **96** (2003) 229.
90. T. Marumoto, D. Zhang, H. Saya, *Nat. Rev. Cancer.* **5** (2005) 50.
91. N. Keen, S. Taylor, *Nat. Rev. Cancer.* **4** (2004) 936.
92. E. A. Harrington, D. Bebbington, J. Moore, R. K. Rasmussen, A. O. Ajose-Adeogun, T. Nakayama, J. A. Graham, C. Demur, T. Hercend, A. Diu-Hercend, M. Su, *Nat. Med.* **10** (2004) 267.
93. E. S. Krongauz, A. L. Rusanov, T. L. Renard, *Russ. Chem. Rev.* **39** (1970) 9.
94. Y.-H. So, J. P. Heeschen, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 3561.
95. N. M. Ghanem, F. Farouk, R. F. George, S. E. S. Abbas, O. M. El-Badry, *Bioorg. Chem.* **80** (2018) 576.
96. A. Sablan, *PRODRUG SYNTHESIS USING PACLITAXEL AND HYBRID PEPTIDES* (2017)
97. URL: [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Amine\\_to\\_Amide\\_Coupling/Amine\\_to\\_Amide\\_Coupling\\_HATU\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HATU_Mech.htm) (pristup 18.06.2023.)
98. R. A. I. Abou-Elkhair, A. E. A. Hassan, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Org Lett.* **18** (2016) 4717.
99. I. Boček, K. Starčević, I. Novak Jovanović, R. Vianello, M. Hranjec, *J. Mol. Liq.* **342** (2021) 117527.
100. M. Hranjec, E. Horak, D. Babić, S. Plavljanin, Z. Srdović, I. Murković Steinberg, R. Vianello, N. Perin, *New J. Chem.* **41** (2017) 371.
101. N. Perin, D. Babić, P. Kassal, A. Čikoš, M. Hranjec, R. Vianello, *Chemosensors* **10** (2022) 21.



