

# Sinteza, računalno modeliranje i fotokemija novih 1,3-tiazolo-tienostilbena

---

Đurčević, Ema

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:149:578746>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ema Đurčević**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, rujan 2023.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ema Đurčević

**SINTEZA, RAČUNALNO MODELIRANJE I FOTOKEMIJA  
NOVIH 1,3-TIAZOLO-TIENOSTILBENA**

DIPLOMSKI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Irena Škorić

Komentor rada: dr. sc. Danijela Barić, viša znanstvena suradnica, IRB

Neposredni voditelj rada: Milena Mlakić, mag. appl. chem

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Irena Škorić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

dr. sc. Danijela Barić, viša znanstvena suradnica, IRB

Zagreb, rujan 2023.

## SAŽETAK

Inhibitori enzima kolinesteraza prepoznaju se kao jedan od glavnih izbora za smanjenje simptoma *Alzheimerove* bolesti, četvrte bolesti po redu koja uzrokuje smrt u razvijenim zemljama, zbog toga što uzrokuje da se razina neurotransmitera acetilkolina u kolinergičnim sinapsama povećava. U svrhu pronalaska još učinkovitijih inhibitora kolinesteraza, sintetizirani su u ovom radu novi derivati 1,3-tiazolo-tienostilbena **1-9** i njihovi fotoproducti **10-16**. Spojevi **1-5**, **7** i **8** sintetizirani su Wittigovom reakcijom s tiofenskom fosfonijevom soli. Sinteza 1,3-tiazolo-tienostilbena **6** provela se amidacijom spoja **5** uz acetanhidrid, dok se spoj **9** sintetizirao Büchwald-Hartwigovim aminiranjem. Svi derivati **1-9** dobiveni su kao smjese *cis*- i *trans*-izomera. Na dobivenim spojevima **1-4** i **6-9** provedene su reakcije elektrociklizacije u fotokemijskom reaktoru *Rayonet* s 10 UV lampi na 300 nm, čime su se dobili novi derivati tienobenzo-tiazola **10-16**. Sintetizirani su i novi derivati tienobenzo-triazola **23-25** nizom od tri reakcije. Svi dobiveni spojevi pročišćeni su kolonskom kromatografijom na silika-gelu.

Čisti spojevi okarakterizirani su spektroskopskim metodama i poslani su na ispitivanje biološke aktivnosti. Koristile su se  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR tehnike, UV-Vis spektroskopija, masena spektrometrija i HRMS analiza. Provelo se i računalno istraživanje kojim su proučavane geometrije i elektronske strukture dobivenih tiazola, te molekulski *docking* kojim su se identificirale interakcije između enzima i potencijalnog inhibitora s ciljem predviđanja jačine inhibicije.

**Ključne riječi:** Alzheimerova bolest, elektrociklizacija, inhibicija kolinesteraze, molekulski docking, 1,3-tiazolo-tienostilbeni, Wittigova reakcija

## SUMMARY

### Synthesis, computational modeling and photochemistry of new 1,3-thiazolo-thienostilbenes

Inhibitors of enzymes cholinesterases are recognized as one of the main choices for reducing symptoms of *Alzheimer's* disease, the fourth leading cause of death in developed countries, because they cause an increase in the level of acetylcholine neurotransmitter in cholinergic synapses. In order to discover even more effective cholinesterase inhibitors, new derivatives of 1,3-thiazole-thienostilbenes **1-9** and their photoproducts **10-16** were synthesized in this study. Compounds **1-5**, **7**, and **8** were synthesized through the Wittig reaction with thiophene phosphonium salt. The synthesis of 1,3-thiazole-thienostilbene **6** was carried out by amidation of compound **5** with acetic anhydride, while compound **9** was synthesized by Büchwald-Hartwig amination. All derivatives **1-9** were gained as mixtures of *cis*- and *trans*-isomers. The obtained compounds **1-4** and **6-9** underwent electrocyclic reactions in a *Rayonet* photoreactor equipped with 10 UV lamps at 300 nm, resulting in new derivatives of thienobenzo-thiazoles **10-16**. New derivatives of thienobenzo-triazoles **23-25** were also synthesized, through a series of three reactions. All obtained compounds were purified using column chromatography on silica gel.

Pure compounds were characterized by spectroscopic methods and sent for biological activity testing.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR techniques, UV-Vis spectroscopy, mass spectrometry, and HRMS analyses were used. Computational research was also conducted to study the geometries and electronic structures of the obtained thiazoles, and molecular *docking* was performed to identify interactions between the enzyme and the potential inhibitor in order to predict the strength of the inhibition.

**Key words:** *Alzheimer's* disease, electrocyclization, inhibition of cholinesterases, molecular *docking*, 1,3-thiazolo-thienostilbenes, Wittig reaction

## ZAHVALA

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, akademske godine 2022./2023.*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na ukazanom povjerenju, susretljivosti, na stručnim savjetima i velikodušnoj pomoći prilikom izrade ovog Diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se komentorici dr. sc. Danijeli Barić s Instituta Ruđer Bošković na izdvojenom vremenu, pristupačnosti i prenesenom znanju iz područja računalne kemije.*

*Zahvaljujem se mag. appl. chem. Mileni Mlakić na neizmjerljivoj pomoći prilikom eksperimentalnog rada u laboratoriju, na strpljivosti, motivaciji i svom trudu u prenošenju znanja tijekom izrade ovog rada.*

*Naposlijetku, veliko hvala mojoj obitelji i Luki na razumijevanju, strpljenju, neprestanom ohrabrivanju, motivaciji i na bezuvjetnoj podršci koju su mi pružili tijekom cijelog mog školovanja.*

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 2. OPĆI DIO .....  | 2  |
| 2.1. TIAZOLI .....   | 2  |
| 2.1.1. Biološka aktivnost tiazola .....  | 3  |
| 2.2. TIAZOLI I INHIBITORI KOLINESTERAZA .....  | 5  |
| 2.2.1. Inhibicija enzima kolinesteraza .....   | 5  |
| 2.2.2. Alzheimerova bolest .....   | 8  |
| 2.2.3. Derivati tiazola kao antikolinesterazni agensi .....  | 10 |
| 2.3. STILBENI .....  | 12 |
| 2.3.1. Prirodni stilbeni .....   | 12 |
| 2.3.2. Tiazolni analozi stilbena .....   | 13 |
| 2.4. BENZOTIAZOL I NJEGOVI DERIVATI .....  | 14 |
| 2.4.1. Struktura i svojstva benzotiazola .....   | 14 |
| 2.4.2. Farmakološko djelovanje .....   | 15 |
| 2.4.3. Antikancerogeno djelovanje benzotiazola .....   | 15 |
| 2.4.4. Protuupalno djelovanje benzotiazola .....   | 16 |
| 2.4.5. Uloga benzotiazola u tretiranju Alzheimerove bolesti .....  | 17 |
| 2.5. RAČUNALNO MODELIRANJE .....   | 18 |
| 2.5.1. Teorija funkcionala (elektronske) gustoće .....   | 20 |
| 2.5.2. Geometrijska optimizacija molekula .....  | 21 |
| 2.5.3. Molekulski docking .....  | 22 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA .....  | 24 |
| 3.1. UVOD .....  | 24 |
| 3.2. SINTEZA NOVIH DERIVATA 1,3-TIAZOLO-TIENOSTILBENA 1-9 .....  | 25 |
| 3.3. SINTEZA ELEKTROCIKLIZACIJSKIH PRODUKATA TIAZOLNIH DERIVATA 10-16 .....                                  | 26 |
| 3.4. SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA NOVIH 1,3-TIAZOLO-TIENOSTILBENA 1-9 I NJIHOVIH FOTOPRODUKATA 10-16 ..... | 29 |
| 3.4.1. Identifikacija 1,3-tiazolo-tienostilbena spektroskopskim metodama .....                               | 29 |
| 3.4.2. Potvrda struktura elektrociklizacijskih fotoprodukata 1,3-tiazolo-tienostilbena .....                 | 32 |
| 3.5. RAČUNALNO ISTRAŽIVANJE ELEKTRONSKIH STRUKTURA NOVIH TIAZOLO-TIENOSTILBENA I TIENOBENZO-TIAZOLA .....    | 35 |
| 3.6. INHIBICIJSKA AKTIVNOST 1,3-TIAZOLO-TIENOSTILBENA I TIENOBENZO-TIAZOLA PREMA KOLINESTERAZAMA .....       | 40 |
| 3.7. MOLEKULSKI DOCKING .....  | 44 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.8. SINTEZA I KARAKTERIZACIJA NOVIH DERIVATA 1,2,3-TRIAZOLO-TIENOSTILBENA I NJIHOVIH FOTOPRODUKATA .....</b> | <b>46</b> |
| 3.8.1. Sinteza i fotokemija novih derivata 1,2,3-triazolo-tienostilbena .....                                    | 46        |
| 3.8.2. Identifikacija novih fotoprodukata 1,2,3-triazolo-tienostilbena .....                                     | 48        |
| 3.8.3. Ispitivanje aktivnosti novih derivata tienobenzotriazola 23-25 kao inhibitora kolinesteraza .....         | 49        |
| 3.8.4. Računalno istraživanje struktura novih derivata tienobenzotriazola 23-25.....                             | 51        |
| <b>4. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>  | <b>53</b> |
| 4.1. Sinteza tiofenske fosfonijeve soli .....  | 53        |
| 4.2. Organska sinteza 1,3-tiazolo-tienostilbena.....   | 54        |
| 4.2.1. Sinteza tienostilbena Wittigovom reakcijom .....  | 54        |
| 4.2.2. Prevođenje amina u amid .....   | 59        |
| 4.2.3. Büchwald – Hartwigova aminacija .....   | 60        |
| 4.3. Sinteza elektrociklizacijskih produkata 1,3-tiazolo-tienostilbena.....                                      | 61        |
| 4.5. Organska sinteza 1,2,3-triazolo-tienostilbena .....   | 64        |
| 4.5.1. Sinteza 1,2,3-triazol-4-karbaldehida.....   | 65        |
| 4.6. Organska sinteza triazolo-tienostilbena Wittigovom reakcijom.....   | 66        |
| 4.7. Sinteza tienobenzotriazola elektrociklizacijom .....  | 68        |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>  | <b>70</b> |
| <b>LITERATURA .....</b>  | <b>72</b> |
| <b>ŽIVOTOPIS.....</b>  | <b>80</b> |
| <b>PRILOZI.....</b>  | <b>81</b> |



# 1. UVOD

*Alzheimerova* bolest je progresivna nepovratna neurodegenerativna bolest mozga pri kojoj je kolinergički sustav mozga stalno u neravnoteži, a pri čemu se javljaju posljedice kao što su dezorijentiranost, poteškoće u razmišljanju i rješavanju problema, gubitak pamćenja, anksioznost i depresija. Kod pojave bolesti, između ostalog, dolazi do gubitka kolinergičnih neurona u mozgu i do smanjivanja aktivnosti kolin-acetil-transferaze, koja je odgovorna za stvaranje neurotransmitera acetilkolina. Enzimi kolinesteraze hidroliziraju acetilkolin čime također dolazi do smanjenja razine acetilkolina. Zbog učinka hidrolize, dolazi do nedostatka acetilkolina u hipokampusu i korteksu mozga što je povezano s različitim psihološkim funkcijama.

S obzirom na to da je *Alzheimerova* bolest četvrta glavna bolest koja uzrokuje smrt u razvijenim zemljama, veliki su naponi uloženi u potragu za učinkovitim lijekovima koji bi se mogli primjenjivati u borbi protiv ove bolesti. Danas je u medicinskoj primjeni samo nekoliko lijekova koji mogu ublažiti simptome bolesti, ali ne i u potpunosti zaustaviti njezino napredovanje. Lijekovi koji se koriste djeluju kao inhibitori enzima kolinesteraza, pri čemu se sprječava hidroliza acetilkolina i povećava njegova razina u kolinergičnim sinapsama. Veliki potencijal u inhibiciji kolinesteraza imaju biološki aktivni spojevi koji posjeduju tiazolnu jezgru.

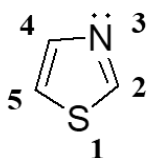
U ovom radu opisani su simptomi i neurološke posljedice pojave *Alzheimerove* bolesti, strategije prilikom liječenja simptoma bolesti i mehanizam inhibicije enzima kolinesteraza, acetil- i butirilkolinesteraze. Nadalje, opisani su heterociklički spojevi 1,3-tiazoli, njihova biološka aktivnost i uloga u tretiranju *Alzheimerove* bolesti. Pojašnjeno je farmakološko i biološko djelovanje do sada poznatih prirodnih stilbena, sintetskih tiazolnih analoga stilbena te benzotiazola i njihovih derivata. Kako bi se otkrili novi učinkovitiji inhibitori kolinesteraza, sintetizirani su derivati 1,3-tiazolo-tienostilbena i njihovi fotoproducti tienobenzotiazoli. Pripremljeni su i neki novi derivati tienobenzotiazola. Svi produkti koji su dobiveni čisti i u dovoljnim količinama okarakterizirani su spektroskopskim metodama i ispitivani su u svrhu njihove aktivnosti kao antikolinesterazni agensi. Na dobivenim spojevima provelo se i računalno ispitivanje kako bi se karakterizirala njihova geometrija, elektronska struktura i termodinamička stabilnost te je napravljen studij molekuskog dockinga, tj. smještanja potencijalnih inhibitora u aktivno mjesto enzima. Na taj način identificirane su stabilizirajuće interakcije između liganda i enzima koje, blokiranjem aktivnog mjesta, omogućavaju inhibitorno djelovanje ispitivanih molekula na kolinesteraze.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. TIAZOLI

Heterociklički spojevi su organske molekule koje se pojavljuju u gotovo svim prirodnim i sintetičkim spojevima, a karakterizira ih peteročlana ili šesteročlana prstenasta struktura, sastavljena od atoma ugljika i vodika te heteroatoma kao što su dušik, kisik i sumpor. Heterociklički spojevi su sve češći predmet istraživanja znanstvenika jer ih se obično povezuje uz njihov širok spektar bioloških aktivnosti. U skupini heterocikličkih spojeva značajno mjesto zauzimaju tiazoli,<sup>1</sup> a smatraju se i najvažnijim heterociklima upravo zbog njihove uloge u dizajnu bioloških molekula, sintetske raznolikosti i terapijskog značaja. Tiazolna jezgra uvelike je proučavana u području organske i medicinske kemije.<sup>2</sup>

Struktura tiazola sastavljena je od peteročlanog prstena koji sadrži atom sumpora u položaju 1 i dušikov atom, donor elektronskog para, u položaju 3 (slika 1). Numeriranje tiazolnog prstena započinje od atoma sumpora. Tiazolni prsten prvi put su spomenuli, opisali i sintetizirali njemački kemičari *Hantzsch* i *Waber* 1887. godine, a strukturu tiazola potvrdio je također njemački znanstvenik *Popp* 1889. godine.<sup>3</sup>



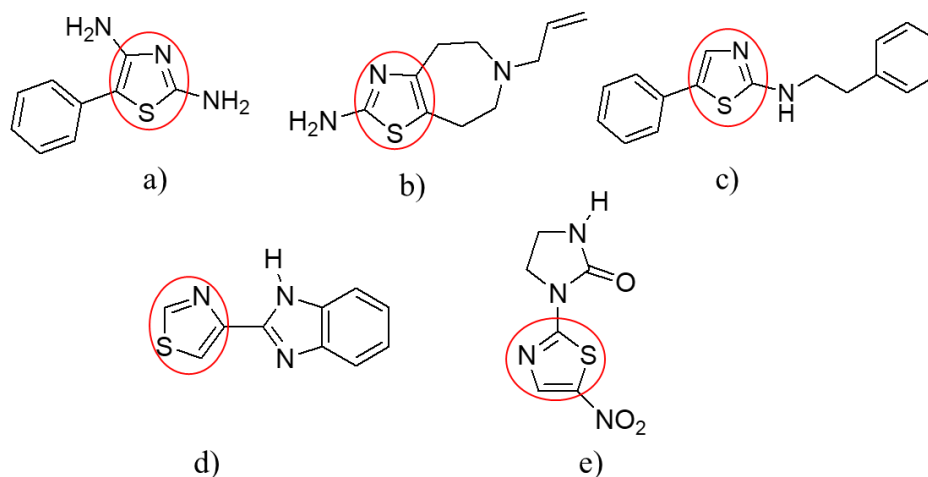
*Slika 1: Struktura molekule tiazola.*

*Hantzsch* je sintetizirao jednostavnu jezgru tiazola, a put sinteze uključivao je ciklizaciju i kondenzaciju haloketona s tioamidom. U to vrijeme, takva sinteza bila je najpopularniji način pripreme tiazola.<sup>4</sup> Godine 1910. znanstvenik *Gabriel* predlaže novi sintetski put za pripremu tiazola, gdje se tiazolni prsten dobiva ciklizacijom acilaminoacetona pomoću difosfornog pentasulfida na povišenim temperaturama. Navedenom metodom mogu se dobiti i supstituirani tiazoli u položaju C2 ili C5.<sup>5,6</sup> Danas, derivati tiazola sintetiziraju se u prisustvu različitih katalizatora i uz korištenje tehnike mikrovalnog zračenja.<sup>4</sup>

Tiazolni prsten je aromatičan, na temelju delokalizacije slobodnog elektronskog para iz atoma sumpora koji nadopunjuje željenih  $6\pi$  elektrona, čime je ispunjeno Hückelovo pravilo.<sup>7</sup> Također, tiazolni prsten je planaran i kemijski vrlo sličan peteročlanim ili šesteročlanim aromatskim sustavima, posebice piridinu i tiofenu. Reaktivnost tiazola povezana je s donorskim i akceptorskim mjestima na prstenastoj strukturi. S obzirom na to, reakcije elektrofilne supstitucije odvijaju se na atomima koji otpuštaju elektrone (položaj C4 i C5 na slici 1). Nukleofilni napad je pak favoriziran na ugljikovom atomu u položaju 2, jer je vodikov atom u tom položaju vrlo reaktivan i lako se izmjenjuje s drugim skupinama.<sup>8</sup> Tiazol se smatra visoko reaktivnom molekulom zbog kiselosti protona u položaju C2 i stoga je postao važna komponenta prilikom stvaranja novih kemijskih entiteta.<sup>5</sup>

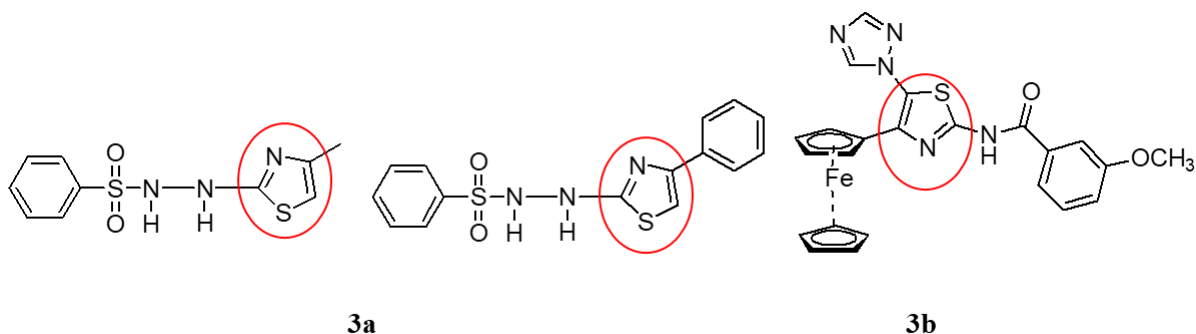
### **2.1.1. Biološka aktivnost tiazola**

Tiazolni prsten i njegovi derivati jedni su od najistaknutijih spojeva u literaturi zbog svojeg širokog spektra biološkog djelovanja, uključujući protuupalno, antikancerogeno, antibakterijsko, antivirusno, antigljivično, antidijabetičko, anti-Parkinsonovo, antitrombotično, analgetsko djelovanje, te djelovanje u borbi protiv Alzheimerove bolesti, između ostalog. Zbog svoje široke primjene u području dizajna i otkrivanja lijekova, tiazoli zauzimaju važno mjesto u medicinskoj kemiji. Također, u usporedbi s drugim peteročlanim heterociklima s dva heteroatoma, kao što su oksazol, izoksazol i izotiazol, tiazol je najčešći esencijalni heterociklički spoj u raznim lijekovima. Trenutno je dostupno nekoliko lijekova koji u svojoj strukturi sadrže tiazol, a oni koji se mogu istaknuti su amifenazol, koji se upotrebljava prilikom predoziranja opijatima, talipeksol, koji se koristi u terapiji Parkinsonove bolesti, fanetizol, protuupalni lijek, tiabendazol, antihelminetik, te niridazol, šistosomicid i antihelminetik. Strukture navedenih lijekova s istaknutim tiazolnim prstenom prikazane su na slici 2.<sup>5,6</sup>



Slika 2: Strukture lijekova na bazi tiazola koji se koriste u terapiji različitih bolesti –  
 a) amifenzol, b) talipeksol, c) fanetizol, d) tiabendazol, e) niridazol.

Jedno od važnijih bioloških djelovanja tiazola i njihovih derivata je antikancerogeno. Budući da je oboljenje od karcinoma jedno od najčešćih uzroka smrti u svijetu, veliki naponi uloženi su u pronalazak novih lijekova u borbi protiv te bolesti.<sup>9,10</sup> Najveći postotak raka koji uzrokuju smrt zauzima rak pluća, zatim rak prostate i debelog crijeva kod muškaraca te rak dojke i jajnika kod žena.<sup>11</sup> S obzirom na to da do sada poznati lijekovi u terapiji raka pokazuju toksičnost, manjak selektivnosti prema tkivu zahvaćenim rakom i neželjene interakcije s drugim lijekovima, očito je da postoji velika potreba za pronalaskom novih rješenja.<sup>9,10</sup> Na tu temu provedena su različita istraživanja, a jedno od otkrića bili su bis-tiazolni derivati. Ispitivala se njihova biološka aktivnost u liječenju najčešćih vrsta raka (rak prostate i jetre). Lijekovi prikazani na slici 3a pokazali su značajnu antikancerogenu aktivnost.<sup>12</sup> Nadalje, osmišljeni su i sintetizirani derivati tiazola koji u svojoj strukturi sadrže ferocen i triazolni prsten. Takvi spojevi pokazali su značajnu biološku aktivnost protiv kancerogenih tumora i pokazalo se da su dobri inhibitori ljudskih staničnih linija raka. Struktura jednog od navedenih derivata prikazana je na slici 3b.<sup>13</sup>



*Slika 3: Derivati tiazola koji su pokazali antikancerogenu biološku aktivnost.*

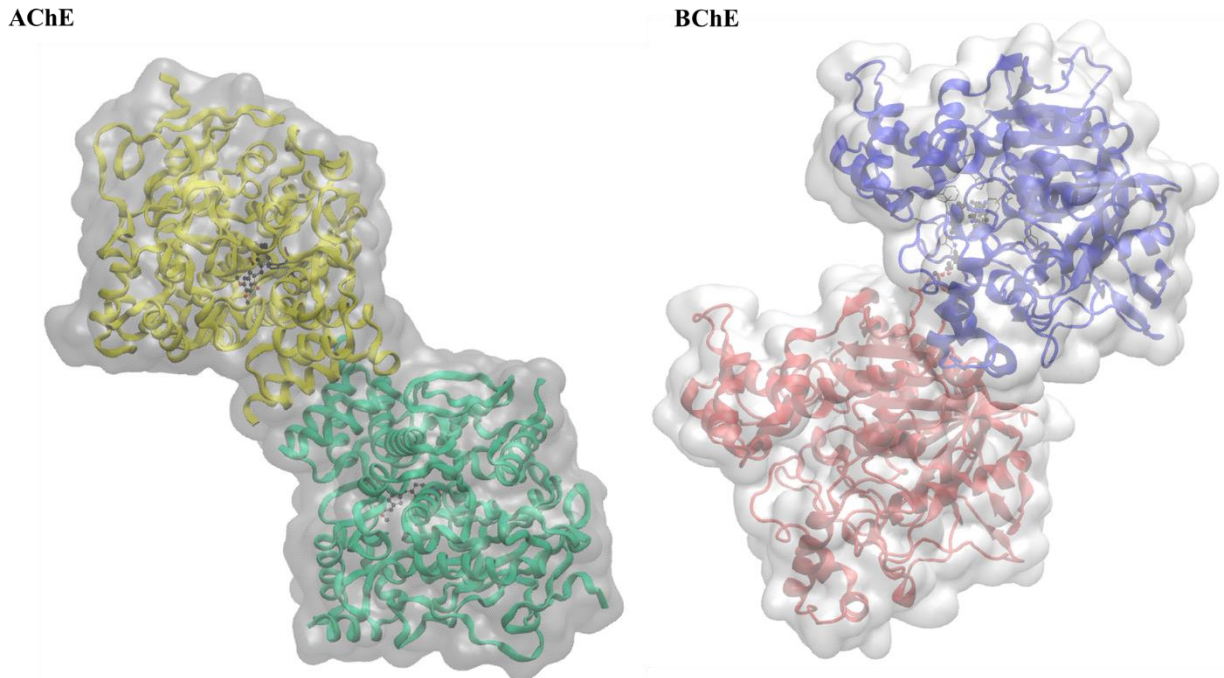
Među brojnim biološkim aktivnostima tiazola i njegovih derivata, posebice treba istaknuti aktivnost u liječenju *Alzheimerove* bolesti. Standardni tretman za pacijente oboljele od *Alzheimerove* bolesti je inhibicija acetilkolinesteraze,<sup>14</sup> enzima koji katalizira hidrolizu neurotransmitera acetilkolina.<sup>15</sup> Ranije je dokazano da spojevi koji sadrže tiazolni prsten pokazuju dobru učinkovitost protiv neurodegenerativnih poremećaja uzrokovanih niskom razinom neurotransmitera.<sup>16</sup> Ispitana inhibicijska aktivnost tiazola i njegovih derivata prema acetilkolinesterazi, kao i srodnom enzimu butirilkolinesterazi, bit će detaljnije izložena u sljedećem poglavlju.

## 2.2. TIAZOLI I INHIBITORI KOLINESTERAZA

### 2.2.1. Inhibicija enzima kolinesteraza

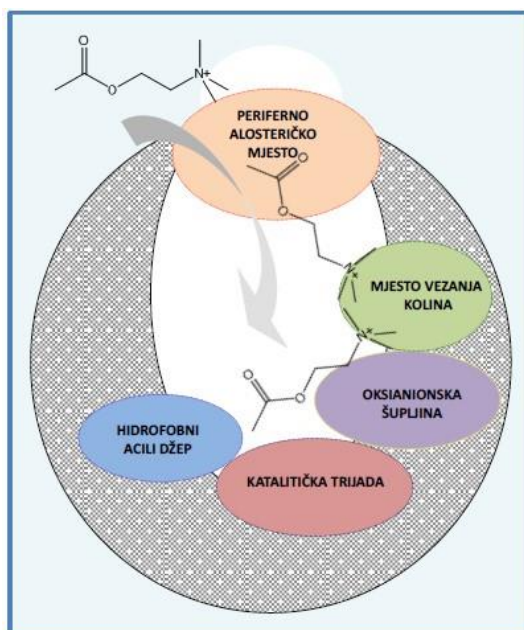
Enzimi kolinesteraze široko su rasprostranjeni u biljnom i životinjskom svijetu, a zanimanje za tu skupinu enzima javilo se otkrićem njihovih važnih bioloških aktivnosti.<sup>17</sup> Biološka uloga kolinesteraza u hidrolizi neurotransmitera acetilkolina otkrivena je 1930-ih godina.<sup>18</sup> Iako se na početku smatralo da postoji samo jedan enzim koji sudjeluje u hidrolizi, ubrzo se otkrilo da postoje dva različita enzima kolinesteraza (slika 4), acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE). Enzimi se razlikuju u afinitetu prema supstratima i mjestu gdje se nalaze.<sup>19</sup> Acetilkolinesteraza ili prava, specifična kolinesteraza stvara se u mozgu, mišićima i koštanoj srži, a nalazi se i u krvi vezana na membrane eritrocita. Butirilkolinesteraza ili nespecifična kolinesteraza hidrolizira i druge spojeve kao što su butirilkolin, benzoilkolin i

sukcinilkolin, a sintetizira se u crijevnoj sluznici, gušterači i serumu.<sup>20</sup> Također, butirilkolinesteraza ima glavnu ulogu u metabolizmu spojeva koji sadrže estere.<sup>21</sup>



*Slika 4: Prikaz strukture acetilkolinesteraze (lijevo) i butirilkolinesteraze (desno).*

Oblik aktivnog mjesta kolinesteraza prikazan je na slici 5. Aktivno mjesto ima oblik ždrijela dubine 20 Å i širine 5 Å. U aktivnom mjestu razlikuje se pet strukturnih domena, a to su periferno alosteričko mjesto, smješteno uz rub aktivnog mjesta, katalitička trijada (serin, glutamat, histidin), domena gdje se veže kolin, oksianionska šupljina te acilni džep.<sup>22</sup>



*Slika 5: Prikaz aktivnog mjesta kolinesteraza s istaknutim strukturnim jedinicama; strelica označava smjer ulaska acetilkolina.<sup>22</sup>*

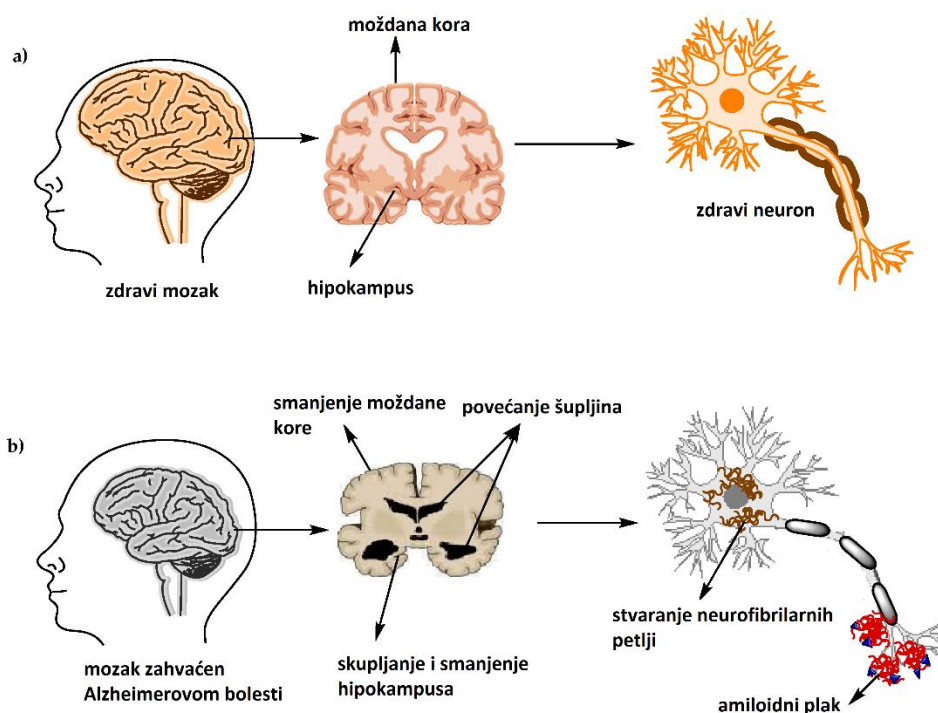
Kolinesteraze su skupina enzima koji prvenstveno kataliziraju hidrolizu acetilkolina, odnosno razgrađuju ga na kolin i acetyl-coA.<sup>15</sup> Acetilkinolin je neurotransmiter koji se nalazi na sinapsi živčanog tkiva i djeluje preko muskarinskih i nikotinskih receptora neurotransmitera. Acetilkinolin nastaje iz kolina i acetyl-coA u kolinergičnim neuronima uz katalitičko djelovanje enzima kolin-acetyl-transferaze.<sup>23</sup> Prilikom živčanog podražaja, živčani impuls utječe na prijenos acetilkolina iz predsnapse u postsinapsu, odnosno acetilkolin se prenosi do receptora neurotransmitera koji se tamo nalaze. Receptori dalje prenose živčani impuls do živčanih stanica. Gore navedenom reakcijom hidrolize, kolinesteraze upravljaju prijenosom živčanih impulsa prilikom živčanog podražaja u sinapsama središnjeg i perifernog živčanog sustava.<sup>22</sup> Na taj način, kolinergični neuron se nakon aktivacije vraća u stanje mirovanja.<sup>24</sup>

Inhibicija aktivnosti kolinesteraza uzrokuje nakupljanje acetilkolina, odnosno acetilkolin se ne može razgraditi na acetyl-coA i kolin te dolazi do prekomjerne stimulacije muskarinskih i nikotinskih receptora.<sup>15</sup> Inhibicija kolinesteraza može se postići stvaranjem nekovalentnih (reverzibilna inhibicija) ili kovalentnih (ireverzibilna inhibicija) interakcija između različitih inhibitora i serina katalitičke trijade kolinesteraze. Inhibitori koji djeluju reverzibilno su uglavnom prirodnog podrijetla i izoliraju se iz biljaka. S obzirom na to da su enzimi kolinesteraze povezani s različitim bolestima kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest, javila se potreba za razvojem sintetskih reverzibilnih inhibitora. Najpoznatiji sintetski inhibitor koji je u kliničkoj upotrebi za kontrolu simptoma navedenih bolesti je donepezil.<sup>25</sup> U kliničkoj

upotrebi korištenje inhibitora podrazumijeva usporavanje pada razine acetilkolina. Ireverzibilni inhibitori kolinesteraza su karbamati i organofosforni spojevi, a koriste se kao lijekovi i pesticidi. Svojstva organofosfata su često i zloupotrebjavana, pa je poznata i njihova uloga kao neurotoksičnih bojnih otrova. Poznati karbamat je fizostigmin koji se upotrebljava u terapiji Alzheimerove bolesti i glaukoma.<sup>25</sup>

