

# Priprava i biološka aktivnost novih tienbenzo-triazola

---

Selec, Ida

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:434231>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ida Selec

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2023.

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

Kandidatkinja Ida Selec

Predala je izrađen diplomski rad dana: 12. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

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

Dr. sc. Irena Čaleta, znan. sur., Selvita d.o.o.,  
Zagreb

Izv. prof. dr. sc. Krunoslav Žižek, Sveučilište u  
Zagrebu

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
(zamjena)

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

Diplomski ispit održat će se dana: 15. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ida Selec

Priprava i biološka aktivnost novih tienobenzo-triazola

DIPLOMSKI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Irena Škorić

Komentor rada: dr.sc. Irena Čaleta

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

Zagreb, rujan 2023.

## SAŽETAK

Cilj rada bio je sintetizirati nove tienobenzotriazole te ispitati njihovu inhibicijsku potenciju prema kolinesterazama. Također je procijenjena selektivnost njihove inhibicije, a rezultati su interpretirani molekularnim modeliranjem. Uspješno je sintetizirano 15 novih spojeva koji se razlikuju po supstituentu pričvršćenom na triazolni prsten ili po aromatičnosti središnjeg prstena. Fotociklizacijskim putem sintetiziran je jedan spoj **1**, dok je alternativni put dao širok spektar molekula dihidro-tienobenzotriazola i aromatiziranih tienobenzotriazola **2-15**. Većina novih molekula pokazala je bolju inhibicijsku potenciju prema butirilkolinesterazi (BChE – eng. *butyrylcholinesterase*). Računalne studije ukazuju na povezivanje tienobenzotriazola s kolinesterazama preko vodikovih veza koje uključuju jedan od dušika triazola, smještenih između aromatskih ostataka liganda i aromatskih ostataka aktivnih mjesta kolinesteraza. Također su prisutne i alkilne interakcije. Molekularno pristajanje omogućuje uvid u strukturu dobivenih kompleksa i identifikaciju stabilizirajućih interakcija između enzima i potencijalnog inhibitora kolinesteraze. Novosintetizirani tienobenzotriazoli pokazali su dobre karakteristike za budući dizajn inhibitora kolinesteraza i traženje terapeutika za liječenje neuroloških poremećaja.

**Ključne riječi:** alternativna sinteza, fotociklizacija, inhibicija, kolinesteraze, tienobenzotriazoli

## SUMMARY

### Synthesis and biological activity of thienbenzo-triazoles

The aim of this study was to synthesize new thienbenzo-triazoles and to examine their inhibitory potency towards cholinesterases. The selectivity of their inhibition was also assessed, and the results were interpreted by molecular modeling. 15 new compounds have been successfully synthesized, differing in the substituent attached to the triazole ring or by the aromaticity of the central ring. A single compound **1** was synthesized by photocyclization route, while the alternative pathway gave a wide range of molecules of dihydro-thienbenzo-triazole and aromatized thienbenzo-triazole **2-15**. Most of the new molecules showed better inhibitory potency towards butyrylcholinesterase (BChE). Computational studies suggest that thienbenzo-triazole and cholinesterases are linked via hydrogen bonds involving one of the triazole nitrogen, located between aromatic ligand residues and aromatic residues of the active cholinesterase site. Alkyl interactions are also present. Molecular docking gives insight into the structure of the obtained complexes and the identification of stabilizing interactions between enzymes and a potential cholinesterase inhibitor. The newly synthesized thienbenzo-triazoles showed good characteristics for the future design of cholinesterase inhibitors and the search for therapeutics for the treatment of neurological disorders.

**Key words:** alternative synthesis, photocyclization, inhibition, cholinesterases, thienbenzo-triazoles, inhibition

*Ovaj rad izrađen je u Selviti d.o.o čijim se zaposlenicima zahvaljujem na prenesenom znanju, ljubaznosti i susretljivosti.*

*Također se zahvaljujem dr. sc. Ireni Čaleti na mentorstvu i pruženoj prilici da uz njeno vodstvo steknem nova znanja, vještine i iskustvo u području organske kemije.*

*Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Ireni Škorić na pruženom mentorstvu, savjetima i podršci tijekom izrade diplomskog rada te prenesenom znanju tijekom školovanja na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.*

*Veliko hvala Marku na podršci i motivaciji tijekom studiranja, a najveće hvala na strpljenju i snazi koju si mi pružio prilikom izrade diplomskog rada.*

*Najveće hvala mami Spomenki i baki Ani za pružanje mogućnosti studiranja, podršku i ljubav pruženu tijekom školovanja i cijelog života.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. BENZOTRIAZOLI .....	3
2.2. ENZIMI <sup>27</sup> .....	4
2.3. ALZHEIMEROVA BOLEST .....	6
2.4. ACETILKOLIN .....	10
2.5. KOLINESTERAZE .....	12
2.6. INHIBITORI KOLINESTERAZA .....	19
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
3.1. UVOD .....	24
3.2. FOTOCIKLIZACIJSKA SINTEZA .....	24
3.2.1. SINTEZA ETIL-3-(4-FORMILTRIAZOL-1-IL)PROPANOATA .....	24
3.2.2. SINTEZA TRIFENIL(2-TIENILMETIL)FOSFONIJEVA BROMIDA .....	25
3.2.3. SINTEZA ETIL-3-[4-[( <i>E</i> )-2-(2-TIENIL)VINIL]TRIAZOL-1-IL]PROPANOATA .....	25
3.2.4. SINTEZA ETIL-3-(1 <i>H</i> -TIENO[3',2':3,4]BENZO]1,2- <i>d</i> ][1,2,3]TRIAZOL-1-IL)PROPANOATA <b>1</b> .....	27
3.3. ALTERNATIVNA SINTEZA .....	29
3.3.1. SINTEZA 1-AZIDO-4-NITROBENZENA .....	29
3.3.2. SINTEZA DIHIDRO-TIENOBENZO-TRIAZOLA <b>2-8</b> .....	29
3.3.3. SINTEZA AROMATIZIRANIH TIENOBENZO-TRIAZOLA <b>9-15</b> .....	35
3.4. INHIBICIJSKA AKTIVNOST TIENOBENZO-TRIAZOLA <b>1-15</b> PREMA ENZIMIMA KOLINESTERAZE .....	43
4. EKSPERIMENTALNI DIO .....	49
4.1. OPĆE NAPOMENE .....	49
4.2. FOTOCIKLIZACIJSKA SINTEZA .....	50
4.2.1. SINTEZA ETIL-3-(4-FORMILTRIAZOL-1-IL)PROPANOATA .....	50



4.2.2.	SINTEZA TRIFENIL(2-TIENILMETIL)FOSFONIJEVA BROMIDA .....	50
4.2.3.	SINTEZA ETIL-3-[4-[( <i>E</i> )-2-(2-TIENIL)VINIL]TRIAZOL-1-IL]PROPANOATA.....	50
4.2.4.	SINTEZA ETIL-3-(1 <i>H</i> -TIENO[3',2':3,4]BENZO]1,2- <i>d</i> ][1,2,3]TRIAZOL-1-IL)PROPANOATA.....	51
4.3.	ALTERNATIVNA SINTEZA .....	52
4.3.1.	SINTEZA 1-AZIDO-4-NITROBENZENA.....	52
4.3.2.	SINTEZA DIHIDRO-TIENOBENZO-TRIAZOLA 2-8.....	52
4.3.3.	SINTEZA AROMATIZIRANIH TIENOBENZO-TRIAZOLA 9-15 .....	58
5.	ZAKLJUČAK .....	64
6.	LITERATURA .....	65

## 1. UVOD

Istraživanje lijekova (eng. *drug discovery*) je proces identifikacije potencijalnih novih terapijskih entiteta koristeći kombinaciju eksperimentalnih, translacijskih i kliničkih modela. Proces otkrivanja lijekova uključuje identifikaciju kandidata za lijekove, sintezu, karakterizaciju, probir i testove terapijske učinkovitosti.

Cilj predkliničkog programa otkrivanja lijekova jest otkriti jednu ili više molekula kandidata od kojih svaka ima dovoljno dokaza o biološkoj aktivnosti za metu relevantnu za bolest, kao i dovoljno sigurnih svojstava i svojstava sličnih lijekovima s ciljem izvršavanja testiranja na ljudima. Zbog visokih proračuna potrebnih za istraživanje i razvoj (R&D, eng. *Research and Development*) i klinička ispitivanja, razvoj lijekova je relativno dug proces. Potrebno je otprilike 12-15 godina za razvoj novog lijeka od trenutka otkrića do trenutka dostupnosti na tržištu za liječenje pacijenata<sup>1,2,3</sup>.

Dizajn lijekova je proces pronalaženja novih lijekova na temelju znanja o biološkoj meti. Lijek se najčešće ponaša kao inhibitor funkcije biomolekule kao što je protein ili organska molekula. Molekula se time aktivira što rezultira terapijskom koristi za pacijenta. Dizajn lijekova uključuje dizajn molekula komplementarnih po obliku i naboju prema molekulskoj meti s kojom se vežu i reagiraju<sup>4,5</sup>.

Enzimi kolinesteraze su otkrivene početkom 20. stoljeća te su od tada sve veći predmet istraživanja u području biokemije, biomedicine, fiziologije i toksikologije<sup>6</sup>. Acetilkinesteraza (AChE – eng. *AcetylCholinEsterase*) i butirilkolinesteraza (BChE – eng. *ButyrylCholinEsterase*) su srodni enzimi iz iste skupine enzima te im se aminokiselinski slijed podudara oko 55%<sup>7</sup>. Obzirom na razlike u aminokiselinskim ograncima aktivnog mjesta enzima, BChE i AChE imaju različitu specifičnost prema supstratima i osjetljivost prema velikom broju inhibitora<sup>8,9</sup>.

Ključna razlika dvaju enzima je prisutnost 14 aromatskih aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu AChE u odnosu na aktivno mjesto BChE koje broji 8 aromatskih i 6 alifatskih aminokiselinskih ostataka<sup>10</sup>. Samim time BChE bolje hidrolizira molekule od AChE<sup>11,12,13,14</sup>. Acetilkinesteraza kontrolira kanaliziranje živčanih impulsa u kolinergičkim sinapsama središnjeg i perifernog živčanog sustava hidrolizom neurotransmitera acetilkolina. AChE također sudjeluje i u procesima kao što su aktivacija dopaminskih neurona i stvaranje

amiloidnih vlakana karakterističnih za Alzheimerovu bolest<sup>15,16,17</sup> (AD – eng. *Alzheimer disease*). Butirilkolinesteraza dobro katalizira hidrolizu acetilkolina zbog sposobnosti koregulacije kolinergičke neurotransmisije<sup>18</sup>. Visoke razine BChE u vezi su s karakterističnom neuropatološkom karakteristikom Alzheimerove bolesti<sup>19,20</sup>. BChE također vežemo uz katalitičku i stehiometrijsku detoksikaciju ksenobiotika (organofosfati, kokain, aspirin) i bioaktivaciju droga (heroin)<sup>21,22</sup>. Oba enzima pokazuju dobre karakteristike za liječenje neurodegenerativnih poremećaja. Do sada poznati inhibitori kolinesteraza koji se koriste za liječenje tih poremećaja jesu galantamin, donepezil i rivastigmin<sup>23</sup>.

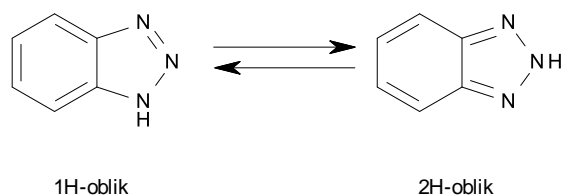
U ovome radu sintetizirano je 15 novih spojeva kao potencijalnih inhibitora kolinesteraza s ciljem liječenja neurodegenerativnih bolesti.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BENZOTRIAZOLI

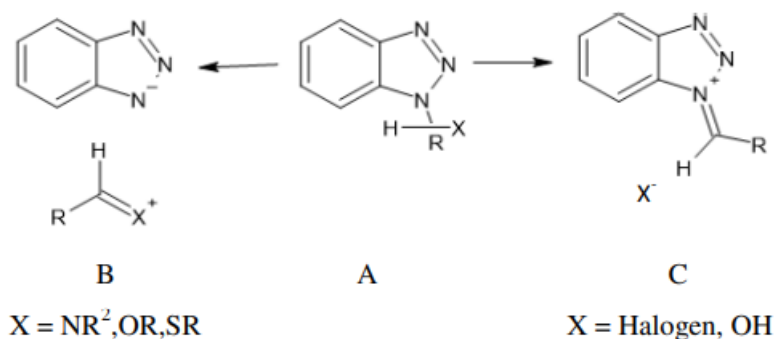
Benzotriazol (BTA, eng. *benzotriazole*), triazolni prsten fuzioniran s benzenskom jezgrom spada u klasu heterocikličkih spojeva koji su od velikog interesa za farmaceutsku industriju. BTA se lako uvodi u molekule različitim postupcima kondenzacije, adicije i supstitucije. Poznat je i pod nazivom 1*H*-benzo[*d*]-1,2,3-triazol<sup>24,25</sup>.

BTA je biciklički heterociklički sustav sastavljen od tri atoma dušika fuzioniranih s benzenskim prstenom. *N*-supstituirani benzotriazol ima dva tautomerna izomera u 1*H* i 2*H* oblicima (slika 1) od kojih 1*H* prevladava u odnosu na 2*H* na sobnoj temperaturi i u plinskom i u tekućem obliku.



Slika 1. Shematski prikaz 1*H*- i 2*H*-oblika benzotriazola<sup>25</sup>.

BTA se ponaša kao elektron donor ili prekursor radikala ili karbaniona. Osim što je elektron donor, također ima sposobnost privlačenja elektrona. Zbog toga, spojevi s R i hetero atomom (N, O, S) pričvršćeni na benzotriazolni dušik mogu ionizirati na dva načina, tvoreći benzotriazolni anion i imonijev, oksonijev i tionijev kation u svrhu stvaranja strukture B (slika 2) ili ioniziraju dajući strukturu C.



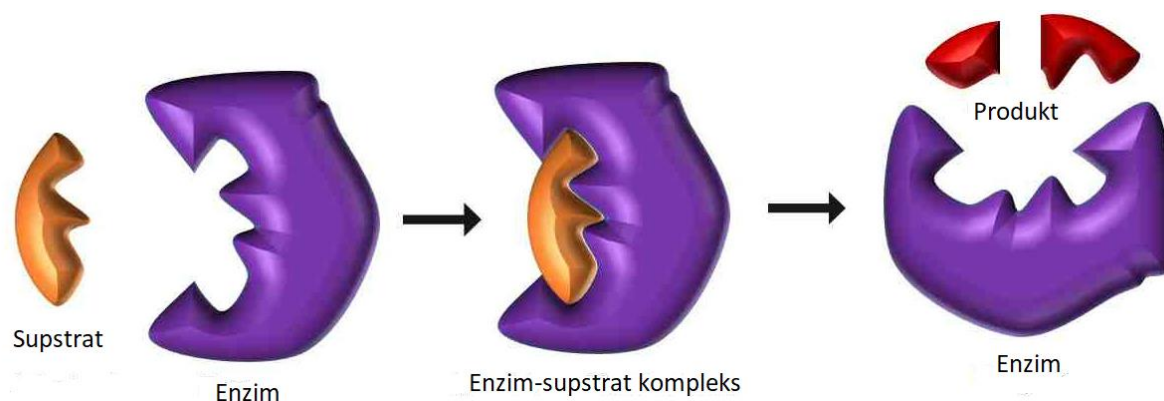
Slika 2. Shematski prikaz ionizacije spojeva s R i heteroatomom<sup>25</sup>.

Derivati BTA su aktivni protiv širokog spektra ciljanih molekula. Također, BTA je od biološke i industrijske važnosti<sup>25</sup>. 1*H*-benzo[*d*]-1,2,3-triazol se smatra povlaštenom strukturom uslijed njegovih farmakoloških aktivnosti. Korišten kao predložak za dizajn novih farmakološki aktivnih spojeva, BTA prolazi kroz brzi razvoj u sintezi heterocikla. Istraživanjima se pokazalo da BTA ima različite farmakološke aktivnosti (protuupalnu, antimikrobnu, antifungalnu i antikarcenogenu). Također je poznato da molekule koje sadrže jezgru benzotriazola posjeduju i CNS (eng. *Central Nervous System*) aktivnost<sup>26</sup>.

## 2.2. ENZIMI<sup>27</sup>

Uloga enzima je ubrzati kemijske reakcije u organizmu. Također, neophodni su za disanje, probavljanje hrane, mišićnih i živčanih funkcija itd. Ukratko, enzimi olakšavaju provedbu kemijskih reakcija unutar svake stanice. Tijekom sudjelovanja u kemijskoj reakciji se ne uništavaju odnosno izlaze nepromijenjeni iz reakcije te se stoga mogu ponovno koristiti. Sudjeluju u reakcijama vitalnima za rad i cjelokupno zdravlje tijela.

Većina enzima su po svojoj strukturi proteini, iako ima nekih koji su ribonukleinske kiseline. U svakoj stanici nalazi se na tisuće enzima koji pružaju specifičnu pomoć cijelom tijelu. Enzimi ubrzavaju kemijske reakcije u stanicama snižavanjem praga potrebnog za početak predviđene reakcije odnosno snižavaju energiju aktivacije vezanjem za supstrat po principu „ključa i brave“ (slika 3).



Slika 3. Mehanizam ključa i brave<sup>28</sup>.

Mehanizam „ključa i brave“ predstavljen je 1894. godine. Prema tom mehanizmu, enzim u svojoj strukturi posjeduje aktivno mjesto specifičnog oblika koje oblikom odgovara supstratu.

Danas je poznat i noviji, inducirani model prema kojem aktivno mjesto mijenja oblik prilikom interakcije sa supstratom. Nakon što se podloga zaključa u točno određenom položaju, započinje kataliza.

Djelovanje enzima moguće je samo u točno određenim uvjetima. Primjerice, optimalna temperatura pri kojoj enzim može djelovati je temperatura tijela (37 °C). Na nižim temperaturama enzimi i dalje obavljaju svoju funkciju, ali znatno sporije. Međutim, ukoliko je temperatura previsoka, okoliš je previše kiseo ili alkaln, te enzim mijenja svoj oblik. Promjena oblika popraćena je promjenom oblika aktivnog mjesta zbog čega se supstrat ne može vezati te enzim ne može obavljati svoju funkciju. Navedeno se zove denaturacija.

Funkcija nekih enzima ovisi o ne-proteinskim molekulama, poznatima kao kofaktori. Danas poznajemo dvije vrste kofaktora, ione i koenzime. Ioni su anorganske molekule slabo povezane s enzimom. Koenzimi su organske molekule slabo povezane s enzimom koje omogućuju enzimu da odrađuje svoj posao. Kada je kofaktor čvrsto vezan na enzim, tada ga nazivamo prostetičkom skupinom.

Za očuvanje ispravnosti rada tjelesnog sustava, nekad je potrebno usporiti funkciju enzima. Primjerice, ukoliko proizvodi previše proizvoda, potrebno je smanjiti ili zaustaviti njegovu proizvodnju. Aktivnost enzima može se ograničiti:

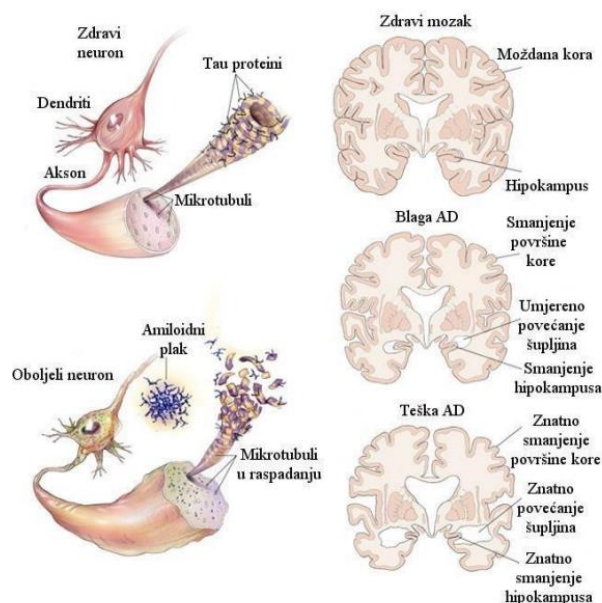
- a) KOMPETITIVNIM INHIBITORIMA – blokiraju aktivno mjesto enzima čime izazivaju kompeticiju sa supstratom za vezivanje na aktivno mjesto.
- b) NEKOMPETITIVNIM INHIBITORIMA – molekule koje se vežu za enzim negdje drugdje osim na aktivnom mjestu čime smanjuju njihovu učinkovitost.
- c) REVERZIBILNIM INHIBITORIMA – inhibitor se veže i za enzim i za supstrat, produkti rjeđe napuštaju aktivno mjesto te se reakcija usporava.
- d) IREVERZIBILNIM INHIBITORIMA – veže se za enzim te ga trajno inaktivira.

### 2.3. ALZHEIMEROVA BOLEST

Alzheimerova bolest (AD, eng. *Alzheimer's disease*) kao najčešći oblik demencije (lat. de – bez, mens – um) vodeća je bolest današnjice, sa 1-3% do čak 11% zahvaćenosti populacije u dobi starijoj od 70 godina<sup>29</sup>. Ovaj kronični degenerativni poremećaj klinički se karakterizira oštećenjem pamćenja, složenom spoznajom jezika, emocija i ponašanja. Bolest prvi puta opisuje Alois Alzheimer 1906. godine koristeći kriterije progresivnog gubitka pamćenja, dezorijentacije i patoloških markera. Bolest je danas neizbježna posljedica starenja<sup>30,31,32,33</sup> s prevalencijom oko 1% u životnoj dobi od 60 godina te raste dvostruko svakih pet godina<sup>34,35</sup>. Sa sve dužim životnim vijekom, prevalencija ima tendenciju porasta<sup>36</sup>.

Demencija se može prepoznati pojavom kognitivnih smetnji i otežanim obavljanjem svakodnevnih radnji, s naglaskom da pacijent svojih „nesposobnosti“ nije svjestan. Bolest se očituje gubitkom pamćenja, ponajviše za kratkotrajnu memoriju, zapuštanjem vanjskog izgleda, poteškoćama u učenju i pamćenju, vremenskoj i prostornoj orijentaciji, sposobnosti prosuđivanja te poremećaju govora i ponašanja<sup>37,38</sup>. Čimbenici kojima se pridaje najveća važnost pri pojavi AD jesu starija životna dob, utjecaj nižeg obrazovanja, trauma glave, ženski spol i izloženost emocionalnom stresu<sup>39,40</sup>.

AD je bolest moždane kore i okolnih struktura te ju karakterizira brza progresivnost i ireverzibilnost, kao i oštećenje živčanih stanica. Posljedica bolesti jest gubitak neurona i nastanak senilnih plakova i neurofibrilarnih petlji<sup>39,40</sup>. Uloga neurona je prijenos poruka između različitih dijelova mozga i od mozga do mišića i organa u tijelu. U početku se oštećenja događaju u dijelovima mozga uključenim u pamćenje, uključujući entorhinalni korteks i hipokampus, dok bolest kasnije pogađa i područja u moždanoj kori (područja odgovorna za jezik, rasuđivanje i društveno ponašanje). Kritičnu fazu bolesti karakterizira oštećenje mnogih drugih područja mozga<sup>30,31,32,33</sup> (slika 4).



Slika 4. Usporedba zdravog mozga i mozga osobe oboljele od AD<sup>41</sup>.

Biokemijski procesi uključeni u razvoj Alzheimerove bolesti vode do gubitka neurona apoptozom (programirana smrt stanice). Alzheimerova bolest uključuje nasljedne i sporadične oblike bolesti. Nasljedni AD prenosi se na autosomno dominantan način, a prvi simptomi se javljaju prije 65. godine života (rani oblik AD). Sporadni oblik se pak javlja nakon 65. godine života te je ujedno i najčešći oblik bolesti. Iako se Alzheimer smatra sporadičnom bolesti, oko 5-15% slučajeva nasljednog je tipa, od kojih pola ima rani početak i tipično su vezani s genetskim poremećajima<sup>42</sup>.

Osnovne teorije vezane uz primarni uzrok bolesti su:

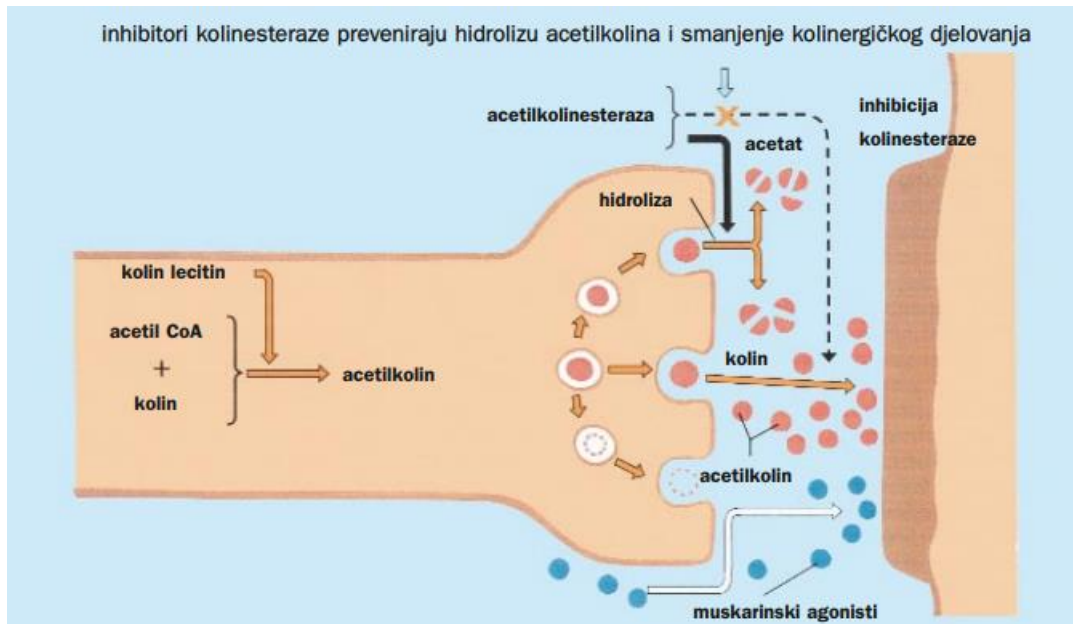
- a) KOLINERGIČKA HIPOTEZA – pretpostavlja da je uzrok AD-a poremećaj metabolizma acetilkolina koji se vezan uz učenje i pamćenje. Smatra se da dolazi do smanjenja enzima kolin-acetil-transferaze koji je odgovoran za sintezu acetilkolina. Hipoteza pretpostavlja da se povećanjem njegove koncentracije mogu ublažiti simptomi bolesti.
- b) AMILOIDNA HIPOTEZA – pretpostavlja da  $\beta$ A-peptid ima središnju ulogu u patogenezi AD tj. da nakupine i plakovi peptida pronađeni na mozgu oboljelih imaju toksičan učinak na zdrave neurone i uzrokuju njihovo odumiranje. Prema istraživanjima je zaključeno da stupanj oštećenja stanica ovisi o količini nastalog  $\beta$ A-peptida kao i o njegovim karakteristikama.