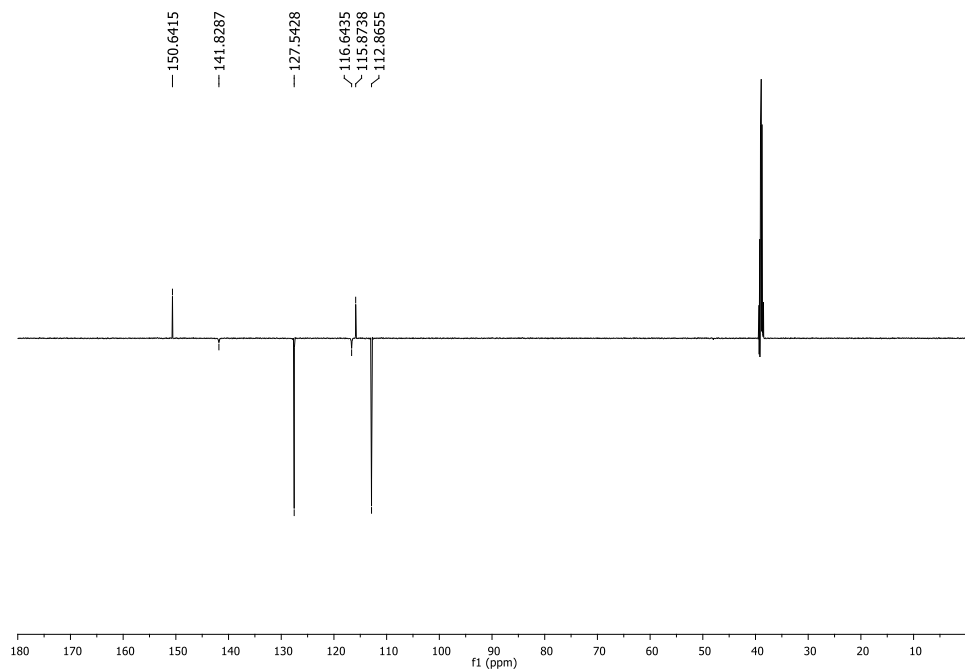
## **8. PRILOZI**

**Prilog 1.**

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilina **3**

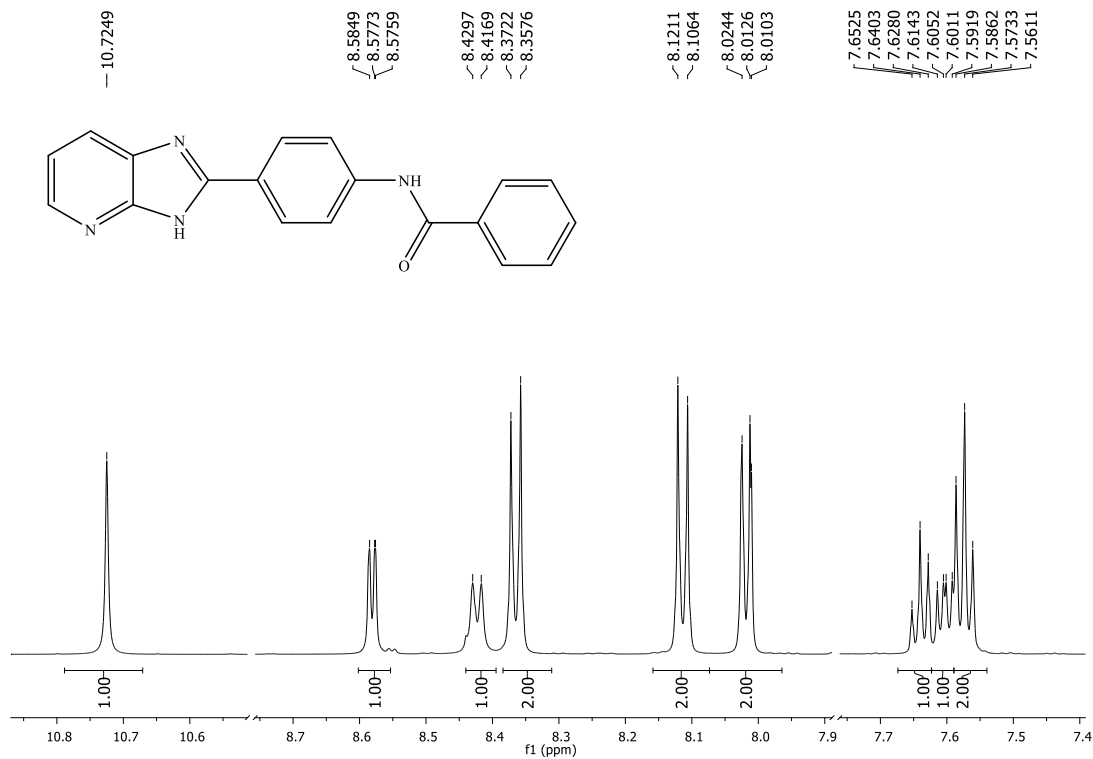


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)anilina **3**

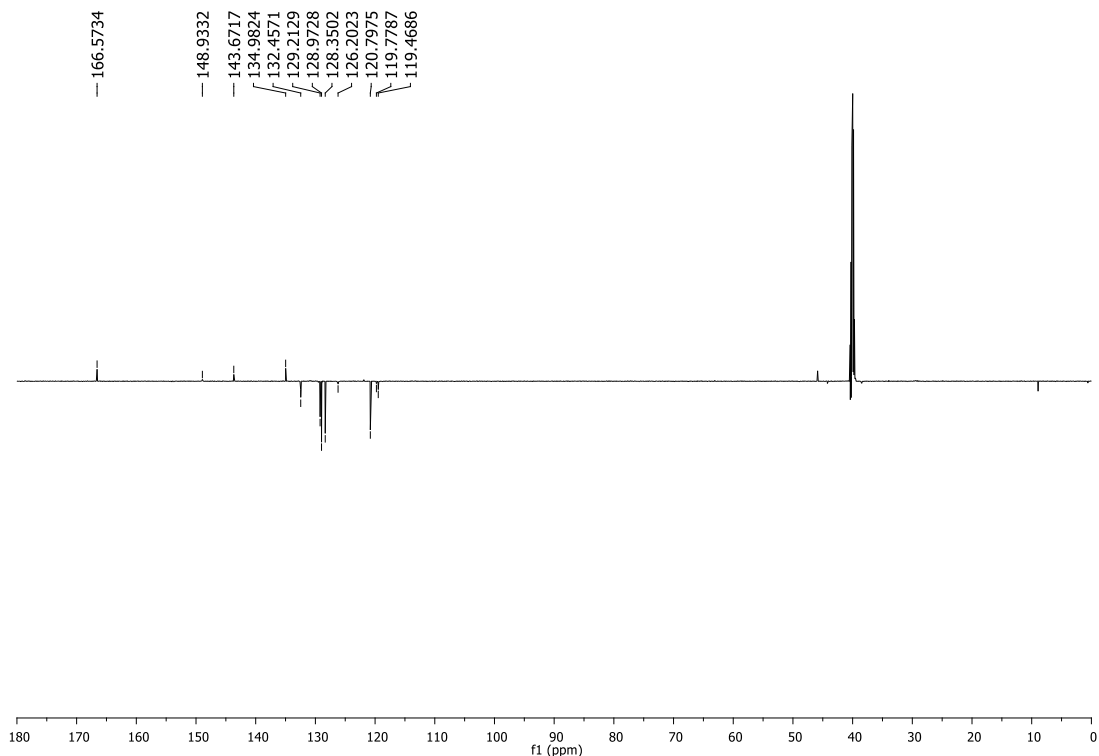


## Prilog 2.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)benzamida **6**

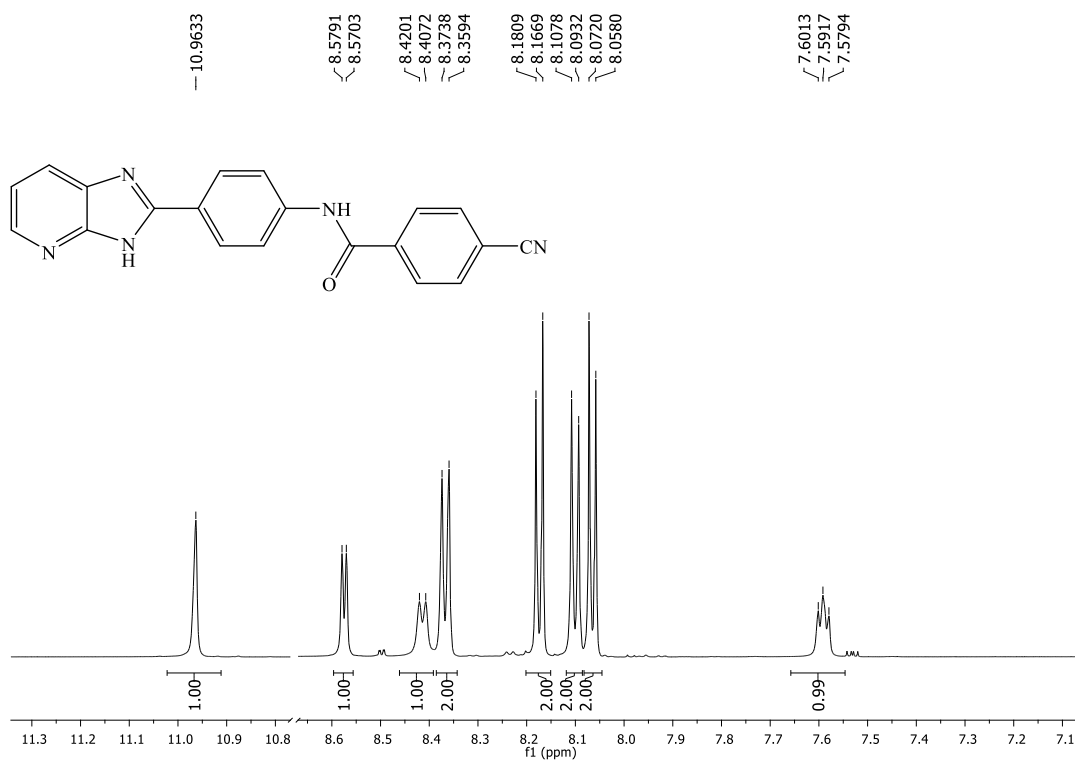


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)benzamida **6**

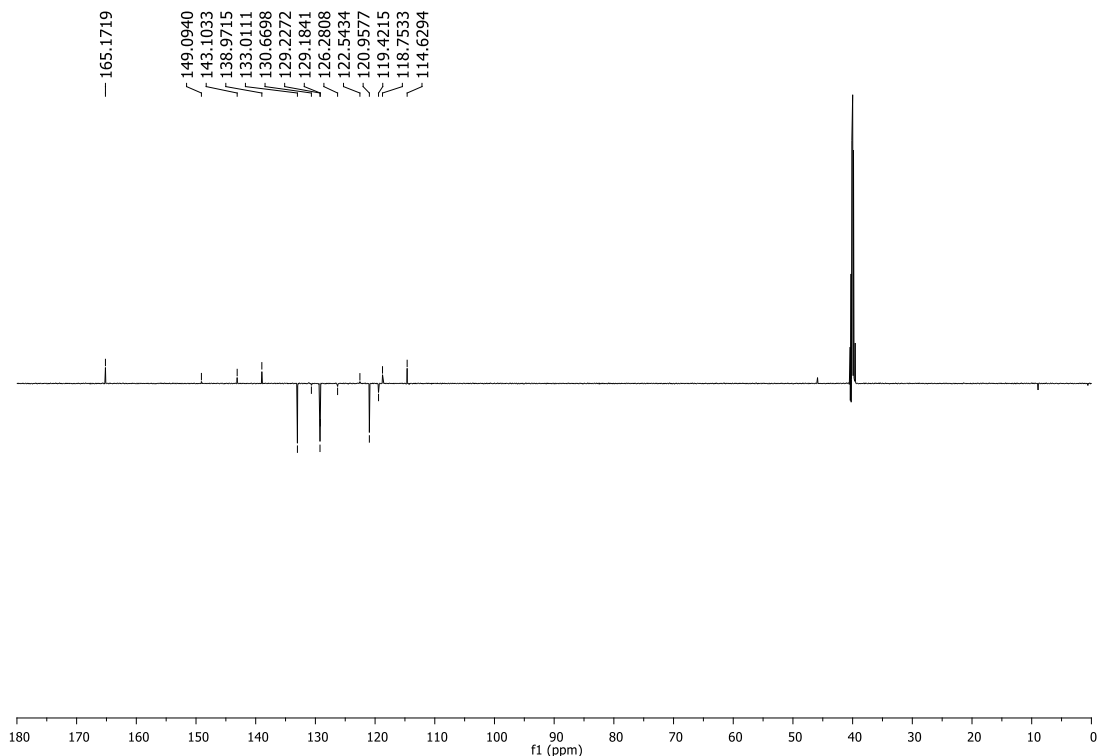


### Prilog 3.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-cijanobenzamida **7**

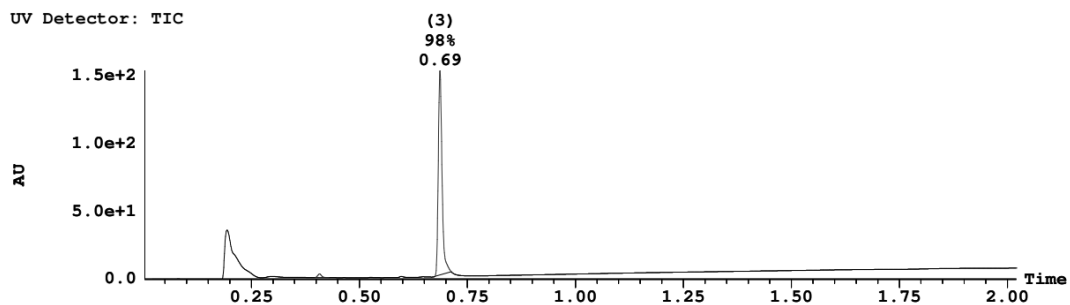


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-cijanobenzamida **7**



## Prilog 4.

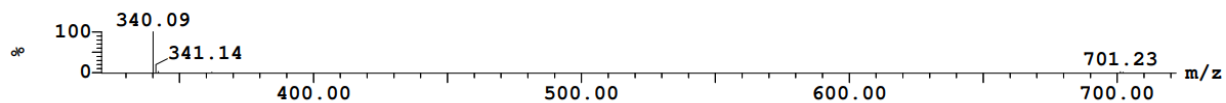
a) Maseni kromatogram *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-cijanobenzamida 7



b) Maseni spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-cijanobenzamida 7

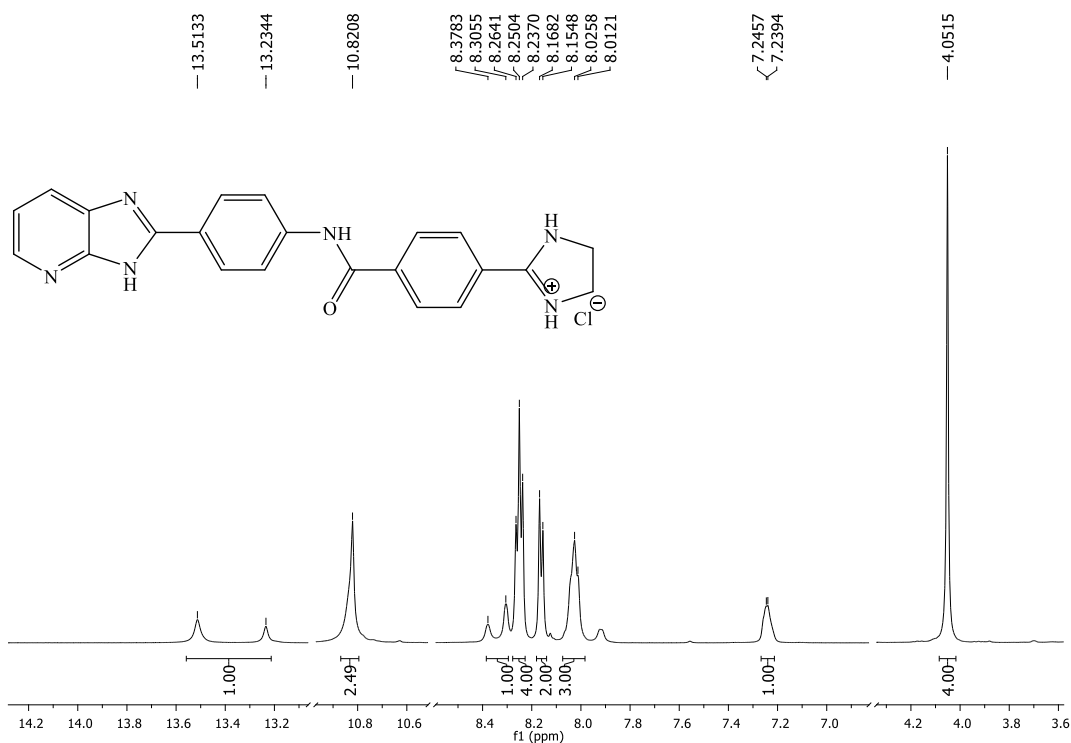
Peak ID	Compound	Time	Mass Found
3		0.69	

SAMPLE: 2:33 Combine (77:89-(59:64+102:107))