## 2.2.2. Alzheimerova bolest

*Alzheimerova* bolest (AB, engl. *Alzheimer's disease*, AD) je progresivni ireverzibilni neurodegenerativni poremećaj mozga i najčešći je oblik demencije.<sup>26</sup> Bolest ima destruktivni učinak na razmišljanje i pamćenje, a najčešći simptomi bolesti su poremećaji u formiranju kratkoročnog pamćenja, problemi s jezičnim vještinama i poremećaji pažnje. Ono što dodatno prati bolest je promjena osobnosti, pogoršanje vizualno-prostornih vještina, anksioznost i depresija.<sup>27</sup> Pojava bolesti uključuje interakciju genetskog rizika i okolišnih čimbenika.<sup>29</sup> *Alzheimerovu* bolest prvenstveno karakterizira oštećenje i propadanje živčanih stanica, propadanje kognitivnih funkcija koje se odvija progresivno, pojava depozita  $\beta$ -amiloida u izvanstaničnim senilnim plakovima te pojava neurofibrilarnih petlji u moždanoj kori (slika 6).<sup>29</sup>



Slika 6: Prikaz fiziološke strukture mozga i neurona u a) zdravom mozgu i b) mozgu oboljelom od Alzheimerove bolesti.<sup>29</sup>



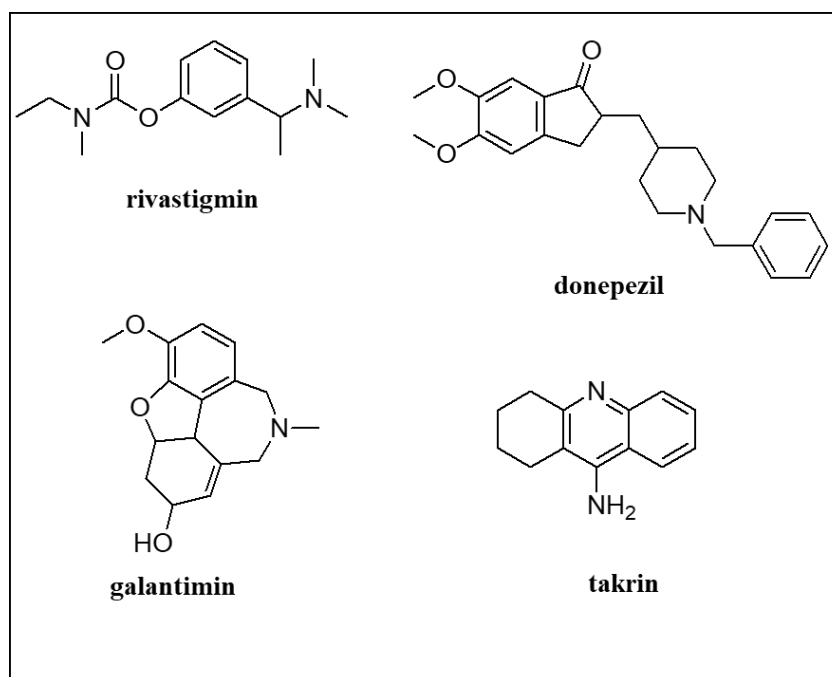
*Alzheimerova* bolest je četvrta glavna bolest koja uzrokuje smrt u razvijenim zemljama, nakon karcinoma, cerebralnih bolesti i kardiovaskularnih bolesti. S obzirom na to, veliki su napori uloženi u potragu za učinkovitim lijekovima koji bi se mogli koristiti u terapiji ove bolesti.<sup>30</sup>

Iako postoje brojne hipoteze o patofiziologiji *Alzheimerove* bolesti, njezina patogeneza nije još u potpunosti objašnjena.<sup>31</sup> Kolinergički sustav, odnosno niska razina acetilkolina, beta-amiloidni ( $A\beta$ ) protein, tau- $(\tau)$ protein, oksidativni stres, upala i toksični metalni ioni glavne su hipoteze koje objašnjavaju uzroke i napredovanje bolesti. U skladu s ovim hipotezama, povećanje kolinergičke aktivnosti sa spojevima koji inhibiraju kolinesterazu, inhibicija stvaranja  $A\beta$  agregata i smanjenje hiperfosforilacije  $\tau$  proteina poznati su pristupi tretiranja bolesti.<sup>16</sup> Inhibitori kolinesteraze prepoznaju se kao jedan od glavnih izbora prilikom liječenja *Alzheimerove* bolesti, a sve češća strategija je sintetizirati nove i snažne lijekove sa značajnim inhibicijskim potencijalom za acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu.<sup>32</sup> Pretpostavlja se da se prilikom bolesti gube kolinergični neuroni u mozgu i da dolazi do smanjivanja aktivnosti kolin-acetil-transferaze, koja je odgovorna za stvaranje acetilkolina. U skladu s tim, dolazi do pojave niske razine acetilkolina. Acetilkinolin je ključan za kognitivne procese i sposobnosti, uključujući memoriju i pamćenje. Niskom razinom acetilkolina dolazi do smanjenja kolinergičke neurotransmisije u mozgu te do disfunkcije kognitivnog sustava. Osim što potiče hidrolizu acetilkolina, acetilkolinesteraza upravlja i otpuštanjem prekursora amiloidnog- $\beta$  proteina, a butirilkolinesteraza stvara amiloidni- $A\beta$  protein te potiče da se protein skuplja u amiloidne- $\beta$  plakove.

Inhibicija AChE spriječila bi hidrolizu acetilkolina, tako da bi se razina acetilkolina u kolinergičkim sinapsama povećavala.<sup>16,33</sup> Iako je AChE primarna meta za inhibiciju, u posljednje vrijeme BChE i potraga za njezinim inhibitorima privlači sve veću pozornost. BChE služi kao pomoćni enzim AChE i povezan je s njom, a sprječava da enzim interferira s prijenosom neurotransmitera, što rezultira nuspojavama za pacijente kao što su mučnina, povraćanje, groznica, pa čak i smrt.<sup>34,35</sup> Također, BChE može hidrolizirati acetilkolin tako da se njegove razine ne smanjuju, već čak i povećavaju. Istraživanja koja su provedena *in vivo* na miševima pokazala su da miševi koji boluju od *Alzheimerove* bolesti i kod kojih je izolirana BChE, imaju značajno manju količinu amiloidnog plaka, kad ih se usporedilo s miševima koji imaju *Alzheimerovu* bolest s uobičajeno prisutnom BChE.<sup>36</sup> U mozgu zdrave osobe prevladava AChE, ali u mozgu pacijenata sa *Alzheimerovom* bolesti aktivnost BChE raste, dok aktivnost AChE ostaje nepromijenjena ili se smanjuje.<sup>34</sup> Isto tako, inhibicija BChE nije povezana sa štetnim djelovanjem i pokazuje učinkovitost bez značajnih nuspojava. Stoga, i inhibicija BChE

može se smatrati značajnom za sintezu novih lijekova i koristiti kao meta za liječenje *Alzheimerove* bolesti. Osim toga, još učinkovitije bi bilo pronaći lijek koji inhibira i AChE i BChE i koji bi mogao pokazati još bolje rezultate od selektivnih inhibitora AChE ili BChE.<sup>37</sup>

Donepezil, galantimin, takrin i rivastigmin<sup>38</sup> (slika 7) poznati su inhibitori kolinesteraza. Danas se koriste kao lijekovi za *Alzheimerovu* bolest svi osim takrina, koji je prvi otkriven, ali je naknadno pokazao da izaziva hepatotoksičnost.<sup>24</sup> Ostale lijekove je odobrila Američka agencija za hranu i lijekove (FDA). Međutim, lijekovi koji se danas koriste služe samo za ublažavanje simptoma bolesti, dok lijek koji zaustavlja napredovanje bolesti još nije uspješno razvijen. Osim toga, trenutno korišteni lijekovi imaju i različite nuspojave, kao što su gastrointestinalni poremećaji i hepatotoksičnost, koje ograničavaju njihovu kliničku primjenu. Iz tog razloga, znanstvena istraživanja za pronalazak jačih lijekova s manje nuspojava se i dalje intenzivno nastavljaju.<sup>39</sup>

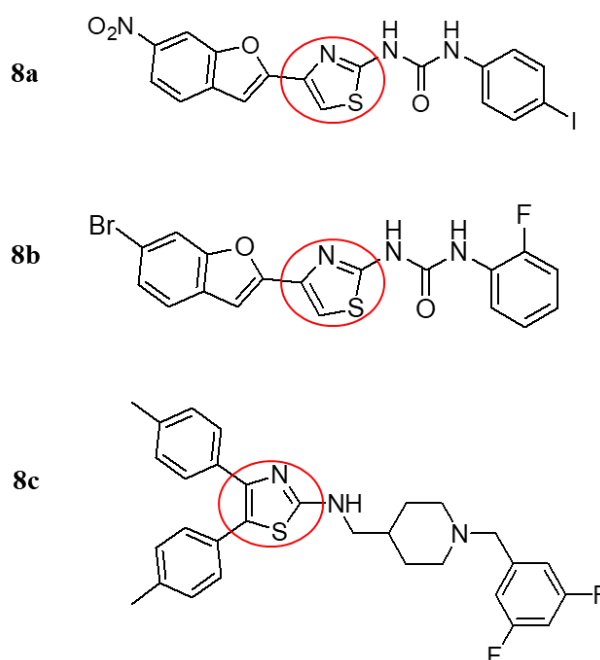


Slika 7: Prikaz struktura poznatih inhibitora kolinesteraza koji se koriste u liječenju *Alzheimerove* bolesti.<sup>38</sup>

### 2.2.3. Derivati tiazola kao antikolinesterazni agensi

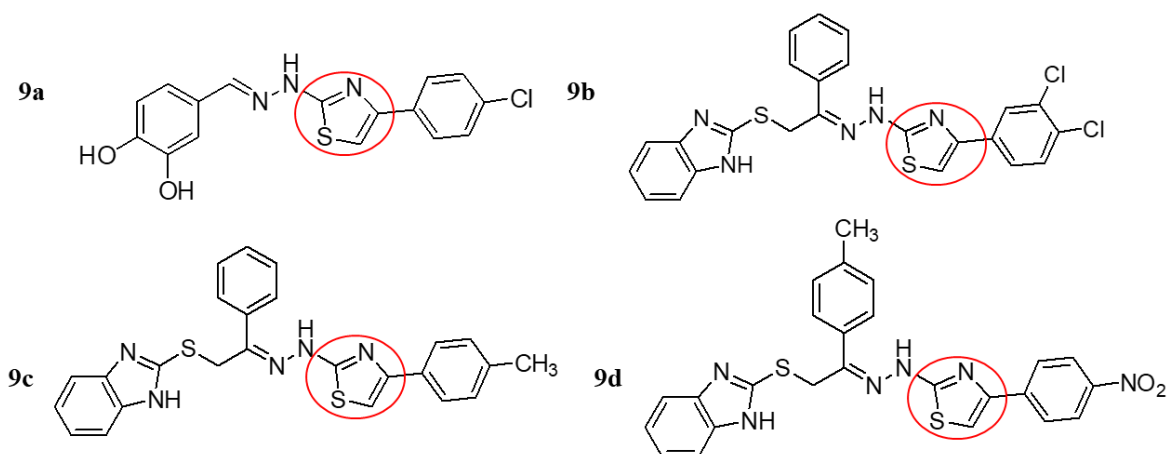
Tiazolni derivati zbog svojeg farmakološkog značaja pokazuju obećavajuću medicinsku primjenu, a već su i danas uključeni u strukture brojnih lijekova. Strukturne modifikacije

inhibitora AChE koji se trenutno koriste u kliničkoj primjeni, dovele su do istraživanja važnosti inkorporiranja tiazolnih dijelova kao građevnih jedinica prilikom optimizacije inhibicijske aktivnosti prema AChE.<sup>40</sup> Prvi derivati tiazola, koji su pokazali aktivnost prilikom inhibicije AChE, u svojoj su strukturi sadržavali akridinsku jezgru. Akridinski derivati tiazola pokazali su uvjerljivu AChE inhibiciju uz IC<sub>50</sub> oko 6 nM, što je upućivalo da bi akridinski dio trebao biti uključen u strukture lijekova.<sup>41</sup> No, otkriveno je da akridinska jezgra izaziva hepatotoksičnost, što je dovelo i do uklanjanja lijeka takrina s tržišta.<sup>42</sup> U daljnjoj potrazi za inhibitorima kolinesteraza sintetizirani su i benzofuranilni derivati tiazola koji su pokazali umjerenu dualnu aktivnost prema AChE i BChE (slika 8a i 8b).<sup>43</sup> Pored toga, poznat je još i benzilpiperidinski derivat diariltiazola (slika 8c), koji je pokazao inhibiciju aktivnost uz IC<sub>50</sub> od 0.30 μM.<sup>44</sup>



Slika 8: Tiazolni derivati koji pokazuju inhibitorsku aktivnost prema AChE i BChE.

Daljnijim istraživanjima utvrđena je i važnost inkorporiranja hidroksilnih i halogenih skupina u inhibitore kolinesteraza. Slika 9a prikazuje poznati analog tiazola koji je pokazao dobru inhibitorsku aktivnost prema AChE i BChE (IC<sub>50</sub> za AChE = 21 μM i IC<sub>50</sub> za BChE = 1.6 μM).<sup>45</sup> Sintetizirani su i derivati tiazola koji sadrže benzimidazolnu jezgru s različitim supstumentima. Primjeri takvih inhibitora prikazani su na slici 9b, 9c i 9d.

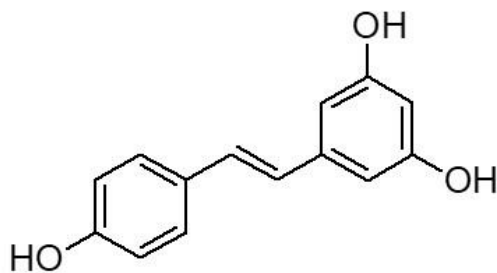


Slika 9: Prikaz poznatih inhibitora kolinesteraza koji u svojoj strukturi sadrže tiazolni prsten.<sup>40</sup>

## 2.3. STILBENI

### 2.3.1. Prirodni stilbeni

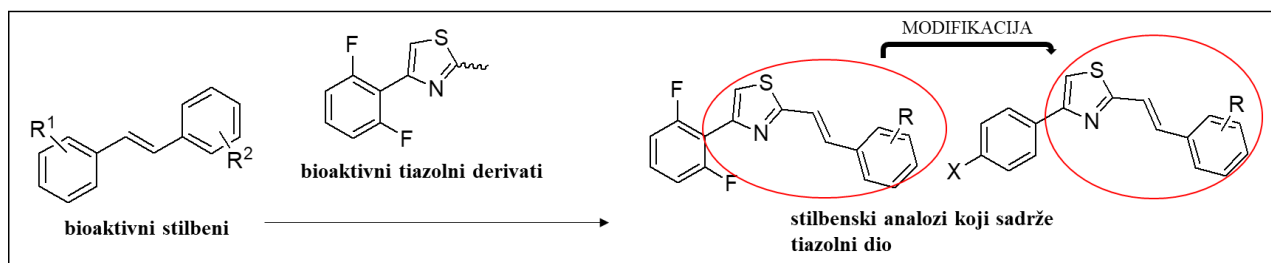
Prirodni spojevi važan su izvor spojeva za medicinsku kemiju i razvoj lijekova.<sup>46</sup> Prirodni stilbeni nastaju u biljkama, a kategorizirani su i kao fitoaleksini jer su uključeni u obrambeni mehanizam biljaka. Prirodne stilbene biljke sintetiziraju kao odgovor na ultraljubičasto zračenje, ozljede te bakterijske i gljivične toksine.<sup>47</sup> U posljednjih nekoliko godina, istraživanja su pokazala da stilbenski analozi sadrže različite biološke aktivnosti koje mogu biti korisne za ljudsko zdravlje, ali i za upotrebu u poljoprivredi. Iako su istraživanja vezana uz upotrebu stilbena kao pesticida rijetka, stilbeni su pokazali dobro antigljivično, insekticidno, nematocidno i algicidno djelovanje. Nasuprot tomu, postoji mnogo istraživanja vezanih uz farmakološka svojstva stilbena, kao što su antikancerogeno, antioksidativno, antileukemično i protuupalno djelovanje.<sup>48</sup> Najpoznatiji prirodni stilben je rezveratrol, fitoaleksin pronađen u grožđu (slika 10). Rezveratrol je pokazao značajnu kemopreventivnu aktivnost raka u istraživanjima koja su povezana uz tri glavne faze karcinogeneze.<sup>49</sup> Također, rezveratrol djeluje i kao antioksidans. S obzirom na navedena otkrića, nameće se činjenica da stilbenski dio treba biti uključen u strukture biološki aktivnih molekula.<sup>48</sup>



Slika 10: Prikaz strukture prirodnog stilbena rezveratrola.<sup>49</sup>

### 2.3.2. Tiazolni analozi stilbena

Već je ranije spomenuto da su tiazoli važne molekule zbog njihovih različitih bioloških djelovanja. U svrhu pronalaska novih biološki aktivnih heterocikličkih spojeva, a u konačnici i novih lijekova, pripremljeni su novi analozi stilbena u kojima se jedan fenilni prsten iz stilbenske strukture zamijenio s 4-(2,6-difluorfenil)tiazolom te s 4-(4-halofenil)tiazolom.<sup>50,48</sup> Prikaz strategije za stvaranje novih stilbenskih analoga koji sadrže tiazolni prsten dan je na shemi 1.



Shema 1: Strategija dizajna novih stilbenskih analoga.<sup>50</sup>

Prikazani spojevi ispitivani su u svrhu njihove aktivnosti kao inhibitori enzima topoizomeraze I. DNA topoizomeraza IB (Top1) je nuklearni enzim koji se ističe među staničnim linijama raka i ključan je u regulaciji topološke strukture DNA u nekoliko značajnih staničnih metaboličkih procesa, uključujući transkripciju i replikaciju.<sup>51</sup> Stoga, Top1 se može iskoristiti kao stanična meta u otkrivanju novih lijekova protiv raka. Testovi relaksacije posredovani s Top1 enzimom pokazali su da su gore navedeni spojevi pokazali promjenjivu inhibicijsku aktivnost prema Top1.<sup>52</sup> Osim inhibicijske aktivnosti, stilbenski analozi koji sadrže tiazolnu jezgru ispitivani su i u svrhu njihove antigljivične aktivnosti. Provedena su *in vitro* antigljivična ispitivanja, a

dobiveni rezultati pokazali su da stilbenski analozi pokazuju umjerenu antigljivičnu aktivnost. Ispitivanja su se uglavnom odnosila na gljivične biljne patogene.<sup>48</sup>

## 2.4. BENZOTIAZOL I NJEGOVI DERIVATI

### 2.4.1. Struktura i svojstva benzotiazola

Benzotiazoli su biciklički heterocikli i ksenobiotici koji u svojoj strukturi sadrže tiazolni prsten. Osnovna struktura benzotiazola sastoji se od benzenskog prstena fuzioniranog u položajima 4 i 5 s tiazolnim prstenom koji sadrži sumpor i dušik, heteroatome bogate elektronima (slika 11). Navedena dva prstena čine osnovnu jezgru 1,3-benzotiazola.<sup>11</sup> Benzotiazoli privlače veliku pozornost prilikom istraživanja sinteze i dizajna novih lijekova zbog svoje značajne biološke i farmakološke aktivnosti.<sup>53</sup> Benzotiazoli sadrže prošireni  $\pi$  delokalizirani sustav koji ima sposobnost vezanja na molekule DNK.<sup>54</sup> Što se tiče fizikalnih svojstava, benzotiazoli su bezbojne i blago viskozne tekućine, molekulske formule  $C_7H_5NS$ . Po prirodi, benzotiazoli su slabo bazični spojevi čija je temperatura taljenja  $2^\circ\text{C}$ , a temperatura vrelišta  $227\text{-}228^\circ\text{C}$ . Gustoća benzotiazola je  $1.24\text{ g/mol}$ , a molekulska masa  $135.19\text{ g/mol}$ . U prirodi, benzotiazoli se nalaze u moru i na kopnu, u brojnim prirodnim tvarima s nizom bioloških aktivnosti.<sup>55</sup> Tako su benzotiazoli nađeni u strukturi luciferina kod krijesnica, a također su sastavni dio arome borovnica te lišća čaja.<sup>54</sup>



Slika 11: Tautomeri benzotiazola.<sup>54</sup>

Benzotiazole prvi put je sintetizirao *Hoffmann* 1887. godine, tako što je proveo reakciju kondenzacije 2-aminofenola s derivatima karboksilne kiseline, odnosno nitrilima, esterima, ortoesterima, amidima i aldehidima.<sup>56</sup> Postoji još nekoliko puteva sinteze benzotiazola, od kojih su najpoznatiji oksidacijska kondenzacija uz barijev manganat, ciklizacija 2-aminofenola s anilinima katalizirana Bronstedovom kiselinom te intramolekulska ciklizacija tioformanilida.<sup>3</sup>

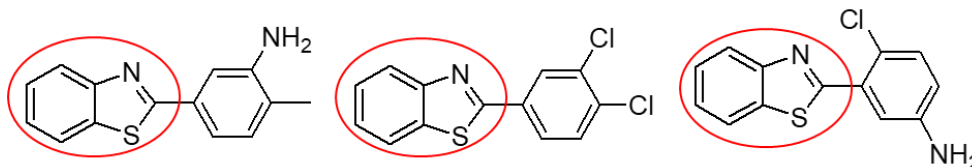
## 2.4.2. Farmakološko djelovanje

Benzotiazoli i njihovi derivati pripadaju važnoj skupini heterocikličkih sintetskih spojeva.<sup>57</sup> Derivati benzotiazola imaju značajnu ulogu u području istraživanja, posebice u sintetskoj, medicinskoj i farmaceutskoj kemiji zbog svojih bioloških i farmakoloških aktivnosti.<sup>54</sup> Otkriće i farmakološki profil riluzola bio je početak zanimanja biologa za benzotiazole. Riluzol, 6-trifluormetoksi-2-benzotiazolamin, je blokator procesa povezanih s neurotransmiterom glutamatom<sup>54</sup>, odnosno ometa neurotransmisiju glutamata u biokemijskim, elektrofiziološkim i bihevioralnim eksperimentima.<sup>58</sup> Nakon otkrića riluzola, benzotiazoli su uvelike proučavani te se otkrilo da posjeduju raznovrstan profil kemijske reaktivnosti.<sup>11</sup> Iako je biološka aktivnost benzotiazola poznata dugi niz godina, njihove biološke značajke su i dalje od velikog znanstvenog interesa.<sup>56</sup> Dokazano je da jezgra benzotiazola pokazuje širok spektar farmakoloških aktivnosti i stoga je vrlo značajna za razvoj novih lijekova.<sup>11</sup> Neka od farmakoloških djelovanja koja posjeduju benzotiazoli su antidiabetičko, antikancerogeno, protuupalno, imunomodulatorno i neuroprotektivno, antiglutamatno/antiParkinsonovo, antiparazitsko, te analgetsko djelovanje.<sup>11</sup> Posebice je značajna medicinska aktivnost benzotiazola prilikom tretiranja različitih neurodegenerativnih bolesti, uključujući Alzheimerovu bolest, lokalnu ishemiju mozga, Huntingtonovu bolest i rak. Važnost uključivanja benzotiazola u dizajn novih lijekova potvrđuje i činjenica da je velik broj patenata već objavljen na tu temu, a također i to da su mnogi derivati benzotiazola trenutno u različitim fazama kliničkih ispitivanja.<sup>3</sup>

## 2.4.3. Antikancerogeno djelovanje benzotiazola

Već je ranije spomenuto da, iako je tijekom posljednjih godina ostvaren značajan napredak u istraživanju i razvoju različitih antikancerogenih lijekova, i dalje postoje nedostaci trenutno dostupnih lijekova u borbi protiv raka. Prvi značajni nedostatak je nedostatak selektivnosti prema tumorskom tkivu, što uzrokuje neželjene nuspojave, a drugi je otpornost stanica raka na korištene lijekove.<sup>59</sup> Utvrđeno je da je potrebno sintetizirati nove spojeve, jednostavne strukture s novim mehanizmom djelovanja i koji pokazuju *in vivo* antitumorski potencijal. Benzotiazol i njegovi derivati pokazuju antitumorsku aktivnost i stoga je sintetiziran niz selektivnih antitumorskih lijekova koji sadrže benzotiazolnu jezgru. Supstituirani 2-fenilbenzotiazoli (slika 12) predstavljaju nove, moćne i visoko selektivne agense koji su, u *in*

*in vitro* istraživanjima, pokazali antitumorsku aktivnost prema ljudskim stanicama raka pluća, bubrega i jajnika.<sup>60</sup>

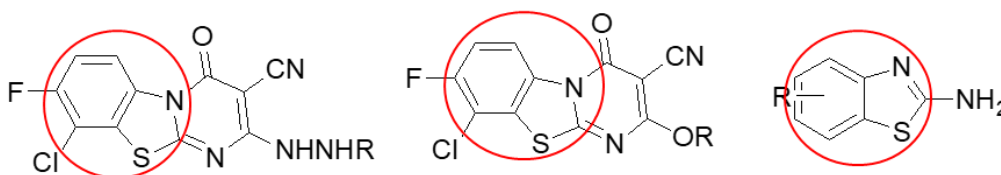


Slika 12: Prikaz struktura 2-(supstituiranih-fenil)benzotiazolnih derivata.<sup>61</sup>

Benzotiazolni analozi ostvaruju svoju antikancerogenu aktivnost tako da djeluju na različite načine, odnosno ciljajući različite molekularne procese. Tako primjerice benzotiazoli mogu djelovati kao inhibitori enzima Topoizomeraze II. Istraživanja koja proučavaju povezanost strukture i biološke aktivnosti pokazala su da je jezgra benzotiazola nužna za učinkovitu citotoksičnost, te da alkilna ili halogena skupina u položaju 3 fenilnog prstena povećava citotoksičnost antitumorskih benzotiazola.<sup>61</sup>

#### 2.4.4. Protuupalno djelovanje benzotiazola

Upalne bolesti su široko rasprostranjene u svijetu i često se javljaju, a u većini slučajeva su loše tretirane što može dovesti do različitih komplikacija posebice kod jakih alergija, autoimunih bolesti te odbijanja transplantiranog organa. Nadalje, otkriveno je i da kronične upale posreduju pojavi drugih bolesti kao što su srčane bolesti, rak, dijabetes, artritis, *Alzheimerova* bolest i autoimune bolesti. Dosadašnja terapija upalnih bolesti se sastoji u korištenju nesteroidnih protuupalnih lijekova koji ublažavaju bol i povišenu temperaturu. Međutim, glavno ograničenje tih lijekova je što se prilikom korištenja javljaju različite nuspojave te se stoga javlja potreba za sintezom novih, sigurnijih za korištenje protuupalnih lijekova. U tu svrhu sintetizirani su različiti derivati benzotiazola koji su pokazali dobru protuupalnu aktivnost (slika 13).<sup>62,63,64</sup>

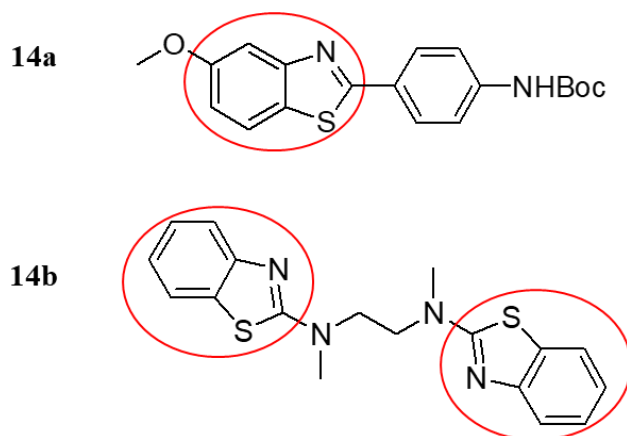


Slika 13: Prikaz struktura derivata benzotiazola koji pokazuju protuupalnu aktivnost.<sup>63,64</sup>



## 2.4.5. Uloga benzotiazola u tretiranju Alzheimerove bolesti

Usljed širokog biološkog djelovanja benzotiazola, sve češća strategija prilikom dizajniranja lijekova je inkorporiranje benzotiazolne jezgre u strukture aktivnih molekula. S obzirom na to da trenutno dostupni lijekovi u borbi protiv Alzheimerove bolesti i dalje imaju jake nuspojave te ne mogu u potpunosti izliječiti bolest, već samo ublažiti simptome, potraga za novim učinkovitim agensima i dalje traje. Znanstvenici su sintetizirali različite derivate benzotiazola i ispitivali njihovu ulogu u Alzheimerovoj bolesti, odnosno njihovu inhibicijsku aktivnost, povezanost s depozitima  $\beta$ -amiloida u izvanstaničnim senilnim plakovima i s neurofibrilarnim petljama u moždanoj kori. Provela se paladijem katalizirana *Suzuki* reakcija u kiselim uvjetima, a produkt reakcije je 2-arilbenzotiazol (slika 14a). Sintetička korisnost ovog postupka potvrđena je i sintezom 2-(4-aminofenil)-6-metoksibenzotiazola, a pozitronska emisijska topografija dokazuje da navedeni spoj može služiti za *in vivo* prepoznavanje Alzheimerove bolesti.<sup>65</sup> Nadalje, otkrilo se da benzotiazolni dimeri (slika 14b) imaju velike specifične afinitete vezanja prema  $A\beta$  fibrilima. To upućuje na činjenicu da bi se dimeri benzotiazola mogli koristiti kao sredstvo za prepoznavanje agregiranih  $A\beta$  fibrila i dijagnosticiranje Alzheimerove bolesti prije nego dođe do značajnog kliničkog oštećenja.<sup>66</sup>



Slika 14: Prikaz struktura nekih od do sada poznatih derivata benzotiazola koji imaju ulogu u terapiji Alzheimerove bolesti.

## 2.5. RAČUNALNO MODELIRANJE

Računalna kemija je područje kemije koje se zasniva na računalnom modeliranju i simulacijama molekula i kemijskih procesa, pri čemu se koriste pristupi temeljeni na kvantnoj mehanici, kao i druge metode računanja zasnovane na klasičnoj mehanici te kombiniranjem ovih pristupa uz upotrebu empirijskih podataka. Temelji se na zakonima kvantne i klasične mehanike, pri čemu se za izvedbu računa koriste određene aproksimacije, kao što su Born-Oppenheimerova aproksimacija i varijacijski teorem.<sup>68</sup> Općenito, izraz računalna kemija koristi se kad je matematička metoda dovoljno dobro razvijena da se može automatizirati i implementirati za rad na računalu.<sup>69</sup> Računalni programi omogućuju da se kemijski fenomeni proučavaju bez eksperimentalnog provođenja i praćenja kemijskih reakcija, a daju uvid u strukturu te svojstva kemijskih spojeva samo upotrebom računala. Za razliku od eksperimentalnog istraživanja, gdje se mogu uočiti samo strukture stabilnih molekula, računalnim metodama mogu se proučavati i modelirati i nestabilne molekule, kratko-živi i nestabilni intermedijeri te prijelazna stanja. Računalno modeliranje je postalo neovisno područje istraživanja, ali i važna potpora eksperimentalnom istraživanju. Uz pomoć računalnog modeliranja, moguće je provesti složene račune u svrhu optimiranja geometrije molekula kao i analize molekulskih sustava i njihovih konformacijskih prostora. Iako navedene simulacije nisu uvijek savršene i nemaju potpunu točnost, one daju dovoljno dobra predviđanja i točne rezultate, ovisno o procesu ili svojstvu koji se simulira.<sup>68</sup>

Postupci koji se koriste za određivanje elektronske strukture temelje se na zakonima kvantne mehanike. Kvantna mehanika je temelj za objašnjavanje i opisivanje subatomske strukture, a razvila se na temelju otkrića Erwina Schrödingera i Wernera Heisenberga. Osnovni koncept kvantne mehanike je da se uz pomoć Schrödingerove jednadžbe mogu izračunati valne funkcije elektrona, sva svojstva sustava koji sadrži elektrone, kao i energija iz koje su svojstva izvedena. Međutim, navedena Schrödingerova jednadžba može se izračunati i egzaktno riješiti samo za sustave koji imaju jedan elektron, odnosno jednoelektronske sustave. Takvi sustavi su primjerice atom vodika, kation helija i  $H_2^+$ .<sup>70</sup> S obzirom na to, za objašnjavanje kvantno-mehaničkih svojstava i dobivanja uvida u strukturu određenih molekula, potrebno je koristiti druge metode.