- c)  $\tau$ -HIPOTEZA - pretpostavlja da dolazi do hiperfosforilacije  $\tau$ -proteina koji se odvaja od mikrotubula čime direktno dolazi do degradacije mikrotubula. Time direktno dolazi do degradacije mikrotubula nakon čega se protein spaja s drugim istovrsnim proteinima stvarajući neurofibrilarne petlje (NFP). Naime, nije utvrđeno je li hiperfosforilacija uzrok ili posljedica AD s obzirom na to da se  $\tau$ -petlje javljaju i kod drugih bolesti.
- d) OKSIDACIJSKI STRES - Stanje do kojeg dolazi uslijed neravnoteže između nastanka slobodnih radikala (najčešće reaktivnih kisikovih ili reaktivnih dušikovih vrsta) i oksidacijske obrane unutar stanica<sup>43</sup>.

Najvažniju hipotezu vezanu uz AD pripisujemo razini acetilkolina. Poznate su dvije važne vrste katalitičkog enzima, a to su acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza koji hidroliziraju kolinergički neuro-odašiljač<sup>30,31,32,33</sup>. Liječenjem se pokušavaju samo ublažiti pojedini popratni simptomi (nesanica, akutna i kronična psihička i motorička uznemirenost, depresivnost, itd.) jer do sada nije pronađen način za izlječenje. AD se u prosjeku razvije unutar 8-12 godina<sup>37,38</sup>.

Prilikom istraživanja, uočeni su poremećaji u kolinergičkoj transmisiji u demenciji s AD i s ranim i s kasnim početkom. Usporedbom kontrolne populacije s bolesnicima s AD, uočeno je smanjenje enzima potrebnih za sintezu i razgradnju acetilkolina čak za 30%<sup>44</sup>. Suvremene teorije nalažu da su kognitivni simptomi AD posljedica deficita kolinergičke neurotransmisije. Povećanje sinteze acetilkolina, smanjenje hidrolize, povećanje oslobađanja iz presinaptičkih završetaka i izravna stimulacija postsinaptičkih kolinergičkih receptora (slika 5) neki su od načina na koji se može postići povećanje kolinergičke neurotransmisije<sup>45</sup>.



Slika 5. Prikaz djelovanja inhibitora kolinesteraze<sup>45</sup>.

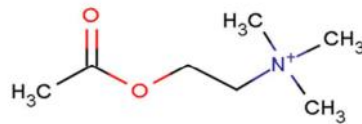
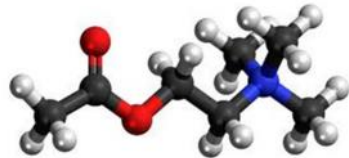
U liječenju AD ranije su se koristili psihostimulansi, vazodilatatori, ergoloidi i nootropici<sup>45</sup>. Kako medicina napreduje, tako su u upotrebi i novi lijekovi koje možemo klasificirati kao:

1. prekursore acetilkolina
2. inhibitore acetilkolinesteraze (AChE – eng. *AcetylCholinEsterase*)
3. kolinergičke agoniste (muskarinske i nikotinske agoniste)<sup>46</sup>

U ovom radu novosintetizirani spojevi su upravo ciljani inhibitori kolinesteraza.

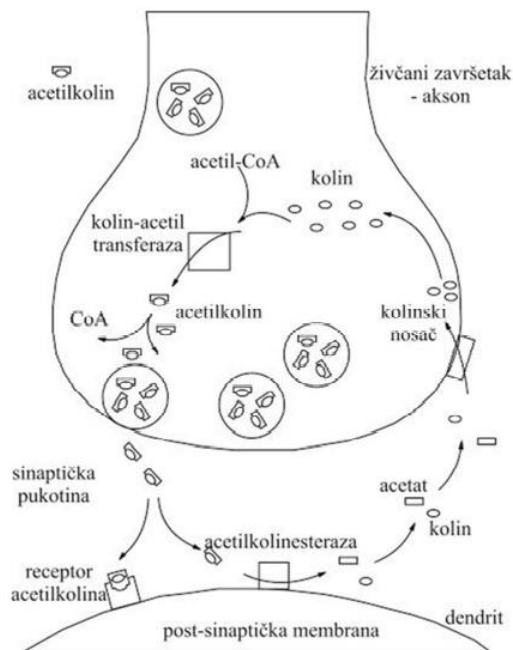
## 2.4. ACETILKOLIN

Acetilkinolin (ACh – eng. *acetylcholin*) je glavni neurotransmiter u tijelu koji ima funkcije i u perifernom i u središnjem živčanom sustavu. ACh ima ulogu u uzbuđenju, pažnji, učenju, pamćenju i motivaciji, a oslobađaju ga, primjerice, motorički neuroni u svrhu aktivacije mišića<sup>47</sup>. Ovaj neurotransmiter je po svom sastavu kvaterna amonijeva baza (slika 6), a izlučuje se u autonomnom živčanom sustavu, neuromišićnoj spojnici i sinapsama CNS.



Slika 6. Kemijska struktura acetilkolina<sup>37,48</sup>.

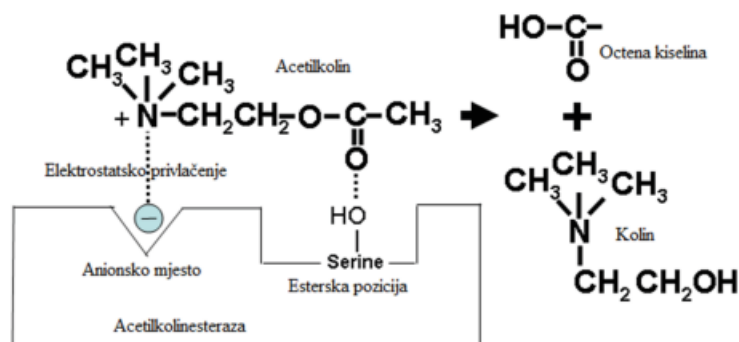
Acetilkinolin se sintetizira iz kolina i acetil-koenzima A (acetyl-CoA) u prisutstvu enzima kolin-acetiltransferaze<sup>37</sup>.



Slika 7. Shematski prikaz kolinergičke sinapse i kružnog ciklusa acetilkolina<sup>49</sup>.

Acetilkolin se iz sinaptičke pukotine uklanja razgradnjom, a ne difuzijom. Prilikom hidrolize acetilkolina, acetilkolinesteraza prati prijenos živčanih impulsa u kolinergičkoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava. Dolaskom živčanog impulsa dolazi do ispuštanja acetilkolina iz sinaptičkog mjehurića predsinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu. ACh se potom veže na kolinergičke receptore vezane na postsinaptičku membranu kolinergičke sinapse ili na mišićne stanice. Vezanje acetilkolina uzrokuje depolarizaciju membrane čime dolazi do daljnjeg prijenosa živčanog impulsa. Polarizacija postsinaptičke membrane i prestanak prijenosa impulsa postiže se razgradnjom acetilkolina u sinaptičkoj pukotini djelovanjem acetilkolinesteraze<sup>37</sup> (slika 7).

Brojne bolesti živčanog sustava karakterizira nedostatak neurotransmitera acetilkolina. Acetilkolin se raspada na kolin i octenu kiselinu pod utjecajem acetilkolinesteraze<sup>50</sup> (slika 8).



Slika 8. Raspad acetilkolina pod utjecajem acetilkolinesteraze<sup>51</sup>.

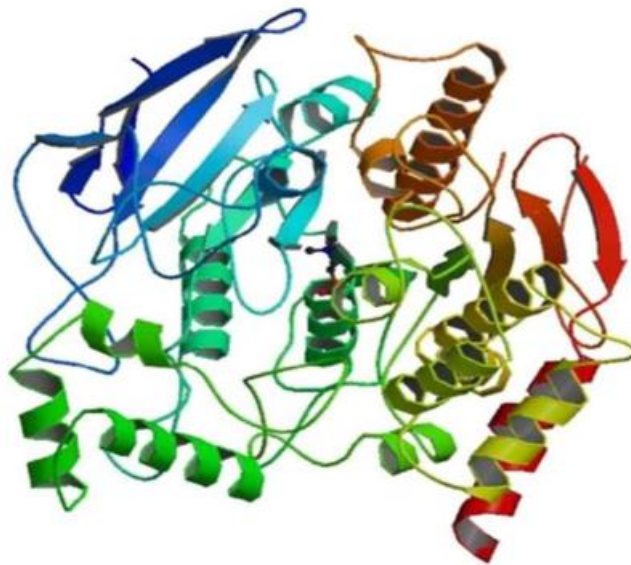
Ukoliko do raspada dođe prije nego što je acetilkolin obavio svoju funkciju neurotransmitera, prijenos impulsa između receptora je smanjen zbog čega dolazi do komplikacija u cijelom CNS. Smatra se da je dobar pristup liječenju odnosno ublažavanju bolesti izazvanih nedostatkom acetilkolina upravo inhibicija kolinesteraza<sup>50</sup>. Alzheimerova bolest okarakterizirana je gubitkom i propadanjem stanica koje koriste ili stvaraju neurotransmiter acetilkolin. Njegovim raspadom na kolin i octenu kiselinu u prisutnosti enzima dolazi do smanjenog prijenosa živčanih impulsa<sup>52,53</sup>.

## 2.5. KOLINESTERAZE

Prema enzimskoj nomenklaturi, acetilkolinesteraza (AChE – eng. *AcetylCholinEsterase*; EC 3.1.1.7.) i butirilkolinesteraza (BChE – eng. *ButyrylCholinEsterase*; EC 3.1.1.8.) spadaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Budući da su im glavne gradivne jedinice beta-nabrane ploče okružene alfa-uzvojnica, kolinesteraze strukturno pripadaju grupi hidrolaza alfa/beta-strukture<sup>54</sup>. Iako strukturno homologni, međusobno se razlikuju prema katalitičkoj aktivnosti odnosno specifičnosti prema supstratima i inhibitorima<sup>8,9</sup>. AChE se prvenstveno nalazi u krvi na membranama crvenih krvnih stanica, u neuromuskularnim spojevima i u neuronskim sinapsama, dok se BChE proizvodi u jetri i nalazi se prvenstveno u krvnoj plazmi. AChE brže hidrolizira acetilkolin, dok BChE brže hidrolizira butirilkolin<sup>55,56,57,58</sup>.

AChE još nazivamo i „pravom kolinesterazom“, a izgrađena je od 12 beta-nabranih ploča okruženih s 14 alfa-uzvojnica (slika 9). Ovaj polimorfni enzim izgrađen od globularnih podjedinica vezan je na membrane stanica preko kolagenske uzvojnice. Katalitičke podjedinice

grupiraju se u oligomerne strukture: globularne, sastavljene od monomera, dimera ili tetramera i asimetrične, koje mogu biti katalitičke, kolagenske i nekolagenske<sup>59</sup>. Glavna uloga acetilkolinesteraze je razgradnja acetilkolina u kolinergičkim sinapsama, a smatra se jednim od najbržih enzima u obavljanju svoje uloge<sup>49</sup>.



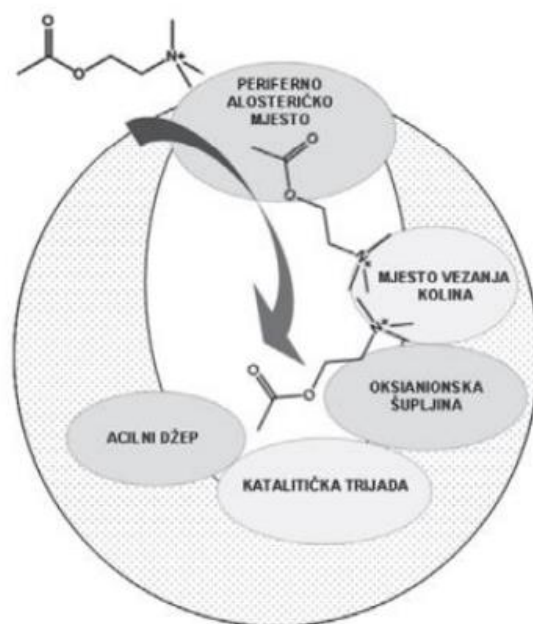
Slika 9. 3D struktura AChE<sup>60</sup>.

BChE (slika 10) se nakon sinteze u jetri izlučuje u krv. Spada u skupinu esteraza koje spadaju u skupinu hidrolaza. Uloga hidrolaza jest cijepanje estera na kiseline i alkohol u reakciji hidrolize. Aktivnost ovog enzima dokazana je i u masnom tkivu, tankom crijevu, plućima i bijeloj tvari mozga<sup>61</sup>. Iako uloga nije poznata, pretpostavlja se da butirilkolinesteraza sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina te u hidrolizi butirilkolina, intermedijernog metabolita koji nastaje metabolizmom neesterificiranih masnih kiselina u jetri. Prisutan je u prijenosu spore živčane provodljivosti, a u sinapsama u CNS sudjeluje u razgradnji acetilkolina<sup>62</sup>. BChE i AChE se razlikuju u specifičnosti prema pojedinim supstratima, ponašanju u suvišku istih i njihovoj raspodjeli u tkivima. Iako je butirilkolinesteraza specifičnija za butirilkolin, također razgrađuje i acetilkolin. U suvišku acetilkolina, acetilkolinesteraza se inhibira, dok se butirilkolinesteraza aktivira<sup>49</sup>.



Slika 10. 3D struktura BChE<sup>59</sup>.

AChE i BChE su stereoselektivni enzimi s različitim potencijalom hidrolize i inhibicije uslijed asimetrije ždrijela i aktivnog mjesta<sup>63,64,65</sup>. Aktivno mjesto oba enzima u obliku je 20 Å dugačkog i 5 Å širokog ždrijela<sup>8</sup>. Kristalografija, specifično vezanje supstrata i inhibitora te ciljana mutageneza omogućile su identifikaciju četiri domene koje čine aktivno mjesto oba enzima. Aktivno mjesto se tako sastoji od katalitičkog mjesta koje čini katalitička trijada s oksanionskom šupljinom, kolinskog mjesta potrebnog za stabilizaciju pozitivno nabijenog kvaternog dijela kolinskih supstrata i nekih inhibitora, acilnog džepa u koji se smješta acilni dio supstrata i perifernog alosteričkog mjesta smještenog na rubu ždrijela koje je odgovorno za prepoznavanje kolinskih supstrata i njihovo daljnje usmjeravanje unutar aktivnog mjesta<sup>66,67</sup> (slika 11).

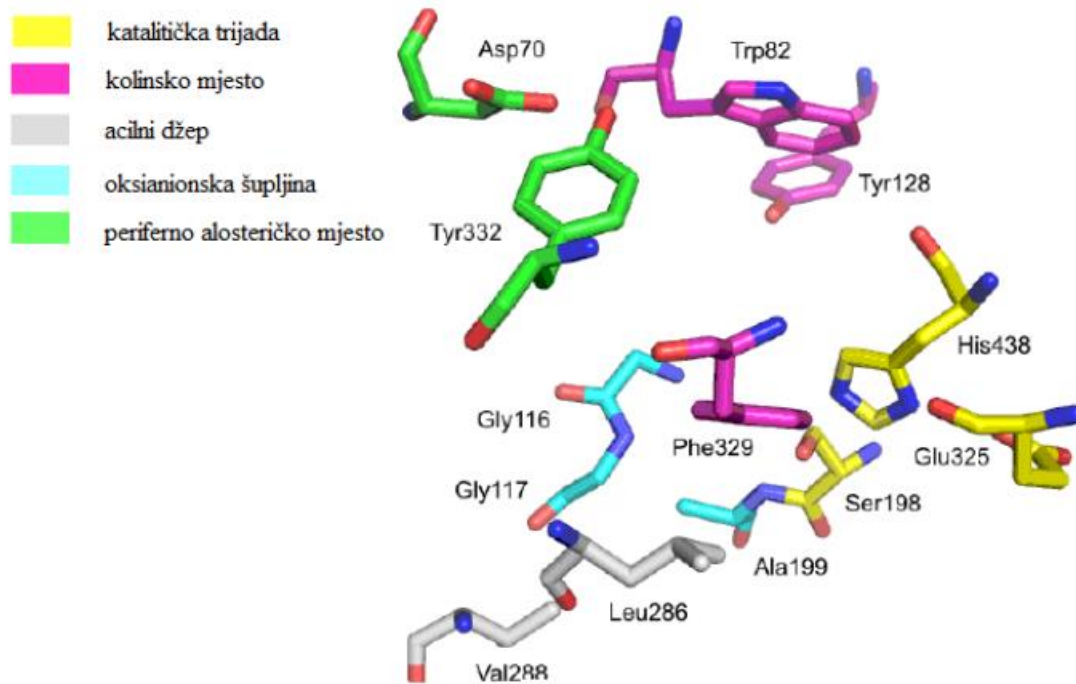


Slika 11. Shematski prikaz aktivnog mjesta kolinesteraza; strelica pokazuje smjer ulaska acetilkolina i njegovo pozicioniranje u aktivnom mjestu<sup>68</sup>.

AChE i BChE imaju razlike u sastavu aminokiselina pojedinih domena aktivnog mjesta, dok im se sastav aminokiselina koje čine katalitičku trijadu i mehanizam hidrolize podudara. Ukoliko dođe do mutacije bilo koje od aminokiselina koje čine katalitičku trijadu, kolinesteraze gube svoju katalitičku aktivnost<sup>69</sup>. Pozitivno nabijeni kvaterni dušik molekule supstrata ulaskom u aktivno mjesto enzima ostvaruje interakcije s aminokiselinskim ostacima u kolinskom mjestu prilikom čega usmjerava supstrat u pogodan položaj za hidrolizu<sup>70,71</sup>. Katalitička trijada koja se nalazi na dnu aktivnog mjesta odgovorna je za hidrolizu supstrata.

Katalitičku trijadu u ljudskoj AChE i BChE čine serin, histidin i glutamat. Kod AChE se nalaze na položajima 203, 447 i 334, dok kod BChE na 198, 438 i 325<sup>72</sup> (slika 12). Prilikom hidrolize supstrata nastaje prijelazno tetraedarsko stanje koje se stabilizira stvaranjem vodikovih veza s peptidnom okosnicom aminokiselina koje tvore oksanionsku šupljinu (slika 12)<sup>8</sup>. Oksanionsku šupljinu u ljudskoj AChE čine glicini na položajima 118 i 119 te alanin na položaju 201, dok se u BChE glicini na položajima 116 i 117, a alanin na 199<sup>8,73</sup>.





Slika 12. Shematski prikaz aktivnog mjesta ljudske BChE<sup>72</sup>.

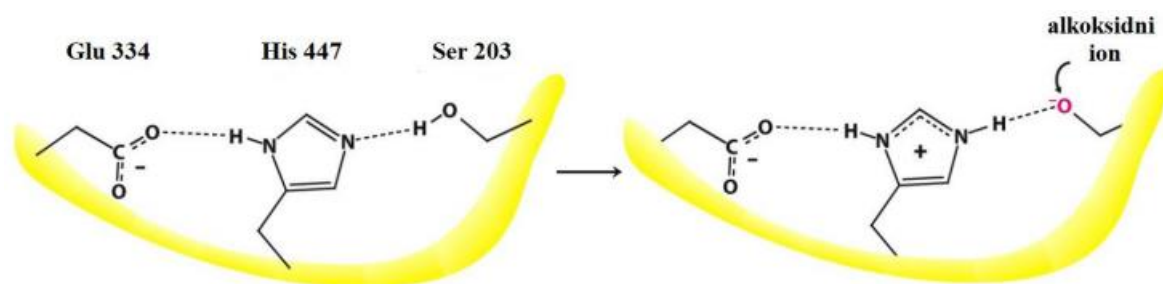
Kolinsko mjesto sastavljeno je od ogranaka aromatskih aminokiselina triptofana, tirozina i fenilalanina direktno uključenih u interakciju između veznog mjesta na enzimu i liganda. Oni omogućuju nastajanje interakcija kation-pi tipa. Uloga triptofana je orijentacija i smještanje nabijenog dijela supstrata čime se ubrzava hidroliza kolinskih supstrata. U odsutnosti fenilalanina, afinitet BChE je ugrožen<sup>67,74</sup>.

Uloga acilnog džepa je orijentirati acilnu skupinu supstrata prema reaktivnome serinu i ostatku enzima. Dimenzija acilnog džepa aktivnog mjesta ljudske AChE definirana je dvama fenilalaninima na položajima 295 i 297 čime je ograničen smještaj supstrata većih od propionilkolina. U acilnom džepu ljudske BChE alifatske aminokiseline leucin 286 i valin 288 zbog svojih manjih dimenzija smanjuju selektivnost enzima čime povećavaju spektar hidrolize supstrata u odnosu na AChE<sup>67,73,74</sup>.

U perifernom mjestu ljudske AChE nalaze se tirozini na položajima 72 i 124 te triptofan 286 važni za specifičnost inhibicije enzima pojedinim inhibitorima<sup>75</sup>. Pri visokim koncentracijama acetilkolina, periferno mjesto ključno je za alosterički mehanizam inhibicije enzima<sup>76</sup>. Ljudska BChE ima alifatske aminokiseline aspartat, glutamin i arginin zbog čega je otvor u ždrijelo veći pa BChE ima manji afinitet prema spojevima koji su specifični inhibitori AChE<sup>67</sup>. Aspartat 74, koji se nalazi u blizini ruba ždrijela i kolinskog mjesta ljudske AChE ima ulogu u stabilizaciji

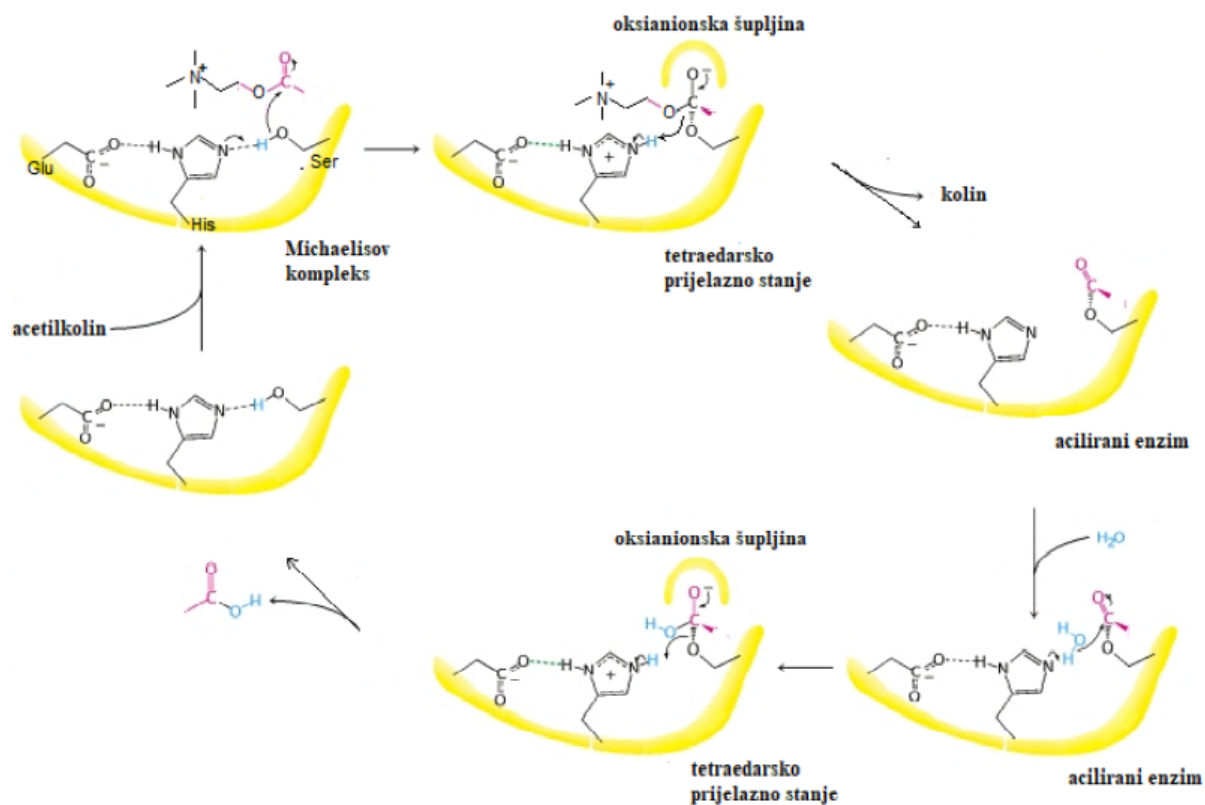
i prihvaćanju liganada i pravilnom orijentiranju pri ulasku u aktivno mjesto. BChE na odgovarajućem položaju ima aspartat 70 zaslužan za aktivaciju odnosno inhibiciju enzima. U ljudskoj BChE aspartat 70 i tirozin 332 smješteni su na ulazu u ždrijelo te obavljaju ulogu perifernog mjesta<sup>77,78</sup>.

Kada pozitivno nabijeni kvaterni dušik kolinskog estera uđe u aktivno mjesto, stvaraju se interakcije s aminokiselinskim ograncima u mjestu vezanja kolina koje pritom usmjeravaju supstrat u pogodan položaj za hidrolizu. Katalitička trijada sastavljena od serina, histidina i glutamata odgovorna je za hidrolizu supstrata (slika 13)<sup>70</sup>. Visoka reaktivnost katalitičkog serina rezultat je karakterističnog razmještaja aminokiselinskih ostataka katalitičke trijade. Uloga histidinskog ogranka 447 je polarizacija hidroksilne skupine katalitičkog serina čime on postaje podložniji deprotonaciji od ostalih serina. Glutamatni ogranak stvara vodikove veze s histidinom 447 te mu tako pomaže da se orijentira u položaj pogodan za stvaranje vodikove veze s hidroksilnom skupinom katalitičkog serina<sup>79</sup>.



Slika 13. Katalitička trijada ljudske AChE<sup>70</sup>.

Hidroliza kolinesterazama odvija se u tri koraka, stvaranje Michaelisovog kompleksa enzim-supstrat, aciliranje enzima i deaciliranje enzima vodom (slika 14). Aciliranje i deaciliranje odvija se preko tetraedarskog prijelaznog stanja sastavljenog od reaktivnog serina i supstrata, a samo prijelaznog stanje stabilizirano je vodikovim vezama s aminokiselinama oksanionske šupljine. U hidrolizi se stvara i intermedijer u kojem se na serinski ostatak enzima prenosi acilna skupina supstrata<sup>80</sup>.



Slika 14. Hidroliza acetilkolina u ljudskom AChE; crtkane linije su vodikove veze<sup>80</sup>.

Reakcija hidrolize potrebna je za vraćanje kolinergičkog neurona u stanje mirovanja nakon aktivacije<sup>55,56,57,58</sup>. Veliku važnost pridajemo AChE zbog njegove uloge u očuvanju homeostaze organizma obzirom da se prijenos živčanih impulsa bitnih za kontrakciju mišića, suženje zjenica, proširenje krvnih žila, održavanje stanja svijesti itd. odvija posredstvom acetilkolina<sup>70,79</sup>.