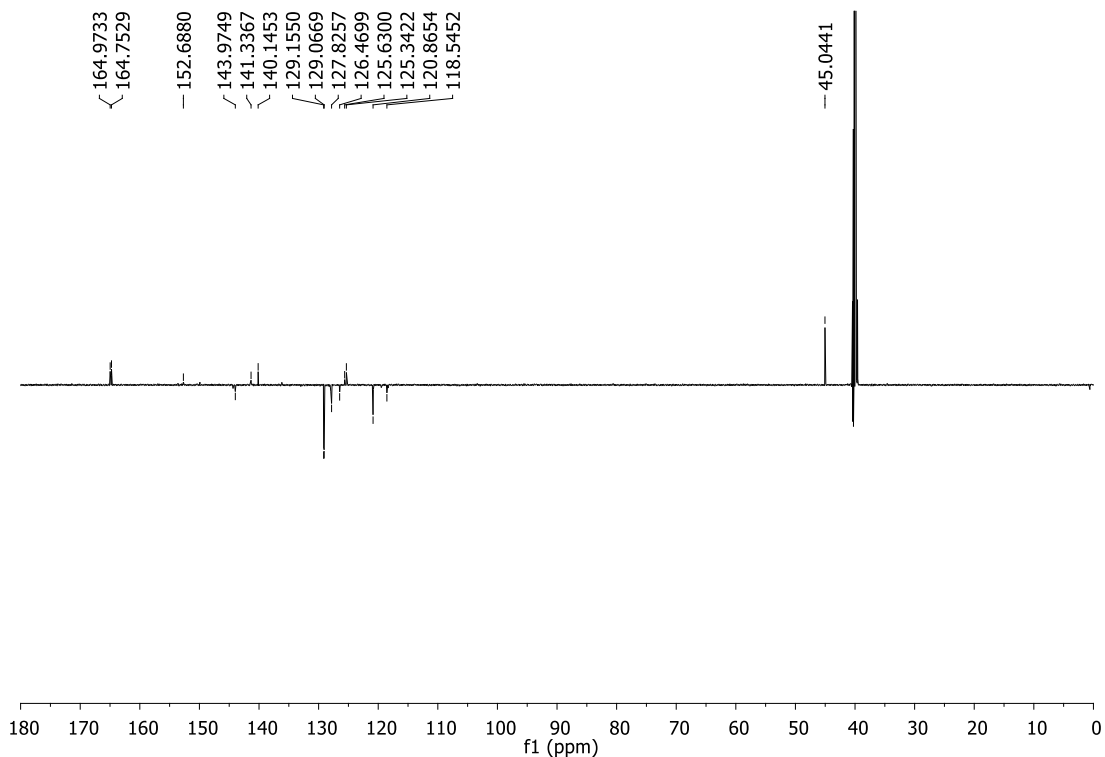


### Prilog 5.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)benzamid hidroklorida **8**

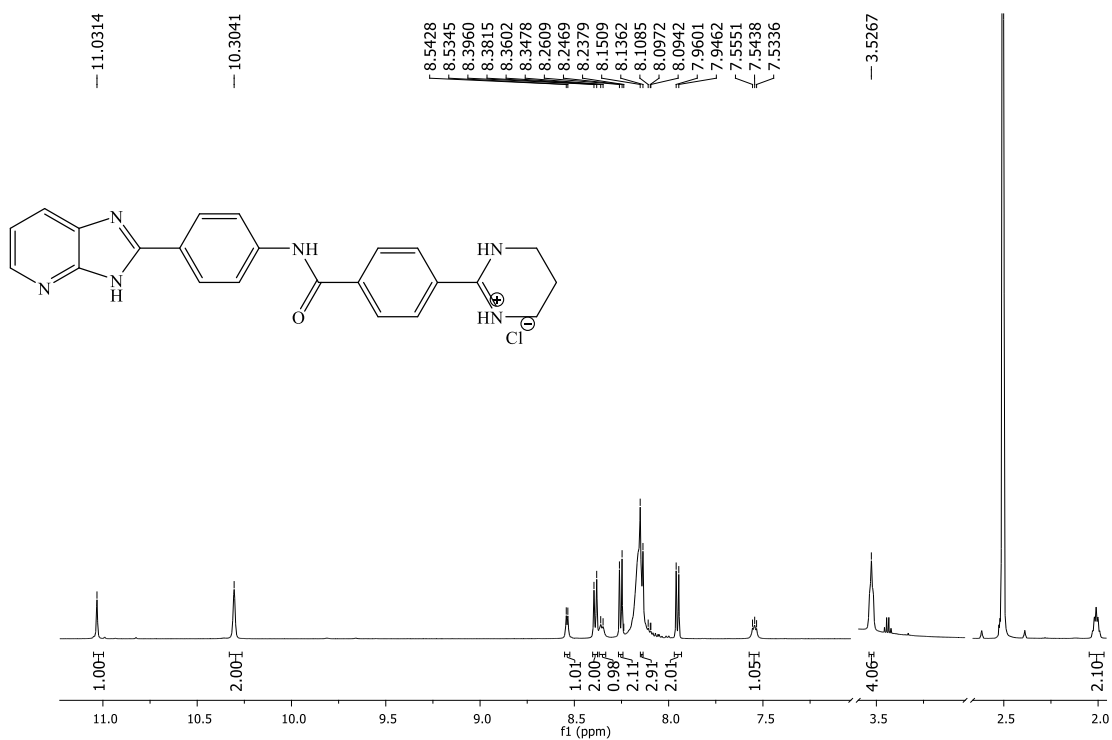


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)benzamid hidroklorida **8**

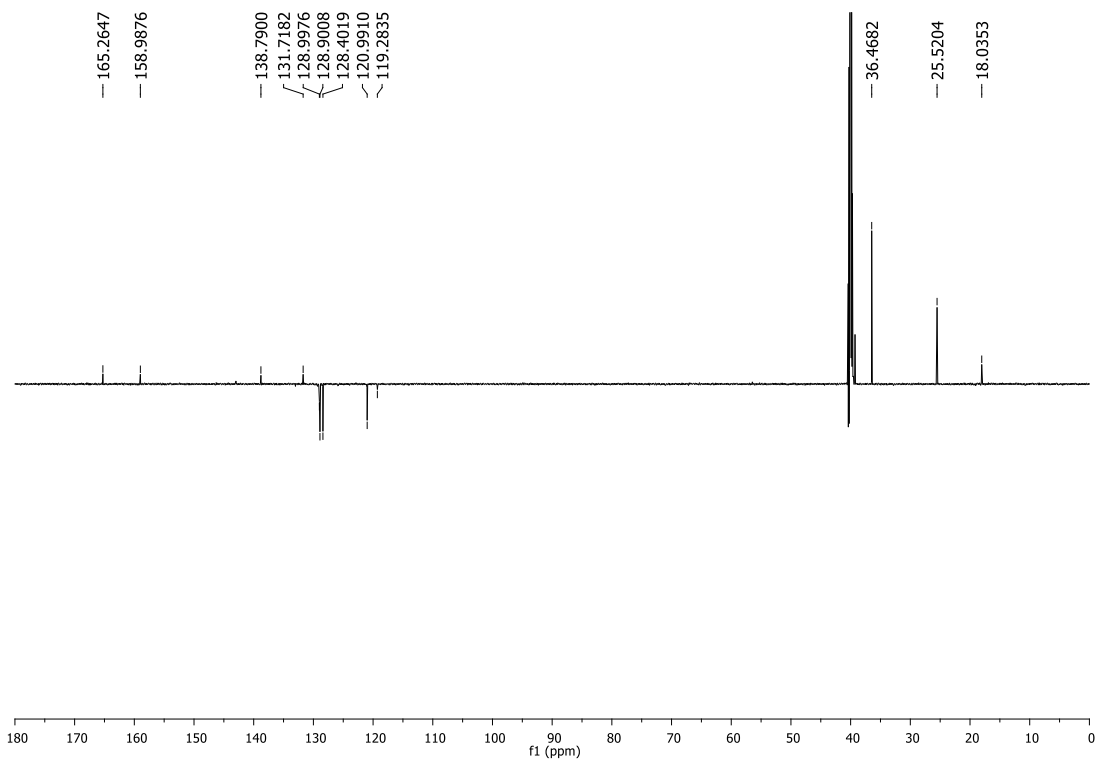


**Prilog 6.**

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)benzamid hidroklorida **9**

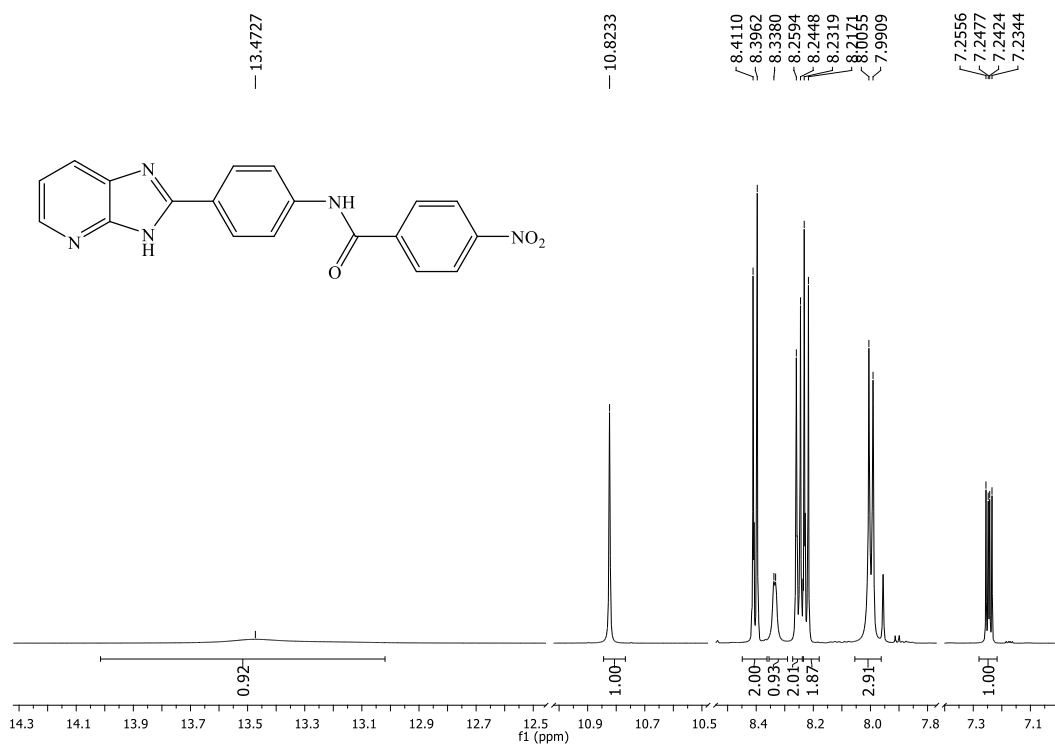


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)benzamid hidroklorida **9**