Za opisivanje strukture i energije molekula koriste se i tzv. semiempirijske metode, kao što su AM1, PM3 i MINDO, koje se služe parametrima izvedenim iz eksperimentalno dobivenih podataka u kombinaciji s kvantno-mehaničkim računima. Nadalje, za detaljan opis elektronske

strukture i svojstava koja iz nje proizlaza pogodne su *ab-initio* metode, kao što su Hartree-Fock metoda (HF), Møller-Plesset skupina metoda (MP) te skupina metoda konfiguracijske interakcije (CI). One se oslanjaju se na zakone kvantne mehanike i za izračune ne koriste eksperimentalne podatke. Ab-initio („početni principi“) metode koriste prva načela, a od podataka koji su unaprijed uključeni u modele tu su samo najosnovnije konstante iz fizike i kvantne mehanike, kao što su Planckova konstanta, masa, naboj elektrona i jezgre te brzina svjetlosti.<sup>70</sup> U metodama se provodi približan kvantno-mehanički izračun, a napravljene aproksimacije su obično matematičke, npr. korištenje jednostavnijeg funkcionalnog oblika za funkciju ili pronalaženje približnog rješenja diferencijalne jednadžbe.<sup>69</sup> Energija sustava koja se dobije kao rješenje Schrödingerove jednadžbe *ab initio* metodama izražava se u jedinicama koje se zovu Hartree (1 Hartree = 27.2116 eV). Najjednostavniji tip *ab initio* izračuna elektronske strukture je Hartree-Fock metoda, u kojoj se trenutačno kulonsko elektron – elektron odbijanje ne uzima posebno u obzir, već samo njegov prosječni učinak (srednje polje).<sup>71</sup> Metoda se temelji na ideji koja podsjeća na odvajanje varijabli koje su koristili Born i Oppenheimer, a prema kojoj se elektronska funkcija može rastaviti na funkcije koje ovise samo o jednom elektronu.<sup>72</sup> Ova metoda je varijacijska te su dobivene vrijednosti energije, izražene valnom funkcijom sustava, uvijek jednake ili veće od točne energije i teže graničnoj vrijednosti koja se naziva Hartree-Fockova granica.<sup>71</sup> S obzirom na navedeno, metoda je ograničena na određene primjene jer ne uzima u obzir činjenicu da je gibanje elektrona unutar sustava međusobno korelirano, što rezultira precjenjivanjem međuelektronskih odbijanja i previsokim vrijednostima ukupne energije koja je dobivena kao rješenje. Ipak, mnoge druge metode izračuna započinju s Hartree-Fock metodom, a onda naknadno ispravljaju metodu tako da uključe elektron-elektron odbijanje, odnosno korelaciju elektrona. Na taj način se dobivaju vjernija predviđanja molekulske strukture i energije.<sup>67</sup> Møller-Plesset skupina metoda i teorija spregnutih klastera primjeri su post-Hartree-Fock metoda. U nekim slučajevima, posebice prilikom procesa gdje dolazi do pucanja kemijskih veza te stvaranja novih, Hartree-Fock metoda nije prikladna pa ne može služiti ni kao osnova za post-Hartree-Fock metode. S obzirom na zahtjevnost i sporost *ab initio* pristupa prilikom kvantno-kemijskog opisivanja višeelektronskih sustava, razvile su se metode koje se zasnivaju na teoriji funkcionala gustoće. Takve metode su jednostavnije u smislu računanja, a osiguravaju približno točnu karakterizaciju određenog sustava.<sup>70</sup>

### 2.5.1. Teorija funkcionala (elektronske) gustoće

Teorija funkcionala gustoće (eng. *Density Functional Theory*, DFT) temelji se na teoremu koji za izračunavanje energije ne uzima u obzir valnu funkciju, već elektronsku gustoću.<sup>73</sup> Metode koje se temelje na DFT posljednjih godina su stekle veliku popularnost, upravo zbog jednostavnijeg računalnog korištenja. Metode koje se baziraju na valnoj funkciji ovise o svim elektronima u sustavu i njihovom broju, a glavna prednost DFT metode u odnosu na metodu valne funkcije je što je elektronska gustoća funkcija samo tri prostorne varijable. Osim toga, DFT metoda se, za razliku od valne funkcije, u načelu opaža putem eksperimenta, kao što su npr. tehnike skenirajuće tunelirajuće spektroskopije ili u kristalografskim mapama elektronske gustoće.<sup>74</sup> DFT metode, za razliku od Hartree-Fock metoda, u računima uzimaju u obzir korelirano gibanje elektrona.

Za DFT metode vrlo je značajna Kohn-Sham teorija, prema kojoj energija osnovnog stanja određenog sustava ovisi o gustoći elektrona u molekuli. Elektronska gustoća izražava se kao kombinacija osnovnih funkcija, a matematička formulacija je slična kao i za Hartree-Fock orbitale. Iz navedenih funkcija definira se Kohn-Sham orbitala, a elektronska gustoća se iz te determinante upotrebljava prilikom računanja energije. DFT funkcional se tada koristi za dobivanje završne energije iz gustoće elektrona. Iako teorija funkcionala, odnosno poveznica između elektronske gustoće i energije nije u cijelosti razjašnjena, postoje različiti funkcionali koji u većoj ili manjoj mjeri daju dobre rezultate izračuna energije. Neki od funkcionala su izvedeni iz kvantno-mehaničkih postavki, a neki iz usporedbe sa eksperimentalnim rezultatima. Prema navedenom, DFT metode se u širem smislu mogu svrstati i među *ab initio* kao i semiempirijske metode.<sup>70</sup>

*Thomas* i *Fermi* razvili su prvu teoriju funkcionala gustoće 1927. godine, a izvod za teoriju temeljio se na modelu homogenog elektronskog plina. Thomas-Fermijeva teorija odvojena je od teorije valne funkcije jer je izražena samo u terminima elektronske gustoće i kao takva smatra se pretečom moderne teorije funkcionala gustoće. Korištenje aproksimacije za realistične sustave daje loša kvantitativna predviđanja, a model čak ne uspijeva reproducirati općenite značajke gustoće. Ipak, model je pronašao suvremenu primjenu u mnogim područjima kroz sposobnosti analitičkog izdvajanja kvalitativnih nizova te zbog lakoće rješivosti modela. Vrijednost ovog modela je što je u njemu prvi puta izveden izraz u kojemu se kinetička energija iskazuje kao funkcional elektronske gustoće.<sup>73</sup>

Najpoznatiji i najčešće upotrebljavani funkcional gustoće je B3LYP (eng. *Becke Three Parameter Hybrid Functionals*). Navedeni funkcional sadržava Becke funkcional izmjene (B) i korekcijski funkcional (LYP), razvijen iz istraživanja znanstvenika *Leea, Yanga i Paara*. Osim navedena dva funkcionala, u B3LYP-u se nalazi i određeni udio HF funkcionala u elektronskoj izmjeni, te je stoga ovaj funkcional kombinacija tri parametra. Uz B3LYP najčešće korišteni funkcionali su i BP86, PW91, PBE1PBE, M06-2X, wB97XD, OLYP i BMK,<sup>70</sup> koji najčešće predstavljaju akronim imena autora i nekih drugih podataka karakterističnih za dani funkcional.

## 2.5.2. Geometrijska optimizacija molekula

Optimizacija geometrije ključna je komponenta većine studija u računalnoj kemiji koje se bave strukturom ili reaktivnošću molekula.<sup>75</sup> Geometrijska optimizacija je metoda za predviđanje trodimenzionalnog rasporeda atoma u molekuli pomoću modela minimalizacije energije. Fenomen vezanja, odnosno sklonost atoma i molekula da se udružuju u veće, stabilnije strukture, kao i nastanak specifičnih struktura, ovisno o sastavnim elementima, može se objasniti uz pomoć rezultata geometrijske optimizacije.<sup>76</sup> Glavni cilj korištenja metoda koje uključuju kvantnu kemiju je da se predviđena struktura molekule optimizira do oblika koji ima minimalnu energiju.<sup>69</sup>

Do promjene energije molekula dolazi već prilikom malih promjena u strukturi, a odnos između promjena energije i strukturnih promjena neke molekule (tj. promjene prostornih koordinata atomskih jezgara u proučavanom sustavu) može se prikazati uz pomoć plohe potencijalne energije (eng. *Potential Energy Surface*, PES). Na plohi potencijalne energije, točke minimuma nazivaju se potencijalne jame koje odgovaraju strukturama s najnižom energijom. Točke s maksimalnim vrijednostima označavaju prijelazna stanja koja se javljaju između dvije potencijalne jame (dva minimuma) na plohi potencijalne energije.<sup>75</sup> Postupak optimizacije koji se primjenjuje u mnogim računalnim kemijskim programima uključuje nekoliko koraka:

1. Napravi se početna pretpostavka o geometriji molekule.
2. Program izračunava geometriju i gradijente energije navedene strukture. Zatim se dobiva Hessianova matrica (matrica sa konstantama sila) pretpostavkom ili proračunom. Konstante sile određuju zakrivljenost površine u toj točki.
3. Program odlučuje jesu li kriteriji optimizacije zadovoljeni.

4. Ako kriteriji optimizacije nisu zadovoljeni, koriste se gradijenti energije i Hessianova matrica kako bi se predložila nova molekularna geometrija. Postupak se tada ponavlja.<sup>72</sup>

Drugim riječima, optimiranje geometrije provodi se tako da se u koordinatnom sustavu razmjestite atomi u molekuli. Sljedeći korak je izračun energije i gradijenta energije pri danoj geometriji, a zatim se određuje promjena geometrije za sljedeći korak optimizacije. Promjena geometrije ovisi o promjenama sile i energije u različitim smjerovima. Ako geometrija neke molekule u uzastopna dva koraka pokazuje jednaku vrijednost, tad se postiže samousklađenost (eng. self-consistency) i stoga se ta geometrija smatra rješenjem za određenu razinu teorije. Brojne molekule imaju složene strukture koje imaju mogućnost većeg broja konformacija. Konformacije se razlikuju po termodinamičkoj stabilnosti. Stoga, svaki konformer je potrebno zasebno optimizirati da bi se procijenilo koji je najstabilniji i najzastupljeniji u realnom sustavu.<sup>68</sup>

### **2.5.3. Molekulski docking**

Određivanje najboljeg položaja dvije molekule, jedne u odnosu na drugu, važan je primjer problema optimizacije. Obično se pokušava uklopiti malu molekulu u veliku proteinsku strukturu, a taj proces naziva se docking.<sup>67</sup> Molekulski docking (pristajanje) je računalna metoda koja omogućava opis slaganja ili uklapanja dva ili više sustava ili struktura. Najčešći primjer je pristajanje neke male molekule terapijskog djelovanja u aktivno mjesto enzima. Enzimi su makromolekule proteinske strukture, a neke bolesti mogu se liječiti ciljanim mijenjanjem enzimske aktivnosti. Često se to postiže uzimanjem lijekova koji imaju inhibitorno djelovanje na enzim. Molekulski docking uglavnom se upotrebljava kao tehnika molekulskog modeliranja i za predviđanje interakcija između malih molekula, liganda, i proteina (enzima).<sup>77</sup> Docking opisuje način na koji se ligand ponaša i orijentira u proteinskim veznim mjestima, a tako se može predvidjeti i željena orijentacija liganda, kao i afinitet vezanja liganda i proteina.<sup>78</sup> Cilj ligand-protein dockinga je i predviđanje prevladavajućeg načina vezanja liganda s proteinom kojemu je poznata trodimenzionalna struktura. Osim ligand-protein dockinga, postoji još i protein-protein docking, koji u posljednje vrijeme postaje sve popularniji u istraživanjima u farmaceutskoj kemiji. Područje molekularnog dockinga pojavilo se tijekom posljednja tri desetljeća zbog potreba molekularne biologije te otkrivanja novih lijekova na

temelju struktura. Razvoj dockinga uvelike je olakšan porastom dostupnosti i snage računala kao i lakšim pristupom bazama podataka malih molekula i proteina.<sup>79</sup>

Računalne metode koje se temelje na strukturnim značajkama i koje su usmjerene na predviđanje načina vezanja liganda na vezno mjesto proteina ili bilo kojeg drugog molekularnog cilja (receptora) uključuju dva računaska koraka. Prvi korak je docking, gdje se stvaraju „poze“, odnosno višestruke konformacije kompleksa protein-ligand. To se obično provodi izvođenjem niza pokušaja te zadržavanjem onih položaja koje su energetski najpovoljnije. Najčešći način za procjenu ispravnosti geometrije dockinga je mjerenje srednje kvadratne devijacije (eng. *Root Mean Square Deviation*, RMSD) liganda. Obično se prihvaća  $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ . U drugom koraku, koristi se funkcija bodovanja za izračunavanje afiniteta između receptora i liganda za svaki položaj.<sup>80</sup>

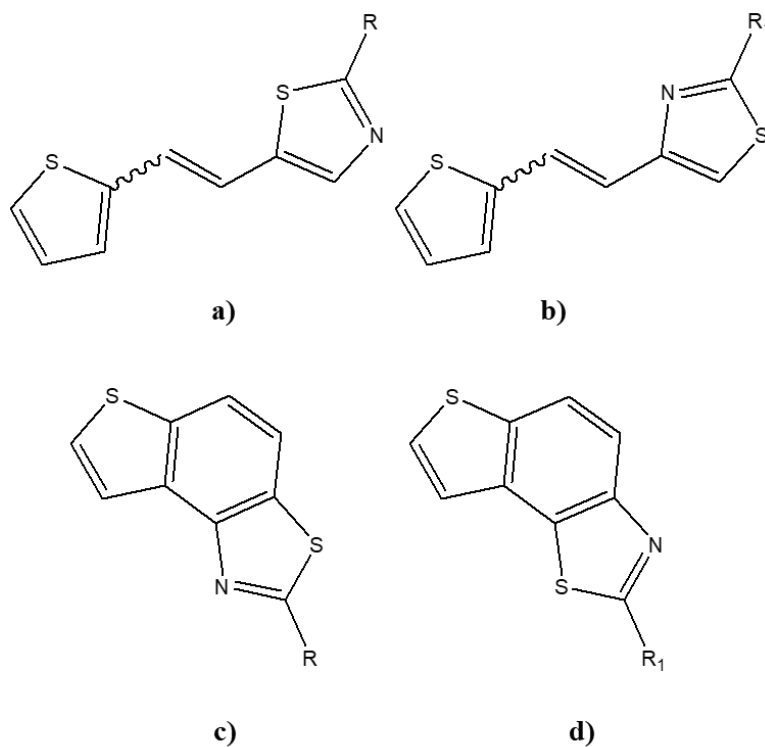
Za izvedbu molekuskog dockinga, potrebno je definirati strukture receptorskih molekula, koje se mogu dobiti kristalografijom X-zrakama ili korištenjem NMR. Receptori su najčešće proteini koji prepoznaju i specifično vežu ligande. Kakav će biti rezultat molekuskog dockinga, to ovisi o kvaliteti strukture receptora. Što je veća rezolucija kristalne strukture receptora, to će biti i bolji ishod dockinga. Još jedan važan faktor koji određuje kvalitetu strukture receptorskih molekula je Debye-Waller ili *B*-faktor, koji opisuje raspršenje X-zraka.<sup>68</sup>

Iako je molekulski docking u posljednje vrijeme dosta popularan i često korišten, još uvijek postoji prostor za poboljšanje. Jedan od najizazovnijih problema u dockingu su receptori s fleksibilnom strukturom. Poznati su brojni primjeri gdje isti protein zauzima različite konformacije ovisno o tome koji se ligand veže na njegovo vezno mjesto. Kao posljedica neuzimanja u obzir fleksibilnosti receptora javljaju se loši rezultati dockinga. Nadalje, molekule vode imaju značajnu ulogu u protein-ligand prepoznavanju. Ako se zanemare interakcije s vodom, može se dogoditi da izračunata energija interakcije danog liganda bude nedovoljno točna. Isto tako, može doći i do vezanja vode u vezno mjesto proteina, ako je aktivno mjesto obogaćeno polarnim aminokiselinama.<sup>81</sup> Ipak, molekulski docking važan je alat u dizajnu novih lijekova i uspješno pomaže u procesima otkrivanja novih aktivnih molekula.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. UVOD

Prethodnim istraživanjima u našem laboratoriju, utvrđeno je da su neki od novih 1,2,3-triazolostilbenskih analoga i njihovih elektrociklizacionih produkata, koji posjeduju tienobenzotriazolnu jezgru, pokazali dobru inhibicijsku aktivnost prema acetilkolinesterazi i butirilkolinesterazi te dobru protuupalnu aktivnost.<sup>82</sup> Inhibicijska aktivnost prema enzimu butirilkolinesterazi posebice je značajna, s obzirom na ulogu enzima u manifestaciji *Alzheimerove* bolesti, što je opisano u prethodnom poglavlju. Već je spomenuto da spojevi s karakterističnom 1,3-tiazolnom jezgrom pokazuju brojne biološke aktivnosti, među kojima je i inhibicijska aktivnost prema kolinesterazama. Stoga, kao nastavak na navedena istraživanja, provela se sinteza i fotokemija novih 1,3-tiazolo-tienostilbena (slika 1), gdje se triazolna jezgra zamijenila tiazolnom, te nekih novih derivata 1,2,3-triazolostilbena, u svrhu pronalaska još učinkovitijih inhibitora kolinesteraza. Novi 1,3-tiazolostilbeni (slika 1a i 1b) sintetizirani su Wittigovom reakcijom ili Büchwald-Hartwigovim aminiranjem, a zatim su podvrgnuti reakcijama elektrociklizacione čime su dobiveni spojevi prikazani na slici 1c i 1d. Osim sinteze, provela se i spektroskopska karakterizacija te računalno modeliranje dobivenih spojeva.<sup>83</sup>

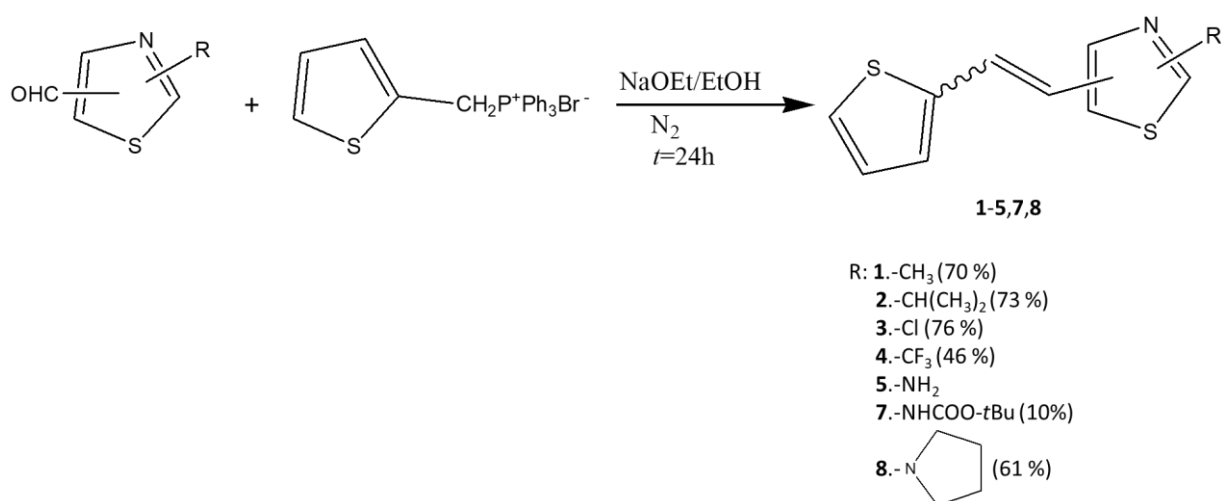


Slika 1: Prikaz struktura novih derivata 1,3-tiazola kao potencijalnih inhibitora kolinesteraza.



### 3.2. SINTEZA NOVIH DERIVATA 1,3-TIAZOLO-TIENOSTILBENA 1-9

Tiazolo-stilbeni **1-9** dobiveni su kao smjese *cis*- i *trans*-izomera. Sinteza derivata 1,3-tiazolo-tienostilbena **1-5**, **7** i **8** (Shema 1) provela se Wittigovom reakcijom s tiofenskom-fosfonijevom soli, odgovarajućim aldehydom, natrijevim etoksidom kao bazom i apsolutnim etanolom kao otapalom. Wittigova reakcija provodila se 24 sata u struji dušika pri sobnoj temperaturi. U reakciji dolazi do stvaranja alkena, odnosno nastaje dvostruka veza. Dobivena smjesa izomera obrađuje se ekstrakcijom i pročišćava kolonskom kromatografijom na silika-gelu. Kao eluens prilikom izvođenja kolonske kromatografije koristila se smjesa otapala petroleter/dietileter promjenjiva omjera.

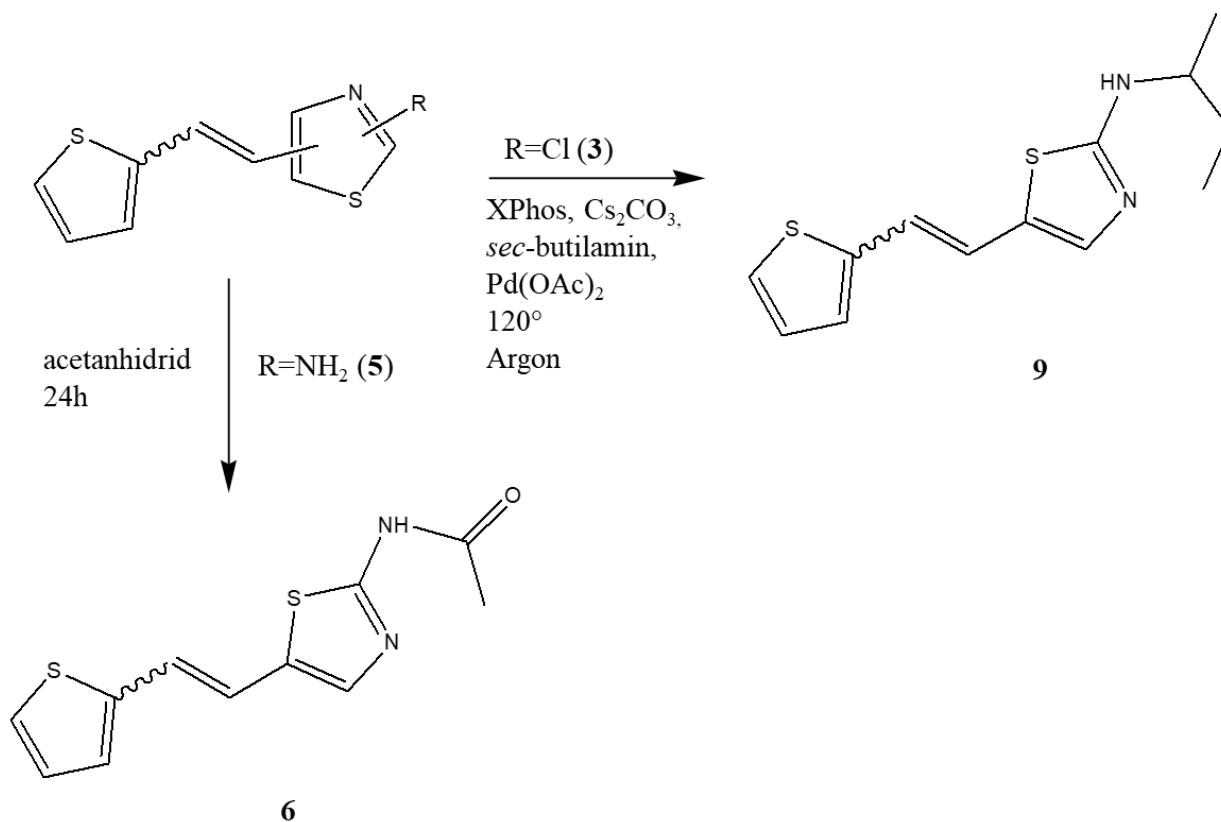


Shema 1: Sinteza 1,3-tiazolo-tienostilbena Wittigovom reakcijom.

Kod metilnog (**1**) i izopropilnog (**2**) derivata 1,3-tiazolo-tienostilbena kolonskom kromatografijom uspješno su izolirani i *cis*- i *trans*-izomeri, dok su kod klorovog (**3**) i pirolidinskog (**8**) derivata uspješno izolirani samo čisti *trans*-izomeri. Snimljeni <sup>1</sup>H NMR spektri smjesa izomera nekih derivata pokazuju da je *trans*-izomer onaj koji nastaje u većem udjelu. Kod metilnog derivata (**1**) većinski izolirani produkt bio je *cis*-izomer, koji je izlazio u posljednjim frakcijama, dok je kod izopropilnog derivata (**2**) *trans*-izomer izoliran u većem iskorištenju i izlazio je u frakcijama nakon *cis*-izomera.

Sinteza derivata 1,3-tiazolo-tienostilbena **6** provela se amidacijom amino-derivata tiazolo-tienostilbena **5** uz acetanhidrid, dok se derivat **9** sintetizirao Büchwald-Hartwigovim aminiranjem iz klorovog derivata (**3**) 1,3-tiazolo-tienostilbena (shema 2). Büchwald-

Hartwigovo aminiranje provodilo se uz reaktante  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , *sec*-butilamin, XPhos kao ligand,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  kao katalizator i 1,4-dioksan kao otapalo. Reakcija se provodila 24 sata u struji argona. Kod derivata **9** uspješno je izoliran čisti *trans*-izomer. Izolirano iskorištenje Büchwald-Hartwigove reakcije iznosilo je 10%.

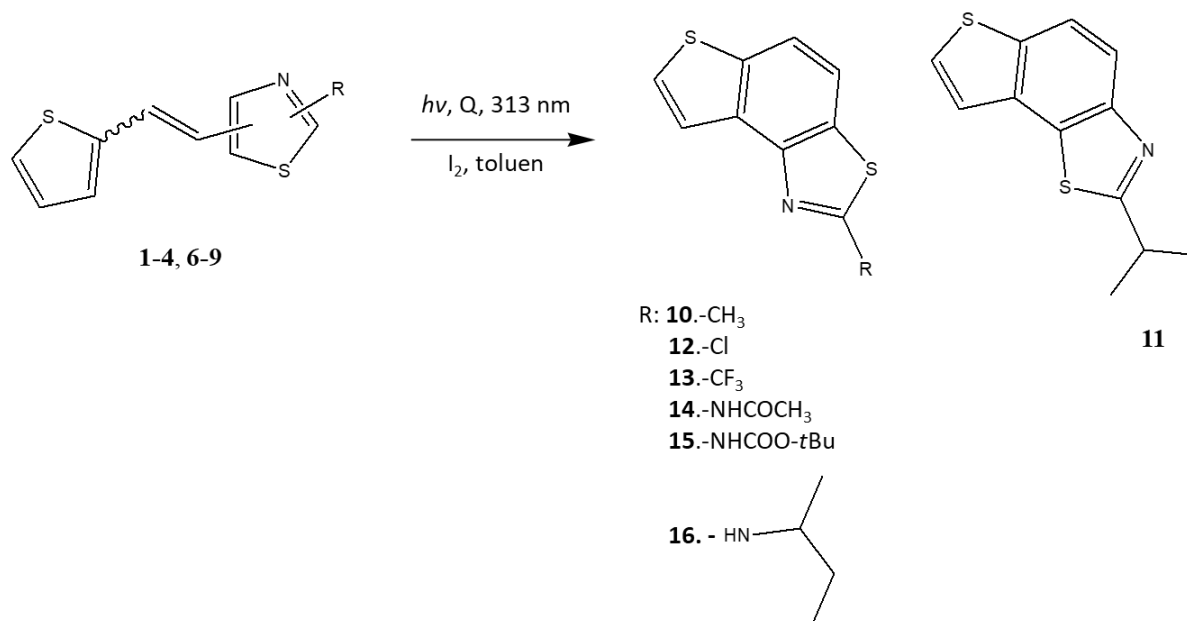


Shema 2: Priprava derivata 1,3-tiazolo-tienostilbena **9** Büchwald-Hartwigovim aminiranjem te derivata **6** prevođenjem amina u amid (amidacija).

### 3.3. SINTEZA ELEKTROCIKLIZACIJSKIH PRODUKATA TIAZOLNIH DERIVATA 10-16

Na derivatima 1,3-tiazolo-tienostilbena **1-4** i **6-9** provedene su preparativne fotokemijske reakcije elektrociklizacije, čime su se dobili novi derivati tienobenzotiazola **10-16** (Shema 3). S obzirom na to da i *cis*- i *trans*-izomeri daju iz fotostacionarnog pobuđenog stanja jedan konačni produkt, radi dobivanja veće mase i iskorištenja kao početni reaktanti u fotokemijskim reakcijama koristile su se smjese izomera **1-4** i **6-9**. Prije reakcija elektrociklizacije, bilo je potrebno snimiti UV-spektre reaktanata kako bi se detektirali maksimumi apsorpcije koji su potrebni za određivanje valne duljine osvjetljavanja. Nakon toga, smjese izomera **1-4** i **6-9**

otopljene su u toluenu ( $\sim 2,5 \times 10^{-3}$  M) i izložene UV zračenju u fotokemijskom reaktoru *Rayonet* s ukupno 10 lampi na 313 nm u kvarcnim kivetama uz dodatak katalitičke količine joda  $I_2$ . Reakcije su se provodile u aerobnim uvjetima 1-5 sati kako bi se postigla potpuna konverzija. Tijek reakcije pratio se uz pomoć tankoslojne kromatografije. Početni reaktanti **1-4**, **6-7** i **9** uspješno su prevedeni u fotoproducte **10-16**, dok početni reaktant **8** nije pokazao reaktivnost prilikom stvaranja elektrociklizacionog produkta.

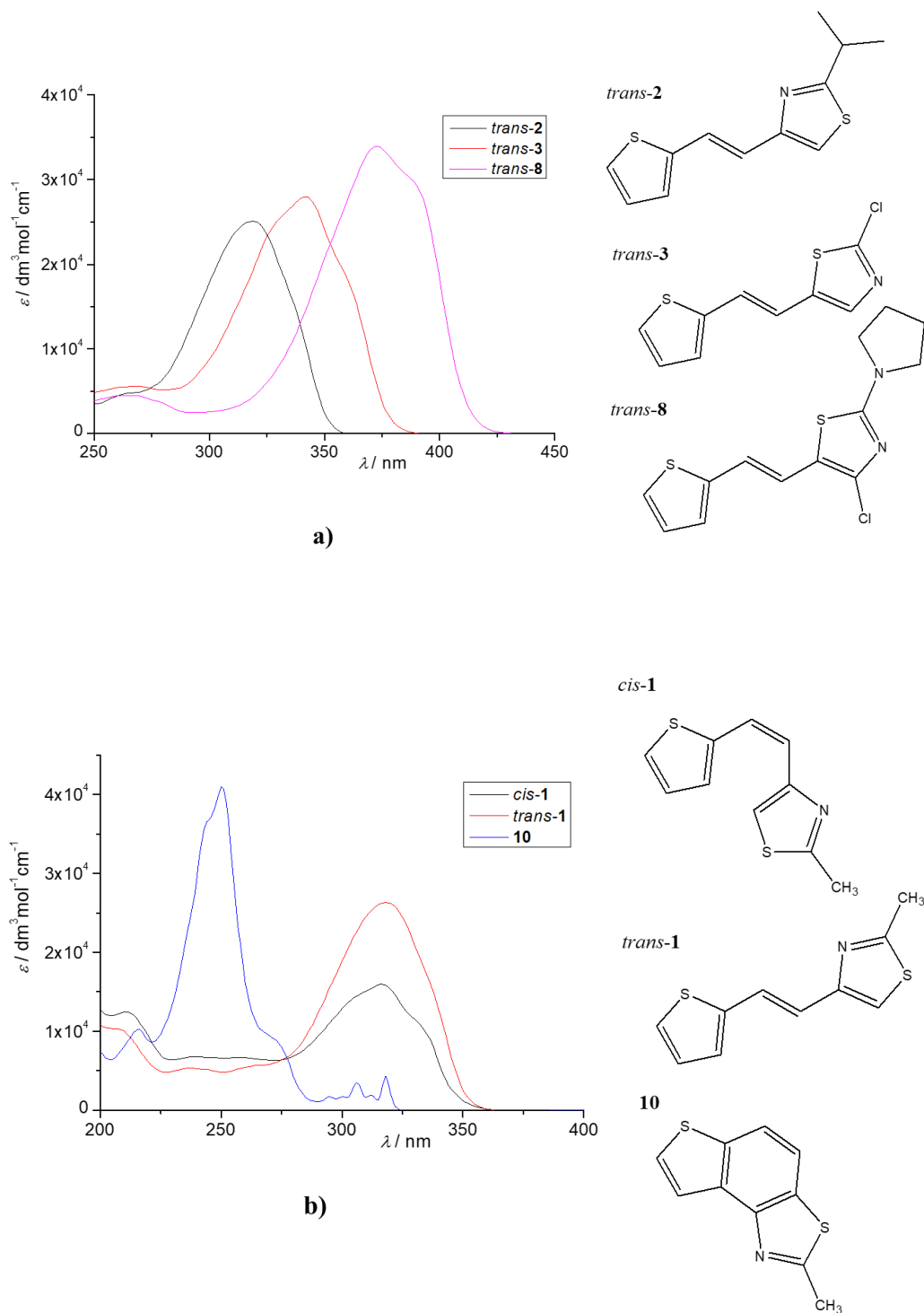


Shema 3: Elektrociklizacioni reakcijski put sinteze tienobenzo-tiazola **10-16**.

