

Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

Ljiljana K. Koračak

**Sinteza derivata artemizinina koji ispoljavaju
selektivnost ka tumorskim ćelijama i potencijal za
reverziju rezistencije**

doktorska disertacija

Beograd, 2026

University of Belgrade
Faculty of Chemistry

Ljiljana K. Koračak

**Synthesis of artemisinin derivatives exhibiting
selectivity toward tumor cells and potential for
reversing drug resistance**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentori:

dr Igor M. Opsenica, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Miroslav Novaković, naučni savjetnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,

Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

dr Mario V. Zlatović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Akademik Slobodan M. Milosavljević, Srpska akademija nauka i umjetnosti

profesor emeritus, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Života Selaković, docent

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Akademik Bogdan A. Šolaja, Srpska akademija nauka i umjetnosti

profesor Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta u penziji

dr Milica Pešić, naučni savjetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: __. __. 2026. godine

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za organsku hemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, pod mentorstvom dr Igora Opsenice i dr Miroslava Novakovića. Dr Igoru Opsenici dugujem veliku zahvalnost na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju, savjetima i slobodi u istraživačkom radu. Njegova podrška i vjera u moje sposobnosti bili su mi značajan podstrek tokom svih godina zajedničkog rada i doprinijeli su mom naučnom i ličnom razvoju. Posebnu zahvalnost dugujem i mentoru dr Miroslavu Novakoviću na stručnim savjetima, nesebičnoj pomoći i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se članovima komisije, akademiku Slobodanu Milosavljeviću, profesoru emeritusu Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, akademiku Bogdanu Šolaji redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta u penziji, dr Mariu Zlatoviću, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, dr Životi Selakoviću, docentu Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta i dr Milici Pešić, naučnom savjetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, što su prihvatili učešće u komisiji za pregled ove disertacije i svojim dragocjenim sugestijama i komentarima doprinijeli njenom kvalitetu.

Zahvalnost dugujem svojim koleginicama i kolegama iz laboratorija 432, 468 i 474 Milici, Dunji, Ani, Nataši, Katarini, Andriani, Dejanu, Životi, Andriji i Milošu na svim zajedničkim trenucima tokom proteklih godina. Hvala vam na pomoći, podršci, brojnim razgovorima i druženju koji su uljepšali ove godine. Posebno hvala kolegici Nikolić na odličnoj saradnji, zajedničkom savladavanju brojnih obaveza kao i na druženju van laboratorije. Zahvaljujem se Vanji, Marini i Anđeli na divnoj saradnji tokom izrade njihovih završnih radova. Takođe, zahvalnost dugujem Miri i Loli na pomoći i prijatnoj saradnji tokom zajedničkog rada sa studentima na eksperimentalnim vježbama.

Posebnu zahvalnost dugujem i kolegama iz laboratorije 524, dr Vladimiru Ajdačiću, dr Pavlu Stojkoviću i Branislavu Kokiću na razmjeni znanja i iskustava, kao i na prijatnoj i podsticajnoj radnoj atmosferi. Pavlu sam iskreno zahvalna na savjetima, motivaciji i nesebičnoj pomoći tokom svih godina zajedničkog rada. Vladimiru dugujem posebnu zahvalnost što je od mog prvog dana u laboratoriji nesebično dijelio svoje znanje i iskustvo, kao i na strpljenju, dragocjenim savjetima i velikoj pomoći tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Milici Pešić na konstruktivnim komentarima i dragocjenim sugestijama tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Takođe, zahvaljujem se i koleginicama sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, dr Ani Podolski Renić, Emi Lupšić i Ani Stepanović, na saradnji i značajnom doprinosu biološkom dijelu istraživanja.

Hvala mojim prijateljima na razumijevanju i podršci, kao i na svim trenucima koji su mi uljepšali godine studiranja. Posebno hvala mojoj Andrei Grbić, koja je još od gimnazije bila uz mene, dijeleći sa mnom sve lijepe, ali i teške trenutke. Hvala joj na svim godinama zajedničkog života, beskrajnim razgovorima, strpljenju i razumijevanju. Neizmjereno sam zahvalna što smo kroz sve ove godine zajedno rasle i što je bila dio svakog važnog poglavlja mog života.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na bezuslovnoj ljubavi, razumijevanju i podršci koju mi pružaju tokom svih ovih godina, a naročito tati i bratu na strpljenju i što su uvijek bili tu za mene. Posebno hvala mojoj mami, koja je moj najveći oslonac i podrška, koja je uvijek vjerovala u mene i pružala mi snagu da istrajem na ovom putu. Hvala joj što me je naučila da vjerujem u sebe, da ne odustajem od svojih ciljeva i da istrajem čak i onda kada je teško. Bez njene ljubavi, strpljenja i nesebične podrške, sve ovo ne bi bilo moguće. Takođe, veliko hvala mojoj kumi Miji i njenoj porodici na ljubavi, pažnji i nesebičnoj podršci tokom svih ovih godina.

Na kraju, ovu doktorsku disertaciju posvećujem baki Zori, koja nažalost više nije sa nama, ali čije uspomene i ljubav zauvijek ostaju dio mene. Znam da bi bila ponosna na mene i na sve što sam postigla.

Sinteza derivata artemizininina koji ispoljavaju selektivnost ka tumorskim ćelijama i potencijal za reverziju rezistencije

SAŽETAK

Rezistencija posredovana P-glikoproteinom (P-gp) predstavlja jedan od ključnih mehanizama višestruke rezistencije (MDR) na lijekove zbog čega sinteza novih hibridnih molekula sposobnih da prevaziđu MDR fenotip, inhibiraju aktivnost P-gp i povećaju intracelularnu akumulaciju citotoksičnih agenasa predstavlja značajan pravac u razvoju antitumorskih lijekova.

Cilj ove doktorske disertacije je sinteza novih hibridnih molekula koji u svojoj strukturi objedinjuju artesunat, semisintetski derivat prirodnog proizvoda artemizininina, i derivate pirimidina, sa ciljem dobijanja jedinjenja unaprijeđene antitumorske aktivnosti prema senzitivnim i rezistentnim ćelijskim linijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NSCLC) i glioblastoma. Hibridna jedinjenja sa piperazinskim linkerom su pokazala izraženu antitumorsku aktivnost i selektivnost prema senzitivnim NSCLC ćelijama, uz sposobnost inhibicije P-gp i prevazilaženja MDR fenotipa kod pojedinih derivata. Derivati artesunata koji u svojoj strukturi sadrže 1,2,3-triazolski prsten su pokazali niže IC₅₀ vrijednosti na rezistentnim ćelijama NSCLC u poređenju sa senzitivnim, što predstavlja fenomen kolateralne senzitivnosti. Derivati artesunata su pokazali potentniji efekat na ćelijama NSCLC u odnosu na ćelije glioblastoma, te su detaljna biološka ispitivanja sprovedena na senzitivnim i MDR ćelijama NSCLC. Kod najpotentnijih hibrida sposobnost selektivnog eliminisanja MDR ćelija povezana je sa indukcijom reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (ROS/RNS) i zavisna od funkcionalnog stanja P-gp. Stoga, derivatizacija artesunata predstavlja obećavajuću strategiju za prevazilaženje P-glikoproteinom posredovane višestruke rezistencije.

Ključne riječi: artemizinin, artesunat, hibridni molekuli, heterociklična jedinjenja, pirimidin, nesitnoćelijski karcinom pluća, glioblastom, višestruka rezistencija na lijekove, reverzija rezistencije

Naučna oblast: hemija

Uža naučna oblast: organska hemija

Synthesis of artemisinin derivatives exhibiting selectivity toward tumor cells and potential for reversing drug resistance

ABSTRACT

P-glycoprotein (P-gp)-mediated resistance represents one of the key mechanisms of multidrug resistance (MDR). Therefore, the synthesis of new hybrid molecules capable of overcoming the MDR phenotype, inhibiting P-gp activity, and increasing the intracellular accumulation of cytotoxic agents represents an important approach in the development of anticancer drugs.

The aim of this doctoral dissertation is the synthesis of new hybrid molecules combining artesunate, a semisynthetic derivative of the natural product artemisinin, with pyrimidine derivatives in order to obtain compounds with improved antitumor activity against sensitive and resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) and glioblastoma cell lines. Hybrid compounds containing a piperazine linker exhibited pronounced antitumor activity and selectivity toward sensitive NSCLC cells, while some derivatives demonstrated the ability to inhibit P-gp activity and overcome the MDR phenotype. Artesunate derivatives containing a 1,2,3-triazole ring showed lower IC₅₀ values in resistant NSCLC cells than in sensitive cells, indicating the phenomenon of collateral sensitivity. Artesunate derivatives exhibited a more potent effect against NSCLC cells than against glioblastoma cells; therefore, detailed biological studies were performed on sensitive and MDR NSCLC cells. In the most potent hybrids, the ability to selectively eliminate MDR cells was associated with the induction of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) and depended on the functional status of P-gp. Therefore, artesunate derivatization represents a promising strategy for overcoming P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.

Key words: artemisinin, artesunate, hybrid molecules, heterocyclic compounds, pyrimidine, non-small cell lung cancer, glioblastoma, multidrug resistance, reversal of resistance

Scientific field: chemistry

Scientific subfield: organic chemistry

Lista skraćenica

A549	ćelijska linija humanog adenokarcinoma pluća
ABC	engl. <i>ATP-binding cassette</i>
ABCB1/MDR1	engl. <i>ATP-binding cassette subfamily B member 1 / Multidrug Resistance Protein 1</i>
ABCC1/MRP1	engl. <i>ATP-binding cassette subfamily C member 1 / Multidrug resistance-associated protein 1</i>
ABCG2/BCRP	engl. <i>ATP-binding cassette subfamily G member 2 / Breast Cancer Resistance Protein</i>
ACT	kombinovana terapija zasnovana na artemizininu (engl. <i>artemisinin-based combination therapy</i>)
ADMET	apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost (engl. <i>absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity</i>)
ALK	engl. <i>anaplastic lymphoma kinase</i>
ATP	adenozin-trifosfat
ATR	oslabljena ukupna refleksija (engl. <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
a. u.	engl. <i>arbitrary units</i>
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil-
BRAF	engl. <i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
brs	prošireni singlet (engl. <i>broad singlet</i>)
CCRF-CEM	senzitivna ćelijska linija leukemije
CD8	engl. <i>cluster of differentiation 8</i>
CEM/ADR5000	višestruko rezistentna ćelijska linija leukemije
CI	ćelijski indeks (engl. <i>cell index</i>)
COSY	engl. <i>correlation spectroscopy</i>
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CuAAC	bakrom katalizovana azid-alkin cikloadicija (engl. <i>Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition</i>)
CYP3A4	citohrom P450 3A4
DCC	<i>N,N</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DCU	<i>N,N</i> -dicikloheksilurea
Dex-Ver	deksverapamil
DHA	dihidroartemizinin
DHE	dihidroetidijum
DIAD	diizopropil azodikarboksilat
DMAP	<i>N,N</i> -dimetilaminopiridin
DME	1,2-dimetoksietan
DHR	dihidrorodamin 123
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DOX	doksorubicin
DPPA	difenilfosforil-azid
d	dublet
dd	dublet dubleta

dt	dublet tripleta
EAANO	Evropsko udruženje za neuroonkologiju (engl. <i>European Association of Neuro-Oncology</i>)
EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
ekv	ekvivalent
EtOAc	etil-acetat
FAR	odnos fluorescentne aktivnosti (engl. <i>Fluorescence Activity Ratio</i>)
FBS	fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FGFR	engl. <i>fibroblast growth factor receptor</i>
GSH	glutation
Hz	Herc
HCT 116	ćelijska linija humanog kolorektalnog karcinoma
HL-60	ćelijska linija humane leukemije
HMBC	engl. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	masena spektrometrija visoke rezolucije (engl. <i>high resolution mass spectrometry</i>)
HRMS-HESI	masena spektrometrija visoke rezolucije sa zagrijanom elektrosprej jonizacijom (engl. <i>high-resolution mass spectrometry–heated electrospray ionization</i>)
HSQC	engl. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IASLC	Međunarodno udruženje za proučavanje raka pluća (engl. <i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>)
IC	infracrvena spektroskopija
IC₅₀	koncentracija jedinjenja koja dovodi do 50% inhibicije ispitivane biološke funkcije u poređenju sa kontrolnim uzorkom
IDH	izocitrat dehidrogenaza
J	konstanta spin–spin kuplovanja
kDa	kilodalton
KRAS	engl. <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
K562/A02	višestruko rezistentna ćelijska linija mijeloidne leukemije
K562/Adr	višestruko rezistentna ćelijska linija humane leukemije
MCF-7	ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke
MCF-7/Adr	rezistentna ćelijska linija humanog karcinoma dojke
MDR	višestruka rezistencija na lijekove (engl. <i>multidrug resistance</i>)
Me	metil-
MeCN	acetonitril
MEM	minimalni esencijalni medijum
MeOH	metanol

MET	engl. <i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
MFI	srednji intenzitet fluorescencije (engl. <i>mean fluorescence intensity</i>)
m	multiplet
m/z	odnos mase i naelektrisanja
MRC-5	ćelijska linija fetalnih fibroblasta pluća
mRNA	informaciona RNK
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat, redukovani
NSCLC	nesitnoćelijski karcinom pluća (engl. <i>non-small cell lung cancer</i>)
NBD	nukleotid-vezujući domen (engl. <i>nucleotide-binding domain</i>)
NCI-60	panel od 60 humanih tumorskih ćelijskih linija Nacionalnog instituta za rak
NCI-H460	ćelijska linija humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća
NCI-H460/R	rezistentna ćelijska linija humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća
NMR	nuklearna magnetna rezonancija
NOESY	engl. <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
OMe	metoksi
PBS	natrijum-fosfatni pufer
PD-1	engl. <i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	engl. <i>programmed death-ligand 1</i>
PDGFR	engl. <i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PET	pozitronska emisiona tomografija
P-gp	P-glikoprotein
Ph	fenil
PhMe	toluen
pKb	negativni logaritam konstante baznosti
ppm	engl. <i>parts per million</i>
q	kvartet
RNK	ribonukleinska kiselina
Rho123	rodamin 123
RNS	reaktivne azotne vrste
ROS	reaktivne kiseonične vrste
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	singlet
SAR	veza između strukture i aktivnosti (engl. <i>structure–activity relationship</i>)
SCLC	sitnoćelijski karcinom pluća (engl. <i>small cell lung cancer</i>)
SD	standardna devijacija
SEM	standardna greška srednje vrijednosti (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SI	indeks selektivnosti
SK-MEL-3	ćelijska linija humanog melanoma
SMMC-7721	ćelijska linija humanog hepatocelularnog karcinoma
S_NAr	nukleofilna aromatična supstitucija
SW620/AD300	rezistentna ćelijska linija humanog kolorektalnog karcinoma
s.t.	sobna temperatura
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija

t	triplet
td	triplet dubleta
TFA	trifluorsirćetna kiselina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna hromatografija
TMD	transmembranski domen (engl. <i>transmembrane domain</i>)
TNM	engl. <i>T-tumor, N-node, M-metastasis</i>
TPSA	engl. <i>topological polar surface area</i>
TQ	tarikvidar
t_R	retenciono vrijeme
t.t.	tačka topljenja
U87	ćelijska linija humanog glioblastoma
VEGFR	engl. <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WlogP	Wildman-Crippen logP
QSAR	engl. <i>quantitative structure–activity relationship</i>
δ	hemijsko pomjeranje u NMR spektroskopiji
v	talasni broj u IC spektroskopiji
°C	stepen Celzijusa

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DIO	2
2.1. Definicija raka	2
2.1.1. Glavna obilježja raka	2
2.1.2. Konvencionalni i savremeni pristupi u liječenju raka	4
2.2. Rak pluća	6
2.2.1. Podjela raka pluća.....	6
2.2.2. Faktori koji utiču na rak pluća	7
2.2.3. Terapijski pristupi u liječenju raka pluća.....	8
2.2.3.1 Ciljana terapija.....	9
2.2.3.2 Imunoterapija.....	10
2.3. Glioblastom	11
2.3.1. Klasifikacija i faktori koji utiču na glioblastom	11
2.3.2. Terapijski pristup u liječenju glioblastoma.....	11
2.4. Višestruka rezistencija na lijekove i P-glikoprotein	12
2.4.1. Višestruka rezistencija na lijekove (MDR).....	12
2.4.2. P-glikoprotein (P-gp).....	13
2.4.2.1. Mehanizam djelovanja P-glikoproteina.....	15
2.4.2.2. Inhibitori P-gp.....	15
2.5. Koncept molekulske hibridizacije i derivatizacija prirodnih proizvoda	17
2.6. Značaj prirodnog proizvoda artemizininina.....	20
2.6.1. Otkriće artemizininina u svijetu.....	20
2.6.2. Otkriće artemizininina u Srbiji	21
2.6.3. Biološka aktivnost artemizininina i njegovih derivata.....	22
2.6.4. Antitumorska aktivnost derivata artesunata.....	26
2.7. Heterociklična jedinjenja u medicinskoj hemiji	28
2.7.1. Derivati pirimidina u medicinskoj hemiji.....	30
2.7.2. Derivati piperazina u medicinskoj hemiji.....	33
2.7.3. Derivati triazola u medicinskoj hemiji	36
3. NAŠI RADOVI	40
3.1. Sintaza derivata artesunata sa etilendiaminskim i piperazinskim linkerom	40
3.2. Određivanje antitumorske aktivnosti pirimidinskih derivata i hibridnih molekula artesunata.....	45
3.2.1 Određivanje selektivnosti novosintetisanih derivata prema tumorskim ćelijama.....	46
3.2.2 Uticaj na aktivnost P-glikoproteina (P-gp).....	48
3.2.3 Odnos strukture i biološke aktivnosti (SAR) sintetisanih jedinjenja	53
3.3 <i>In silico</i> ispitivanja	53
3.4. Dizajn i sinteza hibridnih molekula koji sadrže 1,2,3-triazolski strukturni motiv.....	55
3.5. Određivanje antitumorske aktivnosti 1,2,3-triazolskih derivata artesunata.....	61

3.5.1 Inhibicija aktivnosti P-glikoproteina u prisustvu hibridnih molekula	63
3.5.2 Zavisnost aktivnosti ispitivanih jedinjenja od strukture	65
3.5.3 Zavisnost kolateralne senzitivnosti od aktivnosti P-gp.....	65
3.6. <i>In silico</i> proračuni za jedinjenje 217.....	70
3.7. Određivanje antitumorske aktivnosti derivata artesunate sa 1,2,3-triazolom na ćelijama glioblastoma	71
4. EKSPERIMENTALNI DIO	73
5. ZAKLJUČAK.....	136
6. LITERATURA	138
7. PRILOZI.....	156

1. UVOD

Nesitnoćelijski karcinom pluća predstavlja najzastupljeniji oblik karcinoma pluća i jedan je od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu. Uprkos značajnom napretku u razvoju ciljane terapije i imunoterapije, efikasnost liječenja je i dalje ograničena zbog činjenice da se najčešće dijagnostikuje u uznapredovalom stadijumu. Dodatni izazov predstavlja izražena heterogenost tumora, koja pogoduje razvoju rezistencije na terapiju i nastanku metastaza.

Jedan od najznačajnijih mehanizama nastanka višestruke rezistencije na lijekove jeste povećana ekspresija P-glikoproteina (P-gp), koji aktivnim efluksom antitumorskih lijekova smanjuje njihovu intracelularnu akumulaciju i terapijsku efikasnost. Zbog toga je razvoj novih antitumorskih agenasa, sposobnih da prevaziđu rezistenciju povezanu sa povećanom ekspresijom P-gp, od izuzetnog značaja.

Hibridizacija prirodnih proizvoda predstavlja savremenu strategiju razvoja novih molekula sa unaprijeđenim farmakološkim svojstvima, pri čemu kombinovanje različitih farmakofornih fragmenata u jedinstvenu strukturu može dovesti do povećane biološke aktivnosti, smanjene toksičnosti i prevazilaženja mehanizama rezistencije na lijekove.

Predmet ovog istraživanja predstavlja razvoj strukturno novih molekula sa antitumorskom aktivnošću prema senzitivnim i rezistentnim ćelijskim linijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća i glioblastoma. Dosadašnja istraživanja pokazala su da artemizinin, iako antimalarijski lijek, kao i njegovi derivati, naročito artesunat, ispoljavaju značajnu citotoksičnu aktivnost prema različitim tipovima tumorskih ćelija. Antitumorski potencijal poznatih antimalarijskih agenasa, može da se poveže sa određenim biološkim sličnostima između ćelija malarijskog parazita i tumorskih ćelija, koje karakterišu intenzivna proliferacija i povećana potreba za gvožđem. Međutim, i pored značajnog terapijskog potencijala, primjena prirodnih proizvoda često je ograničena nepovoljnim farmakokinetičkim osobinama i pojavom rezistencije, zbog čega se sve veća pažnja posvećuje strategiji molekulske hibridizacije. Piperazin, pirimidin i triazol predstavljaju privilegovane strukturne motive u medicinskoj hemiji, prisutne u velikom broju biološki aktivnih jedinjenja i odobrenih lijekova, zbog čega predstavljaju gradivne jedinice za dizajn novih antitumorskih hibrida.

Ova doktorska disertacija se sastoji iz četiri dijela:

Opšti dio obuhvata pregled literature koja se odnosi na osnovna obilježja raka, osnovne informacije o nesitnoćelijskom karcinomu pluća i glioblastomu, uzrocima nastanka, kao i savremenim terapijskim pristupima. Posebna pažnja posvećena je fenomenu višestruke rezistencije na lijekove i ulozi P-gp u razvoju rezistentnog fenotipa. Takođe, prikazani su koncepti molekulske hibridizacije i derivatizacije prirodnih proizvoda, uz pregled literature o artemizininu, njegovim derivatima i njihovoj antitumorskoj aktivnosti. Pored značaja derivata artemizininina kao potencijalnih antitumorskih agenasa, opisana je i uloga heterocikličnih jedinjenja u medicinskoj hemiji, sa posebnim osvrtom na antitumorsku aktivnost derivata pirimidina, piperazina i 1,2,3-triazola.

U **Našim radovima** prikazana je sinteza novih derivata pirimidina, derivatizacija artesunata kao i rezultati ispitivanja njihove antitumorske aktivnosti na senzitivnim i rezistentnim ćelijskim linijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća i glioblastoma.

U **Eksperimentalnom dijelu** date su detaljne procedure za sintezu jedinjenja, kao i podaci o njihovoj karakterizaciji i eksperimentalni postupci izvođenja bioloških testova. Prikazani su podaci o karakterizaciji svih sintetisanih jedinjenja - IR i NMR spektri, kao i tačke topljenja. Dodatno, za jedinjenja koja su prvi put sintetisana i za koja je ispitana antitumorska aktivnost, prikazani su podaci o optičkoj aktivnosti, HRMS analizi i HPLC čistoći.

U **Zaključku** su predstavljeni skraćeni prikazi doprinosa ove doktorske disertacije.

2. OPŠTI DIO

2.1. Definicija raka

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), rak predstavlja veliku grupu bolesti koje mogu nastati u gotovo svakom organu ili tkivu u organizmu usljed nekontrolisanog rasta abnormalnih ćelija.¹ Ćelije raka mogu da se šire u okolna, kao i udaljena tkiva i organe procesom metastaze. Metastaziranje predstavlja složen proces koji obuhvata četiri ključne faze: odvajanje tumorskih ćelija od primarnog tumora, migraciju, invaziju i adheziju.² Nakon odvajanja od primarnog tumora, tumorske ćelije migriraju, invadiraju okolno tkivo i putem krvnih i limfnih sudova dopijevaju do udaljenih mjesta, gdje se naseljavaju i nastavljaju rast formirajući sekundarne tumore.

Tumorske ćelije narušavaju normalno fiziološko funkcionisanje organizma, dovode do oštećenja tkiva i organa.³ Njihovo važno obilježje je nekontrolisana proliferacija zbog sposobnosti da izbjegnu regulatorne mehanizme koji u normalnim ćelijama kontrolišu ćelijsku diobu i smrt. Tumorske ćelije su transformisane tokom tumorigeneze, usljed genetskih i epigenetskih promjena, dok genomska nestabilnost i heterogenost ćelijskih populacija unutar istog tumora doprinosi njegovom preživljavanju, prilagođavanju tumorskom mikrookruženju i otpornosti na terapiju.

Rak predstavlja veliki društveni, javnozdravstveni i ekonomski problem 21. vijeka i odgovoran je za gotovo svaki šesti smrtni slučaj, sa skoro 10 miliona smrtnih ishoda zabilježenih tokom 2020. godine.⁴ Metastaze, predstavljaju glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod onkoloških pacijenata i odgovorne su za približno 90% smrtnih ishoda povezanih sa rakom.⁵

2.1.1. Glavna obilježja raka

Koncept „glavnih obilježja raka” (engl. *hallmarks of cancer*) (Slika 1) razvili su Bob Weinberg i Douglas Hanahan sa ciljem sistematizacije i boljeg razumijevanja raznovrsnosti genetskih i fenotipskih karakteristika uočenih kod humanih karcinoma.^{6,7} Ovaj koncept zasniva se na razumijevanju nastanka raka kroz višestepeni proces tumorigeneze koji dovodi do formiranja primarnog tumora, a zatim tumorske ćelije dalje progresivno stiču karakteristike koje im omogućavaju kontinuiranu proliferaciju, metastaziranje i razvoj rezistencije na terapiju. Prema originalnom konceptu objavljenom 2000. godine, definisano je šest ključnih obilježja raka.⁶⁻⁹ Kasnijim proširenjem koncepta 2011. godine⁸ dodata su još dva obilježja, dok je 2022. godine uvedeno i deveto obilježje.⁹

1) *Održavanje proliferativne signalizacije* se odnosi na sposobnost tumorskih ćelija da kontinuirano održavaju proliferaciju. U normalnim tkivima proliferacija ćelija strogo je regulisana signalima koji kontrolišu ulazak ćelija u ciklus rasta i diobe i napredovanje kroz ćelijski ciklus, čime se održava normalna struktura i funkcija tkiva. Tumorske ćelije deregulišu ove signalne puteve i stiču sposobnost autonomne kontrole proliferacije, pri čemu održavaju proliferativnu signalizaciju putem faktora rasta, povećane ekspresije receptora i aktivacije intracelularnih signalnih puteva odgovornih za proliferaciju.

2) *Inaktivacija supresora rasta* podrazumijeva sposobnost tumorskih ćelija da izbjegnu mehanizme koji negativno regulišu ćelijsku proliferaciju. U normalnim ćelijama supresori rasta kontrolišu napredovanje kroz ćelijski ciklus i održavaju homeostazu tkiva, dok su u tumorskim ćelijama ovi mehanizmi često inaktivirani ili oslabljeni.

3) *Izbjegavanje programirane ćelijske smrti* se odnosi na sposobnost tumorskih ćelija da izbjegnu programiranu ćelijsku smrt, odnosno apoptozu. Apoptoza predstavlja važan zaštitni mehanizam koji eliminiše ćelije sa oštećenjima DNK, poremećenom proliferacijom ili drugim oblicima ćelijskog stresa pri čemu tumorske ćelije razvijaju različite mehanizme kojima potiskuju apoptotske puteve.

4) *Uspostavljanje replikativne besmrtnosti* predstavlja sposobnost tumorskih ćelija da neograničeno prolaze kroz cikluse rasta i diobe. Za razliku od tumorskih ćelija, većina normalnih ćelija može proći samo kroz ograničen broj uzastopnih ciklusa rasta i diobe što je uslovljeno postojanjem dvije ključne

barijere proliferacije; senescencije koja predstavlja uglavnom ireverzibilan prelazak u neproliferativno, ali održivo stanje, i krize, koju karakteriše masovno odumiranje ćelija. Sposobnost zaobilazanja ovih barijera i sticanja neograničenog proliferativnog potencijala naziva se imortalizacija i predstavlja jedno od ključnih obilježja tumorskih ćelija.

5) *Privlačenje i stimulisanje stvaranja nove vaskulature* (indukcija angiogeneze) odnosi se na sposobnost tumora da stimuliše stvaranje novih krvnih sudova. Tumorske ćelije zahtijevaju kontinuirano snabdijevanje kiseonikom i hranljivim materijama, što je obezbijeđeno procesom angiogeneze. Za razliku od fizioloških uslova gdje je angiogeneza prolazan proces, tokom tumorske progresije dolazi do trajne aktivacije angiogenog prekidača čime se omogućava kontinuirano stvaranje novih krvnih sudova i dalji rast tumora.

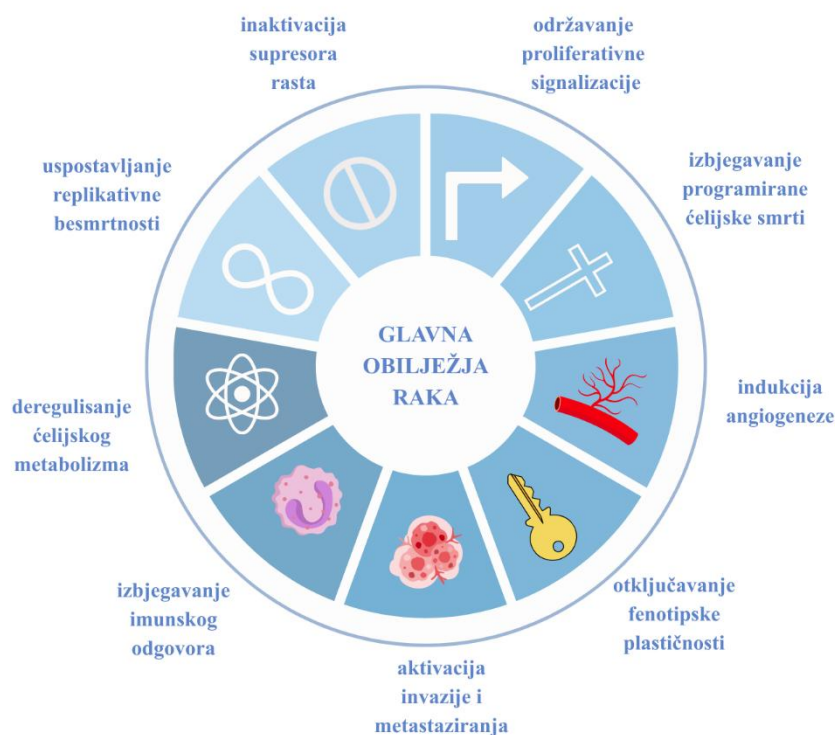
6) *Aktivacija invazije i metastaziranja* predstavlja sposobnost tumorskih ćelija da invadiraju okolno tkivo i šire se u udaljene organe. Ovaj proces uključuje lokalnu invaziju tumorskih ćelija, njihov ulazak i transport kroz krvotok i limfni sistem, zatim izlazak iz krvnih sudova u udaljena tkiva. Nakon toga dolazi do formiranja malih nakupina tumorskih ćelija, odnosno mikrometastaza, koje daljim rastom mogu prerasti u makroskopski vidljive sekundarne tumore.

7) *Poremećaj ćelijskog metabolizma* radi obezbjeđivanja energije za proliferaciju predstavlja važno obilježje raka i odnosi se na sposobnost tumorskih ćelija da prilagode metaboličke procese kako bi obezbijedile dovoljne količine energije i gradivnih komponenti neophodnih za rast, diobu i opstanak ćelije. Za razliku od normalnih ćelija, tumorske ćelije razvijaju složene metaboličke fenotipove i istovremeno koriste oksidativnu fosforilaciju i aerobnu glikolizu kako bi optimizovale proizvodnju energije. Kao izvore energije koriste i druge metabolite, uključujući laktat i glutamin.

8) *Izbjegavanje imunskog odgovora* - tumorske ćelije razvijaju sposobnost supresije adaptivnog i pojedinih komponenata urođenog imunskog odgovora koje bi ih inače prepoznale i eliminisale. Značaj ovog obilježja potvrđen je razvojem imunoterapije, posebno inhibitora imunskih kontrolnih tačaka, koji obnavljaju antitumorski imunski odgovor.

9) *Otključavanje fenotipske plastičnosti* predstavlja sposobnost tumorskih ćelija da mijenjaju svoje osobine i funkcionalno stanje kao odgovor na promjene u mikrookruženju. Ova karakteristika doprinosi intratumorskoj heterogenosti i omogućava adaptaciju tumora tokom progresije bolesti, metastaziranja i razvoja terapijske rezistencije.

Obilježja raka su definisana kao funkcionalne sposobnosti koje zajedničkim djelovanjem usmjeravaju razvoj bolesti, međutim, načini na koje se ove sposobnosti stiču predstavljaju poseban segment, koji obuhvata fenotipske karakteristike koje olakšavaju njihovu aktivaciju i selekciju tokom tumorigeneze i progresije tumora.⁷ Fenotipske karakteristike koje omogućavaju razvoj obilježja raka su: protumorska inflamacija, gubitak genomske integriteta, raznovrsnost mikrobioma, epigenetsko reprogramiranje bez mutacija i inervacija.



Slika 1. Glavna obilježja raka (napravljeno pomoću programa *Canva*).

2.1.2. Konvencionalni i savremeni pristupi u liječenju raka

Najčešće primjenjivane tradicionalne metode liječenja raka uključuju hirurško odstranjivanje, hemoterapiju i radioterapiju, dok savremeni terapijski pristupi obuhvataju hormonsku terapiju, imunoterapiju, ciljanu terapiju, fotodinamičku terapiju, primjenu nanočestica, prirodnih antioksidanasa i druge terapijske pristupe.¹⁰ U praksi se često kombinuje više terapijskih pristupa kako bi se postigla veća efikasnost liječenja.

Hemoterapija predstavlja jedan od najčešće primjenjivanih načina liječenja raka i podrazumijeva upotrebu jednog ili više antitumorskih lijekova koji djeluju kao citotoksična jedinjenja, usporavajući rast tumora sprječavanjem proliferacije, invazije i metastaziranja tumorskih ćelija.^{11,12} Na osnovu mehanizma djelovanja, ovi konvencionalni antitumorski agensi se svrstavaju u sledeće kategorije (Slika 2):^{13,14}

1) *antimetaboliti* predstavljaju jednu od najstarijih grupa antitumorskih lijekova čiji se mehanizam djelovanja zasniva na interakciji sa esencijalnim biosintetskim putevima, koji remete sintezu DNK/RNK ili dovode do nastanka prekida DNK lanaca inhibicijom određenih enzima ili ugradnjom strukturnih analoga pirimidina i purina u DNK. Antimetaboliti se mogu podijeliti u nekoliko grupa, uključujući antagoniste pirimidina (5-fluoruracil), antagoniste purina (fludarabin), analoge purina (6-merkaptopurin), antifolate (metotreksat), kao i inhibitore ribonukleotid reduktaze, među kojima je najpoznatija hidroksiurea.

2) *agensi koji ostvaruju interakciju sa DNK* predstavljaju jednu od najvećih i najznačajnijih grupa antitumorskih lijekova i djeluju različitim mehanizmima:

- alkilujući agensi dovode do alkilovanja DNK baza (dakarbazin).

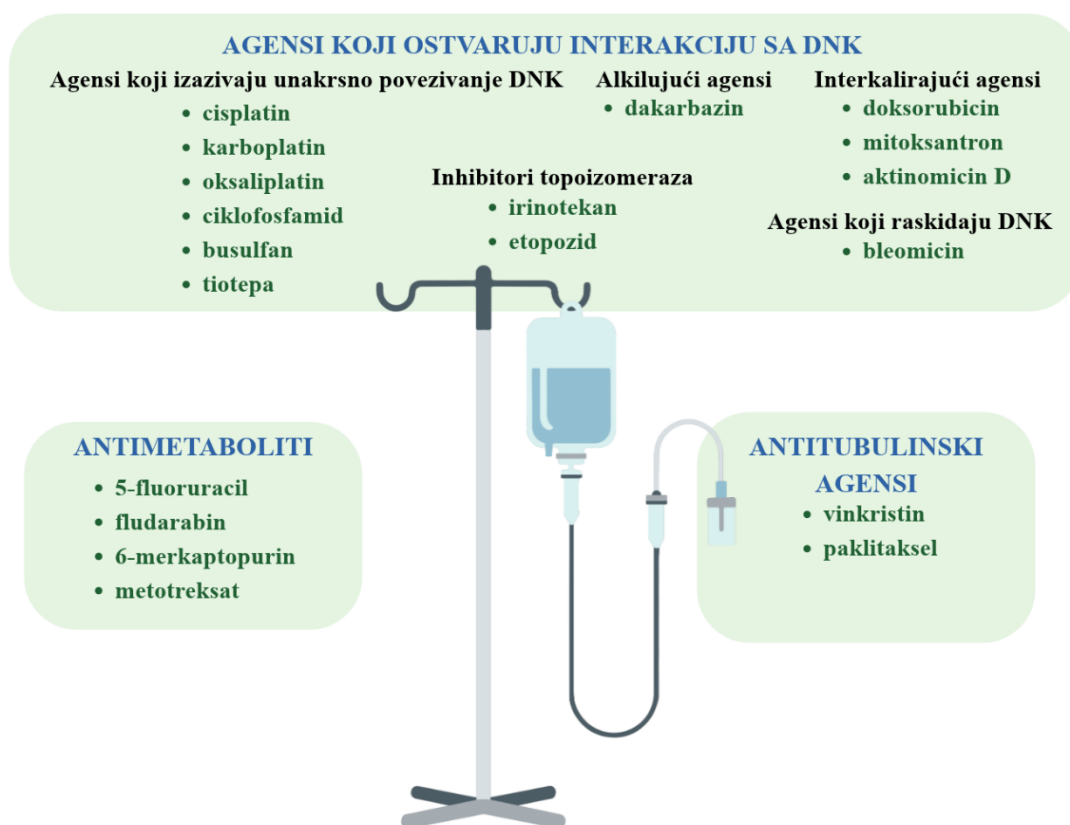
- agensi koji izazivaju unakrsno povezivanje DNK djeluju vezivanjem za DNK, pri čemu dolazi do stvaranja intra- ili interlančane unakrsne veze u molekulu DNK, što dovodi do nepravilnog sparivanja baza i sprječava razdvajanje lanaca tokom sinteze DNK. Dvije glavne grupe ovih antitumorskih agenasa čine kompleksi platine (cisplatin, karboplatin i oksaliplatin), kao i azotni iperiti, među koje spada ciklofosfamid. Pored njih, jedinjenja nitrozouree, busulfan i tiotepa takođe pripadaju grupi agenasa koji formiraju unakrsne veze u DNK.

- interkalirajući agensi djeluju vezivanjem između baznih parova DNK. Ovoj grupi pripadaju antraciklini, poput doksorubicina, kao i mitoksantron i aktinomicin D.

- inhibitori topoizomeraza, među kojima su irinotekan i etopozid, djeluju inhibicijom enzima odgovornih za raskidanje, ponovno povezivanje i održavanje topološkog integriteta DNK.

- agensi koji raskidaju molekul DNK, poput bleomicina, interaguju sa DNK i dovode do prekida DNK lanca na mjestu vezivanja.

3) *antitubulinski agensi* ometaju dinamiku mikrotubula, blokiraju diobu jedra i dovode do ćelijske smrti. Glavni predstavnici ove grupe su taksani i vinka-alkaloidi.



Slika 2. Podjela hemoterapeutika na osnovu mehanizma djelovanja (napravljeno pomoću programa Canva).

Radioterapija podrazumijeva primjenu visokoenergetskih X-zraka u cilju smanjenja tumorske mase.¹⁵ Tradicionalni pristupi liječenju raka zasnivaju se na terapiji zračenjem, koja deluje na sve ćelije unutar lokalizovanog tumorskog mikrookruženja, ili na hemoterapiji, koja cilja brzo rastuće i dijeleće ćelije.^{12,16} Međutim, u oba slučaja dolazi do oštećenja velikog broja zdravih ćelija tokom tretmana. Pored neželjenih efekata kao što su bol, mučnina, dijareja, kardiotoksičnost, gubitak kose, može doći i do razvoja rezistencije tumorskih ćelija na terapiju. Hemoterapija i radioterapija se koriste u kombinaciji kroz neoadjuvantnu terapiju (prije hirurške intervencije), adjuvantnu terapiju (nakon operacije), a mogu se koristiti i bez primjene hirurške terapije. Kombinovana primjena omogućava efikasnije djelovanje na tumorsko tkivo i smanjuje rizik od razvoja rezistencije ćelija raka na

pojedinačne terapije.¹² Postoji pet glavnih tipova adjuvantne terapije u liječenju raka, a to su: hemoterapija, hormonska terapija, radioterapija, imunoterapija i ciljana terapija. Izbor terapije zavisi od tipa karcinoma, stadijuma bolesti, hormonske osjetljivosti tumora i zahvaćenosti limfnih čvorova.

Za razliku od konvencionalne hemoterapije, koja djeluje na sve brzo dijeleće ćelije, *ciljana terapija* je usmjerena na specifične molekularne promjene i proteine uključene u tumorigenezu, što doprinosi selektivnoj inhibiciji rasta i metastaziranja tumorskih ćelija.¹² Glavne vrste ciljanih terapija raka obuhvataju: monoklonska antitijela, inhibitore signalnih molekula, najčešće tirozin-kinaza i imunotoksine.

Imunoterapija predstavlja jedan od najznačajnijih savremenih pristupa u onkologiji, zasnovan na aktivaciji odbrambenog sistema organizma u borbi protiv malignih ćelija.¹⁷ Tumorske ćelije mogu izbjeći imunski sistem na više načina: smanjenjem prepoznatljivih antigena na svojoj površini, aktiviranjem molekula imunskih kontrolnih tačaka (poput PD-L1) koji suzbijaju napad T-limfocita, kao i stvaranjem imunosupresivnog okruženja oko tumora. Imunoterapija djeluje tako što uklanja te blokade i podstiče imunski sistem da prepozna i uništi tumorske ćelije, čime se usporava rast tumora i sprječava metastaziranje.¹⁸

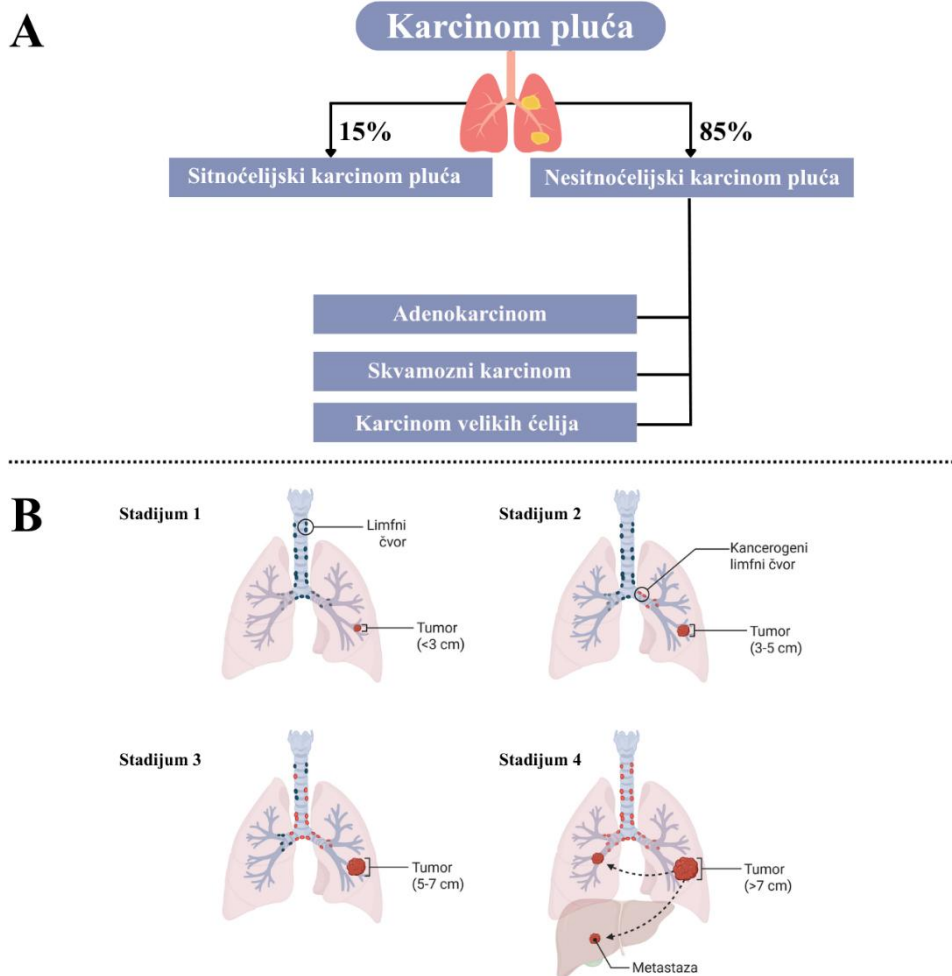
2.2. Rak pluća

Rak pluća, jedan od najčešće dijagnostikovanih tumora, vodeći je uzrok smrtnosti povezane sa rakom širom svijeta.¹⁹ Zbog odsustva kliničkih simptoma i efikasnih programa skrininga, većina karcinoma pluća dijagnostikuje se u uznapredovaloj fazi.²⁰ Međutim, tačno određivanje kategorije i stadijuma raka pluća je od posebnog značaja jer od toga zavise mogućnosti liječenja kao i prognoza i ishod bolesti.

Na osnovu procjene Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) iz 2022. godine, rak pluća je odgovoran za gotovo 2,5 miliona novodijagnostikovanih slučajeva raka i 1,8 miliona smrtnih slučajeva povezanih sa rakom širom svijeta.^{4,21} Istraživanja su pokazala da je adenokarcinom bio najčešći podtip raka pluća u 2020. godini.²² Prema podacima Registra za rak Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut” u 2024. godini od raka pluća je oboljelo 6424 pacijenta, sa 4842 smrtnih slučajeva, što predstavlja vodeći uzrok smrtnosti kada je rak u pitanju.²³

2.2.1. Podjela raka pluća

Postoje dva glavna tipa raka pluća, sitnoćelijski (mikrocelularni, engl. *small cell lung cancer*, SCLC) i nesitnoćelijski karcinom pluća (nemikrocelularni, engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC).²⁴ Nesitnoćelijski karcinom pluća, predstavlja približno 85% svih novih slučajeva raka pluća, dok sitnoćelijski karcinom pluća čini preostalih 15%. NSCLC je dalje klasifikovan na tri histološka podtipa (Slika 3A): adenokarcinom, skvamozni i karcinom velikih ćelija.²⁵



Slika 3. A) Podjela karcinoma pluća; B) Podjela stadijuma karcinoma pluća prema veličini tumora i metastatskoj proširenosti (napravljeno pomoću programa *Canva*).

Adenokarcinom čini oko 40% svih slučajeva karcinoma pluća.²⁵ Nastaje iz malih epitelnih ćelija disajnih puteva, alveolarnih ćelija tipa II, koje imaju sekretornu funkciju. Razvija se nezavisno od pola, starosne dobi i pušačkog statusa. Najčešće se razvija u perifernim dijelovima pluća i u poređenju sa ostalim histološkim podtipovima, adenokarcinom ima tendenciju da raste sporije i ima veću šansu da se otkrije prije pojave udaljenih metastaza. Skvamozni karcinom čini 25–30% svih slučajeva raka pluća.²⁵ Nastaje od ranih verzija skvamoznih ćelija u epitelnim ćelijama disajnih puteva u bronhijama u centru pluća. Ovaj podtip NSCLC je snažno povezan sa pušenjem cigareta. Karcinom velikih ćelija čini približno 5–10% karcinoma pluća.²⁵ Najčešće nastaje u centralnom dijelu pluća, a može se proširiti i na okolne limfne čvorove, zid grudnog koša, kao i u udaljene organe. Ovaj podtip NSCLC je usko povezan sa pušenjem cigareta.

2.2.2. Faktori koji utiču na rak pluća

Pluća predstavljaju složen i osjetljiv organ sastavljen od različitih tipova ćelija koje imaju specifičnu funkciju i omogućavaju efikasnu razmjenu gasova, ali su istovremeno kontinuirano izložena toksičnim gasovima, česticama i infektivnim agensima.²⁰ Dugotrajna izloženost karcinogenima, naročito duvanskom dimu, dovodi do akumulacije ćelijskih autonomnih promjena i promjena u mikrookruženju koje narušavaju ravnotežu između ćelijske proliferacije i smrti, te omogućavaju izbjegavanje imunološkog prepoznavanja, što na kraju dovodi do razvoja raka.

Pušenje duvana predstavlja dominantan faktor rizika za nastanak karcinoma pluća i odgovorno je za više od 85% smrtnih ishoda povezanih sa ovim oboljenjem.²⁶ Pored aktivnog pušenja, i pasivna izloženost duvanskom dimu značajno povećava rizik oboljevanja. Radon, prirodno

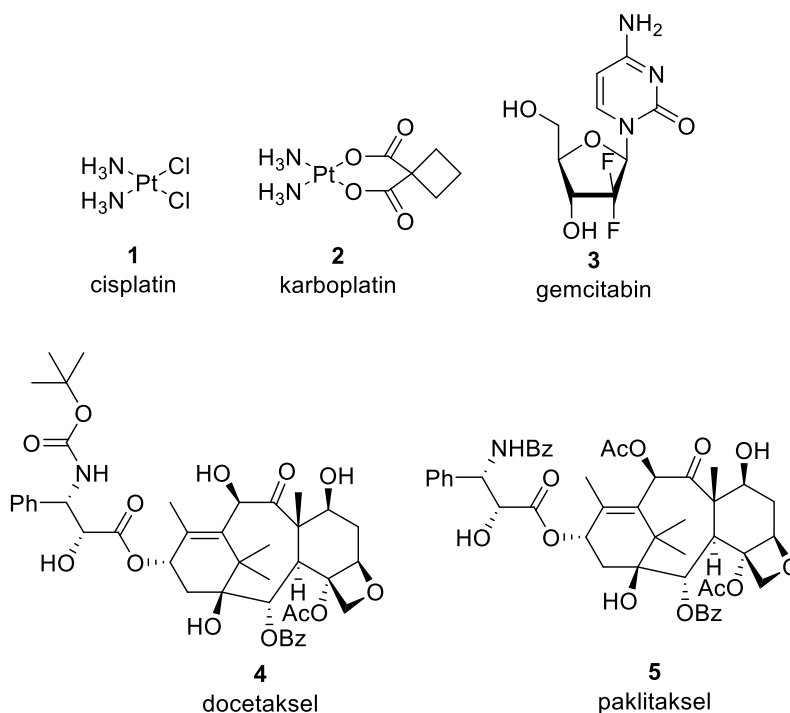
prisutan radioaktivni gas koji nastaje raspadom radijuma-226, predstavlja drugi vodeći uzrok nastanka karcinoma pluća.²⁷ Tokom njegovog raspada dolazi do emisije α -čestica koje mogu izazvati oštećenja ćelija i time povećati vjerovatnoću maligne transformacije. Azbest, mineralno vlaknasto jedinjenje koje se lako raspršuje u vazduhu, predstavlja poznati karcinogen i značajno povećava rizik od razvoja karcinoma pluća, naročito kod pušača.²⁶ Međunarodna agencija za istraživanje raka identifikovala je arsen, berilijum, kadmijum, hlorometil-etere, hrom, nikl, silicijum i vinil-hlorid kao karcinogene supstance.²⁷ Takođe, 2013. godine, zagađenje spoljašnjeg vazduha i suspendovane čestice prečnika manjeg od 2,5 μm (PM_{2,5}) klasifikovani su kao karcinogeni za ljude, potvrđujući njihovu povezanost sa nastankom raka pluća.²⁸

2.2.3. Terapijski pristupi u liječenju raka pluća

Nesitnoćelijski karcinom pluća se često dijagnostikuje u uznapređovalom stadijumu bolesti, kada hirurško odstranjivanje nije moguće, pa se tada pristupa konvencionalnoj ili ciljanoj hemoterapiji ili imunoterapiji.¹⁵ Simptomi poput kašlja, bola u grudima i zviždanja pri disanju često se zanemaruju, što dodatno doprinosi kasnom postavljanju dijagnoze.²⁹ Određivanje stadijuma bolesti ima ključnu ulogu u izboru terapije i procjeni prognoze kod pacijenata sa rakom pluća.³⁰ U tu svrhu koristi se TNM klasifikacija (T-tumor, N-limfni čvorovi, M-metastaze) koju je razvilo Međunarodno udruženje za proučavanje raka pluća (engl. *International Association for the Study of Lung Cancer*, IASLC), a njeno deveto izdanje omogućava precizniju procjenu proširenosti tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova i prisustva metastaza.³¹ Na slici 3B prikazani su stadijumi bolesti prema veličini tumora i metastatskoj proširenosti.

U ranim stadijumima bolesti (0, I i II) osnovni terapijski pristup predstavlja hirurško uklanjanje tumora, uz mogućnost primjene radioterapije i adjuvantne hemoterapije.^{32,33} Kod stadijuma IIIA i IIIB terapijski pristup može obuhvatati hemoterapiju, radioterapiju, imunoterapiju, samostalno ili u različitim kombinacijama i, u odabranim slučajevima, hirurgiju, dok stadijumi IVA i IVB predstavljaju uznapređovalu bolest, kod koje je terapija prvenstveno usmjerena na ublažavanje simptoma i poboljšanje kvaliteta života.

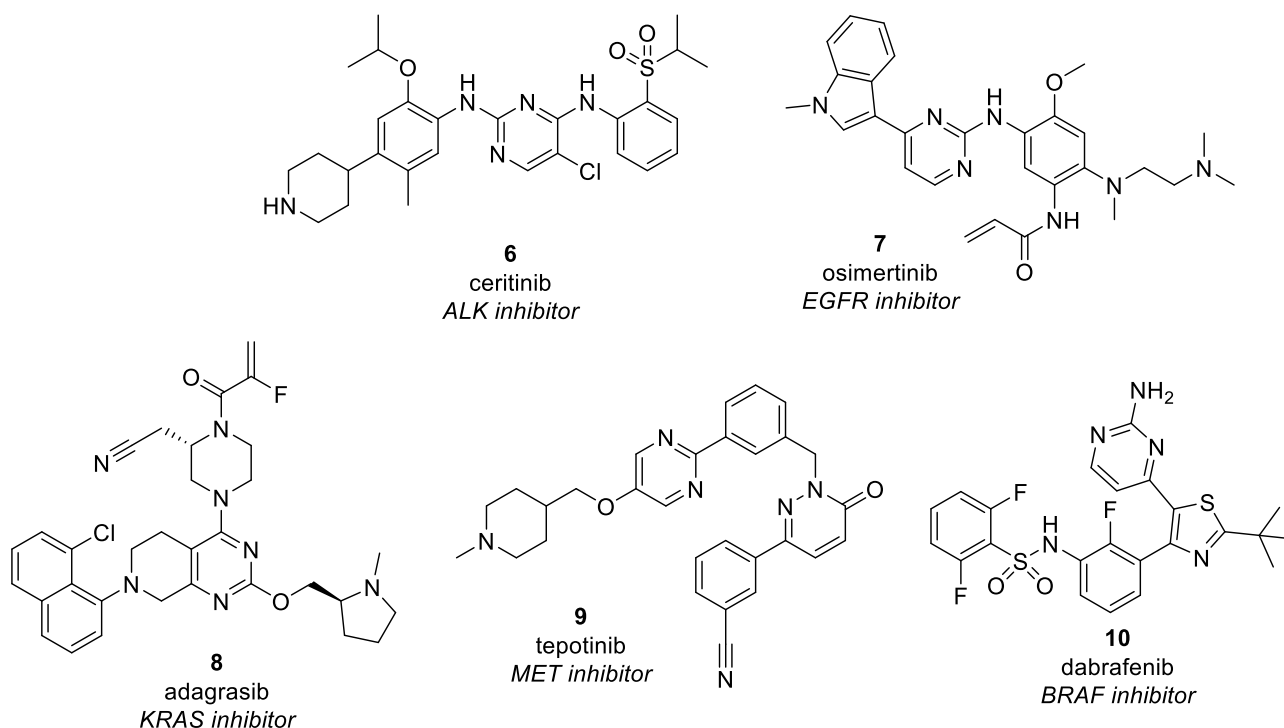
Do kasnih 1990-ih godina liječenje uznapređovalog raka pluća uglavnom se zasnivalo na kombinovanoj terapiji na bazi platinskih lijekova (cisplatin **1**, karboplatin **2**) (Slika 4), nezavisno od histološkog podtipa tumora.³⁴ Uvođenjem citotoksičnih lijekova treće generacije, kao što su gemcitabin **3**, docetaksel **4** i paklitaksel **5**, terapija nesitnoćelijskog karcinoma pluća značajno je unaprijeđena. Identifikacija genskih mutacija i ekspresije određenih proteina u karcinomu pluća omogućila je razvoj molekularne ciljane terapije, što je znatno uticalo na preživljavanje pacijenata sa uznapređovalom bolešću.³² Zbog toga je prije započinjanja ciljane terapije neophodno potvrditi prisustvo molekulskih mutacija u tumorskom tkivu.²⁹



Slika 4. Strukture citotoksičnih lijekova.

2.2.3.1 Ciljana terapija

Danas se za liječenje NSCLC koriste inhibitori *EGFR*, *ALK*, *MET*, *BRAF* signalnih puteva, dok izbor najefikasnije terapije zahtijeva personalizovan pristup zasnovan na identifikaciji specifičnih genskih i proteinskih biomarkera kod pacijenta.³⁵ *EGFR* predstavlja receptor tirozin-kinaze lokalizovan na površini ćelije, čija aktivacija pokreće signalne puteve uključene u rast i proliferaciju ćelija.²⁵ Mutacije *EGFR* kod malignih oboljenja dovode do njegove konstantne aktivacije i nekontrolisane ćelijske diobe. *KRAS* predstavlja jedan od najčešće mutiranih onkogenih povezanih sa NSCLC.²⁵ *BRAF* je protoonkogen koji kodira serin/treonin protein-kinazu uključenu u signalnu transdukciju i reguliše proliferaciju i preživljavanje ćelija.²⁵ Anaplastična limfom kinaza (*ALK*) predstavlja receptorsku tirozin-kinazu kodiranu *ALK* genom lokalizovanim na hromozomu 2, a njena genska preuređenja (fuzije), najčešće sa *EML4* genom, često su povezana sa razvojem raka pluća.³⁶ Na slici 5 prikazane su strukture inhibitora tirozin-kinaze, kao i drugih inhibitora koji su našli primjenu u liječenju NSCLC, kao što su ceritinib **6** (*ALK* inhibitor), osimertinib **7** (*EGFR* inhibitor), adagrasib **8** (*KRAS* inhibitor), tepotinib **9** (*MET* inhibitor), dabrafenib **10** (*BRAF* inhibitor).³⁷



Slika 5. Lijekovi koji su našli primjenu u liječenju NSCLC.

Široka primjena ciljane terapije u liječenju uznapredovalog NSCLC ograničena je brojnim izazovima, uključujući razvoj rezistencije, toksičnost i visoku cijenu ovih terapijskih agenasa, što može smanjiti njihovu dostupnost pacijentima.³⁵ Dodatni problem predstavlja nedostatak validiranih biomarkera za predviđanje terapijskog odgovora usljed izražene heterogenosti tumora. Rezistencija na ciljane terapijske agense može biti inherentna ili urođena, adaptivna ili stečena.³⁸

2.2.3.2 Imunoterapija

Nove strategije imunoterapije usmjerene su na imunomodulatorne mehanizme koje tumorske ćelije koriste kako bi izbjegle djelovanje imunskog sistema.²⁵ Ovaj pristup zasniva se na ciljanoj inhibiciji imunskih kontrolnih tačaka, uključujući citotoksični T-limfocitni antigen 4 (CTLA-4), receptor programirane ćelijske smrti-1 (PD-1) i njegov ligand PD-L1. Vezivanjem liganda PD-L1 za receptor PD-1, dolazi do inhibicije citotoksičnog CD8 T-ćelijskog odgovora i slabljenja antitumorskog imunskog odgovora.³⁹ Kod različitih maligniteta, uključujući rak pluća, PD-L1 je često prekomjerno eksprimiran na tumorskim ćelijama i ima značajnu ulogu u modulaciji imunskog odgovora. Zbog toga su razvijeni inhibitori imunskih kontrolnih tačaka koji blokiraju PD-L1/PD-1 signalni put, čime se omogućava obnavljanje antitumorskog imunskog odgovora. Primjena ovih terapijskih agenasa zahtijeva preciznu klasifikaciju tumora i određivanje nivoa ekspresije PD-L1 imunohistohemijskim analizama.

Različita monoklonska antitijela koja blokiraju PD-1/PD-L1 signalni put trenutno su odobrena za primjenu u kliničkoj praksi, kao monoterapija ili u kombinaciji sa hemoterapijom, za liječenje uznapredovalog NSCLC.⁴⁰ Među njima se nalaze anti-PD-1 antitijela nivolumab i pembrolizumab, anti-PD-L1 antitijela atezolizumab i durvalumab, kao i anti-CTLA-4 inhibitor ipilimumab.

Vakcine protiv raka predstavljaju značajan savremeni pristup u liječenju NSCLC, jer omogućavaju specifično usmjeravanje imunskog odgovora prema tumorskim antigenima uz manje oštećenje zdravih tkiva u poređenju sa konvencionalnim terapijama.⁴¹ Iako preliminarni rezultati ukazuju na bezbjednost i efikasnost mRNA vakcina u liječenju NSCLC, brojna klinička ispitivanja su i dalje u toku (faza I ili II) kako bi se dodatno procijenio njihov terapijski potencijal.⁴²

2.3. Glioblastom

2.3.1. Klasifikacija i faktori koji utiču na glioblastom

Svjetska zdravstvena organizacija klasifikuje tumore glijalnog porijekla prema različitim stepenima maligniteta u graduse 1–4.^{43,44} Anaplastični astroцитom, gradus 3, i glioblastom, gradus 4, su tumori visokog stepena maligniteta. Sa kliničkog i biološkog stanovišta, važno je razlikovati primarni i sekundarni glioblastom.⁴⁵ Primarni (*de novo*) glioblastom nastaje brzo, bez prethodnih dokaza o postojanju manje malignih prekursorskih lezija i nakon kratkog kliničkog toka bolesti. Nasuprot tome, sekundarni glioblastom se razvija postepeno progresijom iz astrocitoma niskog stepena maligniteta (gradus 2) ili anaplastičnog astrocitoma (gradus 3).

Klasifikacija tumora centralnog nervnog sistema prema SZO iz 2021. godine omogućila je značajne promjene u dijagnostikovanju glioma, zasnovane na većem značaju genetskih i molekularnih karakteristika tumora.^{46,47}

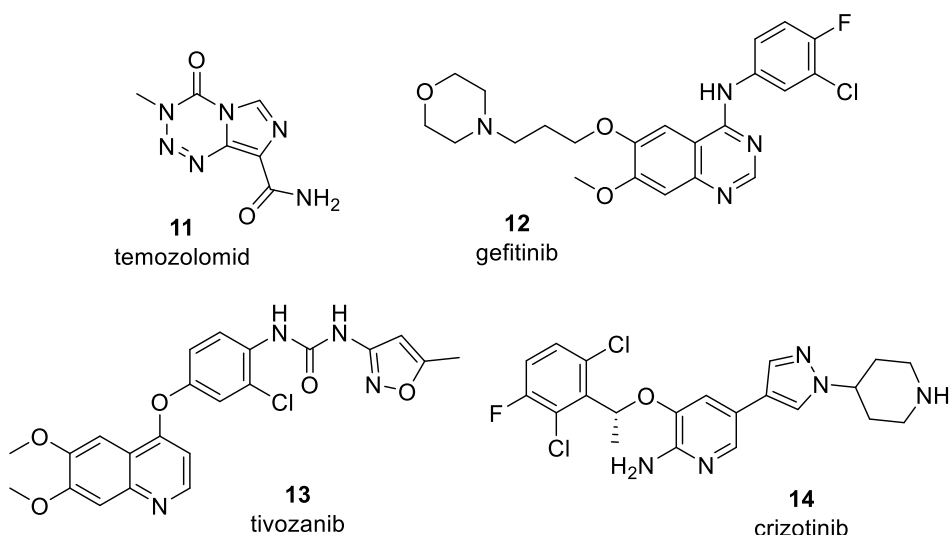
Glioblastom predstavlja najčešći i najagresivniji primarni tumor centralnog nervnog sistema i čini do 50% svih glioma.^{48,49} Za većinu pacijenata sa glioblastomom nisu poznati uzročni faktori bolesti.⁵⁰

Klinički simptomi mogu uključivati progresivne glavobolje, fokalne neurološke deficite i epileptične napade.⁴³ Glioblastomi su poznati po izrazito invazivnom rastu i nejasno definisanim granicama, zbog čega potpuna hirurška resekcija najčešće nije moguća, što predstavlja glavni uzrok recidiva bolesti. Pored toga, maligni gliomi su heterogeni tumori kako po morfološkim karakteristikama, tako i po obrascima ekspresije gena, te pokazuju širok spektar genskih abnormalnosti. Uprkos brojnim naporima usmjerenim ka uspostavljanju optimalnih terapijskih protokola, pacijenti sa glioblastomom uglavnom imaju lošu prognozu, uz progresiju tumora, visoku stopu mortaliteta i prosječno preživljavanje od svega 12–15 mjeseci.⁵¹

2.3.2. Terapijski pristup u liječenju glioblastoma

Prema smjernicama Evropskog udruženja za neuroonkologiju (engl. *European Association of Neuro-Oncology*, EANO), preporučeni terapijski pristup za novodijagnostikovani glioblastom kod odraslih pacijenata mlađih od 70 godina, koji imaju dobro opšte i neurološko stanje podrazumijeva kombinovanu primjenu radioterapije i temozolomida **11** (Slika 6), nakon čega slijedi šest ciklusa terapije temozolomidom.^{44,52}

Među savremenim pristupima za liječenje glioblastoma posebno mjesto zauzimaju imunoterapija i ciljana terapija.⁵³ Trenutna istraživanja usmjerena su na razvoj peptidnih i tumorskih vakcina, inhibitora imunskih kontrolnih tačaka, onkolitičkih virusa i primjenu autolognih aktiviranih T limfocita. Istovremeno, zbog ključne uloge u patogenezi i progresiji glioblastoma, pojedini inhibitori kinaza smatraju se obećavajućim terapijskim opcijama.⁴⁴ Najznačajnije molekularne mete uključuju receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR), receptor za faktor rasta izveden iz trombocita (PDGFR), receptor za hepatocitni faktor rasta (MET), receptor za fibroblastni faktor rasta (FGFR) i receptor za vaskularni endotelni faktor rasta (VEGFR) čija se inhibicija intenzivno ispituje u cilju unapređenja ishoda liječenja pacijenata sa glioblastomom. Na slici 6 prikazani su mali molekulski inhibitori koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima za liječenje glioblastoma (gefitinib **12**, tivozanib **13**, crizotinib **14**).⁵¹



Slika 6. Strukture temozolomida i inhibitora tirozin-kinaza.

Neuspjeh terapije najčešće se pripisuje nepovoljnim farmakokinetičkim svojstvima, razvoju mehanizama rezistencije, izraženoj intratumorskoj heterogenosti i ograničenjima u dizajnu kliničkih ispitivanja.⁴⁸ Iako temozolomid **11** predstavlja sastavni dio standardnog terapijskog pristupa u liječenju glioblastoma, njegova primjena je praćena neželjenim toksičnim efektima pri čemu potpuna eliminacija bolesti uglavnom izostaje.

Glavni pravci u razvoju novih terapijskih strategija za liječenje glioblastoma obuhvataju razvoj sistema za ciljanu isporuku lijekova, unapređenje transporta terapijskih agenasa kroz krvno-moždanu i krvno-tumorsku barijeru, inovativne pristupe u radioterapiji i lokalne metode uništavanja tumora, kao i primjenu inhibitora rasta tumora.^{54,55} Među predloženim strategijama za unapređenje liječenja glioblastoma izdvajaju se kontrolisana i ciljana isporuka antitumorskih lijekova preko krvno-moždane barijere primjenom nanočestica i monoklonskih antitijela, kao i razvoj personalizovanih terapijskih pristupa.

2.4. Višestruka rezistencija na lijekove i P-glikoprotein

2.4.1. Višestruka rezistencija na lijekove (MDR)

Višestruka rezistencija (engl. *multidrug resistance*, MDR) predstavlja pojavu istovremene rezistencije tumorskih ćelija na više antitumorskih lijekova koji imaju različitu hemijsku strukturu i mehanizam djelovanja.⁵⁶

Urođena ili inherentna rezistencija podrazumijeva odsustvo odgovora na inicijalnu terapiju, dok adaptivna rezistencija nastaje tokom liječenja.^{38,57,58} Urođena rezistencija može nastati različitim mehanizmima, uključujući: a) prisustvo genskih mutacija u tumorskim ćelijama, b) razvoj rezistentnih populacija, kao što su matične ćelije raka i c) aktivaciju mehanizama odgovornih za ćelijsku detoksikaciju.⁵⁹ Stečena rezistencija može biti posljedica različitih ćelijskih i molekularnih odgovora, uključujući:

- a) nastanak sekundarnih mutacija u ciljnim genima ili aktivaciju alternativnih signalnih puteva nakon terapije, pri čemu tumorske ćelije mogu razviti otpornost na ciljane lijekove usljed novih mutacija ili promjena u ekspresiji gena;
- b) promjene u molekulskim metama djelovanja lijekova;
- c) izmijenjeni metabolizam lijekova u tumoru;
- d) pojačano izbacivanje lijekova putem transmembranskih transportera, uključujući transportere ATP-vezujuće kasete (ABC transportere);

- e) epigenetske promjene izazvane acetilovanjem, metilovanjem i promjenama nivoa mikroRNK i
- f) promjene u tumorskom mikrookruženju nakon terapije.⁵⁹

Svi navedeni mehanizmi mogu djelovati pojedinačno ili udruženo i doprinijeti razvoju višestruke rezistencije kod tumora. Osnovni razlozi nastanka višestruke rezistencije još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, ali mogu uključivati pojačanu popravku DNK, inhibiciju apoptoze, promjene signalnih puteva, metaboličke promjene u tumorskim ćelijama koje omogućavaju preživljavanje u uslovima stresa, evolutivne mehanizme, zadržavanje lijekova u ćelijskim organelama, kao i urođenu ili adaptivnu prekomjernu ekspresiju transportera odgovornih za efluks lijekova.^{60,61}

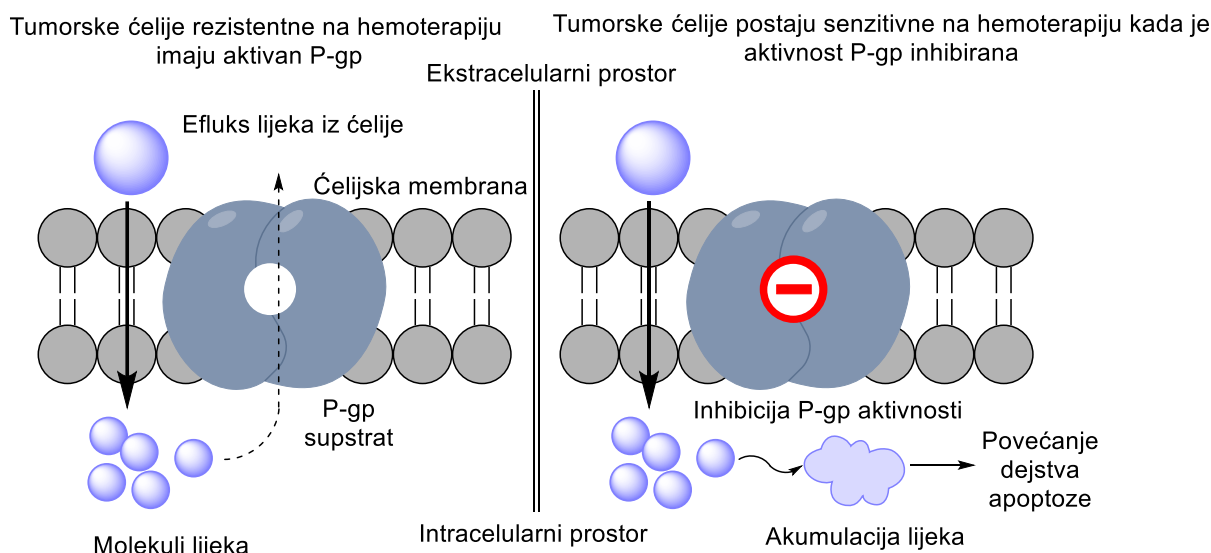
2.4.2. P-glikoprotein (P-gp)

Jedan od najčešćih mehanizama višestruke rezistencije malignih ćelija na lijekove predstavlja ekspresija energetski zavisnih efluksnih pumpi, poznatih kao ABC transportni proteini (engl. *ATP-binding cassette*).⁶² Kod ljudi postoji 48 članova ove proteinske porodice, koji učestvuju u različitim fiziološkim funkcijama, uključujući transport šećera, aminokiselina, lijekova, antibiotika, toksina, lipida, sterola, peptida, nukleotida.⁶³

ATP-vezujući kasetni transporteri podijeljeni su u sedam potporodica, od ABC-A do ABC-G. Identifikovano je približno 15 ABC transportera odgovornih za rezistenciju na klinički značajne lijekove.¹¹ Među transporterima koji imaju ključnu ulogu u razvoju višestruke rezistencije u tumorskim ćelijama posebno se izdvajaju P-glikoprotein (MDR1/ABCB1), protein povezan sa višestrukom rezistencijom na lijekove 1 (MRP1/ABCC1) i protein rezistencije karcinoma dojke (BCRP/ABCG2). Ovi transporteri odlikuju se širokom specifičnošću prema lijekovima i sposobnošću transporta strukturno različitih jedinjenja, što dovodi do smanjene intracelularne akumulacije lijekova, a samim tim i smanjene efikasnosti terapije.⁶² P-glikoprotein, prvi opisani ATP-vezujući kasetni transporter, identifikovali su Juliano i Ling 1976. godine u ćelijama ovarijuma kineskog hrčka rezistentnim na kolhicin, gdje je uočen kao površinski fosfoglikoprotein povezan sa fenomenom višestruke rezistencije.⁶⁴ Ove ćelije pokazivale su unakrsnu rezistenciju prema širokom spektru citotoksičnih agenasa različite hemijske strukture i mehanizama djelovanja, što je ukazalo na ključnu ulogu P-gp u razvoju rezistencije na antitumorske lijekove.

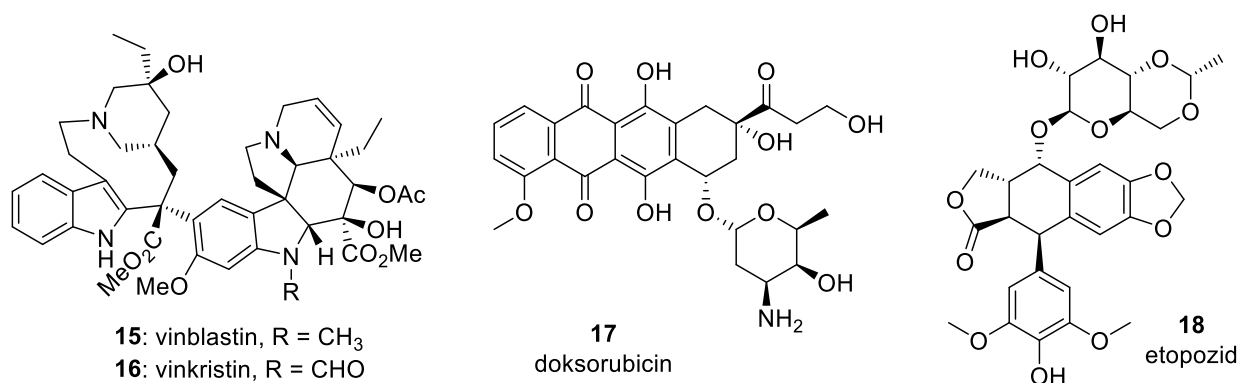
P-glikoprotein je transmembranski protein sastavljen od 1280 aminokiselina, molekulske mase približno 170 kDa.⁶⁵ Strukturno, P-glikoprotein se sastoji od četiri domena karakteristična za ATP-vezujuće kasetne transportere.⁶⁶ Obuhvata dva citoplazmatska nukleotid-vezujuća domena (NBD), koji omogućavaju vezivanje i hidrolizu ATP, obezbjeđujući energiju potrebnu za transport supstrata, kao i dva transmembranska domena (TMD), koja formiraju transportni put za prolazak supstrata, pri čemu svaki sadrži šest transmembranskih α -heliksa odgovornih za prepoznavanje i vezivanje supstrata.⁵⁷

U *inward-facing* konformaciji, konformaciji okrenutoj ka unutrašnjosti ćelije, transmembranski heliksi formiraju veliku unutrašnju šupljinu u koju lijekovi ulaze kroz otvore povezane sa citoplazmom i membranom, nakon čega dolazi do njihovog transporta van ćelije.^{62,67} P-glikoprotein prolazi kroz dinamične konformacione promjene koje omogućavaju vezivanje i transport supstrata kroz membranu. Ove promjene pokreću vezivanje i hidrolizu ATP, praćenu asocijacijom (udruživanjem) NBD domena. Transport lijekova posredovan P-glikoproteinom povezan je sa povećanom ATP-aznom aktivnošću, dok je bazalna aktivnost niska u odsustvu supstrata. Smatra se da *outward-facing* stanje, konformacija okrenuta ka spolja, predstavlja prolaznu, energetski nestabilnu fazu transportnog ciklusa, koja nastaje nakon hidrolize ATP. Na slici 7 dat je shematski prikaz efluksa posredovanog P-gp i inhibicije efluksa.



Slika 7. Shematski prikaz P-gp posredovanog efluksa (A) i inhibicije efluksa (B) (napravljeno pomoću programa *ChemDraw*).

P-glikoprotein je dominantno prisutan u apikalnim membranama epitelnih ćelija širom organizma, a fiziološki se nalazi u gastrointestinalnom traktu, jetri, bubrezima, testisima, jajnicima, nadbubrežnoj i hipofiznoj žlijezdi, placenti i ćelijama krvno-moždane barijere, gdje ima zaštitnu ulogu protiv ksenobiotika i ćelijskih toksina.⁶⁴ Prekomjerna ekspresija P-gp dovodi do razvoja rezistencije na veliki broj hidrofobnih i katjonskih hidrofobnih hemoterapeutika koji predstavljaju osnovu standardnih terapijskih protokola usljed njihovog aktivnog efluksa iz ćelije.⁶⁸ Među njima se nalaze (Slika 8): vinka-alkaloidi, kao što su vinblastin **15** i vinkristin **16**, taksani (Slika 4) poput docetaksela **4** i paklitaksela **5**, antraciklini poput doksorubicina **17**, inhibitori topoizomerase, uključujući etopozid **18**, kao i određeni inhibitori tirozin-kinaze, poput, gefitiniba **12** (Slika 6).

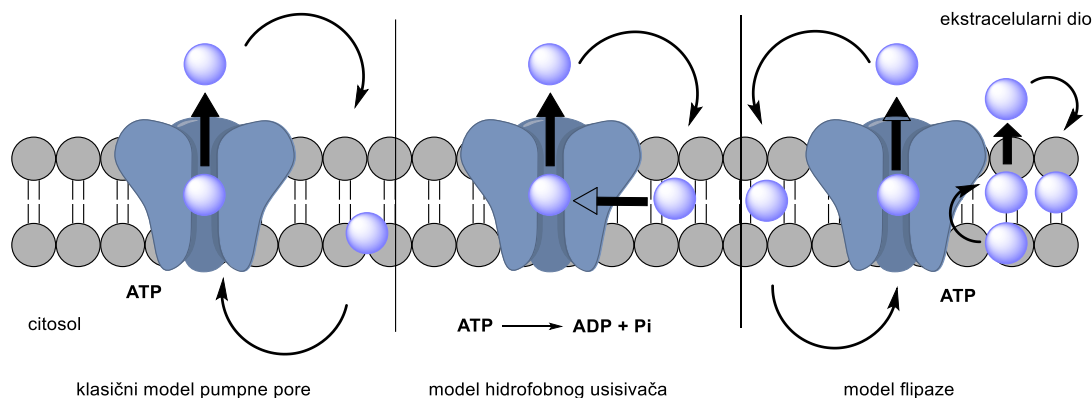


Slika 8. Hemoterapeutici podložni P-glikoprotein posredovanom efluksu.

Ekspresija P-gp utvrđena je u više od 50% tumorskih ćelijskih linija iz NCI-60 panela, uključujući sve melanome i tumore centralnog nervnog sistema, dok je naročito visok nivo ekspresije zabilježen kod karcinoma bubrega i kolona.⁶² Povišena ekspresija P-glikoproteina u tumorskim ćelijama povezana je sa smanjenim odgovorom na hemoterapiju i lošijim kliničkim ishodom kod različitih tipova malignih oboljenja. Pojedini tumori koji inicijalno pokazuju nizak nivo ekspresije P-gp, poput leukemije i karcinoma dojke, mogu nakon progresije bolesti i primjene hemoterapije ispoljiti povećanu ekspresiju ovog transportera.

2.4.2.1. Mehanizam djelovanja P-glikoproteina

Lijekovi ili supstrati P-glikoproteina se izbacuju iz ćelije već na nivou same ćelijske membrane, pri čemu prvi korak u procesu efluksa predstavlja prepoznavanje lijeka od strane P-glikoproteina, nakon čega slijede vezivanje ATP i njegova hidroliza.^{65,69} Energija nastala ovim procesom koristi se za izbacivanje supstrata iz ćelije kroz centralni otvor transportera. Do danas su predložena tri dominantna modela efluksa lijekova posredovanog P-glikoproteinom (Slika 9): klasični model pumpne pore, model hidrofobnog usisivača i model flipaze.



Slika 9. Tri dominantna modela efluksa lijekova posredovanog P-glikoproteinom (napravljeno pomoću programa *ChemDraw*).

Prema klasičnom *modelu pumpne pore*, P-glikoprotein formira hidrofilni transportni put kroz koji se lijekovi prenose iz citosola u ekstracelularnu sredinu kroz centralni dio pore, čime se supstrati štite od hidrofobne lipidne faze membrane.⁶⁹ Prema *modelu hidrofobnog usisivača* P-glikoprotein nespecifično prepoznaje i vezuje širok spektar strukturno raznovrsnih hidrofobnih/amfipatičnih supstrata prisutnih na unutrašnjoj strani ćelijske membrane i prepoznaje ih kao ksenobiotike, nakon čega ih izbacuje iz ćelije.⁶⁹ Zbog izražene hidrofobnosti većine supstrata, pretpostavlja se da se oni najprije raspoređuju između unutrašnjeg vodenog prostora ćelije i unutrašnjeg sloja membrane, prije nego što dođu u kontakt sa P-glikoproteinom. Nakon vezivanja supstrata, hidroliza ATP dovodi do konformacionih promjena transportera koje omogućavaju transport supstrata iz membrane ka spoljašnjoj vodenoj sredini. Prema *modelu flipaze*, P-glikoprotein prepoznaje lijek tokom njegovog prolaska kroz lipidni dvosloj membrane i prebacuje ga iz unutrašnjeg sloja ćelijske membrane ka spoljašnjem sloju, odnosno u ekstracelularni prostor, protiv koncentracionog gradijenta uz utrošak energije dobijene hidrolizom ATP.⁶⁹

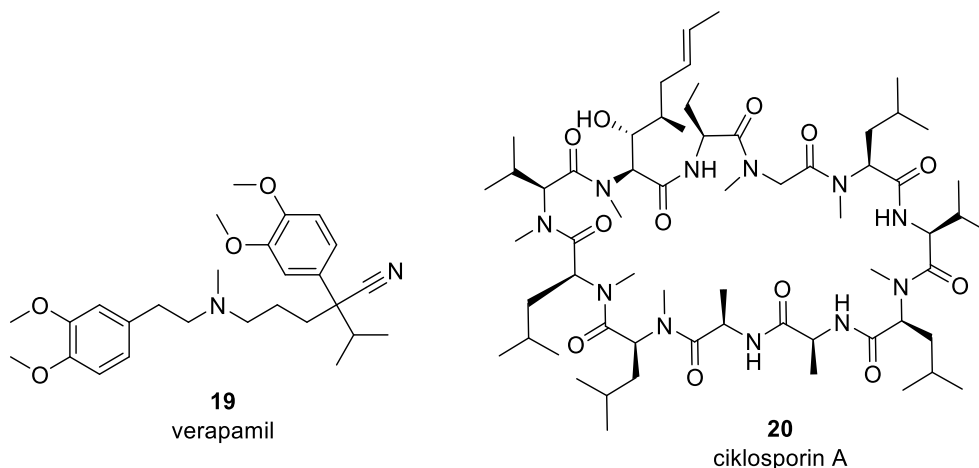
2.4.2.2. Inhibitori P-gp

Inhibicija efluksnih pumpi značajno povećava osjetljivost rezistentnih tumorskih ćelija na hemoterapeutike. Zbog toga inhibicija ovih transportera predstavlja važnu strategiju u prevazilaženju višestruke rezistencije malignih ćelija, sa ciljem ponovnog uspostavljanja efikasnosti antitumorskih lijekova i inhibicije rasta tumora.¹¹ Aktivnost P-glikoproteina može se modulirati na više načina: blokiranjem mjesta za vezivanje lijeka kompetitivnim, nekompetitivnim ili alosternim mehanizmom, ometanjem hidrolize ATP i promjenom integriteta lipida ćelijske membrane.⁷⁰

Međutim, klinička ispitivanja pokazala su ograničenu efikasnost i izraženu toksičnost ovih pristupa, što ukazuje na potrebu za razvojem potentnijih i selektivnijih inhibitora P-gp.⁶¹ Do danas su razvijene tri generacije inhibitora P-glikoproteina, koje su klasifikovane na osnovu njihove efikasnosti, toksičnosti i selektivnosti.