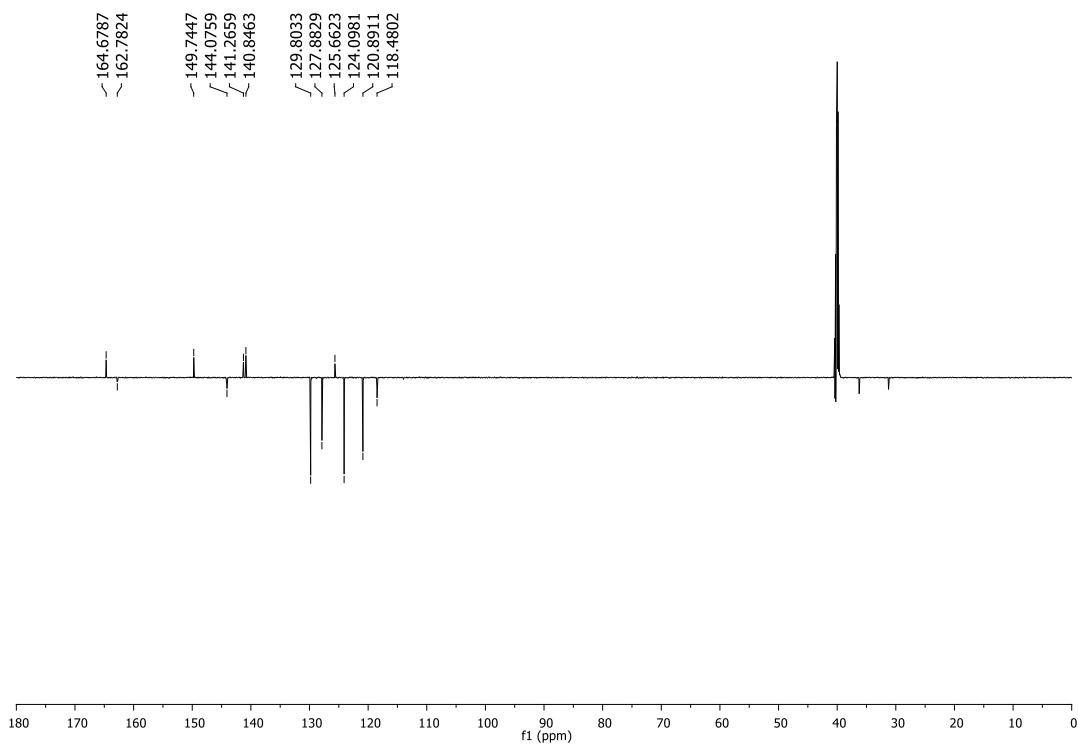


## Prilog 7.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-nitrobenzamida **11**



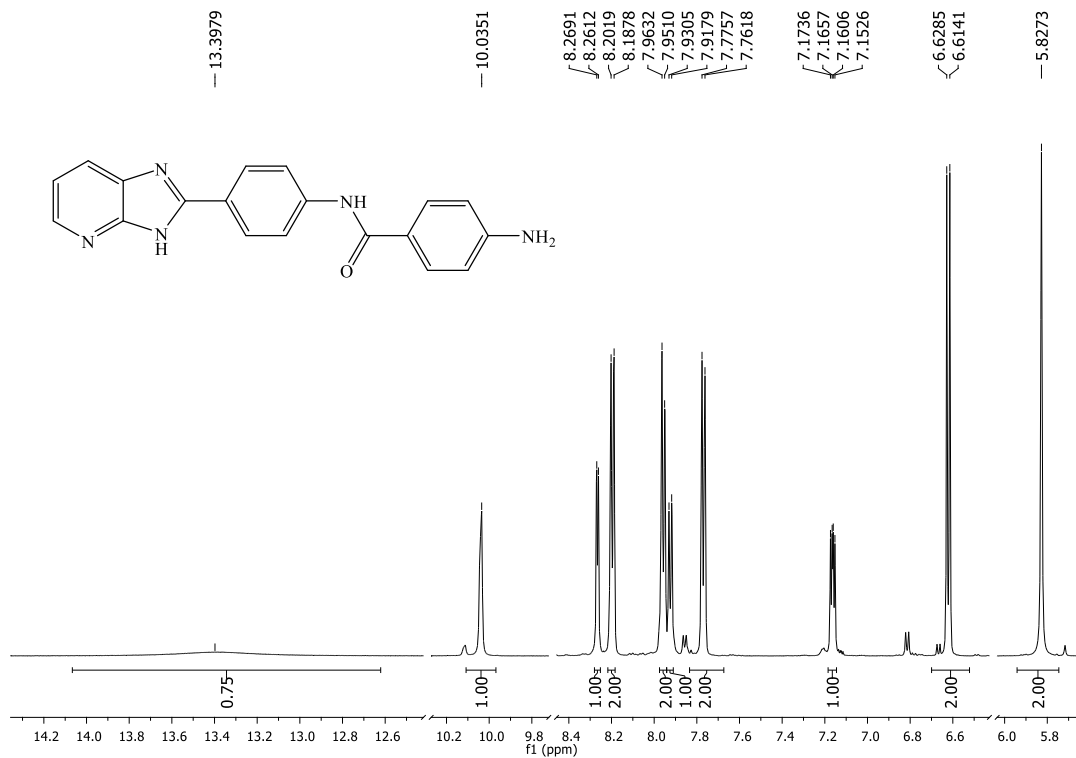
b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-nitrobenzamida **11**