Dobiveni fotoproducti pročišćeni su kolonskom kromatografijom na silika-gelu. Kao eluens prilikom izvođenja kolonske kromatografije koristila se smjesa otapala petroleter/dietileter promjenjiva omjera. Izolirana iskorištenja dobivenih produkata nalaze se u rasponu od 27-70 %. Dobiveni fotoproducti **10-14** su kao čisti spojevi uspješno okarakterizirani spektroskopskim metodama, dok fotoproducti **15** i **16** nisu izolirani u čistom obliku niti su dobiveni u dovoljnim količinama za daljnje pročišćavanje i karakterizaciju.

Za čiste i izolirane izomere 1,3-tiazolo-tienostilbena, kao i za njihove fotoproducte snimljeni su UV spektri u otapalu acetonitrilu. Na slici 2a prikazani su UV spektri *trans*-izomera izopropilnog (*trans*-**2**), klorovog (*trans*-**3**) i pirolidinskog derivata (*trans*-**8**) 1,3-tiazolo-tienostilbena. Na slici 1a mogu se vidjeti jaki apsorpcijski maksimumi na valnim duljinama 318 i 373 nm koji su karakteristični za *trans*-izomere diariletana. Također se može vidjeti i kako promjenom supstituenta od izopropilnog (*trans*-**2**) prema klorovom (*trans*-**3**) derivatu, kao i

promjenom od klorovog (*trans-3*) do pirolidinskog (*trans-8*) derivata dolazi do batokromnog i hiperkromnog pomaka.



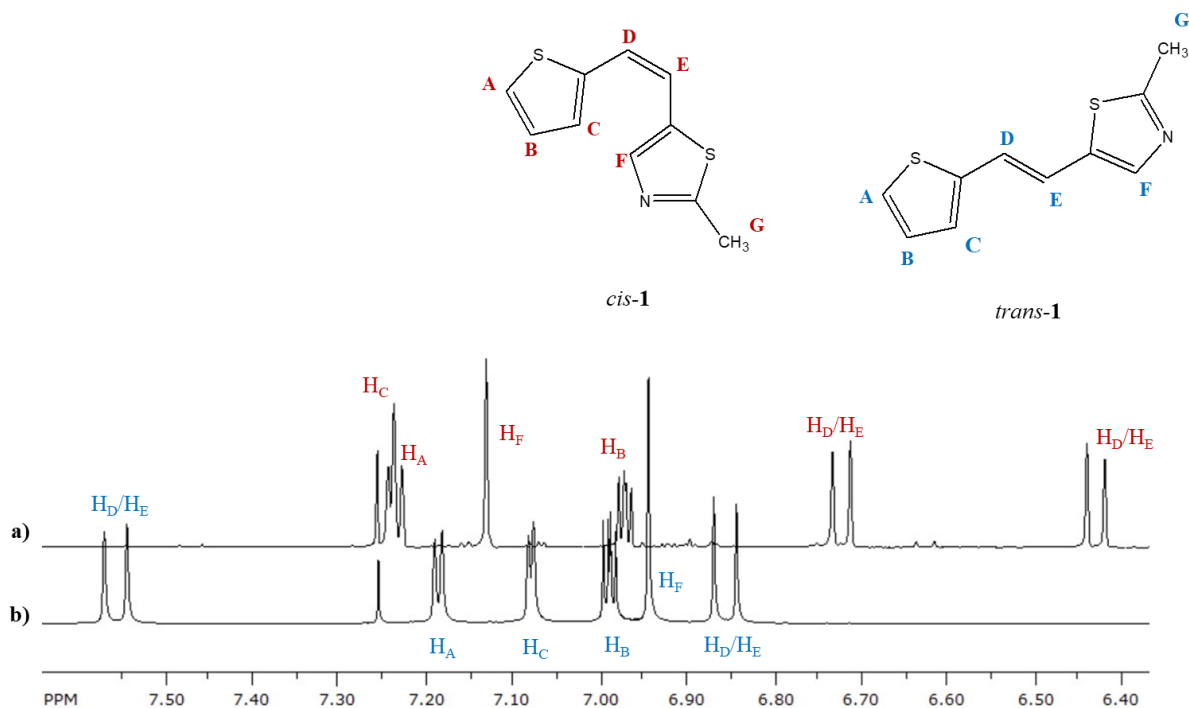
Slika 2: Prikaz UV spektara (ACN): a) 1,3-tiazolo-tienostilbena *trans-2*, *trans-3* i *trans-8*; b) 1,3-tiazolo-tienostilbena *trans-1*, *cis-1* te njihovog electrociklizacionog produkta **10**.

Na slici 2b prikazani su UV spektri 1,3-tiazolo-tienostilbena *trans*-**1** i *cis*-**1** te njihovog elektrociklizacijskog produkta **10**. Maksimumi apsorpcije dobivenih fotoprodukata iznose oko 250 nm. Na slici 2b može se vidjeti razlika u maksimumima između fotoprodukata i tiazolo-tienostilbena, a također i to da se kod *trans*-izomera, u odnosu na *cis*-izomer istog derivata, javlja hiperkromni pomak.

### **3.4. SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA NOVIH 1,3-TIAZOLO-TIENOSTILBENA 1-9 I NJIHOVIH FOTOPRODUKATA 10-16**

#### **3.4.1. Identifikacija 1,3-tiazolo-tienostilbena spektroskopskim metodama**

Strukture derivata 1,3-tiazolo-tienostilbena **1-9** potvrđene su i okarakterizirane spektroskopskim metodama. Strukture derivata kod kojih su izolirani čisti *cis*- i/ili *trans*-izomeri spektroskopski su okarakterizirane uz pomoć  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara te su ti spojevi poslani na daljnja biološka istraživanja. Kod derivata gdje su dobivene samo smjese izomera, a nisu izolirani čisti izomeri, nije se provodila detaljna karakterizacija NMR spektroskopijom, ali su u spektrima utvrđeni željeni produkti kao smjese izomera s karakterističnim konstantama sprega. Za derivate tiazolo-tienostilbena **1** i **2** snimljeni su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri čistih *cis*- i *trans*-izomera, dok su kod derivata **3**, **8** i **9** snimljeni spektri samo uspješno izoliranog, čistog *trans*-izomera. U  $^1\text{H}$  NMR spektrima dobivenih 1,3-tiazolo-tienostilbena identificirani su etenski protoni koji su dokaz nastanka dvostruke veze (Slika 3).



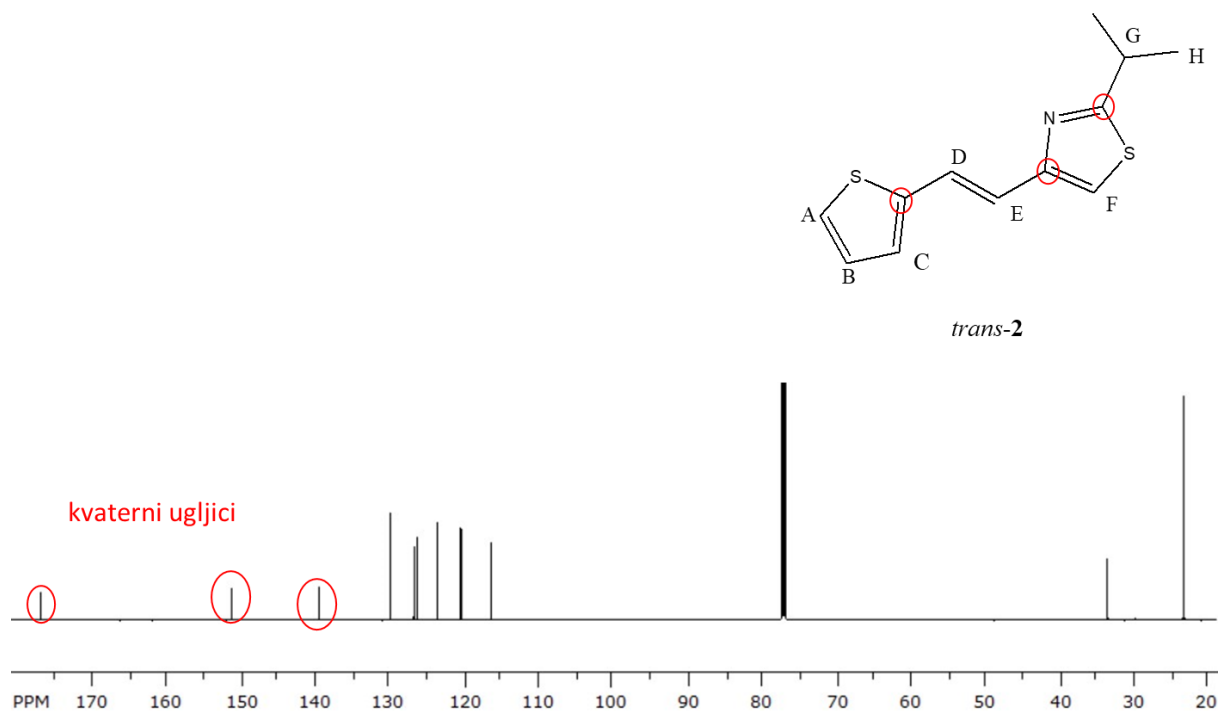
Slika 3: Prikaz <sup>1</sup>H NMR spektara *cis-1* (a) i *trans-1* (b) izomera.

Na slici 3 dan je paralelan prikaz <sup>1</sup>H NMR spektara *cis-1* (a) i *trans-1* (b) izomera metilnog derivata 1,3-tiazolo-tienostilbena. Na spektru a) prikazan je *cis*-izomer, gdje se vide dva karakteristična dubleta na 6,72 i 6,43 ppm koji odgovaraju protonima H<sub>D</sub> i H<sub>E</sub>, od nastale dvostruke veze. Dubleti imaju jednaku konstantu sprege od  $J = 12,4$  Hz, koja je karakteristična za *cis*-izomere i potvrda je da se dva protona međusobno sprežu. Izgled dva dubleta dodatna je potvrda međusobne sprege protona H<sub>D</sub> i H<sub>E</sub> jer dubleti pokazuju tzv. efekt ukošenih multiplleta ili krovni efekt. Na <sup>1</sup>H NMR spektru od *cis*-izomera izopropilnog derivata (**2**), signali koji odgovaraju protonima dvostruke veze stilbena nalaze se na sličnim kemijskim pomacima (6,71 i 6,42 ppm) kao i kod metilnog derivata (**1**). Karakteristični dubleti protona dvostruke veze vide se i na spektru b), koji prikazuje *trans-1* izomer. Dublet jednog protona nalazi se na 7,56 ppm, a dublet drugog na 6,85 ppm. Signali za protone dvostruke veze kod *trans-1* izomera nalaze se na višim kemijskim pomacima u odnosu na *cis-1* izomer, a isti je slučaj i sa protonima dvostruke veze *cis-2* i *trans-2* izomera. Dubleti dvostruke veze *trans-1* izomera također imaju jednaku konstantu sprege, koja iznosi  $J=15,8$  Hz. Ova vrijednost konstante sprege karakteristična je za *trans*-izomere. Signali za protone tiofenske jezgre H<sub>A</sub>, H<sub>B</sub> i H<sub>C</sub> su karakteristična dva dubleta i jedan dublet-dubleta. Kod oba spektra a) i b) signali za protone tiofenske jezgre nalaze se na sličnim kemijskim pomacima, u području aromatskih protona. Konstante sprege dubleta od

protona  $H_A$  iznose  $J = 5-6$  Hz, dok je konstanta sprege dubleta od protona  $H_C$  uvijek manja i iznosi  $J = 3-4$  Hz. S obzirom na to da je signal za proton  $H_B$  dublet-dubleta, signal ima dvije konstante sprege, od kojih manja uvijek iznosi  $J = 3-4$  Hz, a veća  $J = 5-5,5$  Hz. Signal za proton tiazolne jezgre  $H_F$  je singlet i također se nalazi u području aromatskih protona, i to na pomacima 6,94 – 7,45 ppm. Kod oba izomera metilnog derivata (**1**) 1,3-tiazolo-tienostilbena, na pomacima 2,73 – 2,76 ppm nalazi se signal protona metilne skupine koji je singlet i ne spreže se s drugim protonima.

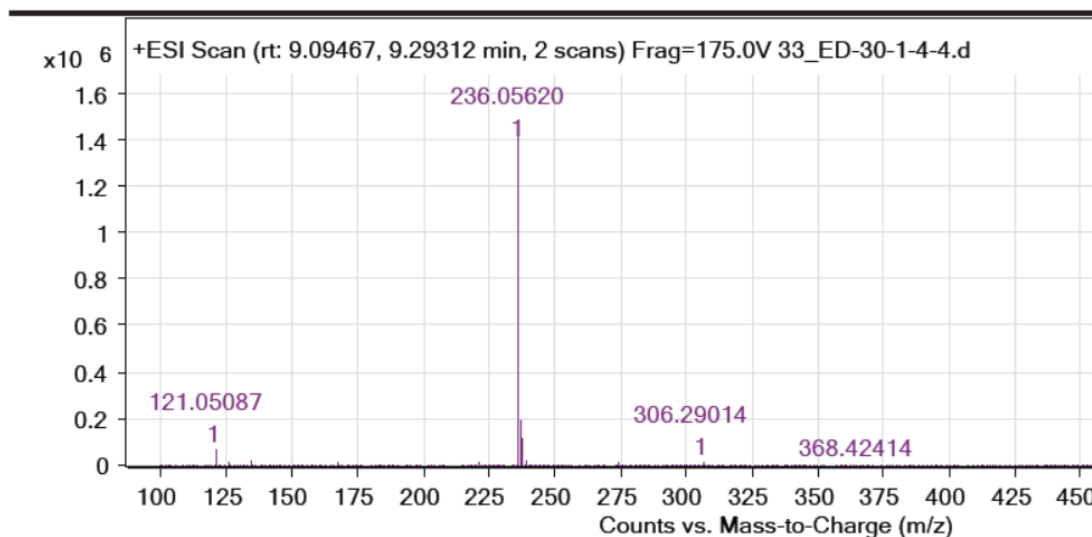
Karakteristični signali za protone dvostruke veze, tiofenske i tiazolne jezgre vide se i na spektrima izoliranih *trans*-izomera derivata **3**, **8** i **9**. Na  $^1H$  NMR spektru pirolidinskog derivata (**8**) se na pomacima između 3,47 i 2,03 ppm, u alifatskom području spektra, nalaze signali za protone pirolidinskog prstena. Kod derivata tiazolo-tienostilbena **9** vidi se signal protona vezanog uz dušik, na 5,55 ppm, te signali protona od *sec*-butilnog supstituenta.

Na  $^{13}C$  NMR spektru vide se tri, odnosno četiri kod pirolidinskog derivata **8**, signala niskog intenziteta, koji predstavljaju signale za kvaterne ugljike, odnosno one ugljike koji na sebe nemaju vezane protone (Slika 4). Signali kvaternih ugljika su singleti. Signali za ugljike dvostruke veze, tiofenske i tiazolne jezgre nalaze se na pomacima između 112,8 i 177,2 ppm i oni su dubleti. Ostali signali nalaze se u alifatskom području i to su signali ugljika od supstituenata pojedinih derivata.



Slika 4:  $^{13}C$  NMR spektr 1,3-tiazolo-tienostilbena *trans*-2.

Osim NMR spektroskopskih metoda, za čiste smjese izomera i neke izolirane izomere snimljeni su maseni spektri te je provedena i HRMS analiza, kako bi se potvrdila točna struktura i čistoća dobivenih produkata. Na slici 5 prikazan je maseni spektar izopropilnog derivata *trans*-2 1,3-tiazolo-tienostilbena. Na spektru se može vidjeti osnovni signal koji je ujedno i molekulski ion i koji predstavlja masu izopropilnog derivata **2**.

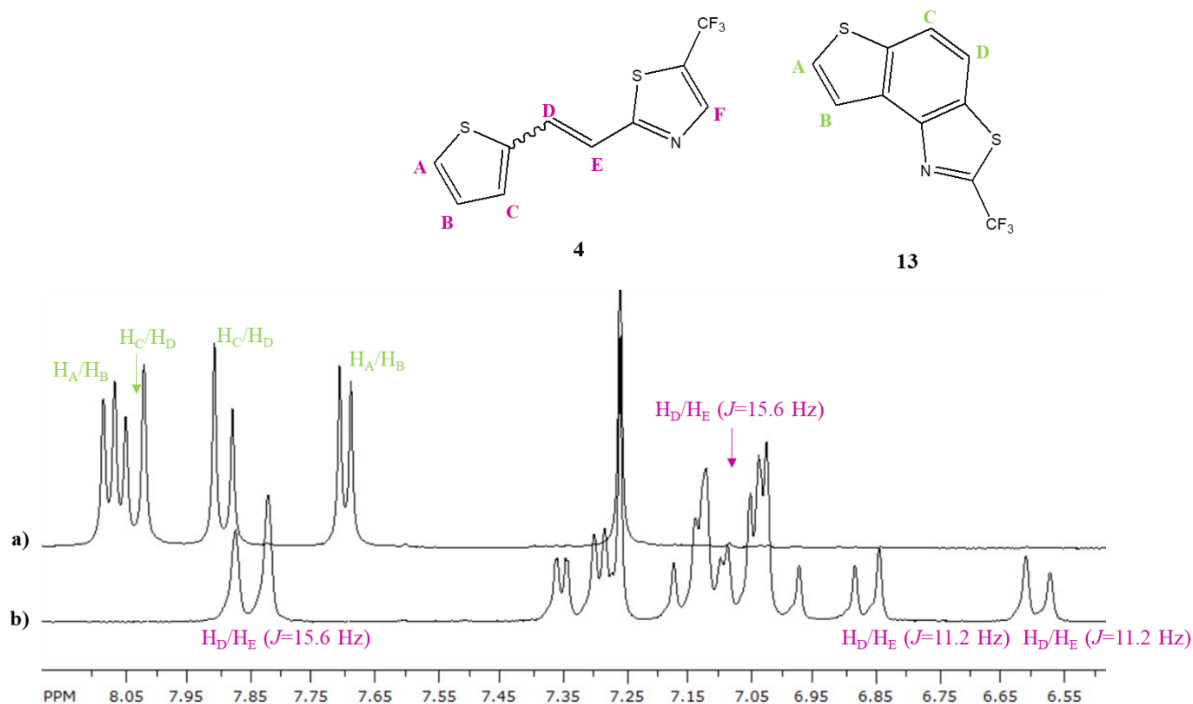


Slika 5: Maseni spektar smjese izomera derivata 1,3-tiazolo-tienostilbena **2**.

### 3.4.2. Potvrda struktura elektrociklizijskih fotoprodukata 1,3-tiazolo-tienostilbena

Strukture dobivenih fotoprodukata 1,3-tiazolo-tienostilbena **10-16** potvrđene su spektroskopskim metodama, a spojevi koji su dobiveni čisti poslani su na ispitivanje biološke aktivnosti. Potvrda uspješne elektrociklizijske reakcije je nestanak dubleta dvostruke veze u <sup>1</sup>H NMR spektrima, koji su odgovarali početnim reaktantima 1,3-tiazolo-tienostilbenima **1-4** i **6-9**. Za nove elektrociklizijske derivate **10-14** snimljeni su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri. Dobiveni fotoprodutki **15** i **16** nisu nastali u dovoljnim količinama niti su izolirani u čistom obliku da bi se mogli uspješno spektroskopski okarakterizirati, ali na snimljenim <sup>1</sup>H NMR spektrima može se vidjeti kako dolazi do nestanka signala za protone dvostruke veze i do nastanka elektrociklizijskog produkta.

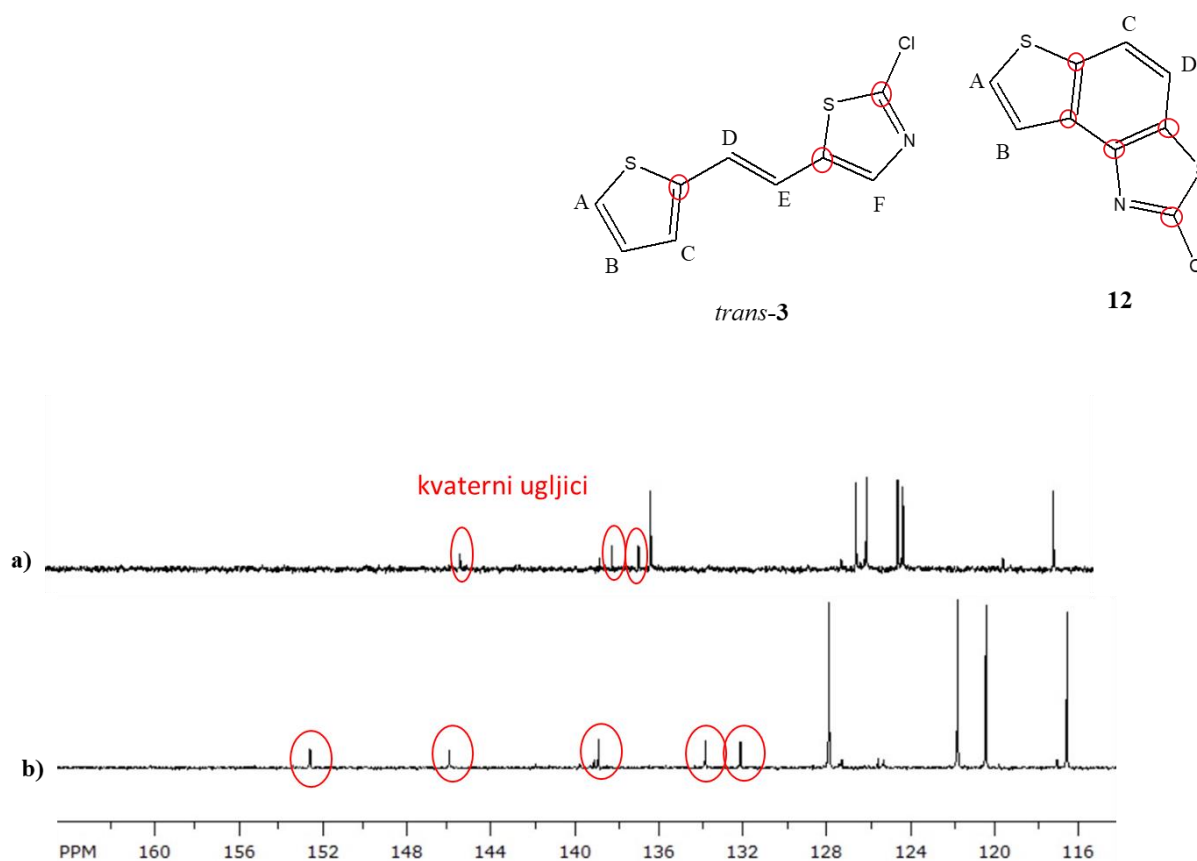




Slika 6: <sup>1</sup>H NMR spektri i strukture tienobenzotiazola **13** (a) i smjese izomera 1,3-tiazolo-tienostilbena **4** (b).

Na slici 6 prikazani su <sup>1</sup>H NMR spektri smjese *cis*- i *trans*-izomera trifluormetilnog derivata 1,3-tiazolo-tienostilbena **4** i njegovog fotoproducta **13**. Spektar b) prikazuje smjesu izomera tiazolo-tienostilbena **4** gdje se mogu vidjeti karakteristični signali za protone dvostruke veze. Signali su dubleti i imaju karakteristične konstante sprege,  $J = 15,6$  Hz za *trans*-izomer i  $J = 11,2$  Hz za *cis*-izomer. Spektar a) je spektar fotoproducta 1,3-tiazolo-tienostilbena **13** na kojemu se vidi kako dolazi do gubitka signala za protone dvostruke veze, te je to potvrda da je fotokemijska reakcija uspješno provedena i da je došlo do zatvaranja prstena. Na spektru a) zbog zatvaranja prstena više nema ni signala za treći proton tiofenske jezgre, kao ni signala protona tiazolne jezgre. Signali aromatskih protona H<sub>C</sub> i H<sub>D</sub> novonastale benzenske jezgre na spektru a) nalaze se na 8,04 i 7,90 ppm i imaju jednaku konstantu sprege koja iznosi  $J = 8,6$  Hz. Kod ostalih derivata konstante sprege za protone H<sub>C</sub> i H<sub>D</sub> se nalaze u rasponu  $J = 8-9$  Hz. Na spektru a) vide se i protoni tiofenske jezgre H<sub>A</sub> i H<sub>B</sub> koji se nalaze na 8,08 i 7,69 ppm. Ovi signali su dubleti i međusobno se sprežu s jednakom konstantom sprege od  $J = 5,5$  Hz. Kod ostalih derivata signali za protone tiofenske jezgre nalaze se na sličnim kemijskim pomacima, u području između 8,08 i 7,44 ppm. Osim navedenih signala u području aromatskih protona, u alifatskom području nalaze se i ostali signali, ovisno o supstituentu na fotoproductima.

Na slici 7 paralelno su prikazani  $^{13}\text{C}$  NMR spektri *trans*-izomera 1,3-tiazolo-tienostilbena **3** i elektrociklizacijskog fotoprodukta **12** nastalog iz smjese *cis*- i *trans*-izomera istog klorovog derivata **3**. Na spektru a) koji prikazuje *trans*-**3** spoj mogu se vidjeti tri signala niskog intenziteta koja odgovaraju kvaternim ugljicima, odnosno onim ugljicima koji na sebi nemaju vezane protone. Na spektru a) vide se i signali većeg intenziteta koji označavaju ugljike tiofenske i tiazole jezgre te ugljike dvostruke veze i oni su zapravo dubleti, jer imaju za sebe vezan jedan proton. Nasuprot tomu, na spektru b) koji pokazuje elektrociklizacijski produkt **12** nalaze se pet signala niskog intenziteta koji označavaju pet kvaternih ugljika. Tih pet signala karakteristični su za tienobenzotiazolnu jezgru, što je dodatna potvrda da je fotokemijska reakcija uspješno provedena.

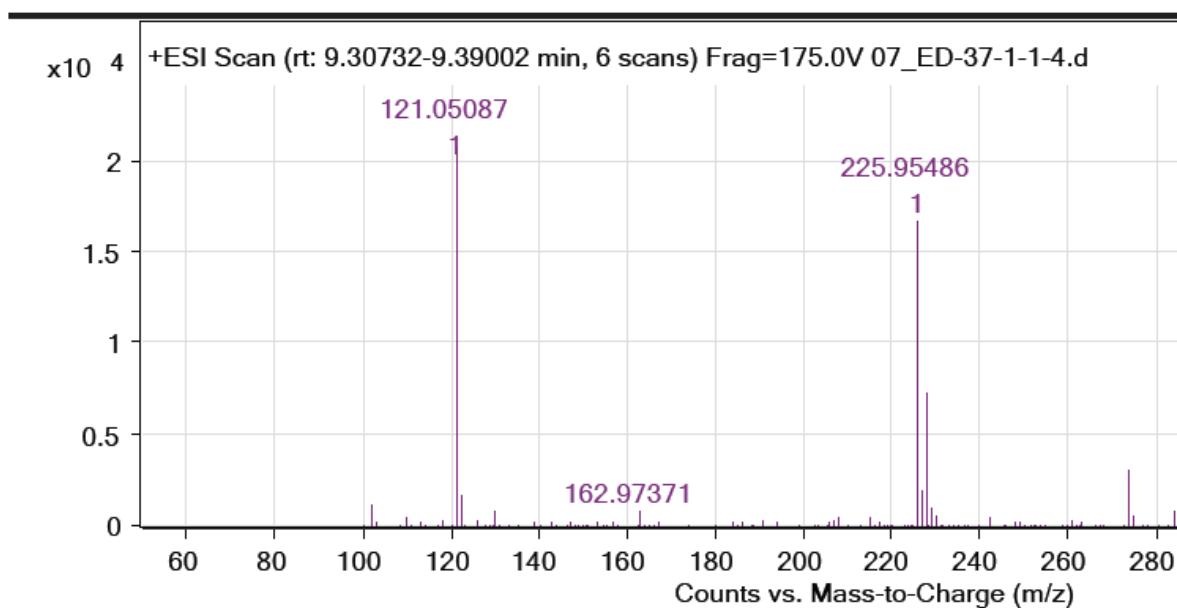


Slika 7: Prikaz  $^{13}\text{C}$  NMR spektara klorovog derivata Wittigovog produkta *trans*-**3** i fotoprodukta od smjese izomera istog klorovog derivata **12**.

Kod ostalih derivata **10**, **11**, **12** i **14**, signali za ugljike tienobenzotiazolne jezgre nalaze se u području između 176,7 i 116,5 ppm. Kod amidnog derivata tienobenzotiazola **14** nije jasno vidljiv signal za ugljik amidne skupine, koji bi se trebao nalaziti u području 170-220 ppm. Isto

tako, kod trifluormetilnog derivata **13** izostaju signali za kvaterne ugljike. Signali za ugljike supstituenata pojedinih derivata nalaze se u području od 8 do 60 ppm.

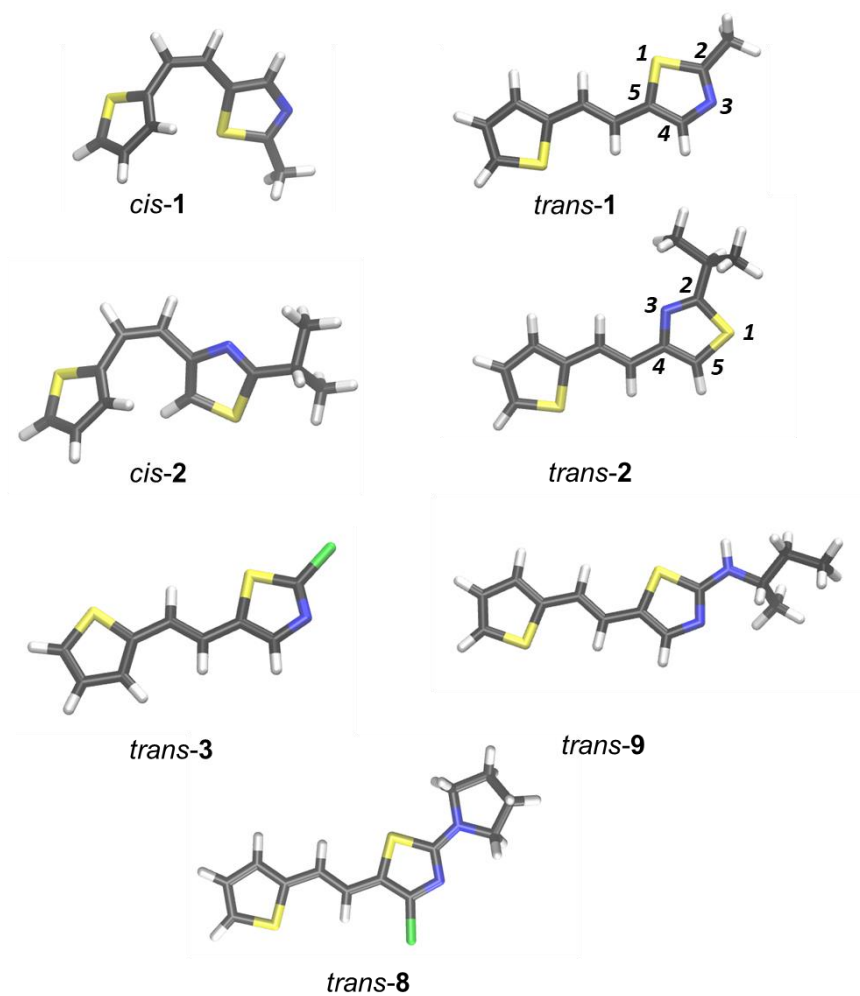
Za sve čiste izolirane elektrociklizijske fotoproducte **10-14** provedena je HRMS analiza i snimljeni su maseni spektri. Na slici 8 prikazan je maseni spektar spoja **12**. Na spektru se može vidjeti pik molekuskog iona koji je ujedno i masa spoja **12** i iznosi 225,95.



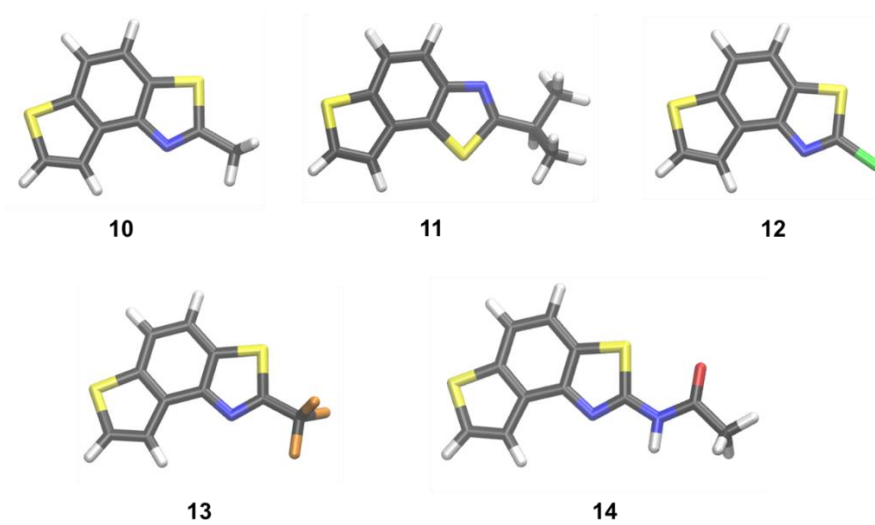
Slika 8: Prikaz masenog spektra klorovog derivata tienobenzotiazola **12**.