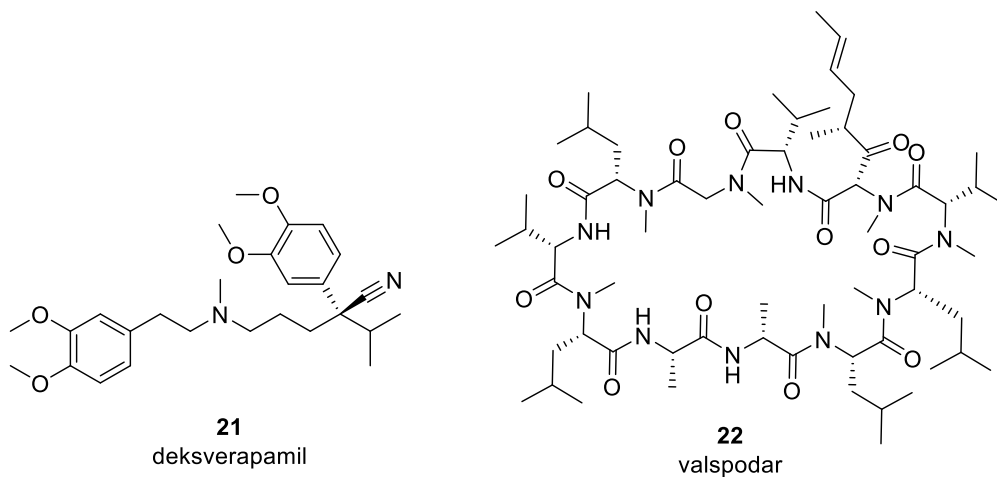
Inhibitori prve generacije (Slika 10) predstavljaju farmakološki aktivna jedinjenja koja se već koriste u kliničkoj praksi za određene terapijske indikacije, ali posjeduju sposobnost inhibicije P-glikoproteina, poput verapamila **19**, blokatora kalcijumskih kanala, i ciklosporina A **20**, imunosupresivnog lijeka.⁷⁰ Njihova primjena ograničena je potrebom za visokim koncentracijama

neophodnim za inhibiciju P-glikoproteina koja dovodi do sistemske toksičnosti. Takođe, oni predstavljaju supstrate drugih transportera i enzimskih sistema, što dovodi do nepredvidivih farmakokinetičkih interakcija.



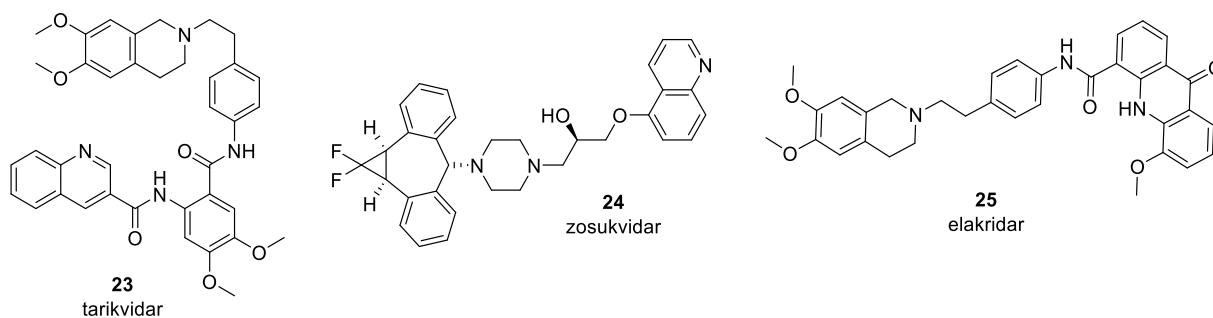
Slika 10. Inhibitori P-gp prve generacije.

Inhibitori druge generacije (Slika 11) ne posjeduju prethodno farmakološko djelovanje i pokazuju veći afinitet prema P-glikoproteinu.^{70,71} Među njima se izdvajaju (*R*)-enantiomer verapamila **19**, deksverapamil (Dex-Ver) **21** i neimunosupresivni analozi ciklosporina A **20**, poput valspodara **22**. Međutim, inhibitori druge generacije inhibiraju enzim CYP3A4 i druge ATP-vezujuće kasetne transportere, što dovodi do smanjenog metabolizma lijekova i složenih farmakokinetičkih promjena usljed istovremene inhibicije više transportera. Iako su razvijeni sa ciljem smanjenja toksičnosti u odnosu na prvu generaciju inhibitora, zadržali su određene neželjne osobine koje ograničavaju njihovu farmakološku primjenu.



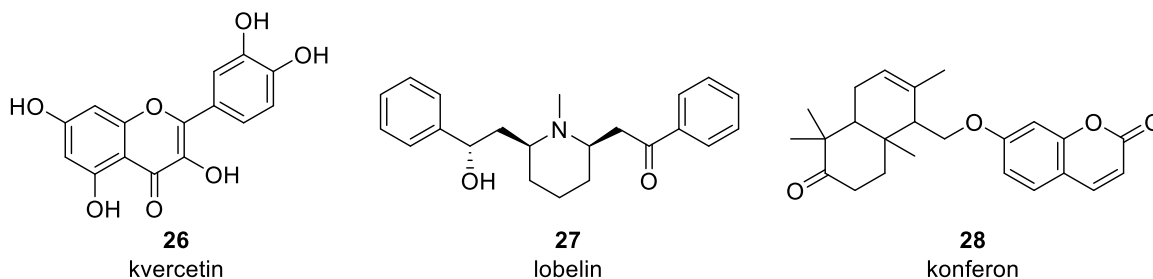
Slika 11. Inhibitori P-gp druge generacije.

Treća generacija inhibitora (Slika 12) razvijena je primjenom kombinatorne hemije i proučavanja odnosa između strukture i aktivnosti (engl. *Structure-Activity Relationship*, SAR), sa ciljem dobijanja inhibitora P-glikoproteina visoke specifičnosti i niske toksičnosti.⁶⁹ Ovi inhibitori pokazuju približno deset puta veću potentnost u odnosu na prethodne generacije, a za razliku od inhibitora druge generacije, enzim CYP3A4 ne utiče značajno na njihovu farmakokinetiku. Predstavnici treće generacije inhibitora uključuju tarikvidar **23**, zosukvidar **24** i elakridar **25**.



Slika 12. Inhibitori P-gp treće generacije.

Prirodni proizvodi (Slika 13) privlače veliku pažnju kao potencijalni modulatori višestruke rezistencije na lijekove, jer mogu povećati osjetljivost tumorskih ćelija na konvencionalnu hemoterapiju uz manju toksičnost.⁶⁹ Među jedinjenjima sa sposobnošću inhibicije P-glikoproteina izdvajaju se alkaloidi, flavonoidi, kumarini, saponini i terpenoidi, koji zahvaljujući dobroj selektivnosti i mogućnosti strukturne modifikacije predstavljaju perspektivne kandidate za razvoj novih inhibitora P-glikoproteina.



Slika 13. Prirodni proizvodi kao inhibitori P-gp.

Inhibitori, kao i supstrati P-glikoproteina pokazuju veliku strukturnu raznolikost, a mnoga jedinjenja, poput verapamila **19** (slika 10), ciklosporina A **20** (slika 10), istovremeno predstavljaju i inhibitore i supstrate P-glikoproteina.⁷⁰

Jedna od najčešće primjenjivanih strategija kod konvencionalnih inhibitora P-glikoproteina zasniva se na kompeticiji za mjesto vezivanja lijekova.⁶⁹ Međutim, prisustvo više mjesta vezivanja na P-glikoproteinu značajno otežava razvoj ciljanih inhibitora. Dodatni problemi koji ograničavaju uspješnost inhibitora P-glikoproteina uključuju nepredvidiv odgovor na terapiju, pojavu toksičnosti izazvanu farmakokinetičkim interakcijama između inhibitora P-glikoproteina i drugih lijekova, promjene u metabolizmu ili eliminaciji lijekova, kao i narušavanje osnovne zaštitne funkcije P-glikoproteina u izbacivanju lijekova, što može povećati toksičnost istovremeno primijenjenih lijekova u zdravim tkivima. Zbog toga postoji velika potreba za razvojem novih, efikasnijih i manje toksičnih inhibitora P-glikoproteina.

2.5. Koncept molekulske hibridizacije i derivatizacija prirodnih proizvoda

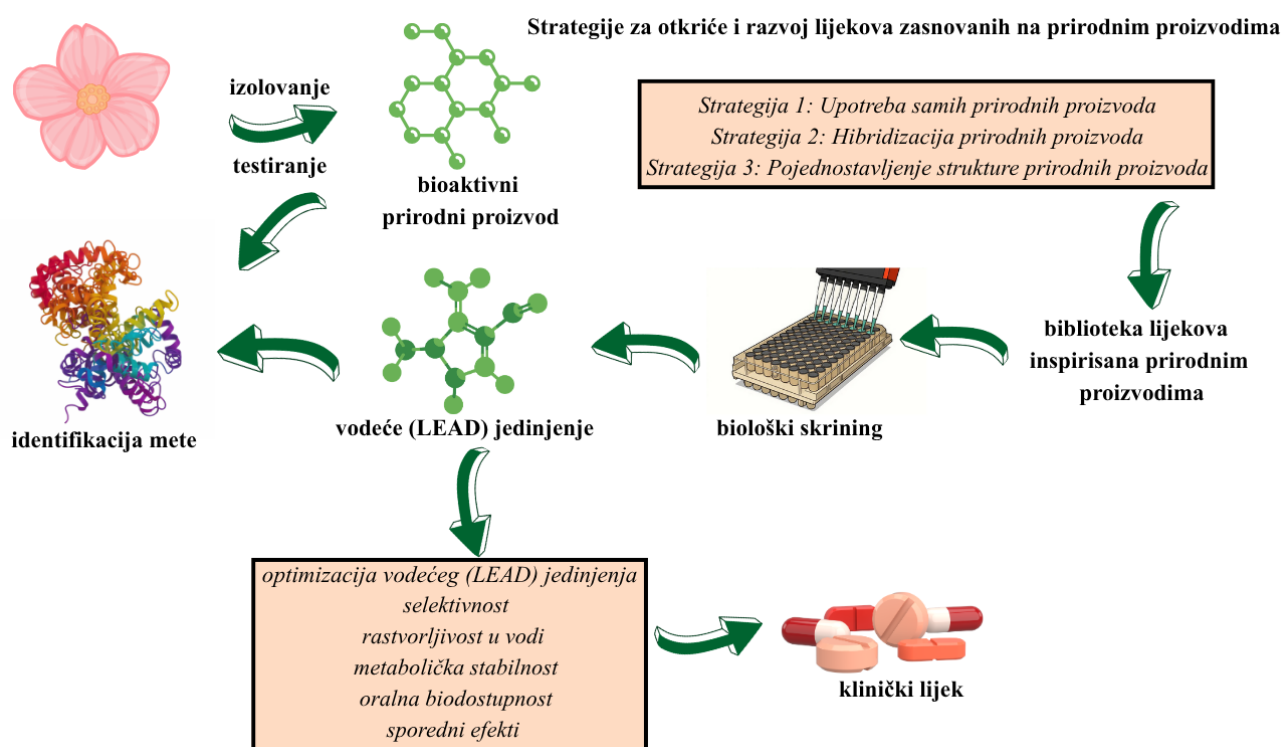
Kroz istoriju, prirodni proizvodi su imali važnu ulogu u otkriću lijekova, a naročito onih lijekova koji su korišćeni za liječenje raka kao i zaraznih bolesti.⁷² Antitumorski lijek koji je našao primjenu u liječenju raka dojke, Taxol®, izolovan iz vrste *Taxus brevifolia*, antimalarijski lijek artemizinin izolovan iz *Artemisia annua*, alkaloid morfin izolovan iz *Papaver somniferum* i antibiotik penicilin iz *Penicillium spp.* predstavljaju samo neke od primjera u kojima priroda djeluje kao izvor aktivnih jedinjenja.⁷³

Prirodni proizvodi se odlikuju velikom raznovrsnošću skeleta i visokim stepenom strukturne složenosti.⁷⁴ Na primjer, struktura artemizinina se karakteriše kondenzovanim trioksanskim sistemom koji sadrži peroksidni most, laktonsku funkcionalnu grupu, kao i ciklični acetalni i ketalni strukturni

motiv.⁷⁵ Prirodni proizvodi uglavnom imaju veću molekulsku masu, veći broj sp^3 ugljenikovih atoma i atoma kiseonika, a manji broj atoma azota i halogena, kao i veći broj akceptora i donora vodoničnih veza i veću molekulsku rigidnost u poređenju sa sintetskim jedinjenjima.⁷⁶ Ove razlike mogu biti prednost, pri čemu veća rigidnost može imati važnu ulogu u otkriću lijekova usmjerenih na interakcije protein-protein.⁷⁷ Većina prirodnih proizvoda izgrađena je pretežno od atoma ugljenika, vodonika i kiseonika, dok je sadržaj azota relativno ograničen, što se može pripisati slabijoj sposobnosti mikroorganizama i biljaka za fiksaciju azota čime se otvara mogućnost za ciljano uvođenje azotovih atoma tokom hemijskih modifikacija prirodnih proizvoda.⁷⁵ Azot predstavlja značajan element budući da se odlikuje izraženijim nukleofilnim karakterom u odnosu na ugljenik i kiseonik. Takođe, učestvuje u formiranju heterocikličnih, aromatičnih i kondenzovanih sistema, pri čemu može imati ulogu terminalne funkcionalne grupe ili linkera između različitih strukturnih cjelina. Imajući u vidu navedene osobine, uvođenje i funkcionalizacija azotovih atoma predstavlja važnu strategiju u procesu optimizacije vodećih jedinjenja.⁷⁵

U procesu otkrivanja i razvoja lijekova zasnovanih na prirodnim proizvodima zastupljene su tri strategije (Slika 14):⁷⁸

1. razvoj i direktna primjena samog prirodnog proizvoda kao lijeka;
2. derivatizacija prirodnih proizvoda;
3. pojednostavljenje kompleksnih struktura prirodnih proizvoda.



Slika 14. Strategije za otkriće i razvoj lijekova zasnovanih na prirodnim proizvodima (napravljeno pomoću programa Canva).

Priroda predstavlja izuzetno značajan izvor biološki aktivnih supstanci i njihovih prekursora pri čemu je gotovo 50% antitumorskih lijekova, koji su našli kliničku primjenu u periodu između 1940. i 2014. godine, zasnovano na prirodnim proizvodima ili inspirisano njima, uključujući i polusintetske strukture.⁷⁹ Na osnovu analize malih molekula odobrenih od strane Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) u ovom periodu, utvrđeno je da neizmjenjeni

prirodni proizvodi čine oko 6% ukupnog broja lijekova. Međutim, većina lijekova porijeklom iz prirodnih proizvoda se ubraja u njihove derivate, koji čine oko 26% odobrenih malih molekula.^{78,79}

Prirodni proizvodi često predstavljaju pogodne polazne strukture za identifikaciju vodećih molekula u procesu razvoja lijekova.^{80,81} Međutim, iako su dobra vodeća jedinjenja (engl. *lead compounds*),⁸² zbog kompleksne hemijske strukture, često ne ispunjavaju kriterijume „*drug-likeness*“ kao što je Lipinski pravilo 5, zbog čega je njihov razvoj kao lijekova ograničen slabom apsorpcijom iz gastrointestinalnog trakta.⁷⁸ Nedostaci nemodifikovanih prirodnih proizvoda prije svega uključuju ograničenu dostupnost jedinjenja, slabu rastvorljivost i metaboličku nestabilnost. Još značajnije, njihova izražena strukturna složenost dovodi do poteškoća u sintezi, kao i do nepovoljnih osobina u pogledu apsorpcije, distribucije, metabolizma, ekskrecije i toksičnosti (ADMET).⁷⁸ S obzirom na to da tradicionalna sinteza derivata prirodnih proizvoda iz jednostavnih početnih supstanci može biti sintetski zahtjevna i često neefikasna, sve veći značaj dobija alternativni pristup koji je zasnovan na direktnoj derivatizaciji prirodnih proizvoda putem selektivnih hemijskih transformacija.⁸³ Ciljane modifikacije mogu biti usmjerene ka unapređenju farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava, uključujući povećanje potentnosti, selektivnosti, rastvorljivosti u vodi, metaboličke stabilnosti i oralne biodostupnosti.⁷⁸ Takođe, smanjenje neželjenih efekata predstavlja jedan od ključnih ciljeva strukturne optimizacije.

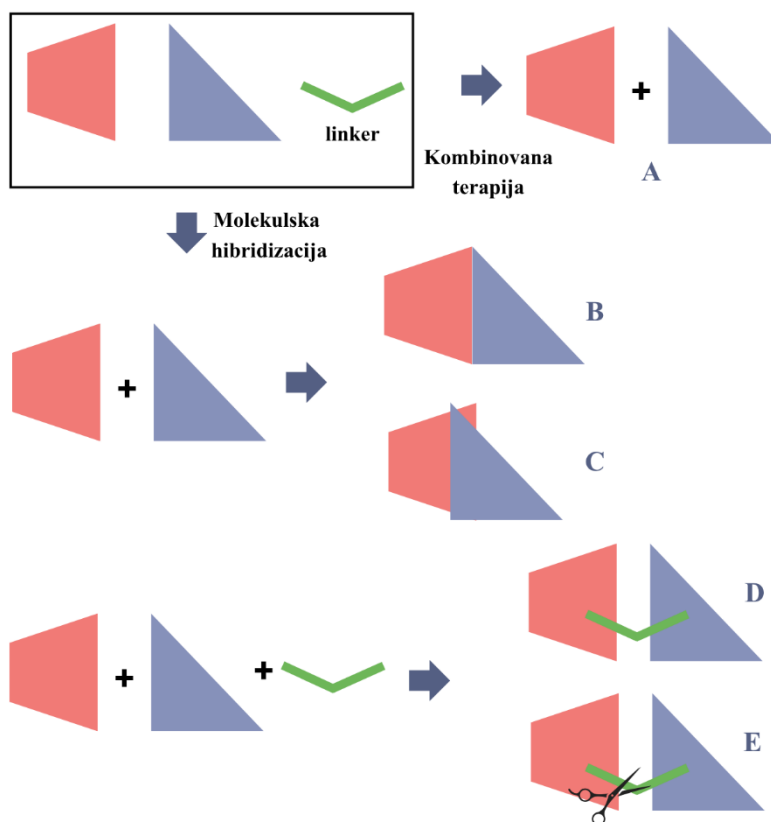
Povećanje lipofilnosti i uvođenje atoma halogena u strukturu prirodnih proizvoda predstavljaju tipične primjere strukturnih modifikacija koji su omogućili poboljšanje biološke aktivnosti ovih jedinjenja.⁸²

Jedan od obećavajućih i fundamentalno novih pristupa koji omogućavaju dobijanje novih specifičnih jedinjenja sa poboljšanim farmakološkim osobinama je hibridizacija prirodnih proizvoda i/ili bioaktivnih jedinjenja.⁸⁴ Ovom metodom se, dva ili više fragmenata prirodnih proizvoda, kombinuju i međusobno povezuju kovalentnim vezama što omogućava nastajanje novih hibridnih molekula. Hibridizacija predstavlja dobar pristup u dizajnu i razvoju lijekova koji privlači značajnu pažnju jer sintetski hibridi, koji sadrže parcijalne strukturne motive prirodnih jedinjenja, u mnogim slučajevima pokazuju izraženiju biološku aktivnost u poređenju sa polaznim jedinjenjima. Pored toga, ovi hibridni molekuli imaju sposobnost da prevaziđu mehanizme rezistencije na lijekove, kao i da omoguće integraciju povoljnih farmakoloških svojstava različitih prirodnih proizvoda u jedinstvenu molekulsku strukturu što može da dovede do smanjene toksičnosti.

Ovaj koncept inspirisan je samom prirodom, budući da su brojni prirodni proizvodi izgrađeni od takvih fragmenata koji potiču iz različitih biosintetskih puteva.⁸⁵ Kao primjer može se navesti vinkristin **16** (Slika 7), hibridno jedinjenje koje predstavlja dimerni indolni alkaloid sastavljen od vindolinskog i katarantinskog strukturnog motiva, a koje se primjenjuje kao lijek u terapiji leukemije. Zanimljivo je da pojedinačni monomerni prekursori ne ispoljavaju značajnu aktivnost.

Hibridni molekuli koji sadrže dvije ili više farmakofornih jedinica mogu se klasifikovati prema načinu njihovog kovalentnog povezivanja (Slika 15).^{86,87} Kod kondezovanih hibrida (Slika 15B), dvije molekulске cjeline povezane su bez prisustva vezivnog fragmenta, pri čemu svaki molekul obezbjeđuje funkcionalnu grupu za formiranje veze, najčešće estarske, karbamatne ili amidne prirode. Spojeni/preklopljeni hibridi (Slika 15C) nastaju preklapanjem strukturnih motiva obe farmakofore, dok izvorne biološke aktivnosti mogu biti djelimično očuvane ili izmijenjene pri čemu se nastoji postići što veći stepen preklapanja farmakofornih fragmenata radi dobijanja manjih i strukturno jednostavnijih molekula sa povoljnim fizičko-hemijskim osobinama. Hibridi sa vezivnim fragmentom karakterišu se prisustvom jasno definisanog linkera, koji može biti neraskidiv ili raskidiv. Neraskidiv vezivni fragment (Slika 15D) omogućava očuvanje biološke aktivnosti i afiniteta različitih farmakofornih jedinica prema biološkoj meti, a može dovesti i do pojave novih bioloških efekata. Nasuprot tome, raskidiv vezivni fragment (Slika 15E) dizajniran je tako da u fiziološkim ili enzimskim uslovima oslobađa polazne aktivne komponente sa nezavisnim djelovanjem.

Imajući u vidu brojne radove u literaturi, koncept hibridizacije pokazuje značajan potencijal u medicinskoj hemiji. U svrhu sinteze novih jedinjenja sa selektivnim djelovanjem na ćelije nesitnoćelijskog raka pluća i glioblastoma, istraživanje je zasnovano upravo na primjeni ovog koncepta.



Slika 15. Mogućnosti kovalentnog vezivanja dvije farmakofore (napravljeno pomoću programa *Canva*).

2.6. Značaj prirodnog proizvoda artemizininina

2.6.1. Otkriće artemizininina u svijetu

Malarija predstavlja jednu od najrasprostranjenijih parazitskih bolesti na svijetu sa visokom stopom morbiditeta i mortaliteta, a naročito u tropskim i subtropskim regionima.⁸⁸ Uzrokuju je paraziti iz roda *Plasmodium*.⁸⁹ Infekcija kod ljudi započinje ujedom zaražene ženke komarca, a simptomi se manifestuju kada parazit dođe do krvotoka čovjeka i počne da se razmnožava.⁹⁰ Poznato je pet vrsta roda *Plasmodium* koji izazivaju infekciju kod ljudi, a to su *P. falciparum*, uzročnik najvećeg broja smrtnih slučajeva, zatim *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* i *P. knowlesi*.⁹¹ Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, u 2023. godini na svijetu je registrovano oko 263 miliona slučajeva malarije sa 597 000 smrtnih ishoda.⁹² Kao standardnu terapiju za liječenje malarije izazvane vrstom *P. falciparum*, SZO preporučuje kombinovanu terapiju zasnovanu na prirodnom proizvodu artemizininu, dok se hlorokin preporučuje kod ljudi zaraženih vrstom *P. vivax* u regionima gdje je parazit i dalje osjetljiv na ovaj lijek.^{92,93}

Iako kombinovana terapija zasnovana na artemizininu (engl. *artemisinin-based combination therapies*, ACT) danas predstavlja osnovu za liječenje malarije izazvane vrstom *P. falciparum*, otkriće artemizininina u drugoj polovini 20. vijeka označilo je prekretnicu u borbi protiv rastuće rezistencije na tadašnje antimalarike koji su se primjenjivali.⁹⁴ Lijekovi koji su do tada smatrani visoko efikasnim, kao što je hlorokin, postajali su sve manje djelotvorni usljed razvoja rezistentnih sojeva parazita što je dovelo do potrebe za pronalaskom novih, efikasnijih antimalarijskih lijekova.

Tokom Vijetnamskog rata, veliki broj sjevernovijetnamskih vojnika je oboljevaao i umirao od malarije, što je predstavljalo ozbiljan problem.⁹⁵ Kineska vlada je 1967. godine pokrenula tajni državni projekat 523, sa ciljem razvoja novog i efikasnog antimalarijskog lijeka. U okviru ovog projekta, koji je uključivao saradnju velikog broja naučnika iz različitih institucija, značajan doprinos dala je Tu Youyou, koja je predvodila tim naučnika iz oblasti fitohemije i farmakologije.⁹⁶ Sa iskustvom u tradicionalnoj kineskoj medicini, Tu je pristup istraživanju zasnovala na sistematskom pregledu drevnih medicinskih tekstova u potrazi za prirodnim jedinjenjima sa potencijalnim antimalarijskim dejstvom. Posebno ju je zainteresovala biljka *Artemisia annua* (poznata kao qinghao) (Slika 16), koja se u tradicionalnoj praksi koristila za liječenje simptoma sličnih groznici koja danas predstavlja jedan od glavnih simptoma malarije. U okviru istraživanja ispitano je više od 380 ekstrakata na modelu malarije kod glodara.⁹⁷ Ekstrakt dobijen iz *Artemisia annua* pokazao je obećavajuće rezultate. Međutim, s obzirom na to da ovaj nivo aktivnosti nije bio dovoljan za terapijsku primjenu, istraživanje je nastavljeno s ciljem poboljšanja metode ekstrakcije, prelazeći sa etanola na ekstrakciju dietil-etrom pri nižim temperaturama, što je omogućilo dobijanje čistijeg i efikasnijeg ekstrakta. Uklanjanjem kiselinskih komponenti, dobijen je neutralni ekstrakt sa smanjenom toksičnošću i znatno većom efikasnošću, koji je 1971. godine postigao 100% inhibiciju malarije kod miševa. Ova metoda omogućila je očuvanje aktivnog jedinjenja koje je ubrzo identifikovano kao artemizinin, seskviterpenski lakton sa peroksidnom grupom, koja se ispostavila ključnom za njegovo antimalarijsko dejstvo.⁹⁴ Ovo otkriće je kasnije prepoznato kao izuzetno važno u borbi protiv malarije, a Tu Youyou je za svoj doprinos 2015. godine dobila Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu. Artemizinin **30**, bezbojna kristalna supstanca molekulske formule $C_{15}H_{22}O_5$, izolovan je 1972. godine iz biljke *Artemisia annua* (Slika 16). Do 1975. godine, korišćenjem NMR spektroskopije, difrakcije X-zraka i masene spektrometrije visoke rezolucije, u saradnji više kineskih instituta, utvrđeno je da je u pitanju seskviterpenski lakton sa jedinstvenom endoperoksidnom grupom. *Trans*-konfiguracija laktonskog prstena je određena tehnikom optičke rotacione disperzije, dok je apsolutna konfiguracija potvrđena i potpuna karakterizacija artemizininina objavljena 1979. godine.⁹⁴

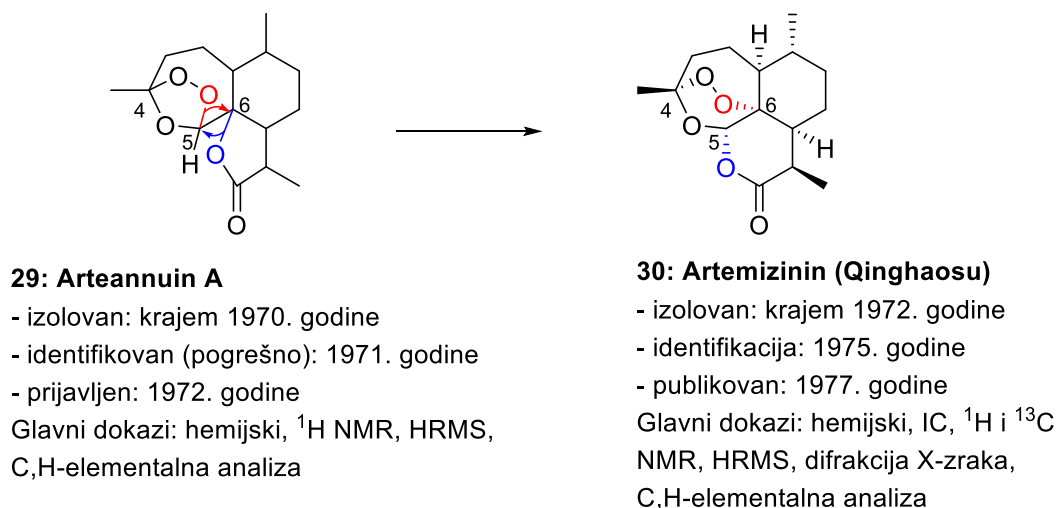


Slika 16. *Artemisia annua*.

2.6.2. Otkriće artemizininina u Srbiji

Malo je poznato da je zapravo, gotovo u isto vrijeme kada su u Kini sprovedena istraživanja sa ciljem pronalaska efikasnog antimalarika, u Srbiji, u Beogradu, artemizinin prvi put izolovan u okviru istraživanja profesora Milutina Stefanovića i Dragoslava Jeremića.^{98,99} Krajem 1970. godine, opisano je izolovanje, iz hloroformskog ekstrakta nadzemnih dijelova biljke slatki pelin, dva kristalna jedinjenja. U radu profesora Milosavljevića iz 2017. godine, mogu da se nađu 1H NMR i IC spektar jedinjenja izolovanog u Beogradu, što ustvari predstavlja i prvi snimljen spektar prirodnog proizvoda artemizininina.⁹⁸ Imajući u vidu da je ovo bila nova klasa prirodnih proizvoda čiji spektralni podaci do tada nisu bili prijavljeni u literaturi, određivanje krajnje strukture je trajalo više mjeseci. Ugljenični skelet seskviterpena kadinanskog tipa je prvi put identifikovan kod ove grupe prirodnih proizvoda što je dovelo do otkrića nove klase seskviterpenskih laktona koji su nazvani kadinanolidi. Predlozi

struktura do kojih su profesori Stefanović i Jeremić došli, na osnovu spektralnih podataka ali i rezultata hemijskih transformacija izolovanih jedinjenja, prikazani su na Osmom međunarodnom simpozijumu o hemiji prirodnih proizvoda u Nju Delhiju održanom 1972. godine. Na slici 17, prikazano je poređenje ozonoidne strukture, koju su odredili profesori Stefanović i Jeremić, i endoperoksidne strukture koju su prijavili Tu Youyou i saradnici za čije su određivanje bili ključni difrakcija X-zraka, ali i ^{13}C NMR spektar koji u to vrijeme nisu bili dostupni u Jugoslaviji. Jugoslovenska grupa je sprovela fitohemijsko istraživanje sa ciljem izolovanja i identifikacije novih sekundarnih metabolita biljaka koje do tad nisu istraživane pri čemu se jasno vidi da je najveći dio strukture bio dobro određen iako sa skromnijom opremom.



Slika 17. Strukture artemizininina određene u Jugoslaviji (A) i Kini (B).⁹⁸

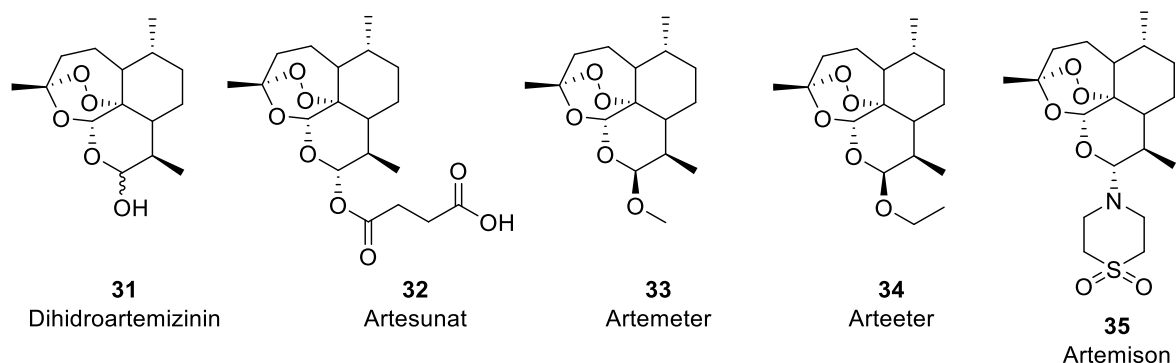
2.6.3. Biološka aktivnost artemizininina i njegovih derivata

Artemizinin **30**, seskviterpenski lakton, i njegovi semisintetski derivati, zajednički označeni kao artemizininini, karakterišu se prisustvom 1,2,4-trioksanskog prstena sa endoperoksidnim mostom.¹⁰⁰ Endoperoksidni most predstavlja ključni strukturni fragment artemizininina koji ima važnu ulogu u ispoljavanju biološke aktivnosti ovih molekula, kako antimalarijske tako i antitumorske.¹⁰¹ Za razliku od većine drugih antimalarijskih lijekova, ovaj visoko oksigenovani seskviterpenski laktonski peroksid ne sadrži azotne heterociklične strukturne fragmente i pokazao je značajnu aktivnost u poređenju sa konvencionalnim antimalarijskim lijekovima, kao što su hlorokin i kinin, protiv različitih sojeva malarije, bez izraženih neželjenih efekata kod pacijenata.¹⁰²

Potencijal artemizininina, kao novog terapijskog agensa za liječenje raka, prepoznat je još 1993. godine, kada je objavljen prvi rad koji je ukazao na njegova antitumorska svojstva, a brojna kasnija istraživanja dodatno su potvrdila značaj ovog prirodnog proizvoda.^{103,104} Danas je poznato da artemizinin, kao i njegovi derivati, ispoljavaju citotoksičnu aktivnost prema različitim tipovima ćelija raka, u *in vitro* i u *in vivo* uslovima.¹⁰⁵ Ova jedinjenja ispoljavaju antitumorsku aktivnost u nano- do mikromolarnim koncentracijama kako na ćelijskim linijama osjetljivim na lijekove, tako i na rezistentnim tumorskim ćelijskim linijama.¹⁰⁶ Uprkos izraženoj terapijskoj efikasnosti, artemizinin **30** karakterišu nepovoljna farmakokinetička svojstva. Ovaj prirodni proizvod se odlikuje niskom rastvorljivošću u vodenim i lipidnim medijima, ograničenom bioraspoloživošću, kao i kratkim poluživotom *in vivo* (oko 2,5 sata).¹⁰⁶ U cilju prevazilaženja navedenih ograničenja razvijene su tri generacije endoperoksidnih jedinjenja sličnih artemizininu, koje obuhvataju polusintetske derivate kao i potpuno sintetske analoge.

Redukcijom karbonilne grupe artemizininina, dobija se dihidroartemizinin **31** (DHA), u visokom prinosu, koji čini glavni aktivni metabolit artemizininina, a njegovom daljom derivatizacijom, dobijaju se i ostali derivati (Slika 18).¹⁰⁷ Artesunat **32** se dobija reakcijom esterifikacije DHA, dok se artemeter **33** i arteeter **34** dobijaju iz DHA reakcijom eterifikacije u prisustvu metanola, odnosno

etanola i katalitičke količine $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$.¹⁰⁸ Artesunat, koji je našao najveću primjenu među derivatima artemizininina u kombinovanoj terapiji za liječenje malarije, predstavlja vodorastvorni derivat ovog prirodnog proizvoda, dok artemeter i arteeter čine njegove lipofilne polusintetske derivate.¹⁰⁹ Svi novosintetisani derivati artemizininina pokazali su unaprijeđena farmakodinamička i farmakokinetička svojstva i kasnije su registrovani kao prva generacija derivata artemizininina. Dalje, artemison **35**, kao predstavnik druge generacije, pokazuje takođe unaprijeđena farmakokinetička svojstva, uključujući produžen poluživot i smanjenu toksičnost.¹⁰⁶



Slika 18. Polusintetiski derivati prirodnog proizvoda artemizininina **30**.

Artemizininini predstavljaju prolijekeve koji se aktiviraju u intracelularnim ili intraparazitskim uslovima.¹¹⁰ Endoperoksidni most artemizininina ima ključnu ulogu u antiparazitskoj i antitumorskoj aktivnosti, a aktivacija artemizininina povezuje se sa razlaganjem ovog endoperoksidnog mosta, pri čemu nastaju visoko reaktivni ugljenikovi radikali sposobni da učestvuju u alkilovanju proteina i stvaranju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Međutim, tačan mehanizam aktivacije artemizininina i dalje nije u potpunosti razjašnjen, posebno u pogledu uloge slobodnog fero-gvožđa i hema u procesu razlaganja endoperoksidnog mosta.

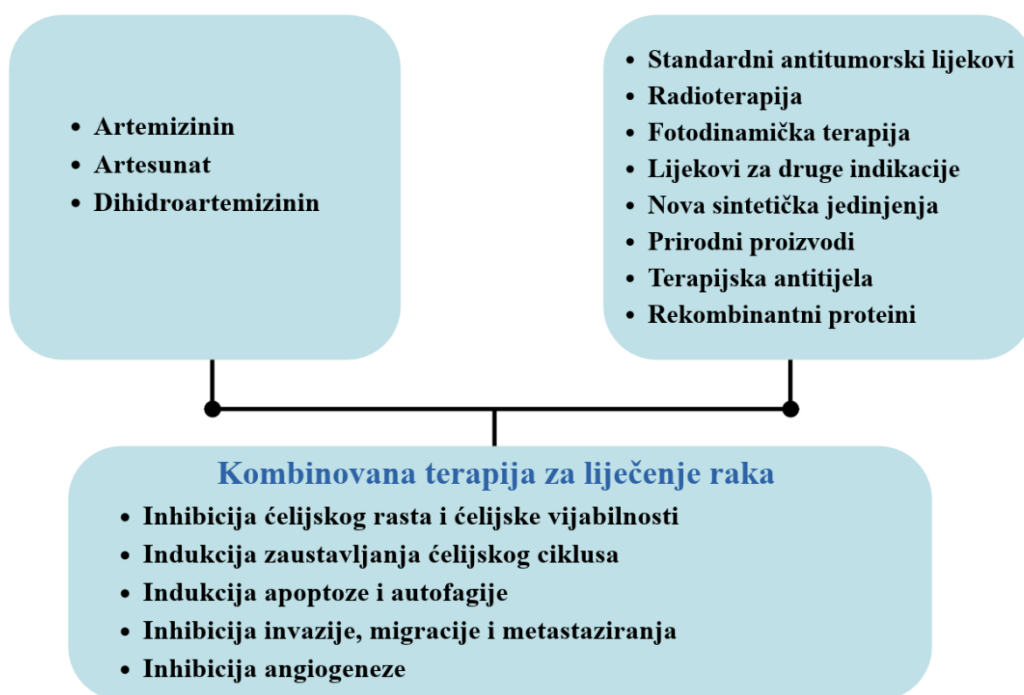
Jedna od glavnih hipoteza o mehanizmu aktivacije artemizininina zasniva se na ulozi slobodnog fero-gvožđa (Fe^{2+}) kao ključnog aktivatora.¹¹⁰ Brojna istraživanja pokazala su da je prisustvo slobodnog ćelijskog gvožđa povezano sa antitumorskom aktivnošću artemizininina, dok helatacija gvožđa značajno smanjuje njegov citotoksični efekat. Takođe, tumorske ćelije imaju povećanu potrebu za metabolizmom gvožđa i viši sadržaj intracelularnog gvožđa u odnosu na normalne ćelije, što može objasniti selektivnost artemizininina prema tumorskim ćelijama. Pored gvožđa, značajnu ulogu u aktivaciji artemizininina ima i hem. Povećana sinteza hema dovodi do pojačane produkcije ROS i veće citotoksičnosti artemizininina, dok inhibicija sinteze hema smanjuje njegovu aktivnost. Savremena proteomska istraživanja pokazala su da hem efikasnije aktivira artemizininin od slobodnog gvožđa, zbog čega se danas smatra da bi aktivacija artemizininina mogla biti primarno hem-zavisna, dok gvožđe ima važniju ulogu u kasnijim procesima citotoksičnosti i stvaranja ROS.

Unutar ćelije, artemizininini, zbog svoje hidrofobne prirode, prvenstveno djeluju u membranskim sistemima i lokalizuju se u strukturama kao što su endoplazmatični retikulum, digestivne vakuole, mitohondrije i druge organele.¹¹¹ Savremena *in vivo* i *in vitro* istraživanja ukazuju na više mogućih mehanizama njihovog djelovanja, među kojima su najznačajniji: indukcija oksidativnog stresa, indukcija apoptoze, inhibicija angiogeneze, zaustavljanje ćelijskog ciklusa u fazi G0/G1, kao i indukcija ferroptoze. Kombinacija oksidativnog stresa, oštećenja DNK, i drugih posljedica alkilovanja proteina i poremećaja normalnih ćelijskih funkcija na kraju dovode do ćelijske smrti.

Razvoj novih antitumorskih lijekova predstavlja dugotrajan i izuzetno skup proces, zbog čega prenamjena lijekova (engl. *drug repurposing*) postaje sve značajnija alternativa tradicionalnom razvoju terapijskih agenasa.¹¹² Artemizininin i njegovi derivati pokazali su povoljan bezbjednosni profil u terapiji malarije, međutim, njihova primjena u liječenju raka može zahtijevati više doze i

dugotrajniju terapiju, što potencijalno povećava rizik od neželjenih efekata. Iako su pri visokim dozama artesunata zabilježene određene neželjene reakcije, bezbjednost dugotrajne primjene artemizininu u onkološkoj terapiji još uvijek nije dovoljno ispitana.¹¹³

Artemizinin i njegovi derivati su prvobitno korišćeni kao monoterapija u liječenju malarije, ali se danas primjenjuju u kombinovanim terapijama zasnovanim na artemizininu, koje objedinjuju brzo djelovanje artemizininske komponente i dugotrajniji efekat partnerskog lijeka.¹⁰⁹ Sličan koncept kombinovanja različitih mehanizama djelovanja primjenjuje se i u razvoju novih antitumorskih agenasa pri čemu proces kombinovane terapije podrazumijeva kombinovanje lijekova različitih mehanizama djelovanja i molekulskih meta radi sprječavanja razvoja rezistencije, raspodjele neželjenih efekata na različita tkiva kako bi se smanjio rizik toksičnosti, kao i činjenice da svaka komponenta kombinovane terapije treba da ispoljava antitumorsku aktivnost i kada se primjenjuje kao pojedinačni lijek.¹¹⁴ Na slici 19 prikazane su mogućnosti kombinovane terapije derivata artemizininu sa različitim tipovima citotoksičnih agenasa i terapijskih pristupa, pri čemu su uočeni sinergistički i aditivni efekti. Derivati artemizininu mogu da se koriste u kombinaciji sa standardnim antitumorskim lijekovima, radioterapijom i fotodinamičkom terapijom, već odobrenim lijekovima za druge indikacije, novim sintetskim jedinjenjima, prirodnim proizvodima i njihovim derivatima, terapijskim antitijelima i rekombinantnim proteinima.



Slika 19. Kombinovana terapija zasnovana na artemizininima.

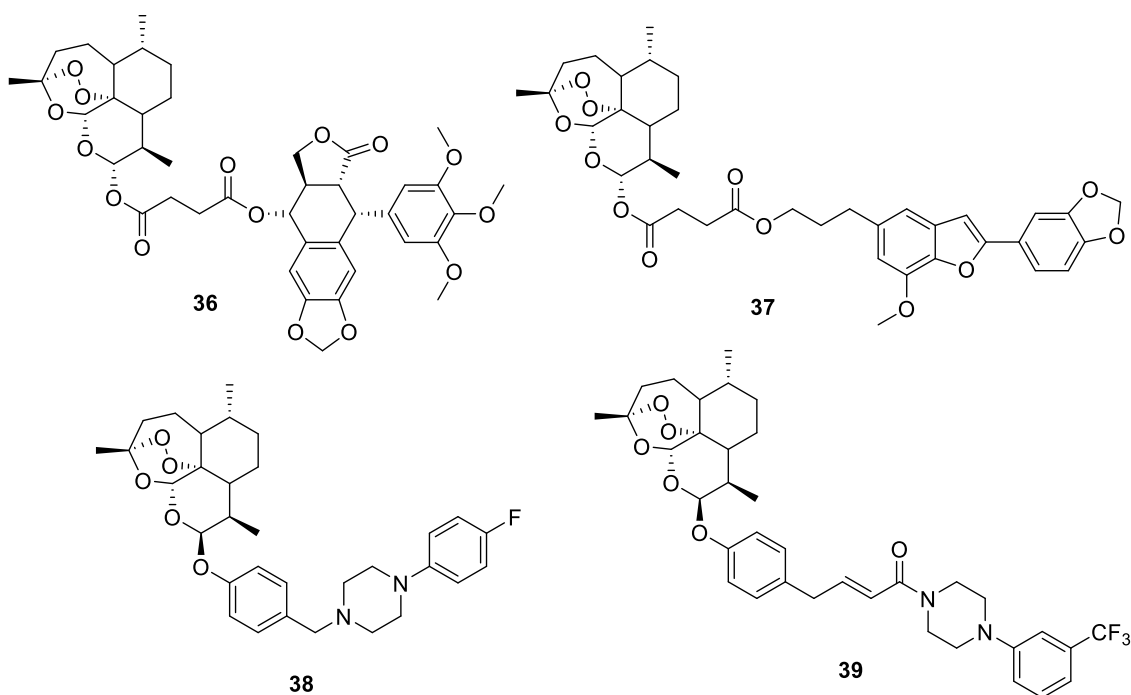
Veliki broj *in vitro* i *in vivo* istraživanja potvrđuje značajnu antitumorsku aktivnost derivata artemizininu, međutim, broj kliničkih studija sprovedenih kod onkoloških pacijenata i dalje je ograničen.¹¹¹ Do sada su najviše ispitivani pacijenti sa solidnim tumorima, uključujući kolorektalni karcinom, karcinom dojke, hepatocelularni karcinom i karcinom pluća. Rezultati dosadašnjih kliničkih ispitivanja ukazuju na to da artesunat može ispoljiti antitumorsku aktivnost uz prihvatljiv bezbjednosni profil. Kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća, kombinacija artesunata i hemoterapije pokazala je značajno bolju kontrolu bolesti i duže vrijeme do progresije u poređenju sa samom hemoterapijom, bez značajnog povećanja toksičnosti.¹¹⁵ Pored procjene efikasnosti, klinička istraživanja bila su usmjerena i na ispitivanje farmakokinetike, bezbjednosti i podnošljivosti artesunata kod pacijenata sa metastatskim karcinomom dojke i hepatocelularnim karcinomom.¹¹¹ Dosadašnji rezultati ukazuju da se artesunat generalno dobro podnosi, dok su najčešće prijavljeni neželjeni efekti uključivali leukopeniju, neutropeniju, anemiju i vrtoglavicu, koji su uglavnom bili

reverzibilni nakon prekida terapije. Iako su rezultati dosadašnjih studija ohrabrujući, neophodna su dodatna klinička ispitivanja kako bi se preciznije definisali optimalni režimi doziranja, dugoročna bezbjednost i stvarni terapijski potencijal artesunata u liječenju malignih oboljenja.

Iako prirodni proizvodi predstavljaju značajan izvor antitumorskih agenasa, njihovu primjenu često ograničavaju nepovoljne farmakokinetičke osobine i razvoj rezistencije, zbog čega molekulska hibridizacija predstavlja efikasnu strategiju za unapređenje njihovih farmakoloških svojstava, efikasnosti, selektivnosti i biodostupnosti.¹¹⁶ U tom smislu, povezivanje artemizininskog fragmenta sa drugim antitumorskim farmakoforima predstavlja značajnu strategiju za razvoj novih antitumorskih derivata. Pored dobro poznate antimalarijske aktivnosti, derivati artemizinina ispoljavaju i antibakterijska, antituberkulozna, antivirusna i antitumorska svojstva, zbog čega artemizininski fragment predstavlja značajnu farmakoforu u razvoju novih lijekova.¹¹⁷

Potencijal derivata artemizinina da prevaziđu P-gp posredovanu višestruku rezistenciju predstavlja značajno područje istraživanja u onkologiji.¹¹⁸ Iako trenutno korišćeni derivati, uključujući artemizinin, artesunat, artemeter i dihidroartemizinin, uglavnom nisu supstrati za P-gp, brojni novosintetisani derivati pokazuju sposobnost inhibicije P-gp i povećanja intracelularne akumulacije antitumorskih lijekova. Zbog toga se smatra da derivati artemizinina (Slika 20) mogu doprinijeti prevazilaženju rezistencije na terapiju i predstavljaju perspektivne kandidate za razvoj novih kombinovanih antitumorskih terapija.

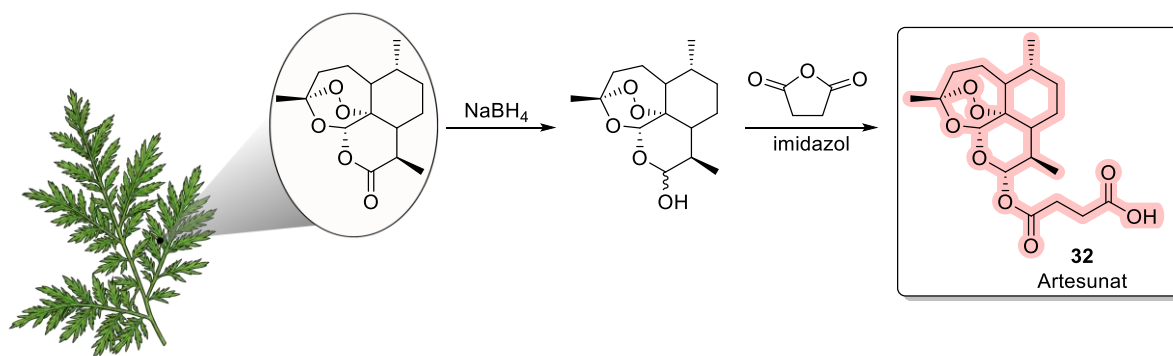
Citotoksična aktivnost hibrida artesunata i podofilotoksina **36** ispitana je na nekoliko senzitivnih ćelijskih linija kao i na višestruko rezistentnoj ćelijskoj liniji leukemije K562/ADR.¹¹⁹ Pokazano je da ovo jedinjenje značajno inhibira rast ćelija K562/ADR u poređenju sa artesunatom, pri čemu je njegovo djelovanje povezano sa indukcijom apoptoze i zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G2/M fazi. Antitumorska aktivnost derivata artesunata i eganola **37** ispitana je na senzitivnoj ćelijskoj liniji leukemije CCRF-CEM i višestruko rezistentnoj ćelijskoj liniji CEM/ADR500 koju karakteriše prekomjerna ekspresija P-gp pri čemu je sintetisani derivat pokazao značajnu aktivnost sa IC₅₀ vrijednostima u submikromolarnom do mikromolarnom opsegu.¹²⁰ U navedenim primjerima pokazana je značajna antitumorska aktivnost na rezistentnim ćelijskim linijama, ali ni u jednom slučaju nije dovedeno do reverzije rezistencije. Međutim, 10-β-fenil etarski derivati dihidroartemizinina **38** i **39** koji u svojoj strukturi sadrže piperazinski prsten pokazali su izrazitu antiproliferativnu aktivnost u submikromolarnom opsegu prema ćelijskoj liniji karcinoma dojke MCF-7 i odgovarajućoj rezistentnoj ćelijskoj liniji MCF-7/Adr pri čemu su bili potentniji od 100 do 300 puta u odnosu na DHA.¹²¹ Takođe, kod jedinjenja **38** i **39** uočena je kolateralna senzitivnost, budući da su ispoljila veću antiproliferativnu aktivnost prema rezistentnoj MCF-7/Adr ćelijskoj liniji nego prema odgovarajućoj senzitivnoj liniji. Ova jedinjenja nisu bila podložna efluksu posredovanom P-glikoproteinom, dok je antiproliferativno dejstvo jedinjenja **39** bilo povezano sa zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G1 fazi.



Slika 20. Strukture derivata artemizinina koji pokazuju uticaj na aktivnost P-gp.

2.6.4. Antitumorska aktivnost derivata artesunata

Artesunat **32** predstavlja semisintetski derivat artemizinina nastao modifikacijom hidroksilne grupe u položaju C-10 dihidroartemizinina uvođenjem suksinatne grupe.^{122,123} Ova strukturna modifikacija zadržava α -stereokonfiguraciju karakterističnu za artesunat, istovremeno značajno poboljšava rastvorljivost u vodi i omogućava dalju hemijsku funkcionalizaciju, zbog čega artesunat predstavlja pogodan prekursor za sintezu novih derivata.



Slika 21. Sinteza artesunata **32**.

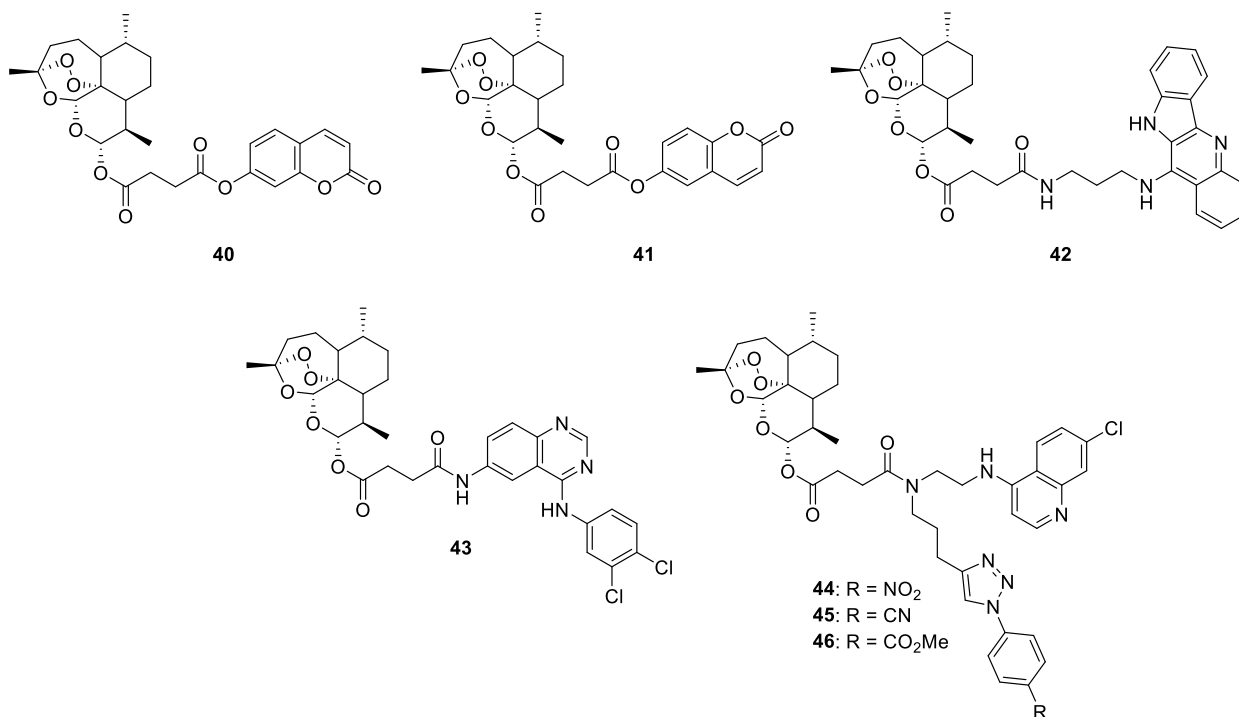
Zahvaljujući visokoj efikasnosti, niskoj toksičnosti, dobroj podnošljivosti, povoljnim farmakokinetičkim osobinama i rastvorljivosti u vodi, artesunat predstavlja jedan od najznačajnijih derivata artemizinina u kliničkoj praksi.¹²⁴ Pored antimalarijskog djelovanja, brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja ukazala su na izražen antitumorski potencijal artesunata. Pokazano je da ovo jedinjenje inhibira proliferaciju i preživljavanje različitih tumorskih ćelija, uključujući leukemiju, melanom, kao i karcinome dojke, kolona, jetre, prostate, mokraćne bešike i grlića materice, što ga čini pogodnim za razvoj novih antitumorskih terapijskih strategija.

Nakon oralne primjene, artemizinin ima kratko poluvrijeme eliminacije od približno 20 minuta i metaboliše se estarskom hidrolizom do dihidroartemizinina koji predstavlja aktivni metabolit.¹²⁵ Zbog kratkog poluvremena eliminacije, artesunat pokazuje ograničenu stabilnost, što

može rezultovati smanjenom bioraspoloživošću. Artesunat ispoljava značajnu antitumorsku aktivnost djelujući kroz različite mehanizme ćelijske smrti, uključujući autofagiju, onkozu, ferroptozu i apoptozu. Pored toga, utiče na više ključnih obilježja razvoja raka inhibicijom proliferacije i invazije tumorskih ćelija, blokadom ćelijskog ciklusa, modulacijom signalnih puteva, izazivanjem oksidativnog stresa, kao i inhibicijom angiogeneze i metastaziranja.

Iako artesunat ispoljava značajnu antitumorsku aktivnost, njegova hemijska struktura pruža dodatne mogućnosti za strukturne modifikacije u cilju unapređenja farmakoloških svojstava i antitumorske efikasnosti. Zbog toga je razvoj novih derivata i hibridnih molekula zasnovanih na artesunatu postao predmet intenzivnih istraživanja, pri čemu se posebna pažnja posvećuje uvođenju različitih heterocikličnih farmakofora radi povećanja biološke aktivnosti, selektivnosti i sposobnosti prevazilaženja rezistencije na lijekove. Istraživanje predstavljeno u ovoj disertaciji zasnovano je na prethodno objavljenim rezultatima i na slici 22 prikazana su odabrana jedinjenja iz literature koje čine hibridna jedinjenja artesunata i heterocikličnih jedinjenja sa izraženom antitumorskom aktivnošću. Među ispitivanim hibridnim jedinjenjima artesunata i kumarina povezanih estarskom vezom, hibridi **40** i **41**, pokazali su visoku selektivnost prema metastatskim ćelijama melanoma SK-MEL3, sa IC_{50} vrijednostima u nanomolarnom opsegu.¹²⁶ Takođe, ova jedinjenja ispoljila su približno dva reda veličine veću potentnost u odnosu na artesunat i paklitaksel. Pored izražene citotoksičnosti, jedinjenja **40** i **41** su pokazala izuzetnu selektivnost prema tumorskim ćelijama sa indeksom selektivnosti preko 4000 uz minimalan efekat na zdrave ćelije.

Derivatizacija artesunata uvođenjem heterocikličnih farmakofora predstavlja uspješnu strategiju za razvoj novih antitumorskih agenasa. U tom kontekstu, hibridi artesunata i indolohinolinskih jedinjenja pokazali su značajnu antiproliferativnu aktivnost prema različitim tumorskim ćelijskim linijama sa IC_{50} vrijednostima u mikromolarnom opsegu, a pojedini derivati ispoljili su veću potentnost od cisplatina.¹²⁷ Posebno se izdvojilo jedinjenje **42**, koje je pokazalo značajnu aktivnost prema ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća A549 ($IC_{50} = 1,33 \mu M$) i kolorektalnog karcinoma HCT 116 ($IC_{50} = 0,58 \mu M$), uz veću potentnost prema A549 ćelijama u poređenju sa dihidroartemizininom i cisplatinom. Sličan pristup primjenjen je i u razvoju hibrida artesunata i hinazolina, koji predstavlja značajan *N*-heterociklični farmakoforni motiv prisutan u brojnim klinički primjenjivanim antitumorskim lijekovima.¹²⁸ Hibrid **43** je ispoljio izraženu antileukemijsku aktivnost prema senzitivnoj CCRF-CEM i višestruko rezistentnoj CEM/ADR5000 ćelijskoj liniji sa prekomjernom ekspresijom P-glikoproteina, pri čemu je njegova aktivnost prema rezistentnim ćelijama bila čak 45 puta veća u odnosu na doksorubicin. Pored hinazolinskih derivata, sintetisani su i hibridi artesunata sa hinolinom koji u svojoj strukturi sadrže 1,2,3-triazolski motiv.¹²⁹ Ova jedinjenja pokazala su umjerenu do izraženu antiproliferativnu aktivnost prema različitim leukemijskim ćelijskim linijama, pri čemu su K562 ćelije bile najosjetljivije. Posebno su se izdvojili hibridi **44–46**, koji su pokazali antileukemijsku aktivnost uporedivu sa doksorubicinom, uz veću aktivnost u odnosu na polazne komponente, hinolin i artesunat, potvrđujući da hibridizacija artesunata heterocikličnim jedinjenjima predstavlja efikasnu strategiju za razvoj novih selektivnih antitumorskih agenasa, kao i uvođenje 1,2,3-triazolskog strukturnog motiva u dizajnu novih antitumorskih agenasa.



Slika 22. Strukture derivata artesunata koji ispljavaju antitumorsku aktivnost.

2.7. Heterociklična jedinjenja u medicinskoj hemiji

Heterociklična jedinjenja su molekuli kod kojih je ugljenikov atom u prstenu zamijenjen sa kiseonikom, azotom ili sumporom.¹³⁰ Prisustvo heteroatoma, kao i veličina prstena, utiču na fizička i hemijska svojstva jedinjenja. Zahvaljujući sposobnosti formiranja vodoničnih veza između heteroatoma i DNK, jedinjenja koja sadrže heteroatome odlikuju se povećanom stabilnošću kompleksa i u skladu sa tim, jačina interakcije između DNK i heterocikličnih jedinjenja direktno korelira sa njihovim antitumorskim dejstvom.

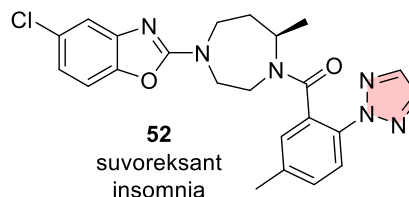
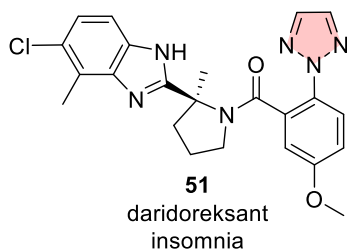
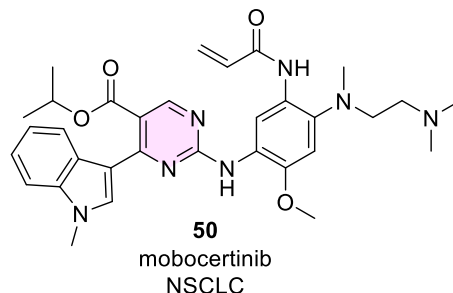
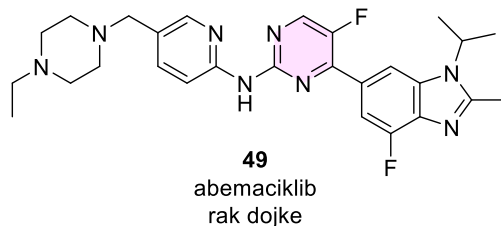
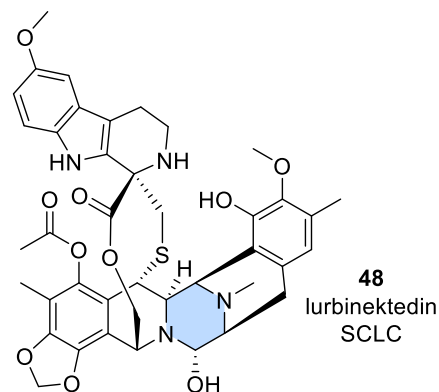
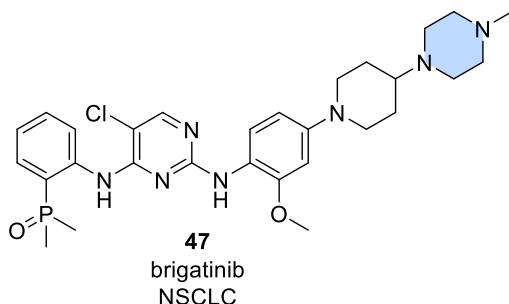
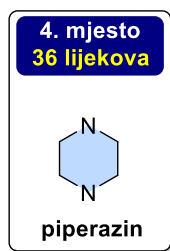
Prema statistici, više od 85% svih biološki aktivnih hemijskih struktura sadrži heterociklično jezgro.¹³¹ Na osnovu ovog se može zaključiti da heterociklična jedinjenja imaju važnu ulogu u modernom dizajnu lijekova. Takođe, primjena heterocikličnog strukturnog motiva predstavlja koristan alat za modifikaciju rastvorljivosti, lipofilnosti, polarnosti i mogućnosti formiranja vodoničnih veza između biološki aktivnih agenasa, što kao rezultat ima optimizovana ADMET svojstva lijekova ili kandidata za lijekove. Sve veće prisustvo različitih heterocikličnih jedinjenja u lijekovima povezano je sa napretkom u sintetskim metodologijama, kao što su metalima katalizovane reakcije ukrštenog kuplovanja koje omogućavaju brz pristup širokom spektru funkcionalizovanih heterocikala. U novije vrijeme, u reakcijama sinteze, kao i funkcionalizacije heterocikličnih jedinjenja, koriste se reakcije C–H aktivacije, fotoredoks reakcije, multikomponentne reakcije.¹³² Razvoj novih metodologija u heterocikličnoj hemiji ima za cilj dobijanje biološki aktivnih molekula sa unaprijeđenim farmakološkim svojstvima, pri čemu se razvijaju regio-, stereo- i hemoselektivne sintetske metode, optimizuju reakcioni uslovi radi veće efikasnosti i tolerancije prema funkcionalnim grupama, pojednostavljaju sintetski postupci primjenom *one-pot* protokola i eliminišu toksični ili skupi reagensi i zahtijevni reakcioni uslovi.¹³²

Međutim, uprkos dostupnosti brojnih savremenih sintetskih metodologija, većina najčešće korišćenih reakcija u medicinskoj hemiji otkrivena je prije više od 20 godina.¹³² Tri najzastupljenije metodologije su formiranje amidne veze, Suzuki–Miyaura ukršteno kuplovanje i S_NAr (nukleofilna aromatična supstitucija). Zastupljenost ovih reakcija može se objasniti njihovim jasno definisanim spektrom supstrata, hemoselektivnošću i tolerantnošću prema funkcionalnim grupama.

Mnoga N-heterociklična jedinjenja, široko rasprostranjena u prirodi, ulaze u sastav biološki važnih molekula, uključujući vitamine, nukleinske kiseline, enzime, koenzime, hormone i alkalioide, kao i antibiotike i agrohemikalije.¹³³ Štaviše, ona čine sastavni dio mnogih farmakološki aktivnih molekula. Bazni parovi DNK i RNK (guanin, citozin, adenin i timin) takođe su sastavljeni od N-heterocikličnih jedinjenja, purina, pirimidina.¹³⁴ Serotonin, tiamin (poznat i kao vitamin B1), atropin, morfin, kodein, papaverin, koniin, kofein samo su neka od jedinjenja koja sadrže N-heterociklični strukturni fragment. N-heterociklična jedinjenja su prisutna, kako u strukturi prirodnih proizvoda, tako i u farmaceutskim proizvodima, organskim materijalima, senzibilizatorima, kopolimerima, bojama i inhibitorima korozije.¹³⁰

Rasprostranjenost azotnih heterocikličnih jedinjenja u biološki aktivnim jedinjenjima može se pripisati njihovoj stabilnosti i funkcionalnoj efikasnosti u ljudskom organizmu, kao i činjenici da se atomi azota lako vezuju za DNK putem vodoničnih veza.¹³³ Elektron bogata N-heterociklična jedinjenja ne samo da lako prihvataju ili otpuštaju proton, već takođe mogu lako da uspostave različite slabe međumolekulske interakcije.¹³⁴ Neke od tih interakcija, kao što su vodonične veze, dipol-dipol interakcije, hidrofobni efekti i Van der Waals sile, doprinose značaju azotnih jedinjenja u medicinskoj hemiji. Ove osobine omogućavaju jedinjenjima da se vezuju za različite enzime i receptore u biološkim ciljanim strukturama sa visokom afinitetom, zahvaljujući poboljšanoj rastvorljivosti.

Pokazano je da 82% novih malih molekula lijekova odobrenih od strane FDA u periodu od 2013. do 2023. godine čine heterociklična jedinjenja koji sadrže azot.¹³⁵ Broj azotnih heterocikličnih jedinjenja po lijeku pokazuje značajan porast, pri čemu veliki procenat lijekova sadrži dva (33%), tri (23%) ili četiri (8%) azotna heterociklična sistema, dok su odobrene i dve strukture koje sadrže čak šest takvih sistema. Skoro 90% malih molekula su odobreni kao lijekovi za rak. Analizom odobrenih lijekova je pokazano da se po učestalosti heterocikličnih jedinjenja u strukturi lijekova piperazin nalazi na četvrtom mjestu, pirimidin na petom, dok se triazol nalazi na jedanaestom mjestu. Zanimljivo je napomenuti da se u odnosu na prethodno istraživanje, objavljeno 2014. godine, pirimidin sa 10. mjesta, po zastupljenosti u lijekovima pomjerio sada na 5. mjesto, dok je triazol sa 24. mjesta prešao na 11.¹³⁶ Većina odobrenih lijekova koja u svojoj strukturi sadrže piperazin predstavljaju 1,4-supstituisane piperazine, dok samo dva lijeka odobrena za liječenje raka sadrže piperazinske derivate supstituisane na svih šest atoma. Na slici 23, prikazan je lurbinektedin **48**, prirodni proizvod koji je našao primjenu u liječenju sitnoćelijskog karcinoma pluća i kod kojeg su svi atomi piperazina supstituisani. Gotovo 50% lijekova koji sadrže pirimidin čine trisupstituisani derivati, a velik broj pirimidinskih jedinjenja čine inhibitore kinaza, **49** i **50**. Na jedanaestom mjestu po zastupljenosti azotnih heterocikličnih jedinjenja nalazi se 1,2,4-triazol, sa devet lijekova koji sadrže ovaj strukturni motiv, zajedno sa 1,2,3-triazolskim lijekovima **51** i **52**.¹³⁵



Slika 23. Strukture odobrenih lijekova.

2.7.1. Derivati pirimidina u medicinskoj hemiji

Šestočlani nezasićeni prstenovi koji sadrže atome azota se nazivaju azini, a oni koji u prstenu sadrže dva atoma azota nazivaju se diazini.¹³⁷ Diazini postoje u tri izomerna oblika (Slika 24) u zavisnosti od položaja azotovog atoma: piridazin (1,2-diazin), pirimidin (1,3-diazin) i pirazin (1,4-diazin).

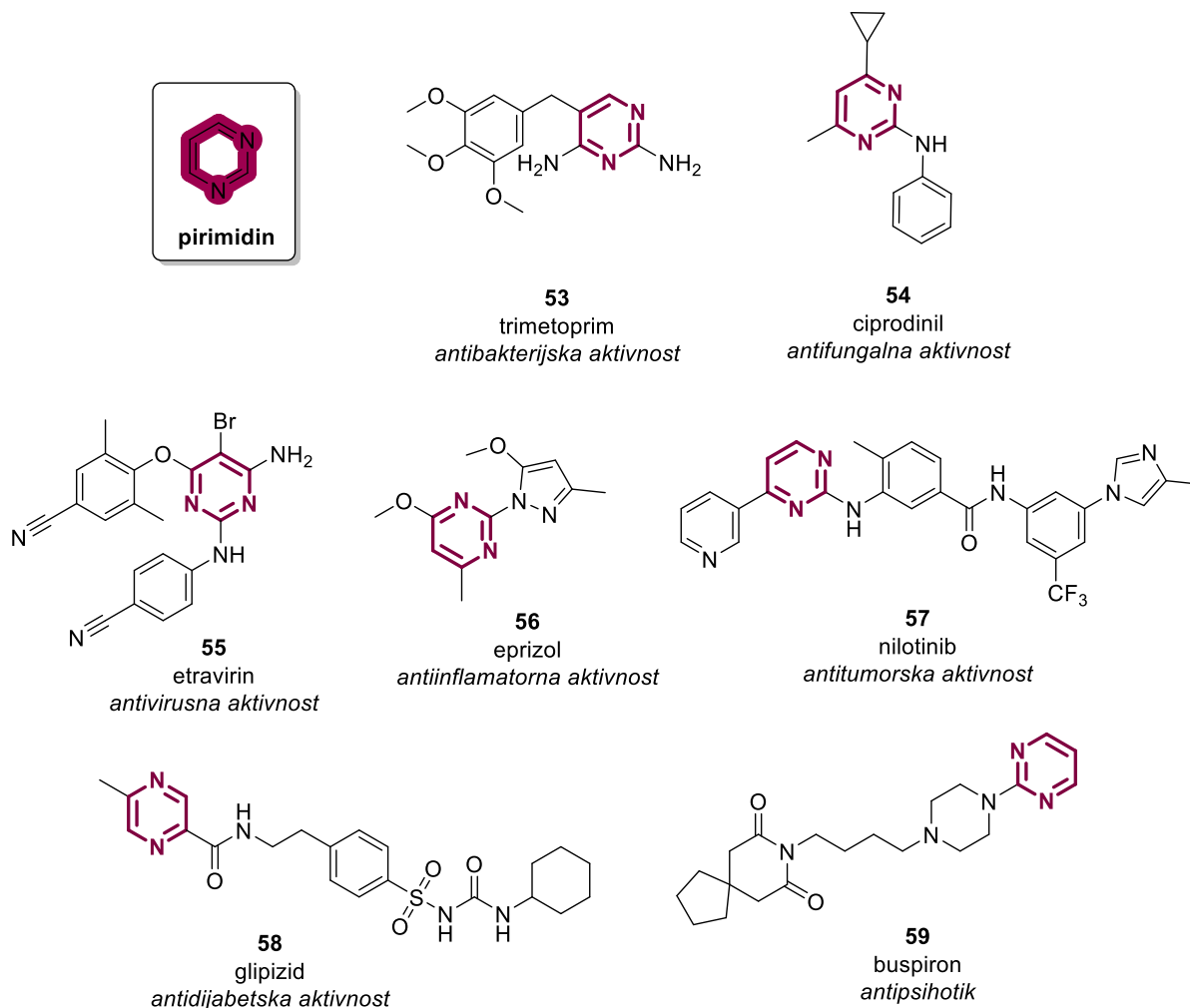


Slika 24. Izomerne forme diazina.

Pirimidin je heterociklično aromatično organsko jedinjenje, slično benzenu i piridinu, koje sadrži dva azotova atoma, u položajima 1 i 3 šestočlanog prstena.^{138,139} Zbog elektronegativnog efekta azota, položaji 2, 4 i 6 su najviše elektronski deficitarni i podložni nukleofilnom napadu, dok je sa druge strane, položaj 5 pirimidinskog prstena najbogatiji elektronima i odgovoran za elektrofilne napade.¹⁴⁰ Pirimidinska jedinjenja predstavljaju jednu od najznačajnijih klasa heterocikličnih jedinjenja zahvaljujući širokom spektru bioloških aktivnosti i rasprostranjenosti u prirodi.¹⁴¹ Kao izuzetno pogodan strukturni motiv u medicinskoj hemiji, pirimidinski prsten omogućava brojne strukturne modifikacije, pri čemu i male promjene u njegovoj strukturi mogu značajno uticati na

biološku aktivnost. Zahvaljujući širokoj zastupljenosti u biomolekulima i izraženom farmakološkom potencijalu, pirimidin i njegovi kondenzovani derivati smatraju se privilegovanim strukturnim motivima.¹⁴² Pirimidini su najzastupljeniji među diazinima jer ulaze u sastav azotnih baza DNK i RNK: timina, citozina i uracila. Osnovna struktura pirimidina prisutna je i u barbituratima i vitaminu B1.¹⁴³

Pirimidinski derivati zauzimaju značajno mjesto u razvoju novih terapijskih agenasa i u literaturi su opisana brojna jedinjenja sa pirimidinskim jezgrom koja ispoljavaju antibakterijsko, antifungalno, antivirusno, antiinflamatorno, antihipertenzivno, antidijabetičko, antitumorsko djelovanje, kao i aktivnost na centralni nervni sistem i kalcijumske kanale.¹⁴⁴ Na slici 25 su prikazane strukture nekih od odobrenih lijekova koji u svojoj strukturi sadrže pirimidinski strukturni fragment.^{145,146}

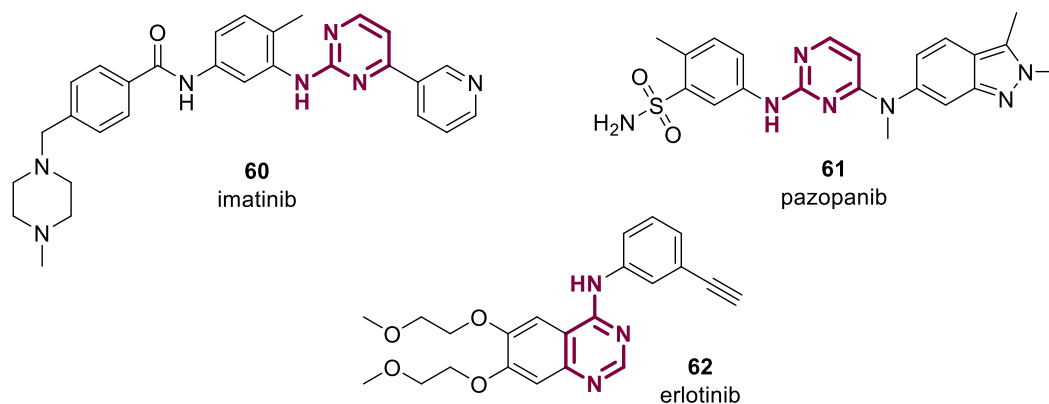


Slika 25. Strukture odobrenih lijekova koji sadrže pirimidinski fragment.

Pirimidinski prsten predstavlja važan strukturni motiv u razvoju lijekova zahvaljujući sposobnosti ostvarivanja interakcija sa različitim biološkim metama putem formiranja vodoničnih veza, kao i u ulozi bioizostera fenilnog i drugih aromatičnih π -sistema, čime se često unapređuju farmakokinetička i farmakodinamička svojstva lijekova.¹⁴⁵

Aminopirimidini predstavljaju heterociklični strukturni fragment koji se sastoji od šestočlanog pirimidinskog prstena supstituisanog amino grupom, pri čemu su izomerni 2-aminopirimidini najviše proučavani.¹⁴⁷ Razvoj lijekova za terapiju malignih oboljenja predstavlja jedan od ključnih fokusa savremene farmaceutske industrije, pri čemu je razumijevanje mehanizma djelovanja malih organskih molekula značajno unaprijedilo pristupe u dizajnu antitumorskih agenasa.

U tom kontekstu, sintetički inhibitori kinaza zasnovani na aminopirimidinskom jezgru zauzimaju značajno mjesto u savremenoj terapiji raka. Među najpoznatijim predstavnicima ove klase (Slika 26) nalaze se imatinib (Glivec®) **60**, pazopanib (Votrient®) **61** i erlotinib (Tarceva®) **62**, koji pripadaju grupi 2- i 4-anilinopirimidinskih lijekova sa širokom primjenom u terapiji različitih tipova malignih ćelija.

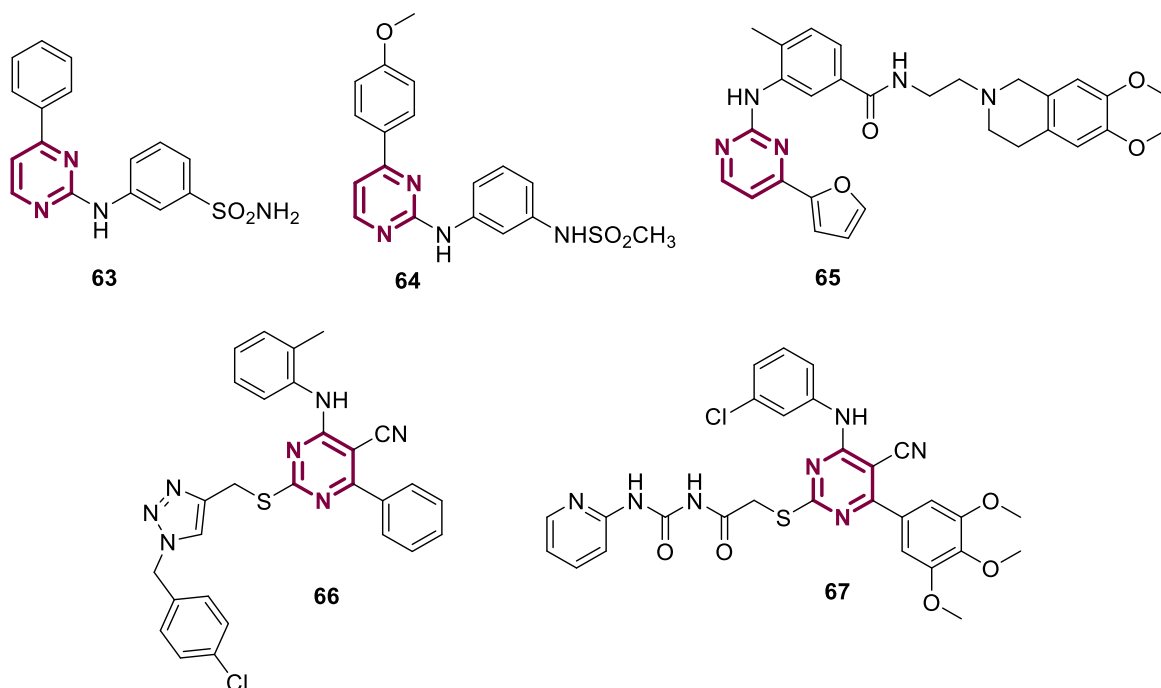


Slika 26. Strukture lijekova koji sadrže 2- ili 4-aminopirimidin.

Na slici 27 prikazane su odabrane strukture jedinjenja iz literature koja sadrže pirimidinski fragment i ispoljavaju antitumorsku aktivnost. Antitumorski potencijal pirimidinskih derivata potvrđen je kod 4-aril-*N*-fenilpirimidin-2-amino jedinjenja, koji su pokazali značajnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća.¹⁴⁸ Među ispitivanim jedinjenjima posebno su se izdvojili derivati **63** i **64** (Slika 27), sa $IC_{50} = 0,2 \mu M$, koji su ispoljili veću aktivnost prema A549 ćelijama u poređenju sa referentnim lijekom doksorubicinom.

Određeni višestruko supstituisani ili kondenzovani derivati pirimidina pokazuju značajan potencijal u prevazilaženju MDR i predstavljaju obećavajuće vodeće strukture za razvoj modulatora višestruke rezistencije posredovanih ABC transporterima.¹⁴⁹ Značaj pirimidinskih derivata u prevazilaženju MDR može se uočiti kod jedinjenje **65**, koje inhibicijom P-gp i BCRP transportera povećava intracelularnu akumulaciju antitumorskih lijekova, poboljšava oralnu bioraspoloživost paklitaksela i povećava osjetljivost rezistentnih tumora na doksorubicin *in vivo*.¹⁵⁰ Pirimidin-1,2,3-triazolski hibridi su pokazali značajnu aktivnost kao modulatori ABCB1 odnosno P-gp -posredovane višestruke rezistencije.¹⁵¹ Na slici 27 prikazano je jedinjenje **66** koje se izdvojilo kao potentni inhibitor P-gp, i koje je pokazalo izraženu sposobnost prevazilaženja rezistencije na paklitaksel u ABCB1-ekspimirajućim SW620/AD3000 ćelijama u poređenju sa verapamilom. Mehanistička ispitivanja pokazala su da jedinjenje **66** povećava intracelularnu akumulaciju i zadržavanje paklitaksela, potvrđujući potencijal pirimidinsko-triazolskog skeleta za razvoj novih modulatora višestruke rezistencije. Daljom optimizacijom ista istraživačka grupa sintetisala je seriju jedinjenja koja sadrže 5-cijano-6-fenilpirimidinsko jezgro pri čemu je jedinjenje **67** pokazalo najizraženiju sposobnost prevazilaženja P-gp posredovane rezistencije na paklitaksel.¹⁵² Mehanistička ispitivanja pokazala su da jedinjenje **67** povećava intracelularno zadržavanje paklitaksela funkcionalnom inhibicijom P-gp, bez uticaja na njegovu ekspresiju i aktivnost enzima CYP3A4. Pored toga, kombinacija jedinjenja **67** i paklitaksela značajno je inhibirala rast P-gp prekomjerno ekspimirajućih tumora *in vivo*, bez uočljivih neželjenih efekata, ukazujući na potencijal pirimidin-acilurea derivata kao modulatora višestruke rezistencije.