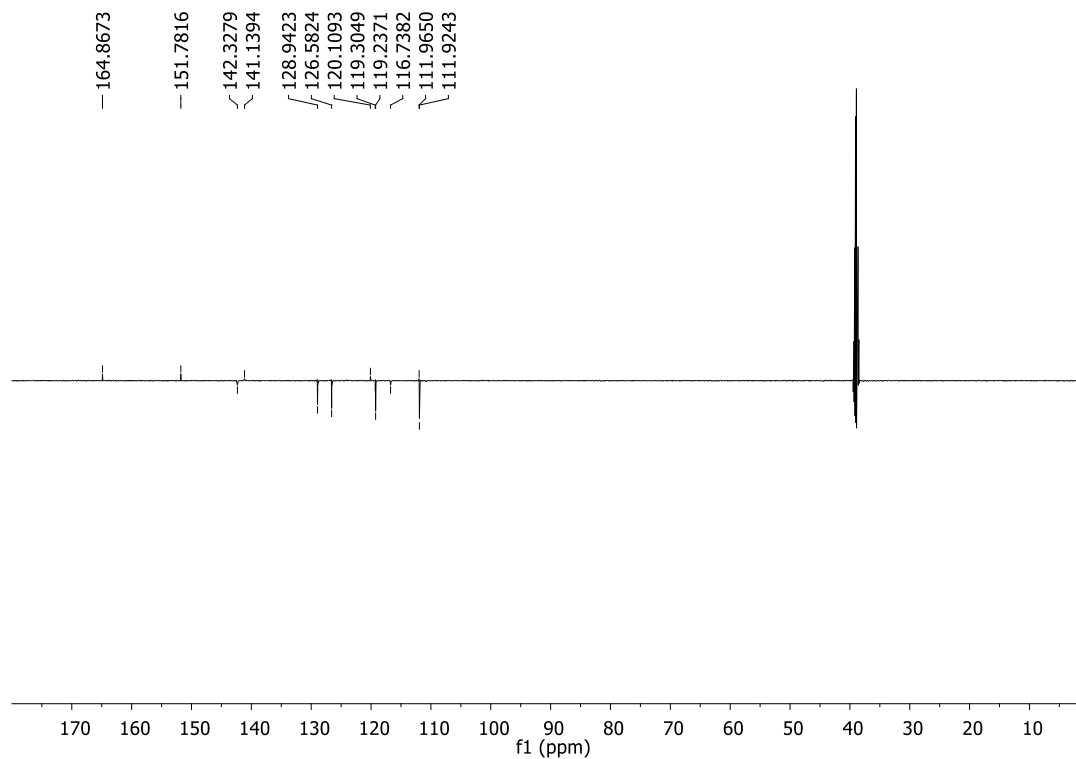


## Prilog 8.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamida **12**

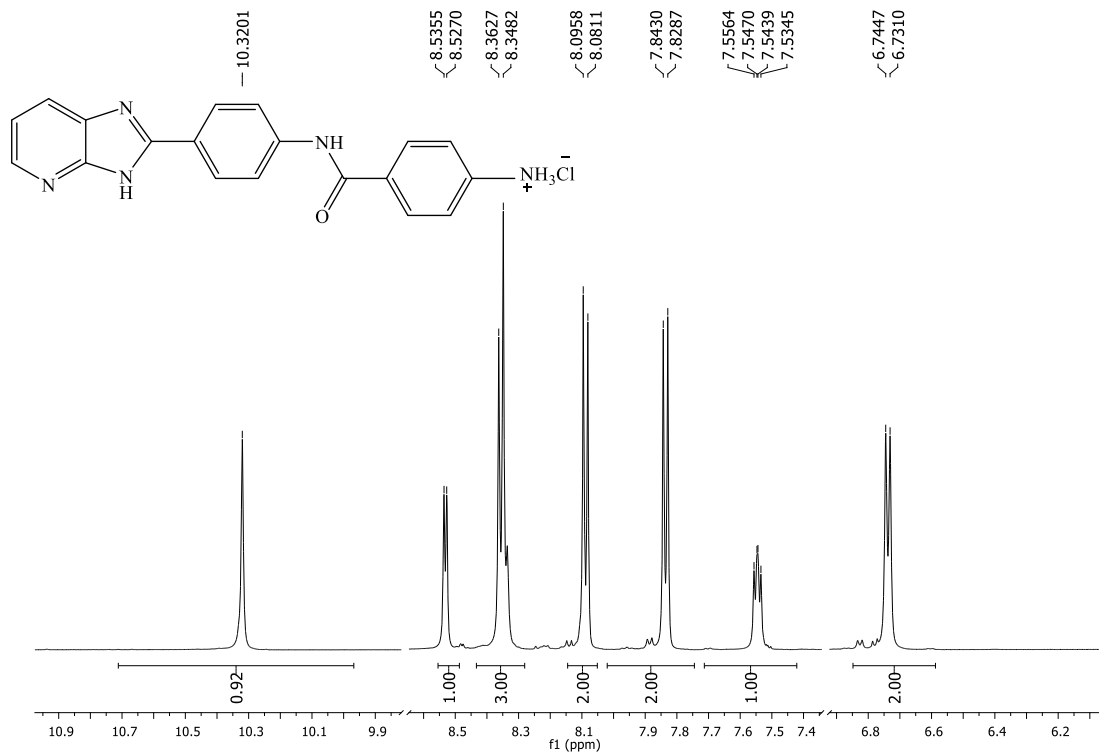


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamida **12**

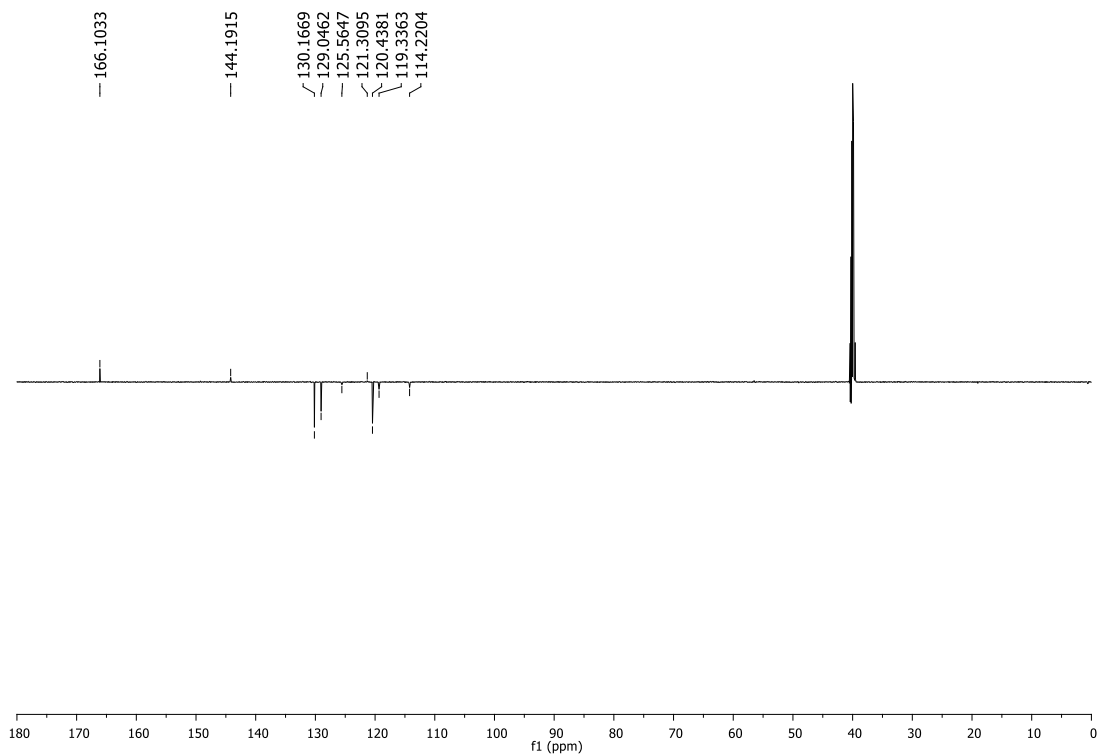


### Prilog 9.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamid hidroklorida **13**

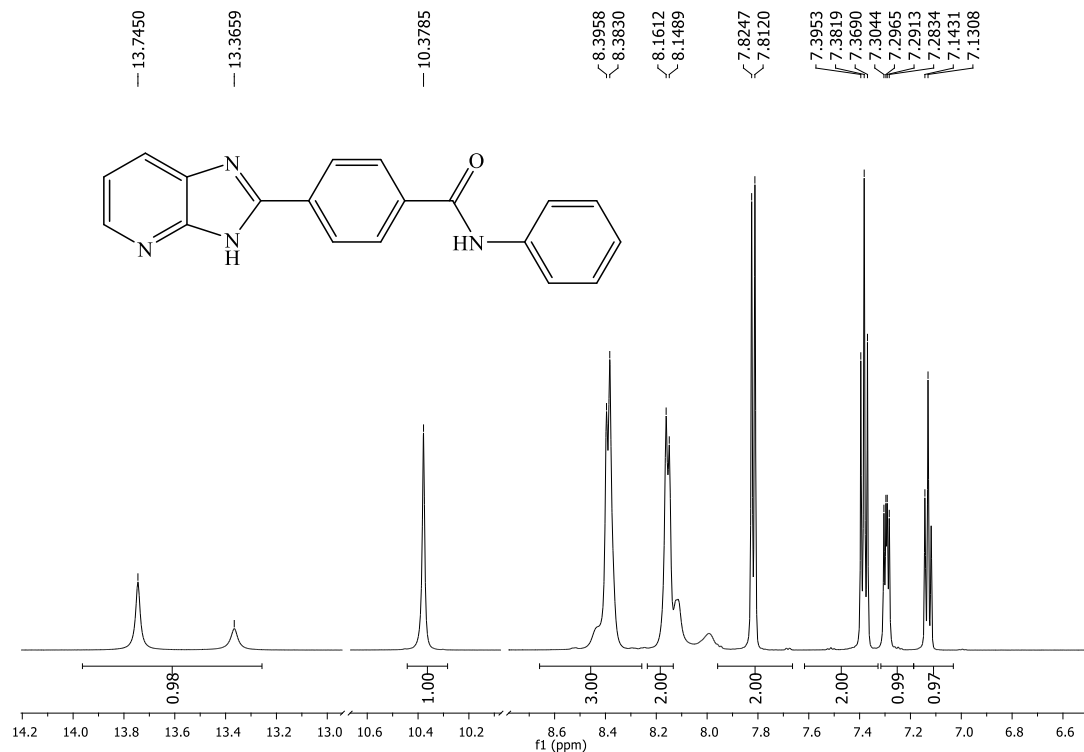


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)fenil)-4-aminobenzamid hidroklorida **13**