### 3.5. RAČUNALNO ISTRAŽIVANJE ELEKTRONSKIH STRUKTURA NOVIH TIAZOLO-TIENOSTILBENA I TIENOBENZO-TIAZOLA

Računalna kemija korištena je za ispitivanje stabilnosti konformacija pripremljenih derivata tiazola, koji su čisti izolirani. Konformacije izoliranih *cis*- i *trans*- izomera tiazolo-tienostilbena (*cis*-1, *cis*-2, *trans*: **1**, **2**, **3**, **8** i **9**) i tienobenzotiazola **10-14** proučavane su modelom M06-2X/6-31G(d). Optimizirane geometrije najstabilnijih konformera prikazane su na slikama 9 i 10.



Slika 9: Najstabilnije konformacije izoliranih *cis*- i *trans*- izomera tiazolo-tienostilbena, optimiranima M062X/6-31G(d) razinom teorije.



Slika 10: Prikaz geometrija izoliranih tienobenzotiazola **10-14**, optimiranima M062X/6-31G(d) razinom teorije.

Svi ispitivani 1,3-tiazolo-tienostilbeni imaju zajednički osnovni dio molekule koji se sastoji od tiazolnog prstena, središnjeg etilenskog dijela i tiofenskog prstena. Spoj **2** ima zamijenjen položaj sumporovog i dušikovog atoma u tiazolnom prstenu u odnosu na spojeve **1, 3, 8 i 9**, odnosno spoj **2** je supstituiran s 2-tiofen-2-il-vinilom u položaju 4 tiazolnog prstena, dok spojevi **1, 3, 8 i 9** imaju 2-tiofen-2-il-vinilnu skupinu u položaju 5 tiazolnog prstena (slika 10). Od svih *trans*- izomera tiazolo-tienostilbena, najstabilnija konformacija je ona gdje su sve tri podjedinice (tiazolni prsten, etilenski dio i tiofenski prsten) spojeva koplanarne, što omogućuje učinkovitu konjugaciju  $\pi$  elektrona. Za razliku od *trans*- izomera, struktura *cis*- izomera nije planarna zbog steričkih odbijanja uzrokovanih blizinom tiofenskog i tiazolnog prstena. Kod najstabilnijeg *cis*-**1** konformera, gdje je jedan od vodika tiofenskog prstena orijentiran prema atomu sumpora iz tiazolnog prstena, također nije ostvarena planarnost zbog vodikove veze koja nije dovoljno jaka da nadvlada sterička odbijanja.

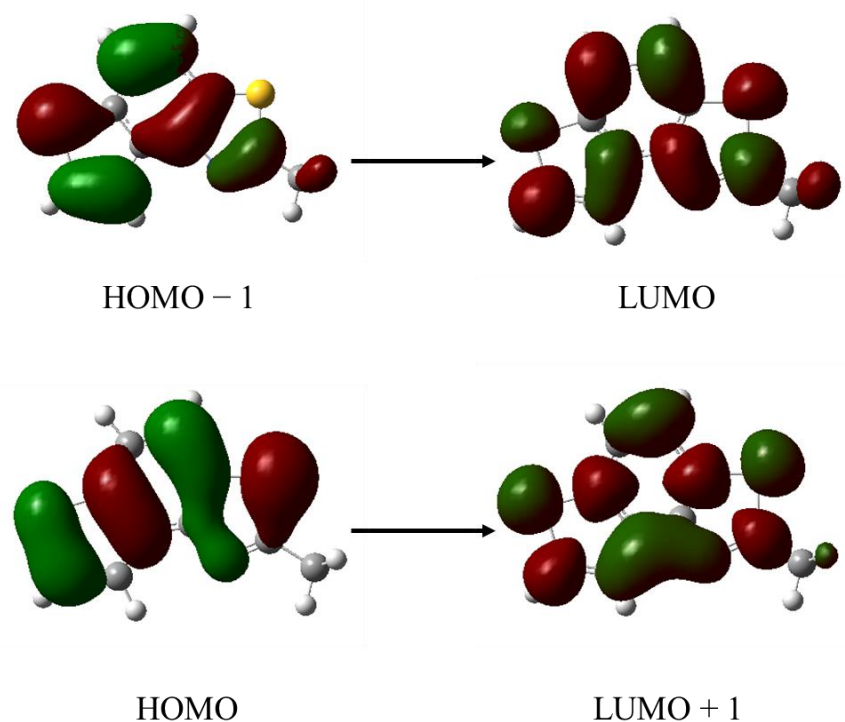
Optimizirane geometrije uspješno pripremljenih i izoliranih elektrociklizijskih fotoprodukata **10-14** prikazane su na slici 10. Orijentacija tiazolne podjedinice u spoju **11** je različita od ostalih izoliranih tienobenzo-tiazola **10 i 12-14** zbog različitog položaja 2-tiofen-2-il-vinilne skupine u početnom stilbenu **2**. Strukture dobivenih spojeva **10-14** korištene su za računalno izračunavanje UV-Vis spektara. UV-Vis spektri sintetiziranih i izoliranih spojeva snimani su u otapalu acetonitrilu. Kako bi se utvrdilo koje orbitale sudjeluju u prijelazima koji se javljaju u snimljenim spektrima, napravljeni su računi temeljeni na vremenski ovisnoj teoriji funkcionala gustoće, TD-DFT (eng. *Time-dependent Density Functional Theory*) mjerenja. Računi su izvedeni za molekule čiji su UV- spektri prikazani na slici 2 (*trans*: **2, 3, 8, 1**; *cis*-**1; 10**) i ostale elektrociklizijske produkte **11-14**. Vremenski ovisna perturbacijska jednadžba, temeljena na Runge-Gross teoremu<sup>84</sup>, riješena je za 20 pobuđenih singletnih stanja za svaku od ispitivanih molekula, koristeći implicitni CPCM model (eng. *Conductor-like polarisable continuum model*) za opis otapala acetonitrila. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 1.

Tablica 1: Eksperimentalne i računске vrijednosti maksimuma valnih duljina 1,3-tiazolo-tienostilbena *trans*: **2**, **3**, **8**, **1** i *cis*-**1** te tienobenzotiazola **10-14**, uz naznačeni glavni asignirani prijelaz. H označava najvišu okupiranu (HOMO), a L najnižu neokupiranu molekulsku orbitalu (LUMO).

| Spoj                    | $\lambda_{\max}/\text{nm}$<br>(eksperimentalni) | $\lambda_{\max}/\text{nm}$ (računski) | Asignirani prijelaz    |
|-------------------------|---|---------------------------------------|------------------------|
| <i>cis</i> - <b>1</b>   | 315   | 323                                   | H→L                    |
| <i>trans</i> - <b>1</b> | 320   | 349                                   | H→L                    |
| <i>trans</i> - <b>2</b> | 318   | 328                                   | H→L                    |
| <i>trans</i> - <b>3</b> | 342   | 357                                   | H→L                    |
| <i>trans</i> - <b>8</b> | 373   | 384                                   | H→L                    |
| <b>10</b>               | 249   | 245                                   | H - 1→L<br>H→L + 1     |
| <b>11</b>               | 251   | 242                                   | H - 1→L<br>H - 1→L + 1 |
| <b>12</b>               | 214   | 203                                   | H - 1→L + 4            |
| <b>13</b>               | 213   | 204                                   | H - 1→L + 3            |
| <b>14</b>               | 221   | 211                                   | H - 1→L + 2            |

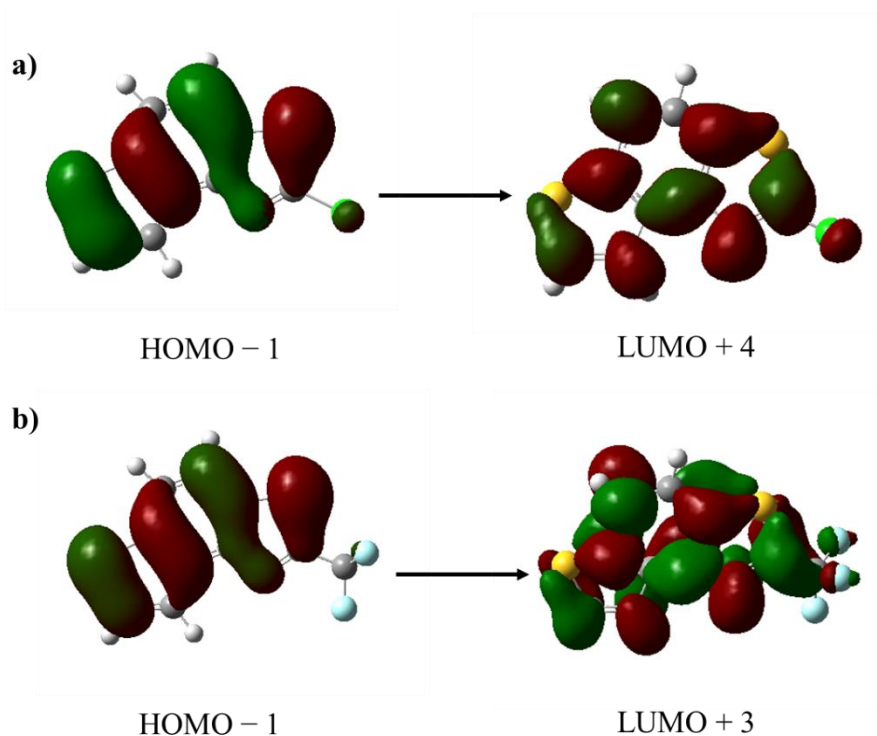
Generirani su prikazi svih molekulskih orbitala kod kojih se javlja prijelaz elektrona zbog pobuđivanja zračenjem. Prijelaz između najviše okupirane molekulske orbitale (HOMO) i najniže neokupirane molekulske orbitale (LUMO) je prijelaz od najvećeg značaja, i taj prijelaz je odgovoran za maksimume apsorpcije u spektrima 1,3-tiazolo-tienostilbena. Prema podacima iz tablice 1, kod 1,3-tiazolo-tienostilbena izračunati prijelazi imaju veće maksimume valnih duljina  $\lambda_{\max}$  za 8 do 15 nm, uz nešto veće odstupanje od 29 nm kod *trans*-**1** spoja. Kod derivata tienobenzotiazola **10-14**, razlika u izračunatim i eksperimentalno dobivenim rezultatima je minimalna, odnosno vrijednosti  $\lambda_{\max}$  za računске prijelaze je veća za oko 10 nm. S obzirom na to da je smjer odstupanja dosljedan, može se zaključiti da su računski dobiveni rezultati pouzdani. Kod tienobenzotiazola **10** i **11** postoje više pikova koji odgovaraju nekoliko vrsta elektronskih prijelaza, dok se kod ostalih spojeva javlja isključivo jedan elektronski prijelaz s maksimalnim doprinosom. Kod spoja **10** najznačajniji prijelaz je prijelaz iz HOMO u LUMO + 1 orbitalu, s doprinosom maksimumu apsorpcije od 73 %, a drugi prijelaz s doprinosom od

27 % je prijelaz između HOMO – 1 i LUMO orbitale. Slika 11 prikazuje orbitale koje sudjeluju u prijelazima u izračunatim spektrima spoja **10**.



Slika 11: Prikaz orbitala koje sudjeluju u najznačajnijim elektronskim prijelazima u spektru spoja **10**.

Spoj **11** također ima više elektronskih prijelaza, od kojih su najznačajniji prijelazi s doprinosima od 33 i 49 %. Kod spoja **11** postoje još i dva prijelaza, koja nisu navedena u tablici 1, iz HOMO u LUMO i iz HOMO u LUMO + 1, s doprinosima od 10 i 8 %. Kod spoja **12** i **13**, prijelaz koji je u najvećoj mjeri odgovoran za položaj maksimuma apsorpcije uključuje virtualne orbitale visoke energije, LUMO + 4 i LUMO + 3, i prikazan je na slici 12. Kod spektra spoja **14**, glavni prijelaz odgovoran za maksimum apsorpcije pokazuje da je amidna skupina na tiazolnom prstenu uključena u prijelaz.



Slika 12: Prikaz orbitala koje sudjeluju u najznačajnijim elektronskim prijelazima u spektru spoja **12** a) i spoja **13** b).

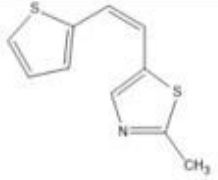
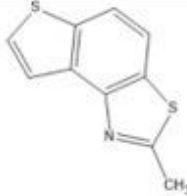
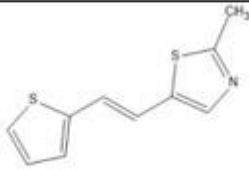
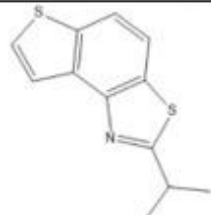
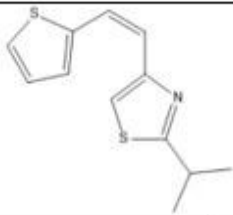
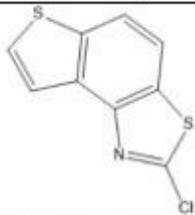
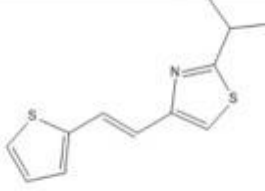
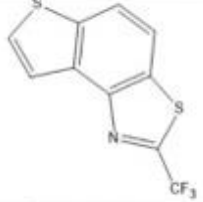
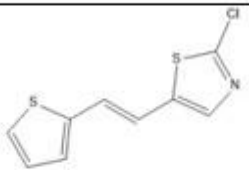
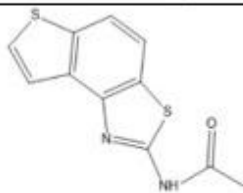
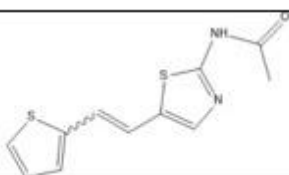
### 3.6. INHIBICIJSKA AKTIVNOST 1,3-TIAZOLO-TIENOSTILBENA I TIENOBENZO-TIAZOLA PREMA KOLINESTERAZAMA

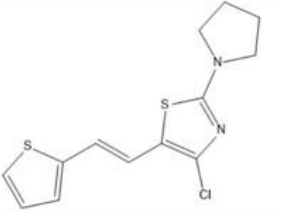
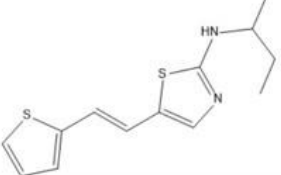
Svi ranije opisani čisti produkti, koji su sintetizirani u dovoljnim količinama, istraživani su u svrhu njihove inhibicijske aktivnosti prema enzimima kolinesterazama, acetilkolinesterazi i butirilkolinesterazi. Ispitivanje inhibicijske aktivnosti provelo se prema Ellmanovoj metodi.<sup>85</sup> Ispitivani spojevi podijeljeni su u dvije skupine, tiazolo-tienostilbeni i njihovi fotoprodukti, tienobenzo-tiazoli. Prilikom određivanja povezanosti između strukture i aktivnosti ključni parametri su vrsta heterocikličkog prstena, geometrija molekule i, gdje je to moguće, vrsta i položaj supstituenta.

Ispitivani spojevi pokazali su inhibicijsku aktivnost samo prema butirilkolinesterazi (BChE). Svi dobiveni rezultati prikazani su u tablici 2.



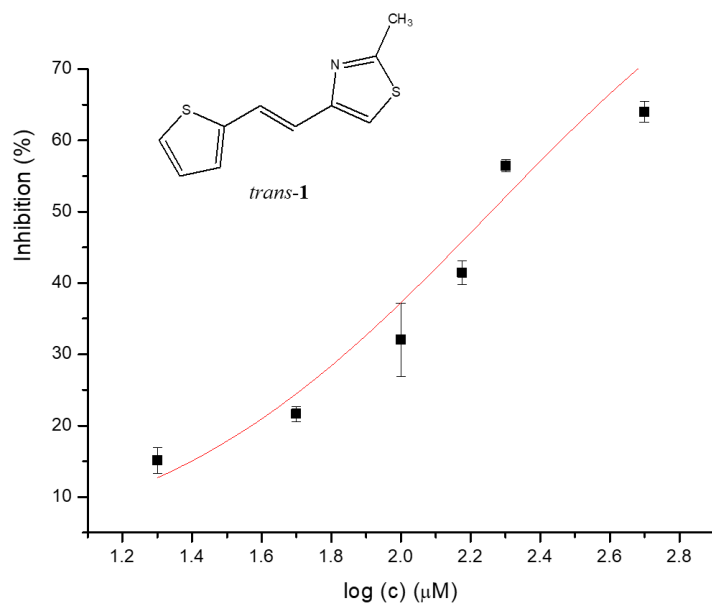
Tablica 2: Izračunate IC<sub>50</sub> vrijednosti i postotci inhibicije za nove derivate 1,3-tiazolo-tienostilbena i njihovih fotoprodukata.

| Spoj            | Struktura   | IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M)<br>BChE | Inhibicija<br>(%) | Spoj              | Struktura  | IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M)<br>BChE | Inhibicija<br>(%) |
|-----------------|---|--|-------------------|-------------------|--|--|-------------------|
| <i>cis</i> -1   |    | -                                      | 364 (500)         | <b>10</b>         |    | 107,3                                  | 79,1 (500)        |
| <i>trans</i> -1 |    | 181,4                                  | 64,0 (500)        | <b>11</b>         |    | -                                      | 46,8 (200)        |
| <i>cis</i> -2   |   | -                                      | 45,5 (250)        | <b>12</b>         |   | 51,1                                   | 75,4 (250)        |
| <i>trans</i> -2 |  | -                                      | 45,8 (250)        | <b>13</b>         |  | 41,9                                   | 70,8 (200)        |
| <i>trans</i> -3 |  | -                                      | 10,0 (250)        | <b>14</b>         |  | -                                      | 24,9 (250)        |
| <b>6</b>        |  | -                                      | 30,6 (250)        | <b>Huperzin A</b> |  | 53,4                                   |                   |

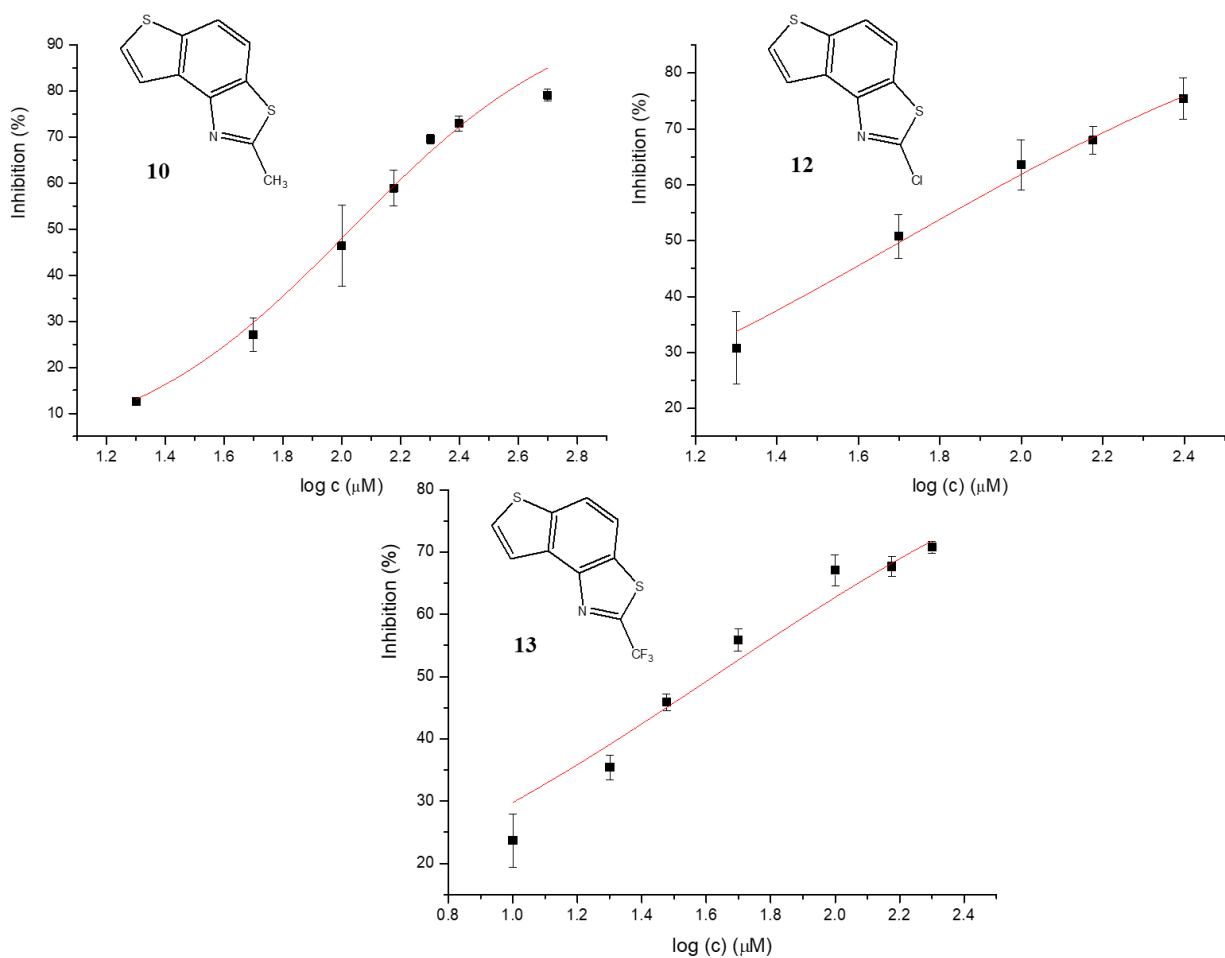
|                            |   |    |            |
|----------------------------|---|----|------------|
| <i>trans</i> -<br><b>8</b> |  | -* | 25,3 (100) |
| <i>trans</i> -<br><b>9</b> |  | -* | 47,7 (100) |

Među stilbenskim derivatima, najbolju inhibicijsku aktivnost pokazao je *trans*-izomer metilnog derivata *trans*-**1** (Tablica 2, slika 13). Usporedba aktivnosti novih stilbenskih derivata s prethodno ispitivanim tienostilbenima<sup>86</sup>, pokazuje kako zamjenom tiofenske s tiazolnom jezgrom dolazi do potpunog gubitka inhibicijske aktivnosti prema acetilkolinesterazi (AChE), te do samo neznatnog povećanja aktivnosti prema BChE. Zamjenom metilne skupine iz *trans*-**1** spoja s izopropilnom skupinom u *trans*-**2** spoju, uz zamjenu položaja dušika i sumpora, dolazi do smanjenja inhibicijske aktivnosti. Već je ranije dokazano da zamjenom geometrije spojeva također dolazi do smanjenja aktivnosti<sup>87</sup>, pa tako i u ovom slučaju ispitivani *cis*-**1** izomer ne pokazuje inhibicijsku aktivnost u odnosu na *trans*-**1** izomer istog metilnog derivata. Ostali tiazolo-tienostilbensi derivati, *cis*-**1**, *trans*-**3** i **6**, pokazali su se kao neučinkoviti inhibitori kolinesteraza. Zbog obojanosti spojeva (\*, tablica 2), za spojeve *trans*-**8** i *trans*-**9** nije bilo moguće provesti mjerenja pri većim koncentracijama.

Kod elektrociklizacijskih produkata, metilni derivat **10**, klorov derivat **12** i trifluormetilni derivat tienobenzo-tiazola **13** ostvarili su IC<sub>50</sub> vrijednosti (Tablica 2, slika 14). Spojevi **12** i **13** posjeduju vrlo dobru inhibicijsku aktivnost s IC<sub>50</sub> vrijednošću u rangu IC<sub>50</sub> vrijednosti poznatog inhibitora kolinesteraza, huperzina A (IC<sub>50</sub> = 53,6 μM). Spoj **10** pokazuje duplo manju aktivnost u odnosu na spojeve **12** i **13**. Na primjeru 1,3-tiazolo-tienostilbena *trans*-**3** i njegovog elektrociklizacijskog produkta **12**, vidi se kako spojevi s planarnom geometrijom, nalik naftalenu, pokazuju puno veću aktivnost nego stilbensi derivati. Usporedbom tiofenskih tiazola opisanih u ovom radu s prethodno istraživanim tiofenskim triazolima, može se vidjeti kako su elektrociklički tiofenski triazoli puno učinkovitiji inhibitori kolinesteraza. Iz navedenog, može se zaključiti kako vrsta heterocikličkog prstena ima veliku ulogu u inhibicijskoj aktivnosti spojeva.



Slika 13: Krivulja inhibicije BChE u ovisnosti o koncentraciji za spoj *trans*-1.



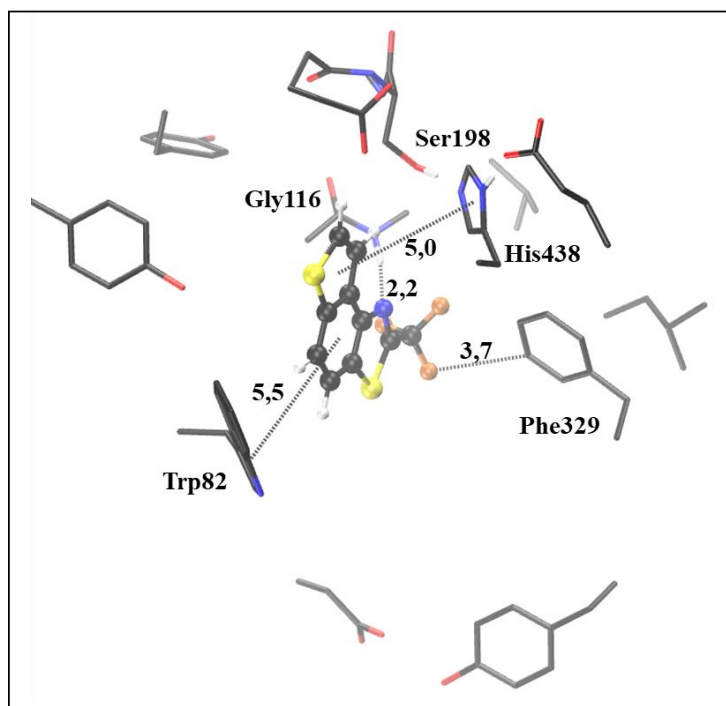
Slika 14: Krivulja inhibicije BChE u ovisnosti o koncentraciji za spojeve 10, 12 i 13.

Istraživanja dobivenih produkata s obzirom na njihovu inhibicijsku aktivnost pokazala su da su spojevi neaktivni prema AChE, a inhibicijska aktivnost prema BChE ovisi o supstituentu na tiazolnom prstenu. Najbolji rezultati postignuti su u istom rangu koncentracija.

### 3.7. MOLEKULSKI DOCKING

Iz dobivenih podataka o inhibicijskoj aktivnosti sintetiziranih spojeva, prikazanima u tablici 2, može se vidjeti kako nekoliko spojeva pokazuje snažan inhibicijski potencijal prema BChE. Za te spojeve proveo se molekularni docking, kako bi se identificirale stabilizirajuće interakcije između aktivnog mjesta u enzimu i ispitivanih molekula. Molekularni docking proveo se upotrebom AutoDock programa. Očekuje se da će se javiti reverzibilna inhibicija za koju je karakteristična brza disocijacija enzim-inhibitor kompleksa, odnosno inhibicija koja se zasniva na stvaranju nekovalentnih veza između aktivnog mjesta enzima i inhibitora. Kako bi se ispitali rezultati predloženi molekularnim dockingom, provele su se dodatne geometrijske optimizacije aktivnog mjesta i inhibitora koristeći kvantno-mehanički klaster-kontinuum pristup. Za svaki ispitivani sustav, izabrana se struktura s najnižom procijenjenom slobodnom energijom vezanja dobivena molekularnim dockingom. Tijekom optimizacije,  $\alpha$ -ugljikovi atomi u aktivnom mjestu ostali su nepomični, što je omogućilo očuvanje koncepcije aktivnog mjesta. Strukture su optimizirane M06-2X/6-31G(d) razinom teorije, uz dielektričnu konstantu  $\epsilon=4$ . Minimumi plohe potencijalne energije za sve strukture dobiveni su vibracijskom analizom. Kristalna struktura enzima BChE naziva 7AIY.pdb preuzeta je iz proteinske baze podataka (eng. Protein Data Bank).

Među tienbenzo-tiazolima, spoj **13** pokazuje najbolju inhibicijsku aktivnost prema BChE. Optimizirana struktura kompleksa aktivnog mjesta enzima i molekule **13** prikazana je na slici 15.



Slika 15: Prikaz rezultata molekuskog dockinga spoja **13** u aktivno mjesto enzima BChE.

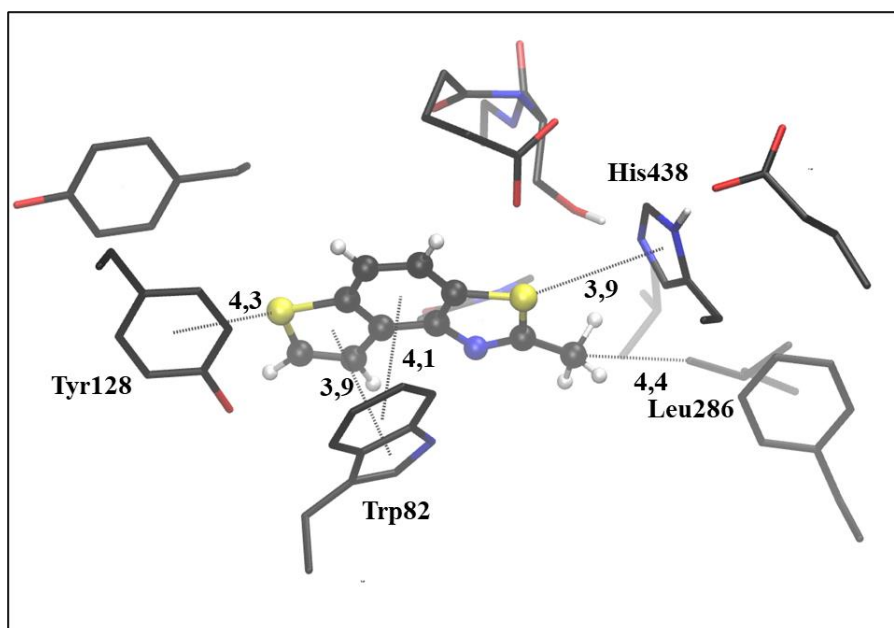
Udaljenosti su izražene u mjernoj jedinici angström, Å ( $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ , odnosno 100 pm).

Zbog jasnijeg prikaza, vodikovi atomi aminokiselinskih ostataka su skriveni.

Esterski dio, odnosno katalitička trijada koju čine aminokiseline Ser198, Glu325 i His438, je najznačajniji dio aktivnog mjesta enzima i izravno je uključen u katalizu. Aktivno mjesto se sastoji i od: anionske podjedinice, odnosno domene gdje se veže kolin, koju čine aminokiseline Trp82, Phe329 i Glu197, acilnog džepa (Leu286 i Val288), perifernog anionskog mjesta (Tyr128, Tyr114, Tyr332 i Asp70) te oksianionske šupljine (Gly116, Gly117 i Ala199). Kompleks tienobenzotiazola **13** i aktivnog mjesta BChE stabiliziran je uz pomoć nekoliko interakcija koja omogućuju da njegov položaj blokira esterski dio aktivnog mjesta enzima. Na taj način sprječava se vezanje supstrata na aktivno mjesto enzima. Prisutnost trifluorometilne skupine, omogućava da spoj **13** stvara hidrofobne interakcije s Phe329. Nadalje, s obzirom na sposobnost fluora da sudjeluje u polarnim interakcijama i orijentaciju trifluorometilne skupine (slika 15), stvara se vodikova veza između drugog fluorovog atoma  $-\text{CF}_3$  skupine i vodikovog atoma peptidne veze između aminokiselina Gly116 i Gly117. Zbog ovakve orijentacije liganda javlja se i  $\pi$ - $\pi$  slaganje (eng.  $\pi$ - $\pi$  stacking) između tiofena i His438 (5,0 Å) te između fenilnog prstena i aminokiseline Trp82 (5,5 Å) na anionskoj podjedinici aktivnog mjesta enzima.