Ovi rezultati potvrđuju značaj pirimidinske farmakofore u razvoju novih antitumorskih jedinjenja sa sposobnošću prevazilaženja MDR fenotipa.



Slika 27. Strukture antitumorskih agenasa koji sadrže pirimidin.

2.7.2. Derivati piperazina u medicinskoj hemiji

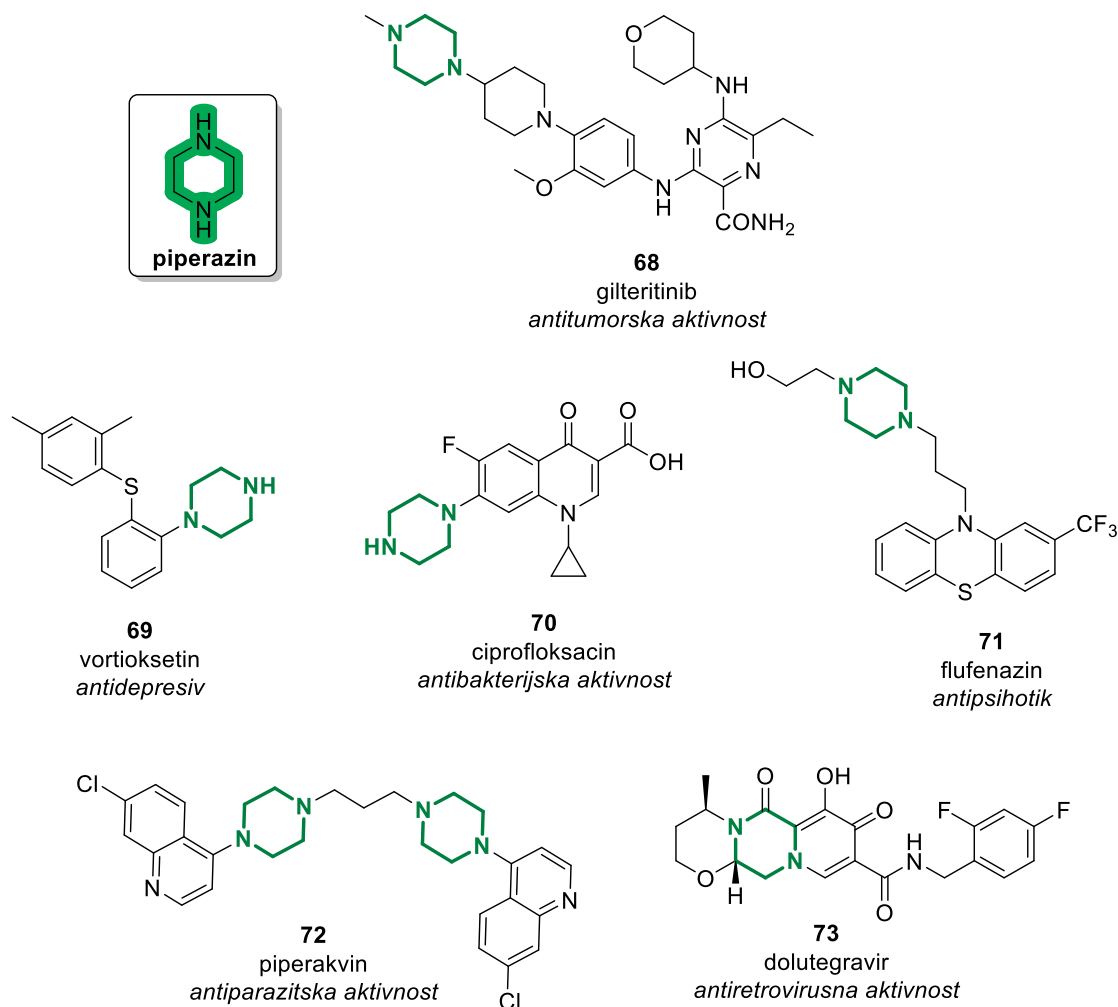
Piperazin, odnosno 1,4-diazacikloheksan, je šestočlano heterociklično jezgro koje sadrži dva azotova atoma u položaju 1 i 4 kao i četiri ugljenikova atoma.¹⁵³ Pokazuje slabo bazna svojstva na 25 °C, sa pK_b vrijednostima od 9,73 i 5,35 kao i dobru rastvorljivost u vodenoj i organskoj sredini. Zahvaljujući kombinaciji strukturne jednostavnosti, hemijske prilagodljivosti i povoljnih farmakoloških osobina, piperazin se smatra privilegovanim strukturnim motivom u razvoju lijekova i često je prisutan u brojnim biološki aktivnim jedinjenjima.^{154,155}

Zbog prisustva dva sekundarna atoma azota u šestočlanom prstenu, piperazin omogućava dobijanje velikog broja simetrično i nesimetrično supstituisanih derivata.¹⁵⁶ Istovremeno, ovakva struktura omogućava piperazinskom prstenu zauzimanje konformacije stolice i lađe, čime se olakšava prilagođavanje aktivnim mjestima enzima, receptorskim džepovima i šuplinama transportera.¹⁵⁴ Pored toga, piperazin može ostvarivati različite nekovalentne interakcije, uključujući vodonične veze, katjon- π interakcije i elektrostatičke interakcije, što doprinosi njegovom farmakološkom potencijalu. Velika polarna površina, sposobnost jonizacije i povoljne ADME osobine čine piperazin značajnim strukturnim motivom u dizajnu lijekova.¹⁵⁷ Zbog toga se piperazinski fragment često koristi kao bazna i hidrofilna grupa za optimizaciju farmakokinetičkih svojstava lijekova, ali i kao spojni fragment u hibridnim molekulima omogućavajući optimalan prostorni raspored farmakofornih cjelina i efikasnije interakcije sa ciljanim biomakromolekulima.

Razvijen je veliki broj efikasnih metoda za sintezu piperazinskih derivata, a najčešće korišćeni sintetski pristupi uključuju Buchwald-Hartwig i Ullmann-Goldberg reakcije kuplovanja, reakcije nukleofilne supstitucije, formiranje amidnih veza, Manihove reakcije, kao i cikloadicione reakcije poput bakrom katalizovane azid-alkin cikloadicije (CuAAC).^{157,158}

Iako piperazin sam po sebi najčešće ne predstavlja citotoksičnu farmakoforu, njegova uloga u optimizaciji vezivanja za biološke mete i poboljšanju farmakokinetičkih osobina je od izuzetnog značaja.¹⁵⁷ Brojna istraživanja pokazala su da piperazinski hibridi mogu djelovati na različite procese uključene u nastanak i progresiju tumora, uključujući regulaciju ćelijske proliferacije, indukciju apoptoze, modulaciju signalnih puteva kinaza, dinamiku mikrotubula, procese replikacije i reparacije DNK, kao i metaboličke puteve tumorskih ćelija.

Lijekovi odobreni od strane FDA sa supstituentima vezanim za jedan ili oba atoma azota piperazinskog prstena prikazani su na slici 28, uključujući manji broj jedinjenja koje karakteriše veća strukturna kompleksnost piperazinskog sistema, pri čemu su supstituenti prisutni na jednom ili više ugljenikovih atoma prstena.^{156,158,159}



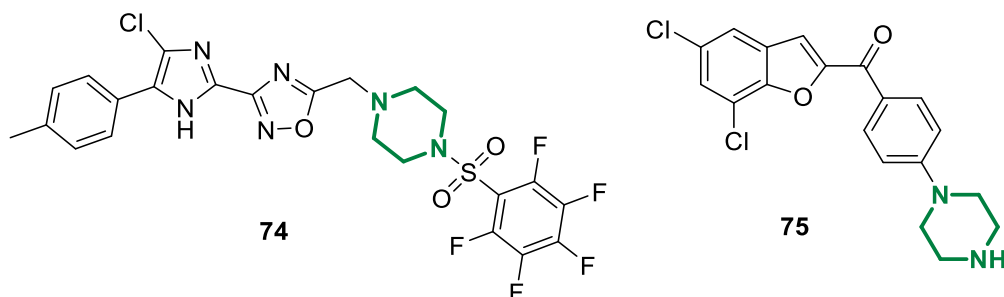
Slika 28. Strukture lijekova koji sadrže piperazinsku farmakoforu.

Jedinjenja koja sadrže piperazinski fragment ispoljavaju širok spektar farmakoloških aktivnosti,¹⁵⁹ uključujući antibakterijsku,¹⁶⁰ antiinflamatornu,¹⁶¹ antihipertenzivnu,¹⁶² antidijabetičku,¹⁶³ antifungalnu,¹⁶⁴ antidepresivnu,¹⁶⁵ antimalarijsku,¹⁶⁶ antipsihotičnu¹⁶⁷ i antitumorsku aktivnost.¹⁶⁸

Veliki broj *N*-funkcionalizovanih derivata piperazina koristi se kao strukturna osnova pesticida i farmaceutskih jedinjenja, uključujući analgetike i druge lijekove, ali i kao važni intermedijeri u organskoj sintezi, u sintezi i modifikaciji peptida, kao i gradivni blokovi u oblasti materijala i polimerizacije.¹⁶⁹ Pored toga, derivati piperazina imaju značajnu primjenu u sintezi obilježavajućih jedinjenja i strukturnih blokova za uvođenje fluorescentnih boja i radionuklida u biološki aktivne molekule. Takođe, piperazinski derivati imaju značajnu ulogu i u koordinacionoj hemiji, gdje zahvaljujući prisustvu donorskih atoma azota mogu djelovati kao ligandi za formiranje različitih metalnih kompleksa.¹⁷⁰ Njihova jednostavna strukturna modifikacija omogućava podešavanje koordinacionih svojstava i načina vezivanja metalnih jona.

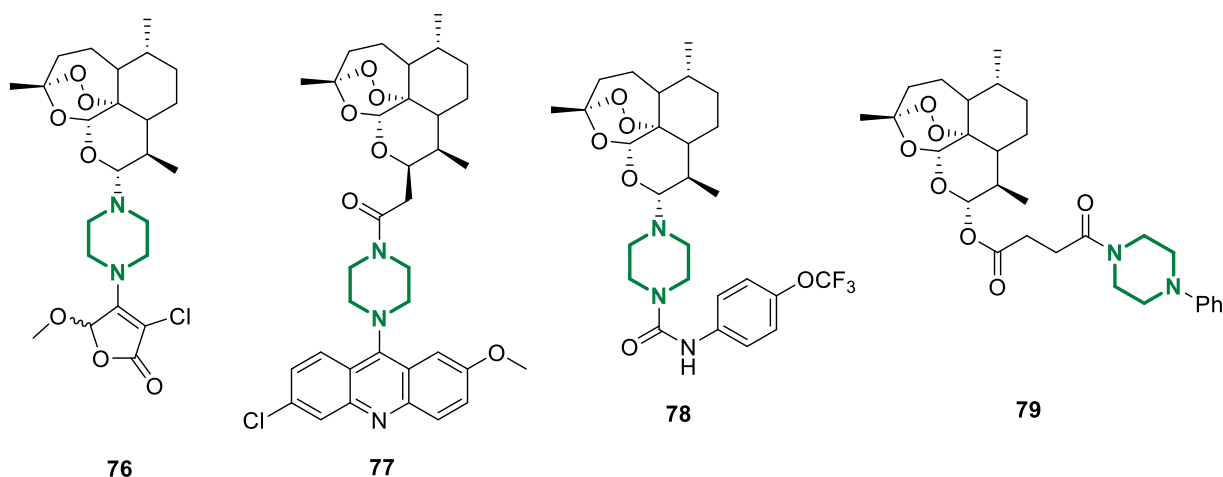
Na slici 29 prikazani su literaturni primjeri jedinjenja koja sadrže piperazin i ispoljavaju antitumorsku aktivnost. Autori su sintetisali seriju hibridnih jedinjenja koja sadrže imidazol, 1,2,4-oksadiazol kao i piperazinski fragment, a njihova antitumorska aktivnost ispitana je na ćelijskim linijama karcinoma dojke, pankreasa, prostate, jetre i kolorektalnog karcinoma.¹⁷¹ Među njima se

posebno izdvojilo jedinjenje **74**, koje je pokazalo izraženu antiproliferativnu aktivnost uz znatno nižu toksičnost prema normalnim ćelijama. Mehanistička ispitivanja pokazala su da jedinjenje **74** indukuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M fazi. U literaturi je prijavljena i sinteza novih potencijalnih antitumorskih agenasa, benzofuran-piperazinskih derivata, od kojih je većina pokazala značajnu inhibiciju proliferacije različitih humanih i murinskih tumorskih ćelijskih linija pri niskim mikromolarnim koncentracijama.¹⁷² Među njima se posebno izdvojilo jedinjenje **75**, koje je indukovalo ćelijsku smrt prvenstveno putem nekroze.



Slika 29. Strukture jedinjenja koja sadrže piperazin i ispoljavaju antitumorsku aktivnost.

U literaturi su opisani brojni primjeri u kojima je artemizinin funkcionalizovan uvođenjem piperazinskog strukturnog motiva, čime je omogućena sinteza hibridnih molekula sa poboljšanim biološkim svojstvima, uključujući izraženu antitumorsku aktivnost. Na slici 30 su prikazani hibridni molekuli (**76** i **77**), kod kojih je derivat artemizininina povezan sa heterocikličnim fragmentom, preko piperazina, kao i molekuli kod kojih je supstituisani piperazinski prsten vezan direktno za artemizinin, odnosno artesunat (**78** i **79**). Hibrid **76** je pokazao izraženu citotoksičnu aktivnost prema humanim hepatokarcinomskim ćelijama SMMC-7721 u submikromolarnim vrijednostima IC_{50} , kao i značajnu aktivnost prema ćelijama karcinoma dojke MCF-7 i istovremeno nisku citotoksičnost prema benignim humanim ćelijama dojke u *in vitro* uslovima.¹⁷³ Takođe, pokazano je da hibridni molekul **77** kod kog je derivat artemizininina povezan piperazinskim fragmentom sa akridinskim jezgrom ispoljava značajno potentniju antitumorsku aktivnost u odnosu na DHA koji je korišćen kao standard, što se ogleda u izraženoj citotoksičnoj aktivnosti prema ćelijskoj liniji HL-60 ($IC_{50} = 0,56 \mu M$), kao i prema ćelijama karcinoma dojke MCF-7 ($IC_{50} = 3,51 \mu M$).¹⁷⁴ Jedinjenje **78** se pokazalo kao potentan antiproliferativni agens prema humanim ćelijama karcinoma dojke MCF-7, pri čemu je daljim analizama mehanizma pokazano da jedinjenje indukuje apoptozu ćelija i efikasno zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi.¹⁷⁵ U literaturi su prijavljeni i derivati artesunata **79** koji sadrže supstituisani piperazinski prsten, čija je antitumorska aktivnost ispitivana na osjetljivoj i rezistentnoj ćelijskoj liniji mišije leukemije, pri čemu je jedinjenje sa fenil supstituentom u položaju 4 piperazinskog prstena pokazalo aktivnost prema obe ćelijske linije, ali bez izražene selektivnosti.¹⁷⁶



Slika 30. Derivati artemizininina koji sadrže piperazinski strukturni motiv.

2.7.3. Derivati triazola u medicinskoj hemiji

Azoli su petočlana aromatična heterociklična jedinjenja koja sadrže najmanje jedan atom azota i dve dvostruke veze.¹⁷⁷ Pored atoma azota, mogu da sadrže i atom kiseonika ili sumpora, a najjednostavniji predstavnik ove grupe jedinjenja je pirol. Triazoli su petočlana heterociklična jedinjenja koja sadrže dva atoma ugljenika i tri azotova atoma sa molekulskom formulom $C_2H_3N_3$.¹⁷⁸ Ova klasa jedinjenja postoji u dve izomerne forme, 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol (Slika 31).

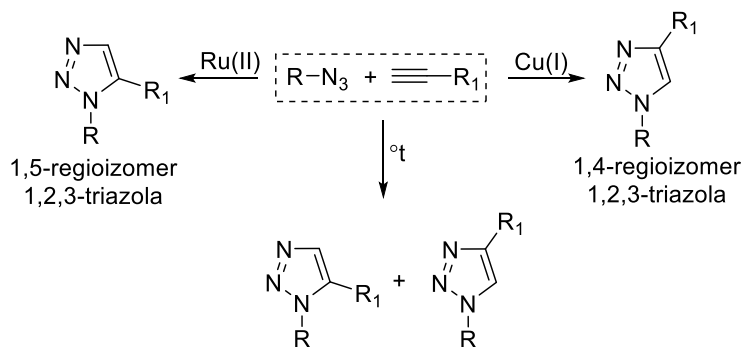


Slika 31. Izomerne forme triazola.

1,2,3-triazol je nezasićeno, bogato π -elektronima, heterociklično jedinjenje kod kog su 6π -elektroni delokalizovani kroz prsten što mu daje aromatični karakter.¹⁷⁹ Atomi azota i ugljenika su sp^2 hibridizovani, pri čemu jedan azotov atom pirolskog, a ostala dva piridinskog tipa. S obzirom da su 1,2,3-triazoli stabilni u širokom spektru uslova, uključujući redoks reakcije, kiselinsko-baznu hidrolizu, svjetlost, često se koriste kao prekursori u reakcijama.¹⁸⁰

1,2,3-triazoli su prvi put sintetisani 1960. godine reakcijom Huizgenove 1,3-dipolarne cikloadicije, polazeći od azida i alkina pod termalnim uslovima, pri čemu je dobijena smjesa 1,4- i 1,5- disupstituisanih triazola.¹⁸¹ Međutim, ovaj pristup je imao ograničenja zbog potrebe za povišenim temperaturama, dugim reakcionim vremenom, kao i zbog niskih prinosa, izostanka selektivnosti i poteškoće prilikom hromatografskog razdvajanja 1,4- i 1,5- regioizomera.¹⁸² Primjena klik (engl. *click*) hemije za sintezu triazola, posebno u oblasti medicinske hemije, je privukla veliku pažnju, a naročito nakon otkrića Sharplessa, Meldala i kolega i razvoja visoko regioselektivne metodologije za sintezu triazola.¹⁸³ Nobelova nagrada 2022. godine, za razvoj klik hemije i bioortogonalne hemije dodijeljena je Sharplessu, Meldalu i Carolyn Bertozzi.¹⁸⁴

Imajući u vidu da je u prirodi teško formiranje petočlanog prstena sa tri vezana atoma azota, efikasna sinteza triazola i njegovih derivata je od velikog značaja.¹⁸⁵ Bakar(I)-katalizovana azid-alkin reakcija cikloadicije (CuAAC) omogućava selektivno dobijanje 1,4-disupstituisanih derivata 1,2,3-triazola na sobnoj temperaturi u vodenom rastvoru, dok se reakcijom katalizovanom rutenijuma dobijaju regioizomerni 1,5-disupstituisani 1,2,3-triazoli kao glavni proizvod (Slika 32).¹⁸⁶

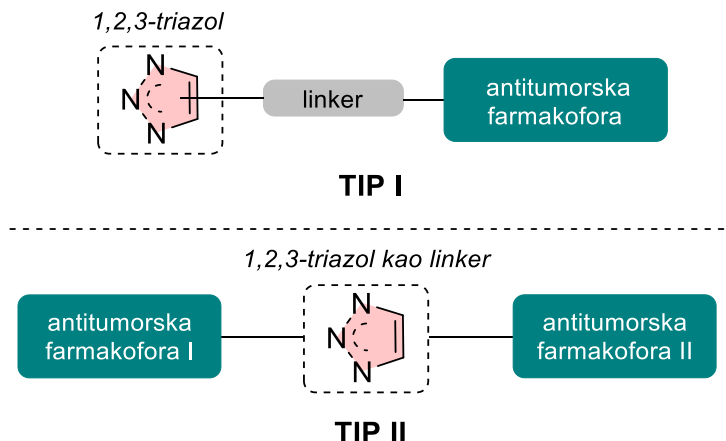


Slika 32. Sinteza 1,4- i 1,5-disupstituisanih 1,2,3-triazola.

S obzirom da hibridna jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže dve ili više različitih farmakofora mogu posjedovati višestruke mehanizme djelovanja, hibridizacija 1,2,3-triazolnog strukturnog motiva sa drugim antitumorskim farmakoforima ima potencijal da obezbijedi nove kandidate za lijekove sa niskom toksičnošću i visokom efikasnošću.¹⁸⁷

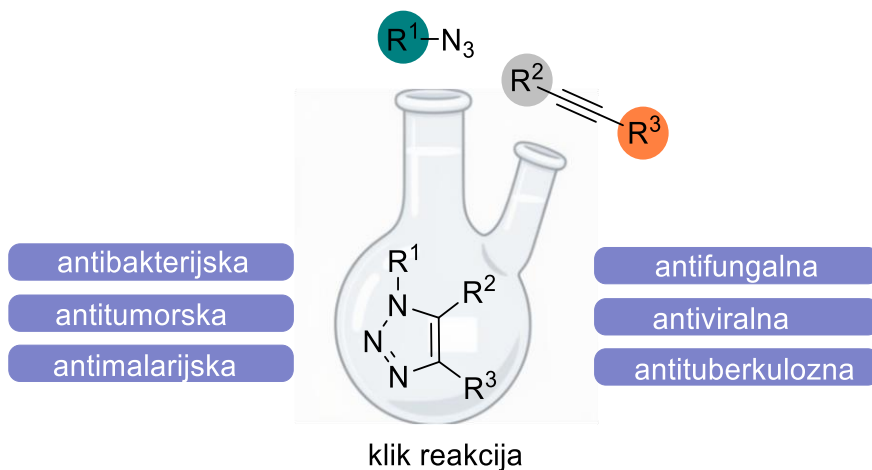
Razlikuju se dva tipa hibridnih molekula koji sadrže 1,2,3-triazolni strukturni motiv (Slika 33):

- 1) jedinjenja u kojima je 1,2,3-triazol pomoću različitih linkera povezan sa nekom drugom antitumorskom farmakoformom;
- 2) jedinjenja u kojima se 1,2,3-triazol ponaša kao linker koji povezuje dve antitumorske farmakofore.



Slika 33. Dva glavna tipa hibridnih molekula koji sadrže 1,2,3-triazol.

1,2,3-triazoli imaju sposobnost da formiraju različite nekovalentne interakcije kao što su hidrofobne interakcije, vodonične veze, Van der Waals sile, i dipol-dipol veze sa različitim enzimima, proteinima i receptorima,¹⁸⁸ tako da derivati 1,2,3-triazola posjeduju širok spektar obećavajuće biološke aktivnosti kao što je: antibakterijska,¹⁸⁹ antimalarijska,¹⁹⁰ antitumorska,¹⁹¹ antifungalna,¹⁹² antiviralna,¹⁹³ antituberkulozna.¹⁹⁴



Slika 34. Biološka aktivnost derivata 1,2,3-triazola.

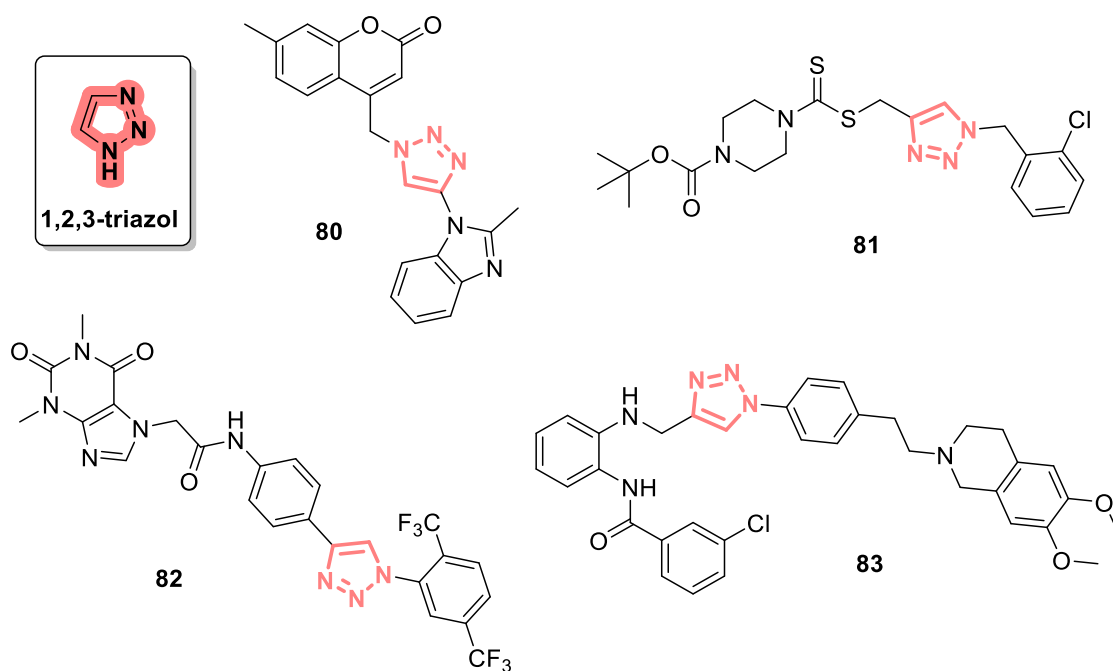
1,2,3-triazoli imaju potencijal da inhibiraju proliferaciju ćelija raka, zaustave ćelijski ciklus i indukuju apoptozu, i pokazuju obećavajuće *in vitro*, kao i *in vivo* aktivnosti na senzitivnim i rezistentnim ćelijskim linijama.¹⁹⁵ Derivati 1,2,3-triazola mogu imati višestruke mehanizme djelovanja na ćelije raka što predstavlja važan izvor za razvoj novih antitumorskih jedinjenja.

Primjena bioizosterne supstitucije je široko korišćena tehnika u modifikaciji aktivnih molekula, a triazoli, koji su osnovni gradivni blokovi u različitim bioaktivnim jedinjenjima, spadaju među najrasprostranjenije bioizostere.¹⁹⁶ U stvari, njihove strukturne karakteristike, kao što su polarnost, sposobnost da djeluju i kao donori vodoničnih veza i kao akceptori, omogućavaju im da imitiraju karakteristike različitih funkcionalnih grupa, uz dodatnu prednost izražene stabilnosti u

hidrolitičkim, oksidativnim i reduktivnim uslovima, što opravdava njihovu široku upotrebu kao bioizostera u sintezi novih biološki aktivnih molekula. Koriste se kao izostera amida, karboksilne kiseline, estra, kao i nekih heterocikličnih petočlanih prstenova koji sadrže azot (imidazol, pirazol, oksazol).¹⁹⁷

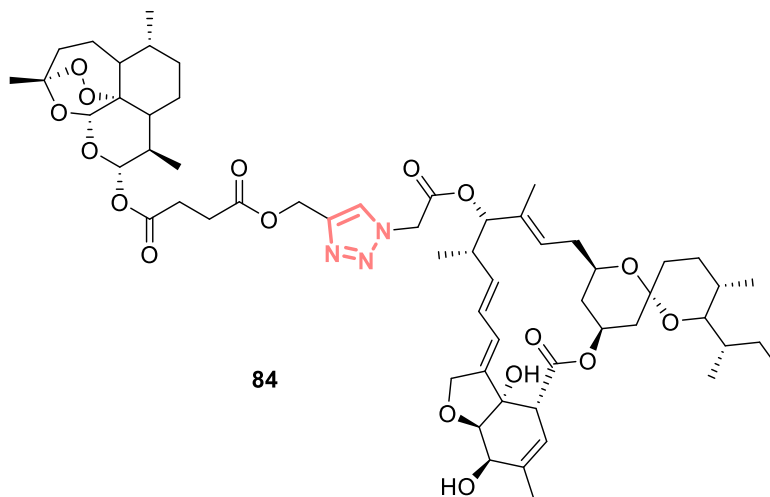
Na slici 35 prikazane su odabrane strukture jedinjenja iz literature koja sadrže triazolski fragment i ispoljavaju antitumorsku aktivnost. Među sintetisanim kumarinsko-triazolskim derivatima posebno se izdvojio 7-metilkumarin-1,2,3-triazol-2-metilbenzimidazolski hibrid **80**, koji je pokazao izraženu citotoksičnost prema ćelijama hepatocelularnog karcinoma u submikromolarnom opsegu koncentracija.¹⁹⁸ Pored izražene citotoksičnosti, jedinjenje je ispoljilo i visoku selektivnost, dok su mehanistička ispitivanja ukazala na indukciju apoptoze kao dominantan mehanizam ćelijske smrti. 1,2,3-triazol-ditiokarbamatski derivati su testirani na četiri različite humane tumorske ćelijske linije pri čemu se jedinjenje **81** izdvojilo sa IC₅₀ vrijednostima u submikromolarnom do mikromolarnom opsegu.¹⁹⁹ Ovo jedinjenje je pokazalo potentniju aktivnost na svim ispitivanim ćelijskim linijama u poređenju sa 5-fluoruracilom, poznatim antitumorskim lijekom koji je korišćen kao pozitivna kontrola.

U cilju razvoja novih potencijalnih antitumorskih agenasa, Yuan i Li su prijavili sintezu derivata teofilina koji sadrže 1,2,3-triazolski strukturni fragment.²⁰⁰ Jedinjenje **82** je pokazalo izraženu antiproliferativnu aktivnost prema različitim ćelijskim linijama, pri čemu su ćelije nesitnoćelijskog karcinoma pluća, H460 i A549, bile najosjetljivije. Mehanistička ispitivanja pokazala su da hibrid **82** indukuje apoptozu, uz nisku toksičnost prema normalnim ćelijama. Ispitivanje antitumorske aktivnosti serije aromatičnih amida koji sadrže 1,2,3-triazolsko jezgro dovelo je do identifikacije jedinjenja **83** kao potentnog modulatora višestruke rezistencije posredovane P-glikoproteinom.²⁰¹ Ovo jedinjenje pokazalo je visoku aktivnost i selektivnost prema tumorskim ćelijama, uz sposobnost povećanja osjetljivosti rezistentnih K562/A02 ćelija na doksorubicin i druge P-gp supstrate. Mehanistička ispitivanja pokazala su da jedinjenje **83** povećava intracelularnu akumulaciju doksorubicina i Rho123 bez uticaja na aktivnost enzima CYP3A4.



Slika 35. Strukture jedinjenja koja sadrže 1,2,3-triazol i ispoljavaju antitumorsku aktivnost.

U nastavku je opisana biološka aktivnost biokonjugata **84** koji u svojoj strukturi sadrži derivat ivermektina, 16-članog makrocikličnog laktona sa izraženom antiparazitskom aktivnošću, i artesunat.²⁰² Za otkriće ivermektina, kao i artemizinin, 2015. godine dodijeljena je Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu, čime je potvrđen njihov izuzetan značaj u terapiji protiv parazita. Biokonjugat **84** artesunata i fragmenta ivermektina, u kojem su ove dvije farmakoforne cjeline povezane 1,2,3-triazolskim prstenom, pokazao je izraženu citotoksičnu aktivnost prema humanoj ćelijskoj liniji adenokarcinoma pluća A549 u niskom mikromolarnom opsegu koncentracija. Ovo jedinjenje se posebno izdvojilo zahvaljujući značajno većoj aktivnosti u odnosu na polazna jedinjenja, odsustvu citotoksičnosti prema zdravim ćelijama i visokim indeksom selektivnosti.



Slika 36. Derivat artesunata **84** koji sadrži triazolski strukturni fragment.

3. NAŠI RADOVI

U okviru ove doktorske disertacije opisana je sinteza novih derivata pirimidina i artesunata, semisintetskog derivata prirodnog proizvoda artemizina, kao i njihove antitumorske aktivnosti. Antitumorska aktivnost određena je na ćelijskim linijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća i glioblastoma. U svrhu ispitivanja potencijala za modulaciju aktivnosti P-glikoproteina i određivanja kolateralne senzitivnosti sintetisanih derivata, korišćen je model senzitivnih ćelijskih linija (NCI-H460 i U87), kao i višestruko rezistentnih ćelijskih linija sa prekomjernom ekspresijom P-glikoproteina (NCI-H460/R i U87-TxR).

Iako je artesunat primarno poznat kao najefikasniji antimalarik, preporučen od strane Svjetske zdravstvene organizacije, savremena istraživanja pokazuju da, osim antimalarijske aktivnosti, ovo jedinjenje pokazuje i širok spektar antitumorske aktivnosti kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima.²⁰³ Zbog povoljnih farmakokinetičkih osobina, artesunat predstavlja dobru osnovu za dalje strukturne modifikacije i ispitivanje antitumorske aktivnosti s ciljem prevazilaženja rezistencije na lijekove.

Premda mehanizam antitumorske aktivnosti artemizina nije u potpunosti razjašnjen, poznato je da je endoperoksidni strukturni motiv, odnosno 1,2,4-trioksanski fragment, ključan za ispoljavanje njegove biološke aktivnosti zbog čega se izmjene dominantno vrše na ugljenikovom atomu u položaju C-10.²⁰⁴ Imajući ovo u vidu, sve strukturne transformacije izvedene su pod uslovima koji omogućavaju očuvanje endoperoksidnog mosta.

Aminopirimidini, a naročito 2-aminopirimidini, predstavljaju važan heterociklični motiv u medicinskoj hemiji, prisutan u brojnim biološki aktivnim jedinjenjima.¹⁴⁷ Značaj ovih malih organskih molekula se ogleda u širokoj primjeni u razvoju antitumorskih lijekova, uključujući i klinički odobrene lijekove koji se koriste za liječenje nesitnoćelijskog karcinoma pluća.

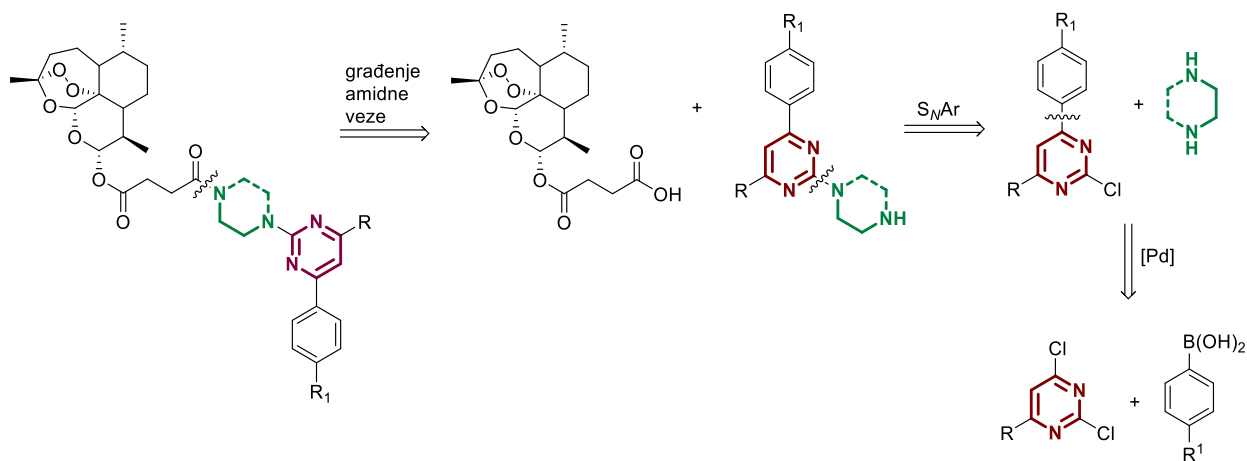
U okviru istraživanja koja su dio ove doktorske disertacije, sintetisana je i testirana serija pirimidinskih derivata, jedinjenja male molekulske mase kod kojih je pirimidinsko jezgro vezano za etilendiaminski ili piperazinski strukturni motiv, u cilju identifikacije jedinjenja koja inhibiraju aktivnost P-gp.²⁰⁵ Daljom derivatizacijom, odnosno, vezivanjem prethodno sintetisanih pirimidinskih jedinjenja za artesunat, omogućena je sinteza hibridnih molekula koji pokazuju poboljšanu antitumorsku aktivnost.

U nastavku istraživanja, sintetisana su jedinjenja koja pored artesunata i pirimidina, sadrže još jedan privilegovani strukturni motiv, 1,2,3-triazol. Ova jedinjenja pokazuju veću citotoksičnost na višestruko rezistentnim ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460/R u odnosu na senzitivne ćelije NCI-H460.²⁰⁶ Takođe, ispitano je i dejstvo sintetisanih derivata prema ćelijskim linijama humanog glioblastoma U87 i U87-TxR u *in vitro* uslovima.

Određivanje antitumorske aktivnosti jedinjenja sintetisanih u okviru ove doktorske disertacije urađeno je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, u saradnji sa istraživačkom grupom dr Milice Pešić, naučnog savjetnika.

3.1. Sinteza derivata artesunata sa etilendiaminskim i piperazinskim linkerom

U okviru ove doktorske disertacije razvijena je efikasna sinteza novih hibridnih derivata artesunata sa ciljem dobijanja jedinjenja unaprijeđene antitumorske aktivnosti, selektivnosti i potencijala za prevazilaženje višestruke rezistencije u odnosu na artemizinin i artesunat. Ovi hibridni molekuli dizajnirani su povezivanjem dva biološki aktivna strukturna motiva, artesunata i pirimidinskih derivata. Na slici 37 prikazan je retrosintetički pristup koji je primjenjen u toku osmišljavanja sinteze novih hibridnih molekula. Pirimidinski derivati dobijeni reakcijom Suzuki-Miyaura ukrštenog kuplovanja su dalje derivatizovani reakcijom nukleofilne aromatične supstitucije sa odgovarajućim *N*-Boc zaštićenim aminima. Građenjem amidne veze između artesunata i pirimidinskih derivata uspješno je ostvarena sinteza novih hibridnih molekula.



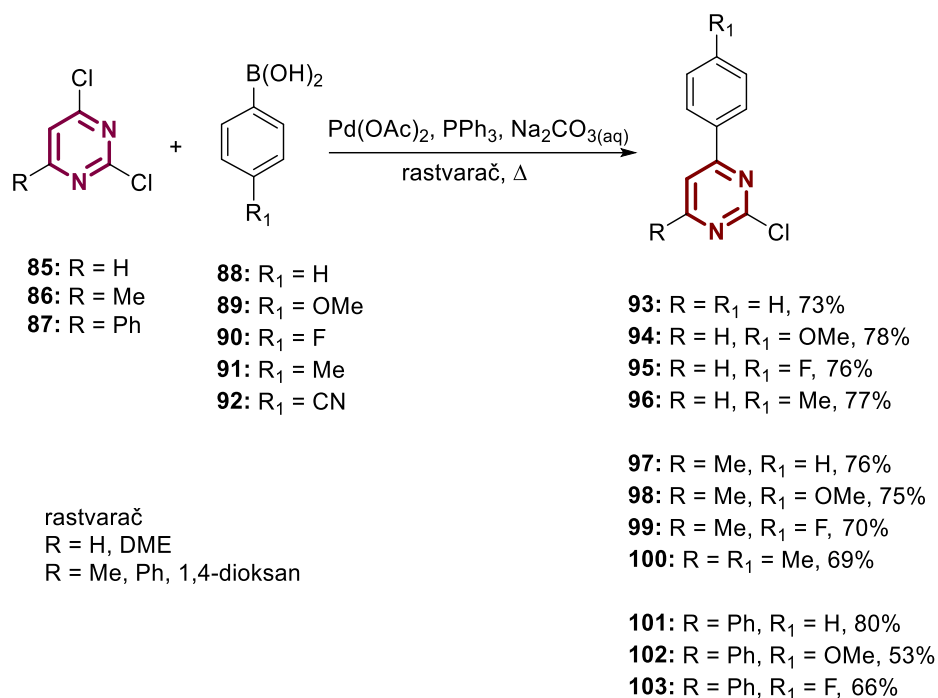
Slika 37. Retrosintetički pristup u sintezi novih hibridnih molekula.

U literaturi postoji veliki broj metoda za dobijanje pirimidinskih jedinjenja, pri čemu je ciklokondenzacija derivata guanidina, amidina ili tiouree s jedne strane, i 1,3-dikarbonilnih jedinjenja s druge, jedna od glavnih metoda za sintezu osnovnog pirimidinskog jezgra.²⁰⁷ Na ovaj način, sintetisano je i polazno jedinjenje **87** (Shema 1), prema proceduri prethodno opisanoj u literaturi.²⁰⁸

Polihalogenovani pirimidini predstavljaju značajne supstrate u reakcijama ukrštenog kuplovanja koje su katalizovane kompleksnim jedinjenjima paladijuma.²⁰⁹ Zahvaljujući razlici u reaktivnosti halogenih supstituenata u različitim položajima pirimidinskog prstena, koja je potvrđena primjenom računarskih proračuna, omogućena je regioselektivna funkcionalizacija jezgra. Ovim se omogućava uvođenje različitih supstituenata na definisane položaje prstena čime se otvara prostor za strukturnu modifikaciju i optimizaciju biološki aktivnih molekula.

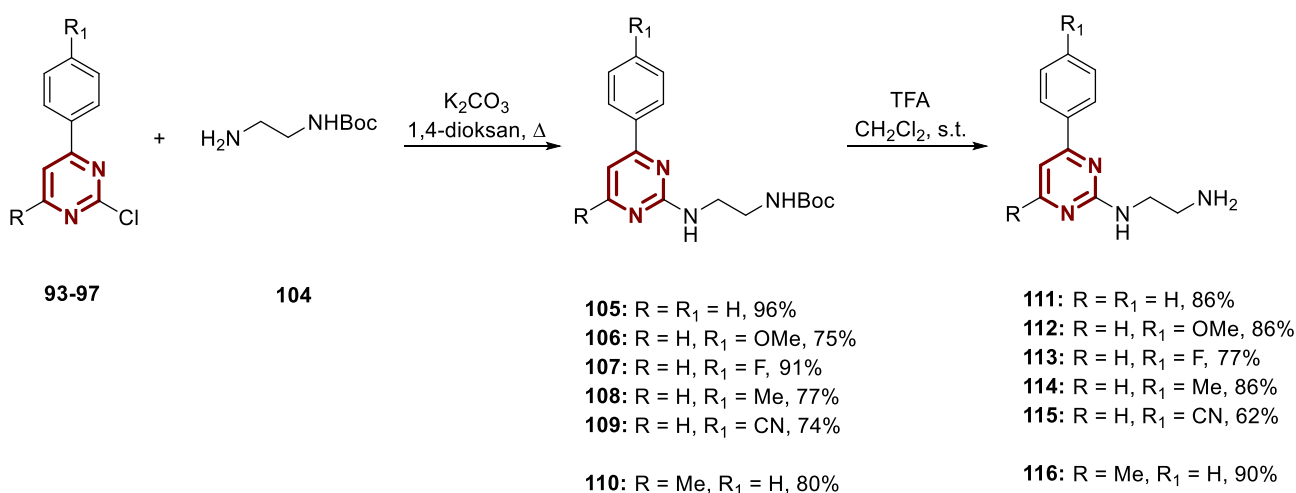
Suzukijeva reakcija kuplovanja pirimidina sa različito supstituisanim boronskim kiselinama je jedna od najčešće primjenjivanih metoda za sintezu supstituisanih derivata pirimidina. Kada se kao polazno jedinjenje u ovoj reakciji koristi 2,4-dihlorpirimidin, uočava se izražena regioselektivnost u C-4 položaju što se objašnjava lakšom oksidativnom adicijom paladijuma na C4-Cl vezu.²¹⁰ U nekim slučajevima, uočena su odstupanja od navedenog, pri čemu do reakcije dolazi u položaju C-2, prvenstveno usljed sternih smetnji izazvanih prisustvom supstituenata u drugim položajima, naročito u položaju C-5.²¹¹

Reakcijom Suzuki–Miyaura ukrštenog kuplovanja različito supstituisanih, 2,4-dihlorpirimidina **85–87** sa odgovarajućim boronskim kiselinama **88–92** sintetisani su željeni derivati, 4-supstituisani 2-hlorpirimidini **93–103** (Shema 1) u dobrim prinosima (53–78%). U sintezi je kao katalizator korišćen paladijum(II)-acetat u prisustvu trifenilfosfina kao liganda i natrijum-karbonata kao baze.²¹² Kako bi se ispitaio uticaj supstituenata na biološku aktivnost krajnjih hibridnih molekula, sintetisana su jedinjenja koja sadrže različite supstituente kako na pirimidinskom jezgru (-H, -Me, -Ph) tako i na benzenovom prstenu (supstituenti sa elektron-donorskim i elektron-akceptorskim svojstvima: -H, -OMe, -F, -Me, -CN).



Shema 1. Reakcija Suzuki–Miyaura ukrštenog kuplovanja između 2,4-dihlorpirimidina **85–87** sa arilboronskim kiselinama **88–92**.

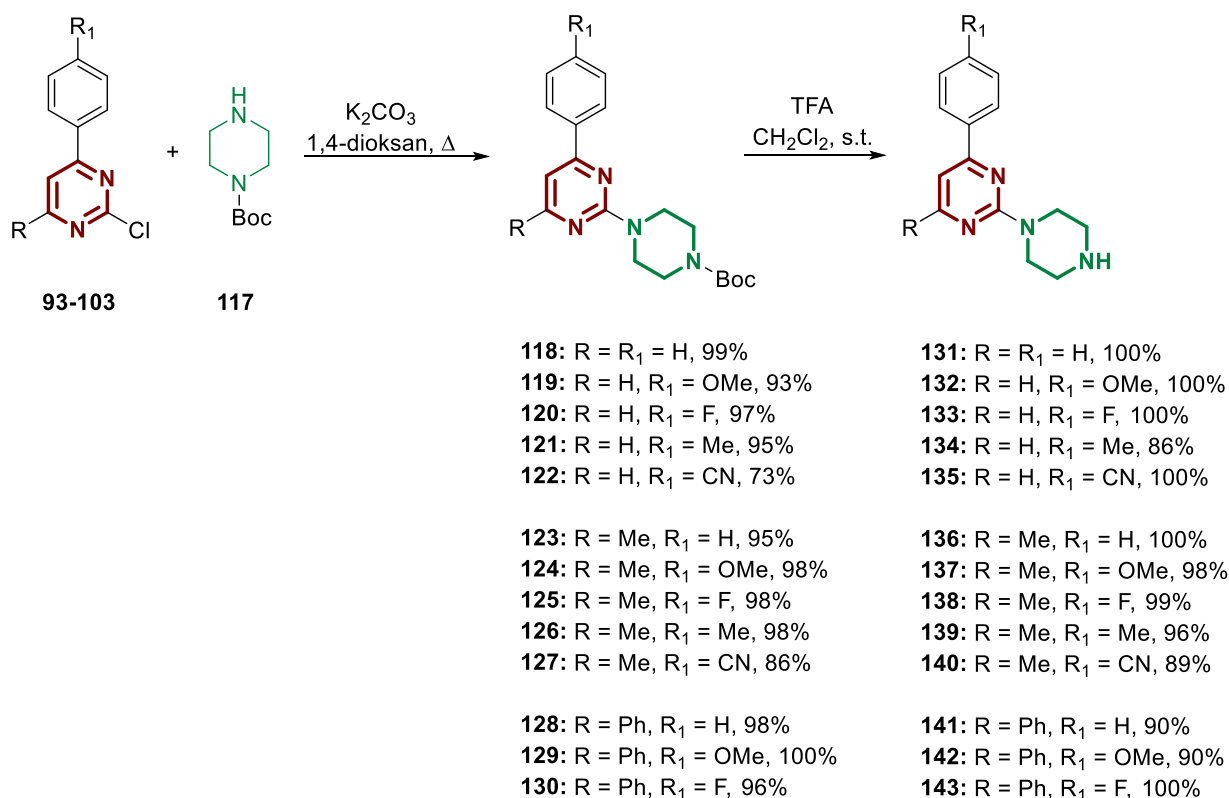
U cilju ispitivanja uticaja strukturnog fragmenta, koji povezuje pirimidinsku farmakoforu sa artesunatom, na ispoljavanje antitumorske aktivnosti, u nastavku istraživanja sintetisani su odgovarajući derivati uvođenjem linearnog etilendiaminskog motiva u položaj 2 pirimidinskog jezgra. Reakcijom nukleofilne aromatične supstitucije pirimidinskih derivata **93–97** sa *N*-Boc-etilendiaminom u prisustvu K_2CO_3 kao baze u 1,4-dioksanu kao rastvaraču dobijena su jedinjenja **105–110** (Shema 2) u dobrim prinosima (74–96%). Nakon reakcije deprotekcije, u prisustvu trifluorsirćetne kiseline u dihlormetanu kao rastvaraču, na sobnoj temperaturi dobijeni su pirimidinski prekursori **111–116** u zadovoljavajućim prinosima.



Shema 2. Sinteza pirimidinskih derivata sa etilendiaminom **111–116**.

Imajući u vidu zastupljenost, kao i farmakološki značaj piperazinskog prstena u medicinskoj hemiji koji je opisan u uvodnom dijelu ove doktorske disertacije, u nastavku istraživanja izvršena je transformacija polaznih pirimidinskih derivata **93–103** u odgovarajuće amino derivate **118–130** reakcijom nukleofilne aromatične supstitucije. Na ovaj način uspješno su sintetisani derivati koji u svojoj strukturi sadrže ciklični, strukturno rigidni piperazinski motiv, a nakon reakcije uklanjanja

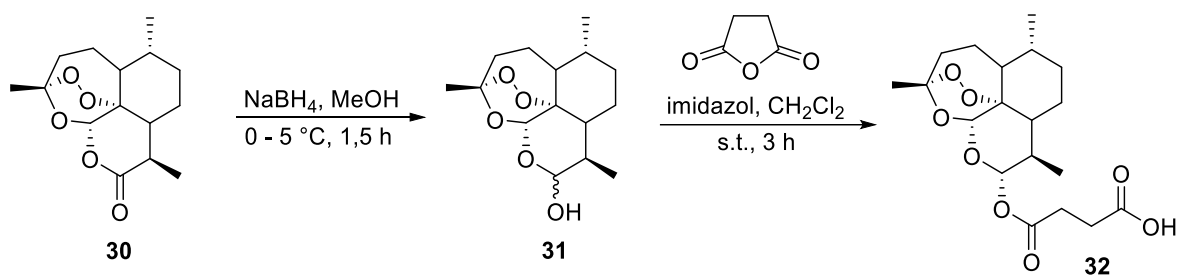
zaštitne Boc-grupe, pod odgovarajućim uslovima, dobijena su jedinjenja **131–143** (Shema 3) u visokim prinosima (86–100%) i zadovoljavajućoj čistoći.



Shema 3. Sinteza pirimidinskih derivata sa piperazinom **131–143**.

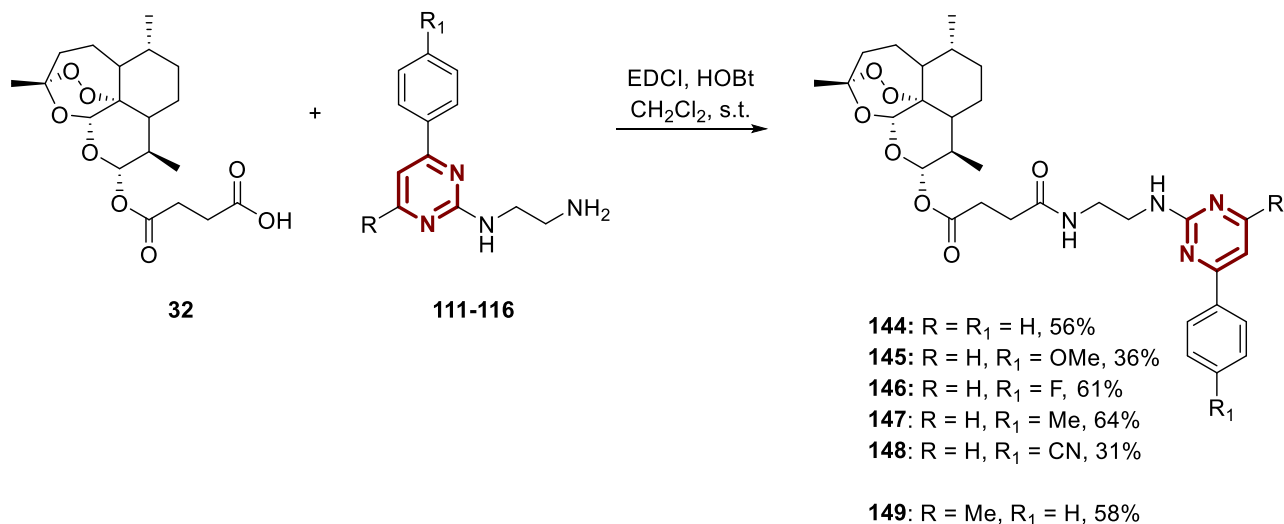
Posljednji korak u sintezi željenih hibridnih molekula predstavljao je formiranje amidne veze. Ova transformacija spada među najčešće primjenjivane reakcije u medicinskoj hemiji zahvaljujući svojoj jednostavnosti, visokoj selektivnosti, dobrim prinosima i stabilnosti nastalih amidnih proizvoda.^{213,214} Amidna veza, široko je prisutna u mnogim organskim molekulima i biomolekulima, kao što su proteini i peptidi. Velika stabilnost amidnih veza pripisuje se njihovoj sposobnosti da formiraju rezonantnu strukturu, koja C(O)–N vezi daje karakter dvostruke veze.²¹⁵ Amidne veze nisu ograničene samo na biološke sisteme, već su prisutne i u velikom broju drugih molekula, uključujući i neke od najvažnijih lijekova na tržištu, kao što su lidokain, paracetamol, penicilin i hloramfenikol.²¹⁶

Na shemi 4 prikazana je sinteza artesunata **32**, polazeći iz artemizina **30**. U prvom koraku izvršena je redukcija karbonilne grupe sa NaBH₄ u metanolu kao rastvaraču, a zatim je dobijeni dihidroartemizinin **31** podvrgnut dalje reakciji sa anhidridom ćilibarne kiseline u prisustvu imidazola i u dihlormetanu kao rastvaraču na sobnoj temperaturi dajući artesunatnu kiselinu, odnosno artesunat **32**.

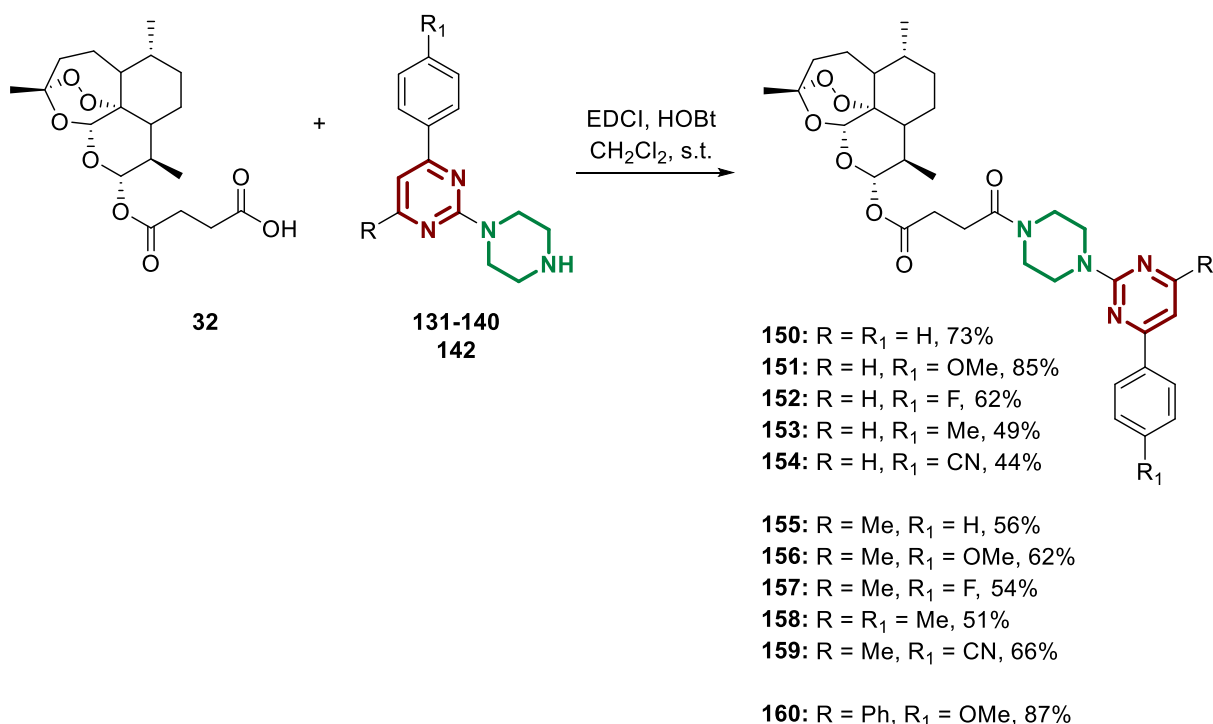


Shema 4. Sinteza artesunata **32**.

Dizajn i sinteza novih hibridnih molekula zasnovani su na literaturnim podacima koji su predstavljeni u okviru ove doktorske disertacije, a koji ukazuju na značaj odabranih strukturnih motiva i koji su poslužili kao polazna tačka za dalju modifikaciju pirimidinskog jezgra kao i artemizinina, odnosno artesunata. Formiranje amidne veze između artesunata **32** i pirimidinskih derivata koji sadrže etilendiaminski, **111–116**, (Shema 5), odnosno piperazinski, **131–140** i **142**, fragment (Shema 6), uz primjenu reagenasa za aktivaciju karboksilne kiseline, EDCI i HOBt, omogućilo je sintezu krajnjih hibridnih molekula koji u svojoj strukturi objedinjuju dve farmakofore.²¹⁷ Reakcija je izvođena na sobnoj temperaturi pri čemu su željeni derivati artesunata dobijeni u umjereno dobrim prinosima (Sheme 5 i 6).



Shema 5. Sinteza hibrida artesunata i pirimidina povezanih etilendiaminskim mostom.

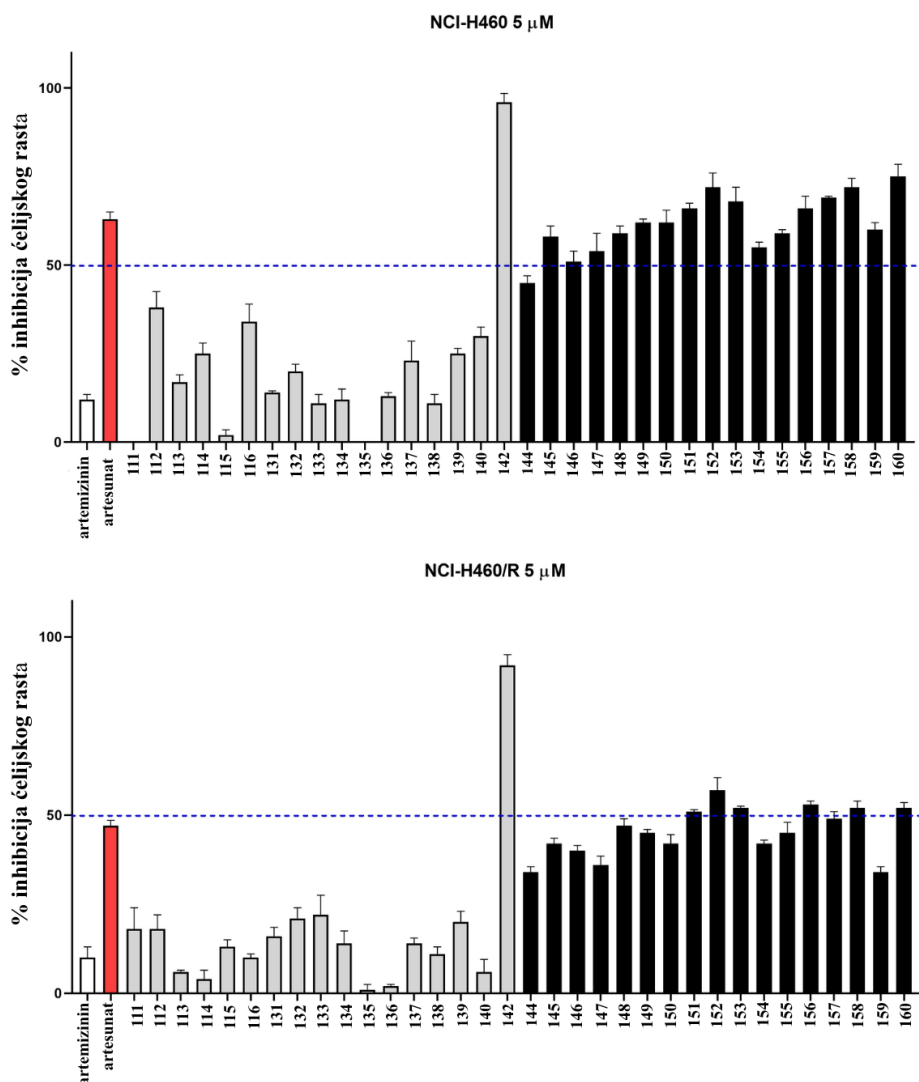


Shema 6. Sinteza hibrida artesunata i pirimidina povezanih piperazinskim mostom.

3.2. Određivanje antitumorske aktivnosti pirimidinskih derivata i hibridnih molekula artesunata

Preliminarno ispitivanje citotoksičnosti derivata pirimidina **111–116**, **131–140**, **142**, kao i hibridnih jedinjenja sa artesunatom **144–149** i **150–160** sprovedeno je na dve ćelijske linije nesitnoćelijskog karcinoma pluća i to na senzitivnoj NCI-H460 i rezistentnoj NCI-H460/R ćelijskoj liniji primjenom dve koncentracije, 5 μ M i 30 μ M (Slika 38 i Slika P8, redom). NCI-H460/R je rezistentna ćelijska linija humanog karcinoma pluća dobijena iz NCI-H460 ćelija kontinuiranim tretmanom rastućim koncentracijama doksorubicina (DOX).²¹⁸ Pored rezistencije na doksorubicin, ova ćelijska linija pokazuje i rezistenciju na druge citostatike (paklitaksel, etoposid i vinblastin) i odlikuje se MDR fenotipom.

Inhibicija ćelijskog rasta u prisustvu ispitivanih jedinjenja upoređena je sa efektima artemizina i artesunata (Slika 38 i Slika P8). Za dobijanje ovih rezultata korišćen je kolorimetrijski MTT test koji predstavlja najčešće primjenjivanu *in vitro* metodu za procjenu vijabilnosti ćelija nakon izlaganja tretmanu. Ovaj test se zasniva na sposobnosti živih ćelija da redukuju žuti, u vodi rastvoran, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT) u aktivnim mitohondrijama do ljubičastog, nerastvornog formazana.²¹⁹ Kristali formazana se zatim rastvaraju u odgovarajućem rastvaraču (DMSO) i mjerenjem apsorbance se određuje procenat biološke aktivnosti ispitivanih supstanci u poređenju sa kontrolnim jedinjenjima. Na osnovu ovog ispitivanja pokazano je da hibridna jedinjenja (**144–149** i **150–160**) imaju potentniju antitumorsku aktivnost u poređenju sa derivatima pirimidina (**111–116** i **131–140**) koji stoga nisu korišćeni u detaljnijim biološkim ispitivanjima (sa izuzetkom jedinjenja **142** koje je pokazalo značajnu citotoksičnost) (Slika 38 i Slika P8). Pri tretmanu koncentracijom od 5 μ M, gotovo sva hibridna jedinjenja (sa izuzetkom jedinjenja **144**) dostigla su 50% inhibicije rasta ćelija NCI-H460. Među derivatima pirimidina, izdvojilo se jedinjenje **142** koje je inhibiralo rast ćelija NCI-H460 za više od 50%. Takođe, jedinjenje **142**, u poređenju sa svim ispitivanim jedinjenjima, pokazalo je najveću citotoksičnu aktivnost, dostigavši približno 90% inhibicije rasta ćelija, pri čemu nije uočena razlika u osjetljivosti između ćelijskih linija NCI-H460 i NCI-H460/R. Analiza odnosa strukture i aktivnosti pokazala je da je jedinjenje **142**, koje se od ostalih ispitivanih pirimidinskih derivata razlikuje u prisustvu fenil-supstituenta u položaju 6 pirimidinskog jezgra, jedino ima značajnu biološku aktivnost, što ukazuje na potencijalno važnu ulogu ovog strukturnog motiva. Artemizinin je pokazao slab efekat na obe ćelijske linije, dok je artesunat postigao značajan nivo inhibicije ćelijskog rasta (više od 50% kod NCI-H460 ćelijske linije). Takođe, na slici 38, može se uočiti razlika u osjetljivosti dve ćelijske linije, NCI-H460 i NCI-H460/R, pri čemu je većina ispitivanih jedinjenja pokazala slabiji efekat na rezistentnoj liniji NCI-H460/R.



Slika 38. Preliminarno ispitivanje citotoksičnog dejstva pirimidinskih derivata **111–116**, **131–140**, **142** i hibridnih molekula **144–149** i **150–160**. Artemizinin, artesunat i nova sintetisana jedinjenja su testirana pri koncentraciji od 5 µM na senzitivnim NCI-H460 i rezistentnim NCI-H460/R ćelijama upotrebom MTT testa nakon 72 sata tretmana. Eksperiment je nezavisno ponovljen tri puta. Plava isprekidana linija označava granicu 50% inhibicije rasta ćelija.

3.2.1 Određivanje selektivnosti novosintetisanih derivata prema tumorskim ćelijama

Pirimidinski derivat **142**, kao i sva hibridna jedinjenja (**144–149** i **150–160**), odabrana su za dalja biološka ispitivanja, koja su obuhvatala određivanje IC_{50} vrijednosti, parametra relativne rezistencije i indeksa selektivnosti (Tabela 1). Za derivate pirimidina **111–116** i **131–140**, koji su pokazali manje od 50% inhibicije ćelijskog rasta NCI-H460 ćelija, IC_{50} vrijednosti nisu određivane. Primjenom MTT testa ispitana je, a određivanjem IC_{50} vrijednosti, kvantifikovana, aktivnost odabranih jedinjenja u odgovarajućem opsegu koncentracija na dve tumorske ćelijske linije, NCI-H460 i NCI-H460/R, kao i na MRC-5 ćelijskoj liniji fibroblasta pluća (Tabela 1, Slika P9 i Slika P10). Polovina maksimalne inhibitorne koncentracije, IC_{50} , predstavlja koncentraciju jedinjenja koja izaziva smanjenje u preživljavanju ćelija za 50% u odnosu na kontrolne netretirane ćelije. U tabeli 1 su prikazani rezultati inhibicije ćelijskog rasta u prisustvu hibridnih jedinjenja u *in vitro* uslovima.

Tabela 1. Citotoksičnost, profili rezistencije i selektivnosti artemizininina, artesunata, pirimidinskog derivata **142** i hibridnih molekula **144–149** i **150–160** upoređeni na osnovu IC₅₀ vrijednosti (μM) dobijenih na NCI-H460, NCI-H460/R i MRC-5 ćelijama.

Jedinjenje	NCI-H460	NCI-H460/R ^a	Relativna rezistencija	MRC-5 ^b	Indeks selektivnosti
Artemizinin ^c	202,0 ± 4,710	215,7 ± 2,605	1,07	322,1 ± 5,934	1,59
Artesunat ^d	3,134 ± 0,034	4,131 ± 0,049	1,32	5,757 ± 0,088	1,84
142	2,019 ± 0,050	3,811 ± 0,077	1,90	3,471 ± 0,086	1,72
144	5,571 ± 0,069	16,423 ± 0,229	2,95 ^f	10,295 ± 0,138	1,85
145	5,467 ± 0,074	6,063 ± 0,075	1,09	8,426 ± 0,154	1,54
146	7,120 ± 0,086	13,337 ± 0,130	1,87	10,360 ± 0,159	1,45
147	7,002 ± 0,109	7,745 ± 0,942	1,11	11,182 ± 0,110	1,60
148	5,853 ± 0,073	10,030 ± 0,102	1,71	7,701 ± 0,133	1,32
149	6,319 ± 0,109	8,477 ± 0,124	1,34	9,743 ± 0,086	1,54
150	3,059 ± 0,045	13,936 ± 0,193	4,55 ^f	11,256 ± 0,117	3,68 ^g
151	2,476 ± 0,045	11,768 ± 0,153	4,75 ^f	12,248 ± 0,220	4,95 ^g
152	1,234 ± 0,019	2,892 ± 0,042	2,34 ^f	9,160 ± 0,157	7,42 ^g
153	2,040 ± 0,048	12,501 ± 0,206	6,13 ^f	12,582 ± 0,336	6,17 ^g
154	3,071 ± 0,43	8,185 ± 0,087	2,66 ^f	13,130 ± 0,137	4,27 ^g
155	1,759 ± 0,042	5,422 ± 0,076	3,09 ^f	8,993 ± 0,156	5,11 ^g
156	1,870 ± 0,035	8,361 ± 0,197	4,47 ^f	8,392 ± 0,178	4,48 ^g
157	2,321 ± 0,046	4,312 ± 0,081	1,85	6,859 ± 0,159	2,95 ^g
158	2,219 ± 0,053	4,323 ± 0,101	1,95	7,299 ± 0,195	3,29 ^g
159	3,582 ± 0,057	6,084 ± 0,108	1,70	9,212 ± 0,118	2,57 ^g
160	1,507 ± 0,058	1,661 ± 0,061	1,10	5,517 ± 0,209	3,66 ^g
DOX ^e	61,13 ± 0,52	524,54 ± 8,91	8,58 ^f	588,00 ± 15,85	9,62 ^g

^a rezistentna ćelijska linija NCI-H460/R sa visokom ekspresijom P-gp dobijena je nakon izlaganja NCI-H460 ćelija medijumu sa postepeno rastućim koncentracijama DOX u toku 3 mjeseca;

^b model zdravih (netumorskih) ćelija: humana ćelijska linija fibroplasta pluća (MRC-5);

^c opseg koncentracija za artemizinin: 5, 10, 25, 50 i 100 μM;

^d opseg koncentracija za artesunat, **142** i sve derivate artesunata: 1, 2,5, 5, 10 i 25 μM;

^e opseg koncentracija za DOX: 100, 250, 500, 1000 i 2000 nM;

^f rezistencija: IC₅₀ vrijednost određenog jedinjenja je najmanje dva puta veća kod rezistentnih tumorskih ćelija u poređenju sa IC₅₀ vrijednosti kod odgovarajućih senzitivnih tumorskih ćelija;

^g selektivnost prema tumorskim ćelijama: IC₅₀ vrijednost određenog jedinjenja je najmanje dva puta veća kod normalnih (netumorskih) ćelija u poređenju sa IC₅₀ vrijednosti kod senzitivnih tumorskih ćelija.

Artesunat je pokazao značajan antitumorski potencijal, sa IC₅₀ vrijednostima nižim od 5 μM na obe ćelijske linije (NCI-H460 i NCI-H460/R), za razliku od artemizininina, koji pokazuje značajno slabiji efekat sa IC₅₀ vrijednostima višim od 100 μM. Efekti artemizininina i artesunata nisu bili umanjani u prisustvu MDR fenotipa kod NCI-H460/R ćelija koje su selektovane iz NCI-H460 ćelija kontinuiranom primjenom doksorubicina. Međutim, u literaturi drugi autori su pokazali značajnu rezistenciju na artesunat u doksorubicin-rezistentnim ćelijama leukemije (K562/ADR).²²⁰ Pored toga, artemizinin i artesunat nisu pokazali značajniju selektivnost prema NSCLC ćelijama u odnosu na MRC-5 fibroblaste pluća.

Rezultati prikazani u tabeli 1 ukazuju na najveću osjetljivost ćelija NCI-H460 na derivat pirimidina **142** i hibridna jedinjenja **150–160** sa IC₅₀ vrijednostima manjim od 5 μM, dok su za hibridna jedinjenja **144–149** IC₅₀ vrijednosti bile u opsegu od 5 do 10 μM. Prisustvo MDR fenotipa značajno je uticalo na efikasnost osam hibridnih jedinjenja (**144** i **150–156**), sa vrijednostima relativne rezistencije većim od 2. Značajno je istaći da su sva hibridna jedinjenja sa piperazinskim linkerom (**150–160**) pokazala povoljan profil selektivnosti (Tabela 1), što ukazuje da piperazinska podstruktura predstavlja važan strukturni motiv. Iako je selektivnost jedinjenja **150–160** bila niža u odnosu na

selektivnost postignutu primjenom DOX, ćelije NCI-H460/R pokazale su manji stepen rezistencije na hibridna jedinjenja u poređenju sa DOX (Tabela 1).

3.2.2 Uticaj na aktivnost P-glikoproteina (P-gp)

Rodamin 123 (Rho123) predstavlja fluorescentnu boju koja se lokalizuje u mitohondrijama ćelija. Ova supstanca je supstrat P-glikoproteina, i shodno tome, koristi se kao molekularna proba u ispitivanjima fenotipa višestruke rezistencije na lijekove. Intenzitet fluorescencije rodamina 123 akumuliranog u vijabilnim ćelijama, koji je obrnuto proporcionalan aktivnosti P-gp transportera, određivan je primjenom protočne citometrije. Kako bi se ispitao uticaj pirimidinskog derivata **142**, kao i hibridnih jedinjenja **144–149** i **150–160** na aktivnost P-gp, rezistentne ćelije NCI-H460/R su tretirane istovremeno rastvorom Rho123 i hibridnih derivata artesunata **144–149** i **150–160** (Tabela 2, Slika 39, Tabela P2, Slika P11). Tarikvidar (TQ), treća generacija inhibitora P-gp, korišćen je kao referentna kontrola za inhibiciju P-gp, dok je NCI-H460 linija, takođe, korišćena kao kontrola. Povećanje srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (engl. *mean fluorescence intensity*, MFI), mjenjenog nakon tretmana, ukazuje na smanjenu aktivnost P-gp. Visoka ekspresija i aktivnost P-gp predstavljaju glavne karakteristike MDR fenotipa ćelija NCI-H460/R.²¹⁸

Tabela 2. Interakcija sa P-gp određena testom akumulacije Rho123.

Ćelijska linija/jedinjenje	MFI ^a	FAR ± S.E. ^b
NCI-H460 ^c	340 061	11,57 ± 0,46
NCI-H460/R	29 394	-
Artemizinin	52 361	1,78 ± 0,15
Artesunat ^{INH}	63 674	2,17 ± 0,16
TQ ^d	390 460	13,28 ± 0,58
142 ^{INH}	128 209	4,36 ± 0,21
144	54 489	1,85 ± 0,16
145	46 478	1,58 ± 0,19
146 ^{INH}	67 715	2,30 ± 0,21
147 ^{INH}	91 112	3,10 ± 0,20
148	33 825	1,15 ± 0,13
149	39 075	1,33 ± 0,12
150 ^{SUB}	76 266	2,59 ± 0,19
151 ^{SUB}	143 802	4,89 ± 0,28
152 ^{SUB}	114 129	3,88 ± 0,24
153 ^{SUB}	99 563	3,39 ± 0,20
154	33 757	1,15 ± 0,12
155 ^{SUB}	111 450	3,79 ± 0,22
156 ^{SUB}	132 961	4,52 ± 0,30
157 ^{INH}	109 620	3,73 ± 0,28
158 ^{INH}	147 315	5,01 ± 0,36
159 ^{INH}	147 583	5,02 ± 0,31
160 ^{INH}	83 011	2,82 ± 0,19

^a MFI - izmjereni srednji intenzitet fluorescencije korišćen je za izračunavanje FAR;

^b FAR - odnos fluorescence i aktivnosti izračunat je prema formuli: FAR = MFI tretiranih rezistentnih ćelija / MFI netretiranih rezistentnih ćelija;

^c senzitivna ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 i njena višestruko rezistentna analogna linija NCI-H460/R korišćene u ovom istraživanju;

^d Tarikvidar (TQ) - inhibitor P-gp treće generacije, primjenjen je kao pozitivna kontrola za inhibiciju P-gp;

^{INH} Jedinjenja koja se ponašaju kao inhibitori P-gp, zaobilaze MDR fenotip i inhibiraju aktivnost P-gp (prema MTT testu i rezultatima akumulacije Rho123);

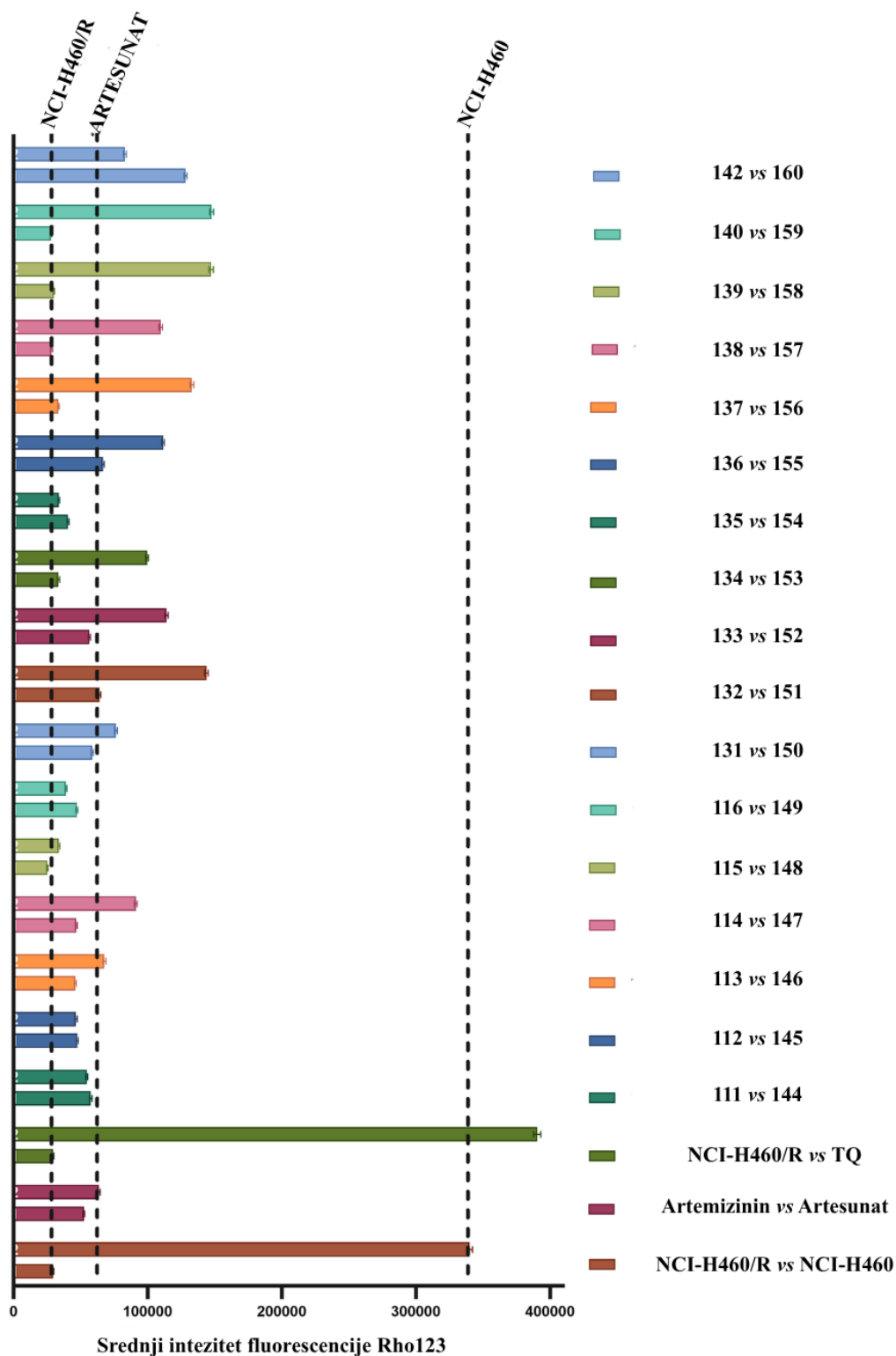
^{SUB} Jedinjenja koja se ponašaju kao supstrati za P-gp čija je IC₅₀ vrijednost značajno viša u rezistentnim ćelijama u poređenju sa senzitivnim (pokazujući profil rezistencije prema MTT testu), ali istovremeno sposobna da povećaju akumulaciju Rho123.

Odnos fluorescentne aktivnosti (engl. *fluorescence activity ratio*, FAR) predstavlja parametar koji se koristi u protočnoj citometriji za kvantifikaciju inhibicije transportera višestruke rezistencije na lijekove, npr. P-gp, i moguće ga je izračunati nakon što je određena MFI vrijednost. Izračunava se kao odnos srednjeg inteziteta fluorescencije rezistentnih ćelija tretiranih ispitivanim jedinjenjima i Rho123 i MFI rezistentnih ćelija tretiranih samo sa Rho123.

Artesunat, primjenjen u koncentraciji od 5 μ M, doveo je do približno dvostrukog povećanja akumulacije Rho123 u ćelijama NCI-H460/R. Pored artesunata, među derivatima pirimidina, samo su jedinjenja **132**, **136** i **142** značajno povećala akumulaciju Rho123. Nasuprot tome, većina hibridnih jedinjenja povećava akumulaciju Rho123 (**146**, **147**, **150–153** i **155–160**). Značajno je istaći da su jedinjenja **142**, **147**, **151–153** i **155–159** ispoljila jači inhibični efekat na funkcije P-gp u poređenju sa artesunatom.

Izbjegavanje ili zaobilazanje mehanizma višestruke rezistencije (MDR) posredovanog aktivnošću P-gp ogleda se u nesmanjenom efektu jedinjenja prema rezistentnim tumorskim ćelijama u odnosu na odgovarajuće senzitivne ćelije, dok se inhibicija P-gp utvrđuje na osnovu povećane akumulacije Rho123 u ćelijama. Rezultati dobijeni MTT testom i testom akumulacije Rho123 ukazali su na postojanje četiri tipa jedinjenja:

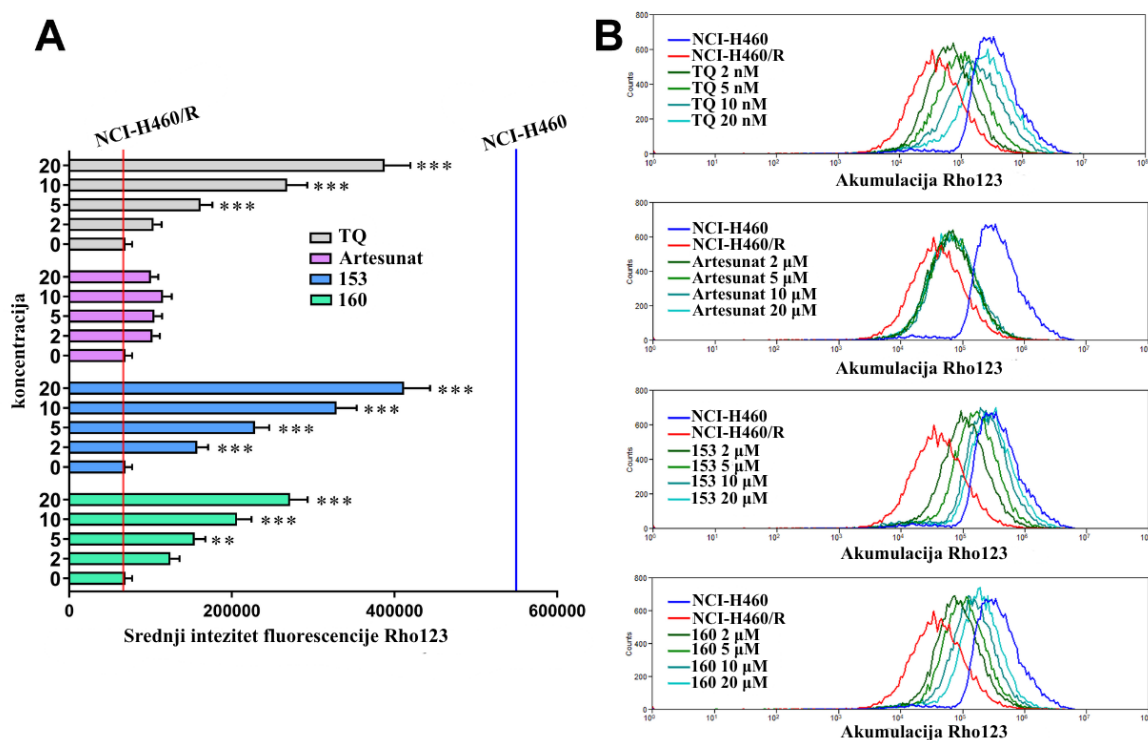
- jedinjenja sposobna da zaobiđu MDR i inhibiraju aktivnost P-gp (artesunat, **142**, **146**, **147** i **157–160**);
- jedinjenja sposobna da zaobiđu MDR, ali bez uticaja na aktivnost P-gp (**145**, **148** i **149**);
- jedinjenja čija je efikasnost umanjena MDR fenotipom, te vjerovatno predstavljaju supstrate P-gp koji mogu kompetitivno inhibirati aktivnost P-gp (**150–153**, **155** i **156**);
- jedinjenja čija je efikasnost umanjena MDR fenotipom te vjerovatno predstavljaju supstrate P-gp, ali ne utiču na aktivnost P-gp (**144** i **154**) (Tabela 2, Tabela P2 i Slika 39).