## 2.6. INHIBITORI KOLINESTERAZA

Funkcija inhibitora kolinesteraze jest blokiranje djelovanja enzima kolinesteraze koji sudjeluje u razgradnji acetilkolina. Blokiranjem njegove funkcije povećava se razina acetilkolina u sinaptičkom rascjepu (razmak između dva živčana završetka<sup>47</sup>. Kod osoba s Alzheimerovom bolešću smanjena je razina acetilkolina u mozgu te je stoga glavni cilj prilikom liječenja upravo inhibicija acetilkolinesteraza<sup>81,82</sup>. Inhibitori koji se koriste u terapiji liječe simptome vezane uz pamćenje, razmišljanje, jezik, prosuđivanje i druge misaone procese. Fiziološki procesi koji uzrokuju oštećenje mozga rezultat su uništavanja stanica koje proizvode i koriste acetilkolin, čime se smanjuje njegova količina potrebna za isporuku živčanih impulsa u drugim stanicama. Inhibicijom AChE održava se razina ACh čime se pojačava kolinergička neurotransmisija u regijama prednjeg mozga te se kompenzira gubitak funkcionalnih moždanih stanica<sup>83</sup>.

Alzheimerova bolest uzrokuje oštećenje kolinergičkog sustava odgovornog za obradu informacija u hipokampusu i neokorteksu te značajnog deficita acetilkolina. Neke od kliničkih manifestacija bolesti posljedica su gubitka kolinergičke inervacije moždane kore. Farmakološko liječenje AD-a je još uvijek simptomatsko, bez mogućnosti utjecaja na uzrok bolesti<sup>84,85</sup>.

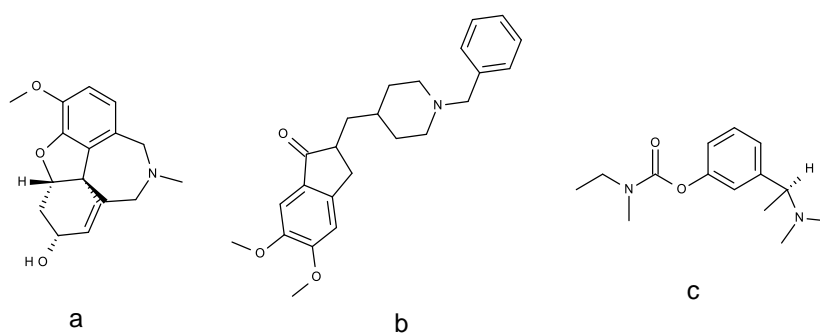
Razvijen je niz ChE (eng. *CholinEsterase*) inhibitora<sup>86,87</sup>. Tri lijeka za liječenje AD trenutno dostupna na tržištu jesu galantamin, donepezil i rivastigmin<sup>88,89,90</sup>. Međutim, učinkovitost ovih lijekova je ograničena. Svi navedeni lijekovi pokazali su različite nuspojave, osobito u većim dozama<sup>86,87</sup>. Galantamin i donepezil su AChE inhibitori<sup>86</sup>, dok je rivastigmin reverzibilni inhibitor i AChE i BChE. Donepezil je vrlo selektivan za AChE u usporedbi s BChE<sup>87</sup>.

Galantamin, alkaloid prisutan u mnogim biljkama<sup>91</sup>, koristio se kao lijek u Rusiji i istočnoeuropskim zemljama desetljećima za liječenje miopatije, miastenije i osjetilnosti i motoričkih deficita povezanih s CNS<sup>92</sup>. Istraživanja su pokazala da se galantamin veže za nikotinske kolinergične receptore. Inhibitorna aktivnost protiv ChE identificirana je 1950-ih<sup>93</sup>. Galantamin je odobren za liječenje AD 2001. godine<sup>89</sup>. Kemijska struktura galantamina predstavljena je na slici 15 (a). Galantamin je učinkoviti u liječenju kognitivnih simptoma. Postupno povećanje doze galantamina može povećati podnošljivost ovog lijeka<sup>94</sup>. Glavne nuspojave uključuju konvulzije, jaku mučninu, grčeve u želucu, povraćanje, nepravilno disanje, zbunjenost, mišićnu slabost i suženje očiju<sup>95</sup>.

Godine 1996. lijek donepezil odobren je za liječenje blagog do umjerenog AD (slika 15, b)<sup>88</sup>. Iako odobren, donepezil uzrokuje razne nuspojave (nesanica, mučnina, gubitak apetita, proljev,

grčevi u mišićima i mišićna slabost). Kod pacijenata liječenima visokim dozama donepezila uočen je niski krvni tlak, jako povraćanje, mišićna slabost, jaka mučnina, problemi s disanjem i bradikardija<sup>96</sup>. Donepezil inhibira kolinesteraze te također djeluje i na razini neurotransmitera i na molekularnoj i staničnoj razini u gotovo svim fazama uključenim u patogenezu AD<sup>97</sup>. Pokazuje jedinstvenu molekularnu strukturu koja uzrokuje istovremenu inhibiciju aktivnog i perifernog anionskog mjesta (PAS – eng. *Peripheral Anionic Site*) TcAChE. Međutim, donepezil ne komunicira izravno s oksianionskom rupom ili katalitičkom trijadom<sup>98</sup>.

Rivastigmin je odobren za liječenje blagog do umjerenog AD 2000. godine. Također, korišten je za liječenje demencija povezanih s Parkinsonovom bolešću<sup>99</sup>. Iako do danas nije poznat mehanizam djelovanja rivastigmina, stoji pretpostavka da bi povećanjem kolinergičkih funkcija mogao izvršiti svoje farmakološko djelovanje<sup>90</sup>. Rivastigmin tartrat cilja i AChE i BChE. Rivastigmin tartrat, karbamat koji se veže za AChE, cijepa rivastigmin u razne fenolne derivate koji se brzo izlučuju iz tijela<sup>100</sup>. Karbamat se veže za ES AChE s više afiniteta od acetatne količine ACh tijekom hidrolize acetilkolina. Stoga je enzimu potrebno puno vremena za inaktivaciju<sup>100</sup>. To objašnjava neobično sporu aktivacijsku kinetiku<sup>90</sup>. Rivastigmin ima puno nuspojava (bol u želucu, gubitak težine, proljev, gubitak apetita, mučnina i povraćanje). Predoziranje rivastigminom uzrokuje brojne simptome (nepravilno, brzo ili sporo disanje, bol u prsima i sporo ili nepravilan rad srca). Struktura rivastigmina je prikazana na slici 15 (c)<sup>101</sup>.



Slika 15. Kemijske strukture inhibitora kolinesteraza<sup>102</sup>.

Polu maksimalne inhibitorne koncentracije ( $IC_{50}$  – eng. *Inhibitory Concentration*) predstavlja mjeru potencije tvari u inhibiranju određene biološke ili biokemijske funkcije.  $IC_{50}$  je kvantitativne prirode te pokazuje koliko određene inhibitorne tvari (npr. lijeka) treba da bi se određeni biološki proces ili biološka komponenta inhibirala za 50%. Pod biološkom

komponentom se podrazumijeva enzim, stanica, stanični receptor ili pak mikroorganizam. Vrijednost  $IC_{50}$  izražava se kao molarna koncentracija.

$IC_{50}$  je najčešće mjera potencije antagonističkih lijekova u farmakološkim istraživanjima. Moguće ga je uspoređivati s drugim mjerama potencije, primjerice s  $EC_{50}$  (eng. *Excitatory Concentration*) za ekscitatorne lijekove.  $EC_{50}$  je doza ili koncentracija plazme potrebna za dobivanje 50% maksimalnog učinka *in vivo*.

$IC_{50}$  se određuje funkcionalnim testovima ili testovima za vezivanje konkurencije.

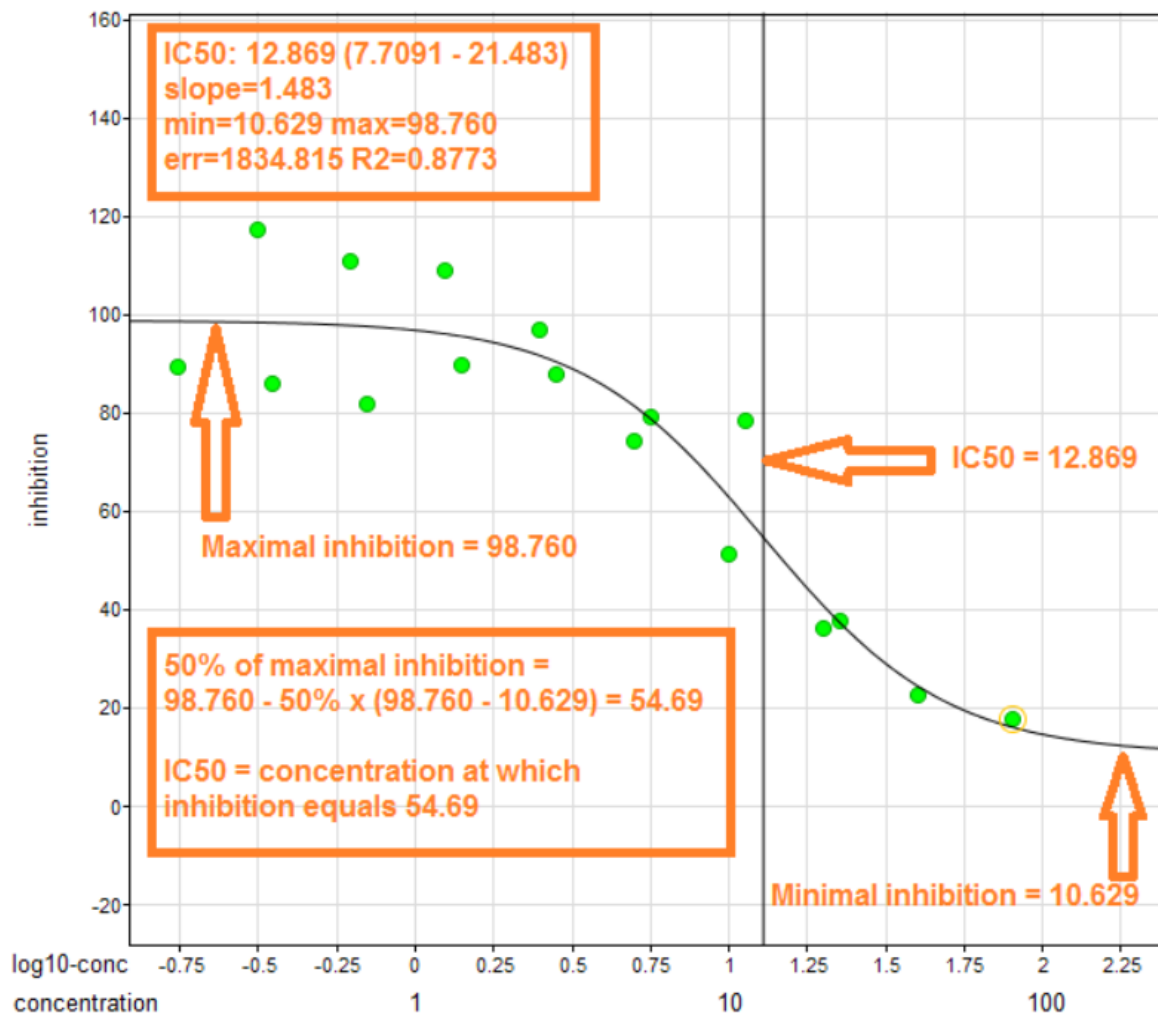
$IC_{50}$  vrijednost se može pretvoriti u  $pIC_{50}$  oblik:

$$pIC_{50} = -\log_{10}(IC_{50})$$

Veće vrijednosti  $pIC_{50}$  znače eksponencijalno snažnije inhibitore.  $pIC_{50}$  se obično izražava u obliku molarne koncentracije (mol/L ili M) što zahtijeva izražavanje  $IC_{50}$  u jedinicama M.

Vrijednost  $IC_{50}$  nekog lijeka određuje se konstruiranjem krivulje odgovora na dozu i ispitivanjem učinka različitih koncentracija antagonista na preokret agonističke aktivnosti. Vrijednost  $IC_{50}$  također se može odrediti za određeni antagonist određivanjem koncentracije potrebne za inhibiciju polovice maksimalnog biološkog odgovora agonista.  $IC_{50}$  vrijednost se može koristiti kako bi se usporedile potencije dva antagonista.

Vrijednost  $IC_{50}$  ovisi o uvjetima u kojima se mjeri. Generalno, veća koncentracija inhibitora znači smanjenu agonističku aktivnost. Nadalje, kako raste agonistička koncentracija, tako se povećava vrijednost  $IC_{50}$ . Također, neki drugi čimbenici mogu utjecati na vrijednost  $IC_{50}$ : kod enzima ovisnih o ATP, vrijednost  $IC_{50}$  ima međuovisnost s koncentracijom ATP, posebice ako se radi o kompetitivnoj inhibiciji<sup>103</sup>.



Slika 16. Dobivanje vrijednosti  $IC_{50}$ <sup>102</sup>.

Slika 16 pokazuje vizualnu demonstraciju kako dobiti vrijednost  $IC_{50}$ . Potrebno je rasporediti podatke s inhibicijom na vertikalnoj osi i log (koncentracija) na vodoravnoj osi. Zatim je potrebno identificirati maksimalnu i minimalnu inhibiciju. Krivulja koja prolazi kroz razinu inhibicije od 50% je vrijednost  $IC_{50}$ <sup>103</sup>.

Tablica 1. Uloga inhibitora AChE u liječenju Alzheimerove bolesti i vrijednosti IC<sub>50</sub><sup>104</sup>.

<b>INHIBITOR AChE</b>	<b>ULOGA</b>	<b>VRIJEDNOST IC<sub>50</sub>/</b> <b>μM<sup>102</sup></b>
galantamin	Pokazuje jaku <i>in vitro</i> AChE inhibicijsku aktivnost, lijek za rane faze AD, karakterizira ga selektivnost i kompetitivnost prema AChE, dugo djelovanje i reverzibilnost	0.15
donepezil	Piperidinski inhibitor kolinesteraza, selektivni inhibitor AChE, nije štetan za jetru, ali uzrokuje nuspojave	6.7
rivastigmin	Inhibira kolinesteraze u dijelovima mozga s najvećim kolinergičkim deficitom kod AD pacijenata, izaziva nuspojave (mučnina, povraćanje)	4.3



## 3. REZULTATI I RASPRAVA

### 3.1. UVOD

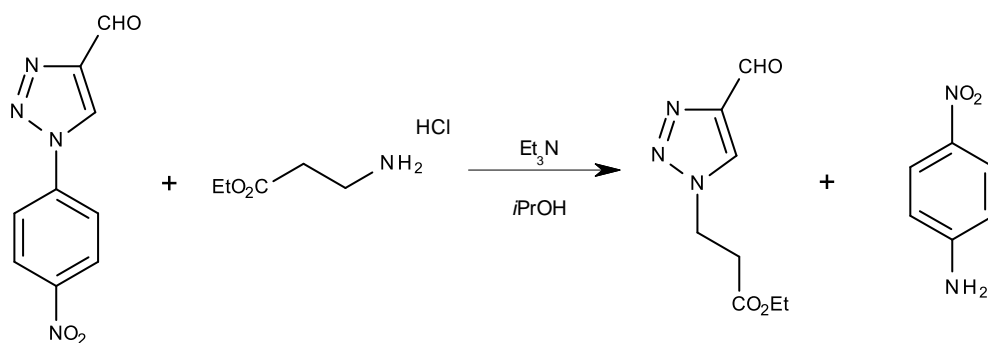
Tienobenzotriazoli već su istraživani spojevi zbog svoje potencijalne inhibicijske aktivnosti prema kolinesterazama<sup>105-107</sup>. Cilj ovog rada bio je sintetizirati nove tienobenzotriazole, ispitati njihove sposobnosti inhibicije prema kolinesterazama, procijeniti selektivnost njihove inhibicije te interpretirati rezultate molekularnim modeliranjem. Provedena su dva različita sintetska puta, fotociklizijski i alternativni kondenzacijski put. Fotociklizijskim putem osvijetljavanjem na valnoj duljini od 313 nm dobiven je esterski derivat u visokom iskorištenju. Alternativni put pokazao se dobrim u slučajevima kada fotociklizacija ne može biti provedena te je dao širok spektar molekula dihidro-tienobenzotriazola i aromatiziranih tienobenzotriazola. Reakcijom kondenzacije najprije su iz odgovarajućih amina sintetizirani dihidro-tienobenzotriazoli koji su potom u reakciji aromatizacije dali konačne spojeve, aromatizirane tienobenzotriazole. Sintetizirani spojevi spektroskopski su okarakterizirani pomoću <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara, te masene spektrometrije.

### 3.2. FOTOCIKLIZACIJSKA SINTEZA

Jedan od 15 novih tienobenzotriazola pripremljen je fotociklizijskim putem iz odgovarajućeg triazolo-tienostilbena. Triazolo-tienostilben, kao smjesa *cis*- i *trans*- izomera dobiven je Wittigovom reakcijom iz 2-tienil-fosfonijeve soli u apsolutnom etanolu, uz natrijev etoksid kao bazu i iz odgovarajućeg triazolnog aldehida.

#### 3.2.1. SINTEZA ETIL-3-(4-FORMILTRIAZOL-1-IL)PROPANOATA

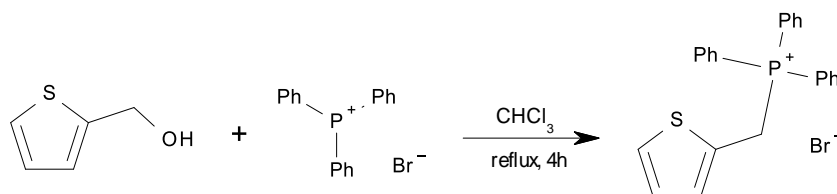
Prvi korak u sintezi konačnog estera jest dobivanje etil-3-(4-formiltriazol-1-il)propanoata (Shema 1). U reakciji supstitucije kao polazni reaktanti korišteni su 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbalhid i beta-alanin-etil-esterski hidroklorid, uz prisutnost trietilamina kao baze i izopropilnog alkohola kao otapala. Ester je pročišćen kolonskom kromatografijom koristeći (20% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluensu.



Shema 1. Sinteza etil-3-(4-formiltriazol-1-il)propanoata.

### 3.2.2. SINTEZA TRIFENIL(2-TIENILMETIL)FOSFONIJEVA BROMIDA

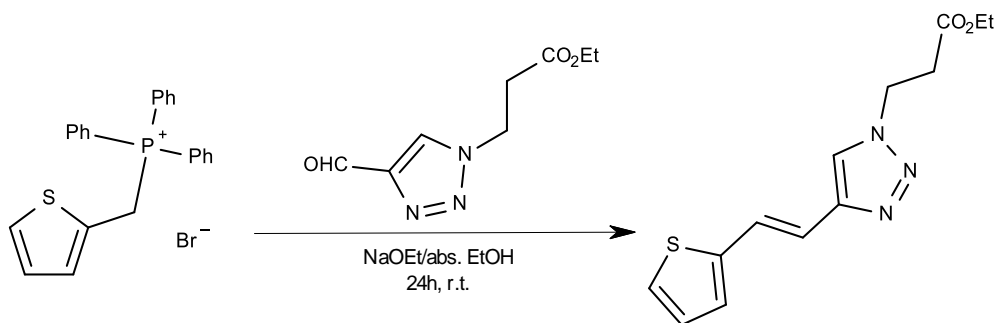
Slijedeći korak bitan za sintezu konačnog esterskog derivata jest dobivanje trifenil(2-tienilmetil)fosfonijeva bromida (Shema 2). Bromid je dobiven reakcijom supstitucije tiofenilmetanola i trifenilfosfin-hidrobromida, uz prisutnost kloroforma kao otapala. Dobivena bijela sol korištena je u slijedećem koraku bez prethodnog pročišćavanja.



Shema 2. Sinteza trifenil(2-tienilmetil)fosfonijeva bromida.

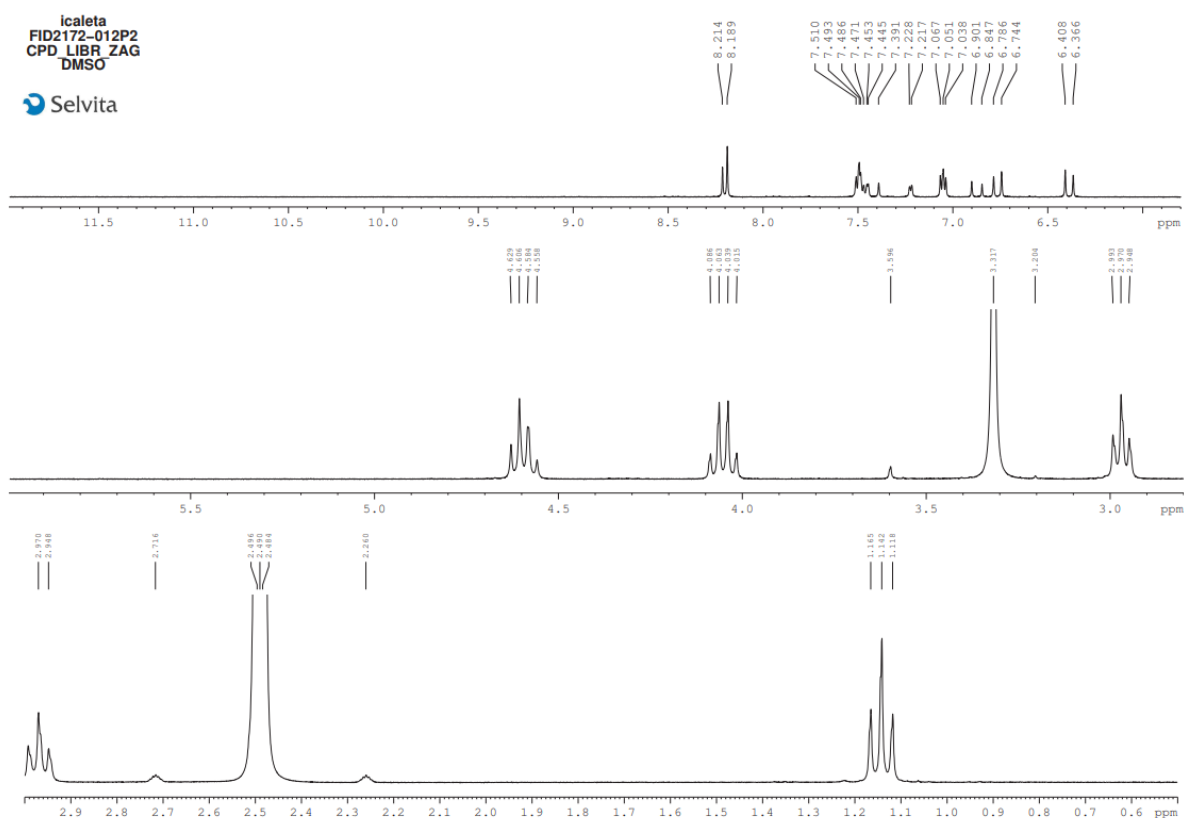
### 3.2.3. SINTEZA ETIL-3-[4-[(E)-2-(2-TIENIL)VINIL]TRIAZOL-1-IL]PROPANOATA

Etil-3-[4-[(E)-2-(2-tienil)vinil]triazol-1-il]propanoat sintetiziran je Wittigovom reakcijom iz prethodno dobivenog formilnog estera i fosfonijeve soli uz prisutnost natrijeva etoksida kao baze i apsolutnog etanola kao otapala (Shema 3). Dobiveni produkt je smjesa *cis*- i *trans*-izomera u omjeru 3 : 1 prema  $^1\text{H}$  NMR spektroskopiji i u iskorištenju od 80%.



Shema 3. Sinteza etil-3-[4-[(*E*)-2-(2-tienil)vinil]triazol-1-il]propanoata.

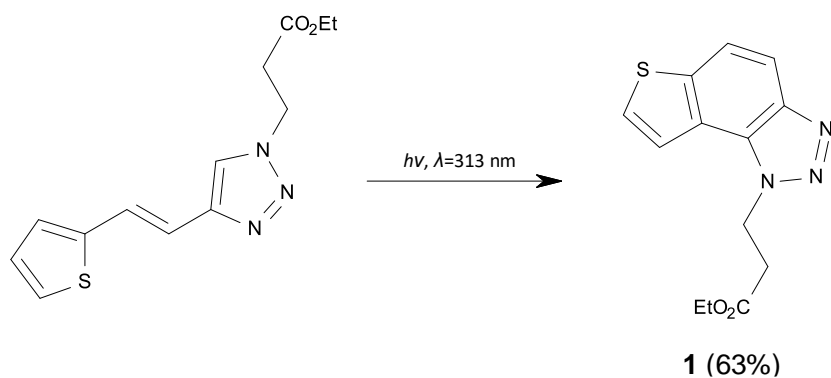
Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom koristeći (20% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluensu te je dobivena čista smjesa izomera (Slika 17) pogodna za fotokemijsku ciklizaciju.



Slika 17. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) spektar početnog tieno-triazolostilbena.

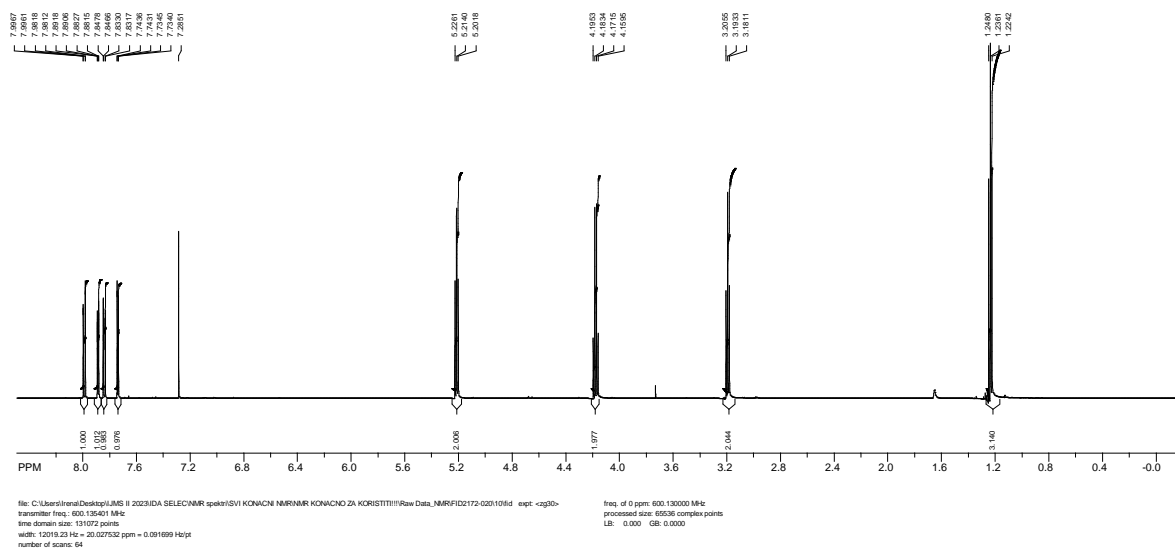
### 3.2.4. SINTEZA ETIL-3-(1*H*-TIENO[3',2':3,4]BENZO]1,2-*d*][1,2,3]TRIAZOL-1-IL)PROPANOATA **1**

Konačan korak u dobivanju tienobenzo-triazola **1** jest reakcija fotociklizacije (Shema 4). Osvjetljavanjem smjese izomera etil-3-[4-[(*E*)-2-(2-tienil)vinil]triazol-1-il]propanoata na 300 nm dobiven je fotociklizijski produkt etil-3-(1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo]1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)propanoat **1**.