Na slici 16 prikazan je rezultat molekuskog dockinga spoja tienobenzotiazola **10** u aktivno mjesto enzima BChE. Na slici se može vidjeti nekoliko stabilizirajućih interakcija. Prisutno je

$\pi$ - $\pi$  slaganje između tiofenskog prstena i aminokiseline Trp82 anionske podjedinice aktivnog mjesta enzima (3,9 Å). Nadalje, prisutno je i  $\pi$ - $\pi$  slaganje između iste aminokiseline Trp82 i benzenskog prstena unutar tienobenzotiazola (4,1 Å). Javljuju se i hidrofobne interakcije između atoma sumpora na tiofenskom prstenu i aminokiseline na perifernom anionskom mjestu, Tyr128, na udaljenosti od 4,3 Å te između atoma sumpora na tiazolnom prstenu i His438 na udaljenosti od 3,9 Å. Na slici se uočava i hidrofobna interakcija između metilne skupine spoja **10** i aminokiseline Leu286 koja se nalazi na acilnom džepu aktivnog mjesta enzima.



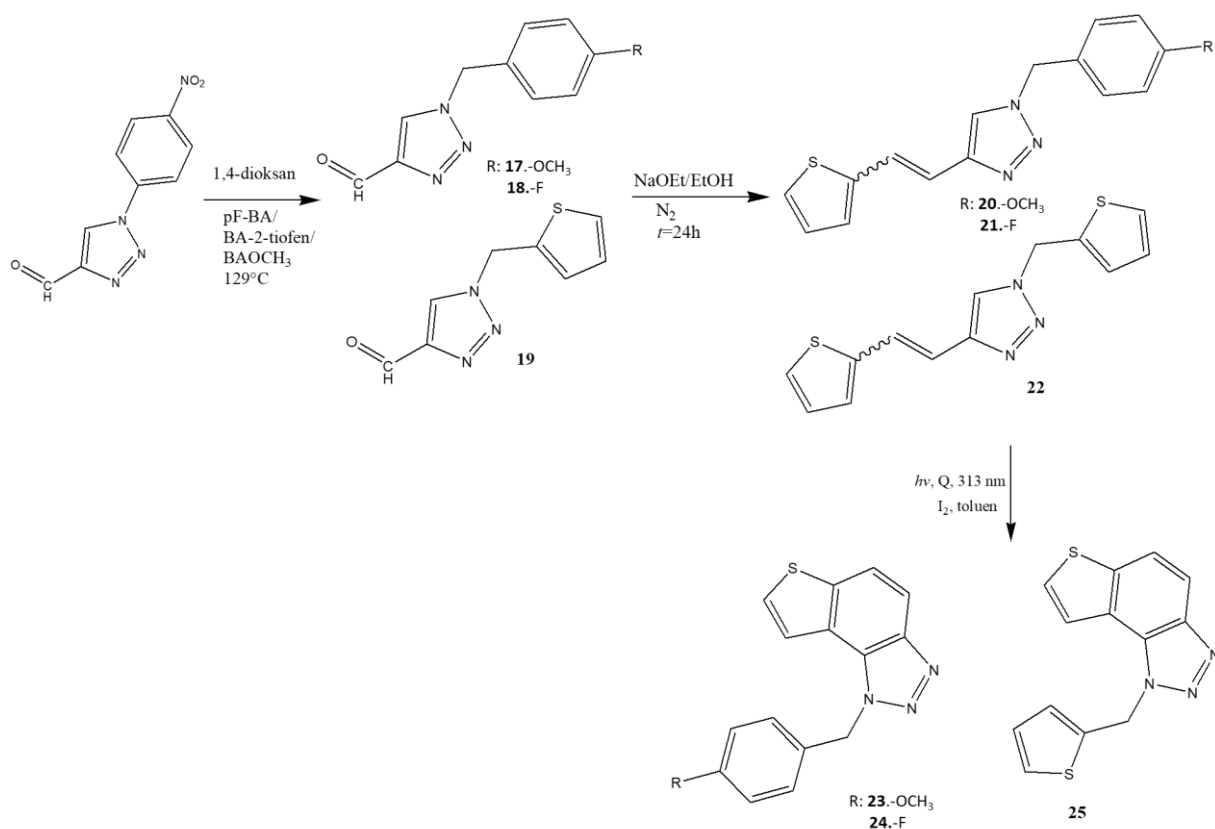
Slika 16: Prikaz rezultata molekularskog dockinga spoja **10** u aktivno mjesto enzima BChE. Udaljenosti su izražene u mjernoj jedinici angström, Å. Zbog jasnijeg prikaza, vodikovi atomi aminokiselinskih ostataka su skriveni.

### 3.8. SINTEZA I KARAKTERIZACIJA NOVIH DERIVATA 1,2,3-TRIAZOLO-TIENOSTILBENA I NJIHOVIH FOTOPRODUKATA

#### 3.8.1. Sinteza i fotokemija novih derivata 1,2,3-triazolo-tienostilbena

Sinteza novih fotoprodukata 1,2,3-triazolo-tienostilbena **23-25** provedena je u tri koraka (Shema 4). Prva reakcija koja se provodila je reakcija supstitucije gdje su sintetizirani početni 1,2,3-triazol-karbaldehidi **17-19**. Reakcija ide uz početni reaktant nitrobenzil-triazolni aldehyd, 1,4-dioksan kao otapalo i odgovarajući amin, ovisno o supstituentu koji se želi dobiti. Nastali

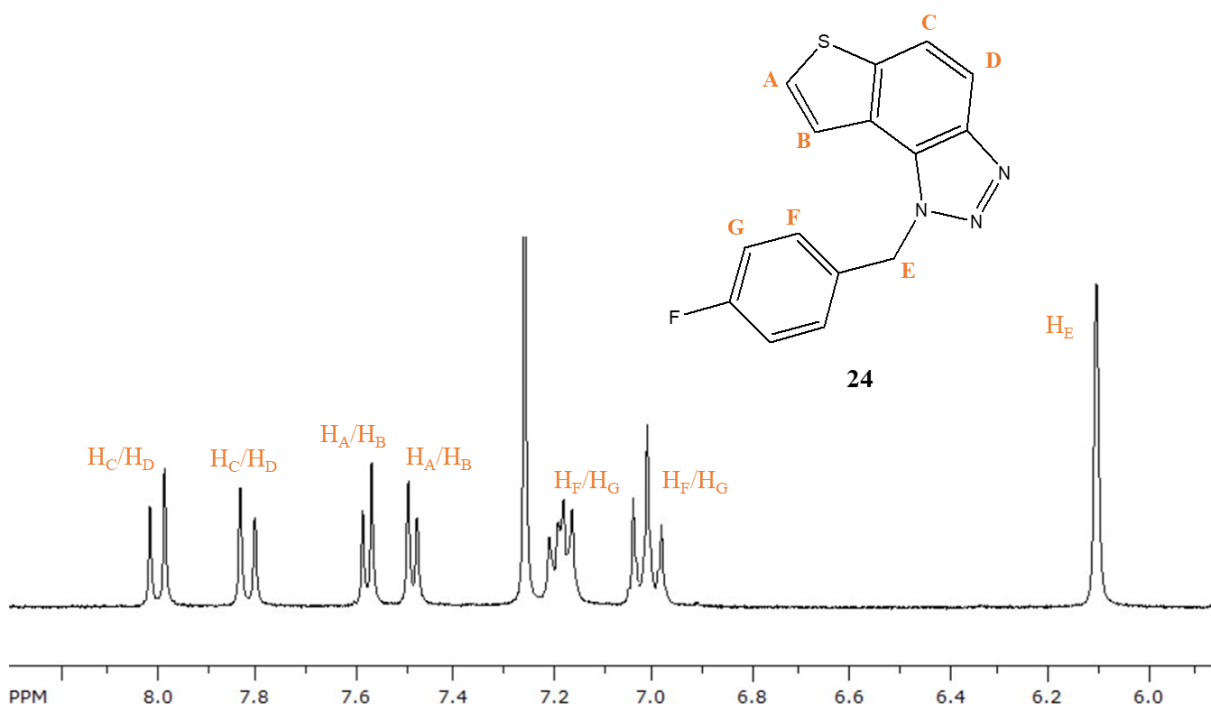
aldehydi dobiveni su u iskorištenjima od 53 do 86 %. Sljedeća reakcija koja se provodila na dobivenim aldehydima **17-19** je Wittigova reakcija čime su dobivene smjese *cis*- i *trans*-izomera **20-22**. Wittigove reakcija provodile su se 24 sata na sobnoj temperaturi u struji dušika, uz tiofensku fosfonijevu sol, apsolutni etanol kao otapalo i natrijev etoksid. Aldehydi **17-19**, kao i smjese izomera **20-22** nastale Wittigovom reakcijom pročišćene su kolonskom kromatografijom. Dobivene smjese izomera otopljene su u toluenu ( $\sim 2,5 \times 10^{-3}$  M) te su se osvijetljavale u fotokemijskom reaktoru s 10 UV lampi na 300 nm, uz dodatak katalitičke količine joda, čime su dobiveni produkti elektrociklizacijske reakcije **23-25**. Svi Wittigovi produkti pokazali su reaktivnost prilikom stvaranja fotoprodukata uz relativno kratko vrijeme osvijetljavanja (3h). Fotoprodukti su dobiveni u izoliranim iskorištenjima od 50 do 59 % te su pročišćeni kolonskom kromatografijom na silika-gelu.



Shema 4: Sinteza novih fotoprodukata 1,2,3-triazolo-tienostilbena nizom od tri reakcije: supstitucija, Wittigova reakcija i elektrociklizacija.

### 3.8.2. Identifikacija novih fotoprodukata 1,2,3-triazolo-tienostilbena

Čisti dobiveni produkti **17-19**, **20-22** i **23-25** okarakterizirani su spektroskopskim metodama. Za dobivene 1,2,3-triazol-karbaaldehide **17-19** snimljeni su  $^1\text{H}$  NMR spektri, dok je za Wittigove produkte **20-22** provedena samo HRMS analiza. Za fotoprodukte **23-25** snimljeni su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri, UV-spektri u acetonitrilu te je provedena HRMS analiza. Dokaz nastajanja novih produkata elektrociklizacijskih reakcija, tienobenzotriazola **23-25**, je nestanak signala za protone dvostruke veze iz  $^1\text{H}$  NMR spektara početnih tienostilbena. Novi derivati tienobenzotriazola **23-25** dobiveni su čisti i poslani su na ispitivanje biološke aktivnosti.



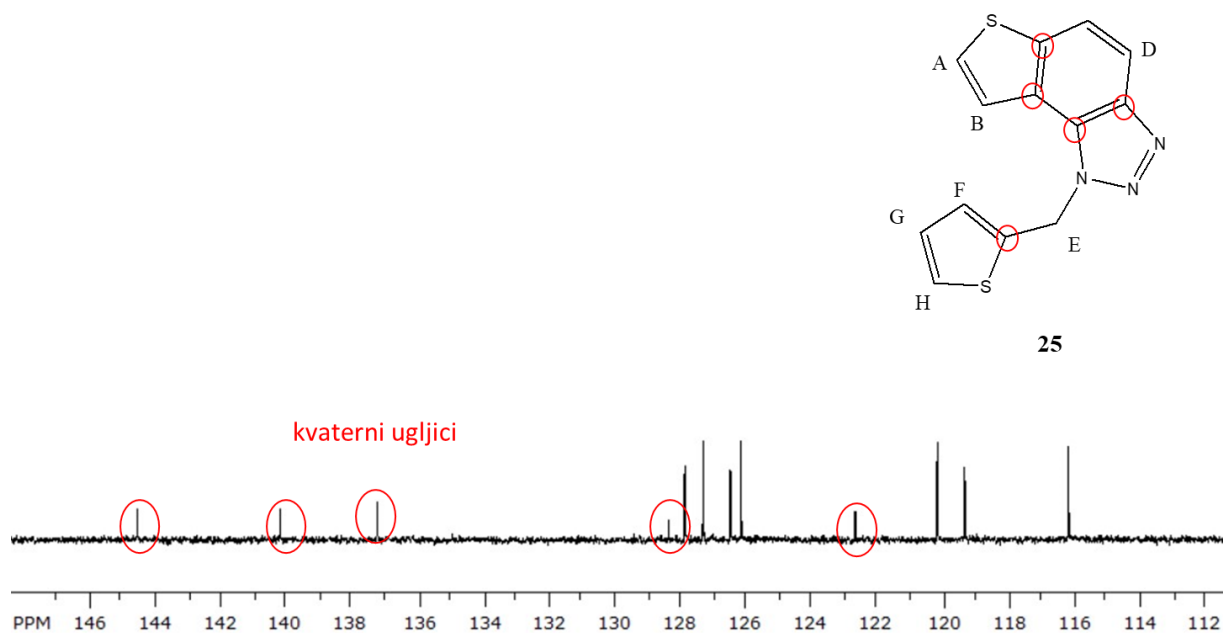
Slika 17:  $^1\text{H}$  NMR spektar novog derivata tienobenzotriazola **24**.

Slika 17 prikazuje  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **24**, elektrociklizacijskog fotoprodukta 1,2,3-triazolo-tienostilbena. Na spektru se vidi kako kod fotoprodukta izostaju dubleti s karakterističnim konstantama sprege ( $J=15-16$  Hz za *trans*-izomere i  $J=12-13$  Hz za *cis*-izomere) za protone dvostruke veze od početnih stilbena, što je dokaz da je došlo do zatvaranja šesteročlanog prstena, odnosno formiranja nove  $\sigma$  veze između krajeva konjugiranog  $\pi$  sustava. Signali za protone tioletnske jezgre  $\text{H}_\text{A}$  i  $\text{H}_\text{B}$  nalaze se na 7,58 i 7,49 ppm i to su dubleti s konstantom sprege od  $J=5.6$  Hz. Signali za dva protona  $\text{H}_\text{C}$  i  $\text{H}_\text{D}$  novonastalog prstena nalaze se na najvećim



kemijskim pomacima, 8,01 i 7,82 ppm, a isti trend pokazuju i ostali electrociklizijski produkti **23** i **25**. To su također dubleti koji imaju konstantu sprege  $J=8,8$  Hz. Signali za protone benzenskog prstena H<sub>F</sub> i H<sub>G</sub> su dubleti s integralom 2H koji se nalaze na 7,21-7,15 i 7,01 ppm. Signal za proton H<sub>E</sub> nalazi se na 6,10 ppm jer je vezan na ugljik koji je uz triazolni s jedne i benzenski prsten s druge strane, pa je signal pomaknut prema manje zasjenjenom području spektra. Signal za proton H<sub>E</sub> je singlet jer ne osjeća sprege s drugim protonima.

Slika 18 prikazuje <sup>13</sup>C NMR spektar electrociklizijskog fotoproducta **25**. Na spektru su istaknuta pet signala niskog intenziteta koja odgovaraju kvaternim ugljicima. Signali kvaternih ugljika su singleti, a karakteristični su za nove sintetizirane electrociklizijske produkte i dokaz su njihovog nastanka. Ostali signali većeg intenziteta nalaze se između 144,6 i 116,1 ppm i pripadaju ugljicima benzenske i dvije tiofenske jezgre. Signal na najnižim kemijskim pomacima (48,4 ppm) odgovara ugljiku C<sub>E</sub>.



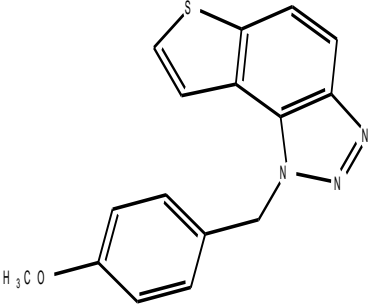
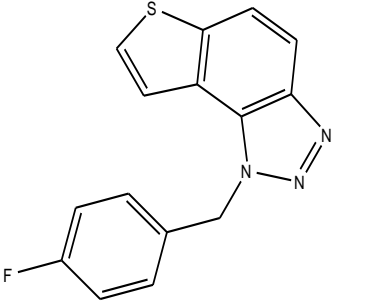
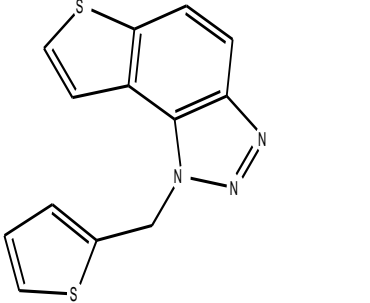
Slika 18: <sup>13</sup>C NMR spektar triazolnog electrociklizijskog fotoproducta **25** s istaknutim kvaternim ugljicima.

### 3.8.3. Ispitivanje aktivnosti novih derivata tienobenzotriazola **23-25** kao inhibitora kolinesteraza

S obzirom na to da su tienobenzotriazoli već prije pokazali dobru inhibicijsku aktivnost<sup>87</sup>, sintetizirani su novi derivati tienobenzotriazola **23-25** na kojima se ispitivala inhibicijska

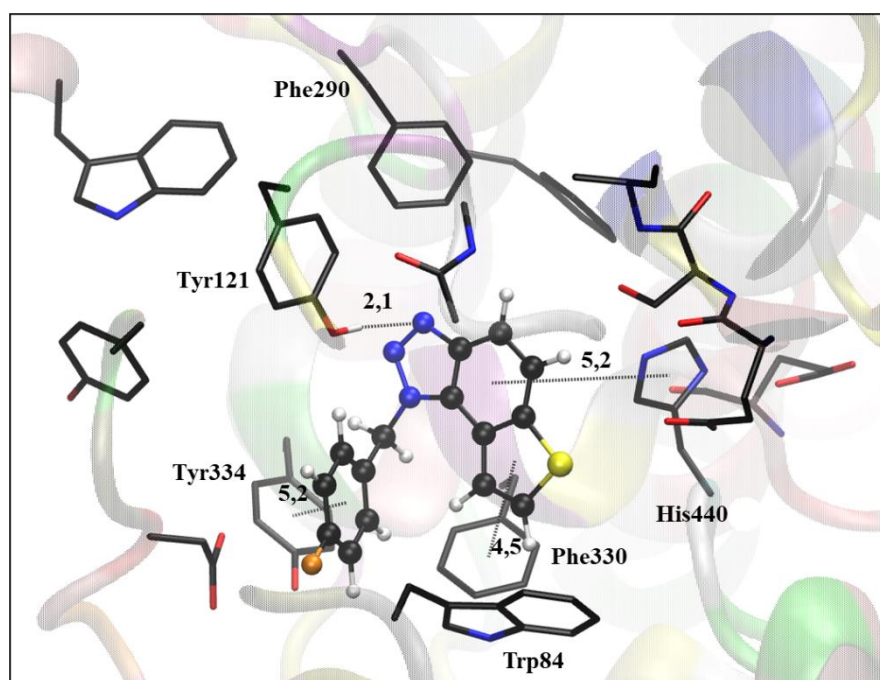
aktivnost prema acetilkolinesterazi i butirilkolinesterazi. Uvođenjem novih supstituenata na triazolnoj jezgri pokušalo se utvrditi javlja li se poboljšanje u biološkoj aktivnosti novih derivata te kakva je veza između strukture i biološke aktivnosti. Najbolju inhibicijsku aktivnost prema AChE i BChE među sintetiziranim tienobenzo-triazolima pokazuje spoj **24**, koji sadrži *p*-fluor-benzilni supstituent na triazolnom prstenu (Tablica 3). IC<sub>50</sub> vrijednosti za BChE od spojeva **23**, **24** i **25** su vrlo slične IC<sub>50</sub> vrijednosti poznatog inhibitora kolinesteraza, huperzina A (IC<sub>50</sub>=53,6 μM), te su nešto slabije od inhibitora galantamina (IC<sub>50</sub>=7,9 μM). Spoj **25** može se istaknuti kao najbolji inhibitor BChE među sintetiziranim spojevima, s IC<sub>50</sub>=23,4. Spojevi **23** i **25** su bolji inhibitori BChE nego **24**, međutim za inhibiciju AChE pokazuju nešto slabije vrijednosti.<sup>88</sup>

Tablica 3: IC<sub>50</sub> vrijednosti za nove derivate tienobenzo-triazola **23-25**.

| Spoj      | Struktura   | IC <sub>50</sub> (μM) AChE | IC <sub>50</sub> (μM) BChE |
|-----------|---|----------------------------|----------------------------|
| <b>23</b> |   | 116,0                      | 25,5                       |
| <b>24</b> |  | 97,0                       | 37,5                       |
| <b>25</b> |  | 118,6                      | 23,4                       |

### 3.8.4. Računalno istraživanje struktura novih derivata tienobenzo-triazola 23-25

Među novim tienobenzo-triazolima **23-25**, koji su ispitivani u svrhu njihove inhibicijske aktivnosti prema enzimima AChE i BChE, najbolje rezultate ostvario je tienobenzo-triazol **24**. Prilikom računalnog istraživanja novih tienobeno-triazola, proveo se molekularni docking kako bi se identificirala struktura i stabilizirajuća međudjelovanja u kompleksima između aktivnog mjesta kolinesteraza i spojeva koji daju najbolje rezultate inhibicijske aktivnosti. Na taj način žele se objasniti podaci o inhibicijskoj aktivnosti dobiveni eksperimentom. Struktura najstabilnijeg kompleksa molekule **24** s aktivnom mjestom AChE, dobivena molekularnim dockingom, prikazana je na slici 19. Korištena kristalna struktura enzima dobivena je iz električne jegulje, pdb koda 1EEA, zbog toga što je i za eksperimentalna mjerenja korišten upravo enzim izoliran iz električne jegulje. Međutim, treba uzeti u obzir da struktura 1EEA ne reproducira točan redoslijed aminokiselina u enzimu kao u električnoj jegulji. Zbog niske rezolucije, u kristalnoj strukturi redoslijed aminokiselina preuzet je iz tercijarne strukture AChE električne raže (*Torpedo californica*).

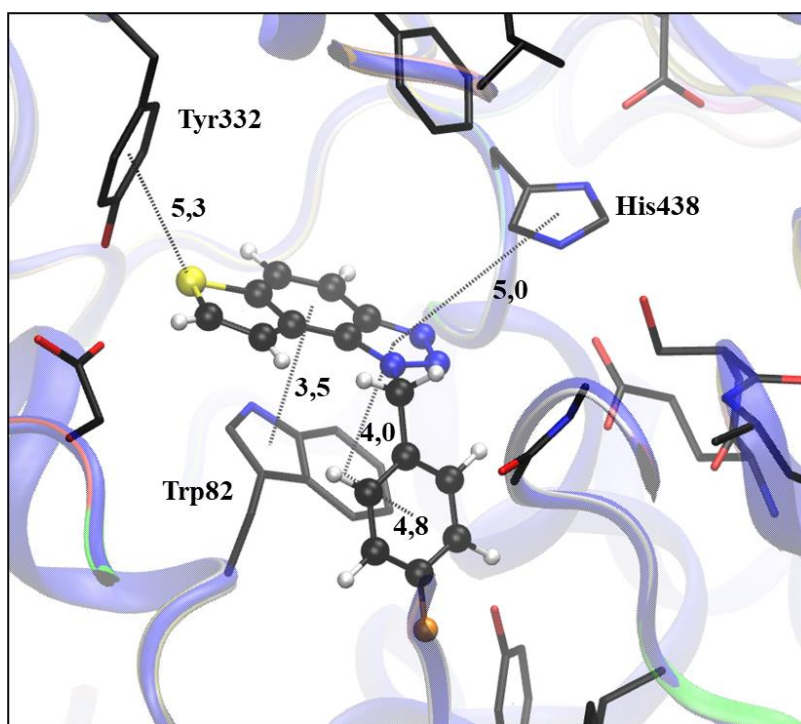


Slika 19: Prikaz rezultata molekularnog dockinga spoja **24** u aktivno mjesto enzima AChE.

Udaljenosti su izražene u mjernoj jedinici angström, Å.

Na slici 19 može se vidjeti kako dolazi do stvaranja vodikove veze između dušikovog atoma triazolnog prstena i -OH skupine aminokiseline Tyr121 na udaljenosti od 2,1 Å. Nadalje, fenilna jezgra liganda uključena je u okomito  $\pi$ - $\pi$  slaganje s His330 na udaljenosti od 5,2 Å, dok tiofenski prsten postiže slične interakcije s Phe330 na udaljenosti od 4,5 Å. Još jedno  $\pi$ - $\pi$  slaganje javlja se kod fluorovog atoma iz *p*-fluor-benzilnog supstituenta, s aminokiselinom Tyr334 (5,2 Å).

S obzirom da je tienobenzotriazol **24** od ispitivanih triazola pokazao najbolji inhibicijski potencijal prema obje vrste kolinesteraza, proveo se molekularni docking spoja **24** s aktivnim mjestom BChE. U ovom slučaju koristio se humani enzim BChE. Struktura dobivenog kompleksa prikazana je na slici 20. Molekulskim dockingom molekule **24** u aktivno mjesto enzima BChE, nisu uočene vodikove veze između triazolnih  $sp^2$  dušika i proton-donorskih aminokiselinskih ostataka. Do interakcije dolazi između sumporovog atoma tiofenskog prstena i aminokiseline Tyr332 na udaljenosti od 5,3 Å. Kod preostala dva benzenska prstena liganda dolazi do  $\pi$ - $\pi$  slaganja s Trp82 i His440.<sup>88</sup>



Slika 20: Prikaz rezultata molekulskog dockinga spoja **24** u aktivno mjesto enzima BChE.

Udaljenosti su izražene u mjernoj jedinici angström, Å.

## 4. EKSPERIMENTALNI DIO

### Opće napomene

Sva korištena otapala dostupna su na tržištu i pročišćena su destilacijom. Bezvodni  $\text{MgSO}_4$  korišten je za sušenje organskih slojeva nakon ekstrakcije. Kolonske kromatografije provodile su se na kolonama punjenima silika-gelom (60 Å, tehnički) uz odgovarajući sustav otapala. Nuklearna magnetska rezonancija ( $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR) korištena je za identifikaciju i određivanje čistoće sintetiziranih spojeva. NMR spektri snimani su pri sobnoj temperaturi na spektrometrima Bruker Avance 300 i 600 MHz. Pri snimanju spektara kao otapalo koristio se deuterirani kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), uz tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard. Kemijski pomaci u NMR spektrima izraženi su mjernom jedinicom ppm (*engl.* parts per million). Za uklanjanje otapala iz otopina koristio se rotirajući uparivač pri sniženom tlaku. UV spektri snimljeni su na Varian CARY 300 BIO UV/Vis spektrofotometru. Preparativne fotokemijske reakcije provodile su se u kvarcnim kivetama u fotokemijskom reaktoru Rayonet s 10 UV lampi pri 313 nm. U reakcijsku otopinu, prije ozračivanja, dodavala se i katalitička količina joda,  $\text{I}_2$ . HRMS analize provodile su se na masenom spektrometru MALDI TOF/TOF opremljenom s Nd:YAG laserom pri 355 nm. Kratice korištene u eksperimentalnom dijelu rada su: PE – petroleter, E – dietileter, EtOH – etanol, ACN – acetonitril, DCM – diklormetan, EtOAc – etilacetat, NMR – nuklearna magnetska rezonancija, UV – ultraljubičasta spektrofotometrija, HRMS – „High resolution“ masena spektrometrija, s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvartet, m – multiplet.

### 4.1. Sinteza tiofenske fosfonijeve soli

Sinteza 2-tiofen-fosfonijeve soli započinje tako da se u trogloj tikvici od 250 mL sintetizira 2-tiofenski bromid. U trogloj tikvicu dodaje se 7,9 g (0,063 mol) 2-tiofenskog metanola otopljenog u 72,3 mL suhog E. U tikvicu se zatim dodaje 5,71 g (0,022 mol) fosforovog tribromida, otopljenog u 7,23 mL E, kap po kap kroz 40 minuta. Reakcijska smjesa miješa se 1 sat na sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici. Nakon toga, u reakcijsku smjesu dodaje se 15 mL metanola i 100 mL destilirane vode, te se provodi ekstrakcija s ukupno 300 mL E. Eterski sloj suši se iznad bezvodnog  $\text{MgSO}_4$  do sljedećeg dana i filtrira, a zatim se uparava na rotirajućem uparivaču do suha. Nakon uparavanja u tikvici zaostaje 2-tiofen bromid kao žuto ulje.

Žuto ulje otapa se u 20 mL toluena i dodaje mu se 16,52 g (0,037 mol) tifenil fosfin, PPh<sub>3</sub> otopljenog u 50 mL toluena. Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj miješalici tri dana te se zatim filtrira kroz Büchnerov lijevak pri sniženom tlaku. Dobivena svijetlo žuta sol suši se u eksikatoru 12 sati. Suha tiofenska fosfonijeva sol koristi se u svim narednim eksperimentima.

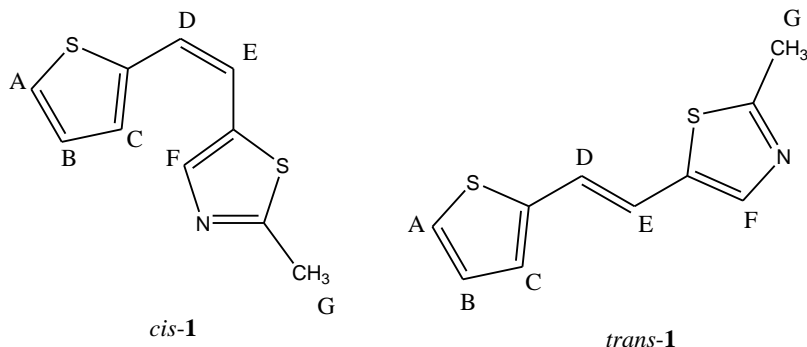
## 4.2. Organska sinteza 1,3-tiazolo-tienostilbena

### 4.2.1. Sinteza tienostilbena Wittigovom reakcijom

Spojevi 1-9 i 20-22 dobiveni su kao smjesa *cis*- i *trans*-izomera. Sinteza spojeva 1-5, 7-8, 20-22 provela se Wittigovom reakcijom. Trogrla tikvica spaja se na aparaturu za propuhivanje dušikom. Na srednji otvor tikvice stavlja se lijevak za dokapavanje, a na desni otvor lula s klor-kalcijskom soli. Tako pripremljena aparatura propuhuje se dušikom 15 minuta. Nakon propuhivanja, lijevi otvor tikvice zatvara se uz pomoć septuma i balona s dušikom. U tikvicu se zatim dodaje 70 mL apsolutnog EtOH sušenog na sitima 3Å te izračunata količina tiofenske soli. Smjesa se miješa na magnetskoj miješalici dok se sol potpuno ne otopi. U lijevak za dokapavanje dodaje se 20 mL apsolutnog EtOH i natrij. Natrij se dodaje u 10 % - tnom suvišku i potrebno ga je dodavati postupno jer se prilikom otapanja natrija otopina zagrijava, razvija se plinoviti vodik, te može doći do burne reakcije. Kad se natrij u potpunosti otopio u EtOH, dobivena otopina natrijevog etoksida ispušta se u trogrlu tikvicu kap po kap. U reakcijsku smjesu dodaje se odgovarajući aldehid i ostavlja se miješati na magnetskoj miješalici 24 sata pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom.

Nakon reakcije, iz reakcijske smjese uklanja se apsolutni EtOH uparavanjem do suha na rotirajućem uparivaču. Suhi produkt otapa se u toluenu i provodi se ekstrakcija toluenom (3x30 mL). Prilikom ekstrakcije, gornji sloj je organski, a donji sloj u ekstrakcijskom lijevku je vodeni (s anorganskim komponentama). Ekstrahirani organski sloj suši se iznad bezvodnog MgSO<sub>4</sub>, filtrira se i ponovno uparava do suha na rotirajućem uparivaču. Dobivena suha smjesa produkata pročišćava se kolonskom kromatografijom, koristeći odgovarajući sustav otapala kao eluens. Sustavi otapala koji su se koristili za izvođenje kolonske kromatografije su: PE/E, PE/DCM, EtOAc/DCM, E/EtOAc

**(Z)-2-metil-5-(2-tiofen-2-il)vinil)tiazol (*cis-1*)** i **(E)-2-metil-5-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol (*trans-1*)**

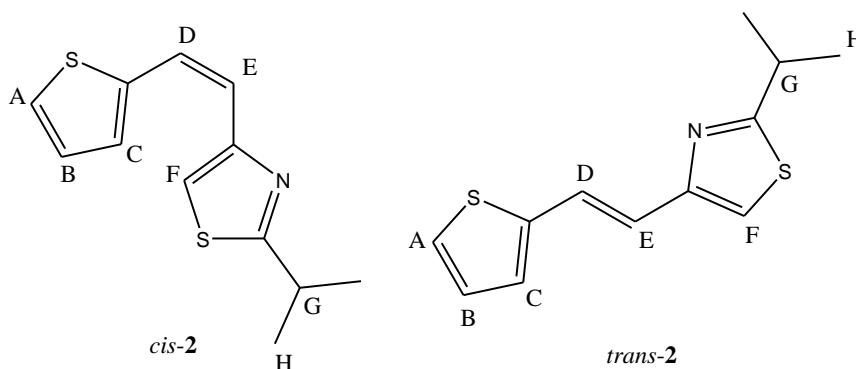


33 mg, 62,3 % izoliranog spoja; **(Z)-2-metil-5-(2-tiofen-2-il)vinil)tiazol (*cis-1*)**: žuto ulje;  $R_f$  (PE/E (10 %)) = 0,62; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 315 (15948);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,24 (d,  $J=3,9$  Hz, 1H,  $\text{H}_C$ ), 7,23 (d,  $J=5,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_A$ ), 7,13 (s, 1H,  $\text{H}_F$ ), 6,97 (dd,  $J=5,1$ , 3,5 Hz, 1H,  $\text{H}_B$ ), 6,72 (d,  $J=12,4$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 6,43 (d,  $J=12,4$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 2,76;  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 165,1 (s), 151,6 (s), 139,6 (s), 129,9 (d), 126,7 (d), 126,5 (d), 124,0 (d), 120,7 (d), 117,1 (d), 19,1 (q); MS (ESI)  $m/z$  (% fragment): 208 (100).