Slika 39. Uticaj na aktivnost P-glikoproteina pirimidinskih derivata i odgovarajućih hibrida sa artesunatom. Srednji intezitet fluorescencije (MFI) Rho123 određen je 30 minuta nakon inkubacije Rho123 (2 μ M) sa testiranim jedinjenjima (5 μ M). Senzitivne NCI-H460 ćelije, kao i rezistentne NCI-H460/R ćelije tretirane sa 50 nM TQ su korišćene kao pozitivna kontrola za akumulaciju Rho123. Isprekidane linije označavaju nivoe akumulacije Rho123 u netretiranim rezistentnim NCI-H460/R ćelijama, NCI-H460/R ćelijama tretiranim sa artesunatom i u netretiranim NCI-H460 ćelijama. Pirimidinski derivati i odgovarajući hibridni molekuli su predstavljeni istom bojom. Akumulacija Rho123 je određena protočnom citometrijom u zelenom kanalu (emisija na 525 nm) i analizirano je najmanje 10 000 događaja (ćelija) po uzorku.

Na osnovu MTT testa i rezultata akumulacije Rho123, odabrana su dva jedinjenja **153** (potencijalni supstrat P-gp) i **160** (potencijalni inhibitor P-gp) kako bi se uporedio njihov koncentraciono-zavisen efekat na aktivnost P-gp sa artesunatom kao polaznim jedinjenjem i TQ kao poznatim inhibitorom P-gp (Slika 40). Efekat artesunata je bio slabiji u poređenju sa **153**, **160** i TQ (Slika 40A i 40B) i nije pokazao koncentraciono-zavisen efekat. Međutim, efekti jedinjenja **153**, **160** i TQ bili su koncentraciono-zavisni. Jedinjenje **153** je bilo efikasnije u povećanju akumulacije Rho123 u odnosu na TQ (Slika 40A i B). Hibridno jedinjenje **160**, koje je identifikovano kao potencijalni inhibitor za P-gp, sposoban da prevaziđe višestruku rezistenciju na lijekove, pokazao je sličan profil akumulacije Rho123 kao TQ (Slika 40B).

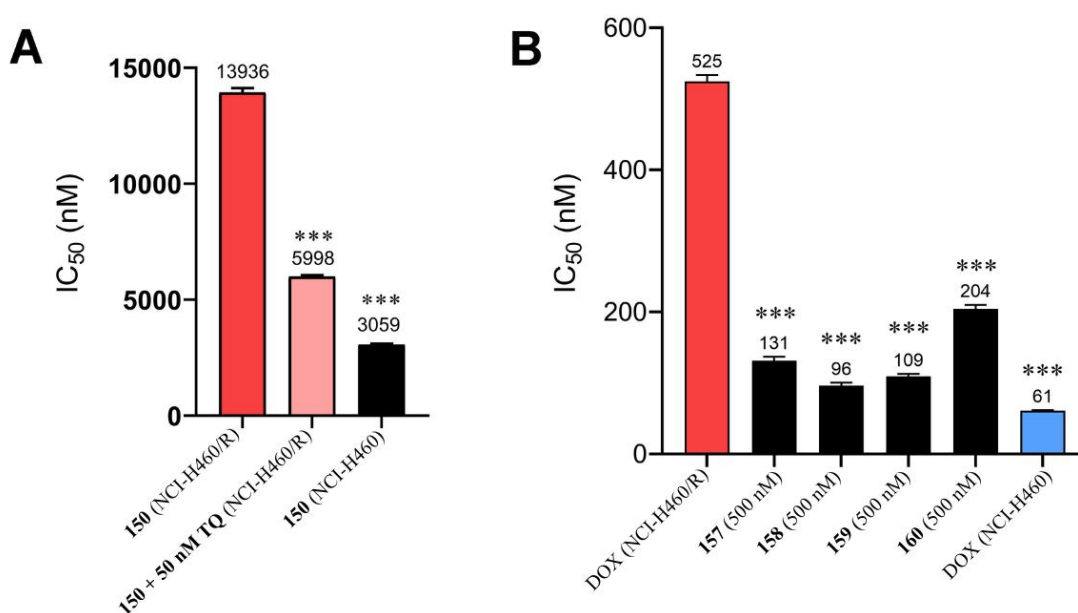
Kako bi se potvrdilo da je dejstvo hibridnih jedinjenja **150–156** povezano sa aktivnošću P-gp, u NCI-H460/R ćelijama ispitana je mogućnost reverzije rezistencije kombinovanom primjenom jedinjenja i 50 nM TQ (Slika P12). Reverzija rezistencije uočena je kod svih testiranih hibrida, osim kod jedinjenja **154**, koje jedino nije pokazalo uticaj na funkciju P-gp (Tabela 2 i Tabela P2). Osjetljivost ostalih jedinjenja **150–153**, **155** i **156**, za koja je pretpostavljeno da su supstrati P-gp, povećana je pri istovremenom tretmanu sa TQ u NCI-H460/R ćelijama. Najizraženija reverzija rezistencije posredovana TQ uočena je kod jedinjenja **150** (Slika 41A), dok su jedinjenja **152** i **155** pokazala najmanju sklonost ka povećanju osjetljivosti.



Slika 40. Ispitivanje koncentraciono-zavisnog efekta TQ, artesunata i dva odabrana jedinjenja **153** i **160** na aktivnost P-gp. A) srednji intezitet fluorescencije (MFI) Rho123 je određen 30 minuta nakon inkubacije Rho123 (2 μM) sa četiri rastuće koncentracije odabranih hibridnih jedinjenja (2, 5, 10 i 20 μM za artesunat, **153** i **160**; 2, 5, 10 i 20 nM za TQ). Senzitivne NCI-H460 ćelije su korišćene kao pozitivna kontrola za akumulaciju Rho123. Crvena linija označava nivo akumulacije Rho123 na netretiranim rezistentnim NCI-H460/R ćelijama, plava linija označava nivo akumulacije Rho123 na netretiranim NCI-H460 ćelijama. B) Odgovarajući profili dobijeni protočnom citometrijom ilustruju koncentraciono-zavisni efekat testiranih jedinjenja. Akumulacija Rho123 je određena protočnom citometrijom u zelenom kanalu (emisioni maksimum na 525 nm) i analizirano je najmanje 20 000 događaja (ćelija) po uzorku. Statistički značajna razlika između tretiranih uzoraka i netretirane (kontrolne) NCI-H460/R je određena primjenom dvofaktorskog ANOVA Bonferroni testa: $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

Vrijednosti relativne rezistencije za jedinjenja **152**, **154** i **155** bile su niže u poređenju sa vrijednostima dobijenim za jedinjenja **150**, **151**, **153** i **156** (Tabela 1), što može objasniti razlike u reverziji rezistencije u prisustvu TQ. Međutim, koncentracija TQ od 50 nM nije bila dovoljna kako bi se postigao maksimalni efekat, niti je u potpunosti obnovila osjetljivost ćelija na hibridna jedinjenja do nivoa zabilježenog u senzitivnim ćelijama NCI-H460 (Slika P12), što ukazuje na to da, pored aktivnosti P-gp, u mehanizmu rezistencije NCI-H460/R ćelija na jedinjenja **150–156** učestvuju i neki drugi faktori.

Da bi se potvrdilo da jedinjenja **157–160** mogu uticati, odnosno smanjiti aktivnost P-gp, ova hibridna jedinjenja su kombinovana sa DOX, koji predstavlja supstrat P-gp. Sva ispitivana jedinjenja pokazala su značajan potencijal da prevaziđu rezistenciju na DOX u ćelijama NCI-H460/R (Slika 41B), kada se primjene u koncentraciji od 500 nM, koja je značajno niža od njihovih IC₅₀ vrijednosti (Tabela 1). Najizraženiji efekat postignut je kod jedinjenja **158** i **159**, koja su pokazala najviše FAR vrijednosti (Tabela 2 i Tabela P2). Zapravo, efikasnost jedinjenja **157–160** u reverziji rezistencije na DOX (Slika 41B) bila je proporcionalna njihovim FAR vrijednostima (Tabela 2 i Tabela P2).



Slika 41. A) Reverzija rezistencije na hibridno jedinjenje **150** primjenom TQ. Efekat jedinjenja **150** prikazan je na NCI-H460/R ćelijama (crveni stubić), na NCI-H460 ćelijama (crni stubić) i pri istovremenom tretmanu sa 50 nM TQ na NCI-H460/R ćelijama (rozi stubić). Jedinjenje **150** ispitivano je u koncentracionom opsegu 1-25 μ M, primjenom MTT testa nakon 72 sata tretmana ($n \geq 3$). Dobijeni rezultati analizirani su nelinearnom regresijom u softveru GraphPad Prism 8.0.2. Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciono-zavisni efekat **150** u NCI-H460/R ćelijama određena je primjenom Danetovog testa za višestruka poređenja (engl. *Dunnett's multiple comparisons test*): *** $p < 0,001$. B) Reverzija rezistencije na DOX, primjenom hibridnih molekula **157–160**. DOX (u koncentracionom opsegu 100-2000 nM) u kombinaciji sa 500 nM jedinjenja **157–160** ispitivan je MTT testom nakon 72 sata tretmana ($n \geq 3$). Dobijeni rezultati analizirani su nelinearnom regresijom u softveru GraphPad Prism 8.0.2. IC₅₀ vrijednosti doksorubicina (DOX) određene u senzitivnim NCI-H460 ćelijama (plavi stubić), rezistentnim NCI-H460/R ćelijama (crveni stubić) i nakon kombinovanog tretmana sa jedinjenjima **157–160** u NCI-H460/R ćelijama (crni stubići). Statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciono-zavisni efekat DOX u NCI-H460/R ćelijama određena je primjenom Danetovog testa za višestruka poređenja: *** $p < 0,001$.

3.2.3 Odnos strukture i biološke aktivnosti (SAR) sintetisanih jedinjenja

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1, tabeli 2 i tabeli P2, uočeni su određeni opšti obrasci odnosa strukture i aktivnosti (SAR) ispitivanih supstanci.

Sva hibridna jedinjenja sa piperazinskim linkerom **150–160** pokazala su značajno veću selektivnost prema NSCLC ćelijama u poređenju sa hibridima sa etilendiaminskim linkerom **144–149** i polaznim jedinjenjem, artesunatom.

Poređenjem hibridnih molekula **150–160** sa artesunatom može se zaključiti da je uvođenje pirimidinskog jezgra sa piperazinskim linkerom dovelo do značajnog poboljšanja aktivnosti prema ćelijskoj liniji NCI-H460 kod gotovo svih hibridnih jedinjenja. Međutim, samo su dva hibridna molekula, **152** i **160**, ispoljila veću potentnost u odnosu na artesunat prema ćelijskoj liniji NCI-H460/R. Artesunat pokazuje povoljniji profil rezistencije u poređenju sa hibridima **150–159**, sa izuzetkom jedinjenja **160**. Važno je istaći da sva hibridna jedinjenja sa piperazinskim linkerom (**150–160**) imaju bolji indeks selektivnosti u odnosu na artesunat.

Takođe, sva hibridna jedinjenja **144–149** i **150–160** pokazala su poboljšanu aktivnost u poređenju sa odgovarajućim derivatima pirimidina **111–116** i **131–140**, **142**.

Poređenjem hibrida sa istim supstituentom na pirimidinskom jezgru (**144–149** u odnosu na **150–155**) može se zaključiti da su hibridna jedinjenja sa piperazinskim linkerom bila potentnija prema ćelijskoj liniji NCI-H460 u odnosu na hibridna jedinjenja sa etilendiaminskim linkerom. Ovi rezultati naglašavaju značaj izbora linkera u hibridnim molekulima na ispoljavanje biološke aktivnosti.

Takođe, elektronski efekti supstituenata (-OMe, -Me, -F, -CN) na benzenovom jezgru vezanom za pirimidinski prsten ne utiču značajno na aktivnost ispitivanih jedinjenja. Najaktivniji hibrid **160** kao i najaktivniji pirimidinski derivat **142**, sadržali su fenil-supstituent u položaju C-6 pirimidinskog jezgra, što ukazuje na značaj ovog strukturnog motiva za ispoljavanje antitumorske aktivnosti na ispitivanim ćelijskim linijama.

Hibridi **152** (sa IC₅₀ vrijednostima 1,234 µM na NCI-H460 i 2,892 µM na NCH-H460/R ćelijama) i **160** (sa IC₅₀ vrijednostima 1,507 µM na NCI-H460 i 1,661 µM na NCH-H460/R ćelijama) predstavljaju najaktivnija jedinjenja. Hibridni molekul **160** posjeduje povoljan profil rezistencije, dok je hibrid **152** (SI = 7,42) najselektivniji među hibridnim molekulima.

Na osnovu FAR vrijednosti (Tabela 2 i Tabela P2), gotovo sva hibridna jedinjenja sa piperazinskim linkerom **150–155** pokazala su izraženiju modulaciju aktivnosti P-gp u poređenju sa odgovarajućim hibridima sa etilendiaminskim linkerom **144–149**.

Prisustvo metil-grupe na C-6 položaju pirimidinskog skeleta dovelo je do povećane aktivnosti jedinjenja **155–159** prema P-gp u poređenju sa odgovarajućim hibridima bez supstitucije na C-6 položaju (**150–154**), kao i u odnosu na jedinjenje **160** sa fenil-grupom na C-6 položaju.

3.3 *In silico* ispitivanja

In silico metode predstavljaju važan alat u razvoju antitumorskih lijekova, omogućavajući predviđanje biološke aktivnosti, proučavanje interakcija sa ciljanim proteinima i identifikaciju novih kandidata za lijekove.^{221,222} Najčešće primjenjivani pristupi uključuju molekulsko dokovanje, molekulsku dinamiku, QSAR analizu i farmakoforno modelovanje, pri čemu je eksperimentalna validacija neophodna za potvrdu dobijenih rezultata.

Analiza fizičko-hemijskih parametara sintetisanih jedinjenja, dobijenih korišćenjem platforme SwissADME, pokazala je da nijedan od hibrida ne odstupa od više od jednog od ukupno pet pravila Lipinskog (Tabela P3). Dalje, imajući u vidu da se izračunate vrijednosti topološke polarne površine (TPSA) i koeficijenta raspodjele oktanol/voda log*P* kreću u opsegu 112,55–121,78 Å², odnosno 3,56–

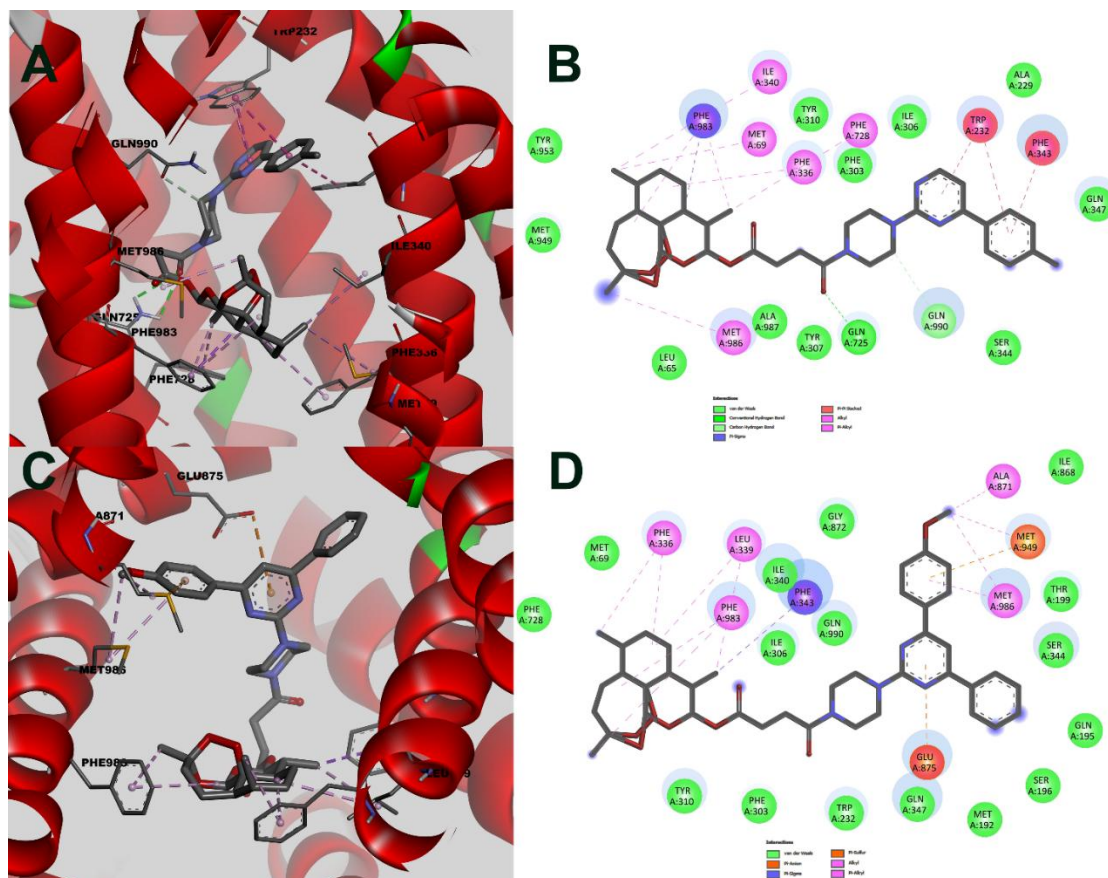
4,43 za jedinjenja **150–153** i **155–158**, može se zaključiti da ova hibridna jedinjenja imaju veliku vjerovatnoću pasivne apsorpcije putem gastrointestinalnog trakta (Slika P13).^{223,224} Za preostala jedinjenja predviđeno je da se ne apsorbuju u značajnoj mjeri iz gastrointestinalnog trakta.

Takođe, prema SwissADME predikcijama, nijedan od sintetisanih hibrida ne bi trebalo da prolazi krvno-moždanu barijeru niti da prevaziđe aktivnost P-gp transportera, dok su za artemizinin i artesunat predviđena ova svojstva. Međutim, eksperimentalni rezultati pokazali su da pojedina jedinjenja, uključujući artesunat, **142**, **146**, **147** i **157–160**, posjeduju sposobnost inhibicije P-gp transportera i prevazilaženja višestruke rezistencije. Ovi rezultati ukazuju na određena odstupanja između *in silico* predikcija i rezultata dobijenih u biološkim sistemima.

S obzirom na to da su ispitivanja sprovedena na paru ćelijskih linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća, senzitivna i odgovarajuća MDR ćelijska linija, koje se razlikuju po ekspresiji i aktivnosti P-gp, eksperimentalni podaci pružaju pouzdaniji uvid u interakcije ispitivanih jedinjenja sa P-gp. Dodatno, iako je artesunat pokazao određeni inhibitorski efekat prema P-gp, njegovo djelovanje nije bilo zavisno od koncentracije i bilo je slabije u poređenju sa jedinjenjima **153**, **160** i TQ (Slika 40). Bez eksperimentalne validacije, rezultati dobijeni primjenom platforme SwissADME mogli bi dovesti do pogrešnog zaključka da artemizinin i artesunat posjeduju povoljnije osobine u odnosu na sintetisana jedinjenja kada je riječ o interakciji sa P-gp transporterom.

Molekulsko dokovanje reprezentativnih hibrida **153** (identifikovanog kao potencijalni supstrata P-gp) i **160** (identifikovanog kao potencijalni inhibitora P-gp), pokazalo je da se oba jedinjenja vezuju u istom regionu proteina, ali zbog razlika u veličini i funkcionalnim grupama, ostvaruju interakcije sa različitim aminokiselinskim ostacima (Slika 42A, C). U oba slučaja dominiraju hidrofobne interakcije, dok je za jedinjenje **153** dominantna interakcija u najpovoljnijoj konformaciji vodonična veza sa ostatkom Gln725 (Slika 42B). Ova interakcija vjerovatno doprinosi povoljnijoj vrijednosti doking skora za jedinjenje **153** u odnosu na **160** (–8,676 naspram –7,848), što je u skladu sa eksperimentalnim rezultatima koji ukazuju na snažniju interakciju jedinjenja **153** sa P-gp (Slika 40).

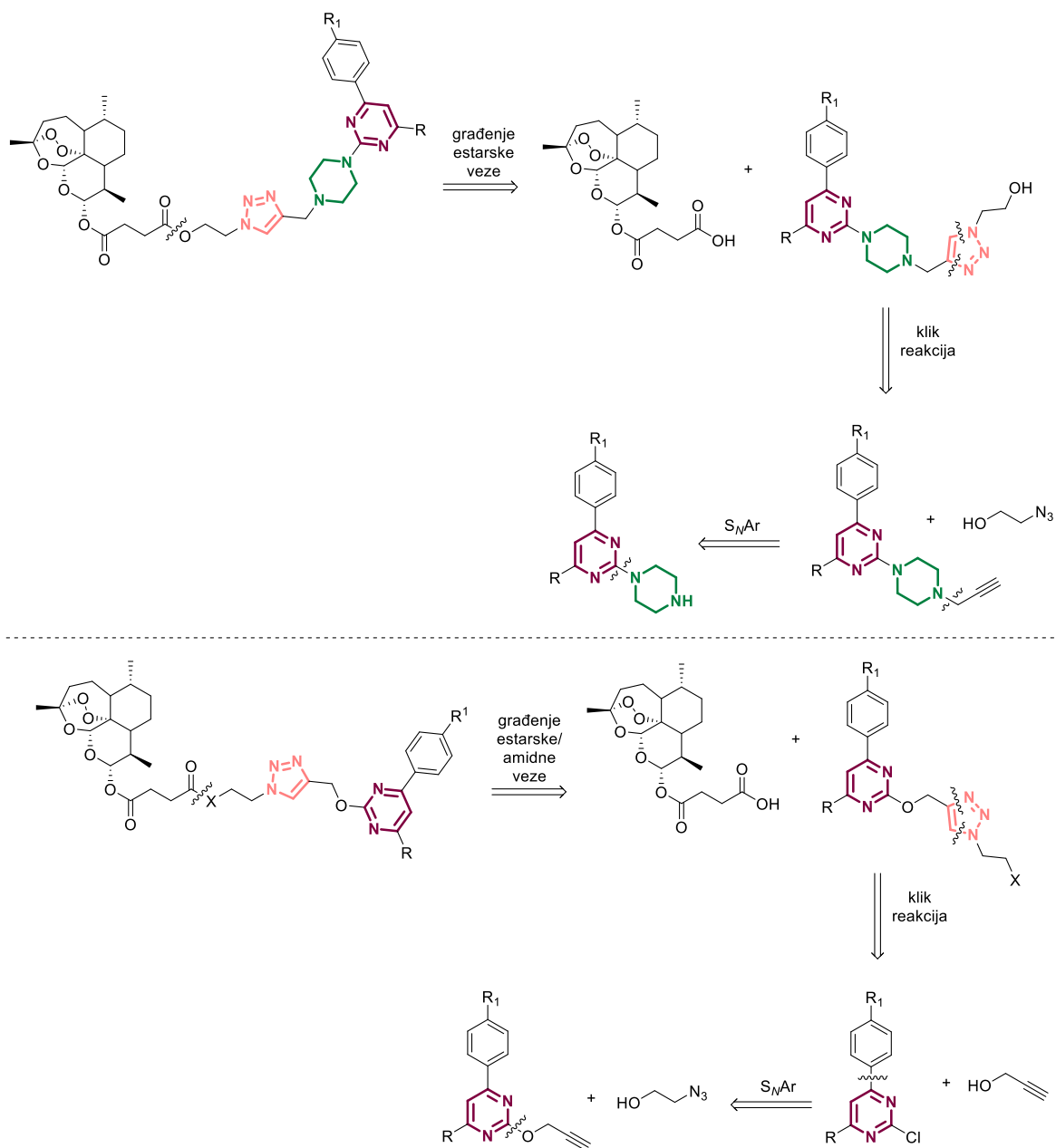
Pored toga, uočene su π – π interakcije sa aminokiselinskim ostacima Trp232 i Phe343, kao i više hidrofobnih π –alkil interakcija sa ostacima Phe336, Phe728 i Phe983 (Slika 42B). Najpovoljnija doking konformacija jedinjenja **160** pokazala je pretežno hidrofobne interakcije, uključujući π – σ interakciju sa Phe343, π –sumpor interakciju sa Met949, kao i π –alkil interakcije sa ostacima Phe336, Phe983 i Met986 (Slika 42D). Takođe su uočene π –anjon interakcije sa ostatkom Glu875, kao i hidrofobne interakcije sa ostacima Met986, Leu339 i Ala871.



Slika 42. Vezivno mjesto P-gp sa prikazom interakcija aminokiselnih ostataka sa jedinjenjima **153** (A) i **160** (C), i 2D šematski prikaz interakcija liganda **153** (B) i **160** (D) sa aminokiselinama.

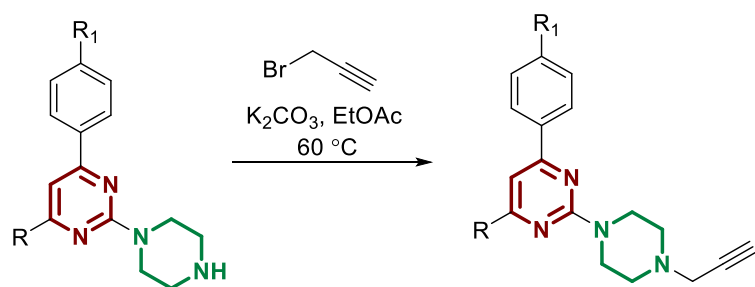
3.4. Dizajn i sinteza hibridnih molekula koji sadrže 1,2,3-triazolski strukturni motiv

U cilju ispitivanja uticaja strukture na antitumorsku aktivnost jedinjenja, a uzimajući u obzir prethodno ostvarene rezultate, koji su pokazali da jedinjenja sa piperazinskim fragmentom ispoljavaju veću aktivnost u poređenju sa analogima koji sadrže etilendiamin, u nastavku istraživanja sintetisana je serija jedinjenja koja u svojoj strukturi kombinuju tri privilegovana strukturna motiva, pirimidin, piperazin i 1,2,3-triazol. Istovremeno, sintetisana je i nova serija derivata pirimidina koji u svojoj strukturi sadrže samo pirimidin i 1,2,3-triazol. Zahvaljujući hemijskoj inertnosti, metaboličkoj stabilnosti kao i sposobnosti ostvarivanja interakcije sa biološkim metama, 1,2,3-triazol predstavlja strukturni motiv prisutan u brojnim biološki aktivnim jedinjenjima i poslužio je kao značajan element u dizajnu novih hibridnih molekula, derivata artemizina.²²⁵ U završnom koraku sinteze, novi pirimidinski derivati su vezani za artesunat, a na slici 43 prikazan je retrosintetički pristup primjenjen u dizajnu novih derivata. Ključna transformacija u predstavljenoj sintetičkoj strategiji bila je bakar(I) katalizovana azid-alkin cikloadicija, primjenjena za formiranje 1,2,3-triazolskog fragmenta koji je iskorišćen za povezivanje farmakofora.



Slika 43. Retrosintetički pristup u sintezi novih hibridnih molekula.

Daljom strukturnom optimizacijom prethodno sintetisanih derivata pirimidina koji sadrže piperazinski prsten sintetisani su novi derivati koji u svojoj strukturi sadrže i 1,2,3-triazolski fragment čime su u jednoj strukturi objedinjene tri privilegovane farmakofore. U prvom koraku sintetisani su odgovarajući alkinski derivati pirimidina reakcijom propargilovanja azotovog atoma piperizina (Shema 7). Jedinjenja **161–169** su dobijena u umjereno dobrim prinosima u reakciji prethodno sintetisanih piperazinskih derivata pirimidina **131–133**, **136–138**, **141–143** sa propargil-bromidom u prisustvu K_2CO_3 kao baze na $60\text{ }^\circ\text{C}$.



131: R = R₁ = H

132: R = H, R₁ = OMe

133: R = H, R₁ = F

136: R = Me, R₁ = H

137: R = Me, R₁ = OMe

138: R = Me, R₁ = F

141: R = Ph, R₁ = H

142: R = Ph, R₁ = OMe

143: R = Ph, R₁ = F

161: R = R₁ = H, 80%

162: R = H, R₁ = OMe, 84%

163: R = H, R₁ = F, 79%

164: R = Me, R₁ = H, 69%

165: R = Me, R₁ = OMe, 63%

166: R = Me, R₁ = F, 75%

167: R = Ph, R₁ = H, 81%

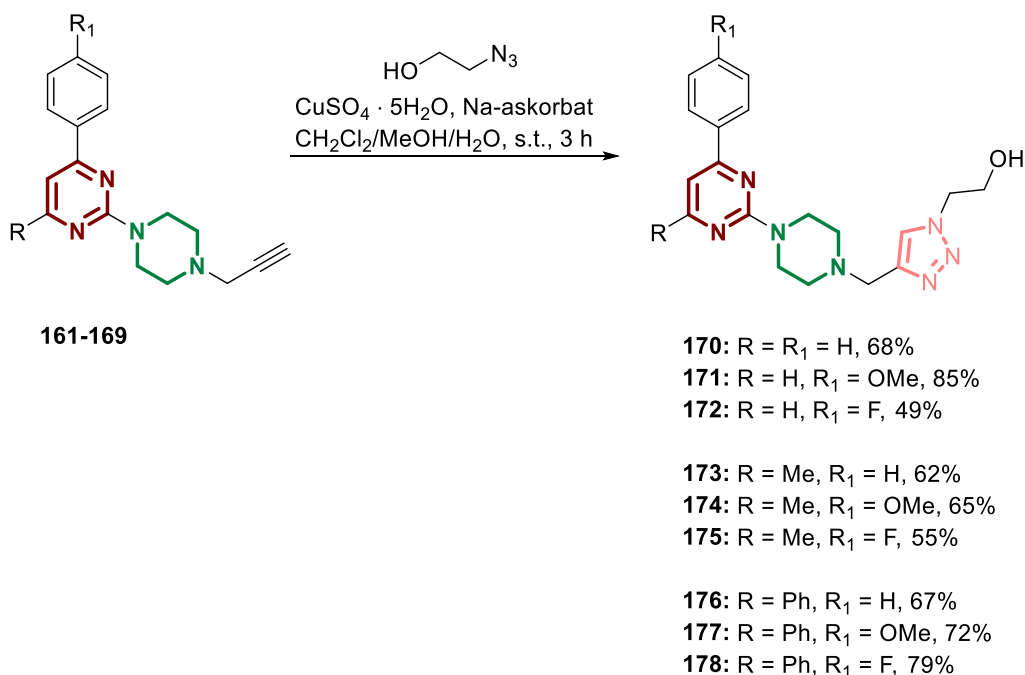
168: R = Ph, R₁ = OMe, 63%

169: R = Ph, R₁ = F, 65%

Shema 7. Sinteza propargilovanih derivata pirimidina **161–169**.

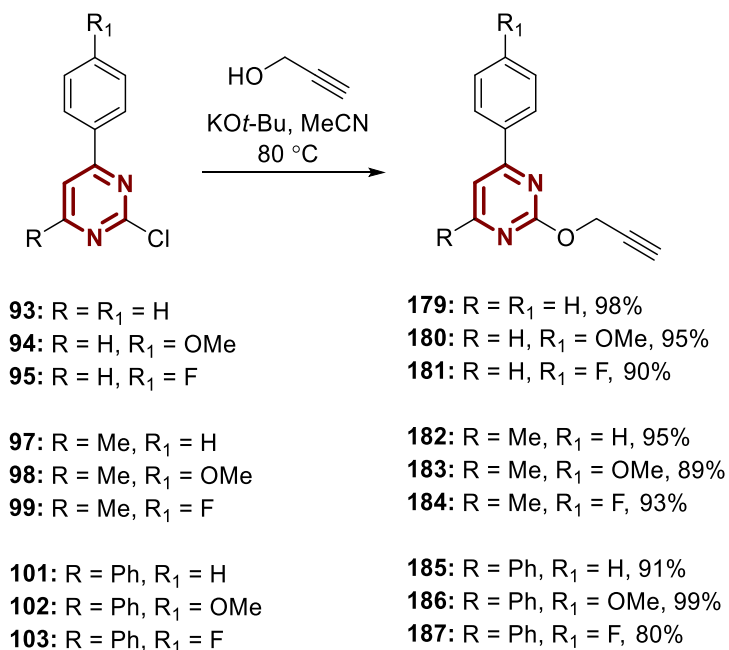
Pojam „klik“ koristi se da opiše jednostavno spajanje molekulskih gradivnih jedinica.²²⁶ Klik reakcije odlikuju se brzinom, visokom selektivnošću, jednostavnom primjenom, kao i činjenicom da nisu osjetljive na prisustvo kiseonika i vode. Takođe, omogućavaju sintezu velikog broja različitih jedinjenja u visokom prinosu. Jedna od velikih prednosti ovih reakcija je što nakon reakcije gotovo da nije potrebno prečišćavanje proizvoda pomoću hromatografskih tehnika, što cijeli proces čini veoma jednostavnim. Klik reakcije su termodinamički vođene reakcije koje se odvijaju brzo, nepovratne su i daju proizvode sa visokom hemijskom selektivnošću. Sporedni proizvodi koji nastaju tokom reakcije lako se uklanjaju, bez potrebe za složenim prečišćavanjem. Da bi se neka reakcija smatrala klik reakcijom, mora da ispunjava određene kriterijume: da se odvija pod blagim (neagresivnim) uslovima, da se koriste lako dostupni reaktanti, da ne zahtijeva korišćenje rastvarača ili da koristi vodu ili neki drugi lako uklonjiv rastvarač, i da omogućava jednostavno izdvajanje i prečišćavanje proizvoda.

Sinteza hibridnih jedinjenja **170–178**, koji u svojoj strukturi sadrže 1,2,3-triazolski strukturni motiv, ostvarena je 1,3-dipolarnom cikloadicionom bakar(I) katalizovanom reakcijom (CuAAC) derivata pirimidina koji sadrže trostruku vezu **161–169** i 2-azidoetanola. Kao izvor katalitički aktivne vrste bakra(I) korišćene su katalitičke količine bakar(II)-sulfata i natrijum-askorbata, pri čemu je bakar(I) generisan *in situ* redukcijom bakra(II). Ovom reakcijom dobijeni su željeni molekuli **170–178** u umjereno dobrim prinosima.



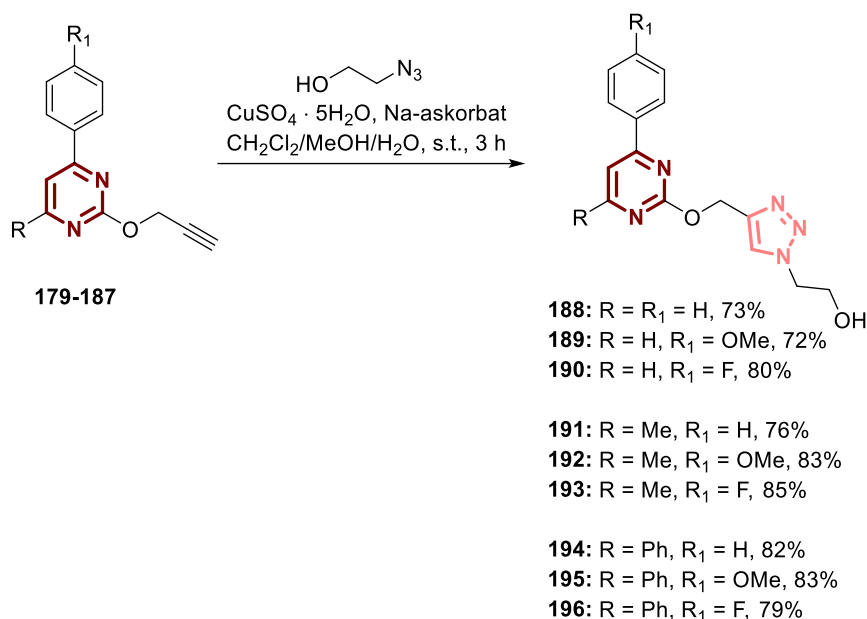
Shema 8. Primjena klik reakcije u sintezi jedinjenja **170–178**.

Za sintezu željenih hibridnih molekula kod kojih su pirimidinski derivati i artesunat povezani putem 1,2,3-triazolskog fragmenta, bilo je neophodno prethodno sintetisati odgovarajuće prekursore koji sadrže alkinsku funkcionalnu grupu. Jedinjenja **93–95**, **97–99**, **101–103** su uspješno prevedena u alkinske derivate reakcijom sa propargil-alkoholom u prisustvu kalijum *tert*-butoksida. Primjenom ovih reakcionih uslova, u acetonitrilu kao rastvaraču, željeni derivati **179–187** su dobijeni u visokim prinosima (Shema 9).



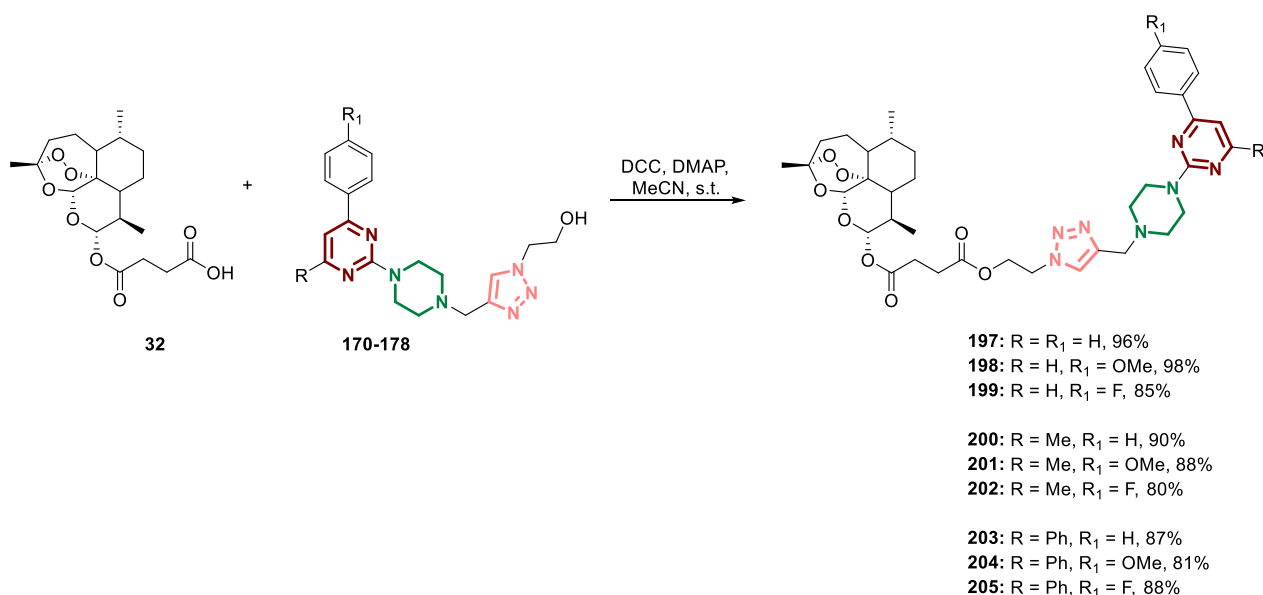
Shema 9. Sinteza alkinskih derivata **179–187**.

Nakon dobijanja odgovarajućih alkinskih prekursora **179–187**, primjenom CuAAC reakcije, pod uslovima koji su prethodno opisani, sintetisana je nova serija pirimidin-triazolskih derivata **188–196**. Željena jedinjenja, prikazana na shemi 10, dobijena su u umjereno dobrim prinosima.

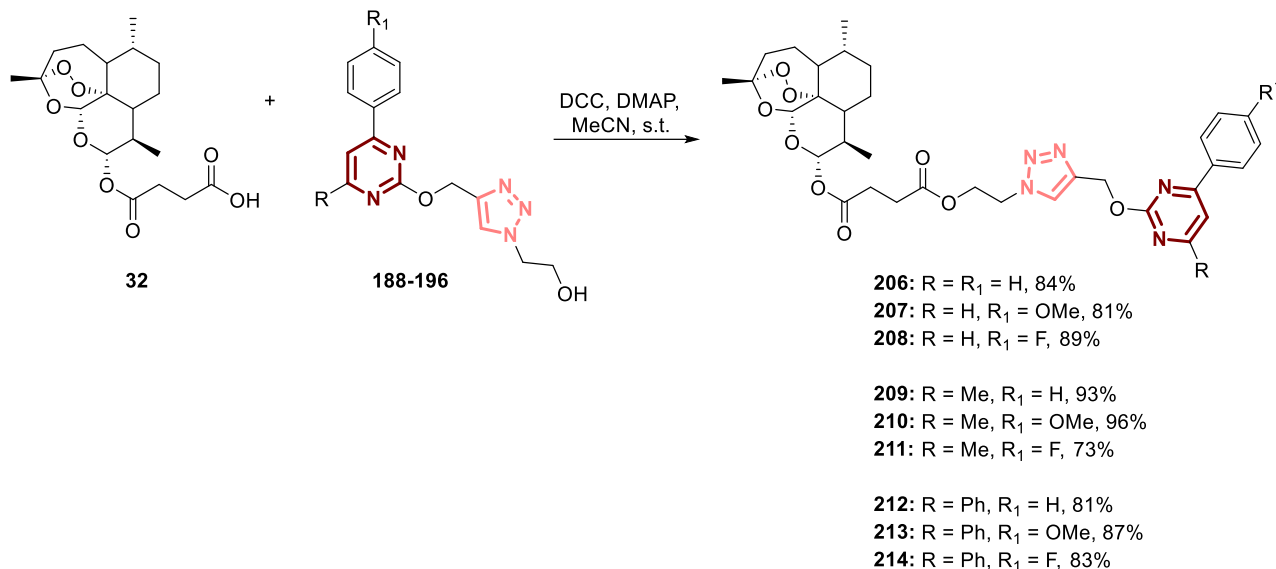


Shema 10. Primjena klik reakcije u sintezi jedinjenja **188–196**.

Tokom protekle decenije, molekulska hibridizacija prirodnih proizvoda pokazala se kao jedna od najuspješnijih strategija u medicinskoj hemiji i dizajnu novih lijekova, prvenstveno zahvaljujući mogućnosti unapređenja farmakoloških, farmakokinetičkih i farmakodinamičkih osobina polaznih jedinjenja. Polazeći od značaja ovog koncepta, kao i prethodno potvrđenog potencijala derivata artemizina dobijenih primjenom molekulske hibridizacije, sintetisana je nova serija hibrida artesunata i pirimidina. Sinteza željenih jedinjenja ostvarena je kovalentnim povezivanjem artesunata **32** sa prethodno sintetisanim pirimidinskim derivatima koji sadrže 1,2,3-triazolski strukturni motiv **170–178** ili **188–196**, pri čemu je formirana estarska veza između karboksilne grupe artesunata i odgovarajuće hidroksilne grupe na pirimidinskom fragmentu. Ova transformacija izvedena je primjenom Štegljehove esterifikacije korišćenjem *N,N*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC) kao aktivatora karboksilne kiseline i 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) kao katalizatora, u acetonitrilu kao rastvaraču. Reakcija je izvedena pod blagim uslovima na sobnoj temperaturi, čime je omogućeno očuvanje osjetljivog endoperoksidnog mosta, ključnog za biološku aktivnost derivata artemizina. Na ovaj način uspješno su sintetisani hibridni molekuli **197–205** i **206–214**, koji su izolovani u dobrim do odličnim prinosima (Shema 11 i Shema 12).

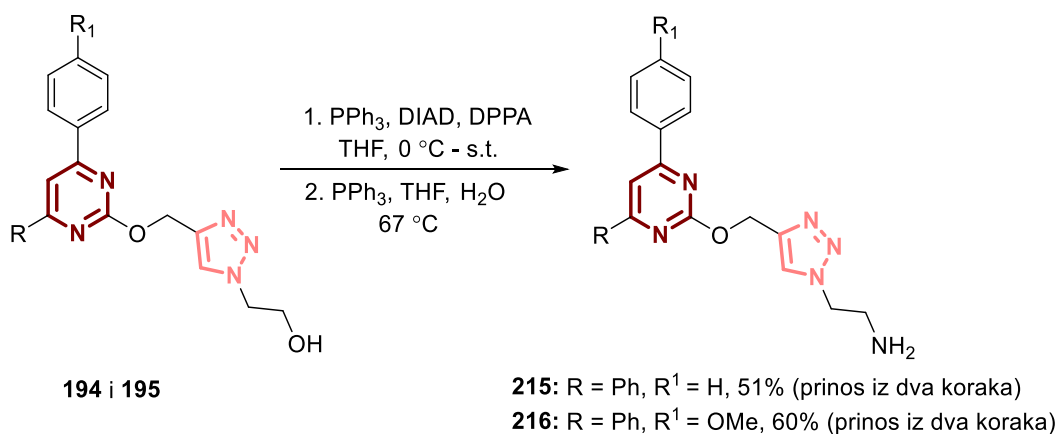


Shema 11. Sinteza hibridnih jedinjenja artesunata **197–205**.



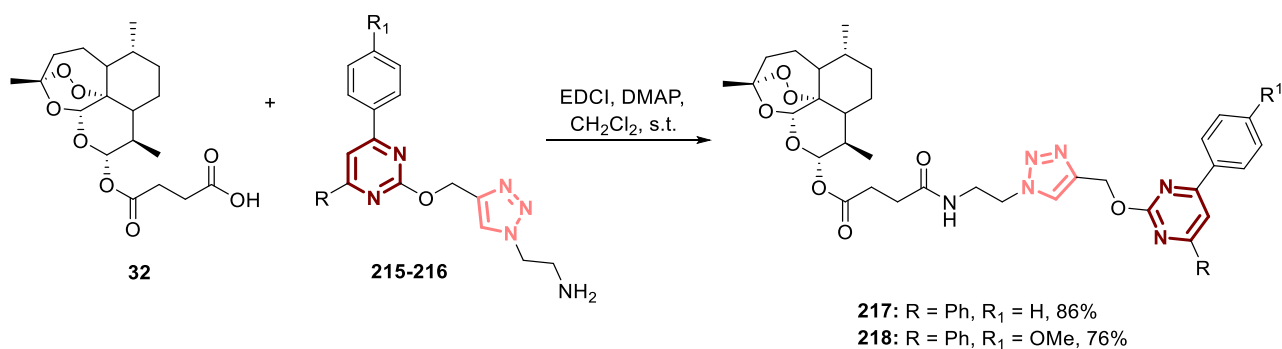
Shema 12. Sinteza hibridnih jedinjenja artesunata **206–214**.

Dodatno, radi ispitivanja uticaja tipa hemijske veze na biološku aktivnost krajnjih hibrida, sintetisana su dva derivata artesunata u kojima su farmakoforne cjeline povezane amidnom vezom. U tu svrhu prethodno su izvršene strukturne modifikacije pirimidinskih derivata **194** i **195**, čime je omogućeno poređenje uticaja estarske i amidne veze između artesunata i pirimidinskog fragmenta na antitumorsku aktivnost. Polazni pirimidinski derivati **194** i **195** koji sadrže hidroksilnu funkcionalnu grupu prevedeni su u odgovarajuće primarne amine **215** i **216** u dva sintetska koraka. U prvom koraku, hidroksilna grupa transformisana je u azidnu funkcionalnu grupu primjenom Mitsunobu reakcije u prisustvu DIAD, DPPA i PPh₃, pri čemu su dobijeni odgovarajući azidni intermedijeri. U drugom koraku, izvršena je redukcija azidne grupe zagrijavanjem reakcione smješe u prisustvu PPh₃, što je omogućilo dobijanje željenih primarnih amina **215** i **216** u umjereno dobrim prinosima (Shema 13).



Shema 13. Sinteza amina **215** i **216**.

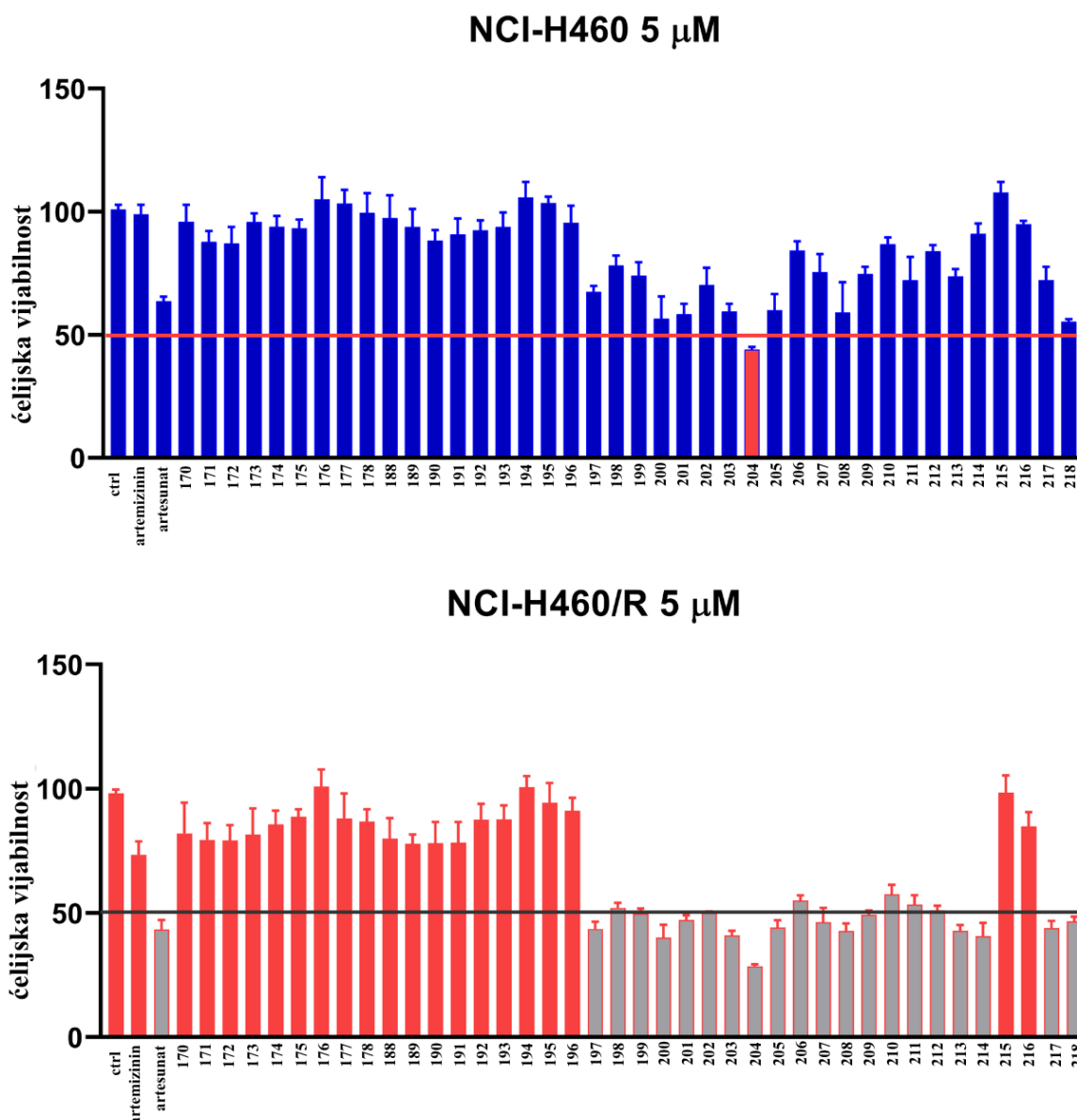
Sinteza hibridnih molekula **217** i **218** ostvarena je reakcijom kuplovanja artesunata i amino pirimidinskih derivata **215** i **216**, pri čemu su željena jedinjenja izolovana u prinosima od 86% i 76%. Reakcija je sprovedena u prisustvu EDCI kao reagensa za aktivaciju karboksilne grupe, koristeći dihlormetan kao rastvarač na sobnoj temperaturi.



Shema 14. Sinteza hibridnih jedinjenja artesunata **217** i **218**.

3.5. Određivanje antitumorske aktivnosti 1,2,3-triazolskih derivata artesunata

Preliminarno ispitivanje antitumorske aktivnosti derivata pirimidina **170–178**, **188–196**, **215–216**, kao i hibridnih jedinjenja artesunata **197–205**, **206–214** i **217–218**, sprovedeno je na senzitivnoj ćelijskoj liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 i odgovarajućoj rezistentnoj ćelijskoj liniji NCI-H460/R. Nivoi inhibicije rasta ćelija u prisustvu ovih jedinjenja upoređeni su sa efektima postignutim primjenom artemizininina i artesunata (Slika 44). Sva hibridna jedinjenja artesunata, kao i sam artesunat, pokazala su veću citotoksičnost prema rezistentnim NCI-H460/R ćelijama u odnosu na senzitivne, pri koncentraciji od 5 μM .



Slika 44. Preliminarno ispitivanje citotoksičnog dejstva pirimidinskih derivata **170–178**, **188–196**, **215**, **216** i hibridnih molekula artesunata **197–205**, **206–214**, **217**, **218**. Citotoksičnost artemizinin, artesunata, derivata pirimidina kao i hibridnih jedinjenja je određena MTT testom nakon 72 h tretmana. Senzitivna ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 i rezistentna ćelijska linija NCI-H460/R tretirane su ispitivanim jedinjenjima pri koncentraciji od 5 µM. Vijabilnost kontrolnih netretiranih ćelija je predstavljena kao 100%. Horizontalna linija označava granicu od 50% vijabilnih ćelija, dok sivi stubići označavaju derivate koji su ispoljili veću citotoksičnost prema rezistentnim ćelijama. Eksperiment je nezavisno ponovljen 3 puta.

Na osnovu rezultata inicijalnog skrininga, za dalja ispitivanja antitumorske aktivnosti odabrano je dvadeset hibridnih jedinjenja, derivata pirimidina i artesunata, koja su pokazala veću citotoksičnost na rezistentnim NCI-H460/R ćelijama. Jedinjenja **197–214**, **217** i **218** su zatim detaljno ispitano u opsegu koncentracija od 1-25 µM na senzitivnim NCI-H460 i rezistentnim NCI-H460/R ćelijama, kao i na normalnim plućnim fibroblastima MRC-5, s ciljem određivanja njihove selektivnosti kako prema senzitivnim, tako i prema rezistentnim tumorskim ćelijama (Tabela 3 i Slika P14). Inhibicija rasta ćelija izazvana različitim koncentracijama artesunata i odabranih jedinjenja određena je primjenom MTT testa i prikazana pomoću IC₅₀ (Tabela 3).

Tabela 3. Citotoksičnost, indeksi kolateralne senzitivnosti i selektivnosti pirimidinskih derivata artesunata upoređeni na osnovu IC₅₀ vrijednosti (μM) dobijenih u NCI-H460, NCI-H460/R i MRC-5 ćelijama.

Jedinjenje	NCI-H460	NCI-H560/R	Indeks kolateralne senzitivnosti	MRC-5	Indeks selektivnosti
Artesunat	6,878 ± 0,111	3,764 ± 0,069	1,83**	7,676 ± 0,090	1,44*
197	9,950 ± 0,136	5,034 ± 0,087	1,98**	8,756 ± 0,181	1,17
198	9,530 ± 0,110	5,537 ± 0,080	1,72**	15,207 ± 0,262	2,02 ^{S**}
199	9,014 ± 0,132	4,166 ± 0,098	2,16**	12,299 ± 0,275	1,87***
200	7,091 ± 0,100	4,816 ± 0,086	1,47*	13,924 ± 0,231	2,34 ^{S**}
201	8,155 ± 0,137	5,032 ± 0,115	1,62**	15,696 ± 0,339	2,38 ^{S**}
202	9,348 ± 0,123	4,612 ± 0,108	2,03**	22,368 ± 0,350	3,20 ^{S***}
203	4,951 ± 0,048	3,617 ± 0,055	1,37*	11,599 ± 0,122	2,71 ^{S***}
204	7,702 ± 0,084	6,165 ± 0,043	1,25*	12,490 ± 0,138	1,80***
205	8,026 ± 0,079	4,932 ± 0,039	1,63**	12,574 ± 0,099	1,74***
206	16,380 ± 0,133	14,235 ± 0,175	1,15*	32,947 ± 0,366	2,15 ^{S***}
207	16,539 ± 0,165	12,487 ± 0,120	1,08*	91,403 ± 1,372	7,02 ^{S***}
208	19,140 ± 0,151	9,149 ± 0,108	2,09**	37,899 ± 0,545	2,68 ^{S***}
209	11,633 ± 0,137	9,693 ± 0,095	1,20*	182,89 ± 2,980	17,15 ^{S***}
210	14,465 ± 0,169	8,332 ± 0,157	1,74*	65,850 ± 0,800	5,78 ^{S***}
211	11,397 ± 0,124	7,583 ± 0,123	1,50*	379,74 ± 5,781	40,01 ^{S***}
212	9,080 ± 0,122	5,181 ± 0,088	1,75**	24,313 ± 0,310	3,41 ^{S***}
213	12,414 ± 0,181	3,154 ± 0,046	3,94***	24,808 ± 0,312	3,19 ^{S***}
214	13,240 ± 0,159	8,189 ± 0,094	1,62**	136,065 ± 1,409	12,70 ^{S***}
217	12,298 ± 0,096	2,512 ± 0,028	4,90***	43,564 ± 0,563	5,88 ^{S***}
218	7,512 ± 0,044	4,417 ± 0,063	1,70**	6,568 ± 0,071	1,10

Značajne razlike između IC₅₀ vrijednosti ćelijskih linija NCI-H460 i NCI-H460/R, koje ukazuju na pojavu kolateralne senzitivnosti (indeks veći od 1), utvrđene su primjenom Welch-ovog testa (n=3), kao i značajne razlike između IC₅₀ vrijednosti tumorskih i zdravih (netumorskih) ćelija. Statistički značajne razlike označene su na sledeći način: $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$.

^SSelektivnost ka tumorskim ćelijama: IC₅₀ vrijednost za dato jedinjenje je najmanje dva puta veća kod normalnih (netumorskih) ćelija fibroplasta porijeklom iz pluća (MRC-5) u odnosu na prosječnu IC₅₀ vrijednost dobijenu kod senzitivnih NCI-H460 i rezistentnih NCI-H460/R ćelija.

Indeks kolateralne senzitivnosti definiše se kao odnos IC₅₀ vrijednosti dobijenih na senzitivnim NCI-H460 i rezistentnim NCI-H460/R ćelijama. Sva testirana jedinjenja pokazuju niže IC₅₀ vrijednosti na rezistentnim NCI-H460/R ćelijama u poređenju sa senzitivnim ćelijama, ukazujući na fenomen kolateralne senzitivnosti. Jedinjenja **213** i **217** ispoljila su najizraženiju kolateralnu senzitivnost, a samim tim i najveću selektivnost prema rezistentnim ćelijama raka (Tabela 3). Izuzetnu selektivnost ka tumorskim ćelijama, koju predstavlja indeks selektivnosti preko 10, pokazala su jedinjenja **209**, **211** i **214** (Tabela 3), a posebno jedinjenje **211** sa indeksom selektivnosti preko 40.

Poređenjem antitumorske aktivnosti hibrida **197–214**, **217** i **218** sa prethodno sintetisanim jedinjenjima **144–160**, čija je aktivnost ispitivana na istom paru ćelijskih linija (NCI-H460 i NCI-H460/R), uočena je značajna promjena u profilu djelovanja. Dok jedinjenja **144–160** nisu ispoljila kolateralnu senzitivnost, hibridi **197–214** i **217**, **218** su pokazali veću aktivnost prema rezistentnoj ćelijskoj liniji NCI-H460/R nego prema odgovarajućoj senzitivnoj liniji, što ukazuje da je uvođenje 1,2,3-triazolskog strukturnog motiva doprinijelo razvoju kolateralne senzitivnosti i poboljšanoj aktivnosti prema MDR ćelijama.

3.5.1 Inhibicija aktivnosti P-glikoprotina u prisustvu hibridnih molekula

Primjenom testa akumulacije rodamina 123 ispitano je uticaj artesunata, jedinjenja **197–214**, **217** i **218** na aktivnost P-gp, a ispitivanje je sprovedeno na rezistentnoj ćelijskoj liniji NCI-H460/R koju karakteriše prekomjerna ekspresija P-gp (Tabela 4 i Slika P15). Dobijeni rezultati su upoređeni sa efektom tarikvidara (TQ), specifičnim inhibitorom P-gp.

Sva ispitivana jedinjenja dovela su do povećane akumulacije Rho123, odnosno, ispoljila su osobine inhibitora P-glikoproteina, pri čemu su jedinjenja **199**, **203–205** i **218** pokazala izraženiji inhibični efekat na aktivnost P-gp u poređenju sa TQ, što je dodatno potvrđeno poređenjem sa nivoom akumulacije Rho123 u senzitivnim NCI-H460 ćelijama (Tabela 4). Navedena jedinjenja dovela su do potpune inhibicije P-gp, budući da su vrijednosti srednjeg intenziteta fluorescence povećane iznad nivoa zabilježenog u senzitivnim ćelijama koje ne ekspimiraju P-glikoprotein na ćelijskoj membrani.

Nivo inhibicije P-gp postignut u NCI-H460/R ćelijama primjenom hibridnih jedinjenja **197–214**, **217** i **218** izražen kroz vrijednost odnosa fluorescentne aktivnosti (FAR, Tabela 4), bio je značajno veći u odnosu na vrijednosti dobijene kod hibridnih jedinjenja **144–160**. Na primjer, FAR vrijednost za jedinjenje **217** iznosi 9,15 (Tabela 4), što ukazuje na superiorniju inhibiciju P-gp u poređenju sa jedinjenjem **160** čija FAR vrijednost iznosi 2,82 (Tabela 2). Može se uočiti da su novosintetisana jedinjenja pokazala efikasniju inhibiciju P-gp, sa FAR vrijednostima u rasponu od 4,21 do 20,02 u poređenju sa jedinjenjima **144–160** koja u svojoj strukturi nisu sadržala 1,2,3-triazolski prsten i koja su ispoljavala FAR vrijednosti u rasponu od 1,15 do 5,02.

Tabela 4. Inhibicija aktivnosti P-gp u prisustvu hibridnih jedinjenja.

Ćelijska linija/jedinjenje	MFI ^a	FAR ^b	SI ^c
NCI-H460	659,003 ± 1352	14,61	100,00
NCI-H460/R	45,108 ± 253	/	6,85
TQ ^d	643,274 ± 1194	14,26	97,61
Artesunat	50,831 ± 292	1,13	7,71
197	278,607 ± 986	6,18	42,28
198	196,247 ± 805	4,35	29,78
199	730,424 ± 1492	16,19	110,84
200	553,103 ± 1258	12,26	83,93
201	384,848 ± 1118	8,53	58,40
202	522,302 ± 1237	11,58	79,26
203	730,955 ± 1398	16,20	110,92
204	682,061 ± 1192	15,12	103,50
205	841,920 ± 1464	18,66	127,76
206	234,874 ± 674	5,21	35,64
207	190,095 ± 655	4,21	28,85
208	282,006 ± 842	6,25	42,79
209	284,239 ± 926	6,30	43,13
210	549,527 ± 1060	12,18	83,39
211	467,604 ± 996	10,37	70,96
212	483,285 ± 953	10,71	73,34
213	628,171 ± 1168	13,93	95,32
214	428,669 ± 936	9,50	65,05
217	412,601 ± 762	9,15	62,61
218	903,202 ± 1630	20,02	137,06

^a MFI – srednji intezitet fluorescence;

^b FAR – odnos fluorescence i aktivnosti izračunat prema formuli: FAR = MFI tretiranih rezistentnih ćelija / MFI netretiranih rezistentnih ćelija;

^c SI – indeks osjetljivosti - određen primjenom sledeće formule: SI = (MFI tretiranih rezistentnih ćelija × 100) / MFI senzitivnih kontrolnih ćelija;

^d TQ – tarikvidar je korišćen kao referentno jedinjenje u koncentraciji od 50 nM.

3.5.2 Zavisnost aktivnosti ispitivanih jedinjenja od strukture

Detaljnijom analizom rezultata prikazanih u tabelama 3 i 4 uočeno je postojanje opštih obrazaca zavisnosti aktivnosti od strukture među ispitivanim jedinjenjima. Sva sintetisana hibridna jedinjenja **197–214**, **217** i **218** ispoljila su izraženiju citotoksičnu aktivnost prema rezistentnoj ćelijskoj liniji NCI-H460/R u odnosu na njihovu aktivnost prema senzitivnim ćelijama NCI-H460 (Tabela 3). Takođe, može se uočiti da je formiranjem estarske, odnosno amidne veze između derivata pirimidina **170–178**, **188–196**, **215–216** (Slika 44) i artesunata **32** dovelo do sinteze jedinjenja sa poboljšanom aktivnošću prema NCI-H460/R ćelijskoj liniji u poređenju sa polaznim derivatima (Slika 44, Tabela 3). Važno je napomenuti da su sva hibridna jedinjenja **197–205**, **206–214**, **217–218**, izuzev jedinjenja **197**, pokazala bolji indeks selektivnosti (SI) u odnosu na sam artesunat.

Poređenjem aktivnosti hibrida **206–214** sa njihovim odgovarajućim piperazinskim analogima **197–205**, može se zaključiti da su gotovo sva hibridna jedinjenja koja sadrže piperazinski strukturni motiv potentnija prema obe ćelijske linije, NCI-H460 i NCI-H460/R. Međutim, uočeno je i da odsustvo piperazinskog fragmenta, dovodi do manje toksičnosti i povoljnijeg indeksa selektivnosti (jedinjenja **206–214** u poređenju sa **197–205**, Tabela 3).

Među serijom jedinjenja **197–205**, derivat **202** pokazao je najpovoljniji indeks selektivnosti i izraženu kolateralnu senzitivnost. Prisustvo fenil-grupe, u položaju C-6 pirimidinskog jezgra, u jedinjenjima **212–214** doprinosi povećanju aktivnosti, čineći ih efikasnijim prema rezistentnoj ćelijskoj liniji. Jedinjenja **206–208**, bez supstituenta u položaju C-6 pirimidinskog jezgra, pokazala su najnižu aktivnost prema obe ćelijske linije u poređenju sa jedinjenjima koja sadrže fenil i metil-grupe. Takođe, jedinjenje **213** pokazalo je najveću vrijednost indeksa kolateralne senzitivnosti među svim ispitivanim jedinjenjima sa estarskom funkcionalnom grupom. Dalje, jedinjenje **211** je ispoljilo najnižu toksičnost i najveću selektivnost prema tumorskim ćelijama.

Poređenjem estera **212** ($R = \text{Ph}$, $R_1 = \text{H}$) i odgovarajućeg amidnog analoga **217** ($R = \text{Ph}$, $R_1 = \text{H}$), pokazano je da amidni derivat ima povoljniji sigurnosni profil, odnosno nižu toksičnost i veću selektivnost prema rezistentnoj ćelijskoj liniji nego prema osjetljivoj. Međutim, pri poređenju estarskog derivata **213** ($R = \text{Ph}$, $R_1 = \text{OMe}$) i jedinjenja **218** ($R = \text{Ph}$, $R_1 = \text{OMe}$), odgovarajućeg amidnog analoga, estarski derivat **213** pokazao je povoljniji sigurnosni profil, sa manjom toksičnošću i većom selektivnošću prema rezistentnoj ćelijskoj liniji u odnosu na senzitivnu.

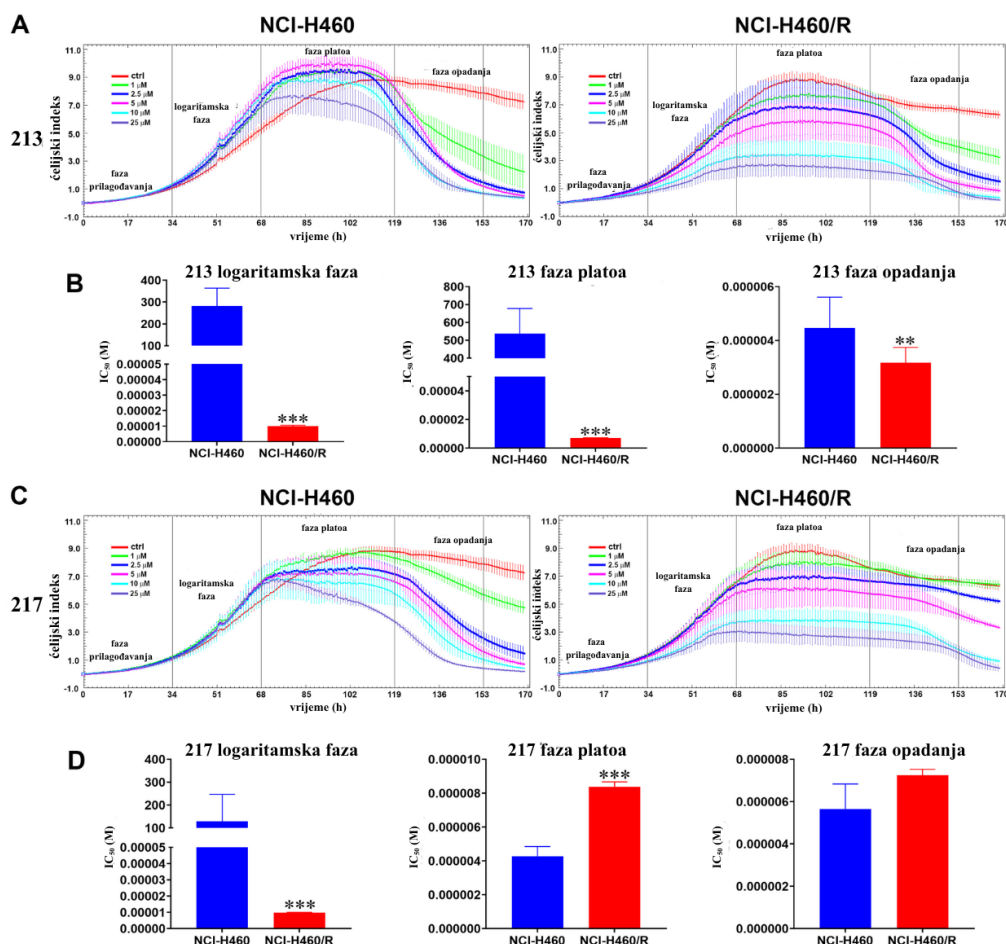
Elektronski efekti supstituenata na benzenovom prstenu vezanom u položaju 4 pirimidinskog jezgra ne utiču značajno na biološku aktivnost ispitivanih jedinjenja (Tabela 3). Važno je napomenuti da hibridizacija artesunata sa derivatima pirimidina povećava njegovu sposobnost modulacije P-gp (Tabela 4). Jedinjenja **199**, **203–205** i **218** ispoljila su znatno izraženiji inhibitorni efekat na aktivnost P-gp u poređenju sa poznatim P-gp inhibitorom, TQ (Tabela 4).

3.5.3 Zavisnost kolateralne senzitivnosti od aktivnosti P-gp

U nastavku je određen način djelovanja jedinjenja **213** i **217**, s ciljem utvrđivanja da li njihovo dejstvo ima citotoksičan, citostatski ili antiproliferativni efekat, kao i da li se navedeni efekti razlikuju između senzitivnih i MDR NSCLC ćelija. U tu svrhu korišćen je xCELLigence sistem, koji omogućava praćenje rasta ćelija u realnom vremenu na osnovu mjerenja napona koji stvaraju ćelije dok se umnožavaju, adheriraju i vrše pritisak na zlatne elektrode u pločama namijenjenim za pomenuta ispitivanja. Dobijeni rezultati (Slika 45A, C) su pokazali da oba jedinjenja tokom logaritamske faze rasta ispoljavaju antiproliferativni efekat prema NCI-H460/R ćelijama. Nasuprot tome, ova jedinjenja su ubrzala rast na senzitivnoj ćelijskoj liniji NCI-H460 u poređenju sa netretiranim kontrolnim ćelijama. Ova razlika potvrđena je i prosječnim IC_{50} vrijednostima određenim tokom logaritamske faze rasta, što ukazuje na izraženu kolateralnu senzitivnost NCI-H460/R ćelija (Slika 45B, D).

Kod NCI-H460 ćelija tretiranih jedinjenjima **213** i **217** faza platoa dostignuta je brže nego kod netretiranih kontrolnih ćelija, dok je naknadni pad ćelijskog rasta bio izraženiji u odnosu na kontrolne

ćelije (Slika 45A, C). Najizraženiji citotoksični efekat oba jedinjenja u NCI-H460 ćelijama uočen je nakon 119 sati, što odgovara četvorodnevnom tretmanu, imajući u vidu da je tretman započet nakon 24 sata perioda adaptacije ćelija. Nasuprot tome, u rezistentnim NCI-H460/R ćelijama, jedinjenja **213** i **217** su tokom logaritamske faze rasta ispoljila antiproliferativni efekat, dok je tokom faze platoa zabilježen citostatski efekat u poređenju sa netretiranim ćelijama. Naknadni pad ćelijskog rasta, koji ukazuje na citotoksično djelovanje, bio je manje izražen nego kod senzitivnih NSCLC ćelija (Slika 45A, C). Kolateralna senzitivnost jedinjenja **213** bila je izražena tokom logaritamske faze rasta, faze platoa i faze opadanja, dok je kod jedinjenja **217** zabilježena samo tokom logaritamske faze rasta ćelija (Slika 45B, D). Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima dobijenim MTT testom.



Slika 45. Praćenje efekta jedinjenja **213** i **217** u realnom vremenu na senzitivnim i rezistentnim ćelijama NSCLC. A) Dinamički profil rasta senzitivnih NCI-H460 i rezistentnih NCI-H460/R ćelija tretiranih jedinjenjem **213** u koncentracionom opsegu 1-25 μM; B) IC₅₀ vrijednosti za jedinjenje **213**, određene tokom logaritamske faze rasta, faze platoa i faze opadanja, na osnovu mjerenja sprovedenih u intervalima od 30 minuta; C) Analogne krive rasta obe ćelijske linije tretirane jedinjenjem **217** u koncentracijama od 1 do 25 μM; D) IC₅₀ vrijednosti za jedinjenje **217** na ćelijskim linijama NCI-H460 i NCI-H460/R. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija iz četiri nezavisna ponavljanja (n = 4).

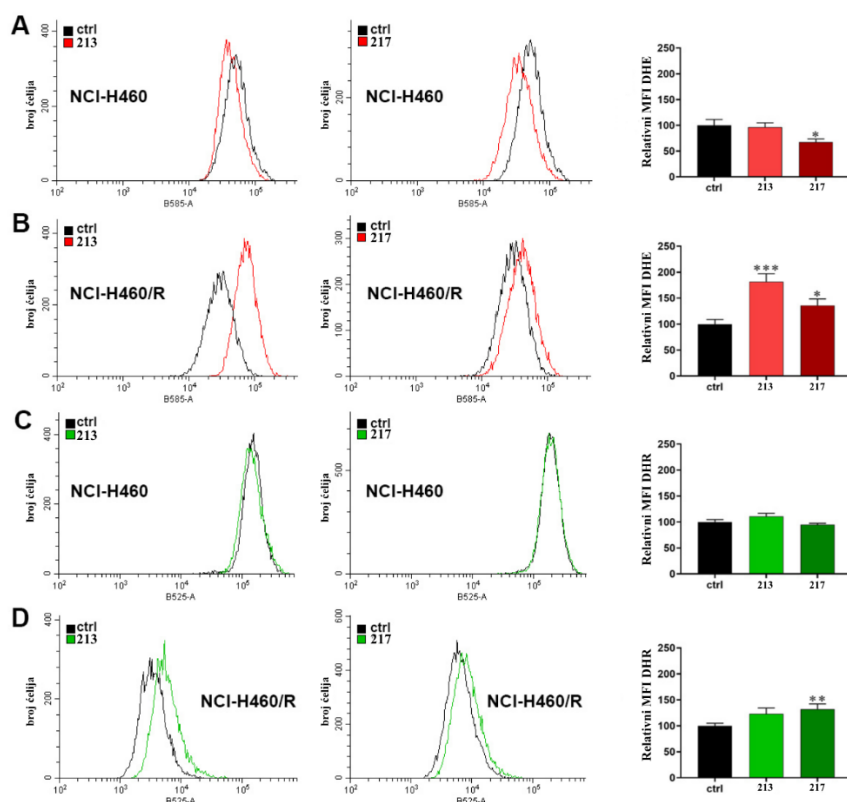
Reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) predstavljaju grupu visoko reaktivnih i nestabilnih radikalskih i neradikalskih vrsta koje nastaju nepotpunom redukcijom molekulskog kiseonika.²²⁷ U ROS spadaju neradikalske vrste, poput vodonik-peroksida (H₂O₂) i singletnog kiseonika, kao i radikalske vrste, u koje se ubrajaju superoksidni anjon (O₂^{•-}) i hidroksilni radikal (HO[•]). Superoksidni anjon radikal (O₂^{•-}) predstavlja primarnu reaktivnu kiseoničnu vrstu koja nastaje u ćelijama redukcijom molekulskog kiseonika, pri čemu može služiti kao prekursor drugih biološki značajnih oksidanasa, uključujući vodonik-peroksid (H₂O₂) i peroksinitrit (ONOO⁻).²²⁸

Među najčešće korišćenim jedinjenjima za detekciju superoksidnog anjona nalazi se dihidroetidijum (DHE), redoks-senzitivno jedinjenje koje u reakciji sa superoksidom formira specifične hidroksilovane proizvode, među kojima je najznačajniji 2-hidroksietidijum, fluorescentno jedinjenje sa maksimumom emisije na 585 nm.²²⁹ Na taj način omogućeno je selektivno praćenje njegove intracelularne produkcije, pri čemu povećanje srednjeg intenziteta fluorescencije ukazuje na povećanu produkciju superoksida u ćelijama. Dihidrorodamin (DHR) je korišćen za određivanje vodonik-peroksida (H_2O_2) i peroksinitrita ($ONOO^-$).²³⁰ Ova metoda se zasniva na oksidaciji DHR do fluorescentnog proizvoda, rodamina.

Jedan od mogućih mehanizama kolateralne senzitivnosti može biti povezan sa različitim redoks statusom i metaboličkim reprogramiranjem višestruko rezistentnih NCI-H460/R ćelija. Analiza protočnom citometrijom pokazala je da jedinjenja **213** i **217**, pri koncentraciji od 5 μM , nisu značajno povećala nivoe superoksidnih anjon radikala niti vodonik-peroksida/peroksinitrita u senzitivnim NCI-H460 ćelijama (Slika 46A, C). Zapaženo je, međutim, da je jedinjenje **217** dovelo do značajnog smanjenja koncentracije superoksidnih anjon radikala u ovim ćelijama (Slika 46A). Nasuprot tome, pri istoj koncentraciji, rezistentne NCI-H460/R ćelije pokazale su značajno povećanje DHE fluorescencije nakon 4 sata tretmana za oba jedinjenja, kao i povećanje DHR signala nakon 24 sata u poređenju sa netretiranim kontrolama, pri čemu je povećanje bilo naročito izraženo za jedinjenje **217** (Slika 46B, D).

Ovi rezultati ukazuju na postojanje redoks-specifične kolateralne senzitivnosti; rezistentne ćelije, uprkos pojačanim antioksidativnim odbrambenim mehanizmima, postaju osjetljive na povećanje nivoa reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (ROS/RNS), koje nije uočeno kod senzitivnih ćelija. Ovaj fenomen usko je povezan sa konceptom „redoks zavisnosti“ (engl. *redox addiction*) rezistentnih ćelija.²³¹ Kako bi se suprotstavile dejstvu konvencionalnih hemoterapeutika, ove ćelije povećavaju sintezu glutationa (GSH), pojačavaju protok nikotinamidadenindinukleotid-fosfata (NADPH) i podstiču ciklus metionina, kao što je prethodno opisano u literaturi.²³² Ovakvo metaboličko reprogramiranje dovodi do smanjenja bazalne produkcije ROS, pri čemu antioksidativni putevi funkcionišu na granici svojih kapaciteta. Posljedično, nakon izlaganja pro-oksidativnim jedinjenjima **213** i **217** dolazi do kolapsa GSH/NADPH puferskog sistema, što dovodi do značajnog povećanja nivoa ROS/RNS.

Sa terapijskog aspekta, iskorišćavanje ove ranjivosti MDR tumorskih ćelija predstavlja značajnu prednost. Jedinjenja **213** i **217** imaju potencijal da selektivno ciljaju i eliminišu rezistentne ćelijske klonove, uz istovremeno smanjenje oksidativnog oštećenja normalnih ćelija ili tumorskih ćelija osjetljivih na klasične hemoterapeutike.



Slika 46. Indukcija oksidativnog stresa jedinjenjima **213** i **217** na senzitivnim i rezistentnim NSCLC ćelijama. A) Generisanje superoksidnog anjona u NCI-H460 ćelijama nakon 4 sata tretmana jedinjenjima **213** i **217** (5 μ M), određeno protočnom citometrijom (fluorescencija DHE). B) produkcija superoksidnog anjona u NCI-H460/R ćelijama pod istim uslovima. C) nivoi vodonik-peroksida i peroksinitrita u NCI-H460 ćelijama nakon 24 sata tretmana sa **213** i **217** (5 μ M), određeni protočnom citometrijom (fluorescencija DHR). D) DHR analiza nivoa vodonik-peroksida/peroksinitrita u NCI-H460/R ćelijama nakon 24 sata tretmana. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM od $\geq 10\,000$ ćelija po uslovu. Fluorescencija je detektovana na 585 nm (DHE, crveni kanal) i 525 nm (DHR, zeleni kanal).

Kako bi se dodatno ispitala uloga P-gp u posredovanju ove senzitivnosti, oba jedinjenja su testirana u kombinaciji sa dva mehanistički različita inhibitora P-gp. Deksverapamil (Dex-Ver),²³³ inhibitor druge generacije i supstrat P-glikoproteina, smanjio je citotoksične efekte jedinjenja **213** i **217**, pri čemu je statistički značajna razlika postignuta samo u kombinaciji sa jedinjenjem **217** (Tabela 5 i Slika P16). Međutim, tarikvidar,²³³ inhibitor treće generacije koji nije supstrat za P-gp, je sinergizovao sa oba jedinjenja, pojačavajući njihovu citotoksičnost (Tabela 5 i Slika P16).

Razlike u efektima Dex-Ver-a i TQ mogu se pripisati njihovim različitim mehanizmima djelovanja. Dex-Ver vjerovatno kompetitivno ometa vezivanje ili transport ispitivanih jedinjenja preko P-glikoproteina, smanjujući njihovu intracelularnu akumulaciju i biološku aktivnost.²³⁴ S druge strane, TQ alosterno inhibira P-glikoprotein blokirajući njegovu ATPaznu aktivnost, što rezultuje potpunom inhibicijom efluksa i povećanim zadržavanjem ispitivanih jedinjenja unutar ćelije.²³⁵

Tabela 5. Citotoksični efekti jedinjenja **213** i **217** u prisustvu P-gp inhibitora.

Jedinjenja	IC ₅₀ ($\pm$ SD)	+Dex-Ver IC ₅₀ ($\pm$ SD)	<i>p</i> - vrijednost*	+TQ IC ₅₀ ($\pm$ SD)	<i>p</i> - vrijednost*
213	2168,64 $\pm$ 223,52	2966,21 $\pm$ 512,72	0,0983	1532,47 $\pm$ 174,83	0,0198
217	2127,49 $\pm$ 88,83	2799,40 $\pm$ 141,06	0,0041	1604,58 $\pm$ 121,36	0,0050

* *p*-vrijednost ukazuje na statistički značajne razlike između tretmana samim jedinjenjima i tretmana u kombinaciji sa Dex-Ver ili TQ koji su analizirani primjenom Welchovog *t*-testa.

U cilju procjene uticaja aktivnosti P-gp na efekat kolateralne senzitivnosti pod dejstvom **213** i **217**, sproveden je test akumulacije Rho123 nakon kombinovanog tretmana **213** i **217** sa Dex-Ver i TQ. Tretman jedinjenjima **213** i **217** doveo je do povećanja akumulacije Rho123 u NCI-H460/R ćelijama, što ukazuje na parcijalnu inhibiciju P-gp u poređenju sa akumulacijom Rho123 u NCI-H460 ćelijama, pri čemu je Cohen-ov d bio manji od -0,50 (Tabela 6 i Slika P17). Istovremena primjena sa Dex-Ver dodatno je povećala nivo akumulacije Rho123, uz Cohen-ov d veći od -0,50, što ukazuje na aditivni inhibitorski efekat (Tabela 6 i Slika P17). Međutim, u kombinaciji sa TQ, akumulacija Rho123 bila je uporediva sa onom postignutom primjenom samog TQ, uz Cohen-ov d približno 0, što sugerise da je P-gp već bio maksimalno inhibiran, dostižući nivo akumulacije Rho123 sličan onom u senzitivnim NCI-H460 ćelijama, tako da ispitivana jedinjenja nisu dodatno doprinijela ovom efektu (Tabela 6 i Slika P17).