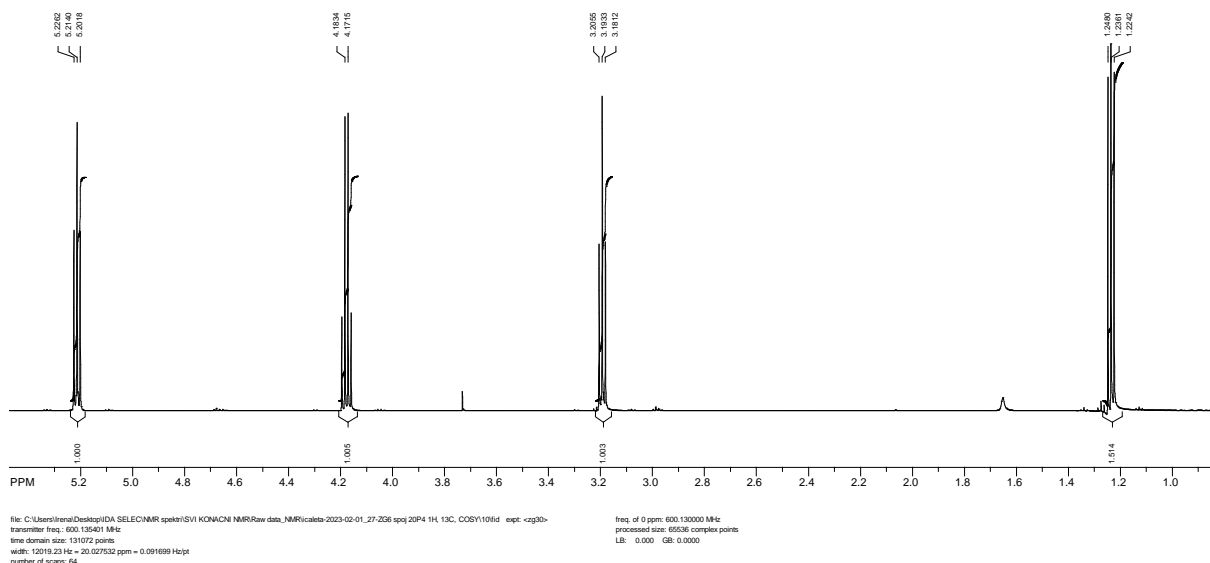


Shema 4. Sinteza etil 3-(1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo]1,2-*d*)[1,2,3]triazol-1-il)propanoata (**1**).

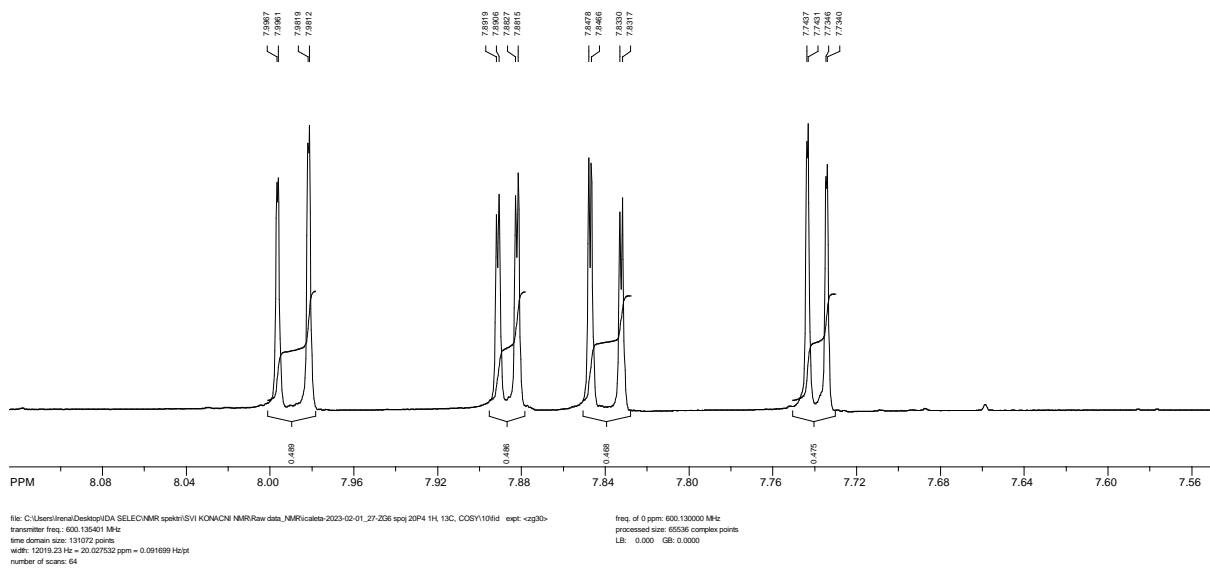
Kruti produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom koristeći (20% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluens i dobiven u 63%-tnom iskorištenju. U NMR spektru tienobenzo-triazola **1** (Slike 18-20) uočava se izostanak signala etilenskih protona i singletnih protona na 1,2,3-triazolnom prstenu u usporedbi s početnim tieno-triazolostilbenom.



Slika 18. <sup>1</sup>H NMR spektar (CDCl<sub>3</sub>) tienobenzo-triazola **1**.



Slika 19. Alifatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienbenzo-triazola **1**.



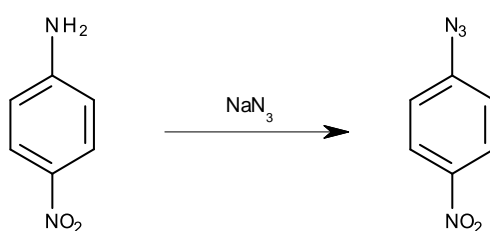
Slika 20. Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienbenzo-triazola **1**.

### 3.3. ALTERNATIVNA SINTEZA

Za dobivanje preostalih 14 spojeva korišten je alternativni pristup. Prvi korak u alternativnom pristupu jest dobivanje dihidro-tienbenzo-triazola **2-8** reakcijom kondenzacije popraćen aromatizacijom za dobivanje konačnih tienbenzo-triazola **9-15**.

#### 3.3.1. SINTEZA 1-AZIDO-4-NITROBENZENA

1-azido-4-nitrobenzen, kao jedan od polaznih reaktanata za sintezu dihidro-tienbenzo-triazola **2-8**, produkt je reakcije supstitucije 4-nitroanilina i natrijeva azida (Shema 5).

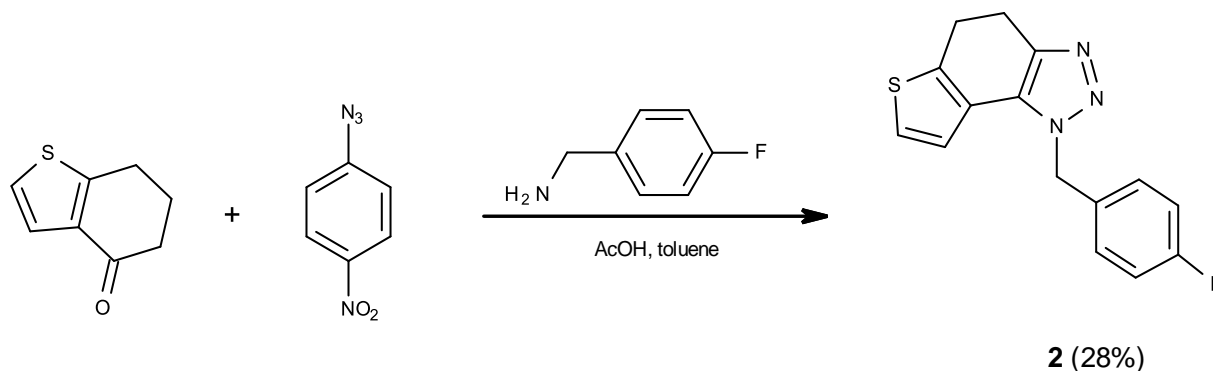


Shema 5. Dobivanje 1-azido-4-nitrobenzena.

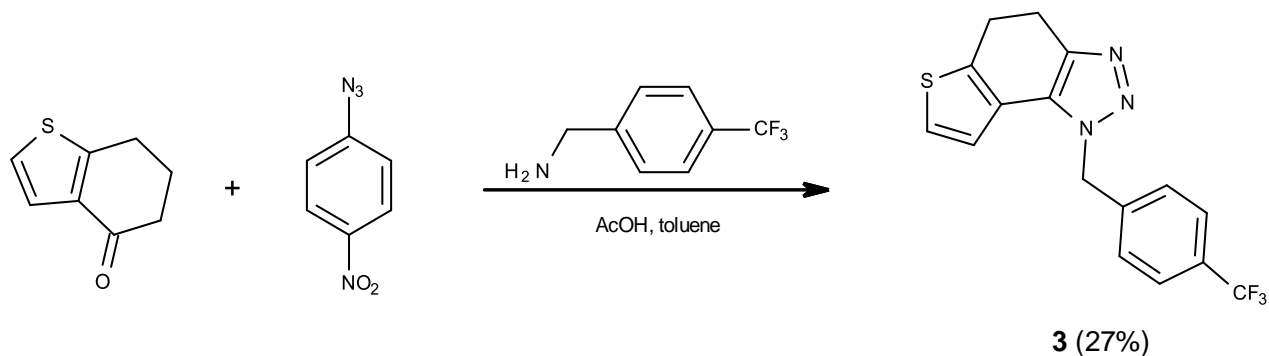
Dobivena krutina koristi se u daljnjim koracima bez pročišćavanja.

#### 3.3.2. SINTEZA DIHIDRO-TIENOBENZO-TRIAZOLA **2-8**

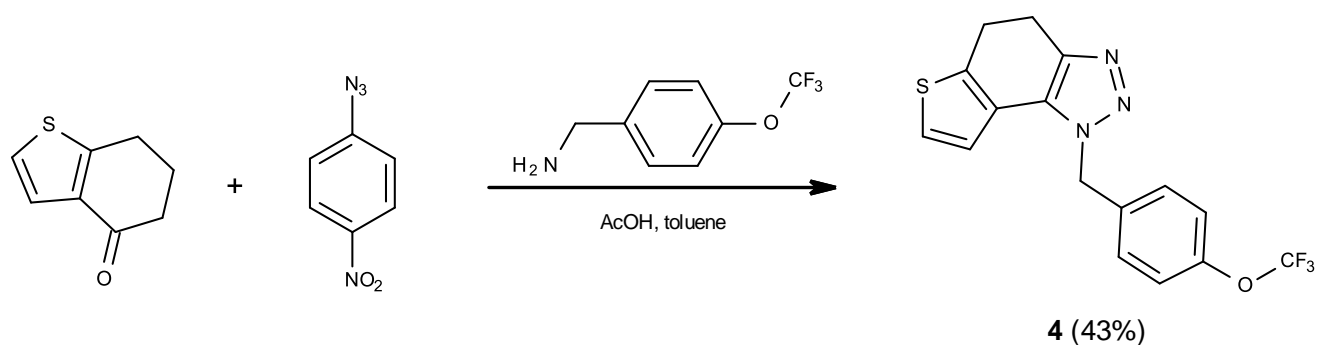
Polazni reaktanti u reakciji kondenzacije (Sheme 6-12) jesu 4-keto-4,5,6,7-tetrahidrotionaften i 1-azido-4-nitrobenzen, uz prisutnost octene kiseline i toluena kao otapala. Konačni produkti reakcije supstitucije nitro-skupine s odgovarajućim aminom jesu dihidro-tienbenzo-triazoli **2-8**.



Shema 6. Sinteza 1-(4-fluorbenzil)-4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**2**).

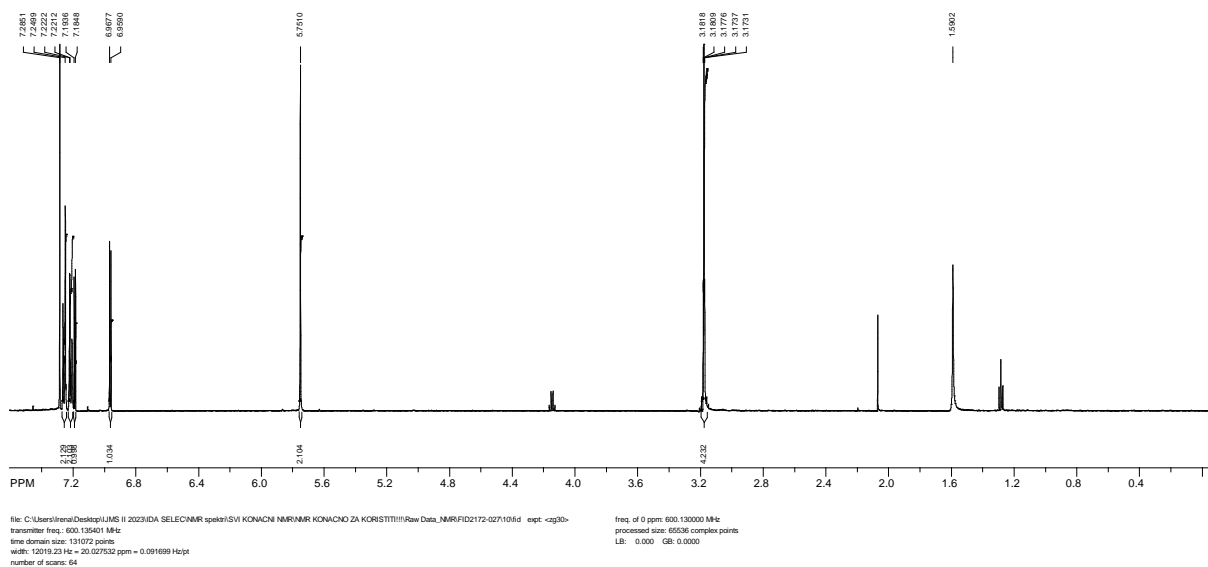


Shema 7. Sinteza 1-(4-(trifluorometil)benzil)-4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**3**).

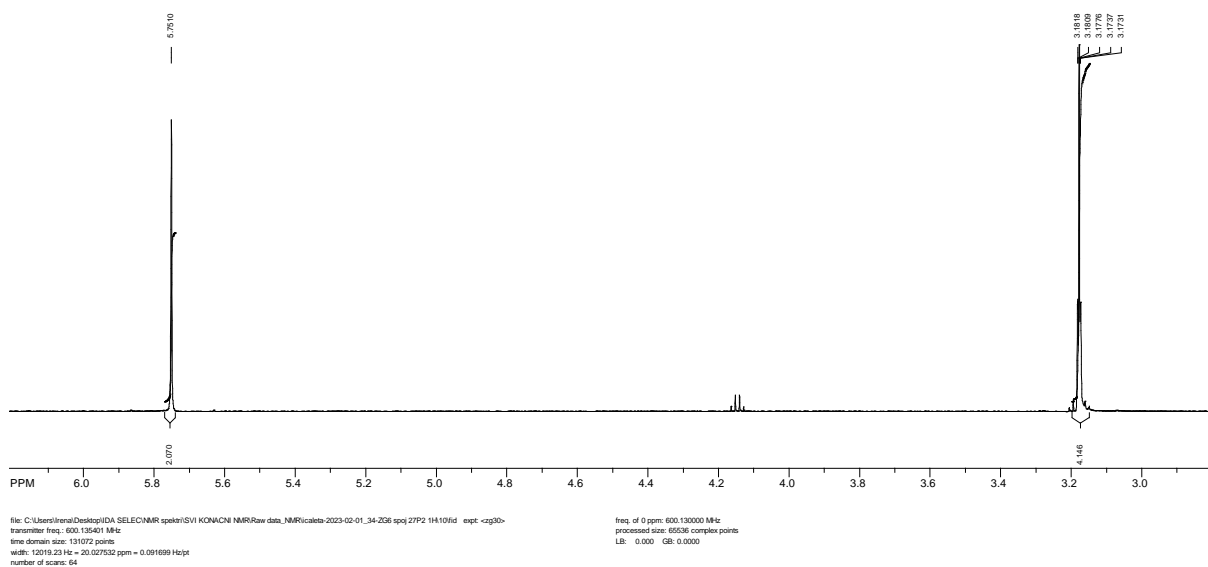


Shema 8. Sinteza 1-(4-(trifluorometoksi)benzil)-4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**4**).

Karakteristični signali u  $^1\text{H}$  NMR spektru za tienobenzo-triazol **4** (Slike 21-23) jesu benzenski dubleti na 7.26 i 7.22 ppm te tiofenski dubleti na 7.19 i 6.96 ppm. U alifatskom dijelu uočava se singlet na 5.75 ppm metilenske skupine vezane na dušik triazolnog prstena te triplet na 3.18 ppm metilenskih skupina fuzioniranog šesteročlanog prstena.

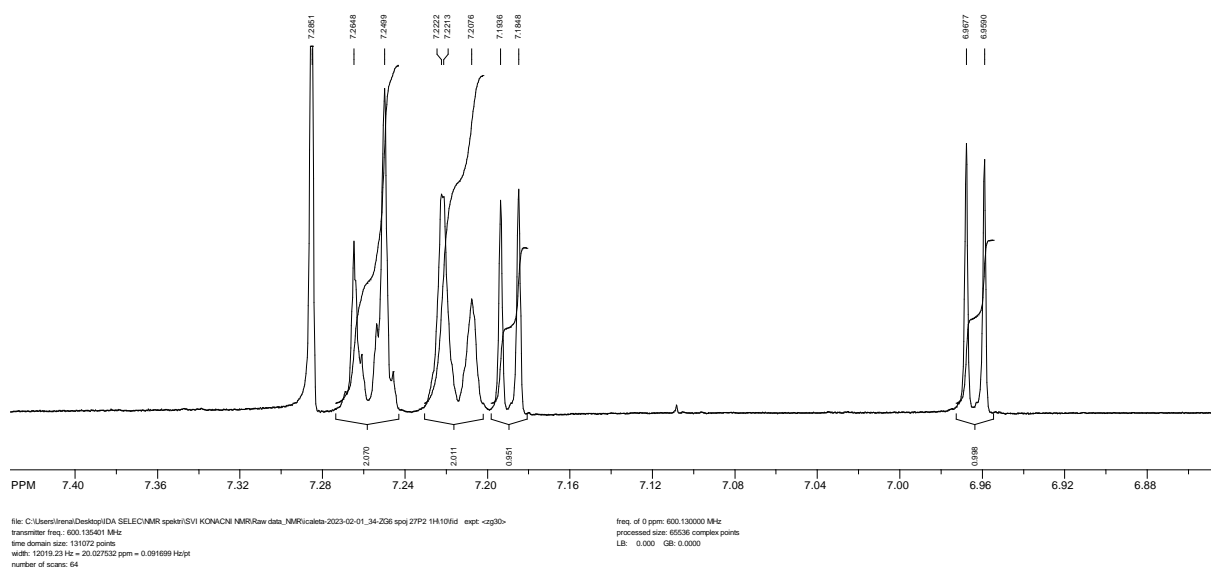


Slika 21.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektr tienbenzo-triazola **4**.

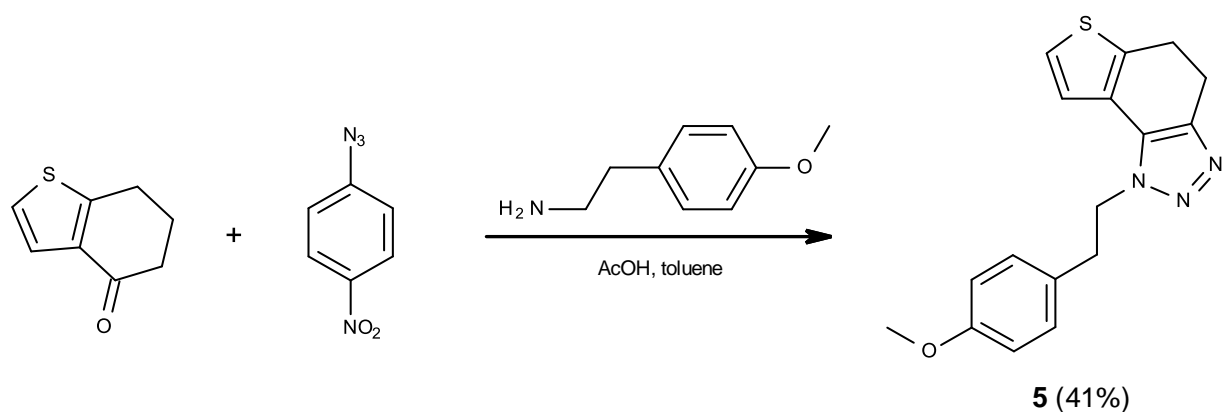


Slika 22. Alifatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienbenzo-triazola **4**.

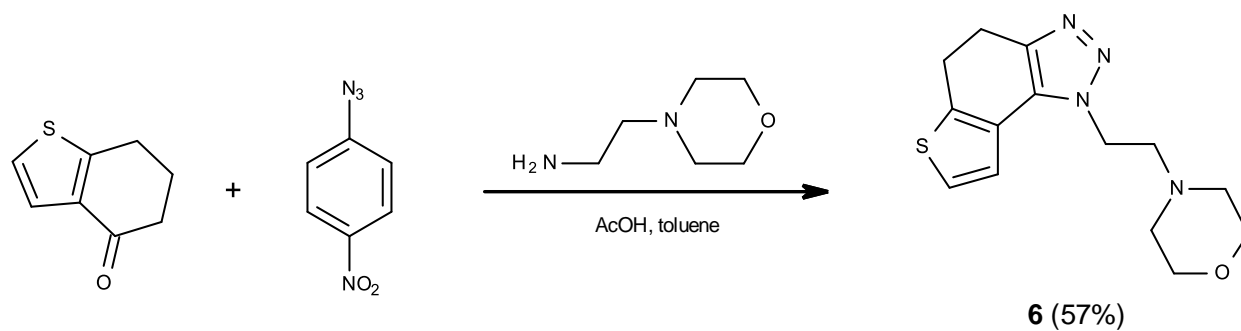




Slika 23. Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienobenzo-triazola **4**.

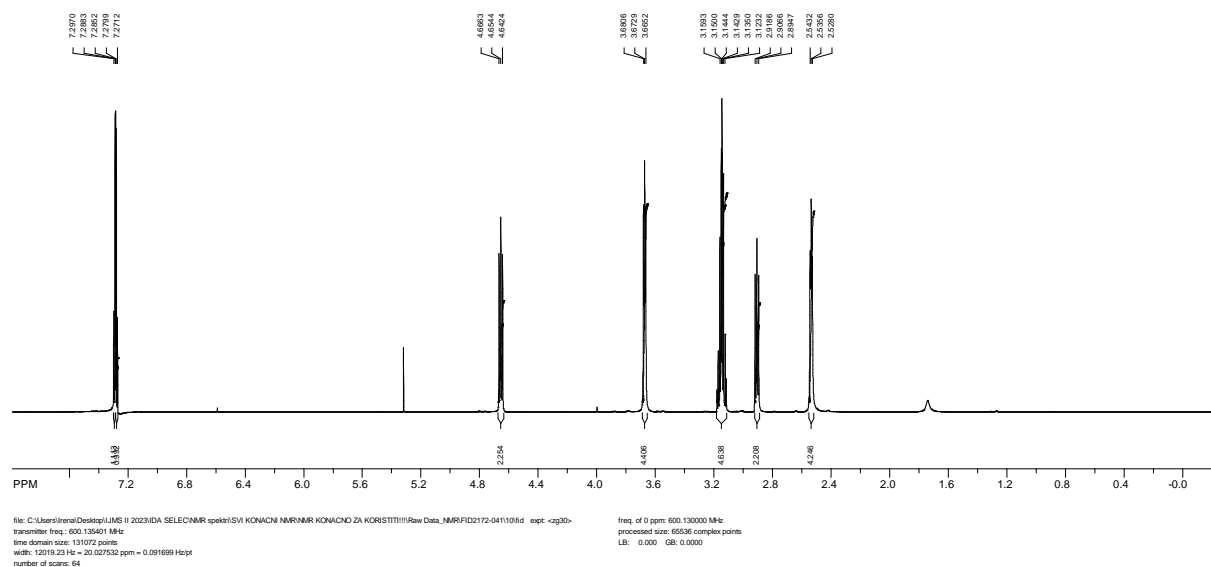


Shema 9. Sinteza 1-(4-(trifluormetoksi)benzil)-4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**5**).

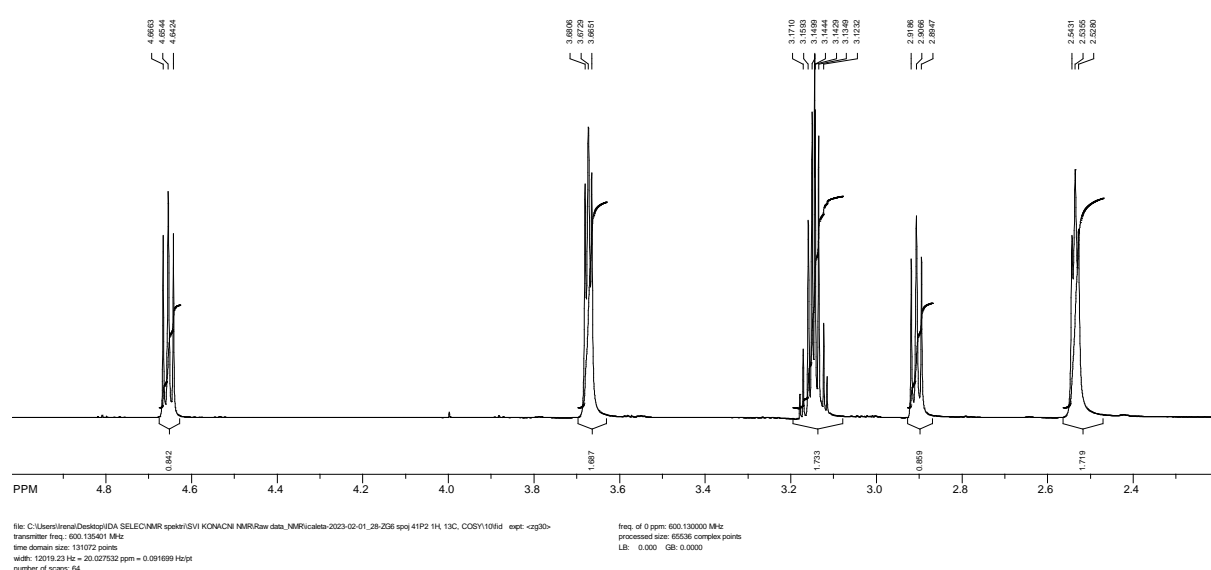


Shema 10. Sinteza 4-(2-(4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)etil)morfolina (**6**).