20 mg, 37,7 % izoliranog spoja; **(E)-2-metil-5-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol (*trans-1*)**: žuto ulje;  $R_f$  (PE/E (5 %)) = 0,71; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 318 (26303);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,56 (d,  $J=15,8$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 7,19 (d,  $J=5,15$  Hz, 1H,  $\text{H}_A$ ), 7,08 (3,6 Hz, 1H,  $\text{H}_C$ ), 6,99 (dd,  $J=5,1$ , 3,6 Hz, 1H,  $\text{H}_B$ ), 6,94 (s, 1H,  $\text{H}_F$ ), 6,85 (d,  $J=15,8$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 2,73 (s, H,  $\text{H}_G$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 166,2 (s), 150,9 (s), 142,5 (s), 127,7 (d), 126,6 (d), 124,6 (d), 124,2 (d), 120,9 (d), 114,7 (d), 19,4 (q).

HRMS ( $m/z$ ) za smjesu konfiguracijskih izomera  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izračunati</sub>=207,0176,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izmjereni</sub>=207,0180.

**(Z)-2-izopropil-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol (*cis*-2)** i **(E)-2-izopropil-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol (*trans*-2)**



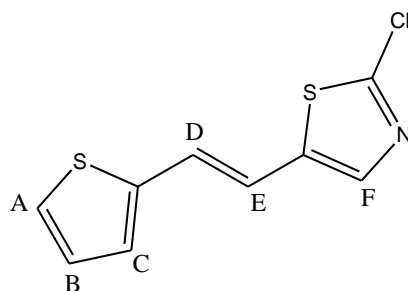
27,2 mg, 38 % izoliranog spoja; **(Z)-2-izopropil-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol (*cis*-2a)**: žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E } 10 \%) = 0,53$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 316 (13832);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,29 (d,  $J=3,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_C$ ), 7,24 (d,  $J=5,2$  Hz, 1H,  $\text{H}_A$ ), 7,13 (s, 1H,  $\text{H}_F$ ), 6,97 (dd,  $J=5,0, 3,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_B$ ), 6,71 (d,  $J=12,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 6,42 (d,  $J=13,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 3,41-3,34 (m, 1H,  $\text{H}_G$ ), 1,46 (d, 6H,  $\text{H}_H$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 177,1 (s), 151,5 (s), 139,7 (s), 130,0 (d), 126,8 (d), 126,5 (d), 123,7 (d), 120,5 (d), 116,5 (d), 33,4 (d), 23,2 (q).

44,3 mg, 62 % izoliranog spoja; **(E)-2-izopropil-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol (*trans*-2b)**: žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E } 10 \%) = 0,56$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 251 (33704);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,49 (d,  $J=15,7$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 7,11 (d,  $J=5,1$  Hz, 1H,  $\text{H}_A$ ), 7,01 (d,  $J=3,2$  Hz, 1H,  $\text{H}_C$ ), 6,93-6,90 (m, 2H,  $\text{H}_B, \text{H}_F$ ), 6,81 (d,  $J=15,7$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 3,31-3,22 (m, 1H,  $\text{H}_G$ ), 1,35 (d, 6H,  $\text{H}_H$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 177,2 (s), 152,1 (s), 141,6 (s), 126,6 (d), 125,5 (d), 123,4 (d), 123,0 (d), 120,0 (d), 112,8 (d), 32,5 (d), 22,2 (q).

HRMS ( $m/z$ ) za smjesu konfiguracijskih izomera  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{izračunati}}=235,0489$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{izmjereni}}=235,0490$ .

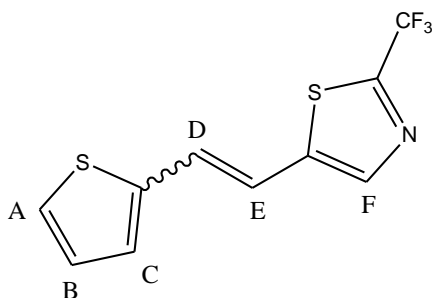


**(E)-2-kloro-5-(2-(tiofen-2-il)vinil)thiazol (3)**



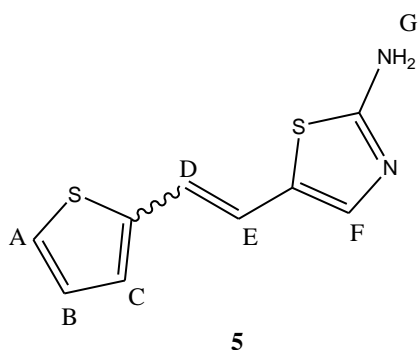
20 mg, 40 % izoliranog spoja; **(E)-2-kloro-5-(2-(tiofen-2-il)vinil)thiazol (*trans-3*)**: žuto ulje;  $R_f$  (PE/E (10 %)) = 0,59; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 342 (27961);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,45 (s, 1H,  $\text{H}_F$ ), 7,25 (d,  $J=5,2$ , 1H,  $\text{H}_A$ ), 7,07 (d,  $J=3,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_C$ ), 7,01 (dd,  $J=5,0, 3,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_B$ ), 6,92 (d,  $J=16,2$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 6,89 (d,  $J=16,2$  Hz, 1H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 149,6 (s), 141,2 (s), 139,8 (s), 139,1 (d), 127,8 (d), 127,3 (d), 125,6 (d), 125,3 (d), 117,0 (d); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_9\text{H}_7\text{ClNS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izračunati</sub>=226,9630,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izmjereni</sub>=226,9633.

**5-(2-(tiofen-2-il)vinil)-2-trifluorometilthiazol (4)**



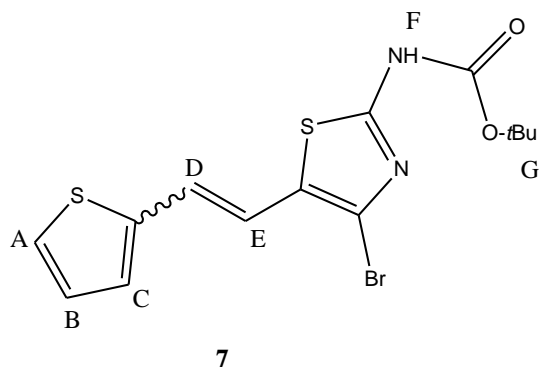
66 mg; HRMS ( $m/z$ ) za smjesu konfiguracijskih izomera  $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{F}_3\text{NS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izračunati</sub>=260,9894,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izmjereni</sub>=260,9896.

**5-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol-2-amin (5)**



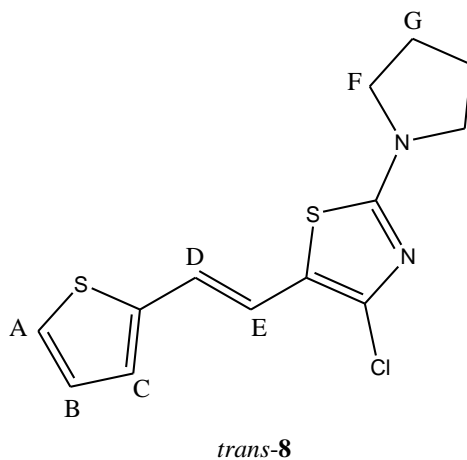
30 mg; HRMS ( $m/z$ ) za smjesu konfiguracionih izomera  $C_9H_8N_2S_2$ :  $[M+H]^+$  izračunati=208,0129,  $[M+H]^+$  izmjereni=208,0133.

**tert-butil(4-bromo-5-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol-2-il)karbamat (7)**



30 mg; HRMS ( $m/z$ ) za smjesu konfiguracionih izomera  $C_{14}H_{15}BrN_2O_2S_2$ :  $[M+H]^+$  izračunati=386,9758,  $[M+H]^+$  izmjereni=385,9751.

**(E)-4-kloro-2-(pirolidin-1-il)-5-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol (8)**

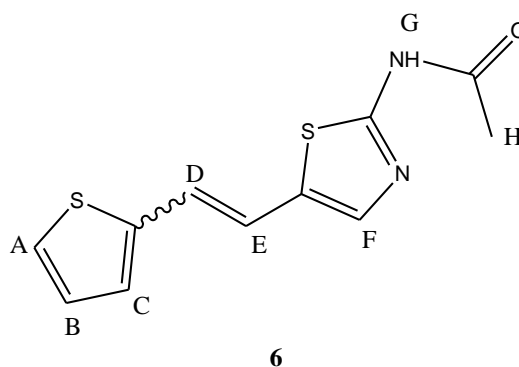


8 mg; 32% izoliranog spoja; (*E*)-4-kloro-2-(pirolidin-1-il)-5-(2-tiofen-2-il)vinil)tiazol (**8**): žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E (20\%)}) = 0,83$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 373 (33945);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,14 (m, 1H, H<sub>B</sub>), 6,96 (d,  $J=4,5$  Hz, 2H, H<sub>A</sub>, H<sub>C</sub>), 6,94 (d,  $J=15,7$  Hz, 1H, H<sub>D</sub>/H<sub>E</sub>), 6,57 (d,  $J=15,7$  Hz, 1H, H<sub>D</sub>/H<sub>E</sub>), 3,47 (t,  $J=6,5$  Hz, 4H, H<sub>F</sub>), 2,08-2,03 (m, 4H, H<sub>G</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 163,0 (s), 142,8 (s), 135,0 (s), 127,6 (d), 125,0 (d), 123,8 (d), 119,5 (d), 118,0 (d), 116,5 (s), 42,3 (t), 25,7 (t); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{S}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izračunati</sub>=296,0209,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izmjereni</sub>=296,0206.

#### 4.2.2. Prevođenje amina u amid

Spoj **6** dobiven je kao smjesa *cis*- i *trans*- izomera i sintetiziran je prevođenjem tiazolo-tienostilbenskog amina (**5**) u tiazolo-tienostilbenski amid. U tikvici od 25 mL stavlja se 30 mg amina i izračunati volumen acetanhidrida (1,5 mL). Dodavanjem acetanhidrida primjećuje se promjena boje i taloženje. Reakcijska smjesa miješa se 24 sata na sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici. Nakon reakcije, u otopinu se dodaje 0,75 mL destilirane vode te se sve skupa filtrira kroz Büchnerov lijevak pri sniženom tlaku. Nakon toga slijedi ispiranje dobivenog produkta s oko 1500 mL destilirane vode kako bi se uklonio acetanhidrid i potaknuo u vodeni dio. Dobivena žuta krutina ostavlja se sušiti u eksikatoru pod tlakom 2 sata.

#### *N*-(5-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol-2-il)acetamid (**6**)

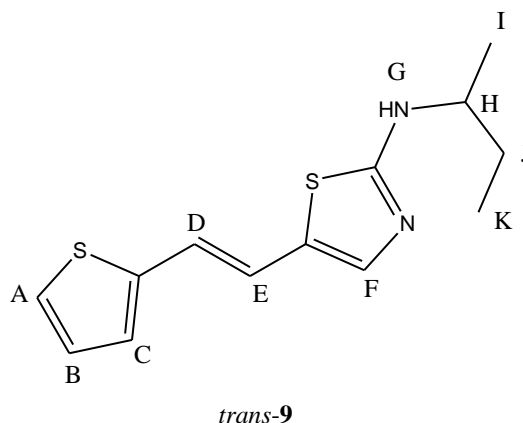


7 mg; HRMS ( $m/z$ ) za smjesu konfiguracijskih izomera  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izračunati</sub>=250,0234,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izmjereni</sub>=250,0235.

### 4.2.3. Büchwald – Hartwigova aminacija

Spoj **9** sintetizira se Büchwald – Hartwigovim aminiranjem i dobiva se smjesa *cis*- i *trans*-izomera. Kao početni reaktanti korišteni su klorov derivat tiazolo-tienostilbena (**3**) (0,00046 mol, 1 eq), XPhos (0,000093 mol, 0,2 eq) kao ligand, Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,000023 mol, 0,05 eq) kao katalizator, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,00069 mol, 1,5 eq) kao baza, otopljen u 2 mL 1,4-dioksana i *sek*-butilamin (0,00093, 2 eq). Svi reaktanti dodaju se u *seal tube* te se reakcijska smjesa propuhuje argonom. Smjesa se zagrijava uz pomoć uljne kupelji na 120 °C i miješa iznad magnetne miješalice 24 sata. Nakon reakcije, dobiveni produkt uparava se do suha na rotacijskom uparivaču. Dobivena smjesa pročišćava se kolonskom kromatografijom na silika-gelu uz sustav otapala E/EtOAc (0-60 %).

#### (*E*)-*N*-(*sek*-butil-(5-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol-1-amin (**9**))

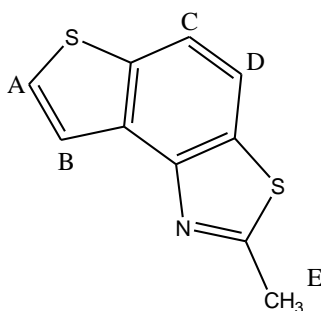


10 mg; 10% izoliranog spoja; (*E*)-*N*-(*sek*-butil-(5-(2-(tiofen-2-il)vinil)tiazol-1-amin (**9**)): žuto ulje;  $R_f$ (DCM/E (40 %)) = 0,24; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 362 (10237); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,12 (d,  $J=4,9$  Hz, 1H, H<sub>A</sub>), 7,05 (s, 1H, H<sub>F</sub>), 6,98-6,93 (m, 2H, H<sub>C</sub>, H<sub>A</sub>), 6,89 (d,  $J=15,7$  Hz, 1H, H<sub>D</sub>/H<sub>E</sub>), 6,60 (d,  $J=15,7$  Hz, 1H, H<sub>D</sub>/H<sub>E</sub>), 5,55 (s, 1H, H<sub>G</sub>), 3,55-3,45 (m, 1H, H<sub>H</sub>), 1,70-1,52 (m, 2H, H<sub>J</sub>), 1,27 (d,  $J=6,3$  Hz, 3H, H<sub>I</sub>), 0,98 (t,  $J=7,4$  Hz, 3H, H<sub>K</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 168,3 (s), 142,9 (s), 139,0 (d), 127,6 (d), 125,4 (s), 124,8 (d), 123,5 (d), 119,5 (d), 119,2 (d), 53,9 (d), 29,7 (t), 20,3 (q), 10,4 (q); HRMS ( $m/z$ ) za C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: [M+H]<sup>+</sup><sub>izračunati</sub>=264,0755, [M+H]<sup>+</sup><sub>izmjereni</sub>=264,0753.

### 4.3. Sinteza elektrociklizacijskih produkata 1,3-tiazolo-tienostilbena

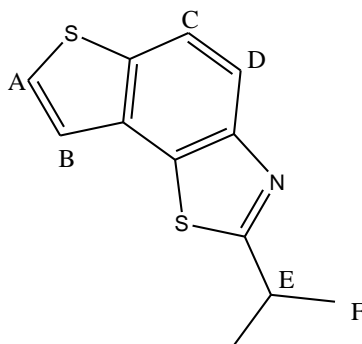
Smjese izomera prethodno sintetiziranih spojeva **1-9** i **20-22** otopljene su u toluenu ( $\sim 2,5 \times 10^{-3}$  M) i automatskom pipetom prebačene u dvije kvarcne kivete (od 50 mL) u jednakim količinama. U svaku kivetu dodaje se i katalitička količina joda,  $I_2$ . Kivete se zatvaraju i stavljaju u fotokemijski reaktor Rayonet s 10 UV lampi na 313 nm. Fotokemijska reakcija provodi se 1-5 sati, ovisno o vremenu potrebnom za postizanje potpune konverzije. Tijek fotokemijske reakcije prati se svakih 30 min ili 1 sat uz pomoć tankoslojne kromatografije. Nakon reakcije, otapalo se uklanja uparavanjem na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Dobiveni produkti **10-16** i **23-25** izolirani su i pročišćeni kolonskom kromatografijom.

#### 2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol (**10**)



15 mg; 61,5 % izoliranog spoja; **2-metiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol (**10**)**: žuto ulje;  $R_f$  (PE/E (5 %)) = 0,35; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 250 (40955);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,91 (dd,  $J=10,9, 8,8$  Hz, 2H,  $H_C, H_D$ ), 7,60 (d,  $J=5,4$  Hz, 1H,  $H_A/H_B$ ), 7,44 (d,  $J=5,4$  Hz, 1H,  $H_A/H_B$ ), 2,90 (s, 3H,  $H_E$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 164,9 (s), 151,3 (s), 136,5 (s), 132,7 (s), 129,8 (s), 128,2 (s), 122,3 (d), 120,3 (d), 118,9 (d), 20,2 (q); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izračunati</sub>=205,0020,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izmjereni</sub>=205,0023.

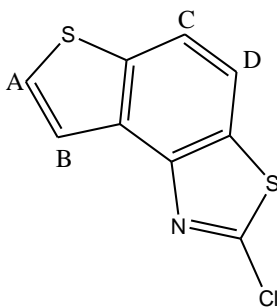
### 2-izopropiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol (11)



11

14 mg; 47 % izoliranog spoja; **2-izopropiltieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol (11)**: žuto ulje;  $R_f$  (PE/E (10 %)) = 0,40; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 251 (33704);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,95 (d,  $J=8,7$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,90 (d,  $J=8,7$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,59 (d,  $J=5,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ), 7,45 (d,  $J=5,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ), 3,52-3,45 (m, 1H,  $\text{H}_E$ ), 1,52 (d,  $J=7,1$  Hz, 6H,  $\text{H}_F$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 176,7 (s), 151,0 (s), 136,4 (s), 132,9 (s), 129,0 (s), 128,0 (d), 122,3 (d), 120,2 (d), 119,2 (d), 34,0 (d), 23,1 (q); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunati=233,0333,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izmjereni=233,0335.

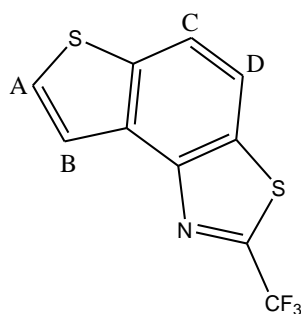
### 2-klorotieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol (12)



12

5 mg; 70 % izoliranog spoja; **2-klorotieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol (12)**: žuto ulje;  $R_f$  (PE/E (10 %)) = 0,45; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 214 (25256);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,94 (d,  $J=5,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ), 7,90 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,71 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,62 (d,  $J=5,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 152,6 (s), 146,0 (s), 138,9 (d), 133,8 (s), 132,1 (s), 127,9 (s), 127,8 (d), 121,7 (d), 120,4 (d), 116,5 (d); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_9\text{H}_4\text{ClNS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunati=224,9474,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izmjereni=224,9475.

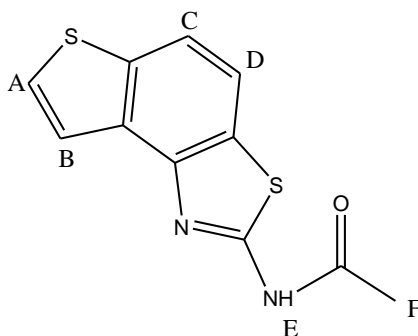
### 2-(trifluorometil)tieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol (13)



12

4 mg; 27 % izoliranog spoja; **2-(trifluorometil)tieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol (13)**: žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E (10 \%)}) = 0,58$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 213 (25252);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 8,08 (d,  $J=5,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ), 8,04 (d,  $J=8,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,90 (d,  $J=8,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,69 (d,  $J=5,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 128,4 (d), 122,3 (d), 122,0 (d), 117,0 (d), 29,7 (q); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{F}_3\text{NS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunati=258,9737,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izmjereni=258,9740.

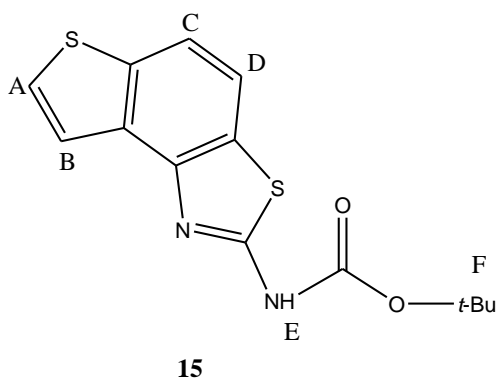
### *N*-(tieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)acetamid (14)



14

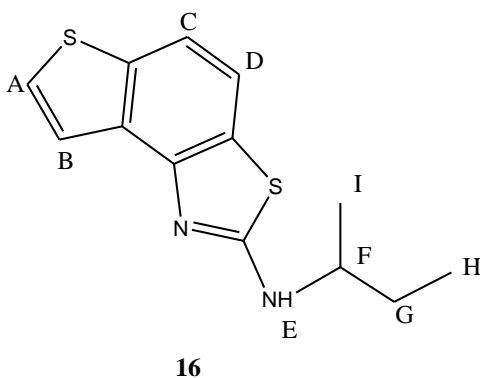
2 mg; 43 % izoliranog spoja; ***N*-(tieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)acetamid (14)**: žuto ulje;  $R_f(\text{E/EtOAc (60 \%)}) = 0,65$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 221 (17611);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 9,36 (s, 1H,  $\text{H}_E$ ), 7,82-7,81 (m, 2H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,76 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,57 (d,  $J=5,3$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ), 2,32 (s, 1H,  $\text{H}_F$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 126,9 (d), 121,2 (d), 118,5 (d), 117,3 (d), 29,7 (q); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{OS}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunati=248,0078,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izmjereni=248,0079.

### tert-butil tieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol-2-ilkarbammat (15)



Nastanak tienobenzo-triazola **15** potvrđen je  $^1\text{H}$  NMR spektrom, s obzirom na nestanak etenskih protona dvostruke veze stilbena s karakterističnim *cis*- i *trans*-spregama.

### *N*-(*sec*-butil)tieno[2',3':5,6]benzo[1,2-*d*]tiazol-2-amin (16)



Nastanak tienobenzo-triazola **16** potvrđen je  $^1\text{H}$  NMR spektrom, s obzirom na nestanak etenskih protona dvostruke veze stilbena s karakterističnim *cis*- i *trans*-spregama.

## 4.5. Organska sinteza 1,2,3-triazolo-tienostilbena

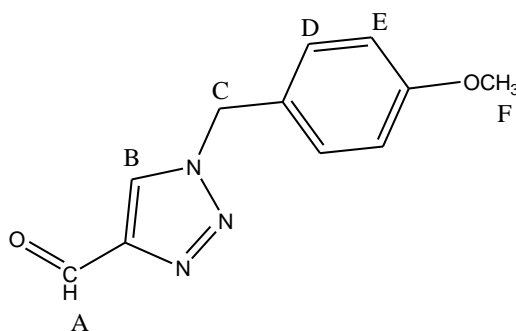
Sinteza novih fotoprodukata 1,2,3-triazolo-tienostilbena provela se nizom od tri reakcije. Prva reakcija je reakcija supstitucije u kojoj su dobiveni novi 1,2,3-triazol-karbaaldehidi **17-19**, na kojima se zatim provodila Wittigova reakcija, pri čemu su dobiveni novi derivati 1,2,3-triazolo-tienostilbena **20-22**. Treća reakcija koja se provodila je fotokemijska reakcija elektrociklizacije kojom su dobiveni fotoprodutki tienobenzo-triazoli **23-25**.



### 4.5.1. Sinteza 1,2,3-triazol-4-karbaldehida

Sinteza početnih 1,2,3-triazol-4-karbaldehida provodila se reakcijom supstitucije. Početni produkt 4-nitrobenzil-1,2,3-triazol stavlja se u reakcijsku tikvicu i otapa se u izračunatom volumenu otapala 1,4-dioksana. Tako pripremljena smjesa miješa se iznad magnetske miješalice. U reakcijsku smjesu dodaje se odgovarajući amin, ovisno o supstituentu koji se želi dobiti na konačnom produktu. Reakcija se provodi dva dana na temperaturi od 129 °C uz neprestano miješanje. Nastali produkt se nakon reakcije uparava do suha na rotacijskom uparivaču i pročišćava kolonskom kromatografijom.

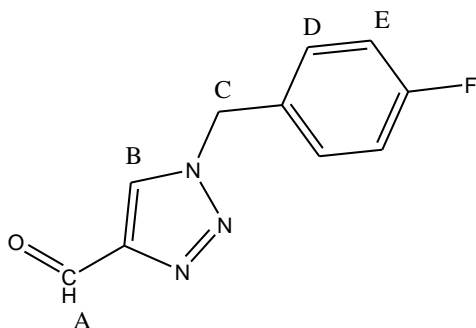
#### 1-(4-metoksibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (17)



17

37,2 mg; 53,3 % izoliranog spoja; **1-(4-metoksibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (17)**: žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E (10 \%)}) = 0,68$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 10,11 (s, 1H,  $\text{H}_A$ ), 7,95 (s, 1H,  $\text{H}_B$ ), 7,27-7,25 (m, 2H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 6,94-6,91 (m, 2H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 5,52 (s, 2H,  $\text{H}_C$ ), 3,82 (s, 3H,  $\text{H}_F$ ).

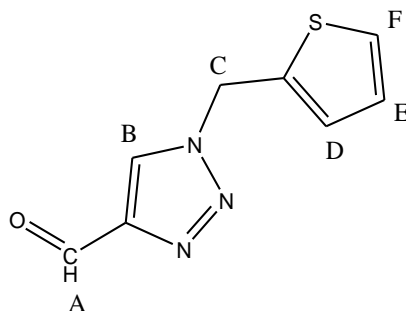
#### 1-(4-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (18)



18

65 mg; 75,6 % izoliranog spoja; **1-(4-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (18)**: žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E } 10 \%) = 0,53$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 10,13 (s, 1H,  $\text{H}_A$ ), 8,00 (s, 1H,  $\text{H}_B$ ), 7,33-7,30 (m, 2H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 7,12-7,08 (m, 2H,  $\text{H}_D/\text{H}_E$ ), 5,57 (s, 2H,  $\text{H}_C$ ).

**1-(tiofen-2-ilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (19)**



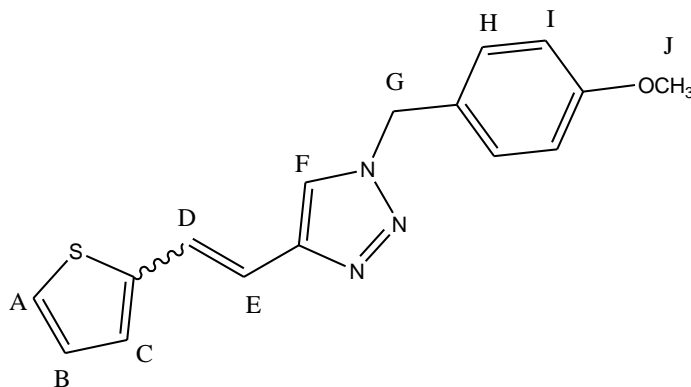
19

63.8 mg; 86,4 % izoliranog spoja; **1-(tiofen-2-ilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid (19)**: žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E } 10 \%) = 0,52$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 10,13 (s, 1H,  $\text{H}_A$ ), 8,05 (s, 1H,  $\text{H}_B$ ), 7,39 (dd,  $J = 5,2, 1,2$  Hz, 1H,  $\text{H}_F$ ), 7,17 (d,  $J = 3,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_D$ ), 7,05 (dd,  $J = 5,1, 3,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_E$ ), 5,78 (s, 2H,  $\text{H}_C$ ).

#### 4.6. Organska sinteza triazolo-tienostilbena Wittigovom reakcijom

Postupak sinteze novih derivata **20-22** 1,2,3-triazolo-tienostilbena Wittigovom reakcijom opisan je u poglavlju 4.2.1.

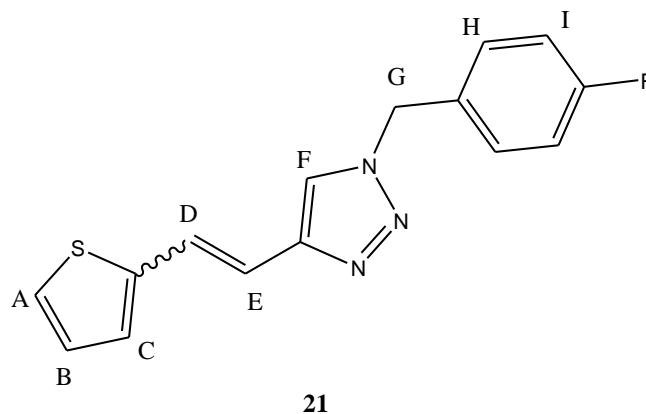
**1-(4-metoksibenzil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1H-1,2,3-triazol (20)**



20

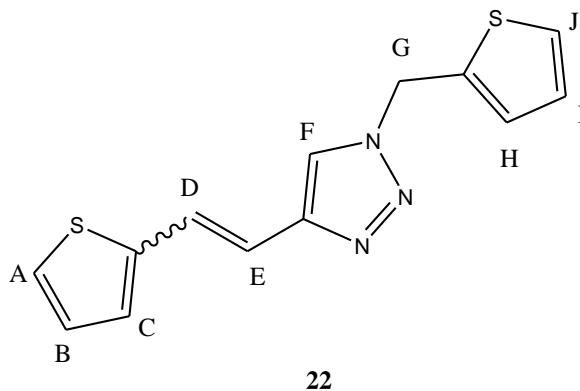
Nastanak dvostruke veze u triazolostilbenu potvrđen je  $^1\text{H}$  NMR spektrom smjese izomera **20**, s obzirom na prisutnost etenskih protona s karakterističnim *cis*- i *trans*-spregama na oko 12 i 16 Hz.

**1-(4-fluorobenzil)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1H-1,2,3-triazol (21)**



Nastanak dvostruke veze u triazolostilbenu potvrđen je  $^1\text{H}$  NMR spektrom smjese izomera **21**, s obzirom na prisutnost etenskih protona s karakterističnim *cis*- i *trans*-spregama na oko 12 i 16 Hz.

**4-(2-(tiofen-2-il)vinil)-1-(tiofen-2-ilmetil)-1H-1,2,3-triazol (22)**

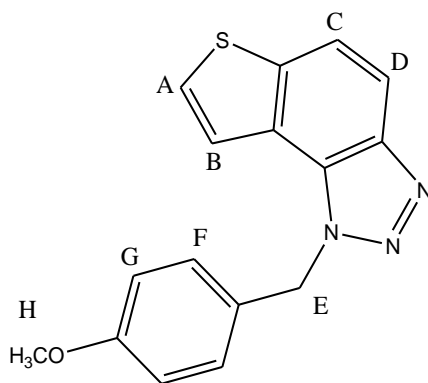


Nastanak dvostruke veze u triazolostilbenu potvrđen je  $^1\text{H}$  NMR spektrom smjese izomera **22**, s obzirom na prisutnost etenskih protona s karakterističnim *cis*- i *trans*-spregama na oko 12 i 16 Hz.

## 4.7. Sinteza tienobenzo-triazola elektrociklizacijom

Postupak sinteze novih fotoprodukata 1,2,3-triazolo-tienostilbena **23-25** fotokemijskom reakcijom elektrociklizacije opisan je u poglavlju 4.3.

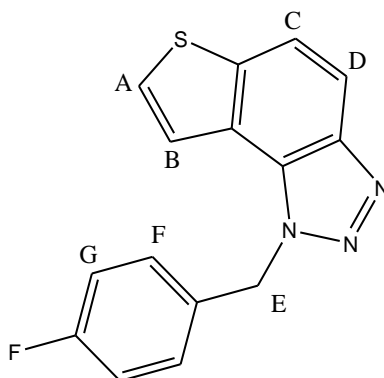
### 1-(4-metoksibenzil)-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (**23**)



**23**

7 mg; 55 % izoliranog spoja; **1-(4-metoksibenzil)-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (**23**):** žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E } 10\%) = 0,53$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 228 (28017);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,99 (d,  $J=8,9$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,80 (d,  $J=8,9$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,57-7,51 (m, 2H,  $\text{H}_A$ ,  $\text{H}_B$ ), 7,15 (d,  $J=8,6$  Hz, 2H,  $\text{H}_F/\text{H}_G$ ), 6,83 (d,  $J=8,6$  Hz, 2H,  $\text{H}_F/\text{H}_G$ ), 6,06 (s, 2H,  $\text{H}_E$ ), 3,74 (s, 3H,  $\text{H}_H$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 159,5 (s), 144,7 (s), 140,0 (s), 128,6 (s), 128,0 (d), 127,7 (d), 127,2 (s), 122,7 (s), 120,3 (d), 119,2 (d), 116,1 (d), 114,5 (d), 55,27 (t), 52,65 (q); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{OS}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunati=295,0779,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izmjereni=295,0774.