Tabela 6. Poređenje akumulacije Rho123 u NCI-H460 ćelijama (pozitivna kontrola) sa rezistentnim NCI-H460 ćelijama nakon tretmana sa **213** i **217**, pojedinačno i u kombinaciji sa Dex-Ver i TQ.

Tretman	Srednja vrijednost $\pm$ SD (n)	Srednja razlika u odnosu na kontrolu	95% interval pouzdanosti razlike	<i>t</i> -vrijednost*	<i>p</i> -vrijednost*	Cohenov d [#]	Tumačenje
NCI-H460	953341,2 $\pm$ 327848,3 (9719)	-	-	-	-	-	-
NCI-H460/R	138820,9 $\pm$ 114479,7 (9801)	-814520,3	[-827931,6 -801109,0]	-93,2	< 0,0001	-2,49	izrazito smanjena akumulacija
213	634309,8 $\pm$ 249426,8 (9844)	-319031,4	[-331312,2 -306750,6]	-41,7	< 0,0001	-0,97	značajno smanjena
217	740278,1 $\pm$ 324606,3 (9650)	-213063,1	[-226620,9 -199505,3]	-27,3	< 0,0001	-0,65	značajno smanjena
Dex-Ver	715094,9 $\pm$ 299634,6 (9696)	-238246,3	[-250805,2 -225687,4]	-30,1	< 0,0001	-0,73	značajno smanjena
213 + Dex-Ver	807073,4 $\pm$ 351138,1 (9726)	-146267,8	[-159825,6 -132710,0]	-22,5	< 0,0001	-0,45	umjereno smanjen ^{aditivni efekat}
217 + Dex-Ver	879754,1 $\pm$ 376865,0 (9665)	-73587,1	[-87144,9 -60029,3]	-10,5	< 0,0001	-0,22	blago smanjena ^{aditivni efekat}
TQ	975155,6 $\pm$ 407657,0 (9445)	+21814,4	[4928,9 38699,9]	2,52	0,012	+0,05	blago veći nego u NCI-H460 ćelijama
213 + TQ	952507,9 $\pm$ 396877,7 (9666)	-833,3	[-17429,3 +15762,7]	-0,10	0,92	~0	statistički ekvivalentno
217 + TQ	977466,9 $\pm$ 401371,3 (9667)	+24125,7	[7239,2 41012,2]	2,76	0,006	+0,06	blago veći nego u NCI-H460 ćelijama

*Welchov *t*-test je korišćen za poređenje srednjih vrijednosti akumulacije Rho123 između senzitivnih NCI-H460 ćelija i različitih tretmana primijenjenih na NCI-H460/R ćelije. Ovaj test je pogodan za poređenje grupa sa nejednakim veličinama uzoraka ili različitim varijansama. *t*-vrijednost pokazuje veličinu i smjer razlike između srednjih vrijednosti grupa, pri čemu veća apsolutna *t*-vrijednost ukazuje na izraženiju razliku. *p*-vrijednost predstavlja vjerovatnoću da takva razlika nastane slučajno ako ne postoji pravi efekat pri čemu se *p*-vrijednost ispod 0,05 smatra statistički značajnom.

[#]Cohenov d je statistička mjera koja se koristi za označavanje veličine efekta kojom se procjenjuje razlika između senzitivnih NCI-H460 ćelija i različitih tretmana primijenjenih na rezistentnim NCI-H460/R ćelijama. Što je vrijednost Cohenovog d dalje od nule, to je veća jačina efekta bez obzira na njegov smjer. Pozitivne vrijednosti ukazuju na povećanu akumulaciju u odnosu na NCI-H460, dok negativne vrijednosti ukazuju na smanjenu akumulaciju takođe u odnosu na NCI-H460.

Ovi rezultati potvrđuju da oba jedinjenja ostvaruju interakciju sa P-gp i utiču na njegovu aktivnost, iako sa manjim intenzitetom u poređenju sa TQ. Aditivni efekat koji je uočen u kombinaciji sa Dex-Ver ukazuje na moguće zajedničko mjesto vezivanja ili transportni mehanizam, dok odsustvo dodatnog efekta u kombinaciji sa TQ sugerise da je postignuta maksimalna inhibicija P-gp.

Imajući u vidu navedeno, može se zaključiti da je fenomen kolateralne senzitivnosti jedinjenja **213** i **217** složene prirode. Poznato je da ćelije sa povećanom ekspresijom P-gp pokazuju veću osjetljivost na oksidativni i druge oblike ćelijskog stresa,²³⁶ a ispitivana jedinjenja mogu dodatno pojačati ovaj efekat.

Zanimljivo je da, iako Dex-Ver povećava akumulaciju Rho123, istovremeno smanjuje citotoksičnost ispitivanih jedinjenja. Ovaj rezultat ukazuje da određeni stepen aktivnosti P-gp može biti neophodan za ispoljavanje kolateralne senzitivnosti, vjerovatno održavanjem specifičnog nivoa metaboličkog stresa. Nasuprot tome, TQ, koji u potpunosti blokira aktivnost P-gp, ispoljava sinergističko dejstvo sa ispitivanim jedinjenjima. To ukazuje na mogućnost da konformacione promjene P-gp ili ćelijski stres izazvan djelovanjem TQ dodatno pojačavaju citotoksičnost jedinjenja **213** i **217**.

3.6. *In silico* proračuni za jedinjenje **217**

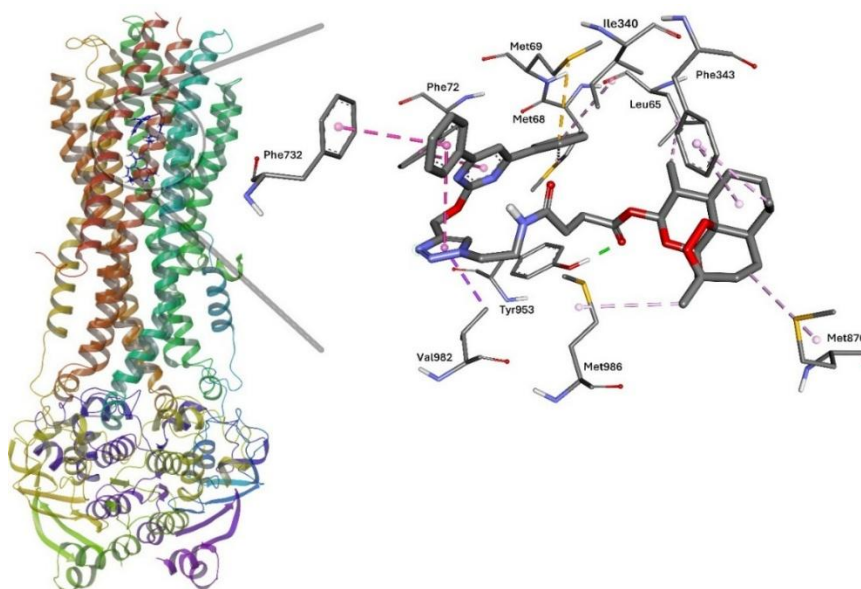
Kako bi se ispitala sposobnost jedinjenja **217** da se veže za P-gp i konkuriše deksverapamilu (Dex-Ver), sprovedeno je molekulsko dokovanje Dex-Ver-a i **217** u vezivnom mjestu verapamila u tri strukture P-gp sa vezanim verapamilom: 8SA0, 8SA1 i 8SB7. Analiza molekulskog dokovanja Dex-Ver-a i većeg, strukturno različitog jedinjenja **217**, u tri navedene strukture P-gp jasno je pokazala da oba jedinjenja mogu da zauzimaju isto centralno vezivno mjesto.

Uprkos tome, najbolje dokovane pozicije pokazuju da, zbog razlika u hemijskoj strukturi i veličini, ova jedinjenja ne ostvaruju interakcije sa identičnim skupom aminokiselinskih ostataka. Ovakvo ponašanje nije neuobičajeno kod visoko fleksibilnih i polispecifičnih transportnih proteina kao što je P-gp, kod kojih različiti supstrati mogu zauzimati istu opštu veznu šupljinu, ali se vezuju putem različitih, djelimično preklapajućih skupova aminokiselinskih ostataka.

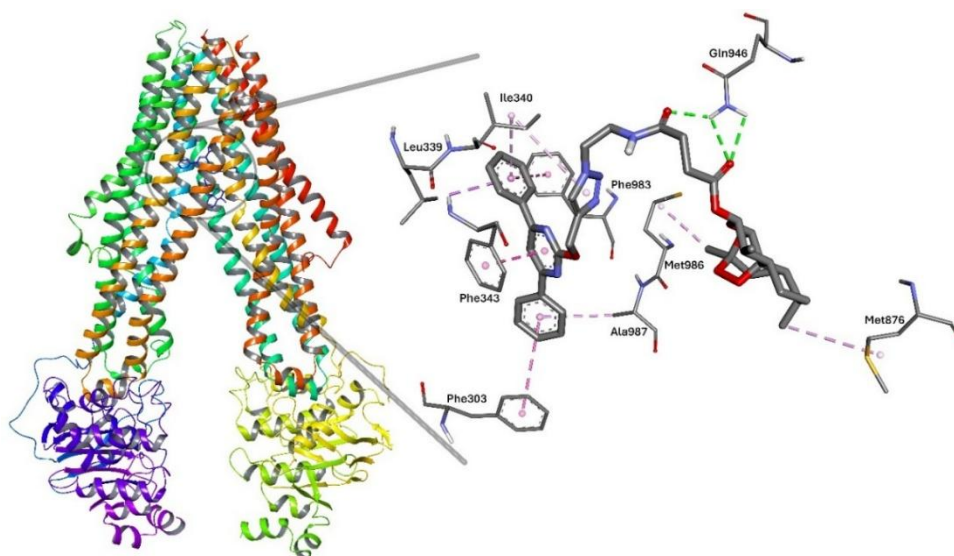
Jedinjenje **217** pokazalo je veći predviđeni afinitet vezivanja u svim ispitivanim konformacijama, sa doking skorovima od $-11,027$ za 8SA0 (Slika 47), $-11,023$ za 8SA1 (Slika 48) i $-10,087$ za 8SB7 (Slika P18D), u poređenju sa Dex-Ver skorovima od $-8,674$, $-7,421$ i $-9,734$, respektivno (Slike P18A, C i B). Ova kombinacija kompetitivnog zauzimanja istog vezivnog mjesta i različitih energija vezivanja ukazuje da **217**, zahvaljujući većim dimenzijama i specifičnim strukturnim karakteristikama, ostvaruje drugačije, povoljnije specifične interakcije unutar zajedničkog, multifunkcionalnog vезnog domena P-gp.

Rezultati molekulskog dokovanja ukazuju da se **217** vezuje za verapamil vezivno mjesto P-glikoproteina sa većim afinitetom od Dex-Ver, kako u zatvorenoj tako i u *inward-open* konformaciji. Snažna interakcija između **217** i P-gp objašnjava povećanu akumulaciju Rho123 u kombinaciji sa Dex-Ver. Čvršćim vezivanjem unutar vezivnog džepa, jedinjenje **217** može djelimično kompetitivirati Dex-Ver za vezivno mjesto ili zauzeti susjedne poddomene, čime efikasnije stabilizuje P-gp u *inward-open* konformaciji i otežava oslobađanje supstrata efikasnije u odnosu na Dex-Ver primijenjen samostalno. Kao rezultat toga dolazi do povećanog intracelularnog zadržavanja Rho123.

Međutim, prema dobijenim rezultatima, kombinacija jedinjenja **217** sa Dex-Ver dovodi do smanjenja citotoksičnosti jedinjenja **217**. Na osnovu navedenog, pretpostavlja se da Dex-Ver i **217** mogu dijeliti i međusobno se nadmetati za vezivna mjesta i na drugim molekulima uključenim u regulaciju ROS/RNS i ćelijske smrti, što za posljedicu ima smanjenje citotoksičnog efekta jedinjenja **217**.



Slika 47. Jedinjenje **217** dokovano u vezivno mjesto zatvorene konformacije P-gp (PDB ID: 8SA0) sa detaljnim prikazom interakcija sa aminokiselinskim ostacima u vezivnom mjestu.



Slika 48. Jedinjenje **217** dokovano u vezivno mjesto konformacije *inward-facing 2* P-gp (PDB ID: 8SA1) sa detaljnim prikazom interakcija sa aminokiselinskim ostacima u vezivnom mjestu.

3.7. Određivanje antitumorske aktivnosti derivata artesunata sa 1,2,3-triazolom na ćelijama glioblastoma

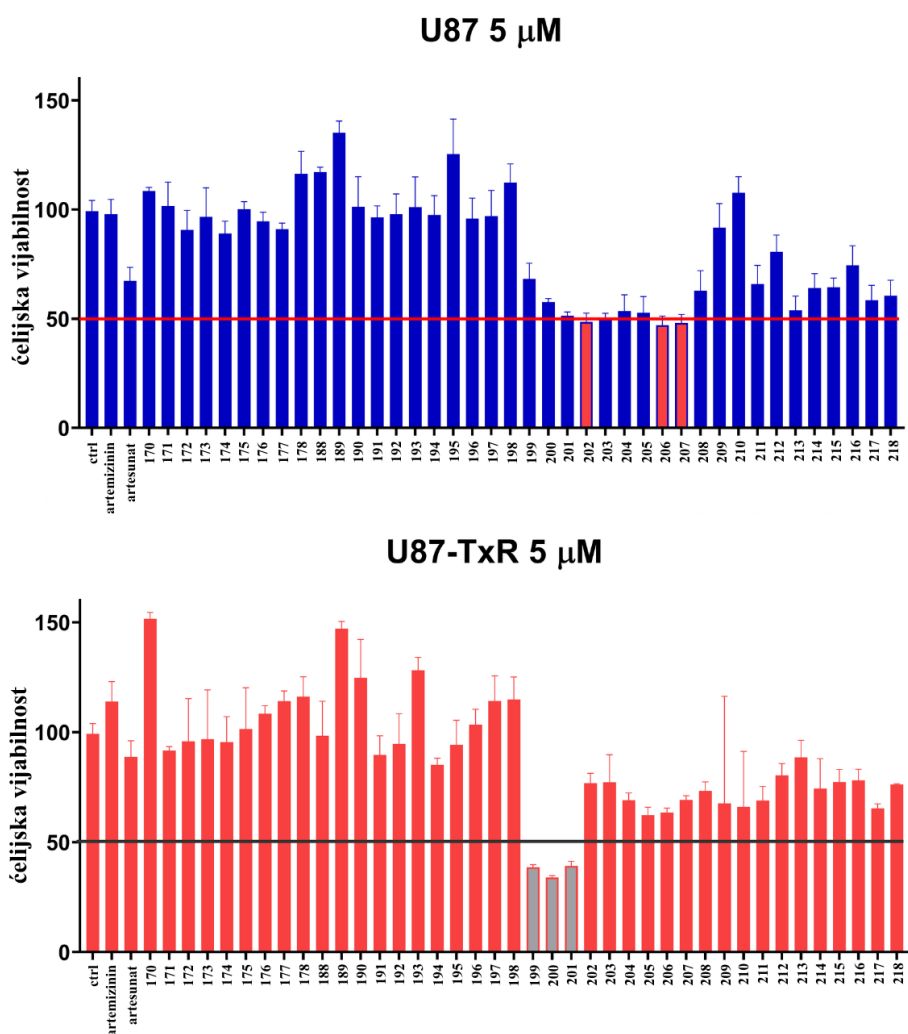
Preliminarno ispitivanje antitumorske aktivnosti derivata pirimidina **170–178**, **188–196**, **215–216**, kao i hibridnih jedinjenja artesunata **197–205**, **206–214** i **217–218**, koji u svojoj strukturi sadrže 1,2,3-triazolski fragment, je takođe sprovedeno na dvije ćelijske linije humanog glioblastoma (U87 i U87-TxR). Ćelijska linija U87-TxR pokazuje rezistentni fenotip, povezan sa prekomjernom ekspresijom P-glikoproteina, a dobijena je selekcijom od U87 ćelijske linije nakon kontinuiranog izlaganja U87 ćelija postepeno rastućim koncentracijama paklitaksela u toku 9 mjeseci.²³⁷

Ispitivanje citotoksičnosti, primjenom MTT esaja pri koncentraciji od 5 μ M, pokazalo je da većina sintetisanih jedinjenja ne dovodi do značajnog smanjenja vijabilnosti U87 ćelija nakon 72 sata tretmana (Slika 49). Samo nekoliko jedinjenja (**202**, **206**, **207**) je dovelo do smanjenja vijabilnosti ćelija ispod 50% na U87 ćelijskoj liniji. Rezistentna ćelijska linija U87-TxR pokazala je veću osjetljivost na pojedina jedinjenja u odnosu na senzitivnu U87 liniju, pri čemu su najizraženiji efekat

na ovim ćelijama ispoljila jedinjenja: **199, 200 i 201**, dok su ostala ispitivana jedinjenja održala ćelijsku vijabilnost iznad 50%

Artemizinin, kao ni artesunat, nisu pokazali značajnu aktivnost prema senzitivnoj i prema rezistentnoj ćelijskoj liniji glioblastoma, pri čemu su pojedini hibridni derivati bili aktivniji što ukazuje na uticaj strukturne modifikacije na poboljšanje biološke aktivnosti (Slika 49). Takođe, hibridna jedinjenja artesunata **197–205, 206–214 i 217–218** su ispoljila potentniju antitumorsku aktivnost i na senzitivnoj kao i na rezistentnoj ćelijskoj liniji glioblastoma kada se porede sa pirimidinskim derivatima **170–178, 188–196, 215–216**.

Hibridi artesunata su pokazali antitumorsko dejstvo zavisno od tipa tumorskih ćelija. Sveobuhvatno gledano, 20 hibridnih jedinjenja dovode do kolateralne senzitivnosti višestruko rezistentnih NSCLC ćelija, dok je efekat na ćelije glioblastoma slabiji i samo tri hibrida se izdvajaju kao kandidati za detaljnije ispitivanje fenomena kolateralne senzitivnosti. Kako broj aktivnih jedinjenja nije dovoljan za uspostavljanje pouzdane SAR analize na ćelijama glioblastoma, dalja mehanistička istraživanja antitumorskog dejstva bila su usmjerena na NSCLC ćelije.



Slika 49. Uticaj artemizininina, artesunata, derivata pirimidina **170–178, 188–196, 215 i 216** kao i hibridnih jedinjenja artesunata **197–205, 206–214, 217 i 218** na vijabilnost ćelija glioblastoma nakon 72 sata tretmana. Jedinjenja su testirana pri koncentraciji od 5 μ M na senzitivnim U87 i rezistentnim U87-TxR ćelijama, korišćenjem MTT testa. Vijabilnost netretiranih kontrolnih ćelija prikazana je kao 100%. Horizontalna linija označava granicu od 50% vijabilnih ćelija, a sivi stubići ukazuju na jedinjenja sa većom citotoksičnošću kod rezistentnih U87-TxR ćelija.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

Tačke topljenja određivane su na aparatu Boetius PMHK i nisu korigovane. IC spektri su snimani na Thermo-Scientific Nicolet 6700 FT-IR "diamond crystal" spektrofotometru. Položaji apsorpcionih traka izraženi su u cm^{-1} . ^1H NMR i ^{13}C NMR spektri snimani su na Varian spektrometru (na 400 MHz i 100 MHz) i Bruker Ultrashield AVANCE III spektrometru (na 500 MHz i 125 MHz) u navedenom rastvaraču. Hemijska pomjeranja izražena su u ppm, konstante kuplovanja (J) u Hz, a multiplicitet signala je označen kao s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), dd (dublet dubleta), dt (dublet tripleta), td (triplet dubleta), brs (prošireni singlet) i m (multiplet). Optička aktivnost je mjerena na automatskom polarimetru Rudolph Research Analytical Autopol IV sa natrijumovom lampom (589 nm) i ćelijom za mjerenje od 10 cm. Kao rastvarač za polarimetrijska određivanja korišćeni su dihlormetan ili metanol. HRMS-HESI spektri snimani su na Q Exactive Plus (ThermoFisher Scientific, Inc., Bremen, Germany) masenom spektrometru opremljenom zagrijanim izvorom HESI-II. Jonizacija je vršena u pozitivnom modu na zagrijanoj sondi za eletrosprej jonizaciju. Korišćeni su sledeći HESI parametri: napon spreja + 3,5 kV, temperatura kapilare 320 °C, protok gasa za sušenje i pomoćnog gasa 36 i 11 a. u. (*arbitrary units*), respektivno, S-Lens RF nivo 50,00. HRMS-HESI spektri snimani su i na LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) masenom spektrometru. Uzorci su rastvoreni u acetonitrilu (HPLC čistoće) i direktno injektovani u instrument. Jonizacija je vršena u pozitivnom modu na zagrijanoj sondi za eletrosprej jonizaciju. Korišćeni su sledeći HESI parametri: napon spreja + 4.7 kV, temperatura isparivača 60 °C, protok gasa za sušenje i pomoćnog gasa 24 i 10 a.u., respektivno, napon kapilare 49 V, temperatura kapilare 275 °C, napon sočiva na cijevi 80 V, rezolucija (za m/z 400): 30 000. Takođe, za sintetisana jedinjenja HRMS-HESI spektri snimani su i na OrbitrapExploris 240 masenom spektrometru. Uzorci su rastvoreni u metanolu (HPLC čistoće) i direktno injektovani u instrument. Jonizacija je vršena u pozitivnom modu na zagrijanoj sondi za eletrosprej jonizaciju. Korišćeni su sledeći HESI parametri: napon spreja + 3600 V, temperatura isparivača 40 °C, protok gasa za sušenje i pomoćnog gasa 5 i 0,3 a.u., respektivno, rezolucija (za m/z 200): 45 000. Za tankoslojnu hromatografiju korišćene su ploče SiO_2 i RP-18 (Merck). Za *dry-flash* hromatografiju korišćen je SiO_2 (0,018–0,032 mm). Čistoća jedinjenja određivana je pomoću Agilent 1200 HPLC sistema opremljenog pumpom Quat Pump (G1311B), injektorom (G1329B, 1260 ALS, TCC 1260 (G1316A) i detektorom 1260 DAD VL+ (G1315C). HPLC čistoća svih biološki ispitanih jedinjenja određena je pomoću dve različite metode. Hromatogram je sniman na UV maksimumu ispitivanog jedinjenja (254 nm) da bi se ostvarila maksimalna selektivnost. Korišćeni su rastvori jedinjenja u metanolu konačne koncentracije ~1 mg/mL.

Metoda A. Kolona InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, $4,6 \times 100$ mm, $2,7 \mu\text{m}$, S.N. USKBM01053 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Brzina protoka iznosila je 0,6 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 6 min 95% A → 5% A, 6 – 12 min 5% A, 12 – 14 min 5% A → 95% A, 14 – 15 min 95% A.

Metoda B. Kolona InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, $4,6 \times 100$ mm, $2,7 \mu\text{m}$, S.N. USKBM01053 was used as the stationary phase. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Brzina protoka iznosila je 0,6 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 6 min 95% A → 5% A, 6 – 12 min 5% A, 12 – 14 min 5% A → 95% A, 14 – 15 min 95% A.

Metoda C. Kolona ZORBAX Eclipse Plus C18, $4,6 \times 150$ mm, $1,8 \mu\text{m}$, S.N. USWKY01594 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 6 min 95% A → 5% A, 6 – 12 min 5% A, 12 – 14 min 5% A → 95% A, 14 – 15 min 95% A.

Metoda D. Kolona ZORBAX SB-C18, $4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$, S.N. USCM074615 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 6 min 95% A $\rightarrow$ 5% A, 6 – 12 min 5% A, 12 – 14 min 5% A $\rightarrow$ 95% A, 14 – 15 min 95% A.

Metoda E. Kolona ZORBAX SB-C18, $4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$, S.N. USCM074615 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Brzina protoka iznosila je 0,6 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 6 min 95% A $\rightarrow$ 5% A, 6 – 11 min 5% A, 11 – 14 min 5% A $\rightarrow$ 95% A, 14 – 17 min 95% A.

Metoda F. Kolona ZORBAX SB-C18, $4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$, S.N. USCM074615 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Brzina protoka iznosila je 0,6 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 5 min 95% A $\rightarrow$ 5% A, 5 – 12 min 5% A, 12 – 15 min 5% A $\rightarrow$ 95% A, 15 – 17 min 95% A.

Metoda G. Kolona InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, $4,6 \times 100$ mm, $2,7 \mu\text{m}$, S.N. USKBM01053 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 6 min 95% A $\rightarrow$ 5% A, 6 – 12 min 5% A, 12 – 14 min 5% A $\rightarrow$ 95% A, 14 – 15 min 95% A.

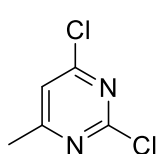
Metoda H. Kolona ZORBAX SB-C18, $4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$, S.N. USCM074615 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 8 min 95% A $\rightarrow$ 5% A, 8 – 12 min 5% A, 12 – 14 min 5% A $\rightarrow$ 95% A, 14 – 17 min 95% A.

Metoda I. Kolona ZORBAX SB-C18, $4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$, S.N. USCM074615 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Brzina protoka iznosila je 0,6 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 6 min 95% A $\rightarrow$ 5% A, 6 – 12 min 5% A, 12 – 14 min 5% A $\rightarrow$ 95% A, 14 – 15 min 95% A.

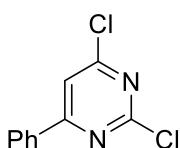
Metoda J. Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, $4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$, USKH161360 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Brzina protoka iznosila je 1 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 6 min 95% A $\rightarrow$ 5% A, 6 – 12 min 5% A, 12 – 14 min 5% A $\rightarrow$ 95% A, 14 – 15 min 95% A.

Metoda K. Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, $4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$, USKH161360 je korišćena kao stacionarna faza. Eluent su činili sledeći rastvarači: 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Brzina protoka iznosila je 1 mL/min. Jedinjenja su eluirana korišćenjem gradijenta: 0 – 1 min 95% A, 1 – 6 min 95% A $\rightarrow$ 5% A, 6 – 12 min 5% A, 12 – 14 min 5% A $\rightarrow$ 95% A, 14 – 15 min 95% A.

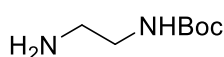
Jedinjenja 2,4-dihlor-6-metilpirimidin **86**,²³⁸ 2,4-dihlor-6-fenilpirimidin **87**,²⁰⁸ N-Boc-etilendiamin **104**,²³⁹ 1-Boc-piperazin **117**²⁴⁰ i 2-azidoetanol²⁴¹ sintetisana su prema procedurama prethodno prijavljenim u literaturi.



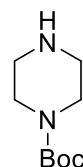
86



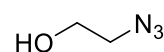
87



104



117



Dihidroartemiznin **31** i artesunat **32** su sintetisani prema proceduri koja je opisana u literaturi sa malim modifikacijama, polazeći iz artemizina.^{242,243}

Artemizinin **30** (50 mg, 0,18 mmol) je rastvoren u metanolu (0,55 mL), nakon čega je natrijum-borhidrid (20 mg, 0,54 mmol) postepeno dodavan u porcijama na temperaturi od 0 – 5 °C tokom 10 minuta. Reakciona smješa je zatim miješana 90 minuta pod istim uslovima. Po završetku reakcije, smješa je neutralisana dodatkom sirćetne kiseline do pH 6-7, razblažena dodatkom dihlormetana (10 mL) i isprana redom vodom (2 × 20 mL) i zasićenim vodenim rastvorom NaCl (20 mL). Organski rastvor je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄ i isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Dobijen je željeni proizvod, dihidroartemizinin **31** (49 mg, 98%) u obliku bezbojne čvrste supstance koji je korišćen u sledećoj fazi bez dodatnog prečišćavanja.

U rastvor dihidroartemizina **31** (49 mg, 0,17 mmol) u dihlormetanu (3,7 mL) dodati su anhidrid čilibarne kiseline (27 mg, 0,27 mmol) i imidazol (13,9 mg, 0,2 mmol). Reakciona smješa je miješana 3 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodat 1 M rastvor hlorovodonične kiseline do postizanja pH 3. Smješa je razblažena dodatkom dihlormetana (20 mL), isprana redom vodom (2 × 10 mL) i zasićenim vodenim rastvorom NaCl (20 mL) i organski rastvor je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom i dobijen je artesunat **32**, koji je bez dodatnog prečišćavanja direktno korišćen u narednom koraku.

IC (ATR): $\nu = 2931, 2874, 2654, 2542, 1743, 1713, 1452, 1423, 1378, 1363, 1311, 1282, 1267, 1253, 1202, 1161, 1132, 1100, 1052, 1036, 1015, 943, 927, 878, 847, 826, 803, 731, 702, 639, 619, 584, 549, 509, 487, 450 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 5,77$ (d, $J = 9,8 \text{ Hz}$, 1H), $5,54$ (s, 1H), $2,74 - 2,54$ (m, 4H), $2,51 - 2,42$ (m, 1H), $2,33$ (td, $J = 14,0 \text{ Hz}$, $J = 4,0 \text{ Hz}$, 1H), $2,05$ (dt, $J = 14,6 \text{ Hz}$, $J = 4,0 \text{ Hz}$, 1H), $1,95 - 1,88$ (m, 1H), $1,81 - 1,70$ (m, 2H), $1,61$ (dt, $J = 13,8 \text{ Hz}$, $J = 4,3 \text{ Hz}$, 1H), $1,54 - 1,39$ (m, 3H), $1,36$ (s, 3H), $1,29 - 1,22$ (m, 1H), $1,09 - 1,01$ (m, 1H), $0,97$ (d, $J = 6,3 \text{ Hz}$, 3H), $0,87$ (d, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): $\delta = 175,8; 172,9; 105,6; 93,7; 92,9; 81,4; 53,0; 46,6; 38,3; 37,3; 35,3; 33,1; 30,1; 29,5; 25,9; 25,8; 22,8; 20,6; 12,3 \text{ ppm}$.

Opšta procedura A – reakcija Suzuki-Miyaura ukrštenog kuplovanja²¹²

U rastvor Pd(OAc)₂ (0,05 ekv.) u DME (7,5 mL/mmol) dodan je PPh₃ (0,10 ekv.) i poslije 2 minuta miješanja na sobnoj temperaturi, u atmosferi argona, u rastvor je dodan odgovarajući 2,4-dihlorpirimidin **85–87** (1,0 ekv.) i rastvor Na₂CO₃ (3,1 ekv.) u H₂O (1,5 mL/mmol). Poslije 5 minuta miješanja na sobnoj temperaturi u reakcionu smjesu je dodana arilboronska kiselina **88–92** (1,0 ekv.). Reakciona smjesa je zagrijavana na 95 °C tokom 3 sata. Nakon hlađenja do sobne temperature, rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, reakciona smješa je razblažena dodatkom dihlormetana (20 mL) i isprana redom vodom (2 × 20 mL) i zasićenim vodenim rastvorom NaCl (20 mL). Organski rastvor je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄ i isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

*Jedinjenja 4-(2-hlorpirimidin-4-il)benzonitril i 4-(2-hlor-6-metilpirimidin-4-il)benzonitril dobijena su prema opštoj proceduri A za Suzukijevu reakciju, međutim, zbog prisustva nečistoća nije bilo moguće izvršiti njihovu adekvatnu karakterizaciju NMR spektroskopijom. Sirovi reakcioni proizvod je direktno upotrebljen u sledećem reakcionom koraku.

Opšta procedura B za sintezu Boc-zaštićenih amino derivata pirimidina

U balon, opremljen povratnim kondenzatorom, dodat je pirimidinski derivat **93–100/102** (1,0 ekv.), odgovarajući *N*-Boc-zaštićeni amin **104/117** (3,0 ekv.), K₂CO₃ (1,2 ekv.) i 1,4-dioksan (7,6

mL/mmol). Dobijena smješa je miješana uz refluks u uljanom kupatilu tokom 20 sati. Nakon hlađenja do sobne temperature, reakciona smješa je procijeđena kroz *Hirsch*-ov lijevak i isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura C za deprotekciju amina

U reakcioni balon su odmjereni **105–110/118–130** (1,0 ekv.), dihlormetan (21,4 mL/mmol) i trifluorsirćetna kiselina (16,0 ekv.). Reakciona smješa je miješana na sobnoj temperaturi u toku 18 sati. Nakon toga, pH vrijednost reakcione smješe je podešena na 8 dodatkom zasićenog vodenog rastvora NaHCO₃. Reakciona smješa je razblažena dodatkom dihlormetana (20 mL) i isprana redom vodom (2 × 20 mL) i zasićenim vodenim rastvorom NaCl (20 mL). Organski rastvor je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄ i isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod je korišćen u sledećoj fazi bez potrebe za dodatnim prečišćavanjem.

Opšta procedura D²¹⁷

Artesunat **32** (1,0 ekv.) je rastvoren u dihlormetanu (14,7 mmol/mL) i zatim su dodani EDCI hidrohlorid (1,0 ekv.) i HOBt monohidrat (1,0 ekv.). Reakciona smješa je miješana na sobnoj temperaturi u toku sat vremena, a zatim je dodat odgovarajući pirimidinski derivat **111–116/131–143** (1,0 ekv.) i dobijena smješa je miješana na sobnoj temperaturi preko noći. Reakciona smješa je razblažena dodatkom dihlormetana (30 mL) i isprana redom vodom (2 × 15 mL) i zasićenim vodenim rastvorom NaCl (30 mL). Organski rastvor je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄ i isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura E za reakciju alkilovanja²⁴⁴

U rastvor aaminskih derivata pirimidina **131–133/136–138/141–143** (1,0 ekv.) u EtOAc (5,3 mL/mmol) dodat je K₂CO₃ (2,0 ekv.), a zatim je dodat propargil-bromid (1,2 ekv, 80% rastvor u toluenu). Dobijena smješa je miješana na sobnoj temperaturi u toku noći. Nakon što je utvrđeno da je reakcija završena (TLC), u reakcionu smješu je dodana voda i rastvor je miješan na sobnoj temperaturi u toku 30 minuta. Reakciona smješa je razblažena dodatkom EtOAc (20 mL) i isprana redom vodom (2 × 10 mL) i zasićenim vodenim rastvorom NaCl (20 mL). Organski rastvor je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄ i isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura F za klik reakciju

U rastvor odgovarajućeg alkinskog derivata pirimidina **161–169/179–187** (1,0 ekv.) i 2-azidoetanola (1,2 ekv.) u smjesi rastvarača MeOH:CH₂Cl₂ (0,06 M, 1:1, v/v), dodata je suspenzija CuSO₄ × 5H₂O (20 mol%) i natrijum-askorbata (50 mol%) u vodi (1,5 mL/0,35 mmol **161–169** ili **179–187**). Dobijena smješa je miješana na sobnoj temperaturi u toku 1-5 sati. Nakon završetka reakcije, isparljive komponente reakcione smješe uklonjene su pod sniženim pritiskom, a u ostatak u balonu dodati su CH₂Cl₂ (30 mL) i H₂O (30 mL). Organski rastvor je odvojen, a vodeni rastvor je ekstrahovan sa CH₂Cl₂ (2 × 30 mL). Spojeni organski rastvori isprani su zasićenim vodenim rastvorom NaCl (30 mL). Organski rastvor je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄ i isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura G za reakciju nukleofilne aromatične supstitucije sa propargil-alkoholom

U rastvor odgovarajućeg pirimidinskog derivata **93–95/97–99/101–103** (1,0 ekv.) u acetonitrilu (3,9 mL/mmol) redom su dodati KO^tBu (1,2 ekv.) i propargil-alkohol (3 ekv.). Reakciona smješa je miješana i zagrijavana na 80 °C u uljanom kupatilu tokom 1-5 sati. Nakon hlađenja do sobne temperature, reakciona smješa je razblažena dodatkom CH₂Cl₂ (20 mL) i isprana redom vodom (20

mL) i zasićenim vodenim rastvorom NaCl (30 mL). Organski rastvor je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄ i isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura H za sintezu amina 215 i 216^{245,246}

Rastvor pirimidinskih derivata, **194/195** (1,0 ekv.), u anhidrovanom THF (8 mL/mmol) je ohlađen na 0 °C i zatim je dodan PPh₃ (2,0 ekv.). Reakciona smješa je miješana na sobnoj temperaturi u toku 5 minuta i nakon dodatka DIAD (2,0 ekv.) i DPPA (2,0 ekv.) reakciona smješa je zagrijana do sobne temperature i nastavljeno je sa miješanjem u toku 18 sati. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, smješa je procijeđena kroz tanak sloj silika gela i sirov proizvod je korišćen u sledećoj fazi bez dodatnog prečišćavanja.

U rastvor odgovarajućeg azidnog derivata pirimidina iz prethodne faze (1,0 ekv.) u THF (3,3 mL/mmol) dodan je PPh₃ (1,0 ekv.). Reakciona smješa je miješana na 67 °C u toku 2 sata. Nakon konverzije azida, dodana je voda (3,3 mL/mmol) i nastavljeno je sa miješanjem u toku 20 sati na istoj temperaturi. Nakon što je utvrđeno da je reakcija završena (TLC), isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂ (MeOH).

Opšta procedura I za sintezu estarskih derivata¹²⁸

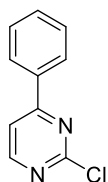
U rastvor odgovarajućih pirimidinskih derivata, **170–178/188–196** (1,0 ekv.), u acetonitrilu (30 mL/mmol) dodani su artesunat **32** (1,3 ekv.), DMAP (50 mol%) i molekulska sita. Reakciona smješa je ohlađena na 0 °C i zatim je dodan DCC (1,3 ekv.). Dobijena smješa je miješana na sobnoj temperaturi u toku noći. Nakon što je utvrđeno da je reakcija završena (TLC), reakciona smješa je procijeđena kroz filter papir kako bi se uklonio DCU koji nastaje u toku reakcije i isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂ (EtOAc/MeOH = 8/2 za jedinjenja **197–205** i heksan/EtOAc = 2/8 za jedinjenja **206–214**).

Opšta procedura J za sintezu amidnih derivata²⁴³

Odgovarajući pirimidinski derivat **215/216** (1,0 ekv.) je rastvoren u dihlormetanu (30 mL/mmol), a zatim su dodani artesunat (1,0 ekv.), DMAP (1,0 ekv.), EDCI (1,0 ekv.) i molekulska sita. Dobijena smješa je miješana na sobnoj temperaturi u toku noći. Nakon što je utvrđeno da je reakcija završena isparljive komponente su uklonjene pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂ (heksan/EtOAc = 2/8).

Karakterizacija sintetisanih jedinjenja:

2-Hlor-4-fenilpirimidin (93)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlorpirimidina **85** (150 mg, 1,01 mmol) i fenilboronske kiseline **88** (123 mg, 1,01 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1), dobijeno je jedinjenje **93** (141 mg, 73%). Bezbojna čvrsta supstanca.

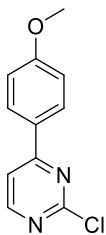
t.t. 85 – 87 °C

IC (ATR): ν = 3141, 3110, 3065, 3043, 3018, 2985, 2918, 1610, 1601, 1571, 1532, 1496, 1450, 1421, 1347, 1288, 1182, 1119, 1070, 999, 985, 860, 841, 816, 784, 750, 706, 687, 623, 466, 423 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,63 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,09 (d, J = 6,7 Hz, 2H), 7,64 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,57 – 7,48 (m, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 167,3; 162,0; 160,0; 135,2; 132,0; 129,3; 127,6; 115,3 ppm.

2-Hlor-4-(4-metoksifenil)pirimidin (94)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlorpirimidina **85** (150 mg, 1,01 mmol) i (4-metoksifenil)boronske kiseline **89** (153 mg, 1,01 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 6/4), dobijeno je jedinjenje **94** (174 mg, 78%). Bezbojna čvrsta supstanca.

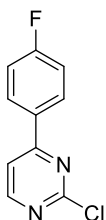
t.t. 136 – 139 °C

IC (ATR): $\nu = 3063, 3023, 2981, 2937, 2840, 2555, 2031, 1901, 1608, 1572, 1530, 1510, 1463, 1452, 1434, 1408, 1347, 1321, 1300, 1258, 1178, 1124, 1106, 1071, 1023, 985, 827, 804, 781, 769, 728, 688, 645, 580, 514, 425 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,54$ (d, $J = 5,1$ Hz, 1H), $8,06$ (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), $7,55$ (d, $J = 5,1$ Hz, 1H), $7,00$ (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), $3,88$ (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 166,8; 163,0; 161,9; 159,6; 129,3; 127,5; 114,6; 114,3; 55,6$ ppm.

2-Hlor-4-(4-fluorfenil)pirimidin (95)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlorpirimidina **85** (150 mg, 1,01 mmol) i (4-fluorfenil)boronske kiseline **90** (141 mg, 1,01 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 8/2), dobijeno je jedinjenje **95** (159 mg, 76%). Bezbojna čvrsta supstanca.

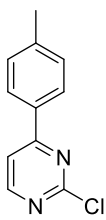
t.t. 127 – 130 °C

IC (ATR): $\nu = 3109, 3066, 2918, 1599, 1572, 1535, 1507, 1433, 1403, 1346, 1316, 1305, 1287, 1237, 1191, 1164, 1121, 1100, 1068, 1015, 986, 836, 791, 770, 689, 642, 569, 503, 494, 431, 402 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,63$ (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), $8,11$ (dd, $J = 9,0$ Hz, $J = 5,3$ Hz, 2H), $7,60$ (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), $7,20$ (t, $J = 8,6$ Hz, 2H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 166,1; 165,3$ (d, $J_{\text{C-F}} = 253$ Hz); $162,0; 160,0; 131,4$ (d, $J_{\text{C-F}} = 3$ Hz); $129,8$ (d, $J_{\text{C-F}} = 9$ Hz); $116,4$ (d, $J_{\text{C-F}} = 22$ Hz); $114,9$ ppm.

2-Hlor-4-(*p*-tolil)pirimidin (96)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlorpirimidina **85** (150 mg, 1,01 mmol) i *p*-tolilboronske kiseline **91** (137 mg, 1,01 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1), dobijeno je jedinjenje **96** (159 mg, 77%). Bezbojna čvrsta supstanca.

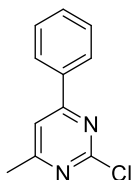
t.t. 98 – 100 °C

IC (ATR): $\nu = 3108, 3062, 2987, 2919, 1613, 1573, 1532, 1509, 1429, 1404, 1377, 1343, 1314, 1286, 1189, 1128, 1108, 1068, 985, 949, 863, 832, 818, 779, 767, 716, 688, 568, 542, 482, 425 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,58$ (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), $7,98$ (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), $7,60$ (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), $7,30$ (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), $2,42$ (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 167,2; 161,9; 159,7; 142,7; 132,4; 130,0; 127,5; 114,9; 21,6$ ppm.

2-Hlor-4-metil-6-fenilpirimidin (97)



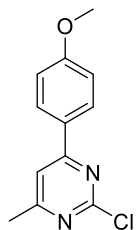
Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlor-6-metilpirimidina **86** (70 mg, 0,43 mmol) i fenilboronske kiseline **88** (52 mg, 0,43 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1), dobijeno je jedinjenje **97** (67 mg, 76%). Bezbojno ulje.

IC (ATR): $\nu = 3064, 2985, 2923, 1578, 1521, 1495, 1436, 1379, 1354, 1302, 1280, 1250, 1205, 1083, 1073, 1030, 1002, 916, 859, 840, 828, 785, 752, 690, 645, 570, 548, 452 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,07 - 8,03$ (m, 2H), $7,54 - 7,46$ (m, 4H), $2,58$ (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170,9; 166,9; 161,5; 135,4; 131,7; 129,1; 127,5; 114,8; 24,3$ ppm.

2-Hlor-4-(4-metoksifenil)-6-metilpirimidin (98)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlor-6-metilpirimidina **86** (50 mg, 0,31 mmol) i (4-metoksifenil)boronske kiseline **89** (47 mg, 0,31 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1), dobijeno je jedinjenje **98** (54 mg, 75%). Bezbojna čvrsta supstanca.

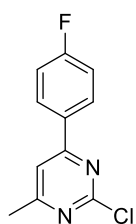
t.t. $59 - 61 \text{ }^\circ\text{C}$

IC (ATR): $\nu = 3017, 2982, 2935, 2841, 1610, 1588, 1577, 1516, 1453, 1362, 1304, 1270, 1252, 1204, 1176, 1111, 1084, 1024, 982, 918, 866, 841, 827, 768, 647, 590, 548, 505, 443 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,03$ (d, $J = 8,6 \text{ Hz}$, 2H), $7,40$ (s, 1H), $6,98$ (d, $J = 8,7 \text{ Hz}$, 2H), $3,87$ (s, 3H), $2,54$ (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170,5; 166,4; 162,7; 161,4; 129,2; 127,8; 114,5; 113,8; 55,6; 24,3$ ppm.

2-Hlor-4-(4-fluorfenil)-6-metilpirimidin (99)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlor-6-metilpirimidina **86** (70 mg, 0,43 mmol) i (4-fluorfenil)boronske kiseline **90** (60 mg, 0,43 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1), dobijeno je jedinjenje **99** (67 mg, 70%). Bezbojna čvrsta supstanca.

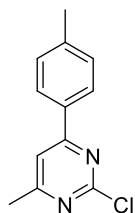
t.t. $100 - 102 \text{ }^\circ\text{C}$

IC (ATR): $\nu = 3065, 2927, 1602, 1582, 1525, 1510, 1447, 1420, 1402, 1386, 1357, 1295, 1255, 1228, 1205, 1164, 1105, 1084, 1031, 1013, 983, 919, 868, 853, 838, 790, 767, 645, 581, 546, 531, 495, 446 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,06$ (dd, $J = 8,0 \text{ Hz}$, $J = 5,4 \text{ Hz}$, 2H), $7,44$ (s, 1H), $7,16$ (t, $J = 8,2 \text{ Hz}$, 2H), $2,57$ (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,1; 165,7; 165,1$ (d, $J_{\text{C-F}} = 251 \text{ Hz}$); $161,5; 131,6$ (d, $J_{\text{C-F}} = 3 \text{ Hz}$); $129,7$ (d, $J_{\text{C-F}} = 9 \text{ Hz}$); $116,3$ (d, $J_{\text{C-F}} = 22 \text{ Hz}$); $114,4; 24,3$ ppm.

2-Hlor-4-metil-6-(*p*-tolil)pirimidin (100)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlor-6-metilpirimidina **86** (70 mg, 0,43 mmol) i *p*-tolilboronske kiseline **91** (58 mg, 0,43 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1), dobijeno je jedinjenje **100** (65 mg, 69%). Bezbojna čvrsta supstanca.

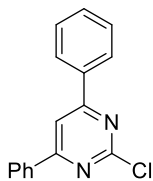
t.t. $52 - 53 \text{ }^\circ\text{C}$

IC (ATR): $\nu = 3040, 2921, 2851, 1612, 1586, 1521, 1507, 1442, 1402, 1385, 1357, 1291, 1254, 1218, 1201, 1184, 1111, 1087, 1041, 1010, 984, 916, 873, 842, 824, 776, 766, 719, 649, 580, 545, 476, 444 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,97$ (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 2H), $7,46$ (s, 1H), $7,29$ (d, $J = 7,9 \text{ Hz}$, 2H), $2,57$ (s, 3H), $2,42$ (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170,7; 166,9; 161,5; 142,4; 132,6; 129,9; 127,4; 114,4; 24,3; 21,6 ppm.

2-Hlor-4,6-difenilpirimidin (101)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlor-6-fenilpirimidina **87** (50 mg, 0,22 mmol) i fenilboronske kiseline **88** (27 mg, 0,22 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1), dobijeno je jedinjenje **101** (47 mg, 80%). Bezbojna čvrsta supstanca.

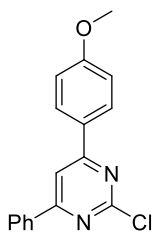
t.t. 111 – 114 °C

IC (ATR): ν = 3051, 2961, 2923, 2851, 1599, 1583, 1568, 1531, 1511, 1496, 1438, 1408, 1370, 1311, 1261, 1233, 1157, 1096, 1070, 1028, 1000, 982, 931, 876, 840, 820, 784, 749, 687, 657, 639, 624, 483, 456 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,14 – 8,10 (m, 4H), 7,96 (s, 1H), 7,55 – 7,49 (m, 6H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 167,6; 162,1; 135,7; 131,7; 129,1; 127,5; 110,9 ppm.

2-Hlor-4-(4-metoksifenil)-6-fenilpirimidin (102)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlor-6-fenilpirimidina **87** (50 mg, 0,22 mmol) i (4-metoksifenil)boronske kiseline **89** (33 mg, 0,22 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1), dobijeno je jedinjenje **102** (35 mg, 53%). Bezbojna čvrsta supstanca.

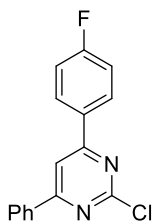
t.t. 125 – 128 °C

IC (ATR): ν = 3042, 2977, 2935, 2839, 2599, 1603, 1583, 1571, 1518, 1503, 1452, 1423, 1403, 1376, 1305, 1265, 1231, 1186, 1173, 1114, 1070, 1025, 981, 924, 873, 847, 830, 778, 759, 729, 693, 656, 641, 580, 508, 463, 442 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,15 – 8,10 (m, 4H), 7,93 (s, 1H), 7,55 – 7,49 (m, 3H), 7,04 – 7,00 (m, 2H), 3,89 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 167,4; 167,2; 162,8; 162,1; 136,0; 131,6; 129,3; 129,2; 128,1; 127,5; 114,6; 110,1; 55,6 ppm.

2-Hlor-4-(4-fluorfenil)-6-fenilpirimidin (103)



Primjenom *opšte procedure A*, polazeći iz 2,4-dihlor-6-fenilpirimidina **87** (50 mg, 0,22 mmol) i 4-fluorfenilboronska kiselina **90** (31 mg, 0,22 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1), dobijeno je jedinjenje **103** (45 mg, 66%). Bezbojna čvrsta supstanca.

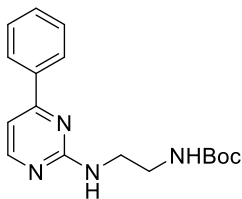
t.t. 112 – 115 °C

IC (ATR): ν = 3062, 2918, 2850, 1729, 1599, 1585, 1573, 1531, 1447, 1417, 1402, 1369, 1310, 1297, 1230, 1159, 1107, 1068, 1027, 1013, 1001, 985, 871, 840, 777, 757, 724, 687, 654, 641, 572, 502, 477, 450 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,18 – 8,12 (m, 4H), 7,97 (s, 1H), 7,56 – 7,51 (m, 3H), 7,24 – 7,20 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 167,9; 166,6; 165,2 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 162,2; 135,7; 131,9 (d, J_{C-F} = 4 Hz); 131,9; 129,8 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 129,3; 127,6; 116,4 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 110,7 ppm.

tert-Butil (2-((4-fenilpirimidin-2-il)amino)etil)karbamat (105)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **93** (69 mg, 0,36 mmol) i *N*-Boc-etilendiamina **104** (171 mg, 1,07 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **105** (108 mg, 96%). Bezbojna čvrsta supstanca.

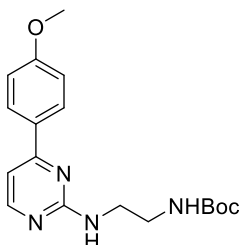
t.t. 112 – 114 °C

IC (ATR): ν = 3377, 3277, 3091, 3056, 3017, 2877, 2941, 2919, 1683, 1589, 1565, 1517, 1458, 1439, 1413, 1367, 1354, 1321, 1273, 1253, 1214, 1179, 1080, 1039, 1027, 1000, 980, 919, 860, 812, 783, 761, 730, 626, 589, 552, 513, 476, 432 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,31 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,03 – 7,97 (m, 2H), 7,48 – 7,43 (m, 3H), 6,97 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 5,73 (brs, 1H), 5,27 (brs, 1H), 3,61 (q, J = 5,9 Hz, 2H), 3,40 (q, J = 5,8 Hz, 2H), 1,41 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 165,0; 162,9; 158,6; 156,4; 137,4; 130,7; 128,8; 127,1; 106,9; 79,3; 41,7; 41,1; 28,5 ppm.

tert-Butil (2-((4-(4-metoksifenil)pirimidin-2-il)amino)etil)karbamat (106)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **94** (31 mg, 0,14 mmol) i *N*-Boc-etilendiamina **104** (70 mg, 0,44 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **106** (35 mg, 75%). Bezbojna čvrsta supstanca.

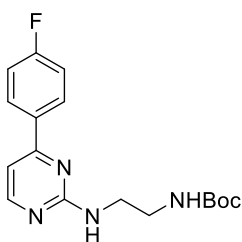
t.t. 123 – 125 °C

IC (ATR): ν = 3366, 2977, 2935, 2839, 1707, 1607, 1567, 1511, 1462, 1412, 1392, 1366, 1342, 1306, 1252, 1211, 1175, 1091, 1073, 1032, 985, 846, 807, 583 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,25 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,97 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,95 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,90 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 5,71 (brs, 1H), 5,31 (brs, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,60 (q, J = 5,8 Hz, 2H), 3,39 (q, J = 5,9 Hz, 2H), 1,40 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 164,4; 162,8; 161,8; 158,3; 156,3; 129,8; 128,6; 114,1; 106,1; 79,3; 55,5; 41,6; 41,1, 28,5 ppm.

tert-Butil (2-((4-(4-fluorfenil)pirimidin-2-il)amino)etil)karbamat (107)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **95** (70 mg, 0,34 mmol) i *N*-Boc-etilendiamina **104** (162 mg, 1,01 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 1/1) dobijeno je jedinjenje **107** (102 mg, 91%). Bezbojna čvrsta supstanca.

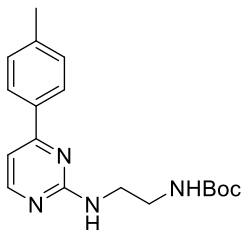
t.t. 139 – 141 °C

IC (ATR): ν = 3379, 3265, 3019, 2984, 2929, 1682, 1603, 1574, 1538, 1519, 1506, 1456, 1416, 1369, 1356, 1319, 1273, 1226, 1171, 1104, 1085, 1041, 1013, 1000, 923, 851, 826, 813, 801, 784, 597, 571, 512, 455 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,30 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,00 (dd, J = 8,7 Hz, J = 5,5 Hz, 2H), 7,13 (t, J = 8,6 Hz, 2H), 6,91 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 5,68 (brs, 1H), 5,20 (brs, 1H), 3,61 (q, J = 5,8 Hz, 2H), 3,39 (q, J = 5,9 Hz, 2H), 1,41 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 164,5 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 163,9; 162,9; 158,7; 156,4; 133,6 (d, J_{C-F} = 3 Hz); 129,1 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 115,8 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 106,5; 79,4; 41,7; 41,0; 28,5 ppm.

tert-Butil (2-((4-(p-tolil)pirimidin-2-il)amino)etil)karbamat (108)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **96** (37 mg, 0,18 mmol) i *N*-Boc-etilendiamina **104** (86 mg, 0,54 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 7/3) dobijeno je jedinjenje **108** (45 mg, 77%). Bež čvrsta supstanca.

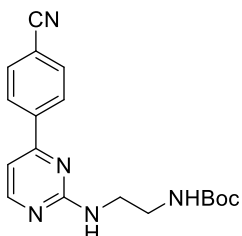
t.t. 133 – 135 °C

IC (ATR): ν = 3382, 3263, 3015, 2982, 2940, 2921, 1683, 1586, 1559, 1517, 1456, 1415, 1390, 1368, 1356, 1320, 1273, 1254, 1210, 1170, 1113, 1088, 1038, 1020, 1000, 924, 859, 835, 797, 784, 764, 703, 592, 573, 550, 500, 444 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,29 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,29 – 7,24 (m, 2H), 6,95 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 5,61 (brs, 1H), 5,23 (brs, 1H), 3,62 (q, J = 5,7 Hz, 2H), 3,40 (q, J = 5,8 Hz, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,42 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 165,0; 162,9; 158,5; 156,4; 141,0; 134,6; 129,6; 127,0; 106,7; 79,3; 41,7; 41,1; 28,5; 21,5 ppm.

tert-Butil (2-((4-(4-cijanofenil)pirimidin-2-il)amino)etil)karbamat (109)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz 4-(2-hlorpirimidin-4-il)benzonitrila (54 mg, 0,25 mmol) i *N*-Boc-etilendiamina **104** (120 mg, 0,75 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **109** (62 mg, 74%). Bezbojna čvrsta supstanca.

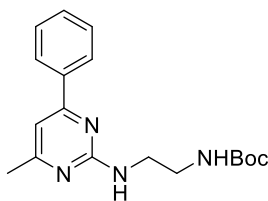
t.t. 166 °C

IC (ATR): ν = 3394, 3253, 3117, 3051, 2981, 2916, 2226, 1714, 1686, 1600, 1580, 1561, 1524, 1454, 1422, 1392, 1366, 1325, 1280, 1249, 1193, 1160, 1093, 1074, 1042, 1020, 985, 952, 855, 803, 728, 697, 675, 636, 550, 530, 461, 436 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,37 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,73 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 5,80 (brs, 1H), 5,13 (brs, 1H), 3,61 (q, J = 5,9 Hz, 2H), 3,39 (q, J = 5,9 Hz, 2H), 1,40 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 162,9; 162,7; 159,3; 156,4; 141,7; 132,6; 127,7; 118,6; 114,0; 107,0; 79,5; 41,8; 40,8; 28,5 ppm.

tert-Butil (2-((4-metil-6-fenilpirimidin-2-il)amino)etil)karbamat (110)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **97** (62 mg, 0,30 mmol) i *N*-Boc-etilendiamina **104** (146 mg, 0,91 mmol) nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **110** (80 mg, 80%). Bezbojna čvrsta supstanca.

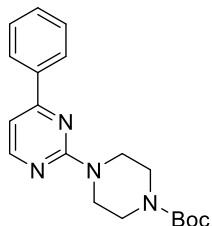
t.t. 97 – 99 °C

IC (ATR): ν = 3376, 3263, 3070, 2986, 2935, 1686, 1593, 1580, 1559, 1514, 1466, 1435, 1422, 1391, 1358, 1345, 1274, 1249, 1215, 1167, 1084, 1032, 1001, 983, 956, 923, 885, 867, 853, 827, 787, 769, 693, 644, 591, 549, 465 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,03 – 7,97 (m, 2H), 7,48 – 7,43 (m, 3H), 6,88 (s, 1H), 5,51 – 5,49 (m, 2H), 3,63 (q, J = 5,8 Hz, 2H), 3,40 (q, J = 5,6 Hz, 2H), 2,39 (s, 3H), 1,41 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168,5; 164,8; 162,9; 156,3; 137,7; 130,5; 128,8; 127,1; 106,7; 79,2; 41,6; 28,5; 24,4 ppm.

tert-Butil 4-(4-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (118)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **93** (70 mg, 0,37 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (205 mg, 1,10 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **118** (123 mg, 99%). Bezbojna čvrsta supstanca.

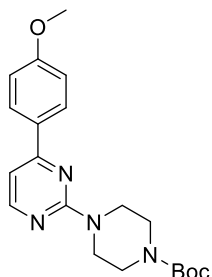
t.t. 120 – 123 °C

IC (ATR): ν = 2994, 2968, 2919, 2853, 1700, 1587, 1566, 1553, 1504, 1450, 1419, 1366, 1344, 1280, 1243, 1164, 1133, 1112, 1077, 1026, 1001, 983, 957, 926, 862, 844, 820, 768, 692, 629, 533 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,37 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,07 – 8,01 (m, 2H), 7,49 – 7,44 (m, 3H), 6,96 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 3,91 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 3,54 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 1,50 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 164,5; 162,0; 158,5; 155,0; 137,7; 130,7; 128,8; 127,1; 106,2; 80,0; 43,8; 28,6 ppm.

tert-Butil 4-(4-(4-metoksifenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (119)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **94** (70 mg, 0,32 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (177 mg, 0,95 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 8/2) dobijeno je jedinjenje **119** (110 mg, 93%). Bezbojna čvrsta supstanca.

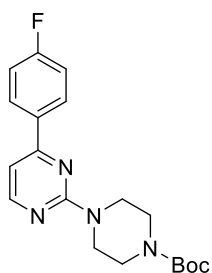
t.t. 103 – 106 °C

IC (ATR): ν = 2979, 2897, 2862, 1685, 1607, 1585, 1567, 1552, 1510, 1441, 1411, 1365, 1345, 1313, 1278, 1244, 1170, 1133, 1113, 1092, 1080, 1027, 999, 982, 957, 864, 846, 822, 800, 770, 736, 699, 581, 558, 531 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,33 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,98 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,91 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 3,90 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 3,87 (s, 3H), 3,53 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 1,49 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 164,0; 161,9; 158,2; 155,4; 155,0; 130,1; 128,6; 114,2; 105,4; 80,0; 55,5; 43,8; 28,6 ppm.

tert-Butil 4-(4-(4-fluorfenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (120)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **95** (70 mg, 0,34 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (188 mg, 1,01 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **120** (117 mg, 97%). Bezbojna čvrsta supstanca.

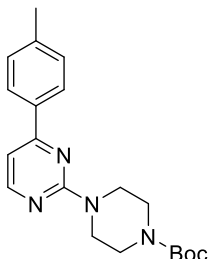
t.t. 111 – 115 °C

IC (ATR): ν = 2975, 2930, 2862, 1686, 1603, 1571, 1556, 1510, 1484, 1459, 1444, 1425, 1387, 1364, 1341, 1328, 1281, 1243, 1221, 1159, 1131, 1111, 1091, 1073, 1054, 1017, 1002, 984, 968, 953, 863, 851, 807, 764, 731, 702, 683, 652, 625, 572, 550, 503, 458, 424 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,37 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,04 (dd, J = 8,7 Hz, J = 5,5 Hz, 2H), 7,14 (t, J = 8,5 Hz, 2H), 6,91 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 3,90 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 3,53 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 1,50 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 164,5 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 163,4; 162,0; 158,6; 155,0; 133,8 (d, J_{C-F} = 3 Hz); 129,1 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 115,8 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 105,8; 80,1; 43,8; 28,6 ppm.

tert-Butil 4-(4-(p-tolil)pirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (121)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **96** (80 mg, 0,39 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (218 mg, 1,17 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 8/2) dobijeno je jedinjenje **121** (132 mg, 95%). Bezbojna čvrsta supstanca.

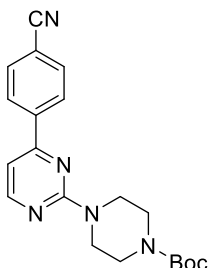
t.t. 120 – 122 °C

IC (ATR): ν = 3018, 3001, 2969, 2889, 2859, 1680, 1611, 1583, 1564, 1551, 1496, 1437, 1405, 1375, 1364, 1343, 1306, 1287, 1276, 1246, 1226, 1169, 1127, 1112, 1092, 1047, 1018, 1000, 982, 960, 928, 865, 848, 801, 774, 760, 724, 700, 664, 640, 620, 573, 551, 526, 495, 451 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,35 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,94 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,26 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 3,90 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,53 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 2,41 (s, 3H), 1,50 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 164,5; 162,0; 158,3; 155,0; 141,0; 134,8; 129,5; 127,0; 105,9; 80,0; 43,8; 28,6; 21,5 ppm.

tert-Butil 4-(4-(4-cijanofenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (122)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz 4-(2-hlorpirimidin-4-il)benzonitrila (70 mg, 0,32 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (181 mg, 0,974 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 7/3) dobijeno je jedinjenje **122** (87 mg, 73%). Bezbojna čvrsta supstanca.

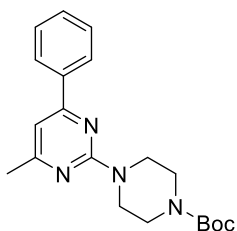
t.t. 162 – 164 °C

IC (ATR): ν = 2989, 2969, 2927, 2859, 2227, 1693, 1583, 1556, 1511, 1460, 1426, 1363, 1344, 1289, 1277, 1250, 1229, 1171, 1140, 1108, 1087, 1041, 1018, 998, 982, 957, 865, 841, 802, 762, 688, 615, 565, 548, 535 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,44 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,14 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,76 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 3,91 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,54 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 1,50 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 162,4; 162,0; 159,2; 155,0; 141,9; 132,6; 127,7; 118,7; 114,0; 106,3; 80,2; 43,8; 28,6 ppm.

tert-Butil 4-(4-metil-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (123)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **97** (40 mg, 0,20 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (109 mg, 0,586 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **123** (66 mg, 95%). Bezbojna čvrsta supstanca.

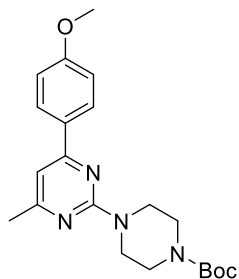
t.t. 144 – 146 °C

IC (ATR): ν = 3006, 2969, 2898, 2861, 1685, 1586, 1556, 1514, 1479, 1429, 1380, 1364, 1346, 1288, 1262, 1234, 1176, 1139, 1119, 1082, 1003, 989, 967, 929, 889, 869, 828, 794, 772, 695, 650, 632, 584, 545 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,06 – 8,00 (m, 2H), 7,47 – 7,43 (m, 3H), 6,86 (s, 1H), 3,92 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 3,53 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 2,41 (s, 3H), 1,50 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168,4; 164,3; 162,1; 155,1; 138,0; 130,4; 128,7; 127,1; 105,8; 80,0; 43,9; 28,6; 24,7 ppm.

tert-Butil 4-(4-(4-metoksifenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (124)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **98** (49 mg, 0,21 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (117 mg, 0,626 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **124** (79 mg, 98%). Bezbojna čvrsta supstanca.

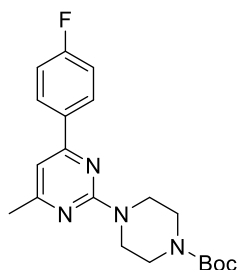
t.t. 114 – 117 °C

IC (ATR): ν = 2969, 2932, 2840, 1701, 1606, 1584, 1549, 1511, 1459, 1420, 1381, 1364, 1347, 1305, 1277, 1251, 1234, 1209, 1170, 1143, 1118, 1082, 1056, 1024, 1002, 891, 863, 845, 829, 817, 791, 768, 731, 636, 594, 541, 511 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,01 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,80 (s, 1H), 3,90 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,86 (s, 3H), 3,52 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 2,39 (s, 3H), 1,49 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168,0; 163,8; 162,1; 161,6; 155,1; 130,4; 128,6; 114,1; 105,0; 80,0; 55,5; 43,8; 28,6; 24,6 ppm.

tert-Butil 4-(4-(4-fluorfenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (125)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **99** (60 mg, 0,27 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (151 mg, 0,808 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **125** (98 mg, 98%). Bezbojna čvrsta supstanca.

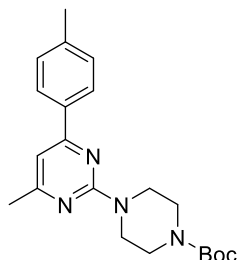
t.t. 90 – 92 °C

IC (ATR): ν = 3004, 2977, 2897, 2860, 1688, 1601, 1561, 1508, 1451, 1426, 1378, 1365, 1346, 1285, 1259, 1234, 1174, 1157, 1137, 1122, 1081, 1004, 990, 968, 891, 869, 848, 834, 813, 790, 770, 731, 674, 639, 592, 544, 501, 426 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,06 – 8,00 (m, 2H), 7,16 – 7,10 (m, 2H), 6,81 (s, 1H), 3,90 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,52 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 2,40 (s, 3H), 1,49 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168,5; 164,4 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 163,2; 162,1; 155,1; 134,1 (d, J_{C-F} = 3 Hz); 129,1 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 115,7 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 105,4; 80,0; 43,8; 28,6; 24,7 ppm.

tert-Butil 4-(4-metil-6-(p-tolil)pirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (126)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **100** (59 mg, 0,27 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (153 mg, 0,82 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **126** (99 mg, 98%). Bezbojna čvrsta supstanca.

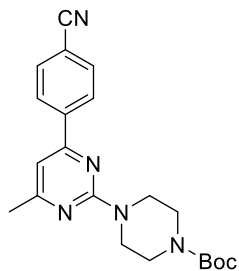
t.t. 114 – 116 °C

IC (ATR): ν = 1688, 1614, 1570, 1554, 1512, 1481, 1462, 1445, 1420, 1366, 1347, 1282, 1252, 1169, 1121, 1087, 1002, 893, 861, 846, 812, 789, 772, 593, 534, 480 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,93 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 8,2 Hz, 3H), 6,84 (s, 1H), 3,91 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,52 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 2,42 – 2,39 (m, 6H), 1,49 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168,1; 164,2; 162,1; 155,1; 140,6; 135,2; 129,5; 127,0; 105,5; 80,0; 43,9; 28,6; 24,6; 21,5 ppm.

tert-Butil 4-(4-(4-cijanofenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (127)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz 4-(2-hlor-6-metilpirimidin-4-il)benzonitrila (53 mg, 0,23 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (129 mg, 0,692 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 8/2) dobijeno je jedinjenje **127** (75 mg, 86%). Čvrsta supstanca žute boje.

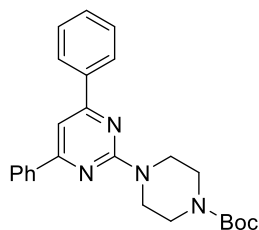
t.t. 89 – 91 °C

IC (ATR): ν = 2999, 2971, 2898, 2863, 2227, 1699, 1581, 1568, 1552, 1505, 1480, 1446, 1419, 1379, 1364, 1350, 1280, 1250, 1173, 1137, 1120, 1084, 1017, 993, 894, 862, 844, 808, 784, 754, 733, 665, 630, 592, 540, 492, 429 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,12 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,74 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 6,85 (s, 1H), 3,90 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,52 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 2,42 (s, 3H), 1,49 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 169,2; 162,1; 162,1; 155,0; 142,3; 132,5; 127,7; 118,8; 113,7; 106,0; 80,1; 43,8; 28,6; 24,7 ppm.

tert-Butil 4-(4,6-difenilpirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (128)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **101** (200 mg, 0,75 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (419 mg, 2,25 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **128** (307 mg, 98%). Čvrsta bezbojna supstanca.

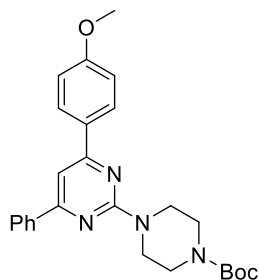
t.t. 225 – 226 °C

IC (ATR): ν = 3062, 2975, 2928, 2856, 1697, 1587, 1564, 1546, 1494, 1452, 1419, 1361, 1282, 1251, 1234, 1171, 1121, 1072, 1029, 1000, 985, 963, 865, 837, 762, 690, 632 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,14 – 8,11 (m, 4H), 7,51 – 7,48 (m, 6H), 7,43 (s, 1H), 4,03 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,58 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 1,51 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 165,4; 162,4; 155,1; 138,2; 130,5; 128,8; 127,2; 102,4; 80,0; 43,9; 28,6 ppm.

tert-Butil 4-(4-(4-metoksifenil)-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (129)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **102** (53 mg, 0,18 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (102 mg, 0,546 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **129** (81 mg, 100 %). Čvrsta supstanca svetložute boje.

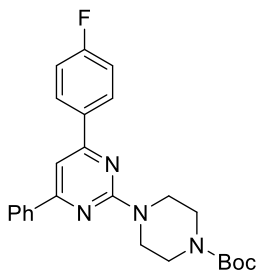
t.t. 151 – 153 °C

IC (ATR): ν = 3003, 2979, 2932, 2852, 1678, 1607, 1585, 1565, 1543, 1512, 1494, 1450, 1429, 1364, 1306, 1284, 1252, 1237, 1172, 1127, 1084, 1030, 1004, 986, 967, 867, 846, 827, 772, 752, 693, 665, 648, 581, 541, 517 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,12 – 8,07 (m, 4H), 7,52 – 7,47 (m, 3H), 7,38 (s, 1H), 7,03 – 6,98 (m, 2H), 4,01 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,88 (s, 3H), 3,57 (t, J = 5,3 Hz, 4H), 1,51 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 165,2; 164,9; 162,3; 161,8; 155,1; 138,4; 130,6; 130,4; 128,8; 128,7; 127,2; 114,1; 101,6; 80,0; 55,6; 43,9; 28,6 ppm.

tert-Butil 4-(4-(4-fluorfenil)-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-karboksilat (130)



Primjenom *opšte procedure B*, polazeći iz **103** (185 mg, 0,65 mmol) i 1-Boc piperazina **117** (363 mg, 1,95 mmol) nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **130** (270 mg, 96%). Čvrsta supstanca svetlo žute boje.

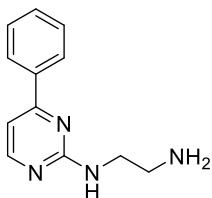
t.t. 217 – 218 °C

IC (ATR): ν = 3062, 2975, 2927, 2857, 1695, 1602, 1567, 1547, 1510, 1497, 1451, 1421, 1363, 1282, 1252, 1233, 1171, 1123, 1075, 1001, 986, 964, 828, 771, 738, 693, 648, 606, 570, 508 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,14 – 8,08 (m, 4H), 7,52 – 7,47 (m, 3H), 7,37 (s, 1H), 7,17 (t, J = 8,4 Hz, 2H), 4,01 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,58 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 1,51 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 165,5; 164,5 (d, J_{C-F} = 250 Hz); 164,3; 162,3; 155,1; 138,1; 134,3 (d, J_{C-F} = 3 Hz); 130,6; 129,2 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 128,8; 127,2; 115,8 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 102,0; 80,0; 43,9; 28,6 ppm.

N¹-(4-Fenilpirimidin-2-il)etan-1,2-diamin (111)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **105** (105 mg, 0,334 mmol), dobijeno je jedinjenje **111** (62 mg, 86%). Žuto ulje.

IC (ATR): ν = 3272, 3061, 2926, 2868, 1715, 1590, 1569, 1531, 1496, 1462, 1415, 1343, 1324, 1278, 1205, 1185, 1157, 1070, 1027, 984, 925, 820, 768, 735, 696, 629 cm⁻¹.

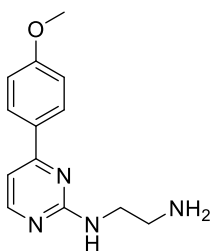
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,32 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,04 – 7,98 (m, 2H), 7,49 – 7,43 (m, 3H), 6,96 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 5,67 (brs, 1H), 3,57 (q, J = 5,9 Hz, 2H), 2,97 (brs, 2H), 1,75 (brs, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 164,9; 163,0; 158,6; 137,6; 130,6; 128,8; 127,1; 106,7; 44,4; 41,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+H]⁺ izračunato za C₁₂H₁₅N₄⁺ 215,12912; detektovano 215,12901.

HPLC čistoća, metoda C: t_R = 10,22 min, površina 98,83%; metoda G: t_R = 5,94 min, površina 99,17% (λ = 254 nm).

N¹-(4-(4-Metoksifenil)pirimidin-2-il)etan-1,2-diamin (112)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **106** (45 mg, 0,13 mmol), dobijeno je jedinjenje **112** (28 mg, 86%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 128 – 130 °C

IC (ATR): ν = 3263, 3110, 2965, 2937, 2875, 1610, 1571, 1508, 1462, 1441, 1426, 1405, 1324, 1301, 1275, 1249, 1213, 1174, 1118, 1091, 1027, 987, 966, 848, 835, 799, 711, 657, 632, 581, 544, 531 cm⁻¹.

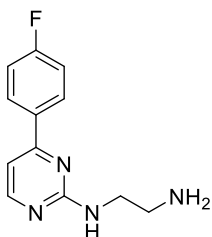
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,27 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,00 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,97 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,91 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 5,48 (brs, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,57 (q, J = 5,9 Hz, 2H), 2,97 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 1,67 (brs, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 166,5; 162,9; 161,8; 158,4; 130,0; 128,6; 114,2; 106,0; 55,5; 44,6; 41,9 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+H]⁺ izračunato za C₁₃H₁₇ON₄⁺ 245,13969; detektovano 245,13968.

HPLC čistoća, metoda C: $t_R = 8,70$ min, površina 97,99%, metoda D: $t_R = 8,53$ min, površina 95,56% ($\lambda = 254$ nm).

***N*¹-(4-(4-Fluorfenil)pirimidin-2-il)etan-1,2-diamin (113)**



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **107** (93 mg, 0,28 mmol), dobijeno je jedinjenje **113** (50 mg, 77%). Čvrsta bezbojna supstanca.

t.t. 104 – 107 °C

IC (ATR): $\nu = 3257, 3153, 3050, 2989, 2936, 2877, 1722, 1649, 1602, 1572, 1535, 1504, 1464, 1426, 1399, 1342, 1317, 1285, 1267, 1231, 1157, 1087, 1013, 988, 965, 853, 818, 799, 750, 716, 658, 572, 539, 518$ cm⁻¹.

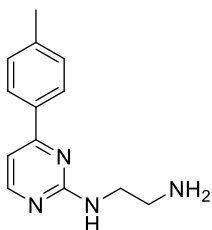
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,32$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $8,02$ (dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 5,5$ Hz, 2H), $7,14$ (t, $J = 8,4$ Hz, 2H), $6,92$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $5,53$ (brs, 1H), $3,57$ (q, $J = 6,0$ Hz, 2H), $2,97$ (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), $1,52$ (brs, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 164,5$ (d, $J_{C-F} = 251$ Hz); $163,8$; $163,0$; $158,8$; $133,7$ (d, $J_{C-F} = 3$ Hz); $129,1$ (d, $J_{C-F} = 9$ Hz); $115,8$ (d, $J_{C-F} = 22$ Hz); $106,3$; $44,6$; $41,8$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₁₂H₁₄N₄F⁺ 233,11970; detektovano 233,11964.

HPLC čistoća, metoda C: $t_R = 8,81$ min, površina 97,53%; metoda D: $t_R = 8,69$ min, površina 97,41% ($\lambda = 254$ nm).

***N*¹-(4-(*p*-Tolil)pirimidin-2-il)etan-1,2-diamin (114)**



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **108** (39 mg, 0,12 mmol), dobijeno je jedinjenje **114** (24 mg, 86%). Čvrsta bezbojna supstanca.

t.t. 135 – 136 °C

IC (ATR): $\nu = 3326, 3253, 3167, 3108, 3068, 3026, 2993, 2949, 2930, 2862, 1600, 1583, 1566, 1536, 1507, 1464, 1416, 1353, 1344, 1323, 1281, 1264, 1213, 1184, 1138, 1114, 1088, 1039, 1020, 990, 966, 865, 835, 798, 749, 703, 625, 574, 505,$

476 cm⁻¹.

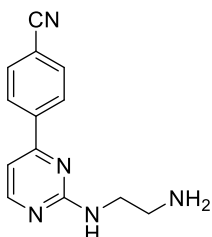
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,29$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $7,91$ (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), $7,27 - 7,23$ (m, 2H), $6,93$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $5,50$ (brs, 1H), $3,56$ (q, $J = 6,0$ Hz, 2H), $2,96$ (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), $2,39$ (s, 3H), $1,59$ (brs, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 166,9$; $163,0$; $158,5$; $141,0$; $134,7$; $129,6$; $127,0$; $106,5$; $44,6$; $41,8$; $21,6$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₁₃H₁₇N₄⁺ 229,14477; detektovano 229,14469.

HPLC čistoća, metoda C: $t_R = 8,95$ min, površina 98,48%, metoda D: $t_R = 9,08$ min, površina 98,77% ($\lambda = 254$ nm).

4-(2-((2-Aminoetil)amino)pirimidin-4-il)benzonitril (115)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **109** (56 mg, 0,16 mmol), dobijeno je jedinjenje **115** (25 mg, 62%). Žuto ulje.

IC (ATR): $\nu = 3369, 3255, 3081, 2919, 2851, 2225, 1678, 1582, 1559, 1502, 1463, 1419, 1350, 1327, 1277, 1249, 1205, 1150, 1101, 1058, 1017, 991, 954, 912, 857, 827, 800, 750, 721, 693, 645, 618, 547, 482$ cm⁻¹.

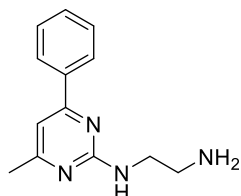
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8,43 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,30 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,88 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,22 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 3,66 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,03 (t, J = 6,2 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 164,2; 164,2; 160,3; 142,9; 133,6; 128,8; 119,4; 115,0; 107,7; 43,7; 41,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₁₃H₁₄N₅⁺ 240,12437; detektovano 240,12435.

HPLC čistoća, metoda C: t_R = 10,26 min, površina 99,52%; metoda G: t_R = 6,34 min, površina 99,72% (λ = 254 nm).

***N*¹-(4-Metil-6-fenilpirimidin-2-il)etan-1,2-diamin (116)**



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **110** (70 mg, 0,21 mmol), dobijeno je jedinjenje **116** (43 mg, 90%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 79 – 80 °C

IC (ATR): ν = 3355, 3266, 3067, 2943, 2922, 2864, 1676, 1591, 1556, 1495, 1463, 1436, 1419, 1375, 1337, 1213, 1181, 1135, 1090, 1070, 1027, 960, 924, 881, 854, 826, 767, 692, 642, 592, 549 cm⁻¹.

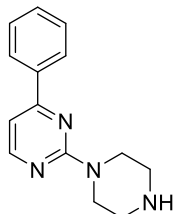
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,03 – 7,99 (m, 2H), 7,48 – 7,42 (m, 3H), 6,87 (s, 1H), 5,39 (brs, 1H), 3,59 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 2,97 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 2,39 (s, 3H), 1,64 (brs, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168,5; 164,7; 163,1; 137,9; 130,4; 128,8; 127,1; 106,4; 44,6; 42,0; 24,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₁₃H₁₇N₄⁺ 229,14477; detektovano 229,14475.

HPLC čistoća, metoda A: t_R = 4,82 min, površina 98,12%; metoda C: t_R = 9,40 min, površina 98,99% (λ = 254 nm).

4-Fenil-2-(piperazin-1-il)pirimidin (131)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **118** (100 mg, 0,294 mmol), dobijeno je jedinjenje **131** (71 mg, 100%). Žuto ulje.

IC (ATR): ν = 3296, 2942, 2914, 2848, 2740, 1588, 1567, 1551, 1495, 1448, 1345, 1317, 1258, 1217, 1141, 1057, 1026, 984, 965, 819, 768, 695, 629 cm⁻¹.

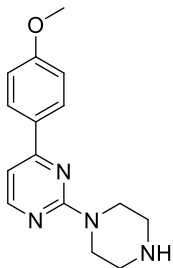
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,36 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,06 – 8,01 (m, 2H), 7,47 – 7,43 (m, 3H), 6,92 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 3,90 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,96 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 1,98 (brs, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 164,4; 162,1; 158,4; 137,8; 130,5; 128,7; 127,1; 105,7; 46,2; 45,0 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₁₄H₁₇N₄⁺ 241,14477; detektovano 241,14472.

HPLC čistoća, metoda C: t_R = 9,03 min, površina 96,36%; metoda D: t_R = 9,06 min, površina 95,64% (λ = 254 nm).

4-(4-Metoksifenil)-2-(piperazin-1-il)pirimidin (132)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **119** (91 mg, 0,24 mmol), dobijeno je jedinjenje **132** (66 mg, 100%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 115 – 117 °C

IC (ATR): $\nu = 3309, 2985, 2950, 2837, 1721, 1606, 1583, 1550, 1509, 1480, 1437, 1371, 1341, 1311, 1253, 1172, 1149, 1119, 1106, 1056, 1033, 983, 963, 840, 808, 774, 729, 700, 681, 644, 633, 582, 539, 515 \text{ cm}^{-1}$.

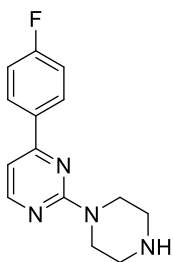
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,32$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $8,02$ (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), $6,97$ (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), $6,88$ (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), $3,89$ (t, $J = 5,0$ Hz, 4H), $3,86$ (s, 3H), $2,97$ (t, $J = 5,0$ Hz, 4H), $1,98$ (brs, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 163,9; 162,1; 161,8; 158,1; 130,3; 128,6; 114,1; 105,1; 55,5; 46,2; 45,0$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₁₅H₁₉ON₄⁺ 271,15534; detektovano 271,15524.

HPLC čistoća, metoda A: $t_R = 5,36$ min, površina 97,53%; metoda C: $t_R = 9,15$ min, površina 97,01% ($\lambda = 254$ nm).

4-(4-Fluorfenil)-2-(piperazin-1-il)pirimidin (133)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **120** (100 mg, 0,279 mmol), dobijeno je jedinjenje **133** (72 mg, 100%). Smeđe ulje.

IC (ATR): $\nu = 3304, 2918, 2850, 1724, 1678, 1602, 1570, 1507, 1442, 1407, 1344, 1317, 1291, 1257, 1231, 1157, 1101, 1055, 1015, 984, 964, 850, 806, 731, 573 \text{ cm}^{-1}$.