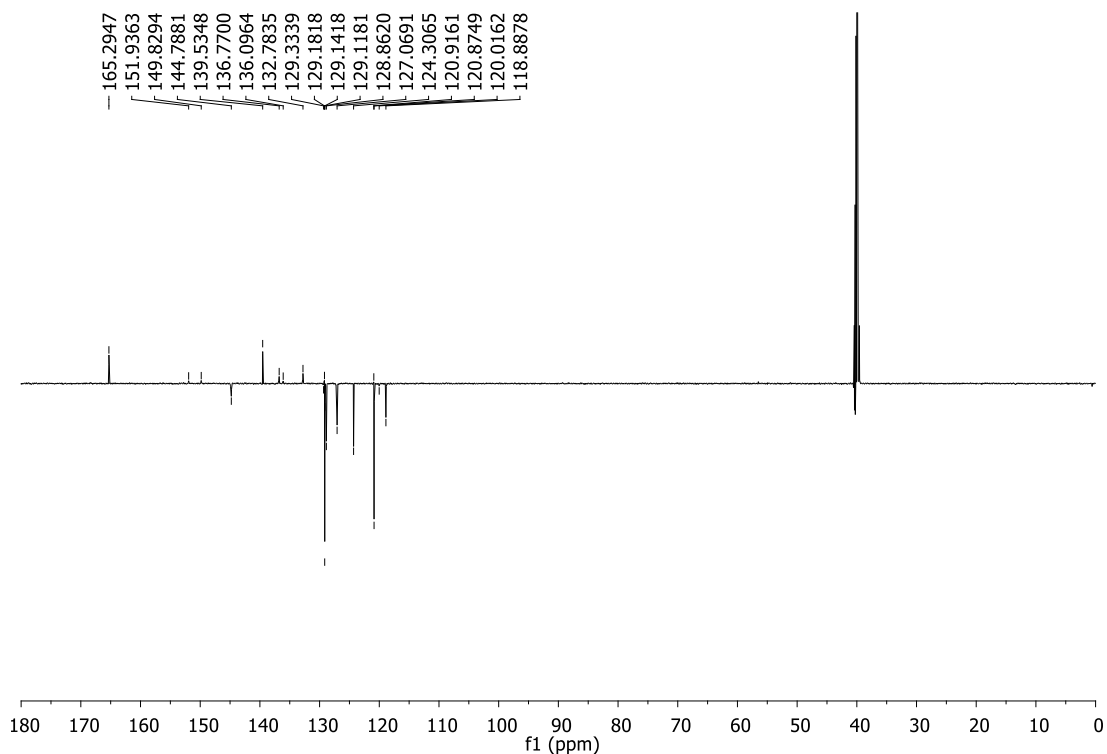


## Prilog 10.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-fenilbenzamida **20**

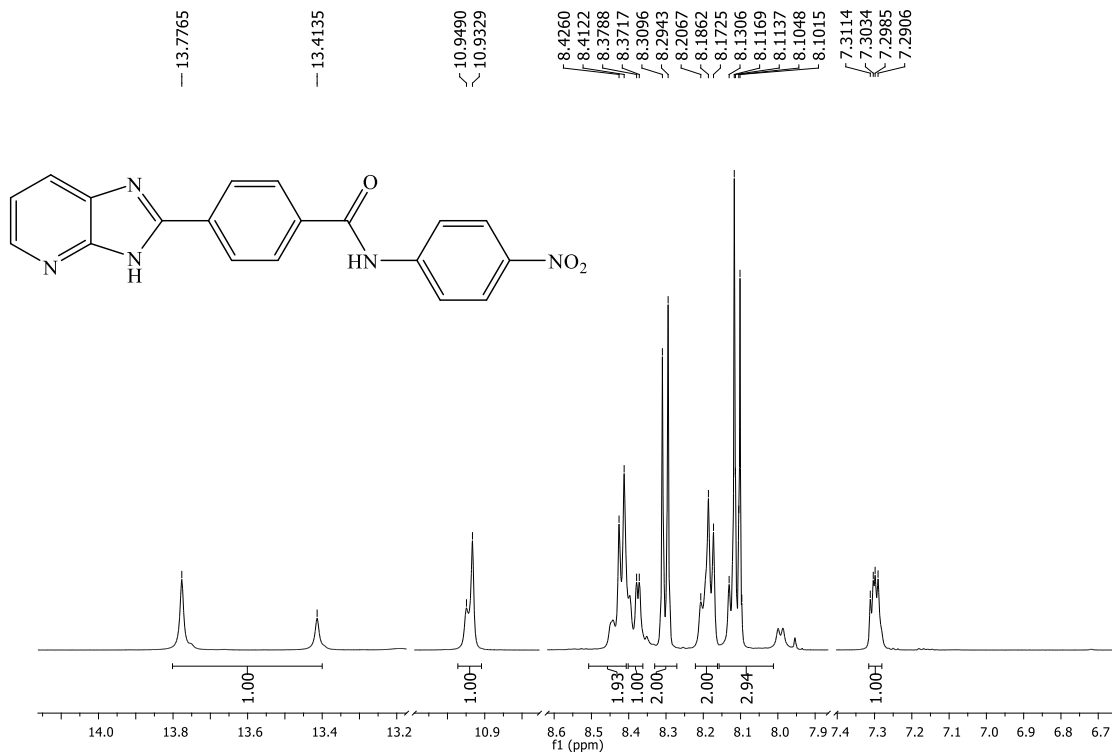


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-fenilbenzamida **20**

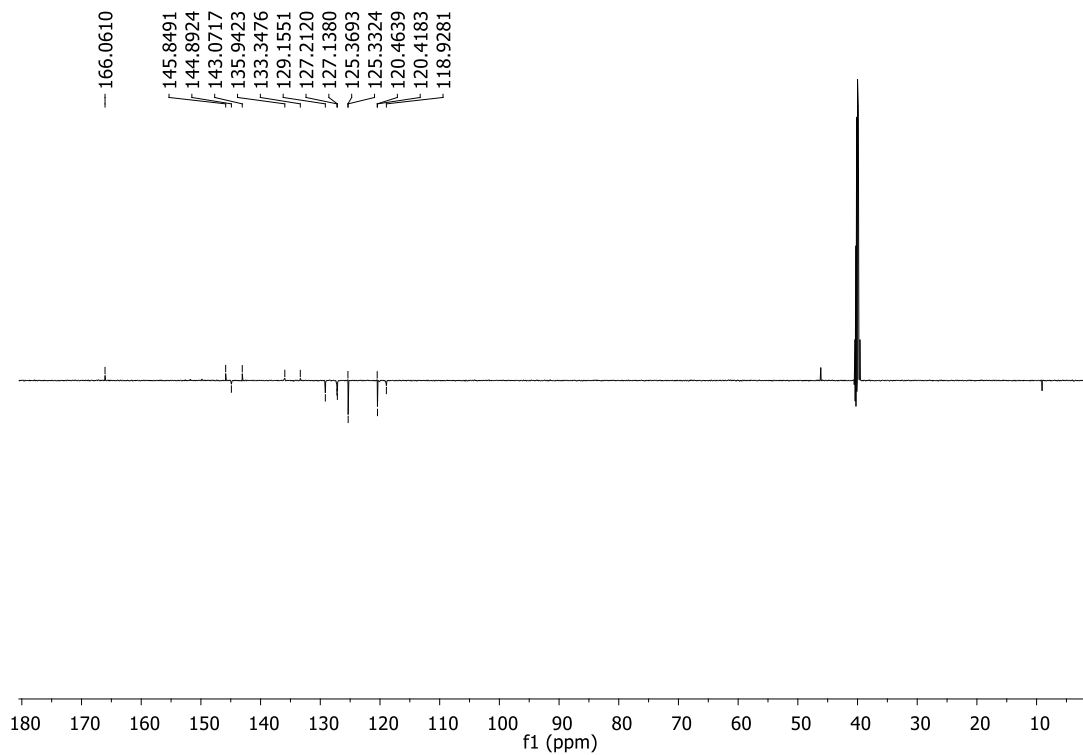


## Prilog 11.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **21**

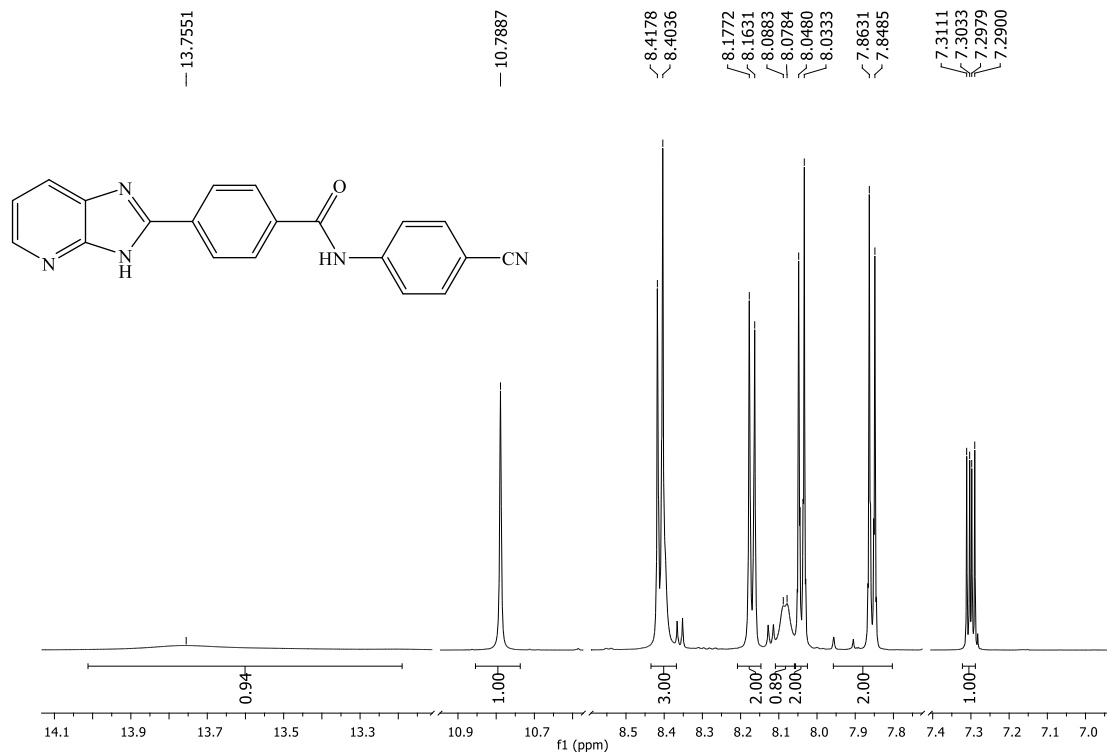


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **21**

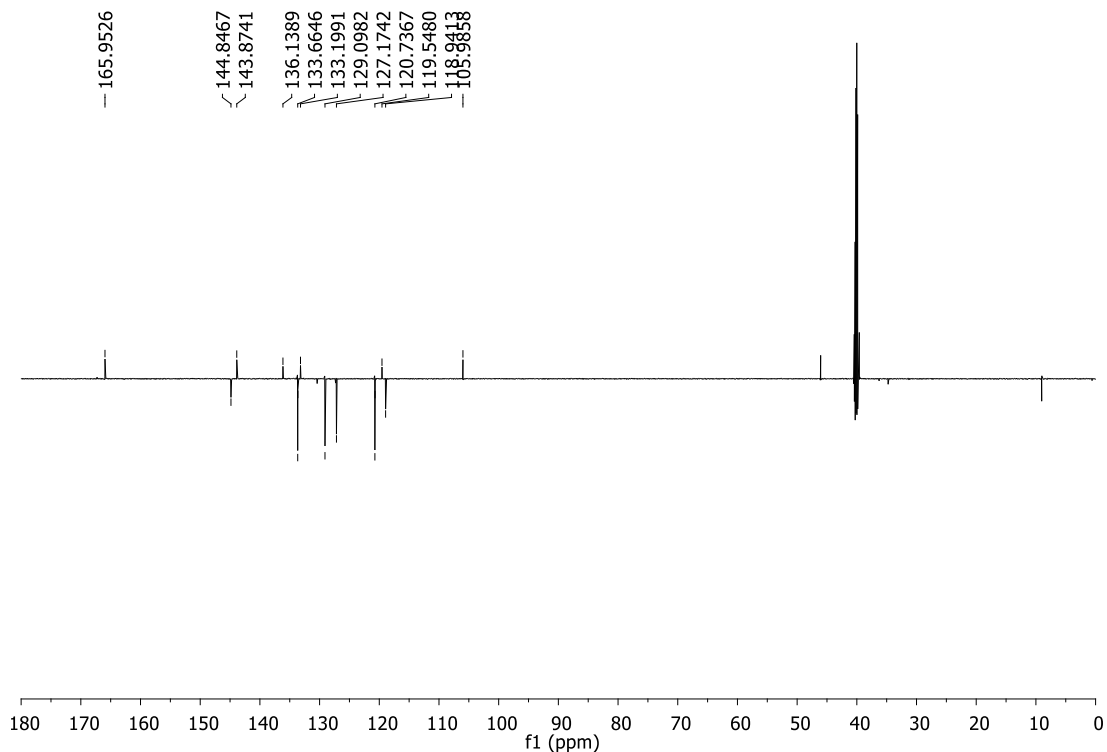


## Prilog 12.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamida **22**

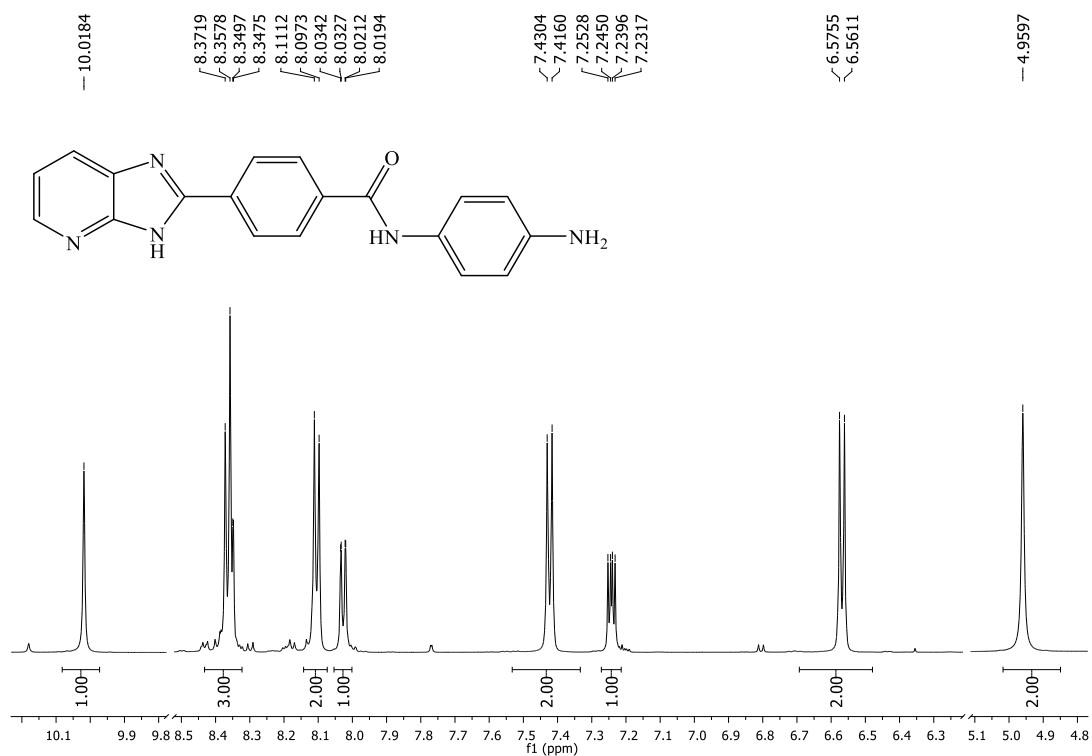


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamida **22**