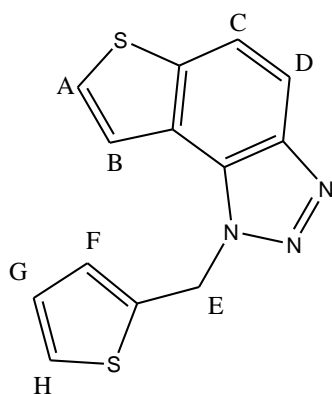
### 1-(4-fluorobenzil)-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (**24**)



**24**

30 mg; 59 % izoliranog spoja; **1-(4-fluorobenzil)-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-d][1,2,3]triazol (24)**: žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E } (10\%)) = 0,27$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm } (\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})$  229 (24972);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 8,01 (d,  $J=8,8$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,82 (d,  $J=8,8$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,58 (d,  $J=5,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ), 7,49 (d,  $J=5,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ), 7,21-7,15 (m, 2H,  $\text{H}_F/\text{H}_G$ ), 7,01 (t,  $J=8,9$  Hz, 2H,  $\text{H}_F/\text{H}_G$ ), 6,10 (s, 2H,  $\text{H}_E$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 163,4 (s), 144,7 (s), 140,2 (s), 130,9 (s), 128,6 (s), 128,4 (d), 127,9 (d), 122,6 (s), 119,9 (d), 119,3 (d), 116,2 (d), 116,1 (d), 52,4 (t); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{S}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izračunati</sub>=283,0580,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izmjereni</sub>=283,0575.

**1-(tiofen-2-ilmetil)-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-d][1,2,3]triazol (25)**



25

23 mg; 50 % izoliranog spoja; **1-(tiofen-2-ilmetil)-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-d][1,2,3]triazol (25)**: žuto ulje;  $R_f(\text{PE/E } (10\%)) = 0,32$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm } (\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})$  229 (28402);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,99 (d,  $J=9,0$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,82 (d,  $J=9,0$  Hz, 1H,  $\text{H}_C/\text{H}_D$ ), 7,69 (d,  $J=5,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ), 7,64 (d,  $J=5,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_A/\text{H}_B$ ), 7,24 (dd,  $J=4,9$ , 1,2 Hz, 1H,  $\text{H}_F/\text{H}_H$ ), 7,02-7,01 (m, 1H,  $\text{H}_F/\text{H}_H$ ), 6,96 (dd,  $J=5,1$ , 3,9 Hz, 1H,  $\text{H}_G$ ), 6,27 (s, 2H,  $\text{H}_E$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 144,6 (s), 140,0 (s), 137,3 (s), 128,3 (s), 127,8 (d), 127,3 (d), 126,5 (d), 126,1 (d), 122,6 (s), 120,1 (d), 119,3 (d), 116,1 (d), 48,4 (t); HRMS ( $m/z$ ) za  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_3\text{S}_2$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izračunati</sub>=271,0238,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ <sub>izmjereni</sub>=271,0236.

## 5. ZAKLJUČAK

U svrhu pronalaska novih potencijalnih lijekova za smanjivanje simptoma *Alzheimerove* bolesti, sintetizirani su novi derivati 1,3-tiazolo-tienostilbena i njihovi fotoprodukti, tienobenzotiazoli te novi derivati tienobenzotriazola. Tiazolo-tienostilbeni **1-9** dobiveni su kao smjese *cis*- i *trans*-izomera. Spojevi **1-5**, **7** i **8** sintetizirani su Wittigovom reakcijom iz odgovarajućeg aldehida i tiofenske fosfonijeve soli, uz natrijev etoksid kao bazu i apsolutni etanol kao otapalo. Spoj **9** sintetiziran je Büchwald-Hartwigovim aminiranjem, dok se za sintezu spoja **6** koristila reakcija amidacije uz acetanhidrid. Novi 1,3-tiazolo-tienostilbeni **1-9** sintetizirani su u iskorištenjima od 10 do 76 %. Smjese izomera **1-4** i **6-9** podvrgnute su fotokemijskim reakcijama elektrociklizacije, čime su dobiveni novi derivati tienobenzotiazola **10-16**. Početni reaktant **8** nije pokazao reaktivnost prilikom stvaranja elektrociklizijskog produkta, dok su ostali reaktanti uspješno prevedeni u fotoprodukte u izoliranim iskorištenjima od 27 do 70 %. Novi derivati tienobenzotriazola **23-25** sintetizirani su nizom od tri reakcije: supstitucija, Wittigova reakcija i fotokemijska reakcija elektrociklizacije.

Svi čisti dobiveni spojevi pročišćeni su kolonskom kromatografijom, okarakterizirani spektroskopskim metodama i ispitivani u svrhu njihove inhibicijske aktivnosti prema enzimima kolinesterazama. Osnovni parametri prilikom ispitivanja povezanosti između strukture dobivenih spojeva i inhibicijske aktivnosti bili su vrsta heterocikličkog prstena, geometrija molekula te položaj supstituenta. Među stilbenskim derivatima tiazolo-tienostilbena, najbolje rezultate inhibicijske aktivnosti ostvario je spoj *trans*-**1**, izomer metilnog derivata. Što se tiče elektrociklizijskih fotoprodukata, najbolje IC<sub>50</sub> vrijednosti ostvarili su metilni derivat (**10**), klorov derivat (**12**) i trifluorometilni derivat (**13**) tienobenzotiazola. Postignuta inhibicijska aktivnost navedenih spojeva je vrlo značajna s obzirom da su IC<sub>50</sub> vrijednosti u rangu s vrijednostima standarda Huperzina A, poznatog inhibitora kolinesteraza. Ispitivani spojevi pokazali su puno bolju inhibicijsku aktivnost prema butirilkolinesterazi (BChE), nego prema acetilkolinesterazi (AChE), što je posebno značajno zbog uloge enzima BChE u manifestaciji *Alzheimerove* bolesti u odmakloj fazi. Računalno ispitivanje pokazalo je da tienobenzotiazoli koji su ostvarili najbolje rezultate inhibicijske aktivnosti prema BChE, imaju rigidni osnovni dio molekule koji može blokirati esterski dio aktivnog mjesta enzima. Nadalje, javljaju se i  $\pi$ - $\pi$  interakcije između liganda i aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta, što dodatno stabilizira stvoreni kompleks. Tienobenzotriazolni derivati **23-25** pokazuju inhibicijsku aktivnost prema

obje kolinesteraze, AChE i BChE. Najbolje rezultate inhibicijske aktivnosti prema AChE i BChE ostvario je spoj **24**, a spoj **25** može se istaknuti kao najbolji inhibitor BChE.

## LITERATURA

1. Rouf, A., Tanyeli, C., Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, **97** (2015) 911–927.
2. Kashyap, S. J., Garg, V. K., Sharma, P. K., Kumar, N., Dudhe, R., Gupta, J. K., Thiazoles: Having Diverse Biological Activities, *Med. Chem. Res.* **21** (2012) 2123–2132.
3. Tariq, S., Kamboj, P., Amir, M., Therapeutic advancement of benzothiazole derivatives in the last decennial period, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **352** (2018) 1–17.
4. Ibrahim, S.A., Rizk, H.F., H. Synthesis and Biological Evaluation of Thiazole Derivatives, *Azoles - Synthesis, Properties, Applications and Perspectives*, IntechOpen, Rijeka, **2** (2020) 18–36.
5. Kashyap, A., Adhikari, N., Das, A., Shakya, A., Ghosh, S.K., Singh, U.P., Bhat, H.R., Review on synthetic chemistry and antibacterial importance of thiazole derivatives, *Curr. Drug Discov. Technol.*, **15** (2018) 214–228.
6. Kumawat, M.K., Thiazole containing heterocycles with antimalarial activity, *Curr. Drug Discov. Technol.*, **15** (2018) 196–200.
7. Mishra, C.B., Kumari, S., Tiwari, M., Thiazole: A promising heterocycle for the development of potent CNS active agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **92** (2015) 1–34.
8. Chotera-Ouda, A., Wróblewska, A., Tokarz, P., Stevens, C., Thiazoles, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, **4** (2022) 530–623.
9. Moghaddam, G., Ebrahimi, S.A., Rahbar-Roshandel, N., Foroumadi, A., Antiproliferative activity of flavonoids: influence of the sequential methoxylation state of the flavonoid structure, *Phytother. Res.*, **26** (2012) 1023–1028.
10. Xiong Cai, S., Nguyen, B., Jia S., Herich, J., Guastella J., Reddy S., Tseng B., Drewe J., Kasibhatla S., A role for transferrin receptor in triggering apoptosis when targeted with gambogic acid, *J. Med. Chem.*, **46** (2003) 2474–2481.
11. Sharma, P. C., Sinhmar, A., Sharma, A., Rajak, H., Pathak, D.P., Medicinal significance of benzothiazole scaffold: an insight view, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **28**(2) (2013) 240–266.
12. Zaharia, V., Ignat, A., Palibroda, N., Ngameni, B., Kuete, V., Fokunang, C., Mounsang, M., Ngadjui, B.T., Synthesis of some p-toluenesulfonyl-hydrazinethiazoles and hydrazino-bis-thiazoles and their anticancer activity, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**(11) (2010) 5080–5085.



13. Arora, P., Narang, R., Nayak, S., Singh, S., Judge, V., 2,4-Disubstituted thiazoles as multitargeted bioactive molecules, *Med. Chem. Res.*, **25** (2016) 1717–1743
14. Ayati, A., Emami, S., Asadipour, A., Shafiee, A., Foroumadi, A., Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery, *Eur. J. Med. Chem.*, **97** (2015) 699–718.
15. Zorbaz T., Kovarik Z., Neuropharmacology: Oxime antidotes for organophosphate pesticide and nerve agent poisoning, *Period. Biol.*, **121-122** (2020) 35–54.
16. Sağlık, B.N., Osmaniye, D., Çevik, U.A., Levent, S., Çavuşoğlu, B.K., Özkay, Y., Kaplancıklı, Z.A., Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationships of Thiazole Analogs as Anticholinesterase Agents for Alzheimer’s Disease, *Molecules*, **25(18)** (2020) 4312.
17. E. Stedman, E. Stedman, L. H. Easson, Choline-esterase. An enzyme present in the blood serum of the horse, *Biochem. J.*, **26** (1932) 2056–2066.
18. V. P. Whittaker, How the cholinesterases got their modern names, *Chem.-Biol. Interact.*, **187** (2010) 23–26.
19. G. A. Alles, R. C. Hawes, Cholinesterases in the blood of man, *J. Biol. Chem.*, **133** (1940) 375–390.
20. Bodač, A., Inhibicijsko djelovanje seskviterpena ( $\beta$ -kariofilena i karofilen oksida) na aktivnost acetilkolinesteraze, *Završni rad, Sveučilište u Zagrebu*, (2020) 20–45.
21. Ecobicon, D.J., Corneau, A.M., Serum cholinesterases are differentially regulated in normal and dystrophin-deficient mutant mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **24** (1973) 29–100.
22. Maček Hrvat N., Kolinesteraze i oksimi kao pseudokatalitička čistila živčanih bojnih otrova, *Doktorski rad*, (2015) 15–20.
23. Burčul F., Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae, *Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu*, (2014).
24. Čolović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A.M., Vasić, V.M., Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology, *Neuropharmacology*, **11(3)** (2013) 315–335
25. Bosak, A., Katalinić, M., Kovarik, Z., Cholinesterases: Structure, Role, and Inhibition, *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **62(2)** (2011) 175–190.
26. Rodgers, A.B., Alzheimer’s Disease: Unraveling the Mystery, National Institutes of Health Publications, Bethesda, 2008, str. 28.

27. Huber, A., Stuchbury, G., Bürkle, A., Burnell, J., Münch, G., Neuroprotective therapies for Alzheimer's disease, *Curr. Pharm. Des.*, **12** (2006) 705–717.
28. Ahmad, S., Iftikhar, F., Ullah, F., Sadiq, A., Rashid, U., Rational design and synthesis of dihydropyrimidine based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors, *Bioorg. Chem.*, **69** (2016) 91–101.
29. Breijyeh, Z., Karaman, R., Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment, *Molecules*, **25** (2020) 5789.
30. Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., Quirion, R., Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: Relations to amyloid peptides, cognition, and treatment strategies., *Prog. Neurobiol.*, **68** (2002) 209–245.
31. Smith, D.G., Cappai, R., Barnham, K.J., The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid  $\beta$  peptide, *Biomembranes.*, **768** (2007) 1976–1990.
32. Hussain, R., Ullah, H., Rahim, F., Sarfraz, M., Taha, M., Iqbal, R., Rehman, W., Khan, S., Shah, S.A.A., Hyder, S., Multipotent Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Synthesis, Biological Analysis and Molecular Docking Study of Benzimidazole-Based Thiazole Derivatives, *Molecules*, **27** (2022) 6087.
33. Acar Cevik, U., Saglik, B.N., Levent, S., Osmaniye, D., Kaya Cavuşoğlu, B., Ozkay, Y., Kaplancikli, Z.A., Synthesis and AChE-Inhibitory Activity of New Benzimidazole Derivatives, *Molecules* **24** (2019) 861.
34. Rahim, F., Ullah, H., Taha, M., Wadood, A., Javed, M.T., Rehman, W., Nawaz, M., Ashraf, M., Ali, M., Sajid, M., Synthesis and in vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory potential of hydrazide based Schiff bases., *Bioorg. Chem.*, **68** (2016) 30–40.
35. Wang, J., Timchalk, C., Lin, Y., Carbon nanotube-based electrochemical sensor for assay of salivary cholinesterase enzyme activity: An exposure biomarker of organophosphate pesticides and nerve agents, *Environ. Sci. Technol.*, **42** (2008) 2688.
36. Andrisano, V., Naldi, M., De Simone, A., Bartolini, M., A patent review of butyrylcholinesterase inhibitors and reactivators, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **28** (2018) 455–465.
37. Ullah, H., Fayyaz, F., Hussain, A., Rahim, F., Rehman, A., Wadood, A., Khan, K.M., New oxadiazole bearing thiosemicarbazide analogues: Synthesis, anti-alzheimer inhibitory potential and their molecular docking study, *Chem. Data Collect.*, **41** (2022) 100915.

38. Atri, A., Frölich, L., Ballard, C., Tariot, P.N., Molinuevo, J.L., Boneva, N., Windfeld, K., Raket, L.L., Cummings, J.L., Effect of idalopirdine as adjunct to cholinesterase inhibitors on change in cognition in patients with Alzheimer disease: Three randomized clinical trials, *JAMA*, **319** (2018) 130–142.
39. Ivančević, Ž., *Medicinski priručnik za liječnike*, Prvo izdanje, Placebo, Hrvatska, 2002., str. 34–1400.
40. Hemaida, A.Y., Hassan, G.S., Maarouf, A.R., Joubert, J., El-Emam, A.A., Synthesis and Biological Evaluation of Thiazole-Based Derivatives as Potential Acetylcholinesterase Inhibitors, *ACS Omega*, **6** (2021) 19202–19211.
41. Jiang, X.-Y., Chen, T.-K., Zhou, J.-T., He, S.-Y., Yang, H.-Y., Chen, Y., Qu, W., Feng, F., Sun, H.-P., Dual GSK-3 $\beta$ /AChE Inhibitors as a New Strategy for Multitargeting Anti-Alzheimer's Disease Drug Discovery, *ACS Med. Chem. Lett.*, **9** (2018) 171–176.
42. Zemek, F., Drtinova, L., Nepovimova, E., Sepsova, V., Korabecny, J., Klimes, J., Kuca, K., Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine, *Expet. Opin. Drug Saf.*, **13** (2014) 759–774.
43. Kurt, B. Z., Gazioglu, I., Basile, L., Sonmez, F., Ginex, T., Kucukislamoglu, M., Guccione, S., Potential of aryl-urea-benzofuranylthiazoles hybrids as multitasking agents in Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.*, **102** (2015) 80–92.
44. Shidore, M., Machhi, J., Shingala, K., Murumkar, P., Sharma, M. K., Agrawal, N., Tripathi, A., Parikh, Z., Pillai, P., Yadav, M. R., Benzylpiperidine-linked diarylthiazoles as potential anti-Alzheimer's agents: Synthesis and biological evaluation, *J. Med. Chem.*, **59** (2016) 5823–5846.
45. Rahim, F., Javed, M.T., Ullah, H., Wadood, A., Taha, M., Ashraf, M., Khan, M.A., Khan, F., Mirza, S., Khan, K.M., Synthesis, molecular docking, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory potential of thiazole analogs as new inhibitors for Alzheimer disease, *Bioorg. Chem.*, **62** (2015) 106–116.
46. Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., Schneider, G., Counting on natural products for drug design, *Nat. Chem.*, **8** (2016) 531–541.
47. Amalfitano, C., Evidente, A., Surico, G., Tegli, S., Bertelli, E., Mugnai, L., Phenols and Stilbene Polyphenols in the Wood of Esca-Diseased Grapevines, *Phytopathol. Mediterr.*, **39** (2000) 178–183.
48. Lu, Q., Yu, Q., Zhu, Y.-B., Weng, J.-Q., Yuan, J., Hu, D.-X., Chen, J., Liu, X.-H., Tan, C.-X., Novel stilbene analogues containing thiazole moiety: Synthesis, biological evaluation and docking study, *J. Mol. Struct.*, **1180** (2019) 780–786.

49. Jang, M., Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes, *Science*, **275** (1997) 218–220.
50. Lu, Q., Ye, F., Sun, X., Weng, J., Yu, Q., Hu, D., Design and Synthesis of Novel Nature-Inspired Stilbene Analogues as Potential Topoisomerase 1 Inhibitors, *Chin. J. Org. Chem.*, **41** (2021), 3321–3329.
51. Champoux, J.J., DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism, *Annu. Rev. Biochem.*, **70** (2001) 369–413.
52. Liu, J.C., Chen, B., Yang, J.L., Weng, J.Q., Yu, Q., Hu, D.X., Design, Synthesis and Cytotoxicity of Thiazole-Based Stilbene Analogs as Novel DNA Topoisomerase IB Inhibitors, *Molecules*, **27** (2022) 1009.
53. Zhilitskaya, L.V., Shainyan, B.A., Yarosh, N.O., Modern Approaches to the Synthesis and Transformations of Practically Valuable Benzothiazole Derivatives, *Molecules*, **26** (2021) 2190.
54. Colorado-Peralta, R., Olivares-Romero, J.L., Rosete-Luna, S., García-Barradas, O., Reyes-Márquez, V., Hernández-Romero, D., Morales-Morales, D., Copper-Coordinated Thiazoles and Benzothiazoles: A Perfect Alliance in the Search for Compounds with Antibacterial and Antifungal Activity, *Inorganics*, **11** (2023) 185.
55. Shkyair Lihumis, H., Alameri, A.A., Hefdhli Zaooli, R., A Review on Recent Development and biological applications of benzothiazole derivatives, *Prog. Chem. Biochem. Res.*, **5** (2022) 147–164.
56. Rana, A., Siddiqui, N., Khan, S.A., Benzothiazoles: A New Profile of Biological Activities, *Indian J. Pharm. Sci.*, **69** (2007) 10–17.
57. Londhe, B.S., Pratap, U.R., Mali, J.R., Mane, R.A., Synthesis of 2-Arylbzothiazoles catalyzed by biomimetic catalyst  $\beta$ -cyclodextrin, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **31** (2010) 2329–2332.
58. Prabhu, P., Pande, S., Shastry, S., Synthesis and Biological Evaluation of Schiff's Bases of Some New Benzothiazole Derivatives as Antimicrobial Agents, *Int. J. Chem. Tech. Res.*, **3** (2011) 185–191.
59. Menta, E., Palumbo, M., Novel antineoplastic agents, *Exp. Opin. Ther. Patents*, **7** (1997) 1401–1426.
60. Dubey, R., Shrivastava, P.K., Basniwal, P.K., Bhattacharya, S., Moorthy, N.S., 2-(4-aminophenyl) benzothiazole: A potent and selective pharmacophore with novel mechanistic action towards various tumour cell lines, *Mini Rev. Med. Chem.*, **6** (2006) 633–637.

61. Choi, S.J., Park, H.J., Lee, S.K., Kim, S.W., Han, G., Choo, H.Y., Solid phase combinatorial synthesis of benzothiazoles and evaluation of topoisomerase II inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem.*, **14** (2006) 1229–1235.
62. Kumar, V., Sharma, A., Sharma, P.C., Synthesis of some novel 2,5-disubstituted thiazolidinones from a long chain fatty acid as possible anti-inflammatory, analgesic and hydrogen peroxide scavenging agents, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **26** (2011) 198–203.
63. Singh, H.P., Sharma, C.S., Gautam, C.P., Synthesis and pharmacological screening of some novel 2-arylhydrazino and 2-aryloxy-pyrimido [2,1-b] benzothiazole derivatives, *Am.-Eurasian J. Sci. Res.*, **4** (2009) 222–228.
64. Venkatesh, P., Pandeya, S.N., Synthesis, characterisation and antiinflammatory activity of some 2-amino benzothiazole derivatives, *Int. J. Chem. Tech. Res.*, **1** (2009) 1354–1358.
65. Majo, V.J., Prabhakaran, J., Mann, J.J., Kumar, J.S.D., An efficient palladium catalyzed synthesis of 2-arylbenzothiazoles, *Tetrahedron Lett.* **44** (2003) 8535–8537.
66. Byeon, S.R., Jin, Y.J., Lim, S.J., Lee, J.H., Yoo, K.H., Shin, K.J., Kim, D.J., Ferulic acid and benzothiazole dimer derivatives with high binding affinity to  $\beta$ -amyloid fibrils, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (2007) 4022–4025.
67. Jensen, F., *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2007., str.16–20.
68. Foresman, G.B., Frisch, A., *Gaussian, I., Exploring chemistry with electronic structure methods*, Gaussian Inc., Pittsburgh, 1996., str.3–59.
69. Young, D.C., *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001, str.19–8.
70. Šakić, D., *Kvantno-kemijsko istraživanje reakcija pregrađivanja odabranih psihofarmaka*, Doktorski rad, str.22-33.
71. Cramer, C. J., *Essentials of Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2002., str.153–189.
72. Bachrach, S.M., *Computational Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007., str.2–27.
73. Koch, W., Holthausen, M.C., *The Basic Machinery of Density Functional Programs. In A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001., str.93–116.

74. Nikšić-Franjić, I., Računalno istraživanje reakcija slobodnih radikala s halogeniranim organskim spojevima u vodenim otopinama, Doktorski rad, str.25-30.
75. Schlegel, H.B., Geometry optimization, Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci., **1** (2011) 790–809.
76. Friesecke, G., Theil, F., Molecular Geometry Optimization, Models, Encyclopedia of Applied and Computational Mathematics, Springer, Berlin, 2015., str.951–957.
77. Kirkpatrick, P., Virtual screening: gliding to success, Nat. Rev. Drug Disc., **3** (2004) 299.
78. Ewing, J.A.T., Kuntz, I.D., Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening, J. Comput. Chem., **18** (1997) 1175.
79. Morris, G. M., Lim-Wilby, M., Molecular Docking. Molecular Modeling of Proteins, Methods Mol. Biol., **443** (2008) 365–382.
80. Yunta, M.J.R., Some Critical Aspects of Molecular Interactions Between Drugs and Receptors, Am. J. Model. Optim., **2** (2014) 84–102.
81. Kroemer, R.T., Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring, Curr. Protein Pept. Sci., **8** (2007) 312–328.
82. Mlakić, M., Faraho, I., Odak, I., Talić, S., Vukovinski, A., Raspudić, A., Bosnar, M., Zadavec, R., Ratković, A., Lasić, K., Marinić, Ž., Barić, D., Škorić, I., Synthesis, photochemistry and computational study of novel 1,2,3-triazole heterostilbenes: Expressed biological activity of their electrocyclization photoproducts. Bioorg. Chem., **121** (2022) 105701.
83. Mlakić, M., Đurčević, E., Odak, I., Barić, D., Juričević, I., Šagud, I., Burčul, F., Lasić, Z., Marinić, Ž., Škorić, I., Thieno-Thiazolostilbenes, Thienobenzo-Thiazoles, and Naphtho-Oxazoles: Computational Study and Cholinesterase Inhibitory Activity, Molecules, **28** (2023) 3781.
84. Runge, E., Gross, E.K.U., Density-functional theory for time-dependent systems, Phys. Rev. Lett., **52** (1984) 997–1000.
85. Ellman, G.L., Courtneax, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharmacol., **7** (1961) 88–95.
86. Mlakić, M., Fodor, L., Odak, I., Horváth, O., Lovrić, M.J., Barić, D., Milašinović, V., Molčanov, K., Marinić, Ž., Lasić, Z., Škorić, I., Resveratrol-maltol and resveratrol-thiophene hybrids as cholinesterase inhibitors and antioxidants: synthesis, biometal chelating capability and crystal structure, Molecules, **27** (2022) 6379.

87. Mlakić, M., Odak, I., Faraho, I., Talić, S., Bosnar, M., Lasić, K., Barić, D., Škorić, I., New naphtho/thienobenzo-triazoles with interconnected anti-inflammatory and cholinesterase inhibitory activity, *Eur. J. Med. Chem.*, **241** (2022) 114616.
88. Mlakić, M., Selec, I., Čaleta, I., Odak, I., Barić, D., Ratković, A., Molčanov, K., Škorić, I., New Thienobenzo/Naphtho-Triazoles as Butyrylcholinesterase Inhibitors: Design, Synthesis and Computational Study, *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (2023) 5879.

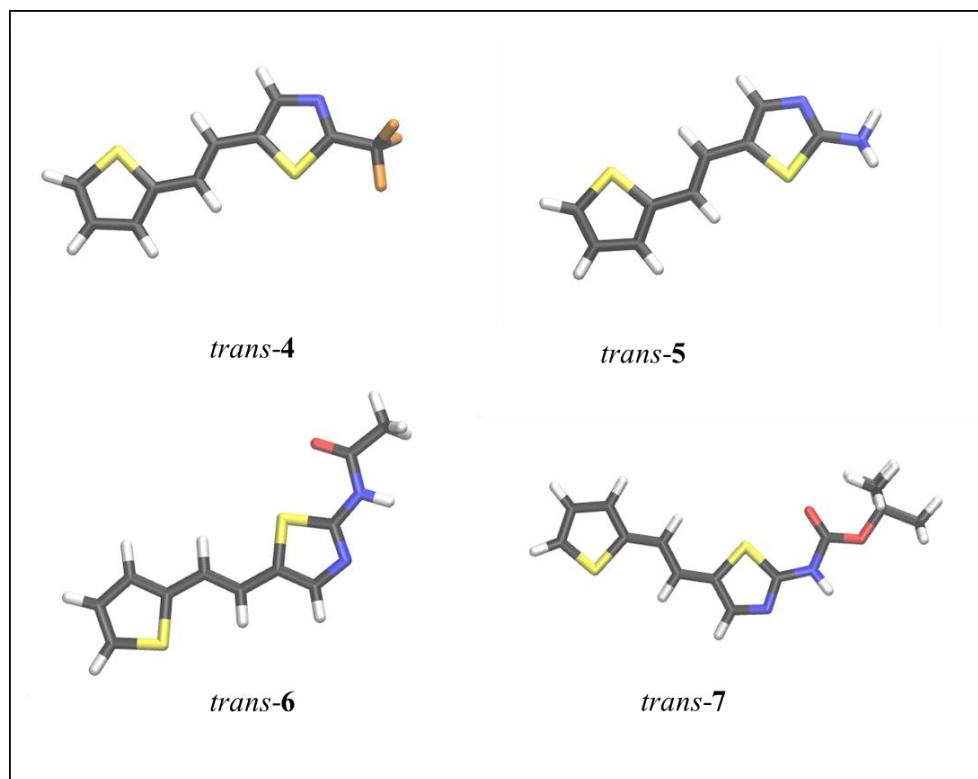
## ŽIVOTOPIS

**Ėma Đurĉević** [REDACTED] Pohađala je i završila osnovnu školu Vilima Korajca u Kaptolu. Maturirala je 2017. godine u Prirodoslovno-matematiĉkoj Gimnaziji u Požeĝi. Iste godine upisuje prvu godinu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij Primijenjena kemija. Stručnu praksu odradila je tijekom 2. godine preddiplomskog studija u Zavodu za javno zdravstvo Požeško-slavonske ŝupanije, služba za zdravstvenu ekologiju, gdje je provodila analize pitkih i otpadnih voda te analize namirnica i kvalitete zraka. Titulu Prvostupnice primijenjene kemije stjeĉe 2021. godine, nakon obrane završnog rada naziva *Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih 3-furostilbenskih oksima*, pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Škorić. Diplomski studij upisala je 2021. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij Primijenjena kemija, smjer Primijenjena organska kemija.



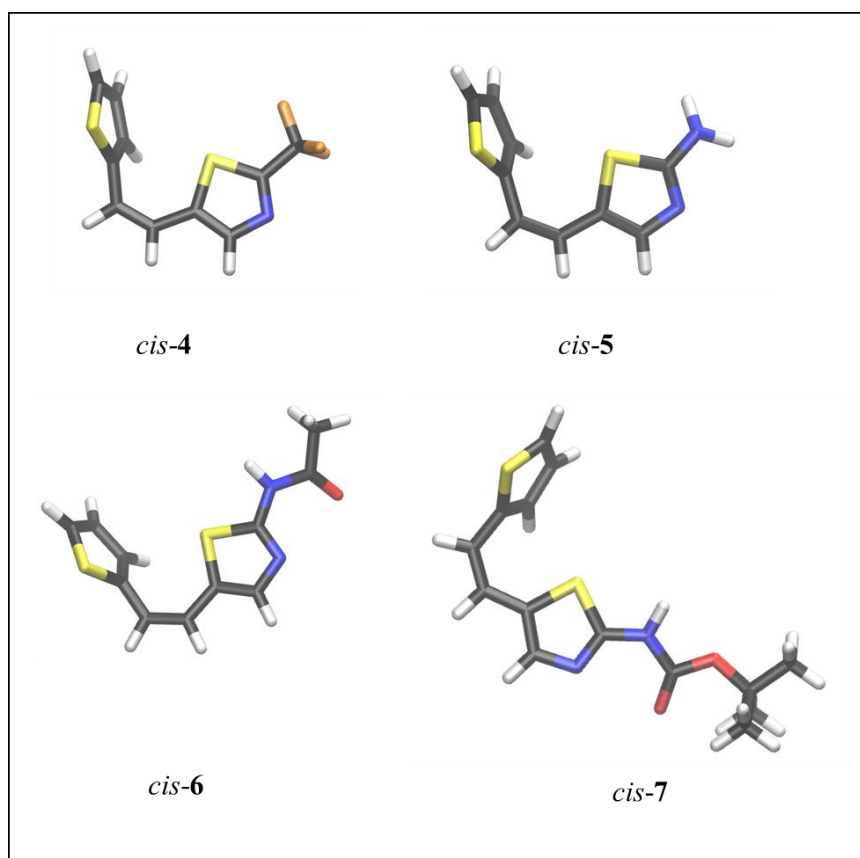
# PRILOZI

1.



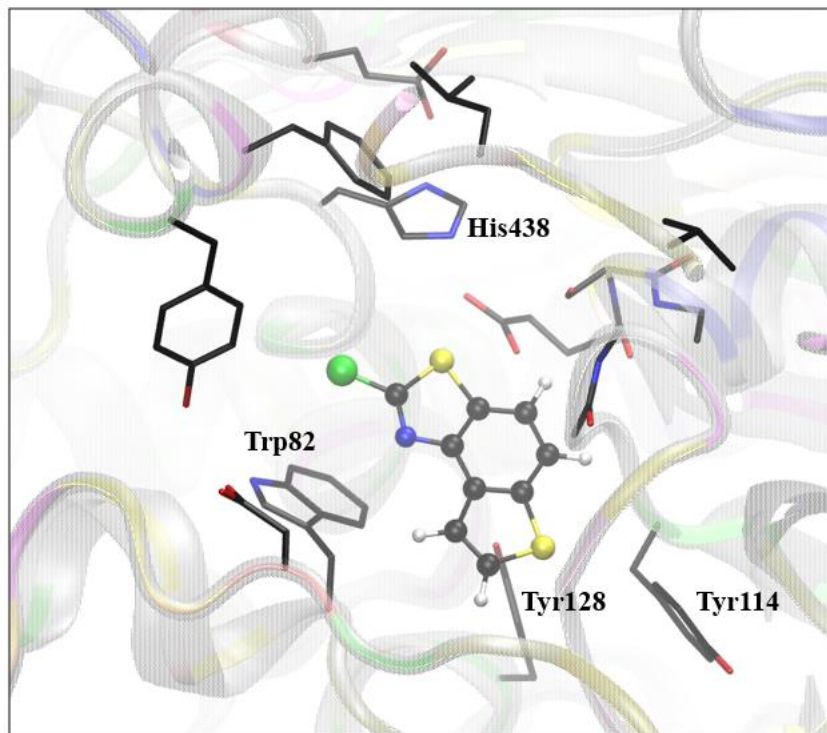
Slika 1: Prikaz geometrija *trans*-izomera 1,3-tiazolo-tienostilbena **4-7**, optimiranima M062X/6-31G(d) razinom teorije.

2.



Slika 2: Prikaz geometrija *cis*-izomera 1,3-tiazolo-tienostilbena **4-7**, optimiranima M062X/6-31G(d) razinom teorije.

3.



Slika 3: Prikaz rezultata molekuskog dockinga spoja **12** u aktivno mjesto enzima BChE. Označene su aminokiseline s kojima molekula **12** kao ligand ostvaruje stabilizirajuće kontakte.