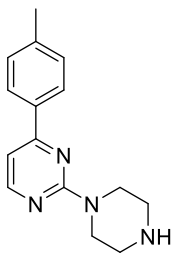
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,34$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $8,02$ (dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 5,6$ Hz, 2H), $7,12$ (t, $J = 8,7$ Hz, 2H), $6,86$ (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), $3,88$ (t, $J = 5,0$ Hz, 4H), $2,95$ (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), $2,20$ (brs, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 164,4$ (d, $J_{C-F} = 251$ Hz); $163,2; 162,0; 158,5; 133,9$ (d, $J_{C-F} = 3$ Hz); $129,1$ (d, $J_{C-F} = 9$ Hz); $115,7$ (d, $J_{C-F} = 22$ Hz); $105,3; 46,1; 45,0$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₁₄H₁₆N₄F⁺ 259,13535; detektovano 259,13530.

HPLC čistoća, metoda C: $t_R = 9,12$ min, površina 96,70%; metoda D: $t_R = 9,16$ min, površina 97,09% ($\lambda = 254$ nm).

2-(Piperazin-1-il)-4-(*p*-tolil)pirimidin (134)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **121** (138 mg, 0,389 mmol), dobijeno je jedinjenje **134** (85 mg, 86%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 80 – 82 °C

IC (ATR): $\nu = 3292, 2987, 2935, 2846, 1698, 1610, 1584, 1567, 1509, 1482, 1444, 1371, 1341, 1321, 1292, 1258, 1215, 1182, 1152, 1119, 1070, 1018, 985, 966, 827, 802, 700, 677, 648, 636, 575, 543, 495 \text{ cm}^{-1}$.

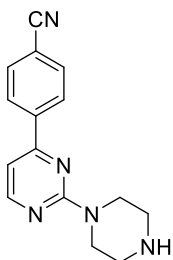
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,34$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $7,94$ (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), $7,26$ (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), $6,91$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $3,90$ (t, $J = 5,0$ Hz, 4H), $2,97$ (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), $2,41$ (s, 3H), $1,95$ (brs, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 164,4; 162,1; 158,2; 140,8; 135,0; 129,5; 127,0; 105,5; 46,2; 45,1; 21,5$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za $C_{15}H_{19}N_4^+$ 255,16023; detektovano 255,16031.

HPLC čistoća, metoda C: t_R = 10,84 min, površina 98,44%; metoda G: t_R = 6,18 min, površina 98,54% (λ = 254 nm).

4-(2-(Piperazin-1-il)pirimidin-4-il)benzonitril (135)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **122** (80 mg, 0,22 mmol), dobijeno je jedinjenje **135** (58 mg, 100%). Čvrsta supstanca žute boje.

t.t. 197 – 199 °C

IC (ATR): ν = 3316, 2917, 2850, 2228, 1583, 1561, 1503, 1441, 1345, 1317, 1289, 1259, 1214, 1140, 1058, 1018, 984, 965, 856, 805, 689, 547 cm^{-1} .

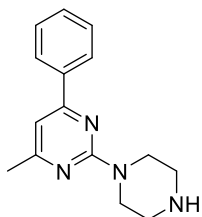
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,42 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,12 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,74 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 6,91 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 3,89 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,95 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 1,93 (brs, 1H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 162,2; 162,1; 159,1; 142,1; 132,5; 127,6; 118,7; 113,8; 105,8; 46,1; 45,0 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za $C_{15}H_{16}N_5^+$ 266,14002; detektovano 266,13991.

HPLC čistoća, metoda A: t_R = 5,26 min, površina 95,58%; metoda C: t_R = 8,77 min, površina 97,12% (λ = 254 nm).

4-Metil-6-fenil-2-(piperazin-1-il)pirimidin (136)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **123** (45 mg, 0,13 mmol), dobijeno je jedinjenje **136** (32 mg, 100%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 94 – 96 °C

IC (ATR): ν = 2940, 2849, 2823, 1587, 1564, 1509, 1495, 1442, 1379, 1346, 1314, 1294, 1268, 1225, 1186, 1136, 1072, 1052, 1028, 1012, 989, 905, 873, 819, 795, 770, 693, 653, 617, 588, 526, 460 cm^{-1} .

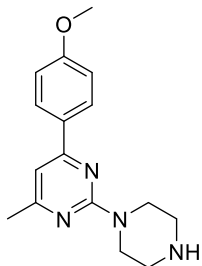
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,06 – 8,01 (m, 2H), 7,47 – 7,42 (m, 3H), 6,83 (s, 1H), 3,92 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 2,97 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,40 (s, 3H), 2,21 (brs, 1H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 168,2; 164,2; 162,3; 138,2; 130,3; 128,7; 127,1; 105,4; 46,2; 45,0; 24,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za $C_{15}H_{19}N_4^+$ 255,16042; detektovano 255,16027.

HPLC čistoća, metoda A: t_R = 5,50 min, površina 99,63%; metoda C: t_R = 9,34 min, površina 99,70% (λ = 254 nm).

4-(4-Metoksifenil)-6-metil-2-(piperazin-1-il)pirimidin (137)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **124** (72 mg, 0,19 mmol), dobijeno je jedinjenje **137** (52 mg, 98%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 107 – 108 °C

IC (ATR): ν = 3255, 2953, 2938, 2886, 2849, 2828, 1722, 1609, 1585, 1569, 1549, 1512, 1469, 1447, 1413, 1378, 1366, 1344, 1321, 1307, 1263, 1226, 1209, 1181, 1142, 1109, 1070, 1033, 1016, 993, 953, 888, 853, 817, 792, 733, 679, 658, 637, 594, 544, 510 cm^{-1} .

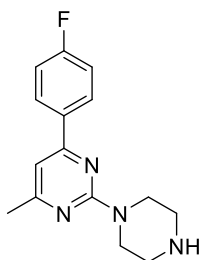
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,01 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,96 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,78 (s, 1H), 3,90 (t, *J* = 5,0 Hz, 4H), 3,86 (s, 3H), 2,96 (t, *J* = 5,0 Hz, 4H), 2,38 (s, 3H), 2,00 (brs, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 167,9; 163,7; 162,2; 161,5; 130,6; 128,6; 114,0; 104,6; 55,5; 46,2; 45,1; 24,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) *m/z*: [M+H]⁺ izračunato za C₁₆H₂₁ON₄⁺ 285,17099; detektovano 285,17112.

HPLC čistoća, metoda A: *t_R* = 5,51 min, površina 96,70%; metoda C: *t_R* = 9,37 min, površina 97,26% (λ = 254 nm).

4-(4-Fluorfenil)-6-metil-2-(piperazin-1-il)pirimidin (138)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **125** (90 mg, 0,24 mmol), dobijeno je jedinjenje **138** (65 mg, 99%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 103 – 106 °C

IC (ATR): ν = 3214, 2997, 2933, 2904, 2847, 1601, 1558, 1506, 1446, 1378, 1346, 1293, 1275, 1224, 1155, 1127, 1088, 1014, 974, 943, 887, 847, 810, 788, 613, 597, 544, 505 cm⁻¹.

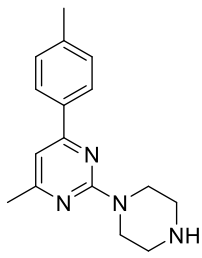
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,06 – 8,00 (m, 2H), 7,15 – 7,09 (m, 2H), 6,78 (s, 1H), 3,91 (t, *J* = 5,1 Hz, 4H), 2,97 (t, *J* = 5,1 Hz, 4H), 2,39 (s, 3H), 2,12 (brs, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168,4; 164,3 (d, *J*_{C-F} = 251 Hz); 163,1; 162,2; 134,3 (d, *J*_{C-F} = 3 Hz); 129,1 (d, *J*_{C-F} = 9 Hz); 115,6 (d, *J*_{C-F} = 22 Hz); 105,0; 46,2; 45,0; 24,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) *m/z*: [M+H]⁺ izračunato za C₁₅H₁₈N₄F⁺ 273,15100; detektovano 273,15093.

HPLC čistoća, metoda A: *t_R* = 5,57 min, površina 98,04%; metoda C: *t_R* = 9,39 min, površina 99,37% (λ = 254 nm).

4-Metil-2-(piperazin-1-il)-6-(*p*-tolil)pirimidin (139)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **126** (90 mg, 0,24 mmol), dobijeno je jedinjenje **139** (63 mg, 96%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 95 – 97 °C

IC (ATR): ν = 3242, 3065, 3001, 2982, 2941, 2886, 2851, 2825, 2656, 1611, 1569, 1550, 1511, 1468, 1443, 1377, 1344, 1322, 1298, 1262, 1223, 1204, 1185, 1167, 1141, 1109, 1071, 1013, 991, 889, 852, 812, 791, 720, 680, 657, 588, 546, 478 cm⁻¹.

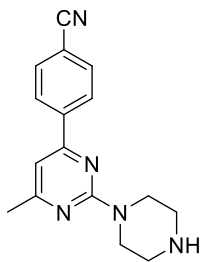
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,96 – 7,92 (m, 2H), 7,27 – 7,23 (m, 2H), 6,81 (s, 1H), 3,91 (t, *J* = 5,0 Hz, 4H), 2,97 (t, *J* = 5,1 Hz, 4H), 2,40 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 1,91 (brs, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168,0; 164,1; 162,3; 140,5; 135,4; 129,4; 127,0; 105,1; 46,3; 45,1; 24,7; 21,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) *m/z*: [M+H]⁺ izračunato za C₁₆H₂₁N₄⁺ 269,17607; detektovano 269,17611.

HPLC čistoća, metoda A: *t_R* = 5,67 min, površina 97,46%; metoda C: *t_R* = 9,63 min, površina 96,69% (λ = 254 nm).

4-(6-Metil-2-(piperazin-1-il)pirimidin-4-il)benzonitril (140)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **127** (62 mg, 0,16 mmol), dobijeno je jedinjenje **140** (41 mg, 89%). Čvrsta supstanca žute boje.

t.t. 65 – 67 °C

IC (ATR): ν = 3594, 3330, 3207, 3079, 2990, 2947, 2917, 2850, 2746, 2228, 1725, 1641, 1582, 1566, 1551, 1505, 1450, 1374, 1347, 1316, 1296, 1269, 1225, 1137, 1108, 1017, 995, 888, 837, 815, 788, 590, 544 cm^{-1} .

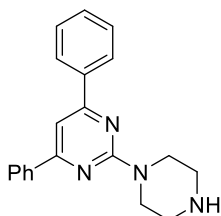
¹H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,12 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,73 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 6,82 (s, 1H), 3,90 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 2,96 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,41 (s, 3H), 1,85 (brs, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 169,0; 162,2; 162,0; 142,5; 132,5; 127,7; 118,8; 113,5; 105,6; 46,2; 45,1; 24,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5^+$ 280,15567; detektovano 280,15574.

HPLC čistoća, metoda A: t_R = 5,45 min, površina 98,52%; metoda C: t_R = 9,07 min, površina 98,93% (λ = 254 nm).

4,6-Difenil-2-(piperazin-1-il)pirimidin (141)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **128** (291 mg, 0,699 mmol), dobijeno je jedinjenje **141** (200 mg, 90%). Čvrsta supstanca svetlo žute boje.

t.t. 152 – 155 °C

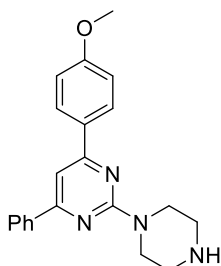
IC (ATR): ν = 3298, 3061, 2996, 2942, 2848, 2739, 1690, 1586, 1564, 1546, 1494, 1449, 1360, 1315, 1295, 1265, 1233, 1201, 1183, 1125, 1070, 1029, 986, 970, 923, 834, 763, 691, 632 cm^{-1} .

¹H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$): δ = 8,07 – 8,03 (m, 4H), 7,45 – 7,41 (m, 6H), 7,37 (s, 1H), 4,00 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 2,97 (t, J = 5,0 Hz, 4H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$): δ = 165,3; 162,1; 138,0; 130,4; 128,7; 127,1; 102,3; 45,3; 44,2 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4^+$ 317,17607; detektovano 317,17545.

4-(4-Metoksifenil)-6-fenil-2-(piperazin-1-il)pirimidin (142)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **129** (86 mg, 0,19 mmol), dobijeno je jedinjenje **142** (60 mg, 90%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 139 – 142 °C

IC (ATR): ν = 2944, 2921, 2836, 1722, 1689, 1608, 1584, 1565, 1542, 1512, 1494, 1460, 1442, 1358, 1301, 1256, 1239, 1171, 1118, 1073, 1029, 985, 969, 923, 897, 835, 820, 768, 734, 693, 654, 638, 605, 581, 536, 517, 466 cm^{-1} .

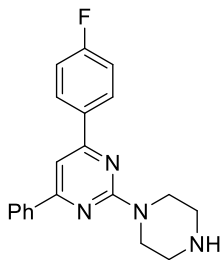
¹H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,13 – 8,07 (m, 4H), 7,51 – 7,45 (m, 3H), 7,35 (s, 1H), 7,03 – 6,98 (m, 2H), 4,03 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 3,88 (s, 3H), 3,02 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,27 (brs, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 165,1; 164,8; 162,4; 161,7; 138,5; 130,8; 130,3; 128,7; 128,7; 127,2; 114,1; 101,3; 55,5; 46,2; 45,0 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{ON}_4^+$ 347,18664; detektovano 347,18672.

HPLC čistoća, metoda A: t_R = 6,07 min, površina 95,03%; metoda B: t_R = 7,66 min, površina 97,19% (λ = 254 nm).

4-(4-Fluorfenil)-6-fenil-2-(piperazin-1-il)pirimidin (143)



Primjenom *opšte procedure C*, polazeći iz **130** (165 mg, 0,38 mmol), dobijeno je jedinjenje **143** (127 mg, 100%). Čvrsta supstanca žute boje.

t.t. 154 – 156 °C

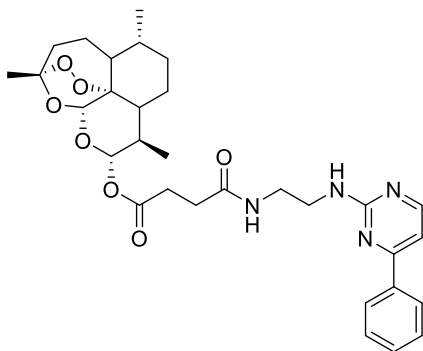
IC (ATR): ν = 3525, 3057, 2918, 2851, 1695, 1601, 1584, 1566, 1547, 1509, 1496, 1450, 1403, 1359, 1295, 1269, 1231, 1200, 1156, 1127, 1070, 1028, 1014, 985, 936, 845, 821, 766, 721, 686, 606, 570, 503 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 8,09 – 8,04 (m, 4H), 7,47 – 7,45 (m, 3H), 7,37 (s, 1H), 7,14 (t, J = 8,5 Hz, 2H), 4,12 – 4,10 (m, 4H), 3,12 – 3,05 (m, 4H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 165,6; 164,5 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 251 Hz); 164,4; 161,8; 137,8; 134,0 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 3 Hz); 130,7; 129,2 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 9 Hz); 128,8; 127,1; 115,7 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22 Hz); 102,4; 44,6; 43,0 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_4^+$ 335,16665; detektovano 335,16604.

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-okso-4-((2-((4-fenilpirimidin-2-il)amino)etil)amino)butanoat (144)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (27 mg, 0,07 mmol) i **111** (15 mg, 0,07 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **144** (23 mg, 56%). Bež ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 2,5 (c 0,08, CH_2Cl_2)

IC (ATR): ν = 3378, 2954, 2926, 2871, 2854, 1749, 1703, 1634, 1590, 1571, 1530, 1497, 1461, 1415, 1377, 1363, 1326, 1278, 1250, 1228, 1202, 1162, 1132, 1098, 1051, 1036, 1018, 949, 927,

910, 877, 849, 824, 770, 737, 697, 629, 551, 487 cm^{-1} .

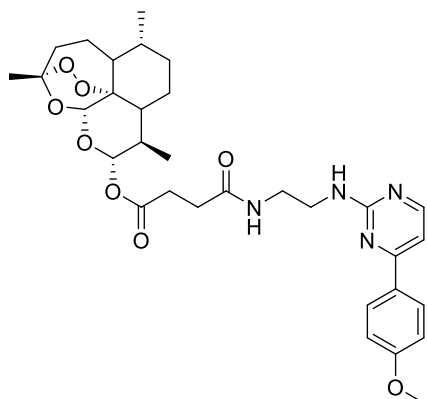
^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 8,20 – 8,15 (m, 1H), 7,96 – 7,89 (m, 2H), 7,44 – 7,41 (m, 1H), 7,40 – 7,36 (m, 3H), 6,93 – 6,90 (m, 1H), 5,63 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 5,32 (s, 1H), 3,56 – 3,50 (m, 2H), 3,43 – 3,32 (m, 2H), 2,66 – 2,55 (m, 2H), 2,46 – 2,30 (m, 3H), 2,25 (td, J = 14,0 Hz, J = 4,0 Hz, 1H), 1,95 – 1,89 (m, 1H), 1,82 – 1,75 (m, 1H), 1,68 – 1,54 (m, 2H), 1,49 (dt, J = 13,8 Hz, J = 4,5 Hz, 1H), 1,37 – 1,28 (m, 4H), 1,27 – 1,12 (m, 3H), 0,93 – 0,82 (m, 4H), 0,73 (d, J = 7,2 Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 172,4; 171,9; 165,3; 162,3; 158,0; 136,9; 130,8; 128,8; 127,0; 106,6; 104,5; 92,2; 91,5; 80,2; 51,4; 45,1; 40,7; 39,9; 37,2; 36,1; 33,9; 31,6; 30,5; 29,7; 25,5; 24,5; 21,8; 20,0; 11,8 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{O}_7\text{N}_4^+$ 581,29698; detektovano 581,29757.

HPLC čistoća, metoda B: t_R = 9,50 min, površina 98,36%; metoda H: t_R = 12,90 min, površina 98,33% (λ = 254 nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-((2-((4-(4-metoksifenil)pirimidin-2-il)amino)etil)amino)-4-oksobutanoat (145)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (27 mg, 0,07 mmol) i **112** (17 mg, 0,07 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **145** (15 mg, 36%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} + 7,5$ (c 0,07, CH₂Cl₂)

IC (ATR): $\nu = 3374, 2926, 2871, 2854, 1748, 1660, 1607, 1573, 1529, 1510, 1461, 1413, 1377, 1362, 1326, 1306, 1281, 1251, 1207, 1132, 1098, 1035, 1018, 949, 927, 910, 877, 846, 808, 762, 736, 700, 582, 551, 523, 487 \text{ cm}^{-1}$.

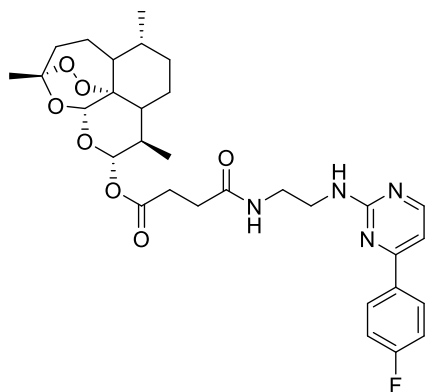
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,27$ (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), $8,01$ (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), $6,98$ (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), $6,95$ (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), $6,75$ (t, $J = 4,9$ Hz, 1H), $5,76$ (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), $5,73 - 5,67$ (m, 1H), $5,38$ (s, 1H), $3,87$ (s, 3H), $3,62 - 3,71$ (m, 2H), $3,58 - 3,45$ (m, 2H), $2,80 - 2,63$ (m, 2H), $2,57 - 2,29$ (m, 4H), $1,99$ (dt, $J = 14,6$ Hz, $J = 4,1$ Hz, 1H), $1,89 - 1,81$ (m, 1H), $1,75 - 1,68$ (m, 1H), $1,67 - 1,54$ (m, 2H), $1,46 - 1,39$ (m, 4H), $1,37 - 1,20$ (m, 3H), $1,01 - 0,91$ (m, 4H), $0,82$ (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 172,0; 171,8; 164,5; 162,8; 162,0; 158,2; 129,6; 128,7; 114,3; 106,2; 104,5; 92,3; 91,6; 80,2; 55,6; 51,6; 45,3; 41,1; 40,9; 37,3; 36,3; 34,2; 31,8; 31,3; 30,2; 26,0; 24,7; 22,1; 20,3; 12,2$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₃₂H₄₃O₈N₄⁺ 611,30754; detektovano 611,30725.

HPLC čistoća, metoda B: $t_R = 9,26$ min, površina 99,90%; metoda E: $t_R = 10,02$ min, površina 98,10% ($\lambda = 254$ nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-((2-((4-(4-fluorfenil)pirimidin-2-il)amino)etil)amino)-4-oksobutanoat (146)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (35 mg, 0,09 mmol) i **113** (21 mg, 0,09 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **146** (31 mg, 61%). Žuto ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 7,5$ (c 0,08, CH₂Cl₂)

IC (ATR): $\nu = 3378, 2953, 2926, 2871, 2854, 1748, 1703, 1664, 1602, 1574, 1531, 1508, 1461, 1413, 1377, 1363, 1298, 1277, 1229, 1159, 1132, 1098, 1036, 1017, 949, 927, 877, 851, 809, 762, 736, 701, 571, 515 \text{ cm}^{-1}$.

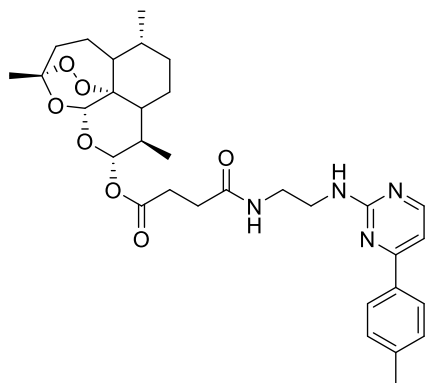
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,31 - 8,24$ (m, 1H), $8,09 - 8,00$ (m, 2H), $7,18 - 7,12$ (m, 2H), $6,96 - 6,93$ (m, 1H), $6,71$ (brs, 1H), $5,75$ (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), $5,38$ (s, 1H), $3,71 - 3,61$ (m, 2H), $3,58 - 3,44$ (m, 2H), $2,78 - 2,64$ (m, 2H), $2,56 - 2,28$ (m, 4H), $2,02 - 1,95$ (m, 1H), $1,89 - 1,80$ (m, 1H), $1,75 - 1,54$ (m, 3H), $1,45 - 1,34$ (m, 4H), $1,33 - 1,17$ (m, 3H), $1,02 - 0,87$ (m, 4H), $0,82$ (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 172,0; 171,9; 164,7 (d, J_{C-F} = 252 Hz); 164,3; 164,1; 162,3; 133,2 (d, J_{C-F} = 3 Hz); 129,3 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 116,0 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 106,3; 104,6; 92,3; 91,6; 80,2; 51,6; 45,3; 41,2; 40,4; 37,3; 36,3; 34,2; 31,8; 31,2; 30,1; 26,0; 24,7; 22,1; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₃₁H₄₀O₇N₄F⁺ 599,28755; detektovano 599,28769.

HPLC čistoća, metoda B: t_R = 9,70 min, površina 97,72%; metoda I: t_R = 10,35 min, površina 98,49% (λ = 254 nm).

(3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-Trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-okso-4-((2-((4-(*p*-tolil)pirimidin-2-il)amino)etil)amino)butanoat (147)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (38 mg, 0,10 mmol) i **114** (23 mg, 0,10 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **147** (36 mg, 64%). Smeđe ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 5,0 (c 0,06, CH₂Cl₂)

IC (ATR): ν = 3353, 2953, 2925, 2870, 2854, 1748, 1659, 1586, 1574, 1530, 1511, 1461, 1415, 1377, 1362, 1277, 1250, 1228, 1207, 1184, 1162, 1132, 1098, 1036, 1018, 948, 927, 910, 877, 848, 825, 803, 762, 738, 704, 573, 502 cm⁻¹.

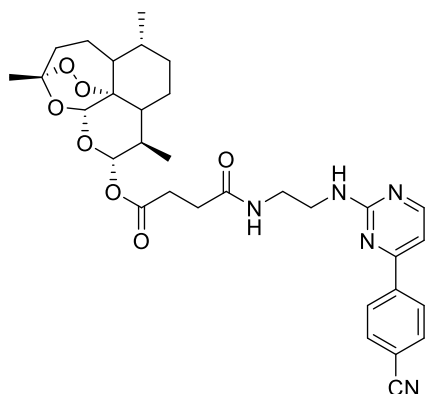
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,24 – 8,19 (m, 1H), 7,95 – 7,90 (m, 2H), 7,29 – 7,25 (m, 2H), 6,98 – 6,95 (m, 1H), 6,79 – 6,74 (m, 1H), 5,75 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,38 (s, 1H), 3,69 – 3,62 (m, 2H), 3,56 – 3,48 (m, 2H), 2,78 – 2,62 (m, 2H), 2,57 – 2,28 (m, 7H), 2,02 – 1,96 (m, 1H), 1,89 – 1,81 (m, 1H), 1,76 – 1,54 (m, 3H), 1,48 – 1,37 (m, 4H), 1,35 – 1,18 (m, 3H), 1,02 – 0,88 (m, 4H), 0,81 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 175,9; 171,9; 171,8; 165,5; 164,8; 141,5; 134,2; 129,7; 127,2; 106,4; 104,5; 92,2; 91,5; 80,2; 51,6; 45,3; 41,0; 40,6; 37,3; 36,3; 34,2; 31,8; 31,0; 30,0; 26,0; 24,7; 22,0; 21,6; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₃₂H₄₃O₇N₄⁺ 595,31263; detektovano 595,31210.

HPLC čistoća, metoda B: t_R = 9,61 min, površina 99,70%; metoda H: t_R = 13,55 min, površina 99,38% (λ = 254 nm).

(3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-Trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-((2-((4-(4-cijanofenil)pirimidin-2-il)amino)etil)amino)-4-oksobutanoat (148)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (42 mg, 0,11 mmol) i **115** (26 mg, 0,11 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **148** (20 mg, 31%). Smeđe ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ + 45,0 (c 0,04, CH₂Cl₂)

IC (ATR): ν = 3369, 2953, 2925, 2870, 2854, 2228, 1747, 1657, 1585, 1555, 1531, 1503, 1459, 1416, 1377, 1276, 1249, 1228, 1202, 1163, 1129, 1096, 1035, 1017, 927, 910, 877, 855, 824, 810, 762, 737, 695, 550 cm⁻¹.

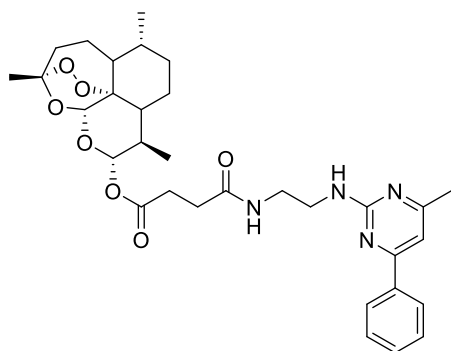
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,36 (s, 1H), 8,13 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,75 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,00 (s, 1H), 6,64 (s, 1H), 5,74 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,38 (s, 1H), 3,69 – 3,45 (m, 4H), 2,76 – 2,66 (m, 2H), 2,54 – 2,29 (m, 4H), 1,98 (dt, J = 14,7 Hz, J = 3,6 Hz, 1H), 1,88 – 1,80 (m, 1H), 1,75 – 1,55 (m, 3H), 1,44 – 1,34 (m, 4H), 1,33 – 1,16 (m, 3H), 1,01 – 0,89 (m, 4H), 0,81 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 172,0; 163,1; 158,6; 141,3; 132,6; 127,7; 118,5; 114,2; 106,9; 104,5; 92,3; 91,5; 80,2; 51,6; 45,2; 41,3; 40,0; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 31,2; 30,1; 28,3; 26,0; 24,6; 22,0; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+H]⁺ izračunato za C₃₂H₄₀O₇N₅⁺ 606,29223; detektovano 606,29261.

HPLC čistoća, metoda B: t_R = 9,27 min, površina 97,60%; metoda I: t_R = 9,98 min, površina 96,15% (λ = 254 nm).

(3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-Trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]zohromen-10-il 4-((2-((4-metil-6-fenilpirimidin-2-il)amino)etil)amino)-4-oksobutanoat (149)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (42 mg, 0,11 mmol) i **116** (25 mg, 0,11 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **149** (36 mg, 58%). Bež ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 1,4 (c 0,07, CH₂Cl₂)

IC (ATR): ν = 3345, 2954, 2925, 2870, 2854, 1748, 1704, 1659, 1578, 1558, 1496, 1461, 1377, 1346, 1250, 1227, 1206, 1161, 1131, 1098, 1035, 1017, 946, 926, 877, 848, 825, 771, 737, 696,

644, 592, 549 cm⁻¹.

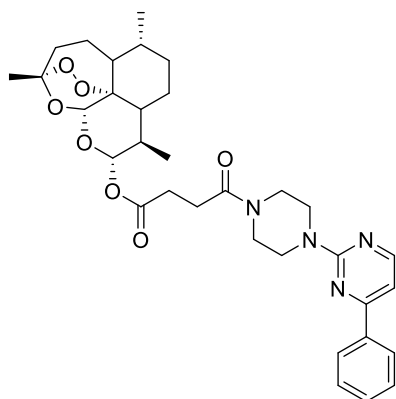
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,05 – 7,98 (m, 2H), 7,49 – 7,43 (m, 3H), 6,96 (s, 1H), 6,90 (s, 1H), 5,75 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,58 (t, J = 6,1 Hz, 1H), 5,39 (s, 1H), 3,70 – 3,62 (m, 2H), 3,56 – 3,45 (m, 2H), 2,79 – 2,47 (m, 4H), 2,42 – 2,28 (m, 5H), 2,03 – 1,97 (m, 1H), 1,90 – 1,82 (m, 1H), 1,77 – 1,54 (m, 3H), 1,48 – 1,39 (m, 4H), 1,38 – 1,21 (m, 3H), 1,02 – 0,90 (m, 4H), 0,81 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171,9; 171,6; 168,6; 164,7; 163,1; 137,5; 130,6; 128,9; 127,1; 106,7; 104,5; 92,2; 91,6; 80,2; 51,7; 45,3; 41,5; 41,1; 37,3; 36,3; 34,2; 31,9; 31,1; 30,0; 26,0; 24,7; 24,5; 22,1; 20,3; 12,2 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+H]⁺ izračunato za C₃₂H₄₃O₇N₄⁺ 595,31263; detektovano 595,31258.

HPLC čistoća, metoda B: t_R = 9,42 min, površina 99,52%; metoda E: t_R = 10,48 min, površina 98,59% (λ = 254 nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-okso-4-(4-(4-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)butanoat (150)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (56 mg, 0,14 mmol) i **131** (35 mg, 0,14 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **150** (64 mg, 73%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 4,33$ (c 0,3, CH₂Cl₂)

IC (ATR): $\nu = 3059, 2926, 2872, 1750, 1650, 1588, 1567, 1554, 1495, 1440, 1376, 1344, 1277, 1255, 1218, 1163, 1132, 1100, 1036, 1017, 983, 927, 877, 845, 825, 770, 735, 698, 629 \text{ cm}^{-1}$.

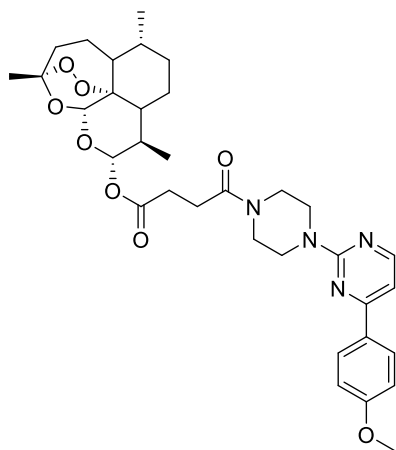
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,39$ (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 8,07 – 8,01 (m, 2H), 7,50 – 7,45 (m, 3H), 6,99 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 5,80 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 5,43 (s, 1H), 4,01 – 3,90 (m, 4H), 3,77 – 3,71 (m, 2H), 3,64 – 3,58 (m, 2H), 2,91 – 2,54 (m, 5H), 2,37 (td, $J = 14,0$ Hz, $J = 3,9$ Hz, 1H), 2,05 – 1,99 (m, 1H), 1,93 – 1,84 (m, 1H), 1,81 – 1,67 (m, 2H), 1,62 (dt, $J = 13,8$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), 1,53 – 1,41 (m, 4H), 1,40 – 1,22 (m, 3H), 1,05 – 0,93 (m, 4H), 0,88 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 172,0; 169,9; 164,6; 161,8; 158,5; 155,4; 137,5; 130,8; 128,8; 127,1; 106,4; 104,6; 92,2; 91,6; 80,3; 51,7; 45,4; 43,9; 43,8; 41,8; 37,4; 36,4; 34,2; 32,0; 29,6; 27,9; 26,1; 24,7; 22,1; 20,3; 12,2$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₃₃H₄₃O₇N₄⁺ 607,31263; detektovano 607,31189.

HPLC čistoća, metoda A: $t_R = 9,56$ min, površina 99,72%; metoda F: $t_R = 11,91$ min, površina 99,51% ($\lambda = 254$ nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-(4-(4-(4-metoksifenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)-4-oksobutanoat (151)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (41 mg 0,11 mmol) i **132** (29 mg, 0,11 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **151** (58 mg, 85%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 2,5$ (c 0,16, CH₂Cl₂)

IC (ATR): $\nu = 2927, 2872, 1750, 1650, 1608, 1586, 1566, 1511, 1439, 1376, 1344, 1303, 1277, 1252, 1217, 1173, 1132, 1100, 1036, 1017, 983, 927, 877, 846, 809, 735, 701, 584 \text{ cm}^{-1}$.

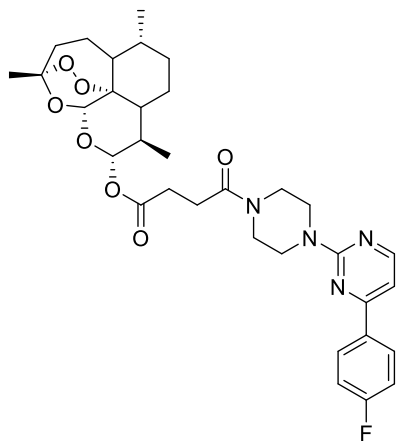
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,32$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,97 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,92 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 5,79 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 5,43 (s, 1H), 3,99 – 3,98 (m, 4H), 3,86 (s, 3H), 3,72 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 3,59 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 2,90 – 2,54 (m, 5H), 2,36 (td, $J = 14,0$, $J = 3,9$ Hz, 1H), 2,05 – 1,97 (m, 1H), 1,92 – 1,83 (m, 1H), 1,80 – 1,66 (m, 2H), 1,61 (dt, $J = 13,9$, $J = 4,4$ Hz, 1H), 1,52 – 1,40 (m, 4H), 1,39 – 1,19 (m, 3H), 1,05 – 0,92 (m, 4H), 0,87 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 171,9; 169,9; 164,1; 161,9; 161,7; 158,1; 129,9; 128,6; 114,1; 105,7; 104,5; 92,2; 91,6; 80,2; 55,5; 51,7; 45,4; 43,9; 43,7; 41,8; 37,4; 36,3; 34,2; 32,0; 29,6; 27,9; 26,1; 24,7; 22,1; 20,3; 12,2$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za $C_{34}H_{45}O_8N_4^+$ 637,32319; detektovano 637,32255.

HPLC čistoća, metoda A: t_R = 9,56 min, površina 98,74%; metoda F: t_R = 11,91 min, površina 99,46% (λ = 254 nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-(4-(4-(4-fluorofenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)-4-oksobutanoat (152)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (50 mg, 0,13 mmol) i **133** (34 mg, 0,13 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **152** (51 mg, 62%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 1,36 (c 0,07, CH_2Cl_2).

IC (ATR): ν = 3457, 2953, 2925, 2870, 2854, 1749, 1650, 1602, 1569, 1508, 1441, 1377, 1344, 1291, 1276, 1224, 1158, 1131, 1099, 1017, 983, 926, 910, 877, 851, 824, 809, 762, 736, 700, 573, 512 cm^{-1} .

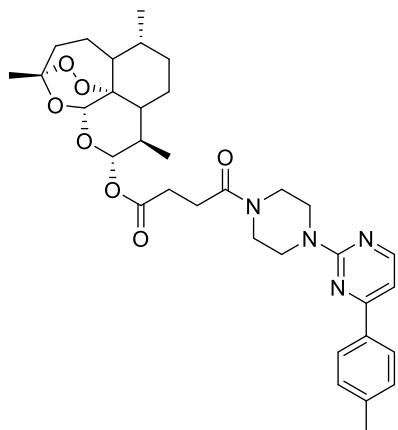
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,37 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,06 – 8,01 (m, 2H), 7,18 – 7,11 (m, 2H), 6,93 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 5,79 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,43 (s, 1H), 3,99 – 3,88 (m, 4H), 3,72 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,60 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 2,91 – 2,52 (m, 5H), 2,36 (td, J = 14,0, J = 4,0 Hz, 1H), 2,08 – 1,98 (m, 1H), 1,92 – 1,83 (m, 1H), 1,80 – 1,67 (m, 2H), 1,61 (dt, J = 13,9, J = 4,5 Hz, 1H), 1,53 – 1,40 (m, 4H), 1,39 – 1,22 (m, 3H), 1,05 – 0,92 (m, 4H), 0,87 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 171,9; 169,9; 164,5 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 163,5; 161,8; 158,6; 133,7 (d, J_{C-F} = 3 Hz); 129,1 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 115,8 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 106,0; 104,6; 92,2; 91,6; 80,3; 51,7; 45,4; 45,3; 43,9; 43,7; 41,8; 37,4; 36,3; 34,2; 32,0; 29,6; 27,9; 26,1; 24,7; 22,1; 20,3; 12,2 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za $C_{33}H_{42}O_7N_4F^+$ 625,30320; detektovano 625,30266.

HPLC čistoća, metoda B: t_R = 9,89 min, površina 98,83%; metoda E: t_R = 11,16 min, površina 98,53% (λ = 254 nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-okso-4-(4-(4-(*p*-tolil)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)butanoat (153)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (46 mg, 0,12 mmol) i **134** (30 mg, 0,12 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **153** (35 mg, 49%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 7,5 (c 0,08, CH_2Cl_2)

IC (ATR): ν = 3427, 2953, 2925, 2870, 2854, 1748, 1650, 1584, 1567, 1553, 1493, 1440, 1377, 1343, 1277, 1252, 1215, 1184, 1163, 1131, 1099, 1036, 1017, 983, 927, 877, 846, 824, 804, 762, 737, 699, 574, 498 cm^{-1} .

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,36 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,96 – 7,92 (m, 2H), 7,29 – 7,24 (m, 2H), 6,96 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 5,80 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,44 (s, 1H), 4,00 – 3,88 (m, 4H), 3,72 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,60 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 2,90 – 2,54 (m, 5H), 2,41 (s, 3H), 2,38 – 2,31 (m, 1H), 2,06 – 1,98 (m, 1H), 1,92 – 1,84 (m, 1H), 1,80 – 1,67 (m, 2H), 1,61 (dt, J

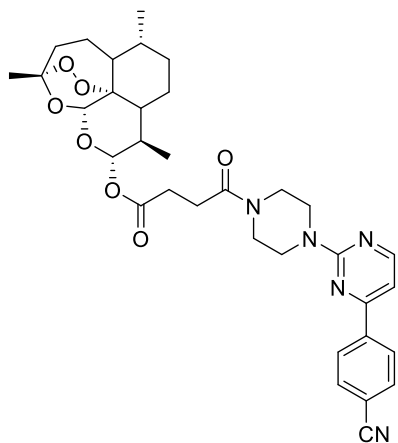
= 14,1, $J = 4,5$ Hz, 1H), 1,53 – 1,40 (m, 4H), 1,39 – 1,22 (m, 3H), 1,06 – 0,93 (m, 4H), 0,87 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 172,0; 170,0; 167,4; 164,6; 161,8; 158,2; 155,6; 141,1; 134,7; 129,6; 127,1; 106,2; 104,6; 92,2; 91,6; 80,3; 51,7; 45,4; 43,9; 43,7; 41,8; 37,4; 36,4; 34,2; 32,0; 29,6; 27,9; 26,1; 24,7; 22,1; 21,6; 20,3; 12,2$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{O}_7\text{N}_4^+$ 621,32828; detektovano 621,32768.

HPLC čistoća, metoda A: $t_R = 9,92$ min, površina 99,06%; metoda E: $t_R = 12,97$ min, površina 99,25% ($\lambda = 254$ nm).

(3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-Trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-(4-(4-(4-cijanofenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)-4-oksobutanoat (154)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (31 mg, 0,08 mmol) i **135** (22 mg, 0,08 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **154** (23 mg, 44%). Žuto ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 3,0$ (c 0,07, CH_2Cl_2)

IC (ATR): $\nu = 3428, 2954, 2925, 2870, 2854, 2228, 1748, 1649, 1582, 1561, 1501, 1439, 1377, 1344, 1278, 1251, 1219, 1163, 1131, 1099, 1017, 983, 927, 877, 856, 810, 762, 737, 691, 549$ cm^{-1} .

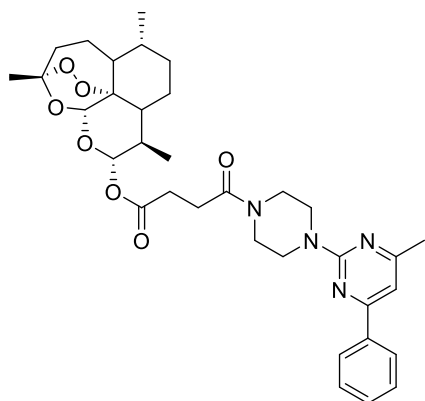
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,45$ (d, $J = 5,1$ Hz, 1H), 8,13 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,76 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 6,99 (d, $J = 5,1$ Hz, 1H), 5,79 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 5,43 (s, 1H), 4,00 – 3,88 (m, 4H), 3,73 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H), 3,61 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 2,91 – 2,52 (m, 5H), 2,36 (td, $J = 14,0$ Hz, $J = 3,9$ Hz, 1H), 2,05 – 1,98 (m, 1H), 1,92 – 1,84 (m, 1H), 1,80 – 1,66 (m, 2H), 1,61 (dt, $J = 13,9$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), 1,52 – 1,40 (m, 4H), 1,39 – 1,22 (m, 3H), 1,06 – 0,93 (m, 4H), 0,87 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,9; 170,0; 162,5; 161,8; 159,2; 141,8; 132,6; 127,7; 118,6; 114,0; 106,6; 104,6; 92,2; 91,6; 80,3; 51,7; 45,4; 45,3; 43,9; 43,7; 41,7; 37,4; 36,3; 34,2; 32,0; 29,6; 27,9; 26,1; 24,7; 22,1; 20,3; 12,2$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{O}_7\text{N}_5\text{Na}^+$ 654,28982; detektovano 654,28938.

HPLC čistoća, metoda B: $t_R = 9,69$ min, površina 97,49%; metoda E: $t_R = 9,14$ min, površina 99,21% ($\lambda = 254$ nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-(4-(4-metil-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)-4-oksobutanoat (155)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (27 mg, 0,07 mmol) i **136** (18 mg, 0,07 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **155** (24 mg, 56%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 24$ (c 0,07, CH₂Cl₂)

IC (ATR): $\nu = 3352, 2954, 2924, 2870, 2853, 1747, 1649, 1570, 1553, 1493, 1444, 1377, 1348, 1277, 1249, 1221, 1162, 1132, 1099, 1017, 949, 926, 910, 878, 849, 825, 770, 738, 696, 591 \text{ cm}^{-1}$.

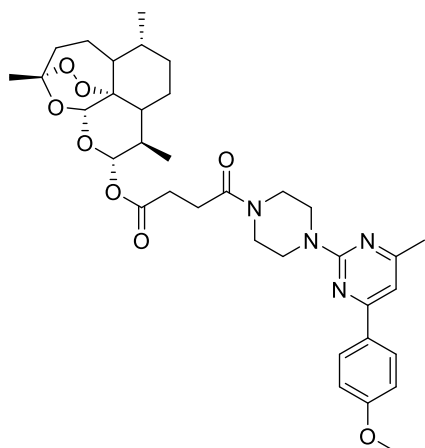
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,05 - 8,01$ (m, 2H), $7,48 - 7,44$ (m, 3H), $6,88$ (s, 1H), $5,80$ (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), $5,44$ (s, 1H), $4,03 - 3,87$ (m, 4H), $3,72$ (t, $J = 5,4$ Hz, 2H), $3,60$ (t, $J = 5,3$ Hz, 2H), $2,90 - 2,53$ (m, 5H), $2,44 - 2,32$ (m, 4H), $2,05 - 1,98$ (m, 1H), $1,92 - 1,85$ (m, 1H), $1,81 - 1,68$ (m, 2H), $1,62$ (dt, $J = 13,8$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), $1,54 - 1,41$ (m, 4H), $1,40 - 1,23$ (m, 3H), $1,11 - 0,94$ (m, 4H), $0,88$ (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 172,0; 169,9; 168,4; 164,3; 162,0; 137,9; 130,5; 128,8; 127,1; 106,0; 104,6; 92,2; 91,6; 80,3; 51,7; 45,4; 45,4; 44,0; 43,8; 41,9; 37,4; 36,4; 34,2; 32,0; 29,6; 27,9; 26,1; 24,7; 24,6; 22,1; 20,3; 12,2$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₃₄H₄₅O₇N₄⁺ 621,32828; detektovano 621,32789.

HPLC čistoća, metoda B: $t_R = 10,21$ min, površina 99,32%; metoda E: $t_R = 12,90$ min, površina 97,38% ($\lambda = 254$ nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-(4-(4-(4-metoksifenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)-4-oksobutanoat (156)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (54 mg, 0,14 mmol) i **137** (40 mg, 0,14 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **156** (57 mg, 62%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} + 20,0$ (c 0,08, CH₂Cl₂)

IC (ATR): $\nu = 3478, 2953, 2925, 2870, 2854, 1749, 1649, 1608, 1585, 1571, 1550, 1513, 1493, 1443, 1377, 1350, 1305, 1277, 1254, 1222, 1172, 1132, 1099, 1035, 1017, 947, 926, 910, 877, 846, 824, 790, 762, 736, 701, 646, 593, 547, 514, 486 \text{ cm}^{-1}$.

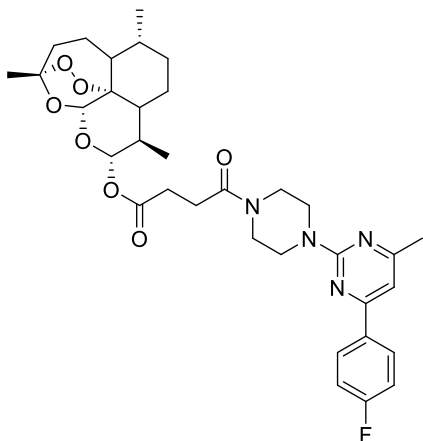
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,00$ (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), $6,97$ (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), $6,82$ (s, 1H), $5,80$ (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), $5,43$ (s, 1H), $4,03 - 3,88$ (m, 4H), $3,86$ (s, 3H), $3,71$ (t, $J = 5,3$ Hz, 2H), $3,59$ (t, $J = 5,3$ Hz, 2H), $2,91 - 2,54$ (m, 5H), $2,42 - 2,32$ (m, 4H), $2,05 - 1,99$ (m, 1H), $1,92 - 1,84$ (m, 1H), $1,81 - 1,67$ (m, 2H), $1,61$ (dt, $J = 13,7$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), $1,53 - 1,41$ (m, 4H), $1,40 - 1,19$ (m, 3H), $1,08 - 0,93$ (m, 4H), $0,87$ (d, $J = 7,4$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 172,0; 169,9; 168,1; 163,8; 161,9; 161,7; 130,3; 128,6; 114,1; 105,2; 104,6; 92,2; 91,6; 80,3; 55,5; 51,7; 45,5; 45,4; 44,0; 43,8; 41,9; 37,4; 36,4; 34,2; 32,0; 29,6; 27,9; 26,1; 24,7; 24,6; 22,1; 20,3; 12,2$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za $C_{35}H_{47}O_8N_4^+$ 651,33884; detektovano 651,33893.

HPLC čistoća, metoda A: t_R = 9,80 min, površina 99,65%; metoda E: t_R = 12,66 min, površina 99,08% (λ = 254 nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*ij*izohromen-10-il 4-(4-(4-(4-fluorfenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)-4-oksobutanoat (157)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (62 mg, 0,16 mmol) i **138** (43 mg, 0,16 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **157** (54 mg, 54%). Bež ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ - 4,1 (c 0,4, CH_2Cl_2)

IC (ATR): ν = 3475, 2953, 2925, 2870, 2854, 1749, 1650, 1602, 1572, 1556, 1510, 1494, 1446, 1377, 1348, 1295, 1276, 1224, 1159, 1132, 1099, 1036, 1017, 948, 926, 878, 850, 825, 790, 762, 737, 701, 591, 546, 503 cm^{-1} .

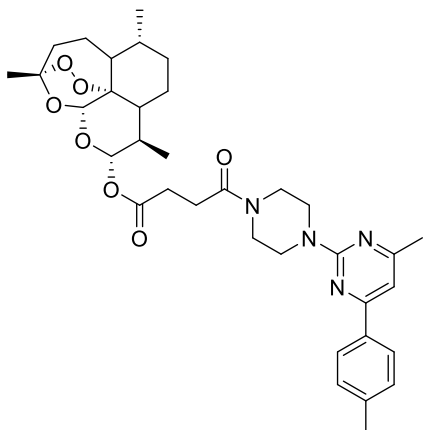
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,05 – 7,98 (m, 2H), 7,15 – 7,08 (m, 2H), 6,81 (s, 1H), 5,78 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,41 (s, 1H), 3,99 – 3,84 (m, 4H), 3,70 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,57 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 2,88 – 2,49 (m, 5H), 2,41 – 2,28 (m, 4H), 2,03 – 1,96 (m, 1H), 1,90 – 1,82 (m, 1H), 1,78 – 1,65 (m, 2H), 1,59 (dt, J = 13,9 Hz, J = 4,4 Hz, 1H), 1,51 – 1,38 (m, 4H), 1,37 – 1,20 (m, 3H), 1,04 – 0,90 (m, 4H), 0,86 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 171,9; 169,8; 168,5; 164,3 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 163,1; 161,8; 133,9 (d, J_{C-F} = 3 Hz); 129,0 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 115,6 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 105,5; 104,5; 92,1; 91,6; 80,2; 51,6; 45,3; 45,3; 43,9; 43,7; 41,8; 37,3; 36,3; 34,1; 31,9; 29,5; 27,8; 26,0; 24,6; 24,6; 22,0; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za $C_{34}H_{44}O_7N_4F^+$ 639,31885; detektovano 639,31876.

HPLC čistoća, metoda B: t_R = 10,22 min, površina 97,58%; metoda E: t_R = 11,04 min, površina 99,18% (λ = 254 nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*ij*izohromen-10-il 4-(4-(4-metil-6-(*p*-tolil)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)-4-oksobutanoat (158)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (54 mg, 0,14 mmol) i **139** (38 mg, 0,14 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **158** (45 mg, 51%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ + 3,0 (c 0,07, CH_2Cl_2)

IC (ATR): ν = 3430, 2954, 2925, 2869, 2854, 1749, 1650, 1570, 1551, 1512, 1493, 1445, 1377, 1348, 1276, 1248, 1222, 1163, 1131, 1099, 1017, 948, 926, 910, 878, 849, 813, 789, 762, 737, 696, 592, 485 cm^{-1} .

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7,96 – 7,91 (m, 2H), 7,28 – 7,24 (m, 2H), 6,86 (s, 1H), 5,80 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,44 (s, 1H), 4,01 – 3,88 (m, 4H), 3,72 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,59 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 2,91 – 2,53 (m, 5H), 2,43 – 2,33 (m, 7H), 2,05 – 1,98 (m, 1H), 1,92 –

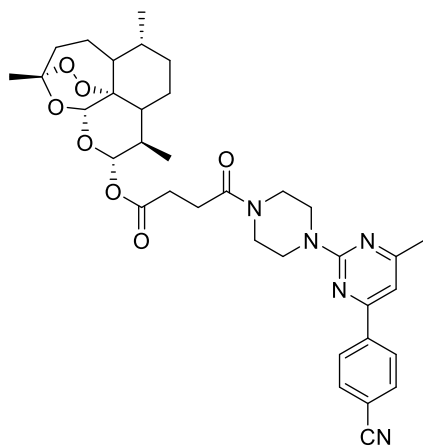
1,85 (m, 1H), 1,80 – 1,68 (m, 3H), 1,62 (dt, $J = 13,8$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), 1,53 – 1,41 (m, 4H), 1,40 – 1,23 (m, 3H), 1,06 – 0,93 (m, 4H), 0,88 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 172,0; 169,9; 168,2; 164,3; 164,2; 161,9; 140,7; 135,0; 129,5; 127,0; 105,7; 104,6; 92,2; 91,6; 80,3; 51,7; 45,4; 45,4; 44,0; 43,8; 41,9; 37,4; 36,3; 34,2; 32,0; 29,6; 27,9; 26,1; 24,7; 24,6; 22,1; 21,5; 20,3; 12,2$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{O}_7\text{N}_4^+$ 635,34393; detektovano 635,34378.

HPLC čistoća, metoda B: $t_R = 10,56$ min, površina 95,92%; metoda E: $t_R = 12,24$ min, površina 97,27% ($\lambda = 254$ nm).

(3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-Trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-(4-(4-(4-cijanofenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)-4-oksobutanoat (159)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (54 mg, 0,14 mmol) i **140** (39 mg, 0,14 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **159** (60 mg, 66%). Žuto ulje.

$[\alpha]_D^{20} + 6,67$ (c 0,06, CH_2Cl_2)

IC (ATR): $\nu = 3428, 2954, 2925, 2870, 2854, 2228, 1748, 1649, 1581, 1566, 1549, 1495, 1446, 1377, 1347, 1278, 1248, 1222, 1162, 1132, 1099, 1035, 1017, 949, 926, 910, 877, 854, 824, 788, 761, 737, 700, 592, 543$ cm^{-1} .

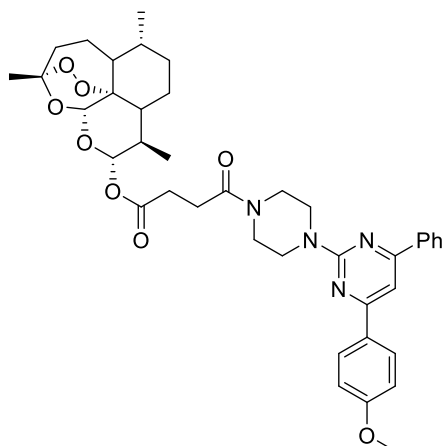
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,12$ (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,74 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 6,87 (s, 1H), 5,78 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 5,42 (s, 1H), 4,00 – 3,88 (m, 4H), 3,74 – 3,68 (m, 2H), 3,62 – 3,56 (m, 2H), 2,87 – 2,51 (m, 5H), 2,46 – 2,30 (m, 4H), 2,04 – 1,97 (m, 1H), 1,91 – 1,84 (m, 1H), 1,79 – 1,66 (m, 2H), 1,60 (dt, $J = 14,1$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), 1,52 – 1,39 (m, 4H), 1,38 – 1,21 (m, 3H), 1,05 – 0,92 (m, 4H), 0,86 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,9; 170,0; 169,2; 162,2; 161,8; 142,1; 132,5; 127,7; 118,7; 113,7; 106,3; 104,6; 92,2; 91,6; 80,2; 51,6; 45,4; 45,3; 43,9; 43,7; 41,8; 37,4; 36,3; 34,2; 31,9; 29,6; 27,9; 26,0; 24,7; 24,6; 22,1; 20,3; 12,1$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{O}_7\text{N}_5\text{Na}^+$ 668,30547; detektovano 668,30517.

HPLC čistoća, metoda B: $t_R = 9,93$ min, površina 98,60%; metoda E: $t_R = 10,12$ min, površina 99,55% ($\lambda = 254$ nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-(4-(4-(4-metoksifenil)-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)-4-oksobutanoat (160)



Primjenom *opšte procedure D*, polazeći iz artesunata **32** (35 mg, 0,09 mmol) i **142** (31 mg, 0,09 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4) dobijeno je jedinjenje **160** (54 mg, 87%). Bež ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 2,8$ (c 0,04, CH₂Cl₂)

IC (ATR): $\nu = 3430, 2954, 2925, 2870, 2853, 1748, 1649, 1607, 1585, 1564, 1542, 1513, 1495, 1445, 1376, 1361, 1305, 1254, 1173, 1132, 1099, 1017, 984, 926, 910, 877, 846, 827, 772, 736, 696, 646, 613, 580, 517 \text{ cm}^{-1}$.

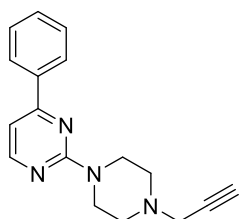
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,15 - 8,06$ (m, 4H), 7,52 – 7,47 (m, 3H), 7,39 (s, 1H), 7,04 – 6,99 (m, 2H), 5,81 (d, $J = 9,7 \text{ Hz}$, 1H), 5,44 (s, 1H), 4,17 – 3,98 (m, 4H), 3,89 (s, 3H), 3,80 – 3,74 (m, 2H), 3,68 – 3,61 (m, 2H), 2,91 – 2,54 (m, 5H), 2,42 – 2,32 (m, 1H), 2,06 – 1,99 (m, 1H), 1,93 – 1,84 (m, 1H), 1,80 – 1,68 (m, 2H), 1,66 – 1,58 (m, 1H), 1,54 – 1,41 (m, 4H), 1,40 – 1,19 (m, 3H), 1,10 – 0,93 (m, 4H), 0,89 (d, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 172,0; 169,9; 167,1; 165,2; 164,9; 162,1; 161,8; 138,3; 130,5; 130,5; 128,8; 128,7; 127,2; 114,2; 104,6; 101,9; 92,2; 91,7; 80,3; 55,6; 51,7; 45,6; 45,4; 44,1; 43,9; 42,0; 37,4; 36,4; 34,2; 32,0; 29,7; 28,0; 26,1; 24,7; 22,2; 20,3; 12,2 \text{ ppm}$.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₄₀H₄₉O₈N₄⁺ 713,35449; detektovano 713,35460.

HPLC čistoća, metoda B: $t_R = 11,36 \text{ min}$, površina 95,13%; metoda E: $t_R = 12,66 \text{ min}$, površina 95,11% ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

4-Fenil-2-(4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il)pirimidin (161)



Primjenom *opšte procedure E*, polazeći iz **131** (90 mg, 0,37 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4), dobijeno je jedinjenje **161** (83 mg, 80%). Čvrsta supstanca bež boje.

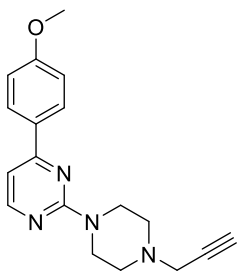
t.t. 118 – 119 °C.

IC (ATR): $\nu = 3235, 3060, 2995, 2949, 2925, 2905, 2888, 2845, 2815, 2750, 2097, 1590, 1566, 1553, 1495, 1467, 1453, 1430, 1372, 1359, 1343, 1328, 1314, 1299, 1255, 1217, 1191, 1161, 1140, 1067, 1031, 1009, 985, 962, 922, 900, 844, 817, 765, 720, 689, 629, 542, 482, 429 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,37$ (d, $J = 5,2 \text{ Hz}$, 1H), 8,07 – 8,03 (m, 2H), 7,48 – 7,45 (m, 3H), 6,94 (d, $J = 5,2 \text{ Hz}$, 1H), 3,99 (t, $J = 5,2 \text{ Hz}$, 4H), 3,38 (d, $J = 2,5 \text{ Hz}$, 2H), 2,67 (t, $J = 5,2 \text{ Hz}$, 4H), 2,26 (t, $J = 2,4 \text{ Hz}$, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 164,5; 162,0; 158,4; 137,8; 130,6; 128,8; 127,1; 105,9; 78,7, 73,5; 52,0; 47,2; 43,8 \text{ ppm}$.

4-(4-Metoksifenil)-2-(4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il)pirimidin (162)



Primjenom *opšte procedure E*, polazeći iz **132** (144 mg, 0,533 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 1/1), dobijeno je jedinjenje **162** (138 mg, 84%). Čvrsta supstanca bež boje.

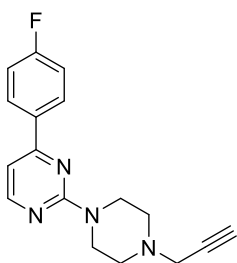
t.t. 99 – 101 °C.

IC (ATR): ν = 3213, 3057, 3013, 2990, 2958, 2919, 2902, 2863, 2839, 2817, 2772, 2749, 2111, 1607, 1588, 1569, 1555, 1511, 1490, 1440, 1378, 1339, 1312, 1248, 1189, 1176, 1148, 1122, 1102, 1055, 1027, 1011, 985, 965, 841, 823, 802, 777, 743, 688, 647, 634, 584, 542, 517, 482, 421 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,32 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,04 – 8,00 (m, 2H), 6,99 – 6,95 (m, 2H), 6,88 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 3,97 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 3,86 (s, 3H), 3,37 (d, J = 2,5 Hz, 2H), 2,66 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 2,26 (t, J = 2,4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 163,9; 161,9; 161,8; 158,1; 130,2; 128,6; 114,1; 105,2; 78,8; 73,5; 55,5; 52,0; 47,2; 43,7 ppm.

4-(4-Fluorfenil)-2-(4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il)pirimidin (163)



Primjenom *opšte procedure E*, polazeći iz **133** (167 mg, 0,646 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 7/3), dobijeno je jedinjenje **163** (153 mg, 79%). Čvrsta supstanca bež boje.

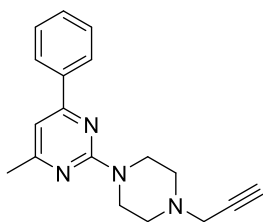
t.t. 104 – 107 °C.

IC (ATR): ν = 3300, 2908, 2815, 1603, 1571, 1507, 1442, 1407, 1344, 1297, 1258, 1231, 1157, 1139, 1096, 1007, 985, 962, 849, 805, 654, 573, 510 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,36 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 8,07 – 8,02 (m, 2H), 7,16 – 7,11 (m, 2H), 6,89 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 3,98 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,38 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 2,66 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,26 (t, J = 2,4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 164,5 (d, J_{C-F} = 250 Hz); 163,3; 161,9; 158,5; 133,9; 129,1 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 115,8 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 105,5; 78,7; 73,5; 51,9; 47,2; 43,7 ppm.

4-Metil-6-fenil-2-(4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il)pirimidin (164)



Primjenom *opšte procedure E*, polazeći iz **136** (248 mg, 0,976 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 7/3), dobijeno je jedinjenje **164** (196 mg, 69%). Čvrsta supstanca bež boje.

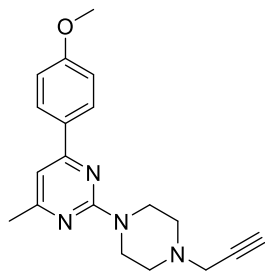
t.t. 95 – 98 °C.

IC (ATR): ν = 3263, 3010, 2936, 2910, 2889, 2850, 2808, 2749, 1649, 1586, 1555, 1510, 1493, 1439, 1373, 1345, 1312, 1300, 1273, 1222, 1183, 1133, 1071, 1027, 1002, 930, 900, 890, 859, 824, 790, 771, 693, 664, 600, 588, 547, 461, 420 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,05 – 8,02 (m, 2H), 7,47 – 7,43 (m, 3H), 6,84 (s, 1H), 4,00 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 3,38 (d, J = 2,5 Hz, 2H), 2,67 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 2,41 (s, 3H), 2,26 (t, J = 2,4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 168,3; 164,2; 162,1; 138,1; 130,3; 128,7; 127,1; 105,5; 78,8; 73,5; 52,1; 47,2; 43,8; 24,7 ppm.

4-(4-Metoksifenil)-6-metil-2-(4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il)pirimidin (165)



Primjenom *opšte procedure E*, polazeći iz **137** (256 mg, 0,90 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 6/4), dobijeno je jedinjenje **165** (183 mg, 63%). Bezbojna čvrsta supstanca.

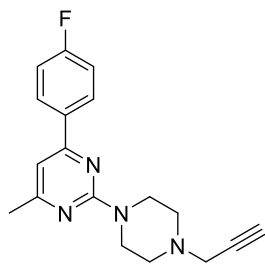
t.t. 110 – 111 °C.

IC (ATR): $\nu = 3264, 3003, 2971, 2935, 2916, 2845, 2818, 2753, 2731, 2687, 1609, 1572, 1551, 1513, 1482, 1456, 1424, 1369, 1350, 1329, 1315, 1299, 1267, 1224, 1174, 1139, 1112, 1096, 1074, 1026, 1006, 903, 893, 844, 833, 813, 789, 771, 709, 640, 589, 549, 511, 474 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,03 - 7,99$ (m, 2H), $6,98 - 6,94$ (m, 2H), $6,78$ (s, 1H), $3,98$ (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), $3,86$ (s, 3H), $3,37$ (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), $2,66$ (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), $2,38$ (s, 3H), $2,26$ (t, $J = 2,4$ Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 168,0; 163,7; 162,1; 161,6; 130,6; 128,6; 114,0; 104,7; 78,8; 73,5; 55,5; 52,1; 47,2; 43,8; 24,7$ ppm.

4-(4-Fluorfenil)-6-metil-2-(4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il)pirimidin (166)



Primjenom *opšte procedure E*, polazeći iz **138** (80 mg, 0,29 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 7/3), dobijeno je jedinjenje **166** (68 mg, 75%). Bezbojna čvrsta supstanca.

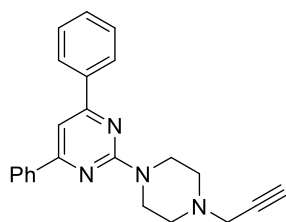
t.t. 103 – 105 °C.

IC (ATR): $\nu = 3301, 3074, 3000, 2929, 2851, 2816, 2764, 1602, 1558, 1510, 1449, 1403, 1375, 1348, 1303, 1271, 1225, 1157, 1139, 1092, 1007, 893, 850, 816, 790, 656, 591, 502 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,06 - 8,01$ (m, 2H), $7,15 - 7,10$ (m, 2H), $6,79$ (s, 1H), $3,98$ (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), $3,38$ (d, $J = 2,5$ Hz, 2H), $2,66$ (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), $2,40$ (s, 3H), $2,26$ (t, $J = 2,4$ Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 168,4; 164,4$ (d, $J_{C-F} = 251$ Hz); $163,1; 162,1; 134,3; 129,1$ (d, $J_{C-F} = 9$ Hz); $115,7$ (d, $J_{C-F} = 22$ Hz); $105,1; 78,8; 73,5; 52,0; 47,2; 43,7; 24,7$ ppm.

4,6-Difenil-2-(4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il)pirimidin (167)



Primjenom *opšte procedure E*, polazeći iz **141** (189 mg, 0,597 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 7/3), dobijeno je jedinjenje **167** (172 mg, 81%). Bezbojna čvrsta supstanca.

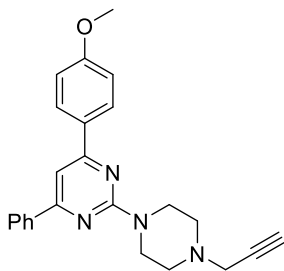
t.t. 132 – 135 °C.

IC (ATR): $\nu = 3295, 3061, 3002, 2930, 2850, 1587, 1563, 1546, 1508, 1494, 1448, 1360, 1330, 1302, 1267, 1233, 1181, 1136, 1099, 1070, 1029, 1006, 987, 827, 762, 690, 663, 632 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,15 - 8,10$ (m, 4H), $7,53 - 7,46$ (m, 6H), $7,41$ (s, 1H), $4,11$ (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), $3,40$ (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), $2,71$ (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), $2,27$ (t, $J = 2,4$ Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 165,4; 162,3; 138,4; 130,4; 128,8; 127,2; 102,1; 78,8; 73,5; 52,1; 47,3; 43,9$ ppm.

4-(4-Metoksifenil)-6-fenil-2-(4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il)pirimidin (168)



Primjenom *opšte procedure E*, polazeći iz **142** (188 mg, 0,543 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Heksan/EtOAc = 6/4), dobijeno je jedinjenje **168** (131 mg, 63%). Čvrsta supstanca bež boje.

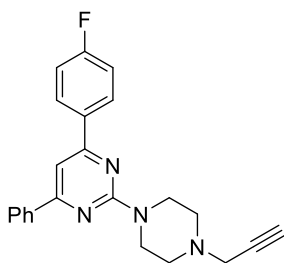
t.t. 128 – 130 °C.

IC (ATR): ν = 3293, 3062, 3001, 2933, 2837, 1608, 1586, 1564, 1542, 1513, 1496, 1449, 1362, 1306, 1267, 1236, 1176, 1148, 1031, 1008, 987, 826, 771, 694, 648, 580 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,12 – 8,09 (m, 4H), 7,51 – 7,46 (m, 3H), 7,36 (s, 1H), 7,02 – 6,99 (m, 2H), 4,10 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,88 (s, 3H), 3,40 (d, J = 2,5 Hz, 2H), 2,71 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,27 (t, J = 2,4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 165,1; 164,8; 162,3; 161,7; 138,5; 130,8; 130,3; 128,8; 128,7; 127,2; 114,1; 101,4; 78,8; 73,5; 55,5; 52,1; 47,3, 43,9 ppm.

4-(4-Fluorfenil)-6-fenil-2-(4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il)pirimidin (169)



Primjenom *opšte procedure E*, polazeći iz **143** (187 mg, 0,559 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 7/3), dobijeno je jedinjenje **169** (135 mg, 65%). Čvrsta supstanca žute boje.

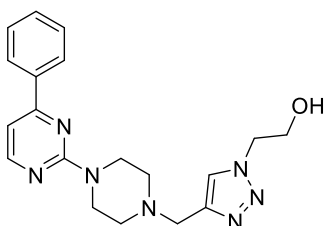
t.t. 108 – 110 °C.

IC (ATR): ν = 3299, 3062, 2908, 2850, 1602, 1584, 1565, 1546, 1510, 1497, 1449, 1402, 1361, 1304, 1266, 1230, 1156, 1092, 1072, 1007, 987, 850, 826, 771, 693, 648, 609, 569, 508 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,15 – 8,09 (m, 4H), 7,52 – 7,47 (m, 3H), 7,35 (s, 1H), 7,20 – 7,14 (m, 2H), 4,09 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,40 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 2,71 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,27 (t, J = 2,4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 165,5; 164,4 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 164,3; 162,3; 138,3; 134,5; 130,5; 129,2 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 128,8; 127,2; 115,7 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 101,7; 78,8; 73,5; 52,1; 47,3; 43,9 ppm.

2-(((4-(4-Fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (170)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **161** (85 mg, 0,31 mmol) i 2-azidoetanola (28 μ L, 0,37 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **170** (77 mg, 68%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 126 – 128 °C.

IC (ATR): ν = 3121, 3074, 3019, 2944, 2887, 2820, 1585, 1566, 1552, 1494, 1447, 1382, 1347, 1321, 1296, 1261, 1237, 1224, 1135, 1122, 1108, 1065, 1025, 997, 982, 924, 820, 791, 766, 737, 720, 696, 625, 563, 546, 491, 443, 404 cm⁻¹.

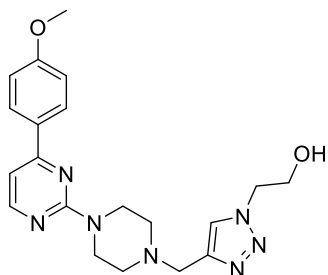
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 8,34 – 8,32 (m, 1H), 8,09 – 8,05 (m, 2H), 7,97 (s, 1H), 7,47 – 7,43 (m, 3H), 7,10 – 7,07 (m, 1H), 4,51 – 4,48 (m, 2H), 3,95 – 3,90 (m, 6H), 3,75 (s, 2H), 2,62 (t, J = 5,0 Hz, 4H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 165,9; 163,0; 159,5; 144,1; 138,7; 131,7; 129,7; 128,1; 126,2; 106,9; 61,6; 53,9; 53,7; 53,6; 44,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+H]⁺ izračunato za C₁₉H₂₄N₇O⁺ 366,20368; detektovano 366,20298.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 5,09$ min, površina 99,63%; metoda K: $t_R = 6,49$ min, površina 99,65% ($\lambda = 254$ nm).

2-4-((4-(4-Metoksifenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (171)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **162** (120 mg, 0,389 mmol) i 2-azidoetanola (35 μ L, 0,47 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 8/2) dobijeno je jedinjenje **171** (131 mg, 85%). Čvrsta supstanca žute boje.

t.t. 132 – 134 °C.

IC (ATR): $\nu = 3309, 3138, 2983, 2941, 2838, 1760, 1606, 1585, 1562, 1510, 1472, 1437, 1412, 1374, 1342, 1302, 1292, 1231, 1193, 1139, 1115, 1076, 1059, 1006, 981, 960, 867, 847, 830, 808, 715, 682, 633, 586, 517, 454 \text{ cm}^{-1}$.

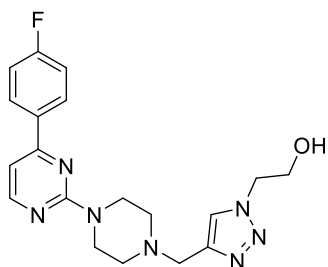
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 8,27$ (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 8,04 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,98 (s, 1H), 7,02 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 6,98 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 4,49 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 3,95 – 3,90 (m, 6H), 3,84 (s, 3H), 3,79 (s, 2H), 2,66 (t, $J = 5,1$ Hz, 4H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): $\delta = 165,5; 163,5; 162,9; 159,1; 143,7; 130,9; 129,7; 126,3; 115,0; 106,3; 61,6; 55,9; 53,9; 53,6; 44,4$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_2^+$ 396,21425; detektovano 396,21362.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 5,11$ min, površina 99,41%; metoda K: $t_R = 6,54$ min, površina 99,49% ($\lambda = 254$ nm).

2-4-((4-(4-Fluorfenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (172)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **163** (60 mg, 0,20 mmol) i 2-azidoetanola (18 μ L, 0,24 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **172** (38 mg, 49%). Čvrsta supstanca žute boje.

t.t. 138 – 140 °C.

IC (ATR): $\nu = 3319, 2850, 1603, 1571, 1508, 1444, 1407, 1344, 1296, 1258, 1226, 1158, 1141, 1057, 1002, 985, 963, 851, 806, 735, 575, 511 \text{ cm}^{-1}$.

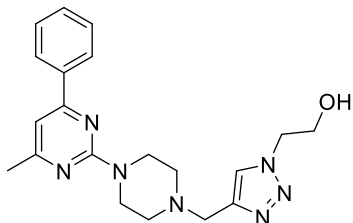
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 8,33$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 8,15 – 8,11 (m, 2H), 7,96 (s, 1H), 7,21 – 7,16 (m, 2H), 7,06 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 4,50 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 3,96 – 3,93 (m, 2H), 3,93 – 3,88 (m, 4H), 3,75 (s, 2H), 2,61 (t, $J = 5,1$ Hz, 4H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): $\delta = 165,9$ (d, $J_{\text{C-F}} = 251$ Hz); 164,7; 163,0; 159,6; 144,2; 135,0; 130,3 (d, $J_{\text{C-F}} = 9$ Hz); 126,1; 116,5 (d, $J_{\text{C-F}} = 22$ Hz); 106,6; 61,6; 53,9; 53,7; 53,6; 44,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_7\text{O}^+$ 384,19426; detektovano 384,19392.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 5,15$ min, površina 99,61%; metoda K: $t_R = 6,56$ min, površina 99,71% ($\lambda = 254$ nm).

2-(4-((4-(4-Metil-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (173)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **164** (170 mg, 0,581 mmol) i 2-azidoetanol (53 μ L, 0,70 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **173** (137 mg, 62%). Čvrsta supstanca žute boje.

t.t. 153 – 154 $^{\circ}\text{C}$.

IC (ATR): ν = 3339, 3144, 3064, 2923, 2848, 1570, 1554, 1494, 1448, 1374, 1348, 1300, 1269, 1222, 1181, 1136, 1073, 1029, 994, 892, 828, 794, 769, 734, 695, 590 cm^{-1} .

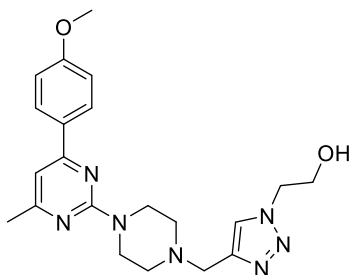
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,01 – 7,99 (m, 2H), 7,67 (s, 1H), 7,46 – 7,40 (m, 3H), 6,82 (s, 1H), 4,46 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 4,02 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,91 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 3,70 (s, 2H), 2,59 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 2,37 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 168,2; 164,2; 162,0; 143,7; 138,0; 130,3; 128,7; 127,1; 124,3; 105,6; 60,9; 53,3; 52,9; 52,8; 43,6; 24,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}^+$ 380,21933; detektovano 380,21894.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,23 min, površina 99,21%; metoda K: t_R = 6,81 min, površina 99,27% (λ = 254 nm).

2-(4-((4-(4-Metoksifenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (174)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **165** (172 mg, 0,534 mmol) i 2-azidoetanol (49 μ L, 0,64 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 7/3) dobijeno je jedinjenje **174** (142 mg, 65%). Čvrsta supstanca žute boje.

t.t. 138 – 140 $^{\circ}\text{C}$. **IC (ATR):** ν = 3340, 2999, 2934, 2838, 1608, 1572, 1551, 1513, 1448, 1376, 1350, 1305, 1269, 1254, 1224, 1174, 1138, 1032, 996, 894, 820, 790, 735, 592, 511 cm^{-1} .

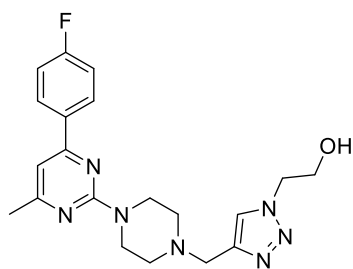
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7,98 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,66 (s, 1H), 6,95 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,77 (s, 1H), 4,47 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 4,04 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,92 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 3,85 (s, 3H), 3,73 (s, 2H), 2,61 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,36 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 168,0; 163,7; 162,0; 161,6; 143,8; 130,5; 128,6; 124,3; 114,0; 104,8; 61,1; 55,5; 53,4; 53,0; 52,8; 43,6; 24,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_2^+$ 410,22990; detektovano 410,22956.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,23 min, površina 96,89%; metoda K: t_R = 6,83 min, površina 96,60% (λ = 254 nm).

2-4-((4-(4-(4-Fluorfenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (175)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **166** (60 mg, 0,19 mmol) i 2-azidoetanola (17 μ L, 0,23 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 8/2) dobijeno je jedinjenje **175** (42 mg, 55%). Čvrsta supstanca bež boje.

t.t. 148 – 151 $^{\circ}\text{C}$.

IC (ATR): ν = 3358, 2926, 2851, 1602, 1557, 1510, 1451, 1376, 1349, 1303, 1271, 1225, 1157, 1057, 996, 894, 850, 818, 791, 735, 591, 503

cm^{-1} .

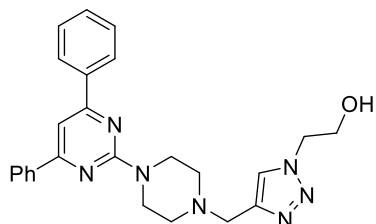
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,03 – 7,99 (m, 2H), 7,66 (s, 1H), 7,14 – 7,08 (m, 2H), 6,77 (s, 1H), 4,48 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 4,06 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,92 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,73 (s, 2H), 2,62 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 2,38 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 168,4; 164,3 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 251 Hz); 163,1; 162,0; 143,9; 134,2; 129,1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 9 Hz); 124,3; 115,6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22 Hz); 105,2; 61,2; 53,4; 53,0; 52,8; 43,6; 24,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{FN}_7\text{O}^+$ 398,20991; detektovano 398,20948.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,29 min, površina 98,69%; metoda K: t_R = 6,87 min, površina 98,31% (λ = 254 nm).

2-4-((4-(4,6-Difenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (176)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **167** (154 mg, 0,435 mmol) i 2-azidoetanola (40 μ L, 0,52 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 8/2) dobijeno je jedinjenje **176** (129 mg, 67%). Čvrsta supstanca žute boje.

t.t. 180 – 182 $^{\circ}\text{C}$. **IC** (ATR): ν = 3326, 3144, 3061, 2927, 2850, 1587, 1546, 1494, 1450, 1360, 1302, 1266, 1233, 1181, 1136, 1072, 1029,

1001, 986, 830, 763, 735, 691, 632 cm^{-1} .

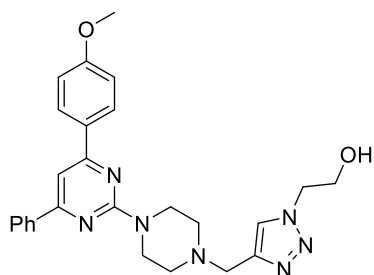
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,11 – 8,08 (m, 4H), 7,67 (s, 1H), 7,49 – 7,46 (m, 6H), 7,39 (s, 1H), 4,50 – 4,45 (m, 2H), 4,08 – 4,01 (m, 6H), 3,75 (s, 2H), 2,67 – 2,65 (m, 4H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 165,3; 162,2; 143,7; 138,3; 130,4; 128,8; 127,2; 124,3; 102,2; 61,1; 53,4; 53,0; 52,8; 43,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}^+$ 442,23498; detektovano 442,23446.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,65 min, površina 98,06%; metoda K: t_R = 7,53 min, površina 97,26% (λ = 254 nm).

2-(4-((4-(4-Metoksifenil)-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (177)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **168** (123 mg, 0,32 mmol) i 2-azidoetanol (29 μ L, 0,38 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 8/2) dobijeno je jedinjenje **177** (108 mg, 72%). Čvrsta supstanca smeđe boje.

t.t. 140 – 142 $^{\circ}\text{C}$.

IC (ATR): ν = 3342, 3064, 3000, 2933, 2839, 1608, 1585, 1564, 1543, 1513, 1496, 1450, 1362, 1306, 1266, 1236, 1176, 1138, 1031, 1002,

986, 828, 773, 735, 695, 609, 581, 518 cm^{-1} .

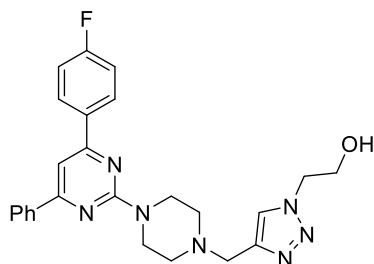
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,10 – 8,06 (m, 4H), 7,66 (s, 1H), 7,49 – 7,45 (m, 3H), 7,34 (s, 1H), 7,00 – 6,97 (m, 2H), 4,50 – 4,46 (m, 2H), 4,06 – 4,02 (m, 6H), 3,86 (s, 3H), 3,75 (s, 2H), 2,65 (t, J = 5,1 Hz, 4H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 165,1; 164,8; 162,2; 161,7; 143,9; 138,5; 130,7; 130,3; 128,7; 128,7; 127,2; 124,2; 114,1; 101,4; 61,2; 55,5; 53,4; 53,0; 52,8; 43,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_2^+$ 472,24555; detektovano 472,24489.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,70 min, površina 98,37%; metoda K: t_R = 7,53 min, površina 98,19% (λ = 254 nm).

2-(4-((4-(4-Fluorfenil)-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (178)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **169** (110 mg, 0,295 mmol) i 2-azidoetanol (27 μ L, 0,35 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **178** (107 mg, 79%). Čvrsta supstanca smeđe boje.

t.t. = 173 – 176 $^{\circ}\text{C}$.

IC (ATR): ν = 3372, 2942, 2846, 1602, 1565, 1546, 1510, 1496, 1450, 1402, 1361, 1304, 1266, 1229, 1156, 1072, 1001, 986, 827, 771, 734,

694, 607, 570, 508 cm^{-1} .

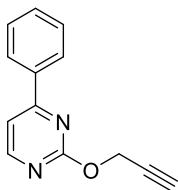
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,10 – 8,06 (m, 4H), 7,67 (s, 1H), 7,49 – 7,45 (m, 3H), 7,33 (s, 1H), 7,17 – 7,12 (m, 2H), 4,49 – 4,46 (m, 2H), 4,07 – 3,99 (m, 6H), 3,73 (s, 2H), 2,64 (t, J = 5,1 Hz, 4H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 165,4; 164,2; 164,4 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 250 Hz); 162,1; 143,8; 138,1; 134,3; 130,5; 129,1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 8 Hz); 128,8; 127,2; 124,3; 115,7 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22 Hz); 101,7; 61,0; 53,4; 53,0; 52,8; 43,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{FN}_7\text{O}^+$ 460,22556; detektovano 460,22489.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,73 min, površina 99,41%; metoda K: t_R = 7,56 min, površina 98,96% (λ = 254 nm).