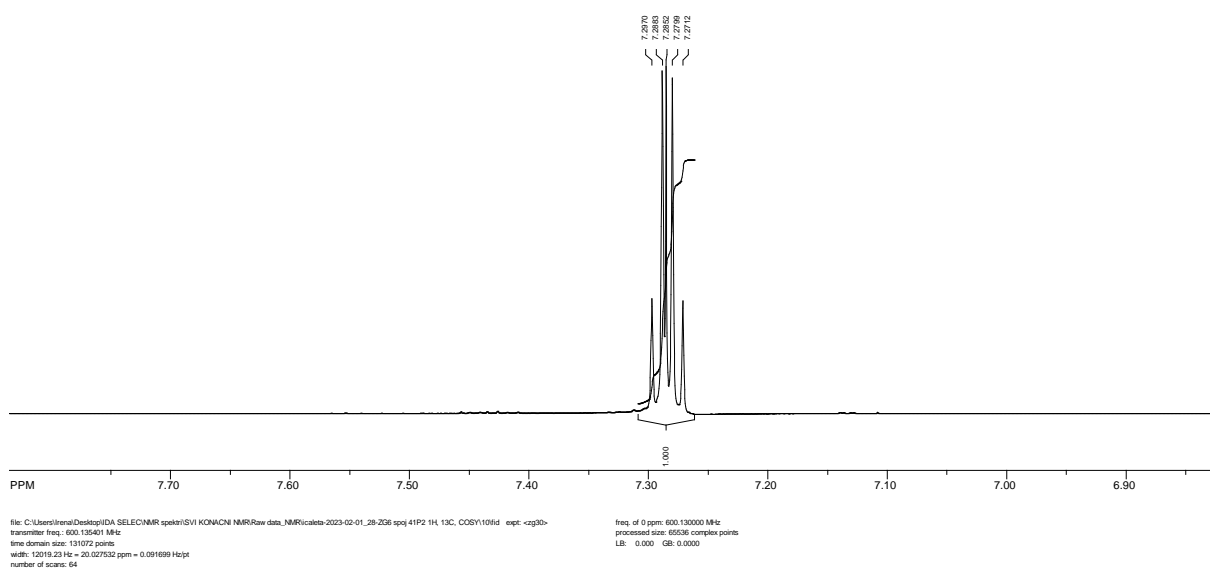
U alifatskom dijelu NMR spektra uočavamo signale na 3.67 i 2.53 ppm koji su karakteristični za morfolinske  $-CH_2$  skupine. Također, uočavamo i metilenske signale vezane na dušik triazolnog odnosno morfolinskog prstena na 4.65 i 2.91 ppm. Multiplet metilenskih skupina fuzioniranog šesteročlanog prstena javlja se na 3.18-3.12 ppm, dok u aromatskom dijelu triazolni prsten daje multiplet u rasponu 7.29-7.27 ppm (Slike 24-26).



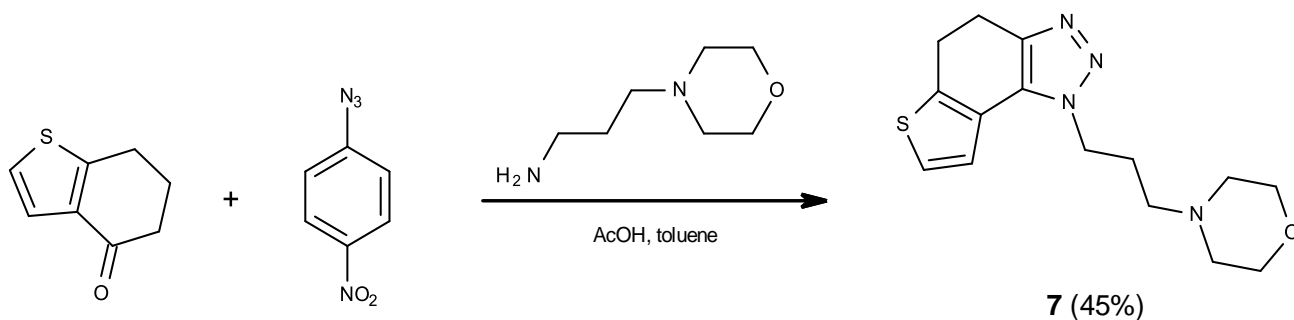
Slika 24.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ) spekter tienbenzo-triazola **6**.



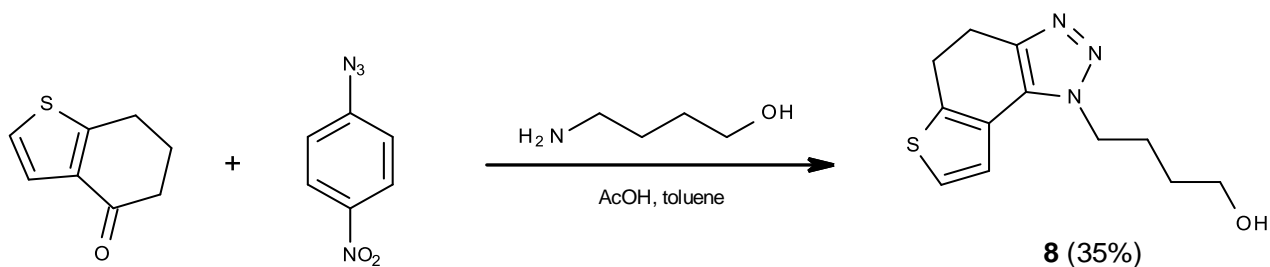
Slika 25. Alifatski dio  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ) spektra tienbenzo-triazola **6**.



Slika 26. Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienobenzo-triazola **6**.



Shema 11. Sinteza 4-(3-(4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)propil)morfolina (**7**).

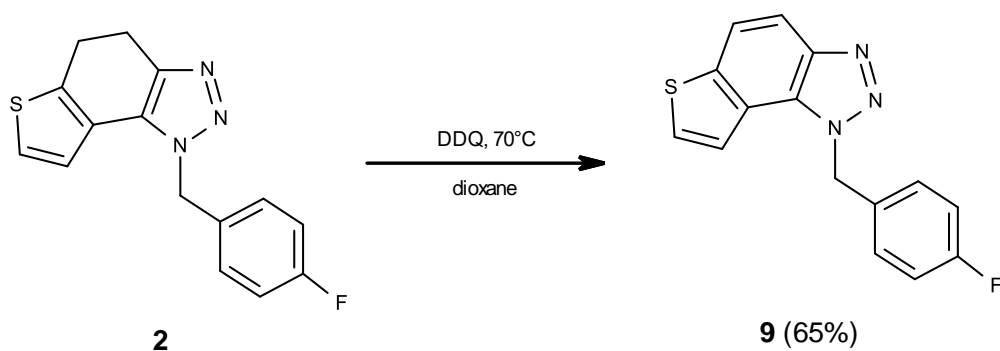


Shema 12. Sinteza 4-(4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)butan-1-ola (**8**).

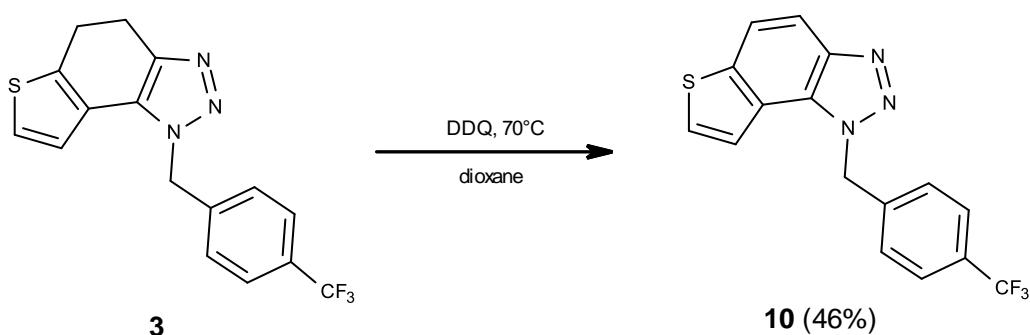
Sirovi produkti **2-8** pročišćeni su metodom kolonske kromatografije koristeći odgovarajući sustav otapala. Svi sintetizirani spojevi spektroskopski su okarakterizirani koristeći NMR i HRMS analize.

### 3.3.3. SINTEZA AROMATIZIRANIH TIENOBENZO-TRIAZOLA **9-15**

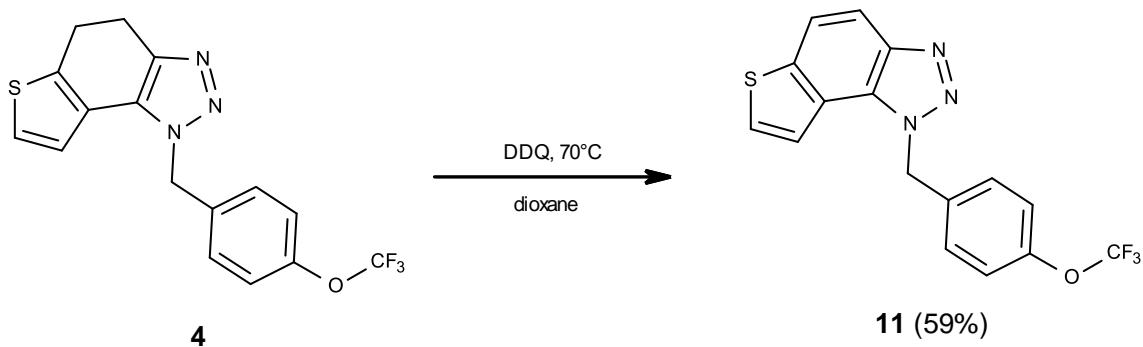
Prehodno sintetizirani dihidro-tienobenzo-triazoli **2-8** podvrgnuti su reakciji aromatizacije koristeći 2,3-diklor-5,6-dicijano-1,4-benzokinon (DDQ) kao oksidans i dioksan kao otapalo. Konačni produkti jesu aromatizirani tienobenzo-triazoli **9-15** (Sheme 13-19 s naznačenim izoliranim iskorištenjima).



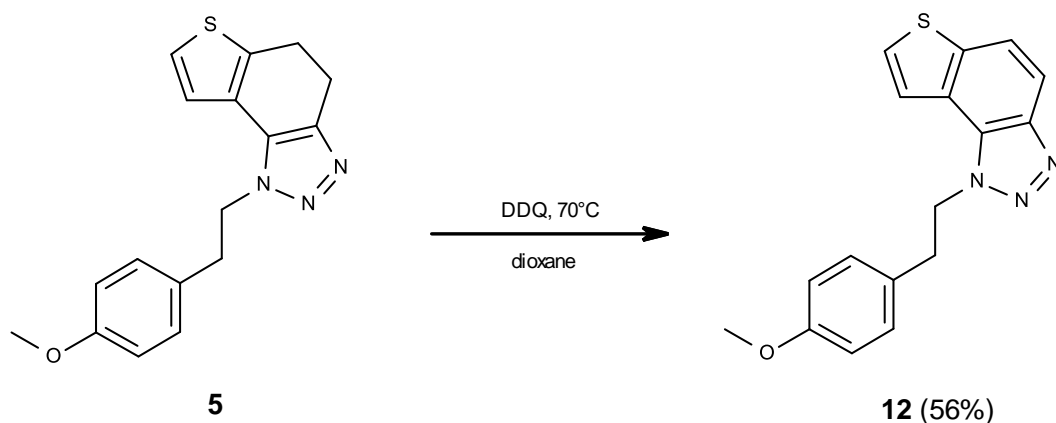
Shema 13. Sinteza 1-(4-fluorbenzil)-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**9**).



Shema 14. Sinteza 1-(4-(trifluorometil)benzil)-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**10**).

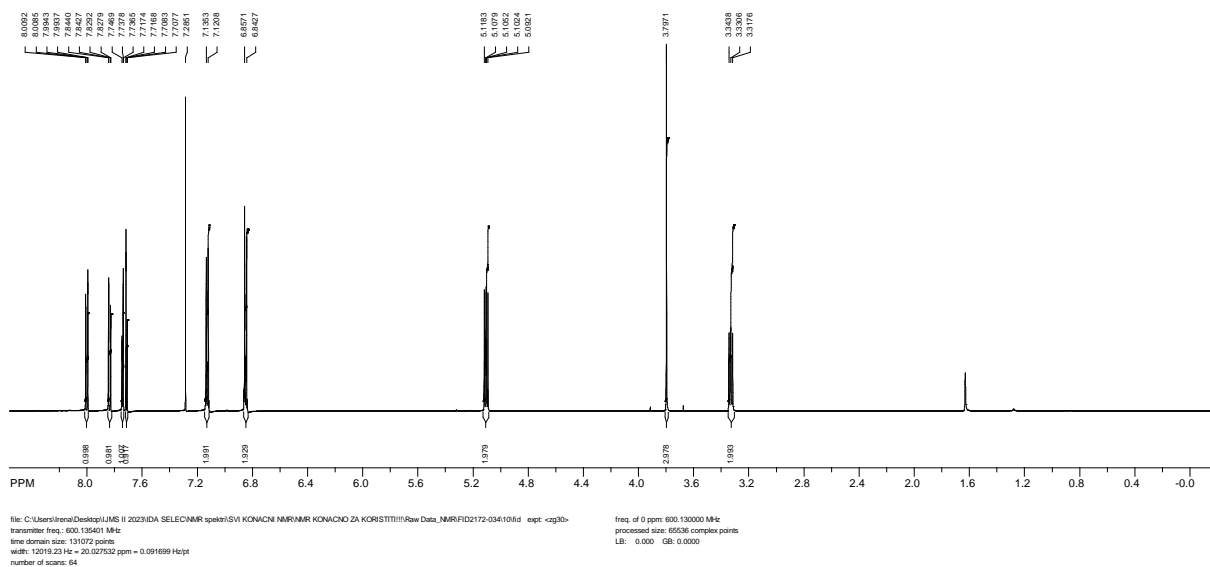


Shema 15. Sinteza 1-(4-(trifluormetoksi)benzil)-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**11**).

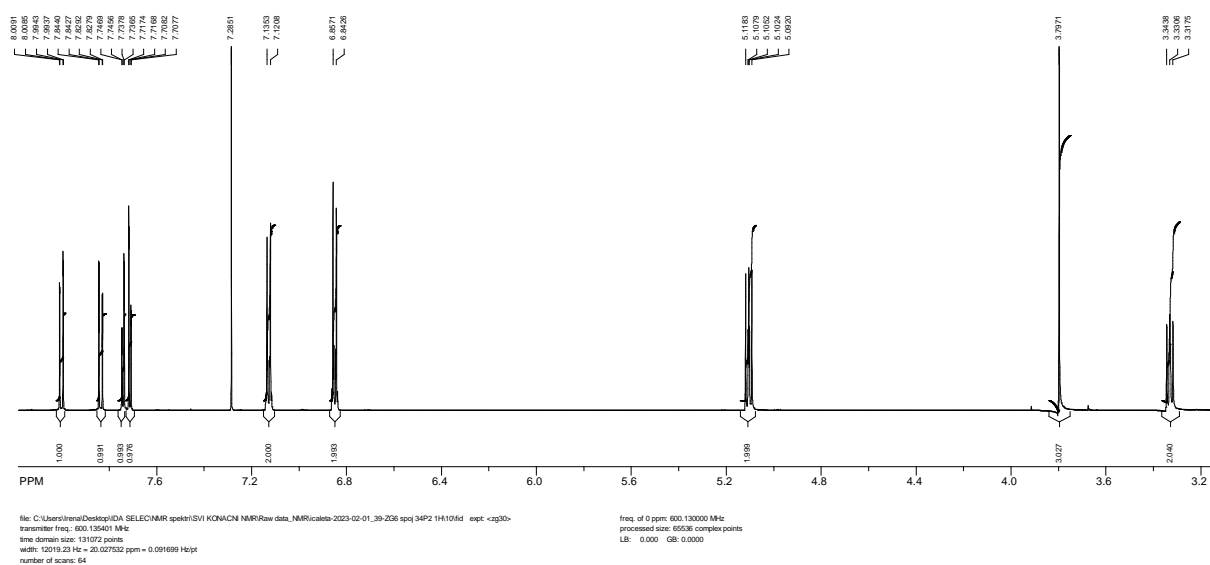


Shema 16. Sinteza 1-(4-metoksifenetil)-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazola (**12**).

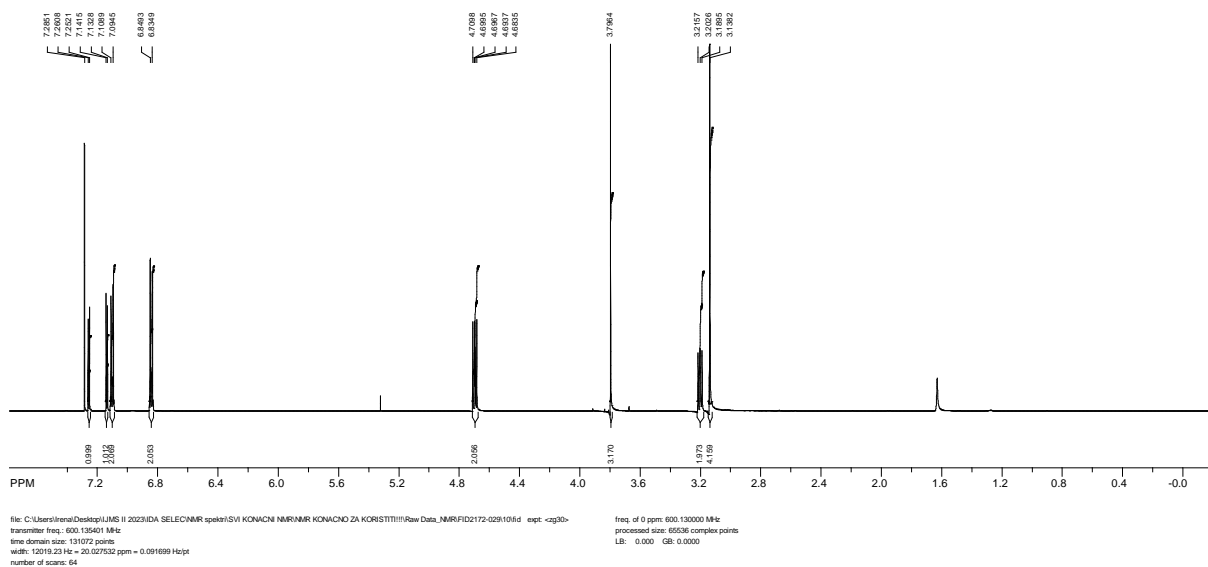
Usporedbom NMR spektara aromatiziranog spoja **12** (Slike 27 i 28) i njegovog nearomatiziranog para **5** (Slike 29-31) uočava se izostanak singleta (3.14 ppm) metilenskih protona fuzioniranog šesteročlanog prstena, odnosno pojava dva dubleta na 7.99 i 7.84 ppm uslijed aromatizacije šesteročlanog prstena.



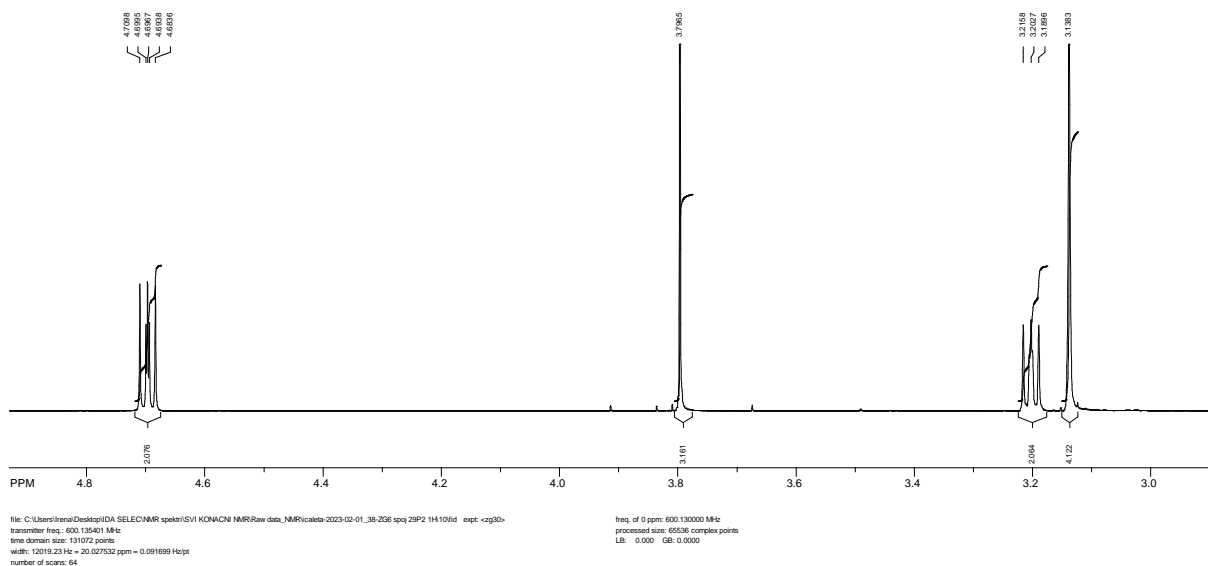
Slika 27.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spekter tienbenzo-triazola **12**.



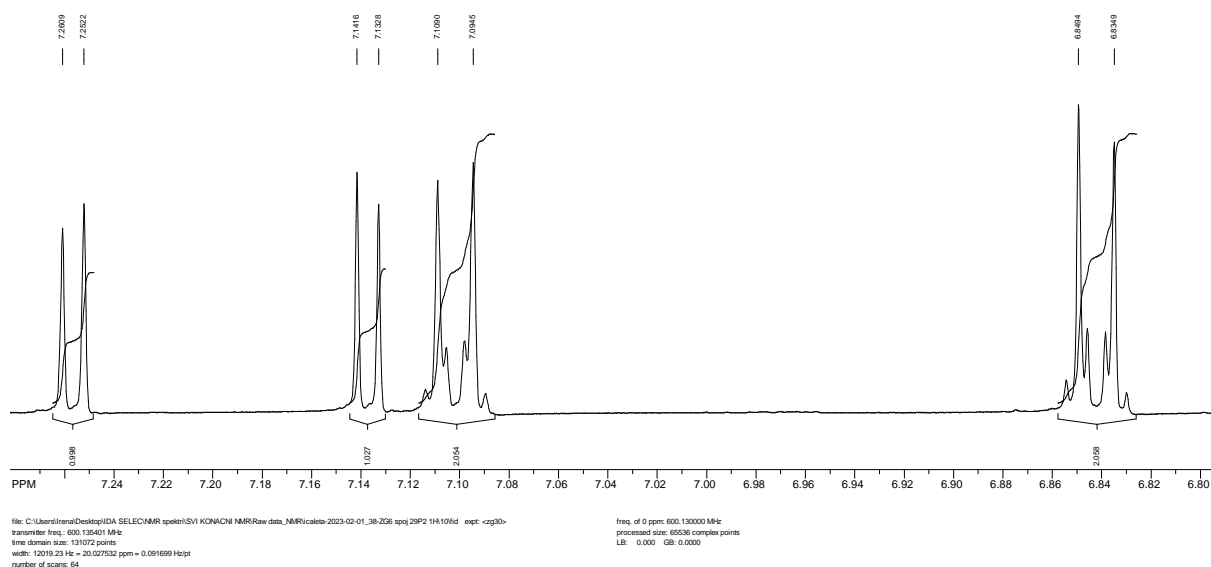
Slika 28. Dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienbenzo-triazola **12**.



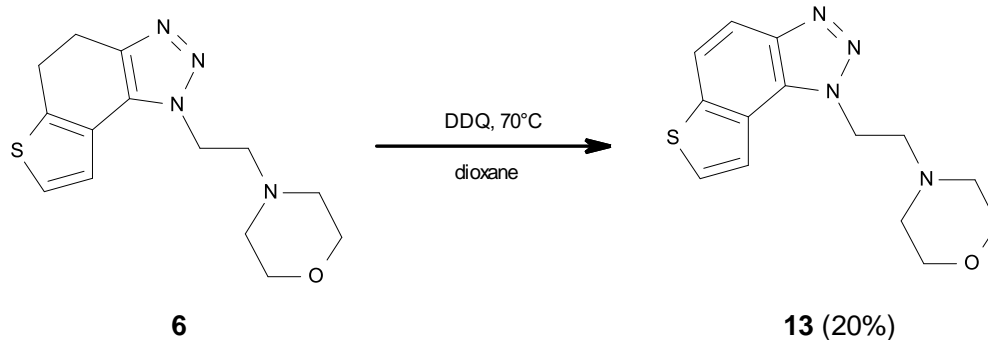
Slika 29.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektar tienbenzo-triazola **5**, nearomatskog para spoja **12**.



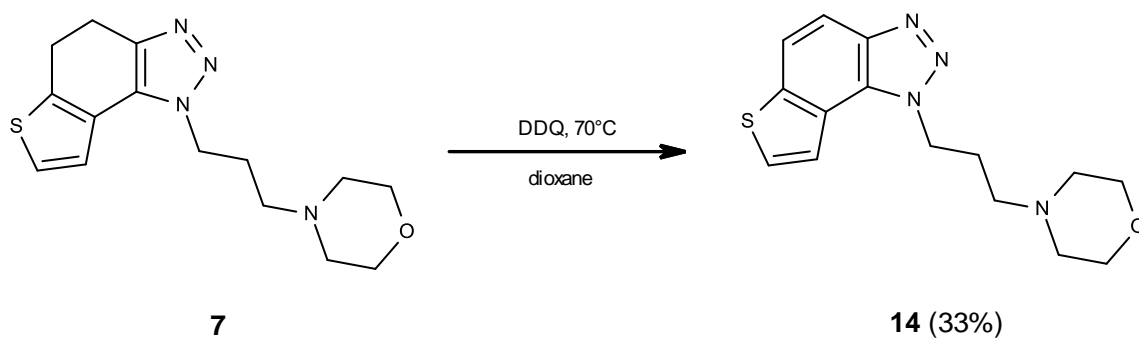
Slika 30. Alifatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienbenzo-triazola **5**.



Slika 31. Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienobenzotriazola **5**.