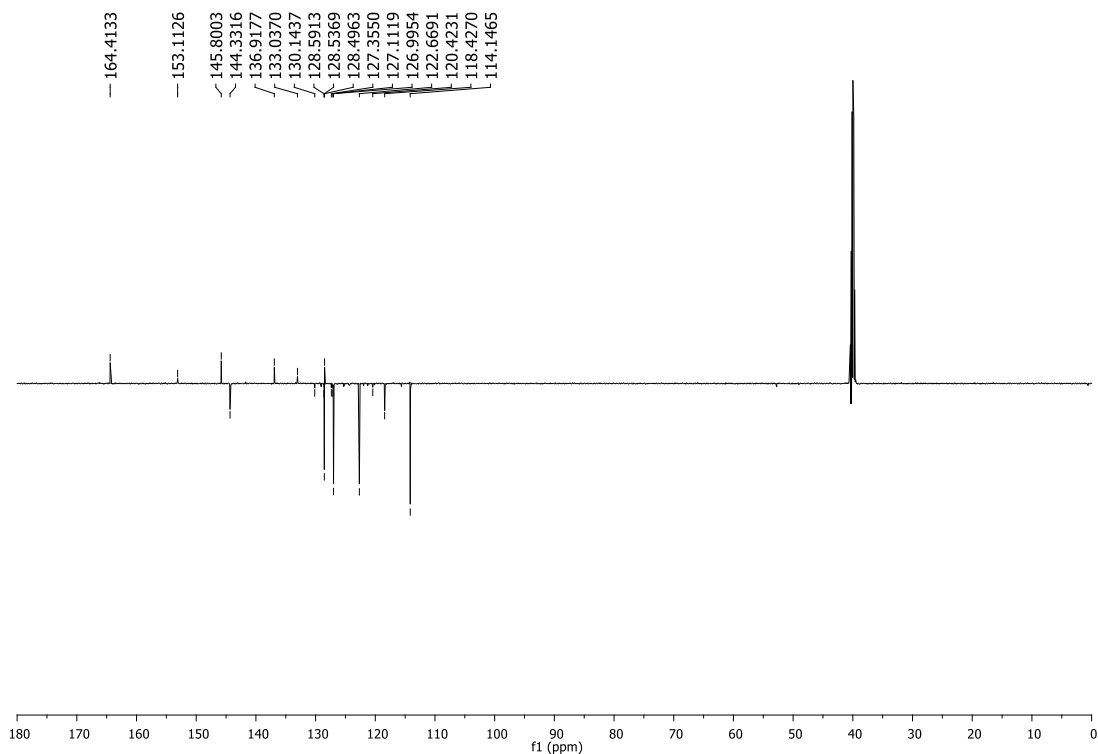


### Prilog 13.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-aminofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamida **23**

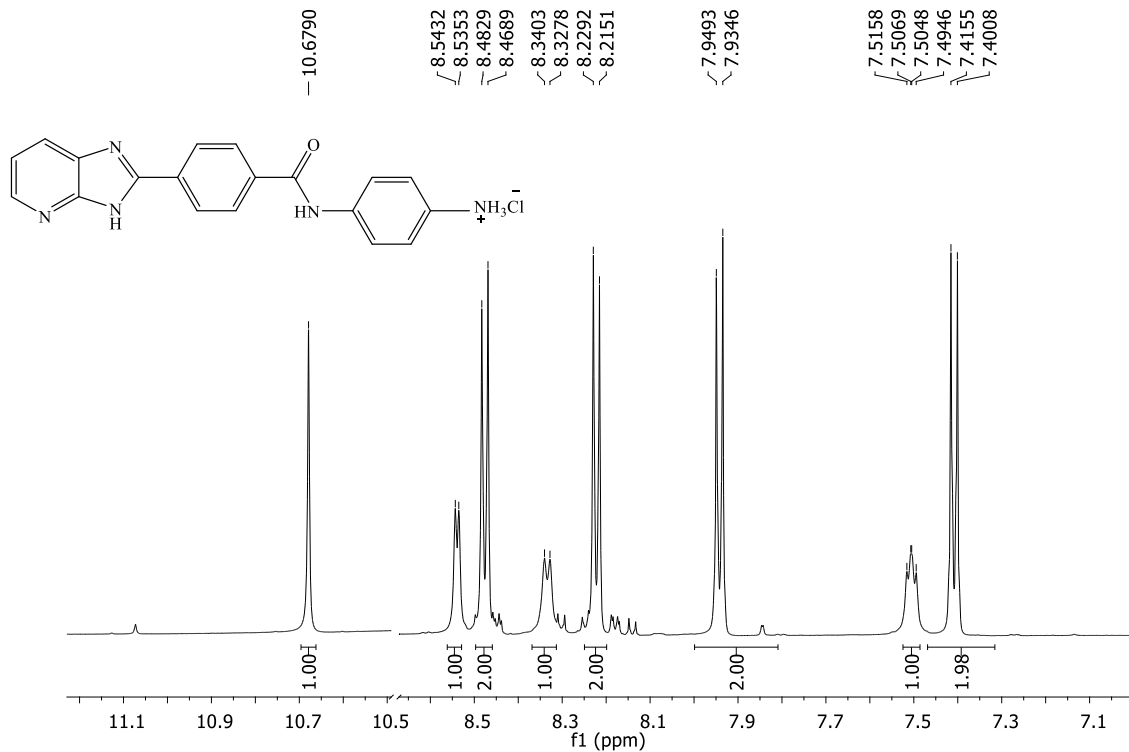


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-aminofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamida **23**

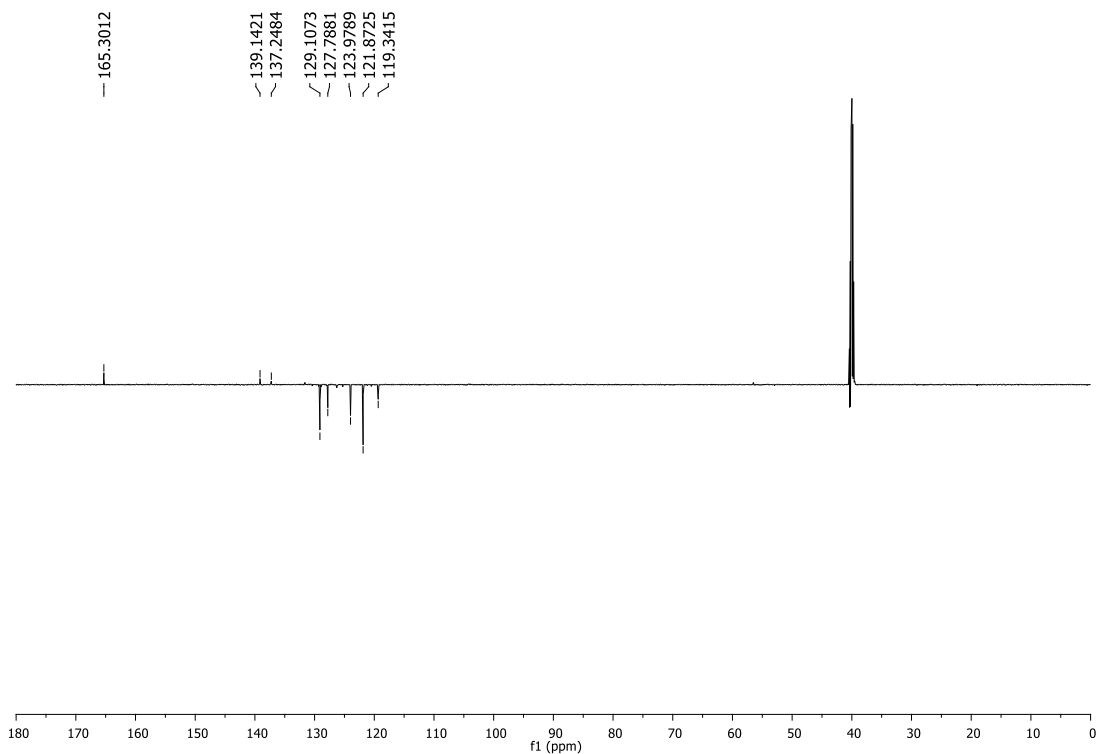


## Prilog 14.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-aminofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid hidroklorida **24**

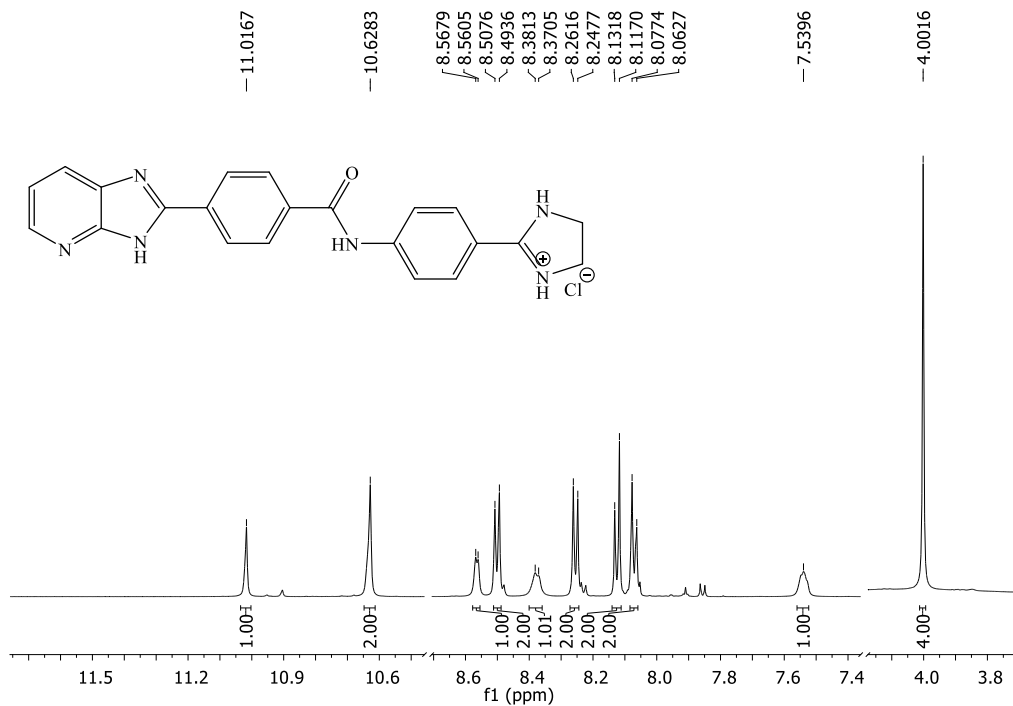


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-aminofenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid hidroklorida **24**