4-Fenil-2-(prop-2-in-1-iloksi)pirimidin (179)



Primjenom *opšte procedure G*, polazeći iz **93** (140 mg, 0,734 mmol) i propargilalkohola (127 μ L, 2,20 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **179** (152 mg, 98%). Bezbojna čvrsta supstanca.

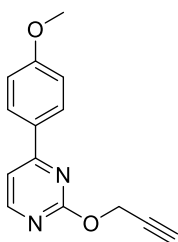
t.t. 51 – 53 °C.

IC (ATR): ν = 3292, 3061, 2942, 2125, 1575, 1550, 1498, 1438, 1406, 1354, 1340, 1327, 1295, 1278, 1207, 1108, 1071, 1036, 1021, 937, 881, 836, 772, 695, 627, 562 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,57 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,13 – 8,09 (m, 2H), 7,52 – 7,47 (m, 3H), 7,40 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 5,10 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 2,48 (t, J = 2,4 Hz, 1H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 166,5; 164,5; 160,0; 136,2; 131,4; 129,0; 127,4; 111,2; 78,7; 74,7; 55,0 ppm.

4-(4-Metoksifenil)-2-(prop-2-in-1-iloksi)pirimidin (180)



Primjenom *opšte procedure G*, polazeći iz **94** (125 mg, 0,566 mmol) i propargilalkohola (98 μ L, 1,71 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **180** (129 mg, 95%). Bezbojna čvrsta supstanca.

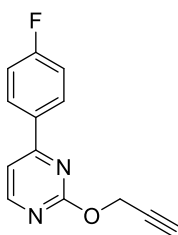
t.t. 105 – 107 °C.

IC (ATR): ν = 3300, 3015, 2989, 2945, 2845, 2132, 1608, 1583, 1548, 1514, 1465, 1448, 1421, 1338, 1305, 1279, 1260, 1213, 1173, 1112, 1098, 1032, 1019, 986, 967, 898, 845, 825, 813, 788, 719, 684, 633, 582, 563, 515, 488, 453 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,50 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 8,09 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 6,99 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 5,09 (d, J = 2,2 Hz, 2H), 3,87 (s, 3H), 2,49 (d, J = 2,3 Hz, 1H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 166,0; 164,4; 162,4; 159,5; 129,0; 128,6; 114,3; 110,3; 78,8; 74,6; 55,5; 54,8 ppm.

4-(4-Fluorfenil)-2-(prop-2-in-1-iloksi)pirimidin (181)



Primjenom *opšte procedure G*, polazeći iz **95** (154 mg, 0,738 mmol) i propargilalkohola (128 μ L, 2,21 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **181** (152 mg, 90%). Bezbojna čvrsta supstanca.

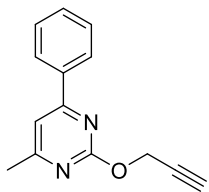
t.t. 63 – 65 °C.

IC (ATR): ν = 3302, 3120, 3085, 3048, 2957, 2929, 1913, 1772, 1660, 1602, 1580, 1559, 1511, 1448, 1415, 1396, 1353, 1332, 1298, 1273, 1226, 1160, 1125, 1102, 1035, 967, 923, 826, 788, 714, 689, 635, 572, 511 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,56 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 8,14 – 8,08 (m, 2H), 7,35 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,20 – 7,15 (m, 2H), 5,09 – 5,08 (m, 2H), 2,49 – 2,47 (m, 1H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 165,4; 165,0 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 251 Hz); 164,5; 160,0; 132,4 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 3 Hz); 129,5 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 9 Hz); 116,1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22 Hz); 110,9; 78,6; 74,7; 55,0 ppm.

4-Metil-6-fenil-2-(prop-2-in-1-iloksi)pirimidin (182)



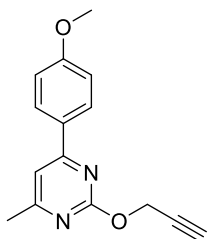
Primjenom *opšte procedure G*, polazeći iz **97** (159 mg, 0,777 mmol) i propargilalkohola (134 μL , 2,33 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **182** (165 mg, 95%). Žuto ulje.

IC (ATR): $\nu = 3294, 3064, 2943, 2125, 1592, 1546, 1500, 1442, 1403, 1379, 1356, 1330, 1223, 1121, 1076, 1058, 1027, 958, 927, 853, 772, 694, 642, 595, 550 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,12 - 8,08$ (m, 2H), 7,50 – 7,46 (m, 3H), 7,27 (s, 1H), 5,10 (d, $J = 2,4 \text{ Hz}$, 2H), 2,53 (s, 3H), 2,46 (t, $J = 2,4 \text{ Hz}$, 1H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 170,8; 166,0; 164,5; 136,6; 131,1; 128,9; 127,4; 110,7; 78,9; 74,5; 54,9; 24,4$ ppm.

4-(4-Metoksifenil)-6-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi)pirimidin (183)



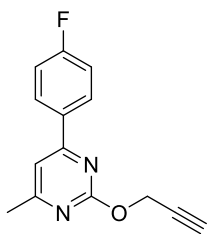
Primjenom *opšte procedure G*, polazeći iz **98** (250 mg, 1,06 mmol) i propargilalkohola (184 μL , 3,19 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 7/3) dobijeno je jedinjenje **183** (240 mg, 89%). Žuto ulje.

IC (ATR): $\nu = 3290, 2936, 2839, 1592, 1542, 1517, 1442, 1415, 1403, 1379, 1358, 1330, 1308, 1256, 1224, 1177, 1124, 1109, 1077, 1057, 1030, 990, 958, 919, 874, 833, 791, 683, 637, 595, 548, 514 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,08 - 8,05$ (m, 2H), 7,19 (s, 1H), 7,00 – 6,96 (m, 2H), 5,08 (d, $J = 2,4 \text{ Hz}$, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,49 (s, 3H), 2,45 (t, $J = 2,4 \text{ Hz}$, 1H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 170,3; 165,5; 164,4; 162,2; 129,0; 128,9; 114,3; 109,8; 79,0; 74,4; 55,5; 54,7; 24,4$ ppm.

4-(4-Fluorfenil)-6-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi)pirimidin (184)



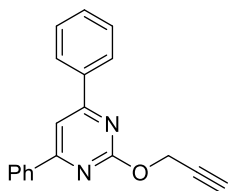
Primjenom *opšte procedure G*, polazeći iz **99** (108 mg, 0,485 mmol) i propargilalkohola (84 μL , 1,45 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **184** (110 mg, 93%). Žuto ulje.

IC (ATR): $\nu = 3301, 3077, 2943, 2126, 1602, 1588, 1546, 1513, 1445, 1408, 1379, 1356, 1330, 1286, 1224, 1160, 1122, 1099, 1076, 1056, 1015, 958, 919, 875, 836, 804, 791, 681, 593, 574, 547, 504 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,10 - 8,07$ (m, 2H), 7,20 (s, 1H), 7,14 (t, $J = 8,6 \text{ Hz}$, 2H), 5,07 (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 2H), 2,50 (s, 3H), 2,45 (t, $J = 2,1 \text{ Hz}$, 1H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170,9; 164,8; 164,7$ (d, $J_{\text{C-F}} = 251 \text{ Hz}$); 164,4; 132,7 (d, $J_{\text{C-F}} = 3 \text{ Hz}$); 129,4 (d, $J_{\text{C-F}} = 9 \text{ Hz}$); 116,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 22 \text{ Hz}$); 110,3; 78,8; 74,5; 54,8; 24,4 ppm.

4,6-Difenil-2-(prop-2-in-1-iloksi)pirimidin (185)



Primjenom *opšte procedure G*, polazeći iz **101** (200 mg, 0,75 mmol) i propargilalkohola (130 μL , 2,25 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **185** (196 mg, 91%). Bezbojna čvrsta supstanca.

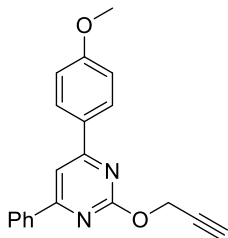
t.t. 104 – 106 $^{\circ}\text{C}$.

IC (ATR): $\nu = 3278, 3055, 3041, 2923, 2868, 1618, 1590, 1571, 1535, 1498, 1443, 1427, 1397, 1368, 1332, 1291, 1242, 1219, 1185, 1159, 1129, 1071, 1039, 1020, 999, 966, 936, 864, 848, 825, 787, 766, 688, 677, 651, 627, 481 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,21 – 8,16 (m, 4H), 7,84 (s, 1H), 7,55 – 7,51 (m, 6H), 5,20 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 2,50 (t, J = 2,4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 167,3; 164,9; 136,8; 131,2; 129,0; 127,5; 107,2; 78,9; 74,6; 55,1 ppm.

4-(4-Metoksifenil)-6-fenil-2-(prop-2-in-1-iloksi)pirimidin (186)



Primjenom *opšte procedure G*, polazeći iz **102** (117 mg, 0,394 mmol) i propargil-alkohola (68 μ L, 1,18 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **186** (122 mg, 99%). Bezbojna čvrsta supstanca.

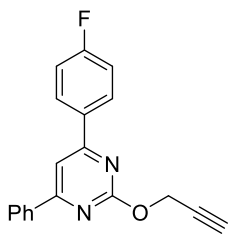
t.t. 92 – 93 °C.

IC (ATR): ν = 3292, 3062, 3005, 2935, 2839, 2214, 2124, 1589, 1573, 1533, 1516, 1499, 1441, 1415, 1402, 1370, 1331, 1296, 1257, 1239, 1178, 1130, 1022, 937, 834, 773, 693, 641, 581, 515 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,17 – 8,11 (m, 4H), 7,72 (s, 1H), 7,52 – 7,47 (m, 3H), 7,00 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 5,16 (d, J = 2,2 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,50 (t, J = 2,4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 166,8; 166,7; 164,7; 162,2; 136,9; 131,0; 129,1; 129,0; 128,9; 127,4; 114,3; 106,2; 79,0; 74,5; 55,5; 54,9 ppm.

4-(4-Fluorfenil)-6-fenil-2-(prop-2-in-1-iloksi)pirimidin (187)



Primjenom *opšte procedure G*, polazeći iz **103** (140 mg, 0,492 mmol) i propargil-alkohola (85 μ L, 1,47 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: heksan/EtOAc = 9/1) dobijeno je jedinjenje **187** (120 mg, 80%). Svetložuta čvrsta supstanca.

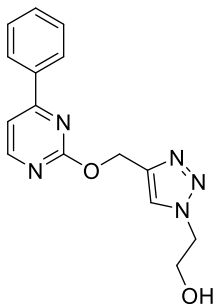
t.t. 43 – 44 °C.

IC (ATR): ν = 3300, 3064, 2934, 2125, 1602, 1590, 1579, 1537, 1512, 1443, 1409, 1369, 1332, 1286, 1232, 1159, 1131, 1097, 1074, 1036, 1022, 939, 897, 839, 773, 692, 644, 571, 508 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,21 – 8,15 (m, 4H), 7,78 (s, 1H), 7,54 – 7,51 (m, 3H), 7,23 – 7,17 (m, 2H), 5,18 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 2,50 (t, J = 2,4 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 167,4; 166,2; 165,0 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 164,9; 136,7; 133,0; 131,3; 129,6 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 129,0; 127,5; 116,1 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 106,8; 78,9; 74,7; 55,1 ppm.

2-(4-(((4-Fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (188)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **179** (154 mg, 0,734 mmol) i 2-azidoetanol (66 μ L, 0,88 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **188** (159 mg, 73%). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. 106 – 108 °C.

IC (ATR): ν = 3261, 3159, 3102, 2948, 2923, 2891, 1657, 1581, 1556, 1498, 1469, 1435, 1413, 1383, 1334, 1309, 1296, 1274, 1212, 1141, 1127, 1105, 1078, 1057, 1045, 1020, 1002, 948, 923, 876, 851, 799, 773, 733, 695, 666, 630, 557, 506, 489,

412 cm⁻¹.

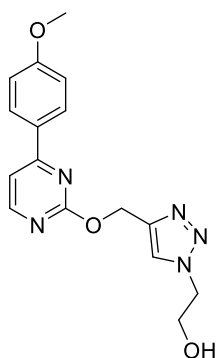
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 8,57 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 8,18 – 8,15 (m, 2H), 8,12 (s, 1H), 7,59 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,54 – 7,49 (m, 3H), 5,63 (s, 2H), 4,49 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,92 (t, J = 5,3 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 166,7; 164,7; 159,9; 143,0; 136,0; 131,2; 128,7; 127,1; 125,0; 110,9; 60,2; 60,1; 52,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+Na]⁺ izračunato za C₁₅H₁₅N₅NaO₂⁺ 320,11180; detektovano 320,11119.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,80 min, površina 97,56%; metoda K: t_R = 7,24 min, površina 96,65% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Metoksifenil)pirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (189)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **180** (76 mg, 0,32 mmol) i 2-azidoetanol (29 μ L, 0,38 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **189** (74 mg, 72%). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. 121 – 122 °C.

IC (ATR): ν = 3242, 2960, 2912, 2839, 1610, 1582, 1553, 1512, 1423, 1379, 1351, 1308, 1277, 1260, 1212, 1182, 1135, 1113, 1081, 1067, 1049, 1013, 992, 927, 874, 828, 793, 709, 679, 644, 585, 519, 419 cm⁻¹.

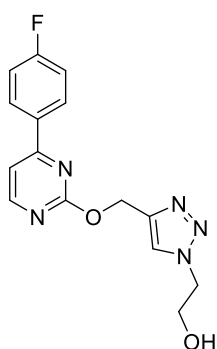
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,42 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,06 – 8,03 (m, 2H), 7,86 (s, 1H), 7,27 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 6,99 – 6,95 (m, 2H), 5,59 (s, 2H), 4,47 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 4,04 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 166,1; 164,8; 162,4; 159,5; 143,5; 129,0; 128,6; 124,7; 114,4; 110,1; 61,0; 60,9; 55,5; 52,9 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+Na]⁺ izračunato za C₁₆H₁₇N₅NaO₃⁺ 350,12236; detektovano 350,12187.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,84 min, površina 99,61%; metoda K: t_R = 7,33 min, površina 99,58% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Fluorfenil)pirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (190)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **181** (135 mg, 0,592 mmol) i 2-azidoetanol (54 μ L, 0,71 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **190** (149 mg, 80%). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. 134 – 135 °C.

IC (ATR): ν = 3285, 3080, 2926, 1600, 1580, 1551, 1511, 1444, 1418, 1361, 1331, 1295, 1274, 1229, 1160, 1143, 1109, 1080, 1036, 1009, 986, 944, 903, 861, 832, 796, 735, 712, 678, 569, 516 cm⁻¹.

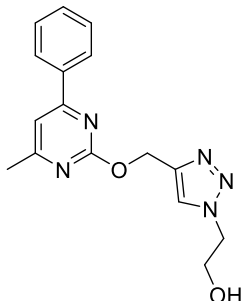
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,50 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,10 – 8,06 (m, 2H), 7,85 (s, 1H), 7,31 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,18 – 7,12 (m, 2H), 5,60 (s, 2H), 4,47 (t, J = 4,9 Hz, 2H), 4,05 (t, J = 4,9 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 165,5; 165,0 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 164,9; 160,0; 143,4; 132,3 (d, J_{C-F} = 3 Hz); 129,5 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 124,7; 116,1 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 110,7; 61,1; 61,0; 52,9 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+Na]^+$ izračunato za $C_{15}H_{14}FN_5NaO_2^+$ 338,10237; detektovano 338,10179.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,92 min, površina 97,65%; metoda K: t_R = 7,33 min, površina 97,90% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-Metil-6-fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (191)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **182** (145 mg, 0,647 mmol) i 2-azidoetanola (59 μ L, 0,77 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **191** (154 mg, 76%). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. 146 – 148 °C.

IC (ATR): ν = 3269, 3139, 3097, 2999, 2941, 2881, 2851, 1597, 1549, 1503, 1438, 1413, 1364, 1346, 1311, 1231, 1172, 1132, 1078, 1061, 1040, 1026, 1001, 989, 956, 882, 869, 833, 801, 771, 691, 662, 645, 595, 550 cm^{-1} .

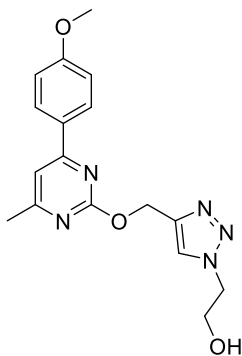
1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 8,19 – 8,16 (m, 2H), 8,13 (s, 1H), 7,56 – 7,51 (m, 4H), 5,65 (s, 2H), 4,52 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,94 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 2,53 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ = 172,3; 167,7; 165,9; 144,5; 137,6; 132,3; 130,0; 128,4; 126,4; 111,7; 61,6; 61,3; 53,9; 23,9 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+Na]^+$ izračunato za $C_{16}H_{17}N_5NaO_2^+$ 334,12745; detektovano 334,12710.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 6,01 min, površina 99,10%; metoda K: t_R = 7,55 min, površina 99,05% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Metoksifenil)-6-metilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (192)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **183** (76 mg, 0,30 mmol) i 2-azidoetanola (27 μ L, 0,36 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **192** (85 mg, 83%). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. 156 – 157 °C.

IC (ATR): ν = 3265, 3091, 2998, 2959, 2838, 1594, 1544, 1517, 1441, 1417, 1353, 1312, 1298, 1259, 1228, 1178, 1128, 1112, 1081, 1048, 1032, 988, 958, 884, 835, 791, 735, 657, 636, 592, 550, 512 cm^{-1} .

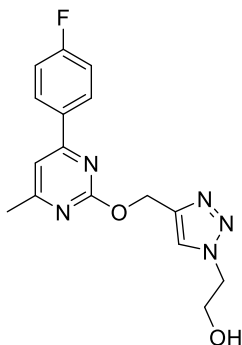
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,05 – 8,01 (m, 2H), 7,83 (s, 1H), 7,13 (s, 1H), 6,97 – 6,94 (m, 2H), 5,58 (s, 2H), 4,45 (t, J = 4,9 Hz, 2H), 4,03 (t, J = 4,9 Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 2,44 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 170,2; 165,5; 164,7; 162,2; 143,7; 128,9; 128,8; 124,6; 114,3; 109,6; 61,1; 60,8; 55,5; 52,9; 24,2 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+Na]^+$ izračunato za $C_{17}H_{19}N_5NaO_3^+$ 364,13801; detektovano 364,13748.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 6,02 min, površina 99,00%; metoda K: t_R = 7,63 min, površina 99,15% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Fluorfenil)-6-metilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (193)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **184** (93 mg, 0,38 mmol) i 2-azidoetanola (35 μ L, 0,36 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **193** (107 mg, 85%). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. 116 – 118 °C.

IC (ATR): ν = 3263, 3146, 3094, 2956, 2866, 1601, 1590, 1548, 1511, 1417, 1369, 1347, 1314, 1227, 1159, 1141, 1124, 1069, 1048, 1015, 989, 949, 884, 835, 791, 658, 587, 546, 506, 411 cm^{-1} .

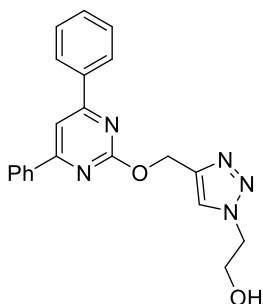
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 8,26 – 8,21 (m, 2H), 8,13 (s, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,25 (t, J = 8,8 Hz, 2H), 5,64 (s, 2H), 4,52 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,95 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 2,52 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ = 172,4; 166,4; 166,2 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 251 Hz); 165,9; 144,5; 133,9; 130,8 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22 Hz); 126,4; 116,8 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22 Hz); 111,4; 61,6; 61,3; 53,9; 23,9 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{FN}_5\text{NaO}_2^+$ 352,11802; detektovano 352,11755.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 6,12 min, površina 98,16%; metoda K: t_R = 7,66 min, površina 98,21% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4,6-Difenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (194)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **185** (183 mg, 0,639 mmol) i 2-azidoetanola (58 μ L, 0,77 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **194** (195 mg, 82%). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. 165 – 167 °C.

IC (ATR): ν = 3356, 3146, 3093, 3063, 2950, 2882, 1588, 1574, 1535, 1499, 1444, 1409, 1355, 1326, 1308, 1289, 1238, 1218, 1185, 1134, 1076, 1059, 1045, 1005, 986, 934, 864, 829, 797, 765, 737, 689, 648, 626, 478 cm^{-1} .

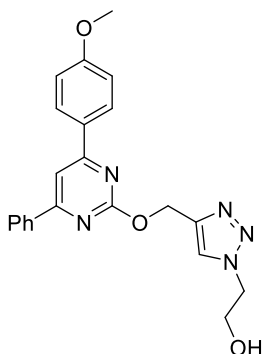
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,14 – 8,10 (m, 4H), 7,86 (s, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,51 – 7,46 (m, 6H), 5,71 (s, 2H), 4,46 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 4,05 (t, J = 4,9 Hz, 2H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 167,3; 165,3; 143,8; 136,8; 131,2; 129,0; 127,4; 124,7; 107,0; 61,2; 61,1; 52,9 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{NaO}_2^+$ 396,14310; detektovano 396,14273.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 7,13 min, površina 98,74%; metoda K: t_R = 8,33 min, površina 99,20% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Metoksifenil)-6-fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (195)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **186** (110 mg, 0,348 mmol) i 2-azidoetanola (32 μ L, 0,42 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **195** (117 mg, 83%). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. 124 – 125 °C.

IC (ATR): $\nu = 3329, 3144, 3104, 2954, 2872, 2838, 1740, 1587, 1530, 1452, 1420, 1360, 1319, 1295, 1242, 1180, 1130, 1078, 1046, 1062, 1026, 1001, 985, 936, 870, 837, 799, 771, 736, 716, 690, 661, 643, 581, 515 \text{ cm}^{-1}$.

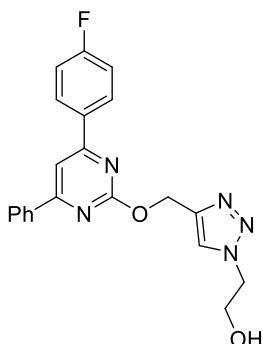
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,08 - 8,03$ (m, 4H), 7,87 (s, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,49 – 7,43 (m, 3H), 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 5,63 (s, 2H), 4,44 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 4,03 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 3,83 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 166,8; 166,6; 165,1; 162,2; 143,6; 136,8; 131,0; 129,0; 128,9; 128,9; 127,3; 124,7; 114,3; 106,1; 61,1; 60,9; 55,5; 52,9$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{NaO}_3^+$ 426,15366; detektovano 426,15321.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 7,12$ min, površina 95,52%; metoda K: $t_R = 8,38$ min, površina 96,68% ($\lambda = 254$ nm).

2-(4-(((4-(4-Fluorfenil)-6-fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-ol (196)



Primjenom *opšte procedure F*, polazeći iz **187** (118 mg, 0,388 mmol) i 2-azidoetanola (35 μ L, 0,46 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) dobijeno je jedinjenje **196** (120 mg, 79%). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. 178 – 180 °C.

IC (ATR): $\nu = 3307, 3139, 3095, 2985, 2956, 2917, 2876, 2850, 1734, 1602, 1589, 1535, 1511, 1437, 1413, 1362, 1346, 1316, 1283, 1231, 1217, 1185, 1159, 1143, 1131, 1080, 1061, 1048, 1032, 1003, 987, 952, 936, 875, 841, 804, 791, 772, 716, 691, 663, 645, 572, 508, 408 \text{ cm}^{-1}$.

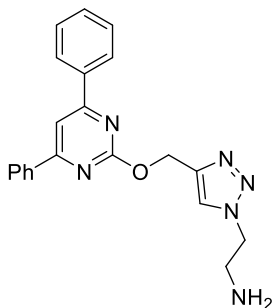
^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): $\delta = 8,12 - 8,05$ (m, 4H), 7,86 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,48 – 7,45 (m, 3H), 7,17 – 7,11 (m, 2H), 5,67 (s, 2H), 4,41 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H), 3,92 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): $\delta = 167,5; 166,2; 165,1; 164,8$ (d, $J_{\text{C-F}} = 251$ Hz); 143,5; 136,5; 132,8; 131,3; 129,5 (d, $J_{\text{C-F}} = 9$ Hz); 129,0; 127,3; 124,7; 116,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 22$ Hz); 106,8; 61,0; 60,7; 52,8 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{NaO}_2^+$ 414,13367; detektovano 414,13324.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 7,22$ min, površina 97,67%; metoda K: $t_R = 8,35$ min, površina 98,42% ($\lambda = 254$ nm).

2-(4-(((4,6-Difenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-amin (215)



Primjenom *opšte procedure H*, polazeći iz **7g** (69 mg, 0,18 mmol), dobijeno je jedinjenje **215** (35 mg, 51% prinos iz dva koraka). Bezbojna čvrsta supstanca.

t.t. = 155 – 160 °C.

IC (ATR): ν = 3373, 3139, 3099, 3055, 2952, 2924, 2854, 1588, 1574, 1535, 1500, 1454, 1443, 1425, 1403, 1355, 1319, 1241, 1218, 1130, 1074, 1052, 1037, 1007, 986, 934, 834, 768, 692, 627, 479 cm^{-1} .

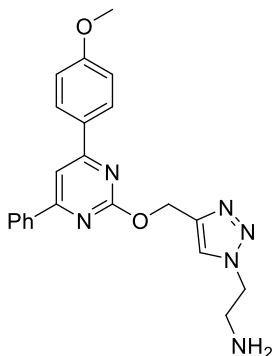
¹H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 8,15 – 8,10 (m, 4H), 7,81 – 7,78 (m, 2H), 7,51 – 7,46 (m, 6H), 5,73 (s, 2H), 4,36 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 3,13 (t, J = 5,8 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 167,4; 165,2; 144,1; 136,7; 131,2; 129,0; 127,4; 124,0; 107,1; 61,1; 53,2; 41,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}^+$ 373,17714; detektovano 373,17639.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,44 min, površina 99,65%; metoda K: t_R = 7,31 min, površina 98,83% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Metoksifenil)-6-fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etan-1-amin (216)



Primjenom *opšte procedure H*, polazeći iz **7h** (60 mg, 0,15 mmol), dobijeno je jedinjenje **216** (36 mg, 60% prinos iz dva koraka). Žuto ulje.

IC (ATR): ν = 3375, 3143, 3064, 2934, 2839, 1605, 1587, 1574, 1533, 1517, 1499, 1452, 1432, 1415, 1354, 1325, 1297, 1258, 1240, 1179, 11341, 1076, 1031, 1014, 1004, 985, 935, 835, 775, 735, 695, 643, 581, 518 cm^{-1} .

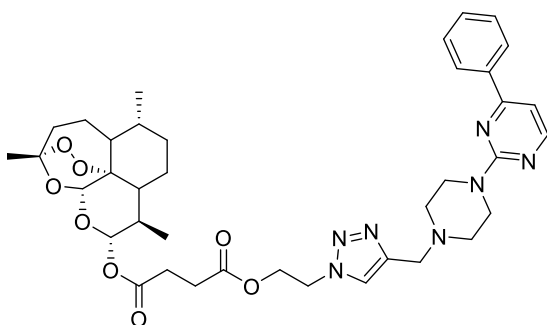
¹H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 8,11 – 8,03 (m, 4H), 7,79 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,48 – 7,42 (m, 3H), 6,99 – 6,92 (m, 2H), 5,67 (s, 2H), 4,33 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,15 – 3,05 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 167,0; 166,8; 165,0; 162,2; 144,1; 136,8; 131,0; 129,0; 128,9; 128,9; 127,3; 124,0; 114,3; 106,3; 60,8; 55,4; 53,1; 41,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_2^+$ 403,18770; detektovano 403,18731.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 5,45 min, površina 96,63%; metoda K: t_R = 7,32 min, površina 96,72% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-izizohromen-10-il)-sukcinat (197)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (40 mg, 0,10 mmol) i **170** (29 mg, 0,08 mmol) dobijeno je jedinjenje **197** (56 mg, 96%). Žuto ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 3,2 (c 0,04, MeOH)

IC (ATR): ν = 3466, 3141, 3058, 2928, 2874, 1744, 1588, 1568, 1553, 1496, 1450, 1376, 1345, 1261, 1208,

1156, 1100, 1050, 1035, 1018, 985, 928, 878, 844, 825, 771, 736, 699, 628, 549, 487 cm⁻¹.

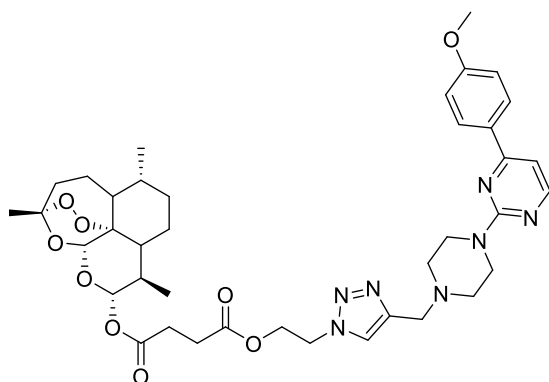
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,33 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,03 – 7,98 (m, 2H), 7,71 (s, 1H), 7,45 – 7,40 (m, 3H), 6,90 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 5,75 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,39 (s, 1H), 4,60 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,53 – 4,42 (m, 2H), 3,93 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 3,76 (s, 2H), 2,69 – 2,50 (m, 9H), 2,32 (td, J = 14,0 Hz, J = 4,0 Hz, 1H), 1,97 (dt, J = 14,3 Hz, J = 4,1 Hz, 1H), 1,87 – 1,80 (m, 1H), 1,76 – 1,62 (m, 2H), 1,58 (dt, J = 13,8 Hz, J = 4,5 Hz, 1H), 1,45 – 1,35 (m, 1H), 1,33 (s, 3H), 1,31 – 1,19 (m, 3H), 1,01 – 0,88 (m, 4H), 0,81 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171,5; 171,1; 164,3; 161,9; 158,3; 144,3; 137,7; 130,5; 128,7; 127,0; 124,0; 105,7; 104,5; 92,4; 91,6; 80,1; 62,9; 53,4; 52,8; 51,6; 49,0; 45,2; 43,7; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,8; 25,9; 24,6; 22,0; 20,2; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+H]⁺ izračunato za C₃₈H₅₀N₇O₈⁺ 732,37154; detektovano 732,37076.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 6,35 min, površina 97,64%; metoda K: t_R = 8,19 min, površina 95,65% (λ = 254 nm).

2-((4-((4-(4-Metoksifenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (198)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (37 mg, 0,10 mmol) i **171** (29 mg, 0,07 mmol) dobijeno je jedinjenje **198** (52 mg, 98%). Žuto ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 2,1 (c 0,05, MeOH)

IC (ATR): ν = 3142, 2933, 2876, 1745, 1608, 1586, 1566, 1511, 1443, 1415, 1376, 1345, 1305, 1252, 1215, 1173, 1156, 1101, 1034, 1018, 984, 962, 927, 911, 878, 846, 824, 808, 736, 702, 585, 519 cm⁻¹.

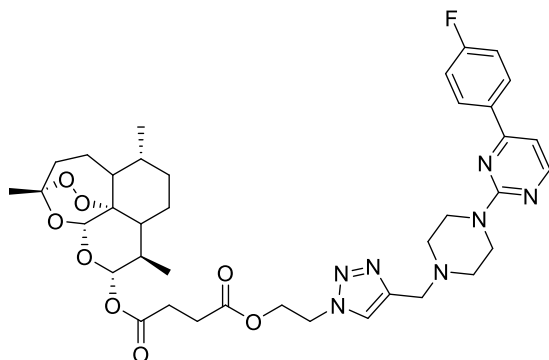
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,27 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,98 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,70 (s, 1H), 6,93 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,84 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 5,75 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,39 (s, 1H), 4,60 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,53 – 4,42 (m, 2H), 3,92 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 3,83 (s, 3H), 3,75 (s, 2H), 2,69 – 2,49 (m, 9H), 2,32 (td, J = 13,9 Hz, J = 3,9 Hz, 1H), 1,97 (dt, J = 14,2 Hz, J = 3,9 Hz, 1H), 1,87 – 1,81 (m, 1H), 1,76 – 1,63 (m, 2H), 1,58 (dt, J = 13,8 Hz, J = 4,5 Hz, 1H), 1,46 – 1,35 (m, 1H), 1,33 (s, 3H), 1,31 – 1,19 (m, 3H), 1,01 – 0,88 (m, 4H), 0,81 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171,5; 171,1; 163,8; 161,9; 161,7; 158,0; 144,4; 130,1; 128,5; 123,9; 114,0; 105,0; 104,5; 92,4; 91,6; 80,1; 62,9; 55,4; 53,4; 52,9; 51,6; 49,0; 45,2; 43,7; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,9; 25,9; 24,6; 22,0; 20,2; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+H]⁺ izračunato za C₃₉H₅₂N₇O₉⁺ 762,38210; detektovano 762,38097.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 6,30 min, površina 95,54%; metoda K: t_R = 8,02 min, površina 95,00% (λ = 254 nm).

2-((4-((4-(4-Fluorfenil)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (199)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (40 mg, 0,10 mmol) i **172** (31 mg, 0,08 mmol) dobijeno je jedinjenje **199** (51 mg, 85%). Žuto ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 0,6$ (c 0,035, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3140, 3061, 2929, 2874, 2852, 1745, 1665, 1602, 1570, 1556, 1507, 1442, 1408, 1376, 1344, 1256, 1226, 1157, 1099, 1036, 1017, 984, 962, 927, 911, 877, 847, 824, 807, 735, 702, 574, 511 \text{ cm}^{-1}$.

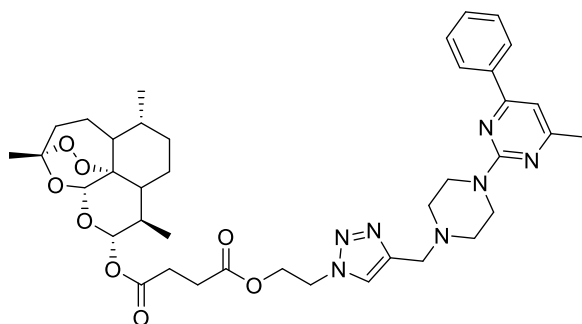
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,32$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $8,01$ (dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 5,5$ Hz, 2H), $7,72$ (s, 1H), $7,11$ (t, $J = 8,6$ Hz, 2H), $6,86$ (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), $5,76$ (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), $5,40$ (s, 1H), $4,61$ (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), $4,54 - 4,42$ (m, 2H), $3,92$ (t, $J = 5,0$ Hz, 4H), $3,77$ (s, 2H), $2,70 - 2,50$ (m, 9H), $2,32$ (td, $J = 13,9$ Hz, $J = 4,0$ Hz, 1H), $1,97$ (dt, $J = 14,4$ Hz, $J = 4,0$ Hz, 1H), $1,88 - 1,84$ (m, 1H), $1,76 - 1,64$ (m, 2H), $1,59$ (dt, $J = 13,8$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), $1,44 - 1,32$ (m, 4H), $1,32 - 1,20$ (m, 3H), $1,02 - 0,89$ (m, 4H), $0,82$ (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 171,5; 171,1; 164,4$ (d, $J_{C-F} = 250$ Hz); $163,2; 161,8; 158,5; 144,1; 133,8$ (d, $J_{C-F} = 3$ Hz); $129,0$ (d, $J_{C-F} = 9$ Hz); $124,1; 115,7$ (d, $J_{C-F} = 22$ Hz); $105,3; 104,5; 92,4; 91,6; 80,1; 62,9; 53,3; 52,7; 51,6; 49,0; 45,2; 43,6; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,8; 25,9; 24,6; 22,0; 20,3; 12,1$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+H]^+$ izračunato za C₃₈H₄₉FN₇O₈⁺ 750,36212; detektovano 750,36151.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 6,40$ min, površina 96,20%; metoda K: $t_R = 8,22$ min, površina 95,16% ($\lambda = 254$ nm).

2-((4-((4-Metil-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (200)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (39 mg, 0,10 mmol) i **173** (30 mg, 0,08 mmol) dobijeno je jedinjenje **200** (56 mg, 90%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 0,7$ (c 0,05, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3143, 3061, 2926, 2874, 2852, 1745, 1569, 1555, 1495, 1450, 1376, 1348, 1301, 1269, 1224, 1208, 1154, 1100, 1035, 1018, 927, 877, 844, 826, 795, 771, 736, 699, 591, 550 \text{ cm}^{-1}$.

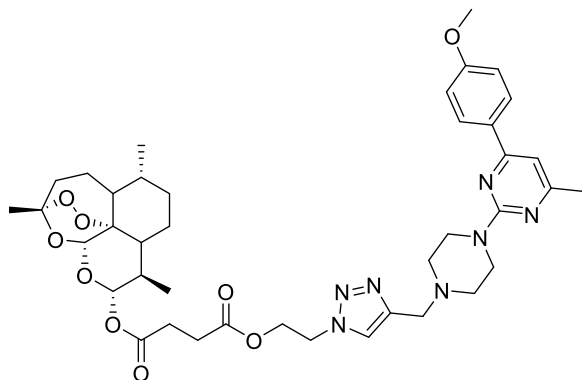
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,02 - 7,97$ (m, 2H), $7,71$ (s, 1H), $7,44 - 7,38$ (m, 3H), $6,80$ (s, 1H), $5,75$ (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), $5,39$ (s, 1H), $4,60$ (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), $4,52 - 4,42$ (m, 2H), $3,94$ (t, $J = 4,9$ Hz, 4H), $3,76$ (s, 2H), $2,70 - 2,49$ (m, 9H), $2,36 - 2,28$ (m, 4H), $2,00 - 1,93$ (m, 1H), $1,87 - 1,79$ (m, 1H), $1,76 - 1,62$ (m, 2H), $1,58$ (dt, $J = 13,9$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), $1,46 - 1,36$ (m, 1H), $1,33$ (s, 3H), $1,31 - 1,20$ (m, 3H), $1,01 - 0,88$ (m, 4H), $0,81$ (d, $J = 7,2$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 171,5; 171,1; 168,1; 164,0; 162,0; 144,2; 138,0; 130,2; 128,6; 127,0; 124,0; 105,3; 104,5; 92,3; 91,5; 80,1; 62,9; 53,4; 52,9; 51,5; 49,0; 45,2; 43,6; 37,2; 36,2; 34,0; 31,8; 29,1; 28,8; 25,9; 24,6; 22,0; 20,2; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{39}\text{H}_{52}\text{N}_7\text{O}_8^+$ 746,38719; detektovano 746,38654.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 9,64 min, površina 95,78%; metoda K: t_R = 8,17 min, površina 95,33% (λ = 254 nm).

2-((4-((4-(4-Metoksifenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (201)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (37 mg, 0,10 mmol) i **174** (30 mg, 0,07 mmol) dobijeno je jedinjenje **201** (50 mg, 88%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 1,5 (c 0,04, MeOH)

IC (ATR): ν = 3465, 3141, 2928, 2874, 1744, 1608, 1572, 1551, 1513, 1449, 1377, 1350, 1305, 1254, 1228, 1210, 1174, 1155, 1100, 1035, 1018, 943, 927, 911, 893, 877, 844, 825, 791, 736, 703, 593, 548, 512,

409 cm^{-1} .

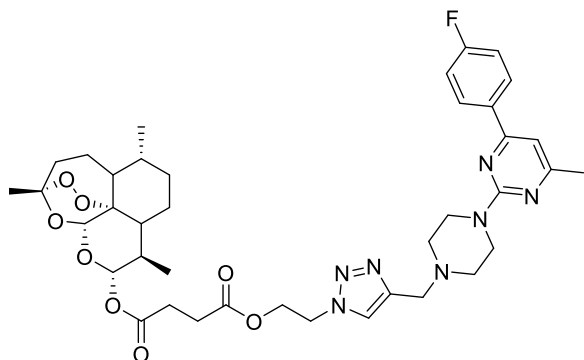
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,98 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,71 (s, 1H), 6,93 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 6,75 (s, 1H), 5,77 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 5,40 (s, 1H), 4,61 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,54 – 4,43 (m, 2H), 3,93 (t, J = 5,0 Hz, 4H), 3,83 (s, 3H), 3,76 (s, 2H), 2,71 – 2,50 (m, 9H), 2,38 – 2,28 (m, 4H), 2,01 – 1,95 (m, 1H), 1,87 – 1,82 (m, 1H), 1,77 – 1,64 (m, 2H), 1,59 (dt, J = 14,1 Hz, J = 4,5 Hz, 1H), 1,47 – 1,37 (m, 1H), 1,34 (s, 3H), 1,33 – 1,21 (m, 3H), 1,02 – 0,89 (m, 4H), 0,83 (d, J = 7,0 Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 171,5; 171,2; 167,8; 163,6; 162,0; 161,5; 144,4; 130,5; 128,5; 124,0; 114,0; 104,5; 104,5; 92,4; 91,6; 80,2; 63,0; 55,4; 53,5; 53,0; 51,6; 49,0; 45,3; 43,7; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,9; 25,9; 24,6; 22,1; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_9^+$ 776,39775; detektovano 776,39658.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 6,39 min, površina 97,01%; metoda K: t_R = 8,15 min, površina 96,03% (λ = 254 nm).

2-4-((4-(4-Fluorfenil)-6-metilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (202**)**



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (39 mg, 0,10 mmol) i **175** (31 mg, 0,08 mmol) dobijeno je jedinjenje **202** (48 mg, 80%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 0,3$ (c 0,03, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3325, 3141, 3057, 2928, 2875, 2851, 1745, 1602, 1557, 1510, 1451, 1376, 1348, 1303, 1269, 1225, 1157, 1100, 1036, 1017, 944, 927, 894,$

$877, 845, 825, 791, 736, 702, 591, 546, 504, 454 \text{ cm}^{-1}$.

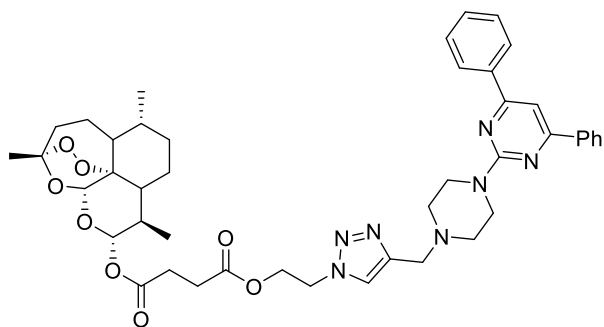
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,03 - 7,99$ (m, 2H), 7,72 (s, 1H), 7,11 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 5,77 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 5,42 (s, 1H), 4,62 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 4,55 – 4,44 (m, 2H), 3,94 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H), 3,77 (s, 2H), 2,71 – 2,51 (m, 9H), 2,37 – 2,30 (m, 4H), 1,99 (dt, $J = 14,5$ Hz, $J = 4,0$ Hz, 1H), 1,90 – 1,81 (m, 1H), 1,79 – 1,65 (m, 2H), 1,60 (dt, $J = 13,8$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), 1,49 – 1,38 (m, 1H), 1,35 (s, 3H), 1,34 – 1,22 (m, 3H), 1,04 – 0,90 (m, 4H), 0,83 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,6; 171,2; 168,3; 165,5; 164,3$ (d, $J_{\text{C-F}} = 250$ Hz); 163,0; 162,0; 144,3; 134,2 (d, $J_{\text{C-F}} = 3$ Hz); 129,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 9$ Hz); 124,0; 115,6 (d, $J_{\text{C-F}} = 22$ Hz); 105,0; 104,6; 92,4; 91,6; 80,2; 63,0; 53,5; 52,9; 51,6; 49,1; 45,3; 43,7; 37,4; 36,3; 34,1; 31,9; 29,2; 28,9; 26,0; 24,6; 22,1; 20,3; 12,2 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{39}\text{H}_{51}\text{FN}_7\text{O}_8^+$ 764,37777; detektovano 764,37668.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 6,52$ min, površina 96,10%; metoda K: $t_R = 8,17$ min, površina 95,89% ($\lambda = 254$ nm).

2-4-((4-(4,6-Difenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (203**)**



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (28 mg, 0,07 mmol) i **176** (25 mg, 0,06 mmol) dobijeno je jedinjenje **203** (40 mg, 87%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} + 0,6$ (c 0,03, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3142, 3060, 2929, 2874, 2852, 1746, 1587, 1562, 1546, 1495, 1451, 1360, 1302, 1267,$

$1231, 1208, 1156, 1100, 1035, 1018, 987, 927, 911, 877, 844, 826, 765, 736, 695, 632, 486 \text{ cm}^{-1}$.

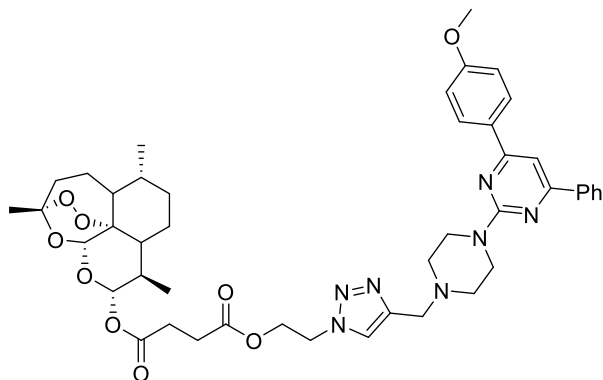
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,11 - 8,09$ (m, 4H), 7,75 (s, 1H), 7,50 – 7,45 (m, 6H), 7,39 (s, 1H), 5,77 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 5,41 (s, 1H), 4,63 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 4,52 – 4,47 (m, 2H), 4,07 (t, $J = 4,9$ Hz, 4H), 3,81 (s, 2H), 2,73 – 2,51 (m, 9H), 2,33 (td, $J = 13,9$ Hz, $J = 4,0$ Hz, 1H), 1,97 (dt, $J = 14,3$ Hz, $J = 4,1$ Hz, 1H), 1,87 – 1,81 (m, 1H), 1,77 – 1,63 (m, 2H), 1,59 (dt, $J = 13,8$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), 1,45 – 1,37 (m, 1H), 1,35 (s, 3H), 1,32 – 1,21 (m, 3H), 1,01 – 0,88 (m, 4H), 0,83 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 171,5; 171,2; 165,3; 162,2; 144,1; 138,3; 130,4; 128,7; 127,2; 124,1; 104,5; 101,9; 92,4; 91,6; 80,2; 63,0; 53,4; 52,9; 51,6; 49,0; 45,3; 43,7; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,9; 25,9; 24,6; 22,1; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_8^+$ 808,40284; detektovano 808,40144.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 6,98 min, površina 97,75%; metoda K: t_R = 8,50 min, površina 95,87% (λ = 254 nm).

2-((4-((4-(4-Metoksifenil)-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (204)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (37 mg, 0,10 mmol) i **177** (35 mg, 0,07 mmol) dobijeno je jedinjenje **204** (50 mg, 81%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 2,2 (c 0,04, MeOH)

IC (ATR): ν = 3142, 3058, 2929, 2850, 1743, 1607, 1584, 1564, 1543, 1513, 1496, 1450, 1362, 1307, 1266, 1236, 1175, 1157, 1100, 1033, 1018, 986, 926, 877, 828, 774, 736, 699, 641, 609, 581, 517

cm^{-1} .

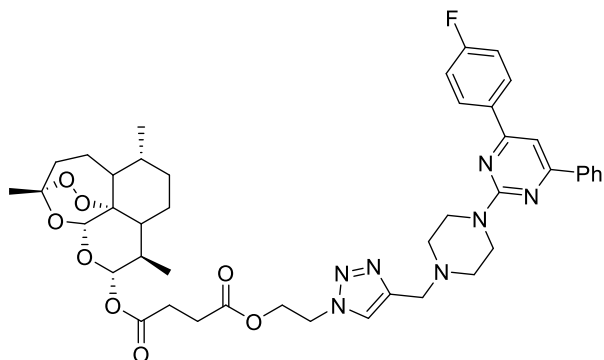
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,11 – 8,05 (m, 4H), 7,73 (s, 1H), 7,49 – 7,43 (m, 3H), 7,33 (s, 1H), 6,98 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 5,77 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 5,40 (s, 1H), 4,62 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,54 – 4,44 (m, 2H), 4,05 (t, J = 4,9 Hz, 4H), 3,86 (s, 3H), 3,79 (s, 2H), 2,72 – 2,50 (m, 9H), 2,37 – 2,27 (m, 1H), 2,00 – 1,93 (m, 1H), 1,86 – 1,80 (m, 1H), 1,77 – 1,63 (m, 2H), 1,58 (dt, J = 10,3 Hz, J = 4,5 Hz, 1H), 1,44 – 1,36 (m, 1H), 1,34 (s, 3H), 1,32 – 1,20 (m, 3H), 1,04 – 0,88 (m, 4H), 0,82 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 171,5; 171,2; 165,0; 164,7; 162,2; 161,6; 144,4; 138,4; 130,7; 130,3; 128,7; 128,6; 127,1; 124,0; 114,0; 104,5; 101,2; 92,4; 91,6; 80,1; 63,0; 55,5; 53,5; 53,0; 51,6; 49,0; 45,2; 43,8; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,9; 25,9; 24,6; 22,0; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{45}\text{H}_{56}\text{N}_7\text{O}_9^+$ 838,41340; detektovano 838,41161.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 10,36 min, površina 95,12%; metoda K: t_R = 8,55 min, površina 96,61% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Fluorfenil)-6-fenilpirimidin-2-il)piperazin-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (205**)**



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (28 mg, 0,07 mmol) i **178** (26 mg, 0,06 mmol) dobijeno je jedinjenje **205** (41 mg, 88%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 2,1$ (c 0,04, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3399, 3143, 3063, 2926, 2853, 1745, 1602, 1564, 1547, 1510, 1497, 1451, 1361, 1304, 1266, 1157, 1100, 1036, 1017, 987, 927, 877, 827,$

$773, 735, 697, 607, 570, 509 \text{ cm}^{-1}$.

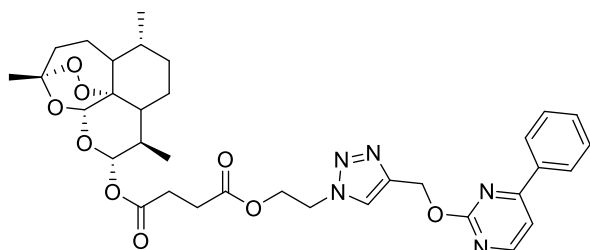
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,13 - 8,06$ (m, 4H), 7,74 (s, 1H), 7,50 – 7,44 (m, 3H), 7,33 (s, 1H), 7,14 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H), 5,77 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 5,40 (s, 1H), 4,62 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 4,55 – 4,44 (m, 2H), 4,05 (t, $J = 4,9$ Hz, 4H), 3,80 (s, 2H), 2,71 – 2,50 (m, 9H), 2,32 (td, $J = 13,8$ Hz, $J = 4,3$ Hz, 1H), 1,97 (dt, $J = 14,7$ Hz, $J = 3,8$ Hz, 1H), 1,88 – 1,80 (m, 1H), 1,75 – 1,64 (m, 2H), 1,59 (dt, $J = 14,0$ Hz, $J = 4,6$ Hz, 1H), 1,46 – 1,37 (m, 1H), 1,34 (s, 3H), 1,32 – 1,21 (m, 3H), 0,99 – 0,89 (m, 4H), 0,82 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,5; 171,2; 165,4; 164,4$ (d, $J_{\text{C-F}} = 250$ Hz); 164,1; 162,2; 144,2; 138,2; 134,4 (d, $J_{\text{C-F}} = 3$ Hz); 130,5; 129,1 (d, $J_{\text{C-F}} = 9$ Hz); 128,7; 127,2; 124,1; 115,7 (d, $J_{\text{C-F}} = 22$ Hz); 104,5; 101,5; 92,4; 91,6; 80,2; 63,0; 53,4; 52,9; 51,6; 49,0; 45,3; 43,8; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,9; 25,9; 24,6; 22,1; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{44}\text{H}_{53}\text{FN}_7\text{O}_8^+$ 826,39342; detektovano 826,39245.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 7,12$ min, površina 95,44%; metoda K: $t_R = 8,61$ min, površina 97,50% ($\lambda = 254$ nm).

2-(4-(((4-Fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (206**)**



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (52 mg, 0,13 mmol) i **188** (31 mg, 0,10 mmol) dobijeno je jedinjenje **206** (58 mg, 84%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 2,3$ (c 0,04, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3145, 3059, 2929, 2875, 1744, 1575, 1550, 1498, 1452, 1435, 1410, 1369, 1322, 1276, 1252, 1228, 1206, 1156, 1102, 1036, 1017, 944, 927, 912, 878, 843, 827, 774, 735, 699, 628, 553, 487 \text{ cm}^{-1}$.

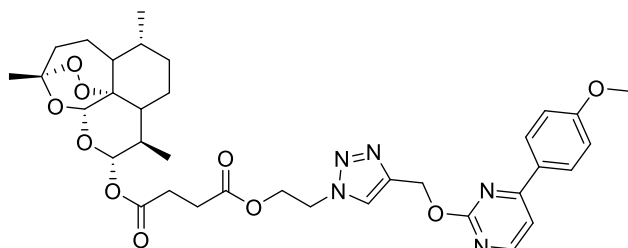
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,58 - 8,54$ (m, 1H), 8,13 – 8,07 (m, 2H), 7,85 (s, 1H), 7,50 – 7,45 (m, 3H), 7,41 – 7,37 (m, 1H), 5,73 (d, $J = 9,9$ Hz, 1H), 5,66 (s, 2H), 5,38 (s, 1H), 4,59 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H), 4,50 – 4,39 (m, 2H), 2,66 – 2,46 (m, 5H), 2,36 – 2,26 (m, 1H), 1,99 – 1,92 (m, 1H), 1,85 – 1,79 (m, 1H), 1,76 – 1,62 (m, 2H), 1,59 – 1,54 (m, 1H), 1,46 – 1,36 (m, 1H), 1,33 (s, 3H), 1,31 – 1,19 (m, 3H), 1,01 – 0,89 (m, 4H), 0,79 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171,5; 171,1; 166,3; 165,0; 160,0; 144,0; 136,2; 131,3; 129,0; 127,3; 124,4; 110,9; 104,5; 92,3; 91,5; 80,1; 62,9; 61,0; 51,6; 49,1; 45,2; 37,3; 36,2; 34,1; 31,8; 29,1; 28,7; 25,9; 24,6; 22,0; 20,2; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+Na]⁺ izračunato za C₃₄H₄₁N₅NaO₉⁺ 686,27965; detektovano 686,27897.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 8,56 min, površina 96,32%; metoda K: t_R = 9,15 min, površina 95,40% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Metoksifenil)pirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (207)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (46 mg, 0,12 mmol) i **189** (30 mg, 0,09 mmol) dobijeno je jedinjenje **207** (51 mg, 81%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 1,8 (c 0,1, MeOH)

IC (ATR): ν = 3146, 3057, 2934, 2875, 1744, 1608, 1578, 1549, 1514, 1440, 1420, 1373, 13327, 1302, 1278, 1254, 1209, 1177, 1156, 1101, 1035, 1018, 944, 927, 877, 826, 795, 735, 702, 582, 522, 486, 450 cm⁻¹.

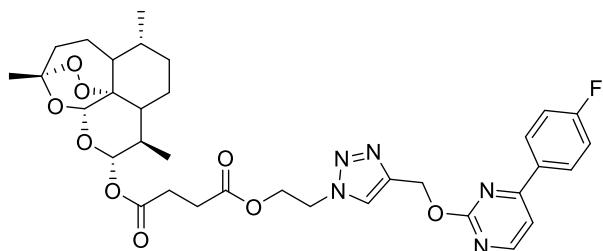
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,50 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,09 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,85 (s, 1H), 7,32 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,74 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 5,66 (s, 2H), 5,40 (s, 1H), 4,60 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 4,52 – 4,39 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,67 – 2,48 (m, 5H), 2,33 (td, J = 13,9 Hz, J = 3,9 Hz, 1H), 1,98 (dt, J = 14,6 Hz, J = 4,0 Hz, 1H), 1,88 – 1,82 (m, 1H), 1,78 – 1,63 (m, 2H), 1,58 (dt, J = 13,7 Hz, J = 4,4 Hz, 1H), 1,47 – 1,37 (m, 1H), 1,35 (s, 3H), 1,32 – 1,19 (m, 3H), 1,02 – 0,90 (m, 4H), 0,81 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171,6; 171,1; 165,9; 165,0; 162,4; 159,7; 144,2; 129,0; 128,7; 124,4; 114,4; 110,1; 104,5; 92,4; 91,6; 80,2; 62,9; 60,9; 55,5; 51,6; 49,1; 45,3; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,8; 25,9; 24,6; 22,0; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+Na]⁺ izračunato za C₃₅H₄₃N₅NaO₁₀⁺ 716,29021; detektovano 716,28985.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 8,49 min, površina 97,15%; metoda K: t_R = 8,92 min, površina 96,17% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Fluorfenil)pirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (208)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (38 mg, 0,10 mmol) i **190** (24 mg, 0,08 mmol) dobijeno je jedinjenje **208** (46 mg, 89%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 4,5 (c 0,03, MeOH)

IC (ATR): ν = 3397, 3146, 3060, 2929, 2875, 1744, 1602, 1579, 1552, 1511, 1444, 1418, 1373, 1326, 1294, 1274, 1231, 1209, 1160, 1101, 1035, 1017, 944, 926, 911, 877, 826, 736, 614, 570, 514, 487, 453 cm⁻¹.

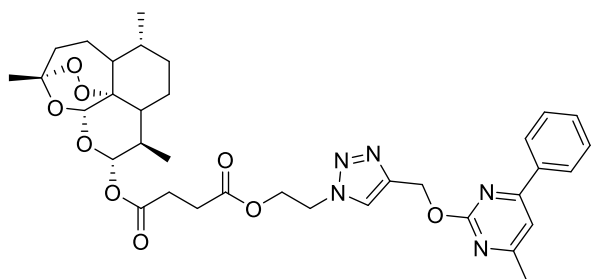
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,56 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,14 – 8,10 (m, 2H), 7,85 (s, 1H), 7,35 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,16 (t, J = 8,6 Hz, 2H), 5,74 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,66 (s, 2H), 5,40 (s, 1H), 4,60 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,52 – 4,40 (m, 2H), 2,68 – 2,47 (m, 5H), 2,37 – 2,29 (m, 1H), 2,01 – 1,94 (m, 1H), 1,89 – 1,81 (m, 1H), 1,77 – 1,64 (m, 2H), 1,58 (dt, J = 14,0 Hz, J = 4,5 Hz, 1H), 1,47 – 1,37 (m, 1H), 1,34 (s, 3H), 1,32 – 1,20 (m, 3H), 1,03 – 0,90 (m, 4H), 0,80 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171,5; 171,1; 165,3; 165,1; 164,9 (d, J_{C-F} = 251 Hz); 160,1; 144,0; 132,5 (d, J_{C-F} = 3 Hz); 129,5 (d, J_{C-F} = 9 Hz); 124,4; 116,1 (d, J_{C-F} = 22 Hz); 110,6; 104,5; 92,4; 91,6; 80,2; 62,9; 61,1; 51,6; 49,1; 45,3; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,8; 25,9; 24,6; 22,0; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+Na]⁺ izračunato za C₃₄H₄₀FN₅NaO₉⁺ 704,27023; detektovano 704,26991.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 8,56 min, površina 99,68%; metoda K: t_R = 9,30 min, površina 95,42% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-Metil-6-fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (209)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (48 mg, 0,13 mmol) i **191** (30 mg, 0,10 mmol) dobijeno je jedinjenje **209** (61 mg, 93%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 3,3 (c 0,06, MeOH)

IC (ATR): ν = 3146, 3063, 2929, 2875, 1744, 1662, 1591, 1545, 1499, 1449, 1409, 1350, 1325, 1280, 1252, 1225, 1155, 1100, 1072, 1050, 1036, 1017, 944, 927, 911, 877, 844, 826, 774, 735, 698, 594, 549 cm⁻¹.

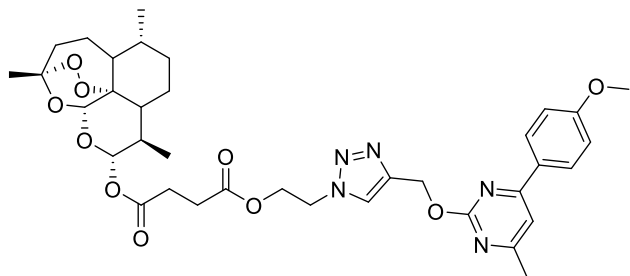
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,15 – 8,10 (m, 2H), 7,86 (s, 1H), 7,52 – 7,47 (m, 3H), 7,30 (s, 1H), 5,76 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,70 (s, 2H), 5,42 (s, 1H), 4,62 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 4,53 – 4,43 (m, 2H), 2,69 – 2,50 (m, 8H), 2,40 – 2,29 (m, 1H), 2,03 – 1,96 (m, 1H), 1,92 – 1,82 (m, 1H), 1,79 – 1,65 (m, 2H), 1,60 (dt, J = 13,9 Hz, J = 4,6 Hz, 1H), 1,50 – 1,39 (m, 1H), 1,37 (s, 3H), 1,34 – 1,22 (m, 3H), 1,05 – 0,91 (m, 4H), 0,83 (d, J = 6,9 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171,6; 171,1; 170,7; 165,8; 164,9; 144,2; 136,5; 131,1; 128,9; 127,3; 124,2; 110,4; 104,5; 92,3; 91,5; 80,1; 62,9; 60,9; 51,6; 49,1; 45,2; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,7; 25,9; 24,6; 24,4; 22,0; 20,2; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M+Na]⁺ izračunato za C₃₅H₄₃N₅NaO₉⁺ 700,2953; detektovano 700,29496.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 8,80 min, površina 95,95%; metoda K: t_R = 9,10 min, površina 95,07% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Metoksifenil)-6-metilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (210)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (44 mg, 0,11 mmol) i **192** (30 mg, 0,09 mmol) dobijeno je jedinjenje **210** (60 mg, 96%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 3,6$ (c 0,05, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3145, 3056, 2932, 2875, 1745, 1590, 1542, 1517, 1452, 1415, 1352, 1323, 1296, 1256, 1226, 1177, 1157, 1132, 1101, 1035, 1019, 944, 927, 911, 878, 836, 793, 736, 702, 594, 548, 513 \text{ cm}^{-1}$.

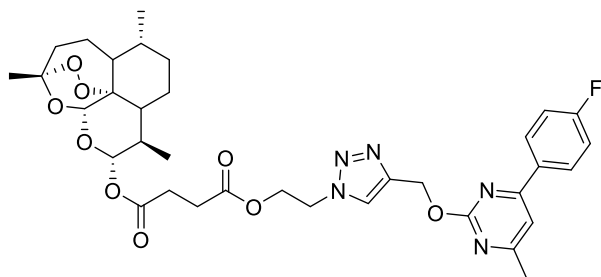
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,07$ (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), $7,81$ (s, 1H), $7,19$ (s, 1H), $6,96$ (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), $5,72$ (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), $5,65$ (s, 2H), $5,38$ (s, 1H), $4,58$ (t, $J = 4,6$ Hz, 2H), $4,50 - 4,38$ (m, 2H), $3,84$ (s, 3H), $2,65 - 2,45$ (m, 8H), $2,31$ (td, $J = 13,8$ Hz, $J = 4,1$ Hz, 1H), $2,00 - 1,93$ (m, 1H), $1,88 - 1,79$ (m, 1H), $1,76 - 1,62$ (m, 2H), $1,56$ (dt, $J = 13,9$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), $1,46 - 1,37$ (m, 1H), $1,34$ (s, 3H), $1,32 - 1,17$ (m, 3H), $1,01 - 0,88$ (m, 4H), $0,79$ (d, $J = 6,9$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 171,6; 171,0; 170,3; 165,3; 164,8; 162,1; 144,3; 128,9; 128,8; 124,2; 114,2; 109,5; 104,5; 92,3; 91,5; 80,1; 62,9; 60,8; 55,5; 51,6; 49,0; 45,2; 37,3; 36,2; 34,1; 31,8; 29,1; 28,7; 25,9; 24,6; 24,3; 22,0; 20,2; 12,1$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+Na]^+$ izračunato za C₃₆H₄₅N₅NaO₁₀⁺ 730,30586; detektovano 730,30519.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 8,51$ min, površina 95,38%; metoda K: $t_R = 9,01$ min, površina 95,14% ($\lambda = 254$ nm).

2-(4-(((4-(4-Fluorofenil)-6-metilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (211)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (40 mg, 0,10 mmol) i **193** (27 mg, 0,08 mmol) dobijeno je jedinjenje **211** (41 mg, 73%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 6,0$ (c 0,03, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3146, 3062, 2928, 2875, 1744, 1602, 1587, 1545, 1512, 1452, 1412, 1350, 1322, 1225, 1159, 1100, 1036, 1017, 944, 927, 911, 877, 840, 793, 735, 702, 588, 573, 546, 506, 487, 453 \text{ cm}^{-1}$.

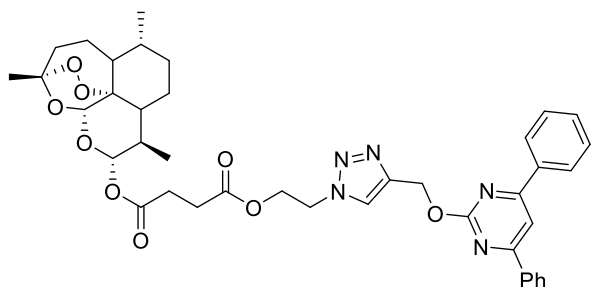
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,14 - 8,08$ (m, 2H), $7,82$ (s, 1H), $7,22$ (s, 1H), $7,17 - 7,11$ (m, 2H), $5,73$ (d, $J = 10,2$ Hz, 1H), $5,65$ (s, 2H), $5,39$ (s, 1H), $4,59$ (d, $J = 4,6$ Hz, 2H), $4,51 - 4,39$ (m, 2H), $2,67 - 2,47$ (m, 8H), $2,37 - 2,27$ (m, 1H), $1,99 - 1,95$ (m, 1H), $1,89 - 1,80$ (m, 1H), $1,77 - 1,63$ (m, 2H), $1,57$ (dt, $J = 13,9$ Hz, $J = 3,5$ Hz, 1H), $1,47 - 1,36$ (m, 1H), $1,34$ (s, 3H), $1,32 - 1,20$ (m, 3H), $1,02 - 0,89$ (m, 4H), $0,80$ (d, $J = 6,7$ Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 171,6; 171,1; 170,8; 164,9; 164,7; 164,7$ (d, $J_{C-F} = 250$ Hz); $144,2; 132,7; 129,4$ (d, $J_{C-F} = 9$ Hz); $124,2; 116,0$ (d, $J_{C-F} = 22$ Hz); $110,1; 104,5; 92,4; 91,6; 80,1; 62,9; 60,9; 51,6; 49,1; 45,3; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,7; 25,9; 24,6; 24,4; 22,0; 20,3; 12,1$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+Na]^+$ izračunato za $C_{35}H_{42}FN_5NaO_9^+$ 718,28588; detektovano 718,28518.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 8,59 min, površina 97,65%; metoda K: t_R = 9,00 min, površina 96,13% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4,6-Difenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (212)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (34 mg, 0,09 mmol) i **194** (25 mg, 0,07 mmol) dobijeno je jedinjenje **212** (40 mg, 81%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 2,7 (c 0,04, MeOH)

IC (ATR): ν = 3147, 3061, 2929, 2875, 1745, 1587, 1573, 1536, 1499, 1452, 1409, 1376, 1353, 1326, 1309, 1284, 1232, 1209, 1156, 1132, 1100, 1036, 1017, 927, 911, 877, 844, 826, 768, 735, 694, 626, 486 cm^{-1} .

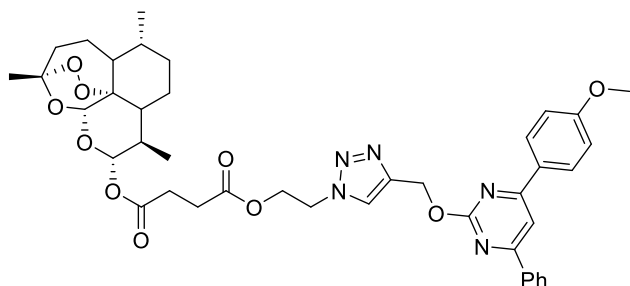
¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,22 – 8,16 (m, 4H), 7,88 (s, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,54 – 7,48 (m, 6H), 5,79 (s, 2H), 5,72 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 5,36 (s, 1H), 4,64 – 4,57 (m, 2H), 4,53 – 4,38 (m, 2H), 2,66 – 2,43 (m, 5H), 2,37 – 2,27 (m, 1H), 2,01 – 1,93 (m, 1H), 1,87 – 1,79 (m, 1H), 1,74 – 1,60 (m, 2H), 1,59 – 1,51 (m, 1H), 1,42 – 1,32 (m, 4H), 1,32 – 1,18 (m, 3H), 1,00 – 0,88 (m, 4H), 0,78 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 171,6; 171,1; 167,2; 165,4; 144,3; 136,8; 131,2; 129,0; 127,5; 124,4; 106,9; 104,5; 92,4; 91,6; 80,2; 62,9; 61,1; 51,6; 49,1; 45,3; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,7; 26,0; 24,6; 22,0; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M+Na]^+$ izračunato za $C_{40}H_{45}N_5NaO_9^+$ 762,31095; detektovano 762,30983.

HPLC čistoća, metoda J: t_R = 9,66 min, površina 95,94%; metoda K: t_R = 12,43 min, površina 95,32% (λ = 254 nm).

2-(4-(((4-(4-Metoksifenil)-6-fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (213)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (37 mg, 0,10 mmol) i **195** (30 mg, 0,07 mmol) dobijeno je jedinjenje **213** (50 mg, 87%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20}$ – 3,0 (c 0,03, MeOH)

IC (ATR): ν = 3396, 3059, 2930, 1744, 1605, 1586, 1574, 1533, 1516, 1499, 1452, 1432, 1415, 1353, 1325, 1297, 1257, 1239, 1177, 1156, 1132, 1100, 1017, 927, 877, 838, 775, 736, 698, 644, 581, 518 cm^{-1} .

¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,17 – 8,13 (m, 4H), 7,87 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,50 – 7,46 (m, 3H), 6,99 – 6,97 (m, 2H), 5,75 (s, 2H), 5,70 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,34 (s, 1H), 4,62 – 4,56 (m, 2H), 4,50 – 4,37 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 2,64 – 2,41 (m, 5H), 2,28 (dd, J = 14,4 Hz, J = 3,8 Hz, 1H), 1,95 (dt, J = 14,0 Hz, J = 3,7 Hz, 1H), 1,84 – 1,77 (m, 1H), 1,71 – 1,59 (m, 2H), 1,53 (dt, J = 13,9 Hz, J = 3,7 Hz, 1H) ppm.

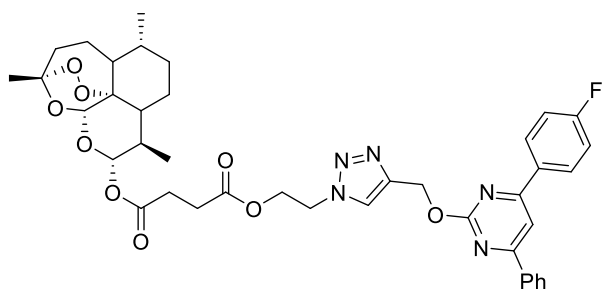
4,4 Hz, 1H), 1,41 – 1,32 (m, 4H), 1,31 – 1,17 (m, 3H), 0,96 – 0,86 (m, 4H), 0,76 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,6; 171,0; 166,7; 166,6; 165,2; 162,2; 144,2; 136,9; 131,0; 129,1; 129,0; 128,9; 127,3; 124,4; 114,2; 105,9; 104,4; 92,3; 91,5; 80,1; 62,9; 60,9; 55,5; 51,5; 49,0; 45,1; 37,2; 36,2; 34,0; 31,7; 29,0; 28,6; 25,9; 24,5; 21,9; 20,2; 12,0$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{NaO}_{10}^+$ 792,32151; detektovano 792,32016.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 9,17$ min, površina 95,83%; metoda K: $t_R = 9,67$ min, površina 95,06% ($\lambda = 254$ nm).

2-(4-(((4-(4-Fluorifenil)-6-fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil-((3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il)-sukcinat (214)



Primjenom *opšte procedure I*, polazeći iz artesunata **32** (38 mg, 0,10 mmol) i **196** (30 mg, 0,08 mmol), dobijeno je jedinjenje **214** (48 mg, 83%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} - 3,4$ (c 0,05, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3146, 3064, 2929, 2875, 1744, 1602, 1588, 1577, 1536, 1512, 1453, 1431, 1412, 1352, 1326, 1284, 1231, 1159, 1132, 1100, 1035, 1017, 927, 877, 843, 775, 735, 697, 570, 510$ cm^{-1} .

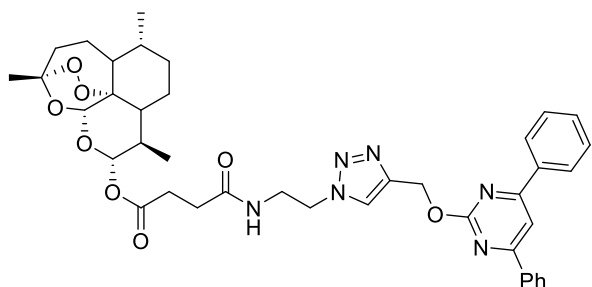
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,23 - 8,15$ (m, 4H), 7,87 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,52 – 7,49 (m, 3H), 7,22 – 7,15 (m, 2H), 5,77 (s, 2H), 5,72 (d, $J = 9,9$ Hz, 1H), 5,37 (s, 1H), 4,62 – 4,59 (m, 2H), 4,53 – 4,38 (m, 2H), 2,68 – 2,44 (m, 5H), 2,37 – 2,27 (m, 1H), 2,00 – 1,94 (m, 1H), 1,88 – 1,80 (m, 1H), 1,75 – 1,61 (m, 2H), 1,59 – 1,52 (m, 1H), 1,43 – 1,17 (m, 7H), 1,00 – 0,89 (m, 4H), 0,78 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,6; 171,1; 167,3; 166,1; 165,3; 164,8$ (d, $J_{\text{C-F}} = 252$ Hz); 144,2; 136,7; 133,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 3$ Hz); 131,3; 129,6 (d, $J_{\text{C-F}} = 9$ Hz); 129,0; 127,4; 124,4; 116,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 22$ Hz); 106,5; 104,5; 92,4; 91,6; 80,2; 62,9; 61,1; 51,6; 49,1; 45,3; 37,3; 36,3; 34,1; 31,8; 29,1; 28,7; 25,9; 24,6; 22,0; 20,3; 12,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{FN}_5\text{NaO}_9^+$ 780,30153; detektovano 780,30065.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 9,58$ min, površina 98,87%; metoda K: $t_R = 9,88$ min, površina 97,89% ($\lambda = 254$ nm).

(3R,6R,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-Trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepin[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-((2-(4-(((4,6-difenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amino)-4-oksobutanoat (217)



Primjenom *opšte procedure J*, polazeći iz artesunata **32** (31 mg, 0,08 mmol) i **215** (30 mg, 0,08 mmol), dobijeno je jedinjenje **217** (51 mg, 86%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} + 1,5$ (c 0,04, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3310, 3062, 2926, 2873, 2853, 1749, 1708, 1673, 1588, 1574, 1536, 1499, 1447, 1409, 1376, 1353, 1327, 1309, 1284, 1231, 1210, 1161, 1132, 1098, 1036, 1016, 927, 877, 845, 826, 768, 735, 694, 627 \text{ cm}^{-1}$.

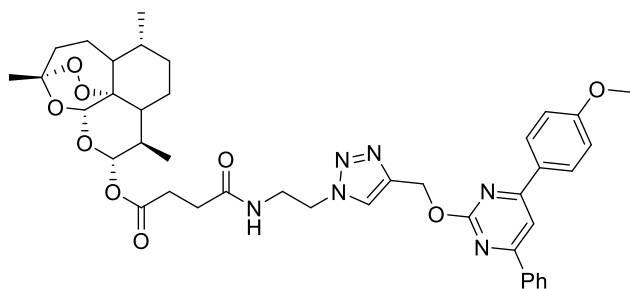
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,16 - 8,10$ (m, 4H), 7,83 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,50 – 7,45 (m, 6H), 6,69 – 6,65 (m, 1H), 5,72 – 5,67 (m, 3H), 5,34 (s, 1H), 4,45 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 2H), 3,78 – 3,63 (m, 2H), 2,76 – 2,25 (m, 6H), 1,96 (dt, $J = 14,6 \text{ Hz}$, $J = 3,9 \text{ Hz}$, 1H), 1,85 – 1,77 (m, 1H), 1,72 – 1,58 (m, 2H), 1,54 (dt, $J = 13,6 \text{ Hz}$, $J = 4,4 \text{ Hz}$, 1H), 1,43 – 1,34 (m, 4H), 1,33 – 1,17 (m, 3H), 0,98 – 0,85 (m, 4H), 0,78 (d, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 172,1; 171,7; 167,1; 165,3; 143,7; 136,7; 131,2; 129,0; 127,4; 124,7; 106,9; 104,5; 92,2; 91,5; 80,1; 60,9; 51,5; 49,7; 45,2; 39,7; 37,2; 36,2; 34,1; 31,8; 30,5; 29,5; 26,0; 24,6; 22,0; 20,2; 12,1 \text{ ppm}$.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{NaO}_8^+$ 761,32693; detektovano 761,32586.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 9,09 \text{ min}$, površina 98,99%; metoda K: $t_R = 10,26 \text{ min}$, površina 99,55% ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

(3*R*,6*R*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-3,6,9-Trimetildekahidro-12*H*-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-*i*]izohromen-10-il 4-((2-(4-(((4-(4-metoksifenil)-6-fenilpirimidin-2-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil)amino)-4-oksobutanoat (218)



Primjenom *opšte procedure J*, polazeći iz artesunata **32** (24 mg, 0,06 mmol) i **216** (25 mg, 0,06 mmol), dobijeno je jedinjenje **218** (36 mg, 76%). Bezbojno ulje.

$[\alpha]_D^{20} + 0,8$ (c 0,04, MeOH)

IC (ATR): $\nu = 3310, 3144, 3063, 2927, 2874, 1750, 1674, 1605, 1574, 1586, 1533, 1517, 1500, 1453, 1342, 1416, 1375, 1353, 1326, 1297, 1258, 1239, 1178, 1132, 1099, 1036, 1017, 927, 877, 838, 775, 735, 697 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,14 - 8,09$ (m, 4H), 7,82 (s, 1H), 7,72 – 7,69 (m, 1H), 7,49 – 7,47 (m, 3H), 7,00 – 6,95 (m, 2H), 6,53 (brs, 1H), 5,73 – 5,66 (m, 3H), 5,35 (s, 1H), 4,46 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 2H), 3,86 – 3,85 (m, 3H), 3,78 – 3,64 (m, 2H), 2,76 – 2,26 (m, 6H), 2,01 – 1,92 (m, 1H), 1,86 – 1,78 (m, 1H), 1,74 – 1,51 (m, 3H), 1,45 – 1,35 (m, 4H), 1,35 – 1,17 (m, 3H), 0,99 – 0,86 (m, 4H), 0,79 (d, $J = 6,4 \text{ Hz}$, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 172,0; 171,7; 166,8; 166,7; 165,2; 162,3; 143,9; 136,9; 131,1; 129,1; 129,0; 128,9; 127,3; 124,6; 114,3; 106,0; 104,5; 92,3; 91,5; 80,2; 60,8; 55,5; 51,6; 49,7; 45,3; 39,7; 37,3; 36,3; 34,1; 31,9; 30,6; 29,6; 26,0; 24,6; 22,0; 20,3; 12,1 \text{ ppm}$.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{41}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{NaO}_9^+$ 791,33750; detektovano 791,33657.

HPLC čistoća, metoda J: $t_R = 8,96 \text{ min}$, površina 98,68%; metoda K: $t_R = 10,16 \text{ min}$, površina 99,05% ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

Biološka ispitivanja

Eksperimenti za određivanje biološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja urađeni su na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, pod rukovodstvom dr Milice Pešić.

Reagensi

U okviru eksperimentalnog rada primjenjeni su sledeći reagensi: RPMI 1640 medijum, fetalni goveđi serum (FBS) (Corning, Njujork, Sjedinjene Američke Države (SAD)), mješavina antibiotika penicilin-streptomycin, mješavina antibiotika i antimikotika (penicilin, streptomycin i amfotericin B), neesencijalne aminokiseline za minimalni esencijalni medijum (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka), tripsin/EDTA rastvor, dihidroetidijum (DHE), dihidrorodamin 123 (DHR) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), minimalni esencijalni medijum (MEM), L-glutamin, dimetil-sulfoksid (DMSO), 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT), Dex-Ver i rodamin 123 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka).

Ispitivane supstance

Ispitivana jedinjenja, pirimidinski derivati, artemizinin, artesunat kao i hibridna jedinjenja, rastvorena su u dimetil-sulfoksidu, a alikvoti rastvora koncentracije 20 mM čuvani su na -20 °C. Tarikvidar je rastvoren u DMSO i alikvoti rastvora koncentracije 10 µM su čuvani na -20 °C. Deksverapamil (Dex-Ver) je rastvoren u sterilnoj dejonizovanoj vodi, kao i doksorubicin (DOX), a alikvoti koncentracije 5 mM i 10 mM, respektivno, su takođe čuvani na -20 °C. Neposredno prije izvođenja eksperimenata, radni rastvori svih jedinjenja su pripremljeni u sterilnoj dejonizovanoj vodi.

Ćelije i ćelijske kulture

Humana ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 je nabavljena od strane American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Rezistentna ćelijska linija NCI-H460/R razvijena je selekcijom NCI-H460 ćelija kontinuiranim izlaganjem postepeno rastućim koncentracijama doksorubicina.²¹⁸ Humana ćelijska linija fibroblasta pluća embrionalnog porijekla (MRC-5) je nabavljena iz Evropske kolekcije autentičnih ćelijskih kultura (ECACC, Port Down, Velika Britanija). Ćelije NCI-H460 kao i ćelije NCI-H460/R gajene su u RPMI 1640 medijumu koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 2 mM L-glutamina, 10 000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina i 25 mg/mL amfotericina B. MRC-5 ćelije su gajene u minimalnom esencijalnom medijumu (MEM) koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina, 2 mM neesencijalnih aminokiselina, 5000 U/mL penicilina i 5 mg/mL streptomicina. Sve ćelije su gajene na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ i presijavane dva puta nedeljno korišćenjem 0,25% tripsin/EDTA.

Ćelijska linija humanog glioblastoma U87 kupljena je od American Type Culture Collection (ATCC, SAD). Odgovarajuća višestruko rezistentna ćelijska linija U87-TxR selektovana je od U87 ćelijske linije nakon kontinuiranog izlaganja postepeno rastućim koncentracijama paklitaksela (100-300 nM) u toku 9 mjeseci.²³⁷ U87 i U87-TxR ćelije kultivisane su u minimalnom esencijalnom medijumu sa 10% fetalnog goveđeg seruma koji je prethodno inaktiviran na 56 °C tokom 30 minuta, uz dodatak 2 mM L-glutamina, 5000 U/mL penicilina i 5 mg/mL streptomicina, u inkubatoru na 37 °C sa 5% CO₂.

MTT test

Za određivanje vijabilnosti ćelija korišćen je MTT test koji se zasniva na sposobnosti živih ćelija da redukuju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT) do nerastvornog ljubičastog formazana u aktivnim mitohondrijama. Preliminarni skrining je urađen tako što su ćelije zasijane u ploče sa 96 bunarića (2000 ćelija po bunariću za NCI-H460 i NCI-H460/R) i inkubirane preko noći u odgovarajućem mediju. Inicijalno, ćelije su tretirane sa 5 µM i 30 µM artemizininom,

artesunata, pirimidinskih derivata **111–116, 131–140, 142**, hibridnih molekula **144–149, 150–160** i sa 5 μM derivata pirimidina **170–178, 188–196, 215–216**, hibrida artesunata **197–205, 206–214 i 217–218** i inkubirane tokom 72 sata (37 °C, 5% CO_2). Na osnovu dobijenih rezultata, hibridni molekuli (**144–149, 150–160, 197–205, 206–214 i 217–218**), kao i jedinjenje **142**, derivat pirimidina, su odabrani za određivanje IC_{50} vrijednosti i dalja eksperimentalna ispitivanja.

U87 i U87-TxR ćelije zasijavane su u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Sarstedt, Nemačka) u gustini od 4 000 ćelija po bunariću, u 100 μL MEM medijuma. Ćelije su zasijavane 24 sata prije tretmana radi adaptacije. Artemizinin, artesunat, kao i jedinjenja **170–178, 188–196, 215–216, 197–205, 206–214 i 217–218** primjenjivana su u koncentraciji od 5 μM .