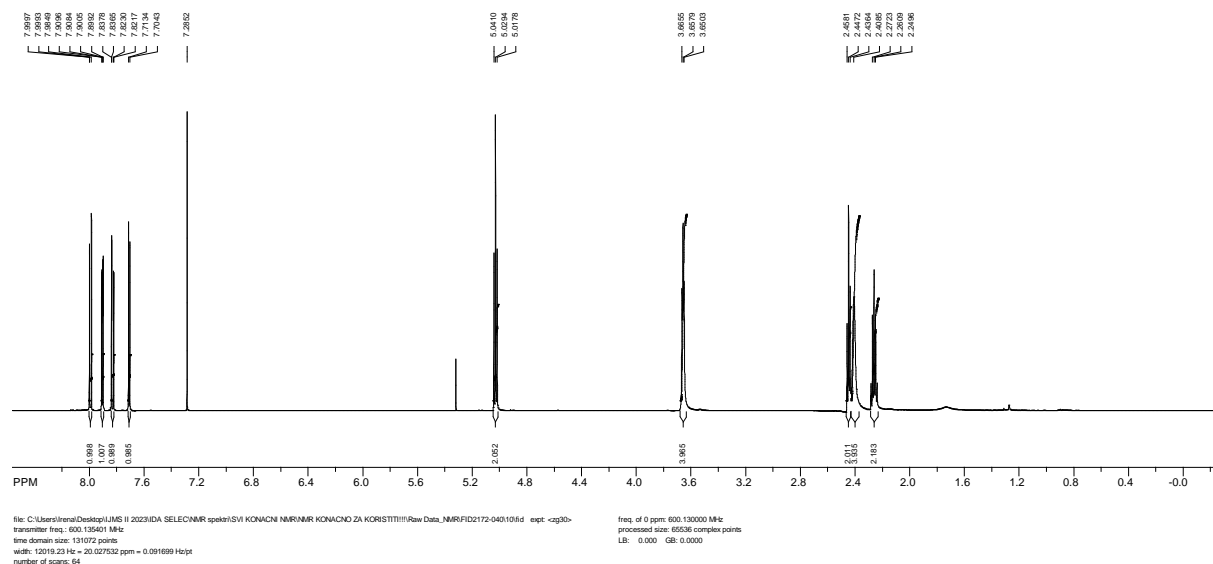
Shema 17. Sinteza 4-(2-(1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)etil)morfolina (**13**).



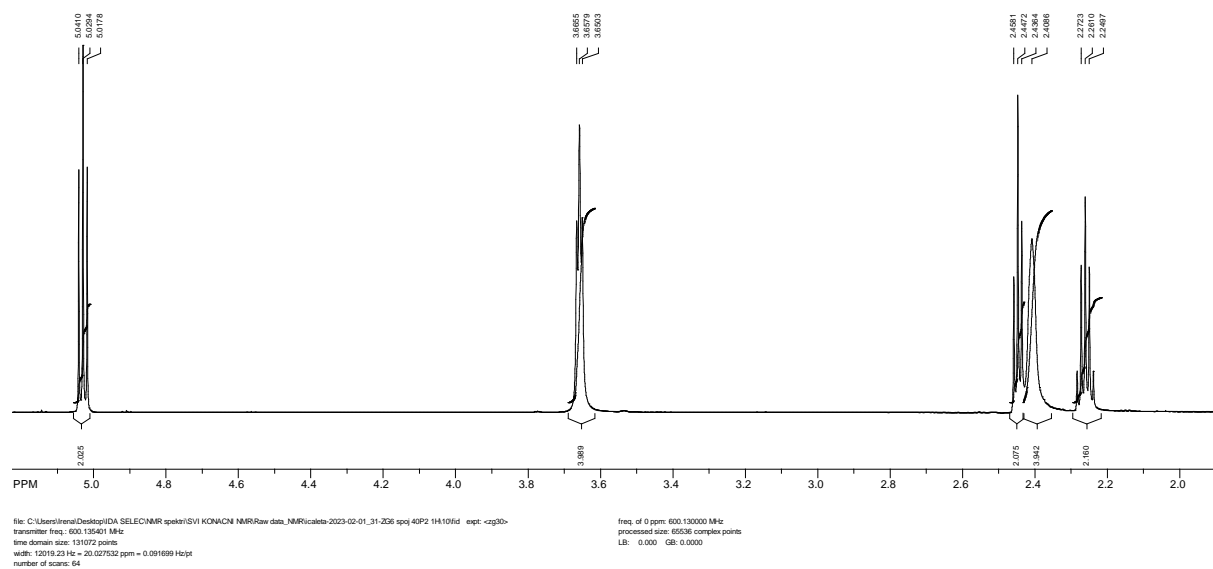
Shema 18. Sinteza 4-(3-(1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)propil)morfolina (**14**).



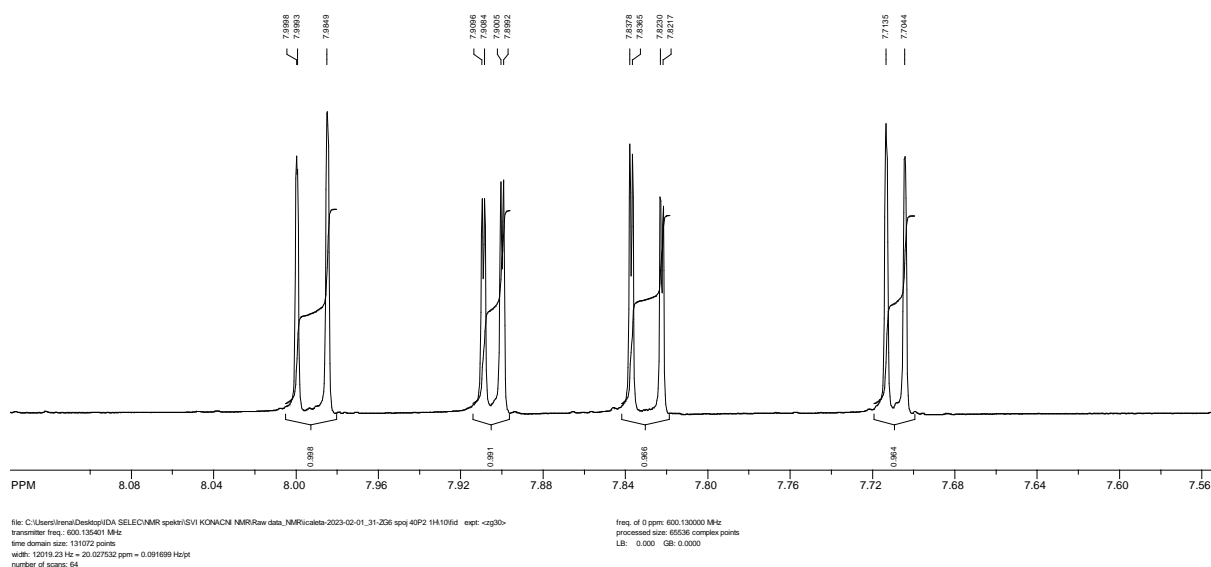
Usljed aromatizacije spoja **7** uočavamo izostanak multiplleta (3.18-3.12 ppm) u NMR spektru aromatiziranog tienobenzotriazola **14** odnosno pojavu dva dubleta na 7.99 i 7.83 ppm (Slike 32-37).



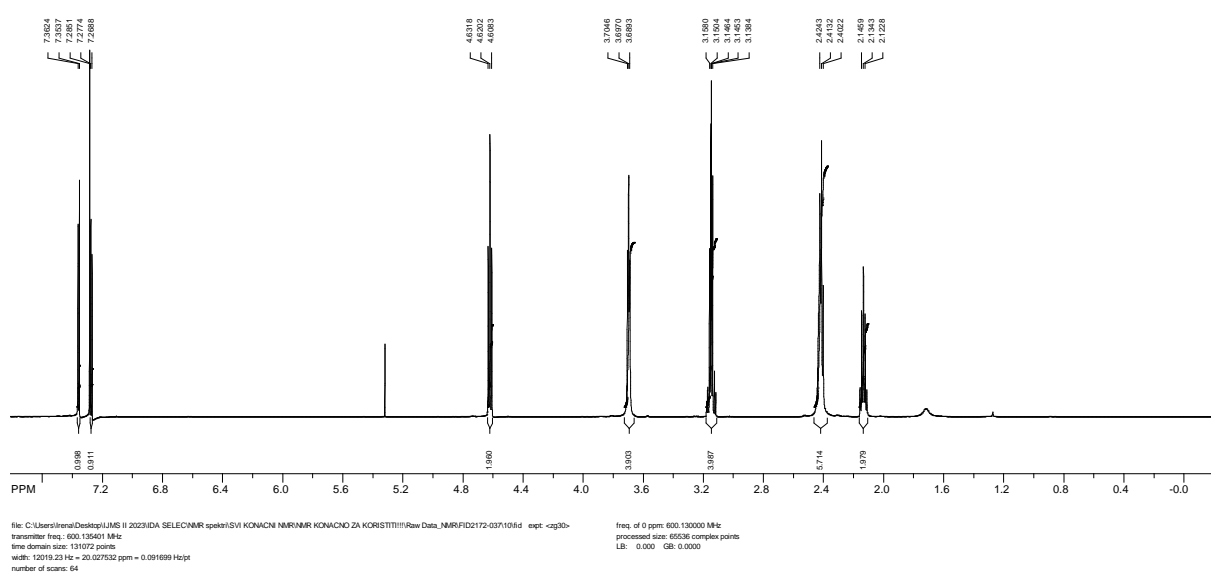
Slika 32.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektar tienobenzotriazola **14**.



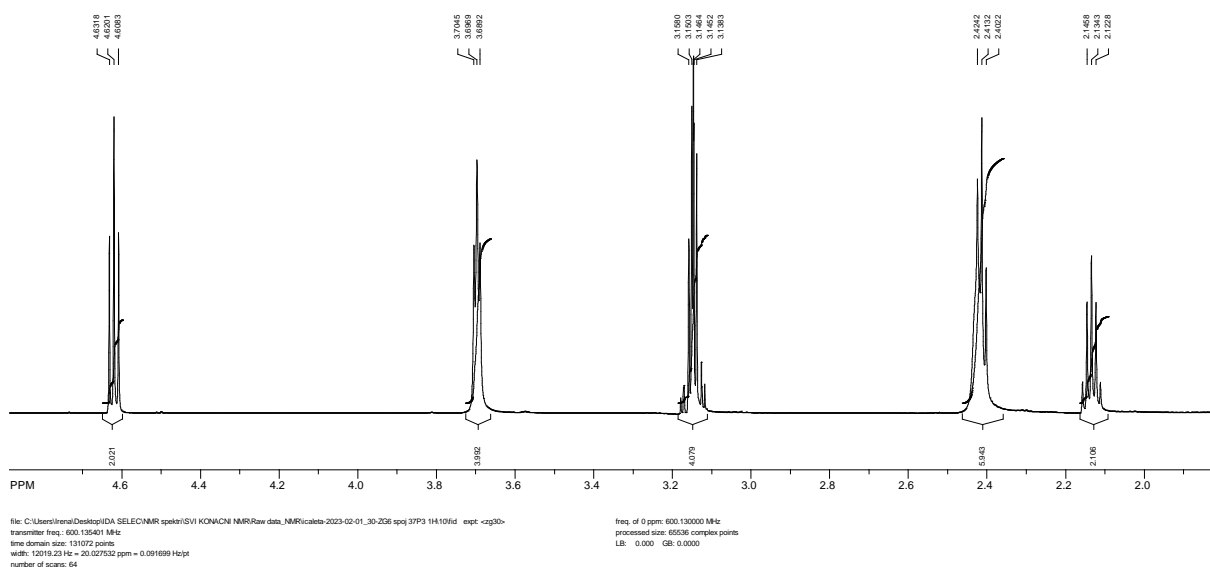
Slika 33. Alifatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienobenzotriazola **14**.



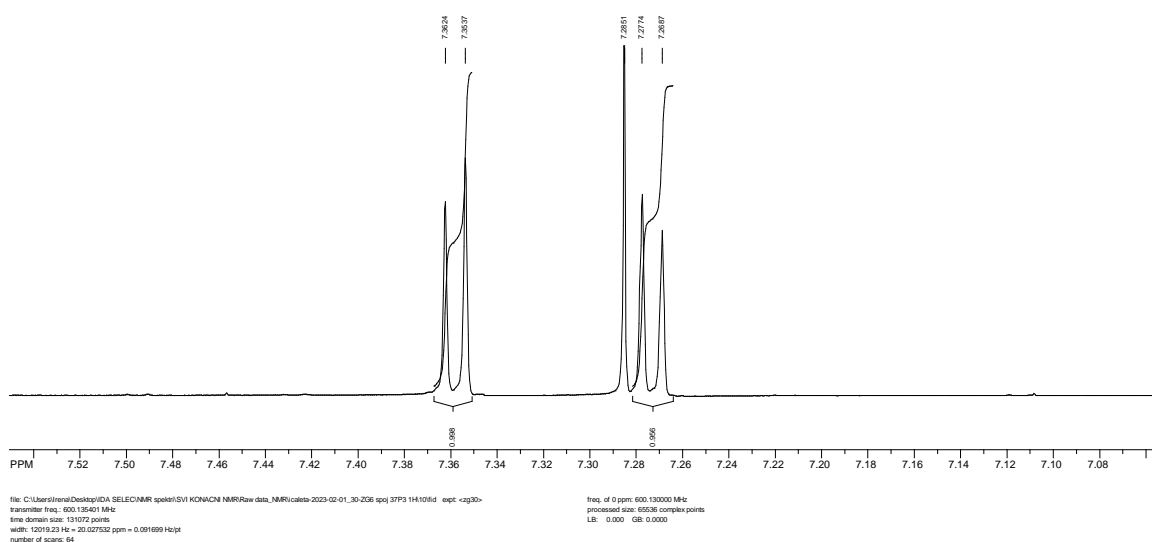
Slika 34. Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienbenzo-triazola **14**.



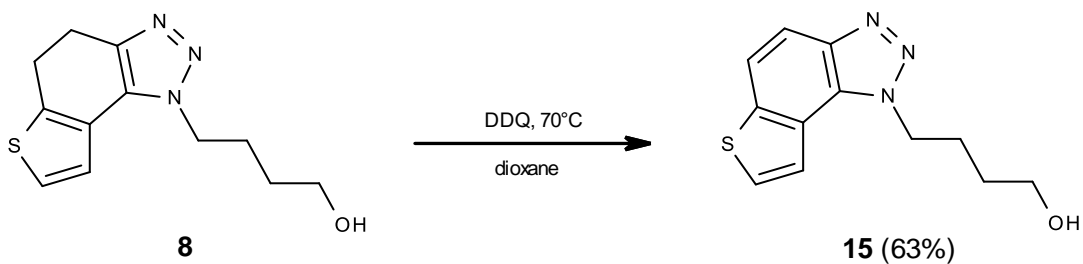
Slika 35.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektar tienbenzo-triazola **7**, nearomatskog para spoja **14**.



Slika 36. Alifatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienobenzo-triazola **7**.



Slika 37. Aromatski dio  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektra tienobenzo-triazola **7**.



Shema 19. Sinteza 4-(1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-d][1,2,3]triazol-1-il)butan-1-ola (**15**).

Produkti **9-15** pročišćeni su metodom kolonske kromatografije upotrebom odgovarajućeg sustava otapala. Svi sintetizirani spojevi spektroskopski su okarakterizirani koristeći NMR i HRMS analize.

### 3.4. INHIBICIJSKA AKTIVNOST TIENOBENZO-TRIAZOLA **1-15** PREMA ENZIMIMA KOLINESTERAZE

Kao što je već spomenuto, rad je napravljen s ciljem ispitivanja inhibicijske potencije novosintetiziranih tienobenzotriazolima **1-15** prema enzimima kolinesterazama, prvenstveno butirilkolinesterazi. Uvođenjem novih supstituenata na triazolni prsten može se pratiti dolazi li do poboljšanja biološke aktivnosti te se dobiva uvid u odnos između strukture i inhibicijske aktivnosti kod novosintetiziranih analoga.

Najbolju inhibiciju oba enzima među novosintetiziranim tienobenzotriazolima **1-15** pokazao je spoj **9**, koji na triazolnom prstenu ima *para*-F-benzilnu skupinu (Tablica 2).

Usporedbom molekula **9-15** s analogima **2-8** koji posjeduju nearomatizirani središnji prsten slijedi zaključak da supstituent na triazolnom prstenu ima veći utjecaj na inhibicijsku potenciju od aromatiziranog/nearomatiziranog prstena. Vrijednosti  $IC_{50}$  za BChE spojeva **1**, **2**, **9** i **12** nešto su slabije od standarda galantamina ( $IC_{50}$  7,9  $\mu$ M).

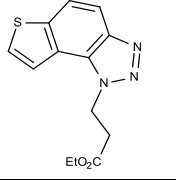
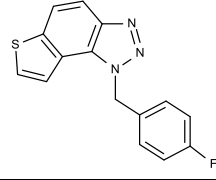
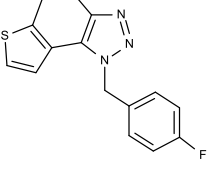
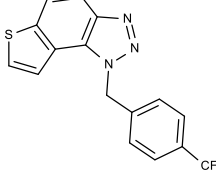
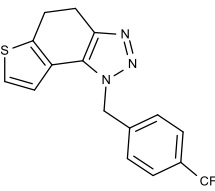
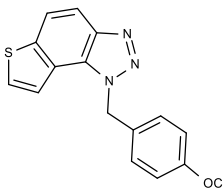
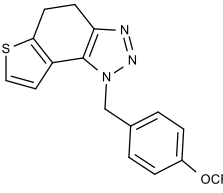
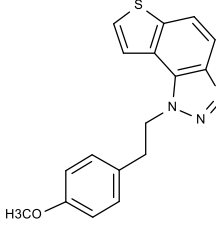
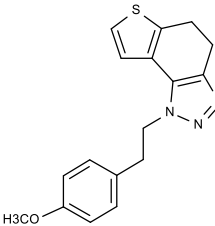
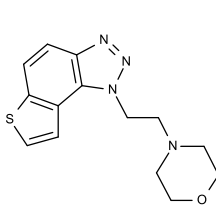
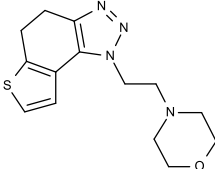
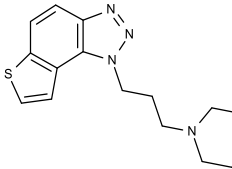
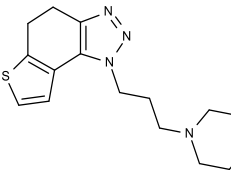
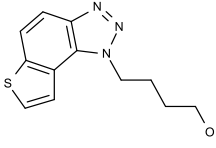
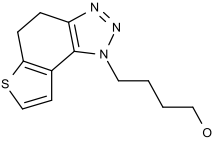
Vrijednosti  $IC_{50}$  analoga **1**, **9** i **12** ukazuju na to da se radi o najučinkovitijim inhibitorima butirilkolinesteraze među novosintetiziranim spojevima **1-15**: spoj **12** je selektivan prema BChE, pokazujući najintenzivniju inhibiciju među svim novim derivatima **1-15**.

Obzirom na selektivnu inhibicijsku aktivnost prema acetilkolinesterazi, dihidro-tienobenzotriazol **6** (ali ne i njegov aromatizirani analog) je pokazao najbolju biološku aktivnost.

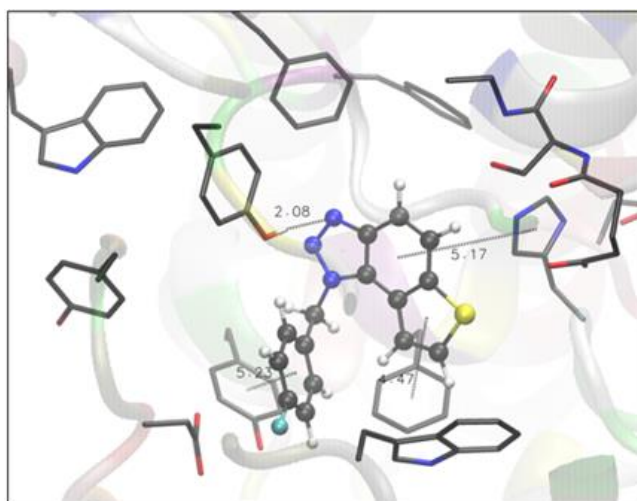
Vrijednosti  $IC_{50}$  spojeva **3**, **4** i **5** pokazuju lošu inhibicijsku potenciju prema oba enzima, dok **7**, **13** i **14** nisu pokazali inhibiciju kolinesteraza.

Među eksperimentalno procijenjenim spojevima koji pokazuju inhibicijsku aktivnost prema obje kolinesteraze, najbolji rezultati postignuti su s tienobenzotriazolom **9**. Najperspektivniji kandidat unutar skupa aktivnih molekula bio je spoj **6**, dok je tienobenzotriazol **12** pokazao izvrstan inhibicijski potencijal prema BChE, kao što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Izmjerene IC<sub>50</sub> vrijednosti za spojeve **1-15** prema modificiranoj Ellmanovoj metodi<sup>108</sup>

SPOJ	STRUKTURA	IC <sub>50</sub> (μM) AChE	IC <sub>50</sub> (μM) BChE	SPOJ	STRUKTURA	IC <sub>50</sub> (μM) AChE	IC <sub>50</sub> (μM) BChE
<b>1</b>		-	39.6	<b>9</b>		97.0	37.5
<b>2</b>		-	58.0	<b>10</b>		139.6	>150
<b>3</b>		117.6	>150	<b>11</b>		68.0	213.5
<b>4</b>		88.7	-	<b>12</b>		-	18.6
<b>5</b>		145.3	119.4	<b>13</b>		-	-
<b>6</b>		45.6	-	<b>14</b>		-	-
<b>7</b>		-	-	<b>15</b>		-	106.7
<b>8</b>		-	74.1	galantamin		0.15	7.9

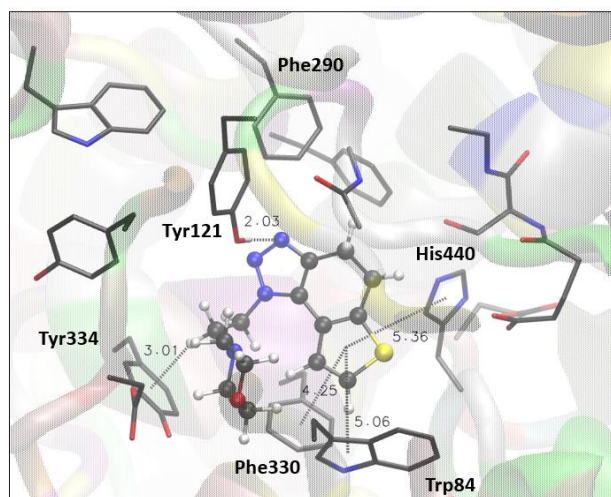
Provedena je i molekularna studija pristajanja s ciljem dobivanja strukturnih karakteristika kompleksa i identifikacije stabilizirajućih interakcija u kompleksima između najuspješnijih spojeva i aktivnog mjesta kolinesteraza. Struktura najstabilnijeg kompleksa **9** s aktivnim mjestom AChE, dobivena pristajanjem, prikazana je na slici 38. Korištena je kristalna struktura dobivena iz električne jegulje (*Electrophorus electricus*, 1EEA.pdb), ali treba imati na umu da ova struktura ne reproducira u potpunosti točan enzimski slijed kao u električnoj jegulji. Zbog niske razlučivosti ove strukture, ona uključuje sekvencu aminokiselina preuzetu iz tercijarne strukture *Torpedo californica* AChE.



Slika 38. Struktura aktivnog mjesta AChE usidrena s tienobenzotriazolom **9**. Molekule potencijalnih inhibitora prikazane su pomoću modela kuglica i štapića.

Slika 38 prikazuje kompleks između tienobenzotriazola **9** i aktivnog mjesta AChE. Formira se vodikova veza između triazolnog dušika i -OH skupine Tyr 121. Fenilna jezgra liganda uključena je u okomitu  $\pi$ - $\pi$  interakciju s His330, dok tiofenski prsten postiže sličnu interakciju s Phe330. Fluorirani fenil na triazolu također je uključen u  $\pi$ - $\pi$  interakciju s Tyr334.

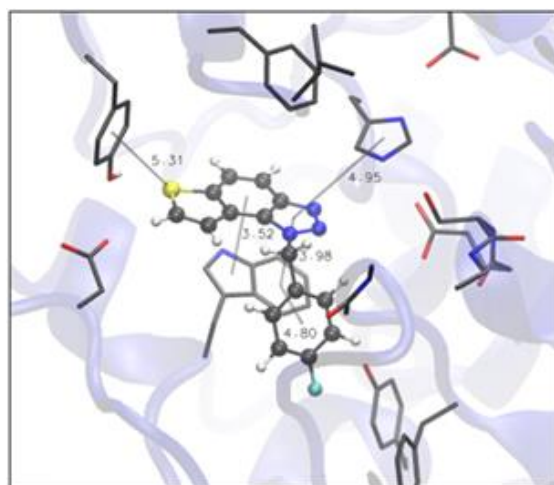
Spoj **6**, najbolji potencijalni inhibitor AChE, ima nearomatsku središnju jezgru. Struktura tienobenzotriazola **6** usidrenog na aktivnom mjestu AChE (slika 39) pokazuje da struktura **6** zauzima pozu sličnu onoj **9**, s triazolnim prstenom orijentiranim prema perifernom anionskom mjestu. Tako se ponovno javlja H-veza između triazolnog dušika i -OH skupine Tyr121.



Slika 39. Struktura kompleksa između spoja **6** (predstavljena modelom kuglica i štapića) i aktivnog mjesta AChE. Vodikovi atomi enzimskih ostataka izostavljeni su radi jasnoće.

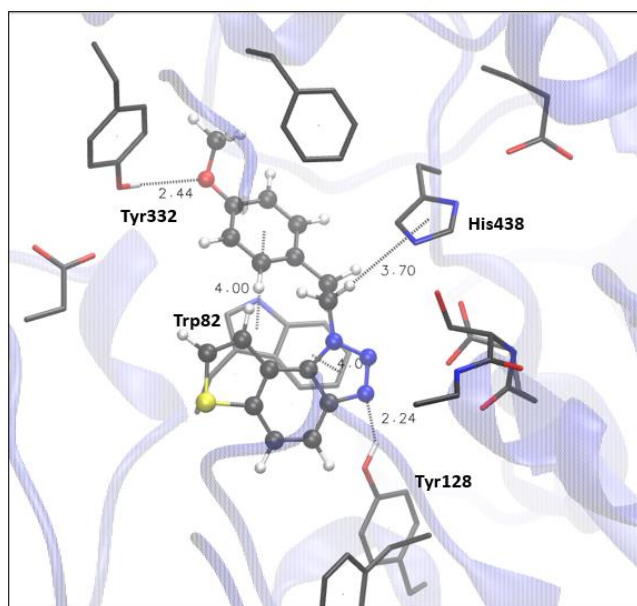
$\pi$ -alkilne interakcije uočene su između etilnog lanca na triazolu i Tyr334, dok tiofen gradi  $\pi$ - $\pi$  interakcije s His440, Phe330 i Trp84.

Kao što je već spomenuto, tienobenzotriazol **9** bio je najaktivniji među spojevima koji su pokazali inhibicijski potencijal prema obje kolinesteraze; stoga je analizirano molekularno pristajanje tienobenzotriazola **9** u aktivno mjesto BChE. Ovdje je korištena struktura ljudskog enzima. Strukture dobivenih kompleksa prikazane su na slici 40. Za molekulu **9** u BChE, H-veza između jednog od triazolnih *sp*<sup>2</sup> dušika i proton-donirajućih ostataka nije uočena; međutim, sumpor tiofena je u interakciji s Tyr332. Preostali aromatski prstenovi liganda uključeni su u  $\pi$ - $\pi$  interakcije s Trp82 i His440, kako je prikazano na slici 40.



Slika 40. Struktura aktivnog mjesta BChE usidrena s tienobenzotriazolom **9**. Molekule potencijalnih inhibitora prikazane su pomoću modela kuglica i štapića.