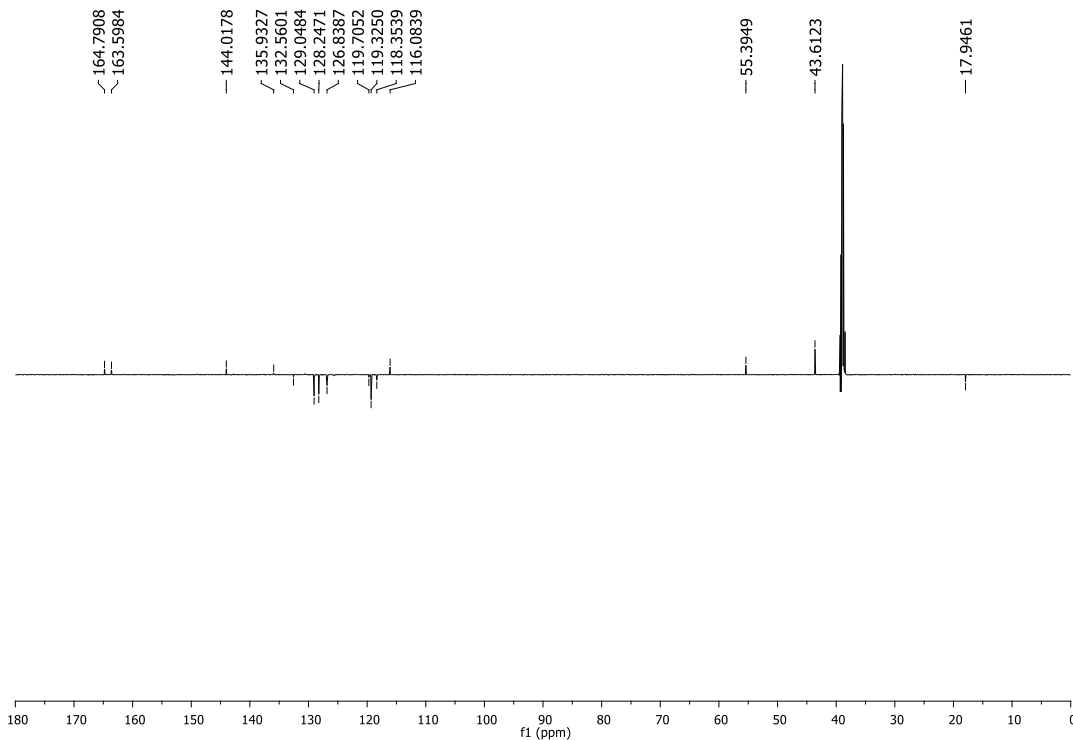


**Prilog 15.**

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid hidroklorida **25**



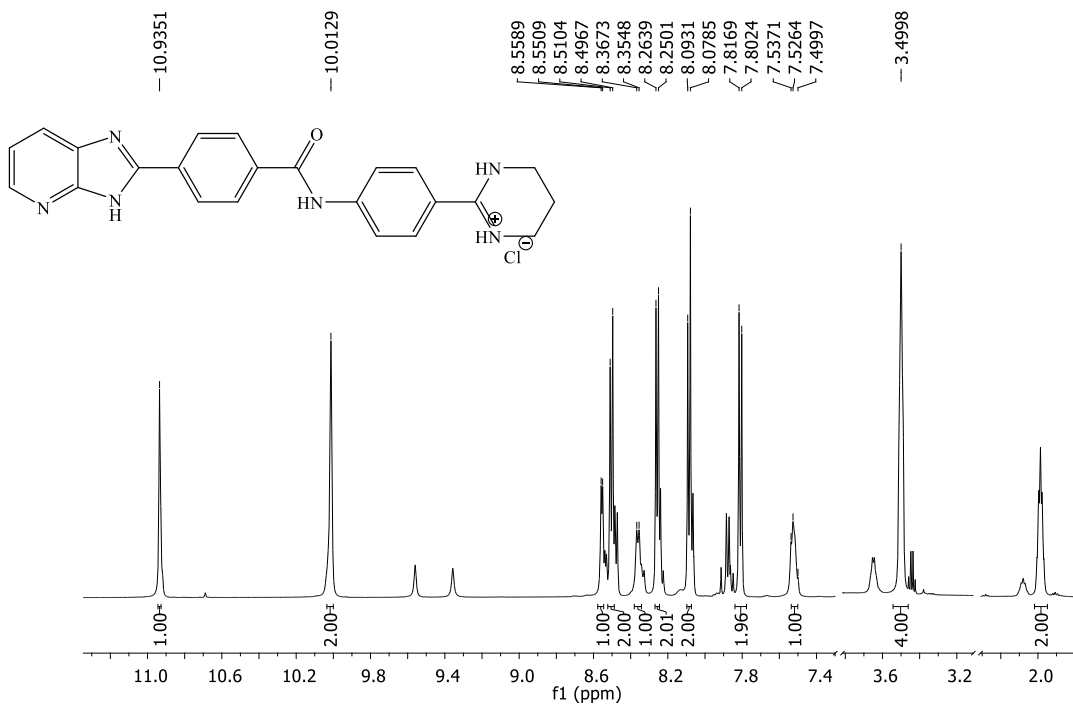
b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil)-4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)benzamid hidroklorida **25**



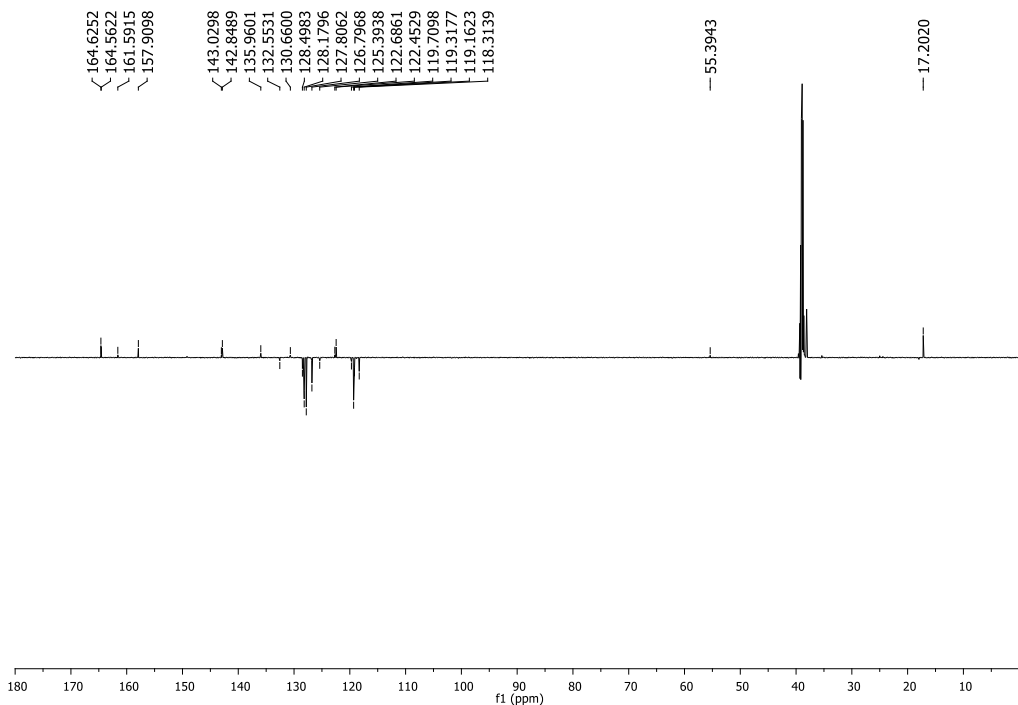


**Prilog 16.**

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)benzamid hidroklorida **26**



b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-*N*-(4-(1,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil)benzamid hidroklorida **26**



## **9. ŽIVOTOPIS**

**Corina Šljubura,** ██████████ Osnovnu školu Popovača pohađa u razdoblju od 2006.-2014. godine nakon čega upisuje Srednju školu Tina Ujevića Kutina, smjer Opća gimnazija. Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Primijenjena kemija upisuje 2018. godine. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za elektronsku spinsku spektroskopiju. Završni rad iz područja organske kemije „*Sinteza i strukturna karakterizacija novih N-supstituiranih derivata imidazo[4,5-b]piridina*“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Hranjec obranila je 2021. godine i postala sveučilišna prvostupnica primijenjene kemije. Iste godine upisuje diplomski studij, studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija. Sudjelovala je na XIV. susretu mladih kemijskih inženjera s posterskim priopćenjem pod nazivom „*Sinteza i antioksidativna aktivnost derivata benzimidazola i imidazo[4,5-b]piridina*“. Sudjelovala je na znanstveno-sportskom natjecanju „Tehnologijada“ s usmenim izlaganjem rada pod nazivom „*Sinteza, strukturna karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih konjugata kumarina i imidazo[4,5-b]piridina*“ te je osvojila 2. mjesto u kategoriji znanstvenih radova. Dobitnica je Rektorove nagrade za akademsku godinu 2022./2023. za rad pod naslovom „*Sinteza, biološka aktivnost i interakcija s ct-DNK novih amidino-supstituiranih derivata imidazo[4,5-b]piridina*“ izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Hranjec. Služi se engleskim jezikom u govoru i pismu, Microsoft office programskim paketom te poznaje osnove programa MatLab, Origin i CorelDRAW.