Konačno, najperspektivniji kandidat za inhibiciju BChE je spoj **12**, s izvrsnom eksperimentalnom vrijednošću  $IC_{50}$  (Tablica 2). Struktura aktivnog mjesta BChE skupa sa molekulom **12**, prikazana na slici 41, otkriva da postoje dvije moguće H-veze: jedna se formira između dušika triazola i hidroksilne skupine Tyr128 (analogno pojavi vodikove veze između dušika triazola i Tyr121 u AChE), a druga je moguća zbog blizine kisika ligandove metoksi-skupine i protona -OH skupine Tyr332.  $\pi$ - $\pi$  interakcije između triazolnog prstena liganda i ostatka Trp82 je prisutno, kao i  $\pi$ -alkilna interakcija između etila (koji povezuje triazol i metoksi-fenilnu podjedinicu) i aminokiseline His438.



Slika 41. Struktura kompleksa između spoja **12** (predstavljen s modelom kuglice i štapa) i aktivnog mjesta BChE. Vodikovi atomi enzimskih ostataka izostavljeni su radi jasnoće.

Prema eksperimentalnim podacima u Tablici 1, najperspektivniji inhibitorni potencijal prema BChE prikazan je spojevima **1**, **2**, **9** i **12**. Pregled njihovih slobodnih energija vezanja ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) procijenjenih molekularnim priključkom pokazuje da su usporedivi s galantaminom, čiji je  $\Delta G_{\text{bind}} -6,26 \text{ kcal mol}^{-1}$  dobiven istim postupkom pristajanja. Slobodne energije vezanja za ove spojeve variraju od  $-5,85 \text{ kcal mol}^{-1}$  za spoj **1** do  $-6,37 \text{ kcal mol}^{-1}$  za molekulu **12**, pri čemu je potonja čak nešto niža od vrijednosti galantamina. Međutim, treba uzeti u obzir da studija pristajanja daje samo grubu procjenu  $\Delta G_{\text{bind}}$  i ne nudi točan termodinamički opis naših sustava.



Rezultati studije pristajanja mogu pokazati mogućnosti postavljanja liganada u aktivno mjesto enzima. Oni mogu identificirati glavne interakcije između novih liganada i enzima, pomažući tako racionalizirati inhibicijske aktivnosti uočene eksperimentom. Ukratko, ovdje ispitani tienbenzo-triazoli smješteni su u kolinesterazama kroz H-veze koje uključuju jedan od dušika triazola,  $\pi$ - $\pi$  slaganje između aromatskih ostataka liganda i aromatskih ostataka aktivnih mjesta kolinesteraza, kao i  $\pi$ -alkil interakcije.

## 4. EKSPERIMENTALNI DIO

### 4.1. OPĆE NAPOMENE

Za praćenje kemijskih reakcija i čistoće sintetiziranih spojeva korištena je tekućinska kromatografija vrlo visoke učinkovitosti vezane na spektrometar masa (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Ultra Violet*, UPLC-MS/UV). Korišten je Waters Acquity uređaj s UV i MS detektorom. Priprava uzorka za analizu uključivala je otapanje uzorka u acetonitrilu.

Za sve reakcije koje su zahtijevale temperaturu višu od sobne koristila se pješčana kupelj čija se temperatura pratila preko termometra.

NMR spektroskopski podatci za  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  jezgre snimljeni su na sobnoj temperaturi na spektrometrima Bruker Avance 300 i 600 MHz. Za snimanje spektara korišten je deuterirani kloroform,  $\text{CDCl}_3$ , s tetrametilsilanom kao standardom. Kemijski pomaci prikazani su u ppm (eng. *parts per million*) jedinici. Sva korištena otapala komercijalno su dostupna i pročišćena destilacijom. Za sušenje organskih slojeva nakon ekstrakcije korišten je bezvodni magnezijev sulfat,  $\text{MgSO}_4$ . Kolonska kromatografija provodila se na uređaju Biotage Isolera koristeći silikonsku kolonu (InterChim Si-HC puriFlash, 50 $\mu$ ) pomoću odgovarajućeg sustava otapala.

Svi udjeli određivani su pomoću UPLC-UV-a na valnoj duljini od 254 nm.

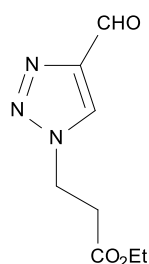
Preparativne fotokemijske reakcije izvedene su u zatvorenoj posudi u fotokemijskom reaktoru Rayonet, koristeći UV svjetiljke valne duljine od 313 nm.

HRMS (eng. *High-Resolution Mass Spectrometry*) analize provedene su na masenom spektrometru (MALDI TOF/TOF analizator) opremljenom Nd:YAG laserom koji radi na 355 nm s brzinom ugradnje od 200 Hz u pozitivnom ( $\text{H}^+$ ) ili negativnom ( $\text{H}^-$ ) ionskom reflektorskom načinu rada. Sva otapala su iz otopina uklonjena rotacijskim uparivačem pod sniženim tlakom.

## 4.2. FOTOCIKLIZACIJSKA SINTEZA

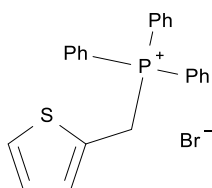
### 4.2.1. SINTEZA ETIL-3-(4-FORMILTRIAZOL-1-IL)PROPANOATA

U okrugloj tikvici otopi se 500.0 mg (2.292 mmol, 1 ekv.) 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehida i 387.1 mg (2.521 mmol, 1.1 ekv) beta-alanin etil ester hidroklorida u 9.0 mL izopropilnog alkohola. Otopini se doda 350.0  $\mu$ L trietilamina te se reakcijska smjesa miješa na 80°C preko noći. Ohlađena reakcijska smjesa upari se do suha na rotacijskom uparivaču. Čišćenje sirovog produkta provodi se metodom kolonske kromatografije na 25g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-100% (20% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluens. Nakon uparavanja dobiveno je 390.4 mg (Y = 86%) svjetlo-žutog uljastog estera.



### 4.2.2. SINTEZA TRIFENIL(2-TIENILMETIL)FOSFONIJEVA BROMIDA

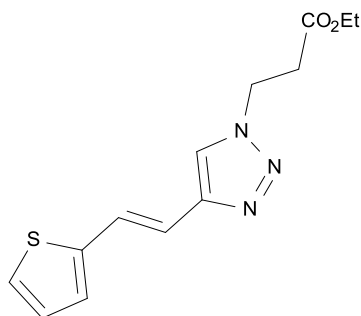
U okrugloj tikvici otopi se 1533.0 mg (4.467 mmol, 1.02 ekv) trifenilfosfin hidrobromida u 11.0 mL kloroforma te se doda 415.0  $\mu$ L tiofenmetanola. Reakcijska smjesa miješa se na temperaturi refluksa. Nakon 4 sata otapalo se upari do suha te se dobivena krutina rekristalizira s etanolom (25.0 mL). Nakon filtracije dobiveno je 1250.4 mg (Y = 64%) bijele soli.



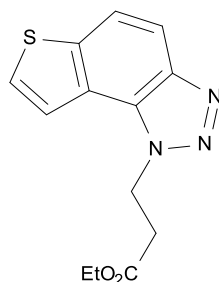
### 4.2.3. SINTEZA ETIL-3-[4-[(*E*)-2-(2-TIENIL)VINIL]TRIAZOL-1-IL]PROPANOATA

U okrugloj tikvici otopi se 688.38 mg (1.567 mmol, 1.0 ekv) trifenil (2-tienilmetil) fosfonijeva bromida u 7.0 mL etanola. U otopinu se doda 308.9 mg (1.567 mmol, 1.0 ekv) etil 3-(4-formiltriazol-1-il)propanoata. Otopina natrijeva etoksida (600.0  $\mu$ L) dodaje se u suhim uvjetima kap po kap. Reakcijska smjesa propuhuje se argonom te se miješa na sobnoj temperaturi preko

noći. Otapalo se upari do suha te se dobivena krutina otopi u 50.0 mL etil-acetata i ekstrahira s vodom (3x20.0 mL) i zasićenom otopinom natrijeva klorida (2x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Etil-acetat upari se do suha, a sirovi produkt pročisti se na 12g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50 μ) koristeći 0-100% (20% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluens. Dobiveno je 143.2 mg (Y = 33%) žute krutine.



#### 4.2.4. SINTEZA ETIL-3-(1H-TIENO[3',2':3,4]BENZO[1,2-*d*][1,2,3]TRIAZOL-1-IL)PROPANOATA



**1** (63%)

Smjesa izomera (170.0 mg, 0.328 mmol, 1.0 ekv) otopi se u toluenu te se otopina raspodijeli u 5 kvarcnih epruveta od 50.0 mL. U svaku epruvetu doda se katalitička količina joda te se epruvete osvjetljavaju s 10 UV lampi na 300 nm u fotokemijskom reaktoru Rayonet 5 sati. Otapalo se upari do suha te se sirovi produkt pročisti na 12g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50 μ) koristeći 0-30% (20% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluens. Nakon uparavanja dobiveno je 214.1 mg (Y = 63%) svjetlo-bež krutine **1**.

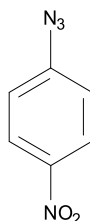
**Etíl-3-(1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)propanoat (1):** 214.1 mg (izolirano iskorištenje 63%);  $R_f$ (DCM/EtOAc (20%)) = 0.65; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ/ppm: 7.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 4.18 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.19 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz,

3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 150.3, 128.1, 119.7, 119.2, 116.1, 61.2, 45.1, 34.5, 14.0 (ne vide se 3 singleta); HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 275.0728$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 275.0727$ .

### 4.3. ALTERNATIVNA SINTEZA

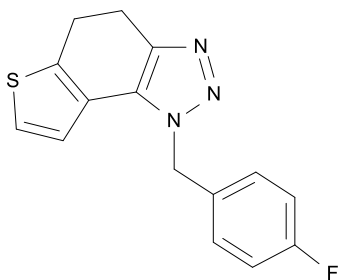
#### 4.3.1. SINTEZA 1-AZIDO-4-NITROBENZENA

U dvogroj tikvici od 250.0 mL otopi se 5.60 g (40.5 mmol, 1.0 ekv) 4-nitroanilina u 70.0 mL 3N HCl i 15.0 mL metanola. U vodi se otopi 3.30 g natrijeva nitrita (47.8 mmol, 1.18 ekv) te se dodaje u ohlađenu otopinu 4-nitroanilina kap po kap. Reakcijska smjesa miješa se 30 minuta u ledenoj kupki. Natrijev azid (3.80 g, 58.5 mmol, 1.44 ekv) otopi se u 14.0 mL vode te se dodaje kap po kap u reakcijsku smjesu. Reakcijska smjesa se miješa još 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon 2 sata doda se dietil-eter te se organski sloj ispere s 3N HCl (3x),  $\text{NaHCO}_3$  (zasićena otopina) i NaCl (zasićena otopina). Organski sloj osuši se iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i profiltrira. Nakon uparavanja dobiveno je 5.6 g ( $Y = 84\%$ ) žute krutine.



#### 4.3.2. SINTEZA DIHIDRO-TIENOBENZO-TRIAZOLA 2-8

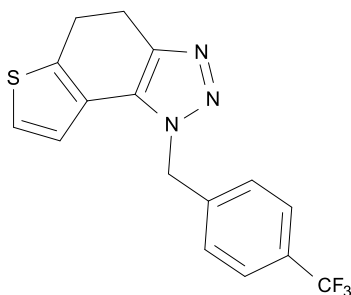
U okrugloj tikvici otopi se 300.0 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 4-keto-4,5,6,7-tetrahidrotionaftena u 1810.0  $\mu\text{L}$  toluena, doda se 323.64 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 1-azido-4-nitrobenzena, 315.0  $\mu\text{L}$  4-fluorbenzilamina, 33.84  $\mu\text{L}$  octene kiseline i 4 Å molekulska sita. Reakcijska smjesa miješa se na  $100^\circ\text{C}$  preko noći. Reakcijska smjesa ohladi se na sobnu temperaturu i otapalo se upari do suha na rotacijskom uparivaču. Uljni produkt otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ekstrahira s vodom (3x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrira i upari do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 25g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-40% (20% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluens. Nakon uparavanja dobiveno je 159.0 mg ( $Y = 28\%$ ) žuto-zelene krutine 2.



**2 (28%)**

**1-(4-fluorobenzil)-4,5-dihidro-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (2):** 159.0 mg (izolirano iskorištenje 28%);  $R_f$  (DCM/EtOAc (20%)) = 0.50;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.21 – 7.19 (m, 2H), 7.17 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 7.06 – 7.03 (m, 2H), 6.96 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 3.17 (t,  $J = 2.6$  Hz, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 168.8, 166.2, 163.4, 161.8, 141.7, 128.5, 124.4, 121.3, 116.1, 104.9, 51.8, 24.5, 21.3; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{S}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 285.0736$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 285.0731$ .

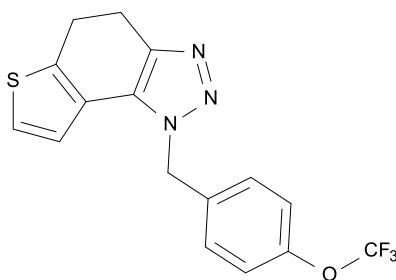
U okrugloj tikvici otopi se 300.0 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 4-keto-4,5,6,7-tetrahidrotionaftena u 1810.0  $\mu\text{L}$  toluena, doda se 323.64 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 1-azido-4-nitrobenzena, 394.0  $\mu\text{L}$  4-(trifluormetil)benzilamina, 33.84  $\mu\text{L}$  octene kiseline i 4 Å molekulska sita. Reakcijska smjesa miješa se na 100°C preko noći. Reakcijska smjesa ohladi se na sobnu temperaturu i otapalo se upari do suha na rotacijskom uparivaču. Uljni produkt otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ekstrahira s vodom (3x20 mL). Organski sloj suši se iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrira i upari do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 25g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-70% (30% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluens. Uparavanjem je dobiveno 181.2 mg (Y = 27%) žuto-smeđe krutine 3.



**3 (27%)**

**1-(4-(trifluorometil)benzil)-4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (3):** 181.2 mg (izolirano iskorištenje 27%);  $R_f$ (DCM/EtOAc (20%)) = 0.54;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.63 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.32 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.18 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 5.81 (s, 2H), 3.21 – 3.15 (m, 4H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 162.2, 157.9, 152.2, 127.1, 126.3, 124.8, 124.6, 121.6, 121.2, 100.6, 52.2, 24.7, 21.5; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{S}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 335.0704$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 335.0695$ .

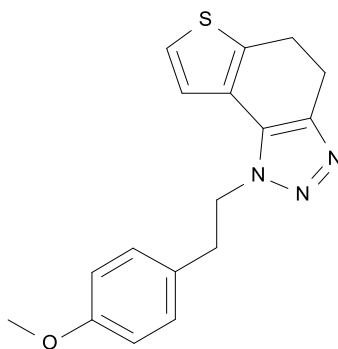
U okrugloj tikvici otopi se 100.0 mg (0.657 mmol, 1.0 ekv) 4-keto-4,5,6,7-tetrahidrotionaftena u 603.0  $\mu\text{L}$  toluena, doda se 107.8 mg (0.657 mmol, 1.0 ekv) 1-azido-4-nitrobenzena, 140.4  $\mu\text{L}$  4-(trifluorometoksi)benzilamina, 11.28  $\mu\text{L}$  octene kiseline i 4 Å molekulska sita. Reakcijska smjesa miješa se na 100°C preko noći. Reakcijska smjesa ohladi se na sobnu temperaturu i otapalo se upari do suha na rotacijskom uparivaču. Uljni produkt otopi se u 50.0 mL etil-acetata i ekstrahira s vodom (3x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrira i upari do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 25g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-40% (20% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluens. Nakon uparavanja dobiveno je 99.6 mg (Y = 43%) žute krutine 4.



**4 (43%)**

**1-(4-(trifluorometoksi)benzil)-4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (4):** 99.6 mg (izolirano iskorištenje 43%);  $R_f$ (DCM/EtOAc (20%)) = 0.53;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.26 (d,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 7.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.19 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 5.75 (s, 2H), 3.18 (t,  $J = 1.9$  Hz, 4H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 165.7, 143.1, 133.7, 128.2, 124.5, 124.4, 123.1, 121.5, 121.3, 121.1, 103.2, 51.8, 24.6, 21.3; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 351.0653$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 351.0647$ .

U okrugloj tikvici otopi se 300.0 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 4-keto-4,5,6,7-tetrahidrotionaftena u 1810.0  $\mu\text{L}$  toluena, doda se 323.64 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 1-azido-4-nitrobenzena, 405.0  $\mu\text{L}$  2-(4-metoksifenil)etilamina, 33.84  $\mu\text{L}$  octene kiseline i 4 Å molekulska sita. Reakcijska smjesa miješa se na 100°C preko noći. Reakcijska smjesa ohladi se na sobnu temperaturu i otapalo se upari do suha na rotacijskom uparivaču. Uljni produkt otopi se u 50.0 mL etil-acetata i ekstrahira s vodom (3x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrira i upari do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 25g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-40% (20% EtOAc/DCM) u diklormetanu kao eluens. Uparavanjem je dobiveno 251.9 mg (Y = 41%) žute krutine 5.



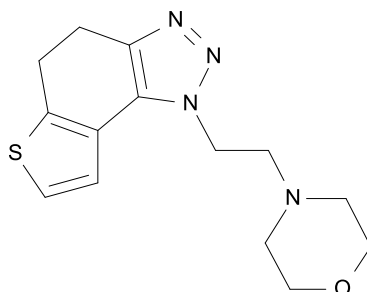
5 (41%)

**1-(4-(trifluormetoksi)benzil)-4,5-dihidro-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-d][1,2,3]triazol (5):** 251.9 mg (izolirano iskorištenje 41%);  $R_f$ (DCM/EtOAc (20%)) = 0.43;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.26 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 7.10 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 4.69 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.21 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 3.14 (s, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 158.8, 142.7, 139.4, 129.9, 129.1, 125.1, 124.5, 121.0, 117.7, 114.4, 55.4, 50.9, 36.1, 24.8, 21.4; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OS}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 311.1092$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 311.1090$ .

U okrugloj tikvici otopi se 300.0 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 4-keto-4,5,6,7-tetrahidrotionaftena u 1810.0  $\mu\text{L}$  toluena, doda se 323.64 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 1-azido-4-nitrobenzena, 363.0  $\mu\text{L}$  4-(2-aminoetil)morfolina, 33.84  $\mu\text{L}$  octene kiseline i 4 Å molekulska sita. Reakcijska smjesa miješa se na 100°C preko noći. Reakcijska smjesa ohladi se na sobnu temperaturu i otapalo se upari do suha na rotacijskom uparivaču. Uljni produkt otopi se u 60.0 mL etil-acetata i



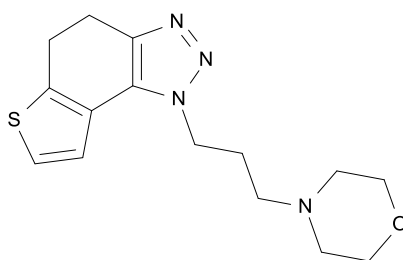
ekstrahira s vodom (3x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrira i upari do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 25g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50 μ) koristeći 0-70% (10% MeOH/DCM) u diklormetanu kao eluens. Uparavanjem je dobiveno 327.6 mg (Y = 57%) žute uljne tekućine 6.



**6** (57%)

**4-(2-(4,5-dihidro-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-d][1,2,3]triazol-1-il)etil)morfolin (6):** 327.6 mg (izolirano iskorištenje 57%);  $R_f$ (DCM/MeOH (10%)) = 0.64; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.29 – 7.27 (m, 2H), 4.65 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 3.67 (t,  $J$  = 4.5 Hz, 4H), 3.18 – 3.12 (m, 4H), 2.91 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.53 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 4H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 142.6, 139.6, 125.2, 124.6, 121.2, 113.9, 67.0, 58.0, 53.9, 47.2, 24.8, 21.5; HRMS ( $m/z$ ) for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>OS: [M+H]<sup>+</sup><sub>calcd</sub> = 290.1201, [M+H]<sup>+</sup><sub>measured</sub> = 290.1197.

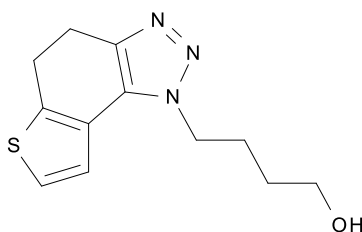
U okrugloj tikvici otopi se 250.0 mg (1.644 mmol, 1.0 ekv) 4-keto-4,5,6,7-tetrahidrotionaftena u 1510.0 μL toluena, doda se 270.0 mg (1.644 mmol, 1.0 ekv) 1-azido-4-nitrobenzena, 336.4 μL 4-(3-aminopropil)morfolina, 28.20 μL octene kiseline i 4 Å molekulska sita. Reakcijska smjesa miješa se na 100°C preko noći. Reakcijska smjesa ohladi se na sobnu temperaturu i otapalo se upari do suha na rotacijskom uparivaču. Uljni produkt otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ekstrahira s vodom (3x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrira i upari do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 12g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50 μ) koristeći 0-60% (10% MeOH/DCM) u diklormetanu kao eluens. Nakon uparavanja dobiveno je 223.6 mg (Y = 45%) smeđeg ulja 7.



**7** (45%)

**4-(3-(4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)propil)morfolin (7):** 223.6 mg (izolirano iskorištenje 45%);  $R_f$  (DCM/MeOH (10%)) = 0.63;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.36 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 4.62 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 3.69 (t,  $J = 4.9$  Hz, 4H), 3.18 – 3.12 (m, 4H), 2.42 – 2.40 (m, 6H), 2.16 – 2.11 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 139.3, 128.6, 125.0, 124.2, 121.3, 112.3, 66.9, 55.2, 53.6, 46.9, 26.9, 24.6, 21.2; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{OS}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 304.1358$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 304.1356$ .

U okrugloj tikvici otopi se 300.0 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 4-keto-4,5,6,7-tetrahidrotionaftena u 1810.0  $\mu\text{L}$  toluena, doda se 323.64 mg (1.972 mmol, 1.0 ekv) 1-azido-4-nitrobenzena, 255.0  $\mu\text{L}$  4-amino-1-butanola, 33.84  $\mu\text{L}$  octene kiseline i 4 Å molekulska sita. Reakcijska smjesa miješa se na 100°C preko noći. Reakcijska smjesa ohladi se na sobnu temperaturu i otapalo se upari do suha na rotacijskom uparivaču. Uljni produkt otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ekstrahira s vodom (3x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrira i upari do suha na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 25g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-100% (10% MeOH/DCM) u diklormetanu kao eluens. Nakon uparavanja dobiveno je 171.9 mg ( $Y = 35\%$ ) žute krutine 8.



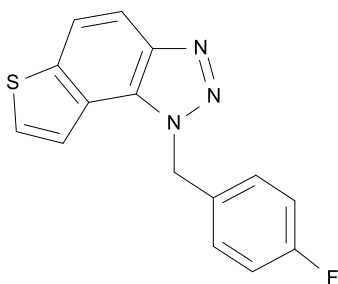
**8** (35%)

**4-(4,5-dihidro-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)butan-1-ol (8):** 171.9 mg (izolirano iskorištenje 35%);  $R_f$  (DCM/MeOH (10%)) = 0.54;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.29 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 7.25 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 4.60 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 3.73 (t,  $J =$

6.6 Hz, 2H), 3.18 – 3.12 (m, 4H), 2.11 – 2.06 (m, 2H), 1.71 – 1.66 (m, 2H), 1.61 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 142.6, 139.5, 125.1, 124.7, 121.3, 116.6, 62.1, 49.1, 29.5, 26.8, 24.7, 21.4; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 249.0936$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 249.0935$ .

#### 4.3.3. SINTEZA AROMATIZIRANIH TIENOBENZO-TRIAZOLA 9-15

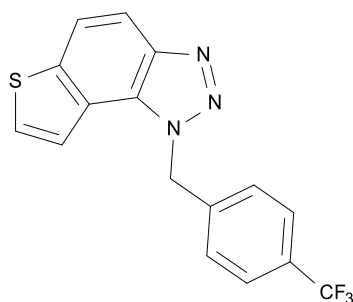
U okrugloj tikvici otopi se 138.9 mg (0.487 mmol, 1.0 ekv) pročišćenog produkta 2 u 7380.0  $\mu\text{L}$  dioksana te se doda 132.7 mg (0.584 mmol, 1.2 ekv) DDQ. Reakcijska smjesa miješa se preko noći na  $70^\circ\text{C}$ . Smjesa ohlađena na sobnu temperaturu se otopi u 60.0 mL etil-acetata i ispere s 1M KOH (2x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , profiltrira i upari do suha. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 4g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-30% (cy-hex:EtOAc=1:1) u cikloheksanu kao eluens. Uparavanjem je dobiveno 89.6 mg (Y = 65%) prozirne krutine 9.



**9** (65%)

**1-(4-fluorobenzil)-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-d][1,2,3]triazol (9):** 89.6 mg (izolirano iskorištenje 65%);  $R_f(\text{Cy-hex}/\text{EtOAc} (50\%)) = 0.50$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 8.00 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.82 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.58 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 7.21 – 7.16 (m, 2H), 7.01 (t,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.09 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 162.6 (d,  $J_{\text{C-F}} = 250$  Hz), 144.7, 140.2, 130.9, 128.6, 128.4, 127.9, 122.6, 119.9, 119.3, 116.2, 116.1, 52.4; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{S}$  (obtained for the pure product):  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 283.0580$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 283.0575$ .

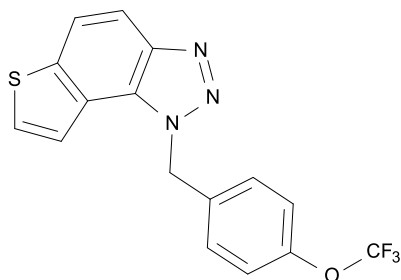
U okrugloj tikvici otopi se 155.0 mg (0.462 mmol, 1.0 ekv) pročišćenog produkta 3 u 7000.0  $\mu$ L dioksana te se doda 125.8 mg (0.554 mmol, 1.2 ekv) DDQ. Reakcijska smjesa miješa se preko noći na 70°C. Smjesa ohlađena na sobnu temperaturu otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ispere s 1M KOH (2x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, profiltrira i upari do suha. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 4g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-60% (cy-hex:EtOAc=1:1) u cikloheksanu kao eluens. Uparavanjem je dobiveno 70.7 mg (Y = 46%) bijele krutine 10.



**10** (46%)

**1-(4-(trifluorometil)benzil)-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (10):** 70.7 mg (izolirano iskorištenje 46%);  $R_f$  (Cy-hex/EtOAc (50%)) = 0.47; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 8.04 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 7.86 (dd,  $J$  = 8.9, 0.8 Hz, 1H), 7.61 – 7.60 (m, 3H), 7.46 (dd,  $J$  = 5.6, 0.8 Hz, 1H), 7.32 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.21 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 144.9, 140.5, 139.3, 130.8, 128.8, 128.4, 127.1, 126.4, 122.6, 119.8, 119.7, 116.4, 52.7 (karakteristično CF<sub>3</sub> cijepanje nije detektirano zbog premalog broja skeniranja); HRMS ( $m/z$ ) for C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>S: [M+H]<sup>+</sup><sub>calcd</sub> = 333.0548, [M+H]<sup>+</sup><sub>measured</sub> = 333.0542.

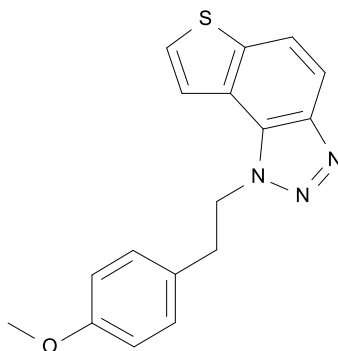
U okrugloj tikvici otopi se 165.9 mg (0.472 mmol, 1.0 ekv) pročišćenog produkta 4 u 7150.0  $\mu$ L dioksana te se doda 128.6 mg (0.566 mmol, 1.2 ekv) DDQ. Reakcijska smjesa miješa se preko noći na 70°C. Smjesa ohlađena na sobnu temperaturu otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ispere s 1M KOH (2x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, profiltrira i upari do suha. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 4g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-30% (cy-hex:EtOAc=1:1) u cikloheksanu kao eluens. Nakon uparavanja dobiveno je 97.5 mg (Y = 59%) bijele krutine 11.



**11 (59%)**

**1-(4-(trifluorometoksi)benzil)-1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (11):** 97.5 mg (izolirano iskorištenje 59%);  $R_f$ (Cy-hex/EtOAc (50%)) = 0.55;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 8.03 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 7.85 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 7.61 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 7.26 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 2H), 7.19 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 6.15 (s, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 149.3, 144.8, 140.4, 134.0, 128.8, 128.3, 128.3, 127.7, 119.9, 119.6, 116.3, 52.4 (the characteristic  $\text{CF}_3$  coupling is not detected due to an insufficient number of scans); HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 349.0497$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 349.0489$ .

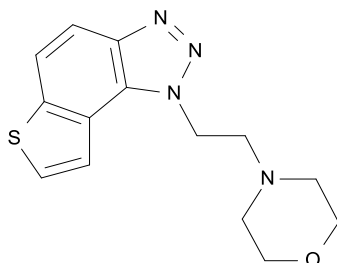
U okrugloj tikvici otopi se 190.0 mg (0.610 mmol, 1.0 ekv) pročišćenog produkta 5 u 9240.0  $\mu\text{L}$  dioksana te se doda 166.2 mg (0.732 mmol, 1.2 ekv) DDQ. Reakcijska smjesa miješa se preko noći na  $70^\circ\text{C}$ . Smjesa ohlađena na sobnu temperaturu otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ispere s 1M KOH (2x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , profiltrira i upari do suha. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 4g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-30% (cy-hex:EtOAc=1:1) u cikloheksanu kao eluens. Nakon uparavanja dobiveno je 105.8 mg ( $Y = 56\%$ ) prozirne krutine 12.



**12 (56%)**

**1-(4-metoksifenetil)-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol (12):** 105.8 mg (izolirano iskorištenje 56%);  $R_f$ (Cy-hex/EtOAc (50%)) = 0.43;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.99 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.84 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.74 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 7.71 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 6.85 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 5.11 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.33 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 158.7, 144.3, 139.9, 129.7, 128.9, 127.8, 122.5, 119.4, 118.9, 116.2, 114.2, 101.7, 55.3, 51.1, 35.7; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 309.0936$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 309.0928$ .

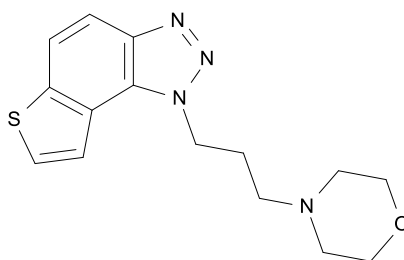
U okrugloj tikvici otopi se 265.7 mg (0.915 mmol, 1.0 ekv) pročišćenog produkta 6 u 13.864 mL dioksana te se doda 249.3 mg (1.098 mmol, 1.2 ekv) DDQ. Reakcijska smjesa miješa se preko noći na 70°C. Smjesa ohlađena na sobnu temperaturu otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ispere s 1M KOH (2x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , profiltrira i upari do suha. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 12g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-50% (10% MeOH/DCM) u diklormetanu kao eluens. Uparavanjem je dobiveno 53.8 mg (Y = 20%) smeđe uljaste tekućine 13.



**13** (20%)

**4-(2-(1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-il)etil)morfolin (13):** 53.8 mg (izolirano iskorištenje 20%);  $R_f$ (DCM/MeOH (10%)) = 0.64;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.99 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.84 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.82 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 7.73 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 5.06 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.68 (t,  $J = 4.4$  Hz, 4H), 3.03 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 4.6$  Hz, 4H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 144.5, 140.2, 128.8, 128.2, 122.8, 119.8, 119.2, 116.4, 66.9, 57.8, 53.9, 47.7; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 288.1045$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 288.1040$ .

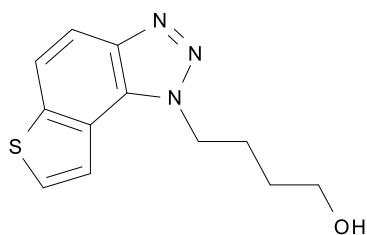
U okrugloj tikvici otopi se 153.0 mg (0.503 mmol, 1.0 ekv) pročišćenog produkta 7 u 7620.0  $\mu$ L dioksana te se doda 205.66 mg (0.906 mmol, 1.2 ekv) DDQ. Reakcijska smjesa miješa se preko noći na 70°C. Smjesa ohlađena na sobnu temperaturu otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ispere s 1M KOH (2x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, profiltrira i upari do suha. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 12g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-50% (10%MeOH/DCM) u diklormetanu kao eluens. Uparavanjem je dobiveno 49.9 mg (Y = 33%) crveno-narančaste uljaste tekućine 14.



**14** (33%)

**4-(3-(1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-d][1,2,3]triazol-1-il)propil)morfolin (14):** 49.9 mg (izolirano iskorištenje 33%);  $R_f$  (DCM/MeOH (10%)) = 0.68; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.99 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 7.83 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 7.71 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 5.03 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 3.66 (t,  $J$  = 4.1 Hz, 4H), 2.44 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 2.40 (s, 4H), 2.28 – 2.24 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 144.4, 140.1, 128.9, 127.9, 122.9, 120.1, 119.2, 116.3, 67.1, 55.6, 53.8, 47.8, 27.2; HRMS ( $m/z$ ) for C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>OS: [M+H]<sup>+</sup><sub>calcd</sub> = 302.1201, [M+H]<sup>+</sup><sub>measured</sub> = 302.1199.

U okrugloj tikvici otopi se 55.2 mg (0.221 mmol, 1.0 ekv) pročišćenog produkta 8 u 3348.0  $\mu$ L dioksana te se doda 60.2 mg (0.265 mmol, 1.2 ekv) DDQ. Reakcijska smjesa miješa se preko noći na 70°C. Smjesa ohlađena na sobnu temperaturu otopi se u 60.0 mL etil-acetata i ispere s 1M KOH (2x20.0 mL). Organski sloj suši se iznad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, profiltrira i upari do suha. Dobiveni sirovi produkt pročisti se na 4g koloni (Interchim Si-HC puriFlash, 50  $\mu$ ) koristeći 0-60% (10%MeOH/DCM) u diklormetanu kao eluens. Nakon uparavanja dobiveno je 34.3 mg (Y = 63%) bijelo-žute krutine 15.



**15** (63%)

**4-(1H-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-d][1,2,3]triazol-1-yl)butan-1-ol (15):** 34.3 mg (izolirano iskorištenje 63%);  $R_f$ (DCM/MeOH (10%)) = 0.51;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.98 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.83 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 4.99 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.75 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 2.23 – 2.19 (m, 2H), 1.73 – 1.69 (m, 2H), 1.67 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 144.6, 140.0, 128.7, 128.2, 122.9, 119.9, 119.2, 116.2, 62.2, 49.6, 29.5, 26.8; HRMS ( $m/z$ ) for  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{OS}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calcd}} = 247.0779$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{measured}} = 247.0776$ .



## 5. ZAKLJUČAK

Koristeći dva različita pristupa sinteze, fotociklizijski i alternativni, uspješno je dobiveno 15 novih tienbenzo-triazola 1-15. Krajnji rezultat je opsežan skup molekula za testiranje s različitim funkcionalnim grupama na triazolnom prstenu ili različitim aromatskim karakterom središnjeg prstena u strukturi. Većina molekula pokazala je bolju inhibicijsku aktivnost prema enzimu butirilkolinesterazi.

Od 15 novosintetiziranih spojeva, samo 4 (1, 2, 9, 12) je pokazalo inhibicijsku potenciju prema BChE u rasponu vrijednosti karakterističnima za uobičajene inhibitore kolinesteraze. Prema acetilkolinesterazi je samo jedan spoj (6) pokazao dobru inhibicijsku potenciju. Spojevi s tienbenzo-triazolnom jezgrom pokazuju veliki potencijal za buduće inhibitore kolinesteraza te mogu biti dobra podloga za traženje novih terapeutika za neurološke poremećaje. Najbolji potencijal za nove inhibitore pokazali su spojevi s *para*-OCH<sub>3</sub> benzilnom skupinom na triazolnoj jezgri ili *para*-OCH<sub>3</sub>-fenilnom skupinom na produljenom alifatskom lancu. Također, *para*-F-benzilna skupina pričvršćena na triazol s dihidro- ili aromatskim središnjim prstenom te osnovni kostur s etoksidnom skupinom daju obećavajuće rezultate za budući dizajn inhibitora kolinesteraza.

## 6. LITERATURA

1. S.F. Zhou, W.Z. Zhong. Drug Design and Discovery: Principles and Applications. *Molecules*. 22 (2017) 1-6.
2. R.C. Mohsa, N.H. Greig. Drug discovery and development: Role of basic biological research Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions. (2017) 1-7.
3. R.C. Mohsa, N.H. Greig. Drug discovery and development: Role of basic Biological Research. *Alzheimer's Dementia*. 3 (4) (2017) 651–657.
4. N.Prakash, P.Devangi. *Drug Discovery*. 2(4) (2010) 1-12.
5. S.Brogi, T.C. Ramalho, K.Kuca, J.L. Medina-Franco, M. Valko. *In Silico Methods for Drug Design and Discovery*. (2020) 1-12.
6. V. P. Whittaker, *Chem. Biol. Interact.* 187 (2010) 23-26.
7. M. Cygler, J. D. Schrag, J. L. Sussman, M. Harel, I. Silman, M. K. Gentry, B. P. Doctor, *Protein Sci.* 2 (1993) 366-382.
8. F. Nachon, P. Masson, Y. Nicolet, O. Lockridge, J. C. Fontecilla-Camps, Comparison of structures of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. U: E. Giacobini, urednik, *Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors*, Martin Dunitz Ltd., London, (2003) 39.
9. J. Massouli', *Molecular forms and anchoring of acetylcholinesterases*. U: *Cholinesterases and cholinesterases inhibitors* (E. Giacobini, ur.), Martin Dunitz Ltd., London, (2000) 81-103.
10. J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253 (1991) 872-897.
11. Z. Kovarik, Amino acid residues conferring specificity of cholinesterases. *Period. Biol.* 101 (1999) 7-15.
12. Z. Radić, N.A. Pickering, D.C. Vellom, S. Camp, P. Taylor, Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors, *Biochemistry* 32 (1993) 12074–12084.
13. A. Saxena, A.M.G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B.P. Doctor, Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterase revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* 119-120 (1999) 61–69.

14. P. Taylor, Z. Radić, N.A. Hosea, S. Camp, P. Marchot, H.A. Berman, Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicol. Lett.* 82–83 (1995) 453–458.
15. H. Soreq, S. Seidman, Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (2001) 294–302.
16. I. Silman, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2005) 293–302.
17. C. Pienica, H. Soreq, MicroRNA regulators of cholinergic signaling link neuromuscular, cardiac and metabolic systems. *Period. biol.* 118 (2016) 373–379.
18. M.M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E.G. Duysen, O. Lockridge, Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110 (2002) 627–639.
19. A.L. Guillozet, J.F. Smiley, D.C. Mash, Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann. Neurol.* 42 (1997) 909–918.
20. M. M. Mesulam, C. Geula, Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann. Neurol.* 36 (1994) 722–727.
21. A. Chatonnet, O. Lockridge, Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*, 260 (1989) 625–634.
22. A.N. Cokugras, Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk. J. Biochem.* 28 (2003) 54–61.
23. S. Darvesh, R. Walsh, R. Kumar, A. Caines, S. Roberts, D. Magee, K. Rockwood, E. Martin, Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 17 (2003) 117–126.
24. S.P. Briguglio, P. Corona, E. Gavini, M. Nieddu, G. Boatto, A. Carta. Benzotriazole: An Overview on its versatile biological behavior. *European Journal of Medicinal Chemistry.* (2014) 1-37.
25. N. Singh, V. Priya, R. Bhasin, K. Verma. An exploration of sundry nature of benzotriazole derivatives: A Review. *International research journal of pharmacy.* 10 (3) (2019)
26. C. M. Jamkhandi, J.I. Disouza, S.B. Magdum, K.B. Swami, P.S. Kumbhar. Synthesis, characterization, in vitro antiinflammatory activity and qsar evaluation of benzotriazolyl)- 3-{5-(carboxymethyl) diazenyl} -2-hydroxyphenyl} prop-2-enoic acid derivatives. *European journal of pharmaceutical and medical research.* 2(6) (2016) 302-306.

27. URL: [Enzymes: Function, definition, and examples \(medicalnewstoday.com\)](https://www.medicalnewstoday.com) (pristup 10.6.2023.)
28. URL: [Mechanism of Enzyme Action \(Activation Energy and Lock and Key Hypothesis Diagram\) - Biology Brain Mechanism of enzyme action](#) (pristup 10.6.2023.)
29. URL: [medlib.mef.hr/368/1/Simic G Neurobiologija demencija rep 368.pdf](https://medlib.mef.hr/368/1/Simic_G_Neurobiologija_demencija_rep_368.pdf) (pristup 10.6.2023.)
30. S.Agatonovic-Kustrina, C. Kettleb, D.W. Mortonb. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. (2018) 553–565.
31. J.-C. Li, J. Zhang, M.C. Rodrigues, D.-J. Ding, J.P.F. Longo, R.B. Azevedo, L.A. Muehlmann, C.S. Jiang. Synthesis and evaluation of novel 1,2,3-triazole-based acetylcholinesterase inhibitors with neuroprotective activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. (2016) 1-5.
32. B.N. Sağlık, D. Osmaniye, U.A. Evik, S. Levent , B.K.A. Soglu, U. Özkay, Z.A. Kaplanci. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationships of Thiazole Analogs as Anticholinesterase Agents for Alzheimer's Disease. *Molecules*. 25 (2020) 4312.
33. N. Riaz, M. Iftikhar, M. Saleem, A.-ur-Rehman, S. Hussain, F. Rehmat, Z. Afzal, S. Khawar, M. Ashraf, M. alRashida. New synthetic 1,2,4-triazole derivatives: Cholinesterase inhibition and molecular docking studies. *Results in Chemistry*. (2020) 100041
34. A. Heyman, W.E. Wilkinson, J.A. Stafford, M.J. Helms, A.H. Sigmon, T. Weinberg. Alzheimer's disease: a study of epidemiological aspects. *Annals of Neurology*. 15 (1984) 335 - 41.
35. V. Folnegović-Šmalc, Z. Folnegović, S. Uzun, M. Vilibić, S. Dujmić, G. Makarić. Psychotrauma Related to War and Exile as a Risk Factor for the Development of Dementia of Alzheimer's Type in Refugees. *Croat Med J* 38(3) (1997) 273 - 6.
36. URL: [31274 \(srce.hr\)](https://srce.hr/31274) (pristup 10.6.2023.)
37. A. Đulović, Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014
38. I. Božić, Određivanje antioksidacijske aktivnosti i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza nehlapljivih izolata korijena gaveza, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2018
39. R. Anand, K.D. Gill, A.A. Mahdi, Therapeutics of Alzherimer's disease: Past,present and future. *Neuropharmacology* (2014) 7

40. URL:[http://neuron.mefst.hr/docs/medicina/medicine\\_engl/katedra\\_fiziologija/Zdravstveni\\_studiji/prezentacije/Sredisnji\\_zivcani\\_sustav\\_ZDRAV\\_STUD\\_2013.pdf](http://neuron.mefst.hr/docs/medicina/medicine_engl/katedra_fiziologija/Zdravstveni_studiji/prezentacije/Sredisnji_zivcani_sustav_ZDRAV_STUD_2013.pdf) (pristup 10.6.2023.)
41. A. Bodač, Inhibicijsko djelovanje seskviterpena ( $\beta$ -kariofilena i kariofilen oksida) na aktivnost acetilkolinesteraze, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016.
42. URL:<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msdprirucnik/neurologija/delirij-i-demencija/alzheimerova-bolest> (pristup 10.6.2023.)
43. K. Pedić, Inhibicija acetilkolinesteraze odabranim organskim sulfidima, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2019
44. G. Blessed. Biochemistry of dementia. Chicester: Roberts PJ, John Wiley, 1980.
45. Y. Dudai. The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends. New York: Oxford University Press, 1989
46. S. Uzun, N. Mimica, V. Folnegović-Šmalc Suvremena farmakoterapija demencija. Treći hrvatski psihijatrijski kongres, Sažeci radova, Osijek. 118 (2002)
47. URL: [List of Cholinesterase inhibitors \(acetylcholinesterase inhibitors\) - Drugs.com](#) (pristup 10.6.2023.)
48. URL: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:401623> (pristup 10.6.2023.)
49. F. Burčul, Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae, Doktorski rad, Zagreb, 2014
50. M. Božičević, Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost novih nitro-tiazolnih derivata, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2020
51. URL: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=5> , (pristup 10.6.2023.).
52. G. Turan-Zitouni, A. Ozdemir, Z.A. Kaplancikli, M.D. Altintop, H.E. Temel, G.A. Çiftci, Synthesis and Biological Evaluation of Some Thiazole Derivatives as New Cholinesterase Inhibitors, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 28(3) (2013) 509-514.
53. P.A. Channar, M.S. Shah, A. Saeed, S.U. Khan, F.A. Larik, G. Shabir, J. Iqbal. Synthesis, Characterization and Cholinesterase Inhibition Studies of New Arylidene Aminothiazolyethanone Derivatives. Medicinal Chemistry. 13 (2017) 1-6.
54. Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. San Diego (CA): Academic Press Inc.; 1992.

55. S. Ghafary, R. Ghobadian, M. Mahdavi, H. Nadri, A. Moradi, T. Akbarzadeh, Z. Najafi, M. Sharifzadeh, N. Edraki, F. Homayouni Moghadam, M. Amini. Design, synthesis, and evaluation of novel cinnamic acid-tryptamine hybrid for inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2020) 1-20.
56. Md. JunaidID, N. Islam, Md. K. Hossain, M. Obayed Ullah, M. Halim. Metal based donepezil analogues designed to inhibit human acetylcholinesterase for Alzheimer's disease. *Metal based donepezil analogues designed for Alzheimer's disease*. (2019) 1-24.
57. J. Cheung, M.J. Rudolph, F. Burshteyn, M.S. Cassidy, E.N. Gary, J. Love, M.C. Franklin, J.J. Height. Structure of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*. (2012) 1-6.
58. S.P. Mantoani, T.P. C. Chierrito, A.F. L. Vilela, C.L. Cardoso, A. Martínez, I. Carvalho. Novel Triazole-Quinoline Derivatives as Selective Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors. *Molecules* 21 (2016) 193.
59. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1p0i> (pristup 10.6.2023.)
60. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija*, Arh Hig Rada Toksikol, 2011
61. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Esterase> (pristup 10.6.2023.)
62. N. Blažević, *Učinci antilipidnih lijekova na butirilkolinesterazu u biološkom materijalu štakora*, Diplomski rad, Zagreb, 2014
63. A. Bosak, I. Gazić-Smilović, G. Šinko, V. Vinković, Z. Kovarik, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 6716-6723.
64. A. Bosak, I. Primožič, M. Oršulić, S. Tomić, V. Simeon-Rudolf, *Croat. Chem. Acta* 78 (2005) 121-128
65. A. Bosak, I. Gazić, V. Vinković, Z. Kovarik, *Arch. Biochem. Biophys.* 471 (2008) 72-76.
66. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* 253 (1991) 872-879.
67. A. Ordentlich, C. Kronman, D. Barak, D. Stein, N. Ariel, D. Marcus, B. Velan, A. Shafferman, *FEBS Lett.*, 334 (1993) 215-220.
68. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 62 (2011) 175-189.

69. G. Gibney, S. Camp, M. Dionne, K. MacPhee-Quigley, P. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 (1990) 7546- 7550.
70. P. Taylor, Z. Radić, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34 (1994) 281-320.
71. P. Taylor, Z. Radic, N. A. Hosea, S. Camp, P. Marchot, H. A. Berman, *Toxicol. Lett.* 82-83 (1995) 453-458.
72. M. Bajda, A. Więckowska, M. Hebda, N. Guzior, C. A. Sottriffer, B. Malawska, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 5608-5632
73. A. Shafferman, A. Ordentlich, D. Barak, D. Stein, N. Ariel, B. Velan, *Biochem. J.* 318 (1996) 833-840.
74. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecellia-Camps, F. Nachon, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 41141-41147
75. Z. Radić, N. A. Pickering, D. C. Vellom, S. Camp, P. Taylor, *Biochemistry* 32 (1993) 12074-12084.
76. Z. Radić, E. Reiner, P. Taylor, *Mol. Pharmacol.* 39 (1991) 98-104.
77. M. C. McGuire, C. P Nogueira, C. F Bartels, H. Lightstone, A. Hajra, A. F. Van der Speck, O. Lockridge B. N. La Du, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989) 953- 957.
78. P. Masson, M. T. Froment, C. F. Bartels, O. Lockridge, *Eur. J. Biochem.* 235 (1996) 36-48
79. J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija, Školska knjiga, Zagreb* (2013) 370.
80. E. Reiner, Z. Radić, u E. Giacobini (ur.), *Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors*, Martin Dunitz Ltd., London (2003) 103-120.
81. R.M. Lane, S.G. Potkin, A. Enz. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int. J. Neuropsychoph.* 9(1) (2006)101–124.
82. E. Giacobini. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol. Res.* 50 (2004) 433–440.
83. S.M. Stahl. The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease part 2: illustrating their mechanisms of action. *J. Clin. Psychiatry.* 61 (2000) 813–814.
84. M. L. Waite. *Australian Prescriber* 38 (2015) 60-63
85. [www.nia.nih.gov](http://www.nia.nih.gov) (pristup 10.6.2023.)
86. Weinstock M. weinstock. Selectivity of cholinesterase inhibition. *CNS Drugs* 12 (1999) 307-323.
87. H. Ogura, T. Kosasa, Y. Kuriya, Y. Yamanishi. Comparison of inhibitory activities of donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in vitro. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22 (2000) 609-613.

88. S.L. Rogers, Friedhoff L.T. Friedhoff. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: Results of a US multicentre randomised double blind placebo-controlled trial The donepezil study group. *Dementia* 7 (1996) 293-303.
89. J. Olin, L. Schneider. Galantamine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD001747, 2001
90. P. Bar-On, C.B. Millard, M. Harel, H. Dvir, A. Enz, J.L. Sussman, I. Silman: Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochem* 41 (2002) 3555-3564.
91. M.D. Fraser, J.R. Davies, X. Chang. New gold in them thar hills: Testing a novel supply route for plant-derived galanthamine. *J Alzheimers Dis* 55 (2017) 1321-1325.
92. F.M. de Souza, N. Busquet, M. Blatner, K.N. Maclean, D. Restrepo. Galantamine improves olfactory learning in the Ts65Dn mouse model of down syndrome. *Sci Rep* 1 (2011) 137.
93. K.G. Pernov. Nivalin and its curative effect on disease of the nervous system. *Psychiatr Neurol Med Psychol (Leipz)* 13 (1961) 416-420.
94. P.N. Tariot, P.R. Solomon, J.C. Morris, P. Kershaw, S. Lilienfeld, C. Ding. A 5-month, randomized, placebocontrolled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group. *Neurology* 54 (2000) 2269-2276.
95. M. Mehta, A. Adem, M. Sabbagh. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2012 728983.
96. S.L. Rogers, M.R. Farlow, R.S. Doody, R. Mohs, L.T. Friedhoff. A 24 week double blind placebo controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil study group. *Neurology* 50 (1998) 136-145.
97. S.A. Jacobson, M.N. Sabbagh. Donepezil: Potential neuroprotective and disease-modifying effects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4 (2008) 1363-1369.
98. G. Kryger, I. Silman, J.L. Sussman. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Struct* 7 (1999) 297-307.
99. F. Inglis. The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *Int J Clin Pract Suppl* 127 (2002) 45-63.
100. M.L. Onor, M. Trevisiol, E. Aguglia. Rivastigmine in the treatment of alzheimer's disease: An update. *Clin Interv Aging* 2 (2007) 17-32.
101. J. Corey-Bloom, R. Anand, J. Veach. A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in



- patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychopharmacol* 1 (1998) 55-65.
102. W.J. Krall, J.J. Sramek, N.R. Cutler: Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer disease, *33* (4) (1999) 441-450.
103. URL: [IC50 - Wikipedia](#) (pristup 10.6.2023.)
104. URL: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:269497> (pristup 10.6.2023.)
105. M. Mlakić et al.: New naphtho/thienobenzo-triazoles with interconnected anti-inflammatory and cholinesterase inhibitory activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 241 (2022)
106. M. Mlakić et al.: Synthesis, photochemistry and computational study of novel 1,2,3-triazole heterostilbenes: Expressed biological activity of their electrocyclization photoproducts. *Bioorganic Chemistry* 121 (2022)
107. A. Ratković et al.: Synthesis and photochemistry of novel 1,2,3-triazole di-heterostilbenes. An experimental and computational study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 261 (2021)
108. Z. Kovarik Amino acid residues conferring specificity of cholinesterases. *Period. Biol.* 101 (1999) 7–15.

## ŽIVOTOPIS

Ida Selec [REDACTED] 2017. godine završava Prvu gimnaziju Varaždin, nakon čega upisuje preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Na drugoj i trećoj godini studija ostvaruje pravo na STEM stipendiju u području prirodnih znanosti. Studentsku praksu odradila je u sklopu studija 2020. godine u Fidelta d.o.o. Nakon obrane završnog rada na temu *Semi-kvantitativne metode karakterizacije mikroplastike u vodenom mediju* 2020. godine stječe naziv prvostupnice primijenjene kemije (univ. bacc. appl. chem). Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena organska kemija na istom fakultetu. Diplomski rad izradila je u Selvita d.o.o na temu *Priprava i biološka aktivnost novih tienobenzo-triazola*.