U cilju određivanja IC_{50} vrijednosti odabranih jedinjenja, ćelije su tretirane sa rastućim koncentracijama artemizina, artesunata, pirimidinskog derivata **142** i hibridnih molekula **144–149, 150–160, 197–205, 206–214 i 217–218** (1, 2,5, 5, 10, 25 μM za NCI-H460, NCI-H460/R, i 10, 25, 50, 75 i 100 μM za MRC-5). Eksperiment je rađen pod istim uslovima, tako što su ćelije sijane u ploče sa 96 bunarića (2000 ćelija po bunariću), inkubirane preko noći i zatim tretirane rastućim koncentracijama odabranih jedinjenja.

Koncentracija TQ od 50 nM kombinovana je sa pet koncentracija jedinjenja **150–156** (1, 2,5, 5, 10, 25 μM), dok su jedinjenja **157–160** koncentracije od 500 nM kombinovana sa pet koncentracija DOX (100, 250, 500, 1000 i 2000 nM) na ćelijskoj liniji NCI-H460/R. U toku ovog kombinovanog tretmana, sve prikazane kombinacije su inkubirane u toku 72 sata. Takođe, NCI-H460/R ćelijska linija tretirana je i sa 50 nM TQ i 5 μM Dex-Ver i u kombinaciji sa jedinjenjima **213 i 217** (1, 2,5, 5, 10, 25 μM).

Nakon završetka tretmana, u svaki bunarić mikrotitar ploče dodan je MTT (0,2 mg/mL) za NSCLC, odnosno MTT rastvor (0,4 mg/mL) za U87, nakon čega su ploče inkubirane tokom tri sata na 37 °C sa 5% CO_2 za NSCLC i U87. Formazan nastao u ćelijama sa očuvanom mitohondrijalnom funkcijom, rastvoren je u 100 μL DMSO. Apsorbanca rastvora koji je dobijen izmjerena je na talasnoj dužini 570 nm, sa referentnom talasnom dužinom 690 nm, koristeći Multiskan Sky Microplate spektrofotometar (Thermo Scientific, Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države). IC_{50} vrijednosti izračunate su pomoću nelinearne regresione analize korišćenjem softverskog paketa GraphPad Prism 8.0.2.

Akumulacija rodamina 123

Akumulacija rodamina 123, fluorescentne boje koja predstavlja supstrat P-gp, određena je metodom protočne citometrije, pri čemu je intezitet fluorescencije korišćen kao indikator stepena njegove akumulacije u ćelijama. NCI-H460/R ćelije, koje pokazuju visok nivo ekspresije P-gp, brojane su i resuspendovane u odgovarajućem medijumu. U toku ovog tretmana, podjednak broj ćelija je bio izložen artemizininu, artesunatu, derivatima pirimidina: **111–116, 131–140, 142** kao i hibridnim molekulima **144–149, 150–160, 197–205, 206–214 i 217–218** (5 μM) u kombinaciji sa rodaminom 123 (1 μM za jedinjenja **197–205, 206–214 i 217–218** i 2 μM za jedinjenja **111–116, 131–140, 142, 144–149, 150–160**) i inkubirane tokom 30 minuta (37 °C, 5% CO_2). Predstavnik treće generacije P-gp inhibitora, tarikvidar (50 nM), je korišćen kao pozitivna kontrola za inhibiciju P-gp, dok su NCI-H460 ćelije, koje ne ekspimiraju P-gp, korišćene kao pozitivna kontrola za akumulaciju Rho123.

Za ispitivanje dozno-zavisnog efekta, NCI-H460/R ćelije su tretirane sa rastućim koncentracijama artesunata, jedinjenja **153 i 160** (2, 5, 10 i 20 μM) i tarikvidara (2, 5, 10 i 20 mM). Takođe, ispitivan je i kombinovani efekat 50 nM TQ i 5 μM Dex-Ver (inhibitor P-gp druge generacije) sa 5 μM jedinjenja **213 i 217** na akumulaciju Rho123 koji je analiziran na NCI-H460/R ćelijama. U oba slučaja, nakon inkubacije, ćelije su bile centrifugirane, isprane dva puta sa hladnim PBS i resuspendovane u 1 mL hladnog PBS. Fluorescencija u zelenom kanalu (525 nm) je mjerena na protočnom citometru CytoFLEX (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA), dok su rezultati

analizirani koristeći softver CytExpert. Za svaki uzorak analizirano je najmanje 10 000 ćelija po uzorku.

Praćenje proliferacije tumorskih ćelija u realnom vremenu

Proliferacija ćelijskih linija NCI-H460 i NCI-H460/R je praćena korišćenjem xCELLigence RTCA sistema (Roche, Basel, Switzerland) na E-pločama sa 96 bunarića. Prije zasijavanja ćelija, u svaki bunarić je dodato 100 μ L odgovarajućeg medijuma, kako bi se registrovao početni pozadinski otpor ili napon. Ćelije su zatim zasijane u bunariće (konačne zapremine 200 μ L), inkubirane 24 sata u cilju adhezije i zatim tretirane jedinjenjima **213** ili **217** i to sledećim koncentracijama: 1, 2,5, 5, 10 i 25 μ M. Mjerenje napona je automatski bilježeno na svakih 30 minuta i detektovane promjene napona su izražene kao bezdimenzionalni ćelijski indeks (engl. *cell index*, CI). Ovaj parametar odražava promjene u adheziji, proliferaciji, broju, morfologiji i vijabilnosti ćelija na površini senzora, pri čemu više vrijednosti uopšteno ukazuju na veću pokrivenost površine i jaču ćelijsku adheziju.²⁴⁷

Uzimajući u obzir promjene CI vrijednosti, efekti tretmana su klasifikovani na sledeći način: antiproliferativni (smanjen nagib CI krive uz zadržan obrazac rasta sličan netretiranoj kontroli), citostatski (održavanje platoa CI tokom produženog perioda), citotoksični (pad CI ispod početnih vrijednosti ili platoa). Analiza podataka sprovedena je na osnovu CI krivih kako bi se kvantifikovao efekat primjenjenih jedinjenja na vijabilnost kao i kinetiku rasta ćelija korišćenjem softvera RTCA 1.2.1 (Roche Diagnostics, Penzberg, Njemačka).

Detekcija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta

Protočna citometrija je korišćena za određivanje nivoa reaktivnih kiseoničnih (ROS) kao i azotnih vrsta (RNS) u ćelijskim linijama NCI-H460 i NCI-H460/R nakon tretmana jedinjenjima **213** i **217**. Nastanak superoksidnih anjona praćen je korišćenjem dihidroetidijuma (DHE), dok su vodonik-peroksid i peroksnitritni anjon (reaktivne azotne vrste, RNS) detektovani primjenom fluorescentne boje dihidrorodamina 123 (DHR).

Ćelije su zasijane u ploče sa 6 bunarića (100 000 ćelija po bunariću) i inkubirane tokom noći. Nakon toga, ćelije su tretirane jedinjenjima **213** i **217** (5 μ M) tokom 4 sata, odnosno 24 sata, u cilju detekcije DHE i DHR fluorescencije, redom. Po završetku tretmana, ćelije su bojene sa DHE ili DHR tokom 30 minuta na 37 °C u mraku. Nakon toga adherentne ćelije su tripsinizovane i isprane dva puta sa hladnim PBS. Intenzitet fluorescencije je određivan na protočnom citometru CytoFlex (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Fluorescencija DHE je mjerena u crvenom kanalu (585 nm), dok je DHR fluorescencija mjerena u zelenom kanalu (525 nm). Za svaki uzorak, analizirano je najmanje 10 000 događaja. Obrada i analiza podataka izvršeni su koristeći softver CytExpert 2.4. (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA).

Statistička analiza

Citotoksičnost je kvantifikovana određivanjem IC₅₀ vrijednosti primjenom MTT testa, dok su analize sprovedene korišćenjem nelinearne regresije u softveru GraphPad Prism, verzija 8.0.2. Inicijalni skrining, kao i krive zavisnosti efekta od doze, dobijene primjenom MTT testa, su generisane primjenom istog softvera. Welchov *t*-test korišćen je za procjenu statističkih razlika u citotoksičnosti između ćelijskih linija, pri čemu se u analizi uzima u obzir aritmetička sredina, standardna devijacija (SD) ili standardna greška srednje vrijednosti (SEM), kao i veličina uzorka analizirana protočnom citometrijom. Aktivnost P-gp, DHE i DHR, analizirani su metodom protočne citometrije na instrumentu CytoFLEX. Statistička obrada podataka ovih eksperimenata izvršena je primjenom Welchovog *t*-testa, primjenom strategije postavljanja graničnika na vijabilnim ćelijama, dok su grafički prikazi generisani u programu CytExpert. U protočnoj citometriji je poželjno da se postavi digitalna granica za isključivu selekciju živih ćelija za analizu, dok se mrtve ćelije, ostaci i dubleti isključuju iz analize podataka. Ovo osigurava da se analiziraju samo biološki relevantne ćelije sprječavajući lažne rezultate.²⁴⁸

In silico metode

Za jedinjenja **153** i **160**: Vrijednosti Wlog i TPSA su generisane korišćenjem SwissADME veb platforme.^{224,249} Proteinska struktura PDB ID 6QEX preuzeta je iz baze podataka RCSB^{250,251} i pripremljena za molekularno dokovanje koristeći alat Protein Preparation Wizard iz softverskog paketa Schrödinger Suite 2021-1.²⁵² Mali molekuli pripremljeni su korišćenjem programa Maestro iz paketa Schrödinger Suite 2021-1.²⁵³ Vezivno mjesto definisano je na osnovu prethodno objavljenih rezultata²⁵¹, a simulacije molekularnog dokovanja urađene su korišćenjem programa Glide iz paketa Schrödinger Suite 2021-1 koristeći režim povećane preciznosti (engl. *extra precision mode* (XP)).²⁵⁴ Vizuelizacija i grafički prikaz generisani su primjenom Discovery Studio 2021 Client.²⁵⁵

Za jedinjenje **217**: U daljem nastavku istraživanja, tri proteinske strukture humanog P-gp sa vezanim verapamilom, dobijene kriogenom elektronskom mikroskopijom (CryoEM)²⁵⁶ preuzete su iz RCSB baze podataka:²⁵⁰ struktura u zatvorenom okludovanom stanju (engl. *occluded closed state*, PDB ID 8SA0), konformacija orjentisana ka unutra 1 (engl. *inward-facing 1*, PDB ID 8SB7), konformacija orjentisana ka unutra 2 (engl. *inward-facing 2*, PDB 8SA1). Proteinske strukture pripremljene su korišćenjem alata Protein Preparation Wizard iz softverskog paketa Schrödinger Suite 2021-1.²⁵² Mali molekuli, Dex-Ver i **217** su pripremljeni korišćenjem programa Maestro iz istog softverskog paketa, Schrödinger Suite 2021-1.²⁵³ Vezivno mjesto je definisano na osnovu prethodno preuzete proteinske strukture sa vezanim verapamilom,²⁵⁶ a *docking* simulacije su ostvarene korišćenjem programa Glide iz paketa Schrödinger Suite 2021-1 koristeći režim povećane preciznosti (XP).²⁵⁴ Najbolje *docking* konformacije su optimizovane i korišćene za dalju analizu. Vizuelizacija i grafički prikaz generisani su primjenom Discovery Studio 2024 Client,²⁵⁵ kao i programa Maestro iz paketa Schrödinger Suite 2021-1.²⁵³

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije dizajnirani su i sintetisani novi hibridni molekuli zasnovani na artesunatu, semisintetskom derivatu artemizina, koji u svojoj strukturi sadrže i privilegovane heterociklične motive, uključujući pirimidin, piperazin i 1,2,3-triazol. U okviru istraživanja sintetisano je 39 derivata pirimidina i 37 hibridnih jedinjenja koji sadrže artesunat, čija je antitumorska aktivnost ispitana na senzitivnoj NCI-H460 i rezistentnoj NCI-H460/R ćelijskoj liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Pored toga, antitumorska aktivnost ukupno 40 odabranih jedinjenja određena je i na senzitivnoj U87 i rezistentnoj U87-TxR ćelijskoj liniji glioblastoma.

Hibridna jedinjenja artesunata i pirimidina sa piperazinskim linkerom (**150-160**) ispoljila su veću selektivnost prema tumorskim NSCLC ćelijama u poređenju sa odgovarajućim hibridima kod kojih su artesunat i pirimidin povezani etilendiaminskim linkerom (**144-149**), kao i u poređenju sa artesunatom, što ukazuje na značajan doprinos piperazinskog strukturnog fragmenta u poboljšanju antitumorske aktivnosti. Derivati sa piperazinskim motivom ispoljavaju poboljšanu antitumorsku aktivnost prema ćelijskoj liniji NCI-H460, u poređenju sa artesunatom. Od izuzetnog je značaja što su jedinjenja **152** i **160** aktivnija prema NCI-H460/R ćelijama u odnosu na artesunat. Jedinjenje **152** je pokazalo najveću selektivnost prema tumorskim ćelijama, sa indeksom selektivnosti većim od 7, dok je jedinjenje **160** ispoljilo najizraženiju antitumorsku aktivnost prema obe ispitivane NSCLC ćelijske linije čime je naglašen značaj fenil-grupe u položaju C-6 pirimidinskog prstena.

Potvrđeno je da gotovo sva jedinjenja povećavaju akumulaciju Rho123 u NCI-H460/R ćelijama, ukazujući na njihovu sposobnost inhibicije P-glikoproteina, pri čemu su pojedini hibridi (**147**, **151-153** i **155-159**) pokazali izraženiji inhibitorski efekat u odnosu na artesunat. Pokazano je da je dejstvo hibridnih jedinjenja **150-156** povezano sa aktivnošću P-glikoproteina, jer je u kombinaciji sa tarikvidarom došlo do reverzije rezistencije. Dodatno, hibridi **157-160** su povećali osjetljivost NCI-H460/R ćelija na DOX u kombinovanom tretmanu, potvrđujući njihov potencijal za prevazilaženje P-gp posredovane rezistencije.

Primjenom koncepta molekulske hibridizacije između artesunata i derivata pirimidina koji sadrže 1,2,3-triazolski fragment sintetisana je nova serija hibridnih jedinjenja koja pokazuju izraženu citotoksičnu aktivnost prema rezistentnoj ćelijskoj liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460/R. Sintaza prekursorskih pirimidinskih derivata zasnivala se na CuAAC reakciji, koja je predstavljala ključni korak u njihovom dobijanju. Poređenje aktivnosti hibrida **206-214** i njihovih piperazinskih analoga **197-205** pokazalo je da prisustvo piperazinskog fragmenta doprinosi većoj antitumorskoj aktivnosti prema obe ispitivane ćelijske linije NSCLC, dok odsustvo piperazina dovodi do gubitka citotoksičnosti, ali boljeg indeksa selektivnosti. Prisustvo fenil-grupe u C-6 položaju pirimidinskog jezgra značajno doprinosi antitumorskoj aktivnosti, zbog čega su jedinjenja **212-214** pokazala veću efikasnost prema rezistentnoj ćelijskoj liniji u poređenju sa jedinjenjima **206-208**, koja ne sadrže supstituent u ovom položaju.

Posebno su se izdvojila jedinjenja **213** i **217**, koja su ispoljila značajno veću citotoksičnost prema rezistentnoj ćelijskoj liniji NCI-H460/R u odnosu na odgovarajuću senzitivnu liniju NCI-H460. Uloga P-glikoproteina u postizanju kolateralne senzitivnosti je pokazana kombinovanjem jedinjenja **213** i **217** sa deksverapamilom i tarikvidarom koji različitim mehanizmima inhibiraju aktivnost P-gp. Deksverapamil je kao kompetitivni inhibitor P-gp smanjio citotoksičnost jedinjenja **213** i **217**, s tim da je došlo do povećanja inhibicije aktivnosti P-gp u odnosu na samostalne tretmane, dok je tarikvidar kao nekompetitivni inhibitor pojačao njihov citotoksični efekat bez sinergističkog efekta na inhibiciju aktivnosti P-gp. Dobijeni rezultati ukazuju da fenomen kolateralne senzitivnosti kod NCI-H460/R ćelija podliježe složenoj regulaciji, ali da je efekat jedinjenja **213** i **217** ipak zavisao od funkcionalnosti P-gp.

Na osnovu svih rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji može se zaključiti da su sintetisani derivati ispoljili značajnu antitumorsku aktivnost na ćelijskim linijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća, dok je njihova aktivnost na ćelijama glioblastoma bila slabije izražena.

Značaj molekulske hibridizacije i sinergijskog efekta farmakofora, potvrđen je činjenicom da su sva sintetisana hibridna jedinjenja pokazala veću antitumorsku aktivnost u odnosu na odgovarajuće prekursorske derivate pirimidina, ukazujući na značaj ovog koncepta za sintezu jedinjenja sa poboljšanom biološkom aktivnošću.

Posebno značajan doprinos ove disertacije predstavlja potvrda da strukturne modifikacije uvedene molekulskom hibridizacijom mogu dovesti do inhibicije aktivnosti P-glikoproteina i prevazilaženja MDR fenotipa, čime se povećava osjetljivost rezistentnih tumorskih ćelija i naglašava značaj ovog pristupa u razvoju novih antitumorskih agenasa usmjerenih ka prevazilaženju rezistencije na lijekove.

6. LITERATURA

1. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 Pristupljeno 20. maja 2026. godine.
2. Guan, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, 5 (5), 402–418. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.005>
3. Brown, J. S.; Amend, S. R.; Austin, R. H.; Gatenby, R. A.; Hammarlund, E. U.; Pienta, K. J. Updating the definition of cancer. *Mol. Cancer Res.* **2023**, 21 (11), 1142–1147. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>
4. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2024**, 74 (3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
5. Ganesh, K.; Massagué, J. Targeting metastatic cancer. *Nat. Med.* **2021**, 27, 34–44. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01195-4>
6. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, 100 (1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
7. Hanahan, D. Hallmarks of cancer-Then and now, and beyond. *Cell* **2026**, 189 (8), 2254–2277. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2025.12.049>
8. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, 144 (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
9. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, 12 (1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
10. Debela, D. T.; Muzazu, S. G.; Heraro, K. D.; Ndalama, M. T.; Mesele, B. W.; Haile, D. C.; Kitui, S. K.; Manyazewal, T. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* **2021**, 9, 20503121211034366. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
11. Engle, K.; Kumar, G. Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB₁ inhibition: A recent update. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 239, 114542. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114542>
12. Baudino, T. A. Targeted cancer therapy: The next generation of cancer treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2015**, 12 (1), 3–20. <http://dx.doi.org/10.2174/1570163812666150602144310>
13. Nussbaumer, S.; Bonnabry, P.; Veuthey, J.-L.; Fleury-Souverain, S. Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta* **2011**, 85 (5), 2265–2289. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.034>
14. Bukowski, K.; Kciuk, M.; Kontek, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21 (9), 3233. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>
15. Huang, C.-Y.; Ju, D.-T.; Chang, C.-F.; Reddy, P. M.; Velmurugan, B. K. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *Biomedicine (Taipei)* **2017**, 7 (4), 23. <https://doi.org/10.1051/bmdcn/2017070423>
16. Sonkin, D.; Thomas, A.; Teicher, B. A. Cancer treatments: Past, present, and future. *Cancer Genet.* **2024**, 286–287, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2024.06.002>
17. Lei, X.; Lei, Y.; Li, J.-K.; Du, W.-X.; Li, R.-G.; Yang, J.; Li, J.; Li, F.; Tan, H.-B. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Lett.* **2020**, 470, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.009>
18. Disis, M. L. Mechanism of action of immunotherapy. *Semin. Oncol.* **2014**, 41, S3–S13. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.09.004>

19. Kratzer, T. B.; Bandi, P.; Freedman, N. D.; Smith, R. A.; Travis, W. D.; Jemal, A.; Siegel, R. L. Lung cancer statistics, 2023. *Cancer* **2024**, *130* (8), 1330–1348. <https://doi.org/10.1002/cncr.35128>
20. Gridelli, C.; Rossi, A.; Carbone, D. P.; Guarize, J.; Karachaliou, N.; Mok, T.; Petrella, F.; Spaggiari, L.; Rosell, R. Non-small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2015**, *1*, 15009. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.9>
21. <https://www.iarc.who.int/cancer-type/lung-cancer/> Pristupljeno 20. maja 2026. godine.
22. Zhang, Y.; Vaccarella, S.; Morgan, E.; Li, M.; Etcheberry, J.; Chokunonga, E.; Manraj, S. S.; Kamate, B.; Omonisi, A.; Bray, F. Global variations in lung cancer incidence by histological subtype in 2020: a population-based study. *Lancet Oncol.* **2023**, *24* (11), 1206–1218. [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(23\)00444-8/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(23)00444-8/abstract)
23. <https://www.batut.org.rs/index.php?content=2096> Pristupljeno 20. maja 2026. godine.
24. Oser, M. G.; Niederst, M. J.; Sequist, L. V.; Engelman, J. A. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol.* **2015**, *16* (4), e165–e172. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(14\)71180-5](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(14)71180-5)
25. Zappa, C.; Mousa, S. A. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl. Lung Cancer Res.* **2016**, *5* (3), 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>
26. Ettinger, D. S.; Akerley, W.; Bepler, G.; Blum, M. G.; Chang, A.; Cheney, R. T.; Chirieac, L. R.; D'Amico, T. A.; Demmy, T. L.; Ganti, A. K. P.; Govindan, R.; Grannis, F. W., Jr.; Jahan, T.; Jahanzeb, M.; Johnson, D. H.; Kessinger, A.; Komaki, R.; Kong, F.-M.; Kris, M. G.; Krug, L. M.; Le, Q.-T.; Lennes, I. T.; Martins, R.; O'Malley, J.; Osarogiagbon, R. U.; Otterson, G. A.; Patel, J. D.; Pisters, K. M.; Reckamp, K.; Riely, G. J.; Rohren, E.; Simon, G. R.; Swanson, S. J.; Wood, D. E.; Yang, S. C. Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2010**, *8* (7), 740–801. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2010.0056>
27. Dela Cruz, C. S.; Tanoue, L. T.; Matthay, R. A. Lung cancer: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clin. Chest Med.* **2011**, *32* (4), 605–644. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001>
28. Berg, C. D.; Schiller, J. H.; Boffetta, P.; Cai, J.; Connolly, C.; Kerpel-Fronius, A.; Borondy Kitts, A.; Lam, D. C. L.; Mohan, A.; Myers, R.; Suri, T.; Tammemagi, M. C.; Yang, D.; Lam, S. Air pollution and lung cancer: A review by international association for the study of lung cancer early detection and screening committee. *J. Thorac. Oncol.* **2023**, *18* (10), 1277–1289. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2023.05.024>
29. Guo, Q.; Liu, L.; Chen, Z.; Fan, Y.; Zhou, Y.; Yuan, Z.; Zhang, W. Current treatments for non-small cell lung cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 945102. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.945102>
30. Alexander, M.; Kim, S. Y.; Cheng, H. Update 2020: Management of non-small cell lung cancer. *Lung* **2020**, *198*, 897–907. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00407-5>
31. <https://radiologyassistant.nl/chest/lung-cancer/tnm-classification-8th-edition-1> Pristupljeno 20. maja 2026. godine.
32. Zarogoulidis, K.; Zarogoulidis, P.; Darwiche, K.; Boutsikou, E.; Machairiotis, N.; Tsakiridis, K.; Katsikogiannis, N.; Kougioumtzi, I.; Karapantzos, I.; Huang, H.; Spyrtatos, D. Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Thorac. Dis.* **2013**, *5* (Suppl. 4), S389–S396. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.07.10>
33. Mithoowani, H.; Febbraro, M. Non-small-cell lung cancer in 2022: A review for general practitioners in oncology. *Curr. Oncol.* **2022**, *29* (3), 1828–1839. <https://doi.org/10.3390/curroncol29030150>

34. Reck, M.; Heigener, D. F.; Mok, T.; Soria, J.-C.; Rabe, K. F. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. *Lancet* **2013**, 382 (9893), 709–719. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61502-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61502-0)
35. Araghi, M.; Mannani, R.; Heidarnejad Maleki, A.; Hamidi, A.; Rostami, S.; Safa, S. H.; Faramarzi, F.; Khorasani, S.; Alimohammadi, M.; Tahmasebi, S.; Akhavan-Sigari, R. Recent advances in non-small cell lung cancer targeted therapy; an update review. *Cancer Cell Int.* **2023**, 23, 162. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02990-y>
36. Schrank, Z.; Chhabra, G.; Lin, L.; Iderzorig, T.; Osude, C.; Khan, N.; Kuckovic, A.; Singh, S.; Miller, R. J.; Puri, N. Current molecular-targeted therapies in NSCLC and their mechanism of resistance. *Cancers (Basel)* **2018**, 10 (7), 224. <https://doi.org/10.3390/cancers10070224>
37. Huang, Q.; Li, Y.; Huang, Y.; Wu, J.; Bao, W.; Xue, C.; Li, X.; Dong, S.; Dong, Z.; Hu, S. Advances in molecular pathology and therapy of non-small cell lung cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2025**, 10 (1), 186. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02243-6>
38. Rotow, J.; Bivona, T. G. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, 17 (11), 637–658. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.84>
39. Osmani, L.; Askin, F.; Gabrielson, E.; Li, Q. K. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, 52 (Pt. 1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.11.019>
40. Massafra, M.; Passalacqua, M. I.; Gebbia, V.; Macrì, P.; Lazzari, C.; Gregorc, V.; Buda, C.; Altavilla, G.; Santarpia, M. Immunotherapeutic advances for NSCLC. *Biologics: Targets and Therapy* **2021**, 15, 399–417. <https://doi.org/10.2147/BTT.S295406>
41. Xiang, Y.; Liu, X.; Wang, Y.; Zheng, D.; Meng, Q.; Jiang, L.; Yang, S.; Zhang, S.; Zhang, X.; Liu, Y.; Wang, B. Mechanisms of resistance to targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: promising strategies to overcoming challenges. *Front. Immunol.* **2024**, 15, 1366260. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1366260>
42. Kabut, J.; Stępień, G. J.; Furgoń, T.; Miciak, M.; Nafalska, N.; Stopyra, M.; Jezierzański, M.; Feret, K.; Gisterek-Grocholska, I. mRNA vaccines in modern immunotherapy for non-small cell lung cancer (NSCLC)-A comprehensive literature review with focus on current clinical trials. *Biomedicines* **2025**, 13, 2187. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13092187>
43. Lima, F. R. S.; Kahn, S. A.; Soletti, R. C.; Biasoli, D.; Alves, T.; da Fonseca, A. C. C.; Garcia, C.; Romão, L.; Brito, J.; Holanda-Afonso, R.; Faria, J.; Borges, H.; Moura-Neto, V. Glioblastoma: therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1826 (2), 338–349. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.05.004>
44. Szklener, K.; Mazurek, M.; Wieteska, M.; Wacławska, M.; Bilski, M.; Mańdziuk, S. New directions in the therapy of glioblastoma. *Cancers* **2022**, 14 (21), 5377. <https://doi.org/10.3390/cancers14215377>
45. Ohgaki, H.; Dessen, P.; Jourde, B.; Horstmann, S.; Nishikawa, T.; Di Patre, P.-L.; Burkhard, C.; Schüller, D.; Probst-Hensch, N. M.; Maiorka, P. C.; Baeza, N.; Pisani, P.; Yonekawa, Y.; Yasargil, M. G.; Lütolf, U. M.; Kleihues, P. Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study. *Cancer Res.* **2004**, 64 (19), 6892–6899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1337>
46. Obrador, E.; Moreno-Murciano, P.; Oriol-Caballo, M.; López-Blanch, R.; Pineda, B.; Gutiérrez-Arroyo, J. L.; Loras, A.; Gonzalez-Bonet, L. G.; Martinez-Cadenas, C.; Estrela, J. M.; Marqués-Torrejón, M. Á. Glioblastoma therapy: past, present and future. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25 (5), 2529. <https://doi.org/10.3390/ijms25052529>

47. Louis, D. N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D. J.; Cree, I. A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H. K.; Pfister, S. M.; Reifenberger, G.; Soffietti, R.; von Deimling, A.; Ellison, D. W. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-Oncology* **2021**, *23* (8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
48. Shergalis, A.; Bankhead, A., III; Luesakul, U.; Muangsins, N.; Neamati, N. Current challenges and opportunities in treating glioblastomas. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70* (3), 412–445. [https://pharmrev.aspetjournals.org/article/S0031-6997\(24\)01261-4/fulltext](https://pharmrev.aspetjournals.org/article/S0031-6997(24)01261-4/fulltext)
49. Preusser, M.; de Ribaupierre, S.; Wöhrer, A.; Erridge, S. C.; Hegi, M.; Weller, M.; Stupp, R. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann. Neurol.* **2011**, *70* (1), 9–21. <https://doi.org/10.1002/ana.22425>
50. Rong, L.; Li, N.; Zhang, Z. Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 142. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02349-7>
51. Thakur, A.; Faujdar, C.; Sharma, R.; Sharma, S.; Malik, B.; Nepali, K.; Liou, J. P. Glioblastoma: Current status, emerging targets, and recent advances. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (13), 8596–8685. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01946>
52. Lim, M.; Xia, Y.; Bettegowda, C.; Weller, M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 422–442. <https://www.nature.com/articles/s41571-018-0003-5>
53. Nam, J. Y.; De Groot, J. F. Treatment of glioblastoma. *J. Oncol. Pract.* **2017**, *13* (10), 629–638. <https://doi.org/10.1200/JOP.2017.025536>
54. Davis, M. E. Glioblastoma: Overview of disease and treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* **2016**, *20* (Suppl. 5), S2–S8. <https://doi.org/10.1188/16.cjon.s1.2-8>
55. Jain, K. K. A critical overview of targeted therapies for glioblastoma. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 419. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00419>
56. Zou, J.-Y.; Chen, Q.-L.; Luo, X.-C.; Damdinjav, D.; Abdelmohsen, U. R.; Li, H.-Y.; Battulga, T.; Chen, H.-B.; Wang, Y.-Q.; Zhang, J.-Y. Natural products reverse cancer multidrug resistance. *Front. Pharmacol.* **2024**, *15*, 1348076. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1348076>
57. Guo, Y.; Ashrafizadeh, M.; Tambuwala, M. M.; Ren, J.; Orive, G.; Yu, G. P-glycoprotein (P-gp)-driven cancer drug resistance: biological profile, non-coding RNAs, drugs and nanomodulators. *Drug Discov. Today* **2024**, *29* (11), 104161. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.104161>
58. Garcia-Mayea, Y.; Mir, C.; Masson, F.; Paciucci, R.; LLeonart, M. E. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *60*, 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.022>
59. Vaidya, F. U.; Chhipa, A. S.; Mishra, V.; Gupta, V. K.; Rawat, S. G.; Kumar, A.; Pathak, C. Molecular and cellular paradigms of multidrug resistance in cancer. *Cancer Rep.* **2022**, *5* (12), e1291. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1291>
60. Mirzaei, S.; Gholami, M. H.; Hashemi, F.; Zabolian, A.; Vasheghani Farahani, M.; Hushmandi, K.; Zarrabi, A.; Goldman, A.; Ashrafizadeh, M.; Orive, G. Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. *Drug Discov. Today* **2022**, *27* (2), 436–455. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.020>
61. Zhang, H.; Xu, H.; Ashby, C. R., Jr.; Assaraf, Y. G.; Chen, Z.-S.; Liu, H.-M. Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp). *Med. Res. Rev.* **2021**, *41* (1), 525–555. <https://doi.org/10.1002/med.21739>

62. Waghray, D.; Zhan, Q. Inhibit or evade multidrug resistance P-glycoprotein in cancer treatment. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (12), 5108–5121. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01457>
63. Sharom, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **2008**, *9* (1), 105–127. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.1.105>
64. Heming, C. P.; Muriithi, W.; Macharia, L. W.; Niemeyer Filho, P.; Moura-Neto, V.; Aran, V. P-glycoprotein and cancer: what do we currently know? *Heliyon* **2022**, *8* (10), e11171. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11171>
65. Varma, M. V. S.; Ashokraj, Y.; Dey, C. S.; Panchagnula, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.* **2003**, *48* (4), 347–359. [https://doi.org/10.1016/s1043-6618\(03\)00158-0](https://doi.org/10.1016/s1043-6618(03)00158-0)
66. Robey, R. W.; Pluchino, K. M.; Hall, M. D.; Fojo, A. T.; Bates, S. E.; Gottesman, M. M. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18* (7), 452–464. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>
67. Juvala, I. I. A.; Abdul Hamid, A. A.; Abd Halim, K. B.; Che Has, A. T. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon* **2022**, *8* (6), e09777. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09777>
68. Kathawala, R. J.; Gupta, P.; Ashby, C. R., Jr.; Chen, Z.-S. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist. Updat.* **2015**, *18*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.11.002>
69. Dewanjee, S.; Dua, T. K.; Bhattacharjee, N.; Das, A.; Gangopadhyay, M.; Khanra, R.; Joardar, S.; Riaz, M.; De Feo, V.; Zia-Ul-Haq, M. Natural products as alternative choices for P-glycoprotein (P-gp) inhibition. *Molecules* **2017**, *22* (6), 871. <https://doi.org/10.3390/molecules22060871>
70. Amin, M. L. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Target Insights* **2013**, *7*, 27–34. <https://doi.org/10.4137/dti.s12519>
71. Ma, X.; Hu, M.; Wang, H.; Li, J. Discovery of traditional Chinese medicine monomers and their synthetic intermediates, analogs or derivatives for battling P-gp-mediated multi-drug resistance. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.061>
72. Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012–3043 <https://doi.org/10.1021/cr900019j>
73. Dias, D. A.; Urban, S.; Roessner, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2012**, *2*, 303–336 <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>
74. Yñíguez-Gutierrez, A. E.; Bachmann, B. O. Fixing the unfixable: The art of optimizing natural products for human medicine. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8412–8428. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00246>
75. Guo, Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharm. Sin. B* **2017**, *7*, 119–136. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.003>
76. Huang, B.; Zhang, Y. Teaching an old dog new tricks: Drug discovery by repositioning natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today* **2022**, *27*, 1936–1944. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.007>
77. Naeem, A.; Hu, P.; Yang, M.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhu, W.; Zheng, Q. Natural products as anticancer agents: Current status and future perspectives. *Molecules* **2022**, *27*, 8367 <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>

78. Wang, S.; Dong, G.; Sheng, C. Structural simplification of natural products. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 4180–4220. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00504>
79. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661 <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
80. Atanasov, A. G.; Zotchev, S. B.; Dirsch, V. M.; International Natural Product Sciences Taskforce; Supuran, C. T. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 200216. <https://www.nature.com/articles/s41573-020-00114-z>
81. Karagöz, A. Ç.; Reiter, C.; Seo, E.-J.; Gruber, L.; Hahn, F.; Leidenberger, M.; Klein, V.; Hampel, F.; Friedrich, O.; Marschall, M.; Kappes, B.; Efferth, T.; Tsogoeva, S. B. Access to new highly potent antileukemia, antiviral and antimalarial agents via hybridization of natural products (homo)egonol, thymoquinone and artemisinin. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 3610–3618. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.05.041>
82. Majhi, S.; Das, D. Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects- A decade update. *Tetrahedron* **2021**, *78*, 131801 <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131801>
83. Hong, B.; Luo, T.; Lei, X. Late-stage diversification of natural products. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 622–635. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00916>
84. Fröhlich, T.; Ndreshkjana, B.; Muenzner, J. K.; Reiter, C.; Hofmeister, E.; Mederer, S.; Fatfat, M.; El-Baba, C.; Gali-Muhtasib, H.; Schneider-Stock, R.; Tsogoeva, S. B. Synthesis of novel hybrids of thymoquinone and artemisinin with high activity and selectivity against colon cancer. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 226–234. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600594>
85. Tsogoeva, S. B. Recent progress in the development of synthetic hybrids of natural or unnatural bioactive compounds for medicinal chemistry. *Mini Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*, 773–793. <https://doi.org/10.2174/138955710791608280>
86. Marchesi, E.; Perrone, D.; Navacchia, M. L. Molecular hybridization as a strategy for developing artemisinin-derived anticancer candidates. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (9), 2185. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092185>
87. Fu, R.-G.; Sun, Y.; Sheng, W.-B.; Liao, D.-F. Designing multi-targeted agents: An emerging anticancer drug discovery paradigm. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *136*, 195–211. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.016>
88. Hamid, A.; Qureshi, N. A.; Rehman, A.; Azam, J.; Nadeem, H.; Ulhaq, I.; Farzand, S.; Saleem, A.; Irshad, N.; Antiplasmodial effect of benzimidazole-pyrazole derivative against *Plasmodium berghei* infection in mice model. *Bioorg. Chem.* **2025**, *163*, 108634. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2025.108634>
89. Tuteja, R. Malaria - an overview. *FEBS J.* **2007**, *274* (18), 4670–4679. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x>
90. Cowman, A. F.; Healer, J.; Marapana, D.; Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **2016**, *167* (3), 610–624. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
91. Talapko, J.; Škrlec, I.; Alebić, T.; Jukić, M.; Včev, A. Malaria: The past and the present. *Microorganisms* **2019**, *7* (6), 179. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7060179>
92. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> Pristupljeno 20. maja 2026. godine.
93. Scarim, C. B.; Jornada, D. H.; Machado, M. G. M.; Ferreira, C. M. R.; dos Santos, J. L.; Chung, M. C. Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas

- disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *162*, 378–395. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.013>
94. Ma, N.; Zhang, Z.; Liao, F.; Jiang, T.; Tu, Y. The birth of artemisinin. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *216*, 107658. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107658>
95. Miller, L. H.; Su, X. Artemisinin: Discovery from the chinese herbal garden. *Cell* **2011**, *146* (6), 855–858. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.024>
96. Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1217–1220. <https://www.nature.com/articles/nm.2471>
97. Tu, Y. Artemisinin-A gift from traditional chinese medicine to the world (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (35), 10210–10226. <https://doi.org/10.1002/anie.201601967>
98. Vajs, V.; Jokić, A.; Milosavljević, S. Artemisinin story from the Balkans. *Nat. Prod. Commun.* **2017**, *12* (8), 1157–1160 <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200802>
99. Đorđević, I.; Vajs, V.; Milosavljević, S. Priča o artemizininu, Hemijski pregled, **2023**, *64* <https://hp.shd.org.rs/broj-casopisa/2023-2/>
100. Fröhlich, T.; Hahn, F.; Belmudes, L.; Leidenberger, M.; Friedrich, O.; Kappes, B.; Couto, Y.; Marschall, M.; Tsogoeva, S. B. Synthesis of artemisinin-derived dimers, trimers and dendrimers: Investigation of their antimalarial and antiviral activities including putative mechanisms of action. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 8103–8113. <https://doi.org/10.1002/chem.201800729>
101. Jana, S.; Iram, S.; Thomas, J.; Liekens, S.; Dehaen, W. Synthesis and anticancer activity of novel aza-artemisinin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3671–3676. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.04.041>
102. Chaturvedi, D.; Goswami, A.; Saikia, P. P.; Barua, N. C.; Rao, P. G. Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 435–454. <https://doi.org/10.1039/B816679J>
103. Efferth, T.; Dunstan, H.; Sauerbrey, A.; Miyachi, H.; Chitambar, C. R. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int. J. Oncol.* **2001**, *18*, 767–773. <https://doi.org/10.3892/ijo.18.4.767>
104. Woerdenbag, H. J.; Moskal, T. A.; Pras, N.; Malingré, T. M.; El-Feraly, F. S.; Kampinga, H. H.; Konings, A. W. T. Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to ehrlich ascites tumor cells. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 849–856. <https://doi.org/10.1021/np50096a007>
105. Efferth, T.; Sauerbrey, A.; Olbrich, A.; Gebhart, E.; Rauch, P.; Weber, H. O.; Hengstler, J. G.; Halatsch, M.-E.; Volm, M.; Tew, K. D.; Ross, D. D.; Funk, J. O. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64* (2), 382–394. <https://doi.org/10.1124/mol.64.2.382>
106. Crespo-Ortiz, M. P.; Wei, M. Q. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 247597. <https://doi.org/10.1155/2012/247597>
107. O'Neill, P. M.; Posner, G. H. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945–2964. <https://doi.org/10.1021/jm030571c>
108. Dai, Y.-F.; Zhou, W.-W.; Meng, J.; Du, X.-L.; Sui, Y.-P.; Dai, L.; Wang, P.-Q.; Huo, H.-R.; Sui, F. The pharmacological activities and mechanisms of artemisinin and its derivatives: a systematic review. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 867–880. https://doi.org/10.1007/s00044-016-1778-5?urlappend=%3Futm_source%3Dresearchgate.net%26utm_medium%3Darticle

109. Lyu, H.-N.; Ma, N.; Meng, Y.; Zhang, X.; Wong, Y.-K.; Xu, C.; Liao, F.; Jiang, T.; Tu, Y.; Wang, J. Study towards improving artemisinin-based combination therapies. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, *38*, 1243–1250. <https://doi.org/10.1039/D0NP00079E>
110. Wong, Y.-K.; Xu, C.; Kalesh, K. A.; He, Y.; Lin, Q.; Wong, W. S. F.; Shen, H.-M.; Wang, J. Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action. *Med. Res. Rev.* **2017**, *37*, 1492–1517. 10.1002/med.21446
111. Slezakova, S.; Ruda-Kucerova, J. Anticancer activity of artemisinin and its derivatives. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 5995–6003. 10.21873/anticancer.12046
112. Wu, G.; Zhao, T.; Kang, D.; Zhang, J.; Song, Y.; Namasivayam, V.; Kongsted, J.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Poongavanam, V.; Liu, X.; Zhan, P. Overview of recent strategic advances in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (21), 9375–9414. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00359>
113. Ma, Z.; Woon, C. Y.-N.; Liu, C.-G.; Cheng, J.-T.; You, M.; Sethi, G.; Wong, A. L.-A.; Ho, P. C.-L.; Zhang, D.; Ong, P.; Wang, L.; Goh, B.-C. Repurposing artemisinin and its derivatives as anticancer drugs: A chance or challenge? *Front. Pharmacol.* **2022**, *12*, 828856. 10.3389/fphar.2021.828856
114. Efferth, T. Cancer combination therapies with artemisinin-type drugs. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *139*, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.019>
115. Zhang, Z.-Y.; Yu, S.-Q.; Miao, L.-Y.; Huang, X.-Y.; Zhang, X.-P.; Zhu, Y.-P.; Xia, X.-H.; Li, D.-Q. Artesunate combined with vinorelbine plus cisplatin in treatment of advanced non-small cell lung cancer: a randomized controlled trial. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* **2008**, *6* (2), 134–138. 10.3736/jcim20080206
116. Fröhlich, T.; Reiter, C.; Saeed, M. E. M.; Hutterer, C.; Hahn, F.; Leidenberger, M.; Friedrich, O.; Kappes, B.; Marschall, M.; Efferth, T.; Tsogoeva, S. B. Synthesis of thymoquinone-artemisinin hybrids: New potent antileukemia, antiviral, and antimalarial agents. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9* (6), 534–539. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00412>
117. Gao, F.; Sun, Z.; Kong, F.; Xiao, J. Artemisinin-derived hybrids and their anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *188*, 112044. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112044>
118. Wang, Y.; Li, Y.; Shang, D.; Efferth, T. Interactions between artemisinin derivatives and P-glycoprotein. *Phytomedicine* **2019**, *60*, 152998. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152998>
119. Zhang, L.; Chen, F.; Zhang, Z.; Chen, Y.; Wang, J. Synthesis and biological evaluation of a novel artesunate podophyllotoxin conjugate as anticancer agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.042>
120. Reiter, C.; Çapcı Karagöz, A.; Fröhlich, T.; Klein, V.; Zeino, M.; Viertel, K.; Held, J.; Mordmüller, B.; Emirdağ Öztürk, S.; Anıl, H.; Efferth, T.; Tsogoeva, S. B. Synthesis and study of cytotoxic activity of 1,2,4-trioxane- and egonol-derived hybrid molecules against *Plasmodium falciparum* and multidrug-resistant human leukemia cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.043>
121. Zhong, H.; Zhao, X.; Zuo, Z.; Sun, J.; Yao, Y.; Wang, T.; Liu, D.; Zhao, L. Combating P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with 10-*O*-phenyl dihydroartemisinin ethers in MCF-7 cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *108*, 720–729. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.040>
122. Yang, X.; Zheng, Y.; Liu, L.; Huang, J.; Wang, F.; Zhang, J. Progress on the study of the anticancer effects of artesunate. *Oncol. Lett.* **2021**, *22* (5), 750. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13011>

123. Shi, M.; Ma, G.; Yang, X. Artesunate: A review of its potential therapeutic effects and mechanisms in digestive diseases. *Pharmaceutics* **2025**, *17* (3), 299. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17030299>
124. Fan, X.; Yan, Y.; Li, Y.; Song, Y.; Li, B. Anti-tumor mechanism of artesunate. *Front. Pharmacol.* **2024**, *15*, 1483049. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1483049>
125. Ruwizhi, N.; Maseko, R. B.; Aderibigbe, B. A. Recent advances in the therapeutic efficacy of artesunate. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (3), 504. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030504>
126. Zippilli, C.; Filippi, S.; Cesarini, S.; Bizzarri, B. M.; Conigliaro, P.; De Marchi, E.; Botta, L.; Saladino, R. Synthesis of artesunic acid-coumarin hybrids as potential antimelanoma agents. *ACS Med. Chem. Lett.* **2023**, *14* (5), 599–605. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.3c00019>
127. Wang, L.; Świtalska, M.; Wang, N.; Du, Z.-J.; Fukumoto, Y.; Diep, N. K.; Kiguchi, R.; Nokami, J.; Wietrzyk, J.; Inokuchi, T. Design, synthesis, and biological evaluation of artemisinin-indoloquinoline hybrids as potent antiproliferative agents. *Molecules* **2014**, *19* (11), 19021–19035. <https://doi.org/10.3390/molecules191119021>
128. Fröhlich, T.; Reiter, C.; Ibrahim, M. M.; Beutel, J.; Hutterer, C.; Zeitträger, I.; Bahsi, H.; Leidenberger, M.; Friedrich, O.; Kappes, B.; Efferth, T.; Marschall, M.; Tsogoeva, S. B. Synthesis of novel hybrids of quinazoline and artemisinin with high activities against *Plasmodium falciparum*, human cytomegalovirus, and leukemia Cells. *ACS Omega* **2017**, *2* (6), 2422–2431. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00310>
129. Herrmann, L.; Yaremenko, I. A.; Çapcı, A.; Struwe, J.; Tailor, D.; Dheeraj, A.; Hodek, J.; Belyakova, Y. Y.; Radulov, P. S.; Weber, J.; Malhotra, S. V.; Terent'ev, A. O.; Ackermann, L.; Tsogoeva, S. B. Synthesis and in vitro study of artemisinin/synthetic peroxide-based hybrid compounds against SARS-CoV-2 and cancer. *ChemMedChem* **2022**, *17*, e202200005. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200005>
130. Kumar, A.; Singh, A. K.; Singh, H.; Vijayan, V.; Kumar, D.; Naik, J.; Thareja, S.; Yadav, J. P.; Pathak, P.; Grishina, M.; Verma, A.; Khalilullah, H.; Jaremko, M.; Emwas, A.-H.; Kumar, P. Nitrogen containing heterocycles as anticancer agents: A medicinal chemistry perspective. *Pharmaceutics* **2023**, *16* (2), 299. <https://doi.org/10.3390/ph16020299>
131. Jampilek, J. Heterocycles in medicinal chemistry. *Molecules* **2019**, *24* (21), 3839. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24213839>
132. Taylor, A. P.; Robinson, R. P.; Fobian, Y. M.; Blakemore, D. C.; Jones, L. H.; Fadeyi, O. Modern advances in heterocyclic chemistry in drug discovery. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6611–6637. <https://doi.org/10.1039/C6OB00936K>
133. Heravi, M. M.; Zadsirjana, V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 44247–44311. <https://doi.org/10.1039/D0RA09198G>
134. Kerru, N.; Gummidi, L.; Maddila, S.; Gangu, K. K.; Jonnalagadda, S. B. A review on recent advances in nitrogen-containing molecules and their biological applications. *Molecules* **2020**, *25* (8), 1909. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25081909>
135. Marshall, C. M.; Federice, J. G.; Bell, C. N.; Cox, P. B.; Njardarson, J. T. An update on the nitrogen heterocycle compositions and properties of U.S. FDA-approved pharmaceuticals (2013–2023). *J. Med. Chem.* **2024**, *67* (14), 11622–11655. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c01122>
136. Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA-approved pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257–10274. <https://doi.org/10.1021/jm501100b>

137. Nadar, S.; Khan, T.; Pyrimidine: An elite heterocyclic leitmotif in drug discovery-synthesis and biological activity. *Chem Biol Drug* **2022**, *100*, 818–842. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14001>
138. Manna, T.; Maji, S.; Maity, M.; Debnath, B.; Panda, S.; Khan, S. A.; Nath, R.; Akhtar, M. J. Anticancer potential and structure activity studies of purine and pyrimidine derivatives: an updated review. *Mol. Divers.* **2025**, *29*, 817–848. <https://doi.org/10.1007/s11030-024-10870-4>
139. Mahapatra, A.; Prasad, T.; Sharma, T. Pyrimidine: a review on anticancer activity with key emphasis on SAR. *Future J. Pharm. Sci.* **2021**, *7*, 123. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00274-8>
140. Quadri, T. W.; Akpan, E. D.; Elugoke, S. E.; Dagdag, O.; Nnaji, N. J.; Verma, C.; Olasunkanmi, L. O.; AlFantazi, A.; Anadebe, V. C.; Barik, R. C.; Ebenso, E. E.; A critical review of coordination chemistry of pyrimidine and pyridazine compounds: Bonding, chelation and corrosion inhibition. *Coord. Chem. Rev.* **2025**, *523*, 216285. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2024.216285>
141. Sorhie, V.; Lotha, T. N.; Mal, S.; Das, S.; Jamir, L.; Bharali, P. A critical review on the sustainable synthesis of pyrimidine-based heterocycles and their biological activities. *Tetrahedron* **2025**, *179*, 134626. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2025.134626>
142. Sharma, S.; Babu, M. A.; Kumar, R.; Singh, T. G.; Dwivedi, A. R.; Ahmad, G.; Goel, K. K.; Kumar, B. A review on pyrimidine-based pharmacophore as a template for the development of hybrid drugs with anticancer potential. *Mol. Divers.* **2025**, *29*, 5283–5305. <https://doi.org/10.1007/s11030-025-11112-x>
143. Swati, Shaveta, Shalini, Sharma, S.; Kumar, R.; Kumar, K.; Kumar, V.; Advances in the synthesis and anticancer activities of pyrimidine based scaffolds. *Eur. J. Med. Chem.* **2026**, *302*, 118319. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.118319>
144. Sharma, V.; Chitranshi, N.; Agarwal, A. K. Significance and biological importance of pyrimidine in the microbial world. *Int. J. Med. Chem.* **2014**, *2014*, 202784. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/202784>
145. Nammalwar, B.; Bunce, R. A. Recent advances in pyrimidine-based drugs. *Pharmaceuticals* **2024**, *17* (1), 104. <https://doi.org/10.3390/ph17010104>
146. Ahmed, K.; Choudhary, M. I.; Saleem, R. S. Z. Heterocyclic pyrimidine derivatives as promising antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *259*, 115701. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115701>
147. Venturini Filho, E.; Pinheiro, E. M. C.; Pinheiro, S.; Greco, S. J. Aminopyrimidines: Recent synthetic procedures and anticancer activities. *Tetrahedron* **2021**, *92*, 132256. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2021.132256>
148. Toviwek, B.; Suphakun, P.; Choowongkamon, K.; Hannongbua, S.; Gleeson, M. P. Synthesis and evaluation of the NSCLC anti-cancer activity and physical properties of 4-aryl-*N*-phenylpyrimidin-2-amines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (20), 4749–4754. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.063>
149. He, Z.-X.; Zhao, T.-Q.; Gong, Y.-P.; Zhang, X.; Ma, L.-Y.; Liu, H.-M. Pyrimidine: A promising scaffold for optimization to develop the inhibitors of ABC transporters. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *200*, 112458. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112458>
150. Qiu, Q.; Zou, F.; Li, H.; Shi, W.; Zhou, D.; Zhang, P.; Li, T.; Yin, Z.; Cai, Z.; Jiang, Y.; Huang, W.; Qian, H. Structure-based discovery of pyrimidine aminobenzene derivatives as potent oral reversal agents against P-gp- and BCRP-mediated multidrug resistance. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (9), 6179–6197. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00246>

151. Wang, B.; Zhao, B.; Chen, Z.-S.; Pang, L.-P.; Zhao, Y.-D.; Guo, Q.; Zhang, X.-H.; Liu, Y.; Liu, G.-Y.; Zhang, H.; Zhang, X.-Y.; Ma, L.-Y.; Liu, H.-M. Exploration of 1,2,3-triazole-pyrimidine hybrids as potent reversal agents against ABCB1-mediated multidrug resistance. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1535–1542. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.041>
152. Wang, B.; Ma, L.-Y.; Wang, J.-Q.; Lei, Z.-N.; Gupta, P.; Zhao, Y.-D.; Li, Z.-H.; Liu, Y.; Zhang, X.-H.; Li, Y.-N.; Zhao, B.; Chen, Z.-S.; Liu, H.-M. Discovery of 5-cyano-6-phenylpyrimidin derivatives containing an acylurea moiety as orally bioavailable reversal agents against P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (14), 5988–6001. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00335>
153. Rizwan, M.; Noreen, S.; Asim, S.; Liaqat, Z.; Shaheen, M.; Ibrahim, H. A comprehensive review on the synthesis of substituted piperazine and its novel bio-medicinal applications. *Chem. Inorg. Mater.* **2024**, *2*, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.cinorg.2024.100041>
154. Ten, A.; Koizhaiganova, R.; Bissenbay, D.; Tursynova, B.; Zhaxibayeva, Z.; Yu, V. Piperazine derivatives: A privileged scaffold in modern synthesis and medicinal chemistry. *ChemistryOpen* **2026**, *15* (1), e202500366. <https://doi.org/10.1002/open.202500366>
155. Zhang, R.-H.; Guo, H.-Y.; Deng, H.; Li, J.; Quan, Z.-S. Piperazine skeleton in the structural modification of natural products: a review. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36* (1), 1165–1197 <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1931861>
156. Faizan, M.; Kumar, R.; Mazumder, A.; Salahuddin; Kukreti, N.; Kumar, A.; Chaitanya, M. V. N. L. The medicinal chemistry of piperazines: A review. *Chem. Biol. Drug Des.* **2024**, *103* (6), e14537 <https://doi.org/10.1111/cbdd.14537>
157. Porwal, T.; Kumar, R.; Tripathi, S.; Salahuddin. Piperazine derivatives as anticancer agents: a medicinal chemistry review of structure, mechanism, and clinical translation. *Med. Chem. Res.* **2026**. <https://doi.org/10.1007/s00044-026-03567-w>
158. Romanelli, M. N.; Braconi, L.; Gabellini, A.; Manetti, D.; Marotta, G.; Teodori, E. Synthetic approaches to piperazine-containing drugs approved by FDA in the period of 2011-2023. *Molecules* **2024**, *29*, 68. <https://doi.org/10.3390/molecules29010068>
159. Singh, S.; Kumar, R.; Tripathi, S.; Salahuddin; Mazumder, A.; Singh, N. Fused and substituted piperazines as anticancer agents: A review. *Chem. Biol. Drug Des.* **2025**, *105* (3), e70077. <https://doi.org/10.1111/cbdd.70077>
160. Tahir, S.; Mahmood, T.; Dastgir, F.; Haq, I.; Waseem, A.; Rashid, U. Design, synthesis and antibacterial studies of piperazine derivatives against drug resistant bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166*, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.062>
161. Hatnapure, G. D.; Keche, A. P.; Rodge, A. H.; Birajdar, S. S.; Tale, R. H.; Kamble, V. M. Synthesis and biological evaluation of novel piperazine derivatives of flavone as potent anti-inflammatory and antimicrobial agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (20), 6385–6390. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.071>
162. Xie, S.; Li, X.; Yu, H.; Zhang, P.; Wang, J.; Wang, C.; Xu, S.; Wu, Z.; Liu, J.; Zhu, Z.; Xu, J. Design, synthesis and biological evaluation of isochroman-4-one hybrids bearing piperazine moiety as antihypertensive agent candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (13), 2764–2770. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.004>
163. Devine, R.; Kelada, M.; Leonard, S.; Martin, D. S. D.; Walsh, J. M. D.; Breen, C. J.; Driver, R. B.; Kinsella, G. K.; Findlay, J. B. C.; Stephens, J. C. Design, synthesis, and biological evaluation of aryl piperazines with potential as antidiabetic agents via the stimulation of glucose uptake and

- inhibition of NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *202*, 112416. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112416>
164. Chandrika, N. T.; Shrestha, S. K.; Ngo, H. X.; Tsodikov, O. V.; Howard, K. C.; Garneau-Tsodikova, S. Alkylated piperazines and piperazine-azole hybrids as antifungal agents. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (1), 158–173. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01138>
165. Gu, Z.-S.; Zhou, A.-N.; Xiao, Y.; Zhang, Q.-W.; Li, J.-Q. Synthesis and antidepressant-like activity of novel aralkyl piperazine derivatives targeting SSRI/5-HT_{1A}/5-HT₇. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 701–715. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.063>
166. Ryckebusch, A.; Deprez-Poulain, R.; Maes, L.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Mouray, E.; Grellier, P.; Sergheraert, C. Synthesis and in vitro and in vivo antimalarial activity of N1-(7-chloro-4-quinolyl)-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine derivatives. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (4), 542–557. <https://doi.org/10.1021/jm020960r>
167. Gao, L.; Hao, C.; Ma, R.; Chen, J.; Zhang, G.; Chen, Y. Synthesis and biological evaluation of a new class of multi-target heterocycle piperazine derivatives as potential antipsychotics. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 16931–16941. <https://doi.org/10.1039/D1RA02426D>
168. Akl, L.; Abd El-Hafeez, A. A.; Ibrahim, T. M.; Salem, R.; Marzouk, H. M. M.; El-Domany, R. A.; Ghosh, P.; Eldehna, W. M.; Abou-Seri, S. M. Identification of novel piperazine-tethered phthalazines as selective CDK1 inhibitors endowed with *in vitro* anticancer activity toward the pancreatic cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *243*, 114704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114704>
169. Wodtke, R.; Steinberg, J.; Köckerling, M.; Löser, R.; Mamat, C. NMR-based investigations of acyl-functionalized piperazines concerning their conformational behavior in solution. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 40921–40933. <https://doi.org/10.1039/C8RA09152H>
170. Kant, R.; Maji, S. Recent advances in the synthesis of piperazine based ligands and metal complexes and their applications. *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 785–800. <https://doi.org/10.1039/D0DT03569F>
171. Nagineni, D.; Murugesan, P.; Abburi, N. P.; Bollikanda, R. K.; Sridhar, B.; Tangutur, A. D.; Kantevari, S. Imidazole-1,2,4-oxadiazole-piperazine hybrids as potent anticancer agents: Synthesis, biological evaluation and molecular docking. *Bioorg. Chem.* **2025**, *156*, 108208. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2025.108208>
172. Schumacher, T. J.; Sah, N.; Palle, K.; Rumbley, J.; Mereddy, V. R. Synthesis and biological evaluation of benzofuran piperazine derivatives as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2023**, *93*, 129425. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2023.129425>
173. Wei, M.-X.; Yu, J.-Y.; Liu, X.-X.; Li, X.-Q.; Zhang, M.-W.; Yang, P.-W.; Yang, J.-H. Synthesis of artemisinin-piperazine-furan ether hybrids and evaluation of *in vitro* cytotoxic activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *215*, 113295. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113295>
174. Jones, M.; Mercer, A. E.; Stocks, P. A.; La Pensée, L. J. I.; Cosstick, R.; Park, B. K.; Kennedy, M. E.; Piantanida, I.; Ward, S. A.; Davies, J.; Bray, P. G.; Rawe, S. L.; Baird, J.; Charidza, T.; Janneh, O.; O'Neill, P. M. Antitumour and antimalarial activity of artemisinin–acridine hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (7), 2033–2037. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.028>
175. Li, S.; Li, G.; Yang, X.; Meng, Q.; Yuan, S.; He, Y.; Sun, D. Design, synthesis and biological evaluation of artemisinin derivatives containing fluorine atoms as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (13), 2275–2278. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.05.035>

176. Yang, X.-L.; Liu, D.; Wang, W.; Qu, L.; Jing, Y.-K.; Zhao, L.-X. Design, synthesis and antiproliferative activities of artemisinin derivatives containing a substituted piperazine. *Lett. Drug Des. Discov.* **2009**, *6* (8), 595–598. <http://dx.doi.org/10.2174/157018009789353446>
177. Teixeira, M. M.; Carvalho, D. T.; Sousa, E.; Pinto, E. New antifungal agents with azole moieties. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (11), 1427. <https://doi.org/10.3390/ph15111427>
178. Kumar, S.; Khokra, S. L.; Yadav, A. Triazole analogues as potential pharmacological agents: a brief review. *Future J. Pharm. Sci.* **2021**, *7*, 106. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00241-3>
179. Vala, D. P.; Vala, R. M.; Patel, H. M. Versatile synthetic platform for 1,2,3-triazole chemistry. *ACS Omega* **2022**, *7* (42), 36945–36987 <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04883>
180. Vaishnani, M. J.; Bijani, S.; Rahamathulla, M.; Baldaniya, L.; Jain, V.; Thajudeen, K. Y.; Ahmed, M. M.; Farhana, S. A.; Pasha, I. Biological importance and synthesis of 1,2,3-triazole derivatives: a review. *Green Chem. Lett. Rev.* **2024**, *17* (1), 2307989 <https://doi.org/10.1080/17518253.2024.2307989>
181. Juriček, M.; Kouwer, P. H. J.; Rowan, A. E. Triazole: A unique building block for the construction of functional materials. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8740–8749. <https://doi.org/10.1039/C1CC10685F>
182. Tiwari, V. K.; Mishra, B. B.; Mishra, K. B.; Mishra, N.; Singh, A. S.; Chen, X. Cu-catalyzed click reaction in carbohydrate chemistry. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3086–3240. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00408>
183. Agalave, S. G.; Maujan, S. R.; Pore, V. S. Click chemistry: 1,2,3-triazoles as pharmacophores. *Chem. Asian J.* **2011**, *6* (10), 2696–2718. <https://doi.org/10.1002/asia.201100432>
184. Peng Wu, The Nobel Prize in chemistry 2022: Fulfilling demanding applications with simple reactions. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17*, 11, 2959–2961. <https://doi.org/10.1021/acschembio.2c00788>
185. Bozorov, K.; Zhao, J.; Aisa, H. A. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (16), 3511–3531. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.005>
186. Guan, Q.; Gao, Z.; Chen, Y.; Guo, C.; Chen, Y.; Sun, H. Structural modification strategies of triazoles in anticancer drug development. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *275*, 116578. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116578>
187. Xu, Z.; Zhao, S.-J.; Liu, Y. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure–activity relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *183*, 111700. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111700>
188. Zhou, C.-H.; Wang, Y. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (2), 239–280. <http://dx.doi.org/10.2174/092986712803414213>
189. Wang, X.-L.; Wan, K.; Zhou, C.-H. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (10), 4631–4639. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.07.031>
190. Kaushik, C. P.; Pahwa, A. Convenient synthesis, antimalarial and antimicrobial potential of thioether-1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles with ester functionality. *Med. Chem. Res.* **2018**, *27* (2), 458–469. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2072-x>
191. Yadav, P.; Lal, K.; Kumar, A.; Guru, S. K.; Jaglan, S.; Bhushan, S. Green synthesis and anticancer potential of chalcone linked-1,2,3-triazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *126*, 944–953. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.030>

192. Abdel-Wahab, B. F.; Abdel-Latif, E.; Mohamed, H. A.; Awad, G. E. A. Design and synthesis of new 4-pyrazolin-3-yl-1,2,3-triazoles and 1,2,3-triazol-4-yl-pyrazolin-1-ylthiazoles as potential antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.023>
193. Jordão, A. K.; Afonso, P. P.; Ferreira, V. F.; de Souza, M. C. B. V.; Almeida, M. C. B.; Beltrame, C. O.; Paiva, D. P.; Wardell, S. M. S. V.; Wardell, J. L.; Tiekink, E. R. T.; Damaso, C. R.; Cunha, A. C. Antiviral evaluation of *N*-amino-1,2,3-triazoles against Cantagalo virus replication in cell culture. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (9), 3777–3783. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.04.046>
194. Shanmugavelan, P.; Nagarajan, S.; Sathishkumar, M.; Ponnuswamy, A.; Yogeeswari, P.; Sriram, D. Efficient synthesis and in vitro antitubercular activity of 1,2,3-triazoles as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (24), 7273–7276. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.048>
195. Zhao, S.; Liu, J.; Lv, Z.; Zhang, G.; Xu, Z. Recent updates on 1,2,3-triazole-containing hybrids with *in vivo* therapeutic potential against cancers: A mini-review. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *251*, 115254. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115254>
196. Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (10), 1572–1581. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.014>
197. Khan, J.; Rani, A.; Aslam, M.; Maharia, R. S.; Pandey, G.; Nand, B. Exploring triazole-based drugs: Synthesis, application, FDA approvals, and clinical-trial updates – A comprehensive review. *Tetrahedron* **2024**, *162*, 134122. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2024.134122>
198. Gazivoda Kraljević, T.; Harej, A.; Sedić, M.; Kraljević Pavelić, S.; Stepanić, V.; Drenjančević, D.; Talapko, J.; Raić-Malić, S. Synthesis, *in vitro* anticancer and antibacterial activities and *in silico* studies of new 4-substituted 1,2,3-triazole–coumarin hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 794–808. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.062>
199. Duan, Y.-C.; Ma, Y.-C.; Zhang, E.; Shi, X.-J.; Wang, M.-M.; Ye, X.-W.; Liu, H.-M. Design and synthesis of novel 1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 11–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.12.046>
200. Ye, J.; Mao, L.; Xie, L.; Zhang, R.; Liu, Y.; Peng, L.; Yang, J.; Li, Q.; Yuan, M. Discovery of a series of theophylline derivatives containing 1,2,3-triazole for treatment of non-small cell lung cancer. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*:753676. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.753676>
201. Qiu, Q.; Zhu, J.; Chen, Q.; Jiang, Z.; Xu, J.; Jiang, X.; Huang, W.; Liu, Z.; Ye, J.; Xu, X. Discovery of aromatic amides with triazole-core as potent reversal agents against P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Bioorg. Chem.* **2019**, *90*, 103083. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103083>
202. Sulik, M.; Otto-Ślusarczyk, D.; Steverding, D.; Struga, M.; Huczyński, A. Antiproliferative and trypanocidal activity of Ivermectin bioconjugates. *ACS Omega* **2025**, *10* (25), 27380–27392. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c02998>
203. Chang, Y.; Lyu, T.; Luan, X.; Yang, Y.; Cao, Y.; Qiu, Y.; Feng, H. Artesunate-multiple pharmacological effects beyond treating malaria. *Eur. J. Med. Chem.* **2025**, *286*, 117292. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117292>
204. Lin, L.; Lu, W.; Dai, T.; Chen, H.; Wang, T.; Yang, L.; Yang, X.; Liu, Y.; Sun, D. Novel artemisinin derivatives with potent anticancer activities and the anti-colorectal cancer effect by the mitochondria-mediated pathway. *Bioorg. Chem.* **2021**, *106*, 104496. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104496>

205. Koračak, Lj.; Lupšić, E.; Terzić Jovanović, N.; Jovanović, M.; Novakovic, M.; Nedialkov, P.; Trendafilova, A.; Zlatović, M.; Pešić, M.; Opsenica, I. M. Novel artesunate-pyrimidine-based hybrids with anticancer potential against multidrug-resistant cancer cells. *New J. Chem.* **2023**, *47*, 6844–6855. <https://doi.org/10.1039/D3NJ00427A>
206. Koračak, Lj.; Ajdačić, V.; Selaković, M.; Pajović, M.; Novakovic, M.; Lupšić, E.; Podolski-Renić, A.; Zlatović, M.; Pešić, M.; Opsenica, I. M. Novel pyrimidine-artesunate hybrids overcome multidrug-resistance in non-small cell lung carcinoma through collateral sensitivity. *Bioorg. Chem.* **2026**, *168*, 109307. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2025.109307>
207. Mahfoudh, M.; Abderrahim, R.; Leclerc, E.; Campagne, J.-M. Recent approaches to the synthesis of pyrimidine derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (20), 2856–2865. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700008>
208. Burgula, L. N.; Radhakrishnan, K.; Kundu, L. M. Synthesis of modified uracil and cytosine nucleobases using a microwave-assisted method. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (21), 2639–2642. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.03.056>
209. Garcia, Y.; Schoenebeck, F.; Legault, C. Y.; Merlic, C. A.; Houk, K. N. Theoretical bond dissociation energies of halo-heterocycles: Trends and relationships to regioselectivity in palladium-catalyzed cross-coupling reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (18), 6632–6639. <https://doi.org/10.1021/ja9004927>
210. Dolšak, A.; Mrgole, K.; Sova, M. Microwave-assisted regioselective Suzuki coupling of 2,4-dichloropyrimidines with aryl and heteroaryl boronic acids. *Catalysts* **2021**, *11* (4), 439. <https://doi.org/10.3390/catal11040439>
211. Smith, S. M.; Buchwald, S. L. Regioselective 2-amination of polychloropyrimidines. *Org. Lett.* **2016**, *18* (9), 2180–2183. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b00799>
212. Taldone, T.; Kang, Y.; Patel, H. J.; Patel, M. R.; Patel, P. D.; Rodina, A.; Patel, Y.; Gozman, A.; Maharaj, R.; Clement, C. C.; Lu, A.; Young, J. C.; Chiosis, G. Heat shock protein 70 inhibitors. 2. 2,5'-Thiodipyrimidines, 5-(phenylthio)pyrimidines, 2-(pyridin-3-ylthio)pyrimidines, and 3-(phenylthio)pyridines as reversible binders to an allosteric site on heat shock protein 70. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (4), 1208–1224. <https://doi.org/10.1021/jm401552y>
213. Brown, D. G.; Boström, J. Analysis of past and present synthetic methodologies on medicinal chemistry: Where have all the new reactions gone? *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (10), 4443–4458. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01409>
214. Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. Rethinking amide bond synthesis. *Nature* **2011**, *480*, 471–479. <https://doi.org/10.1038/nature10702>
215. Mahesh, S.; Tang, K.-C.; Raj, M. Amide bond activation of biological molecules. *Molecules* **2018**, *23* (10), 2615. <https://doi.org/10.3390/molecules23102615>
216. Kumari, S.; Carmona, A. V.; Tiwari, A. K.; Trippier, P. C. Amide bond bioisosteres: Strategies, synthesis, and successes. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (21), 12290–12358. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00530>
217. Wang, N.; Wicht, K. J.; Shaban, E.; Ngoc, T. A.; Wang, M.-Q.; Hayashi, I.; Hossain, M. I.; Takemasa, Y.; Kaiser, M.; El Sayed, I. E. T.; Egan, T. J.; Inokuchi, T. Synthesis and evaluation of artesunate-indoloquinoline hybrids as antimalarial drug candidates. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 927–931. <https://doi.org/10.1039/C4MD00091A>

218. Pesic, M.; Markovic, J. Z.; Jankovic, D.; Kanazir, S.; Markovic, I. D.; Rakic, L.; Ruzdijic, S. Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line *in vitro* by anticancer drugs. *J. Chemother.* **2006**, *18* (1), 66–73. <https://doi.org/10.1179/joc.2006.18.1.66>
219. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-080-5_20
220. Chen, L.; Wang, C.; Hua, N.; Zhao, H. Artesunate enhances adriamycin cytotoxicity by inhibiting glycolysis in adriamycin-resistant chronic myeloid leukemia K562/ADR cells. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 1004–1014. <https://doi.org/10.1039/C8RA08041K>
221. Chunarkar-Patil, P.; Kaleem, M.; Mishra, R.; Ray, S.; Ahmad, A.; Verma, D.; Bhayye, S.; Dubey, R.; Singh, H. N.; Kumar, S. Anticancer drug discovery based on natural products: From computational approaches to clinical studies. *Biomedicines* **2024**, *12* (1), 201. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010201>
222. Mollazadeh, S.; Sahebkar, A.; Hadizadeh, F.; Behravan, J.; Arabzadeh, S. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sci.* **2018**, *214*, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.048>
223. Daina, A.; Zoete, V. A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem* **2016**, *11* (11), 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
224. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
225. Khasawneh, H. E. N.; Hassan, H. M.; Alharbi, A. A.; Almagharbeh, W. T.; Al-Aouadi, R. F. A.; Kaur, K.; Maranan, R.; Farhan, H. M.; Hashem, H.; Hassan, M. M.; Bräse, S.; Al-Emam, A. Current progress of 1,2,3-triazole hybrids as EGFR inhibitors for cancer therapy - a literature review. *RSC Adv.* **2025**, *15* (48), 40998–41047. <https://doi.org/10.1039/d5ra03819g>
226. Manoharan, A.; Jayan, J.; Rangarajan, T. M.; Bose, K.; Benny, F.; Ipe, R. S.; Kumar, S.; Kukreti, N.; Abdelgawad, M. A.; Ghoneim, M. M.; Kim, H.; Mathew, B. “Click chemistry”: An emerging tool for developing a new class of structural motifs against various neurodegenerative disorders. *ACS Omega* **2023**, *8* (47), 44437–44457. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04960>
227. Ray, P. D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **2012**, *24* (5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
228. Michalski, R.; Thiebaut, D.; Michałowski, B.; Ayhan, M. M.; Hardy, M.; Ouari, O.; Rostkowski, M.; Smulik-Izydoreczyk, R.; Artelska, A.; Marcinek, A.; Zielonka, J.; Kalyanaraman, B.; Sikora, A. Oxidation of ethidium-based probes by biological radicals: mechanism, kinetics and implications for the detection of superoxide. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 18626. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75373-2>
229. Zhao, H.; Kalivendi, S.; Zhang, H.; Joseph, J.; Nithipatikom, K.; Vásquez-Vivar, J.; Kalyanaraman, B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *34* (11), 1359–1368. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00142-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00142-4)
230. Dikalov, S. I.; Harrison, D. G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20* (2), 372–382. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4886>

231. Xing, F.; Hu, Q.; Qin, Y.; Xu, J.; Zhang, B.; Yu, X.; Wang, W. The relationship of redox with hallmarks of cancer: The importance of homeostasis and context. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 862743. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.862743>
232. Lopes-Rodrigues, V.; Di Luca, A.; Mleczko, J.; Meleady, P.; Henry, M.; Pesic, M.; Cabrera, D.; van Liempd, S.; Lima, R. T.; O'Connor, R.; Falcon-Perez, J. M.; Vasconcelos, M. H. Identification of the metabolic alterations associated with the multidrug resistant phenotype in cancer and their intercellular transfer mediated by extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44541. <https://doi.org/10.1038/srep44541>
233. Zhao, X.; Di, J.; Luo, D.; Vaishnav, Y.; Kamal; Nuralieva, N.; Verma, D.; Verma, P.; Verma, S. Recent developments of P-glycoprotein inhibitors and its structure-activity relationship (SAR) studies. *Bioorg. Chem.* **2024**, *143*, 106997. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106997>
234. Wang, L.; Sun, Y. Efflux mechanism and pathway of verapamil pumping by human P-glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **2020**, *696*, 108675. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108675>
235. Loo, T. W.; Clarke, D. M. Tariquidar inhibits P-glycoprotein drug efflux but activates ATPase activity by blocking transition to an open conformation. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *92* (4), 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.10.006>
236. Shchulkin, A. V.; Abalenikhina, Y. V.; Kosmachevskaya, O. V.; Topunov, A. F.; Yakusheva, E. N. Regulation of P-glycoprotein during oxidative stress. *Antioxidants* **2024**, *13* (2), 215. <https://doi.org/10.3390/antiox13020215>
237. Podolski-Renić, A.; Anđelković, T.; Banković, J.; Tanić, N.; Ruždijić, S.; Pešić, M. The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines. *Biomed. Pharmacother.* **2011**, *65* (5), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.04.015>
238. Manzoor, S.; Petreni, A.; Raza, M. K.; Supuran, C. T.; Hoda, N. Novel triazole-sulfonamide bearing pyrimidine moieties with carbonic anhydrase inhibitory action: Design, synthesis, computational and enzyme inhibition studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *48*, 128249. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128249>
239. Elduque, X.; Pedroso, E.; Grandas, A. Orthogonal protection of peptides and peptoids for cyclization by the thiol-ene reaction and conjugation. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (7), 2843–2853. <https://doi.org/10.1021/jo500427c>
240. Moussa, I. A.; Banister, S. D.; Beinart, C.; Giboureau, N.; Reynolds, A. J.; Kassiou, M. Design, synthesis, and structure-affinity relationships of regioisomeric *N*-benzyl alkyl ether piperazine derivatives as σ -1 receptor ligands. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (16), 6228–6239. <https://doi.org/10.1021/jm100639f>
241. Zima, V.; Berenguer Albiñana, C.; Rojíková, K.; Pokorná, J.; Pachl, P.; Řezáčová, P.; Hudlický, J.; Navrátil, V.; Majer, P.; Konvalinka, J.; Kožíšek, M.; Machara, A. Investigation of flexibility of neuraminidase 150-loop using tamiflu derivatives in influenza A viruses H1N1 and H5N1. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (13), 2935–2947. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.024>
242. Goswami, L.; Paul, S.; Kotammagari, T. K.; Bhattacharya, A. K. Synthesis of artemisinin derived glycoconjugates inspired by click chemistry. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 4017–4021. <https://doi.org/10.1039/C8NJ05737K>
243. Zhou, Y.; Li, X.; Chen, K.; Ba, Q.; Zhang, X.; Li, J.; Wang, J.; Wang, H.; Liu, H. Structural optimization and biological evaluation for novel artemisinin derivatives against liver and ovarian cancers. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *211*, 113000. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113000>

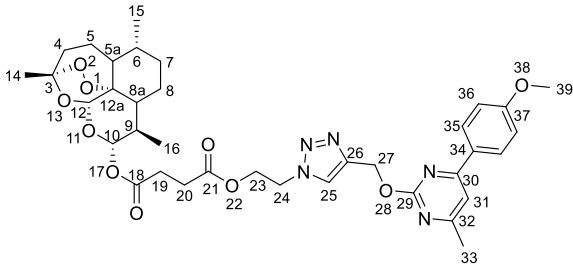
244. Zhang, Z.; Li, K.; Zhang, G.-Y.; Tang, Y.-Z.; Jin, Z. Design, synthesis and biological activities of novel pleuromutilin derivatives with a substituted triazole moiety as potent antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *204*, 112604. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112604>
245. Kavala, M.; Mathia, F.; Kožíšek, J.; Szolcsányi, P. Efficient total synthesis of (+)-Dihydropinidine, (–)-Epidihydropinidine, and (–)-Pinidinone. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (4), 803–808. <https://doi.org/10.1021/np100852p>
246. Slavish, P. J.; Cuypers, M. G.; Rimmer, M. A.; Abdolvahabi, A.; Jeevan, T.; Kumar, G.; Jarusiewicz, J. A.; Vaithiyalingam, S.; Jones, J. C.; Bowling, J. J.; Price, J. E.; DuBois, R. M.; Min, J.; Webby, R. J.; Rankovic, Z.; White, S. W. Chemical scaffold recycling: Structure-guided conversion of an HIV integrase inhibitor into a potent influenza virus RNA-dependent RNA polymerase inhibitor designed to minimize resistance potential. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *247*, 115035. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.115035>
247. Kho, D.; MacDonald, C.; Johnson, R.; Unsworth, C. P.; O'Carroll, S. J.; du Mez, E.; Angel, C. E.; Graham, E. S. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors* (Basel) **2015**, *5* (2), 199–222. <https://doi.org/10.3390/bios5020199>
248. Staats, J.; Divekar, A.; McCoy, J. P.; Maecker, H. T. Guidelines for gating flow cytometry data for immunological assays. In *Immunophenotyping; Methods in Molecular Biology*; Humana: New York, NY, **2019**; Vol. 2032, pp 81–104 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9650-6_5
249. <https://www.swissadme.ch/>
250. <https://www.rcsb.org/structure/6QEX>
251. Alam, A.; Kowal, J.; Broude, E.; Roninson, I.; Locher, K. P. Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein. *Science* **2019**, *363* (6428), 753–756. <https://doi.org/10.1126/science.aav7102>
252. Schrödinger Release 2021-1: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021
253. Schrödinger Release 2021-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
254. Schrödinger Release 2021-1: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
255. BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio 2021 Client, Dassault Systemes, San Diego, 2021.
256. Culbertson, A. T.; Liao, M. Cryo-EM of human P-glycoprotein reveals an intermediate occluded conformation during active drug transport. *Nat. Commun.* **2025**, *16*, 3619. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58561-4>

7. PRILOZI

7.1. Totalna asignacija jedinjenja 210

Jedinjenje **210** izolovano je kao proizvod Štegljihove esterifikacije između artesunata **32** i odgovarajućeg pirimidinskog derivata **192**, kao bezbojno ulje. Potpuna strukturna karakterizacija prikazanog jedinjenja ostvarena je primjenom nuklearne magnetne rezonance (1D i 2D metode: ^1H , ^{13}C , COSY, NOESY, HSQC, HMBC), kao i infracrvene spektroskopije (IC). Za potvrdu strukture sintetisanog molekula korišćena je i masena spektrometrija visoke rezolucije (HRMS) kojom je potvrđena molekulaska masa, detektovan je jon $m/z = 730,30519$, koji odgovara jonu $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{NaO}_{10}^+$ (izračunata vrijednost: 730,30586). Karakterizacija jedinjenja **210** je kompletirana određivanjem optičke rotacije, dok je stepen čistoće potvrđen primjenom dve različite metode visokoeфикаsne tečne hromatografije (HPLC). Dalje, u IC spektru uočena je traka na 1745 cm^{-1} (C=O istežuća) koji odgovara estarskoj funkcionalnoj grupi.

Tabela P1. Asignacija signala jedinjenja **210** (CDCl_3 , 500 MHz)

Položaj	δ_{H} (J, Hz) [ppm]	δ_{C} [ppm]			
3	/	104,5			
4	a: 2,36- 2,29 (m, 1H)	36,3			
	b: 2,00-1,95 (m, 1H)				
5	a: 1,88-1,82 (m, 1H)	24,6			
	b: 1,46-1,38 (m, 1H)				
5A	1,32-1,20 (m, 1H)	51,6			
6	1,32-1,20 (m, 1H)	37,3			
7	a: 1,01-0,94 (m, 1H)	34,1			
	b: 1,69-1,64 (m, 1H)				
8	a: 1,75-1,70 (m, 2H)	22,0	Položaj	δ_{H} (J, Hz) [ppm]	δ_{C} [ppm]
	b: 1,32-1,20 (m, 1H)		24	4,60-4,58 (m, 2H)	49,1
8A	1,60-1,55 (m, 1H)	45,3	25	7,82 (s, 1H)	124,2
9	2,58-2,50 (m, 1H)	31,8	26	/	144,4
10	5,74 (d, J =9,8 Hz, 1H)	92,4	27	5,66 (s, 2H)	60,8
12	5,39 (s, 1H)	91,6	29	/	164,8
12A	/	80,2	30	/	165,3
14	1,36 (s, 3H)	25,9	31	7,20 (s, 1H)	109,5
15	0,92 (d, J =5,7 Hz, 3H)	12,1	32	/	170,3
16	0,80 (d, J =7,1 Hz, 3H)	20,3	33	2,48 (s, 3H)	24,4
18	/	171,1	34	/	128,9
19	2,58-2,50 (m, 2H)	28,7	35	8,08 (d, J =9,1 Hz, 2H)	128,9
20	2,66-2,59 (m, 2H)	29,1	36	6,97 (d, J =8,8 Hz, 2H)	114,3
21	/	171,6	37	/	162,1
23	4,50-4,40 (m, 2H)	62,9	39	3,85 (s, 3H)	55,5

7.1.1. Analiza ^1H , ^{13}C i ^1H - ^{13}C HSQC spektara

Na osnovu signala u ^1H NMR spektru (Slika P1) jedinjenja **210** može se uočiti sledeće:

1. Signali u obliku dubleta, dvostrukog integrala, na hemijskom pomjeranju 8,08 ppm ($J = 9,1$ Hz) i 6,97 ppm ($J = 8,8$ Hz) ukazuju na *para* disupstituisano benzenovo jezgro (H-35 i H-36) i to sa elektron

donorskom grupom u *orto* položaju u odnosu na C/H-35 i elektron akceptorskom grupom u *orto* položaju u odnosu na C/H-36.

2. Singleti, jednostrukog integrala, u aromatičnom dijelu spektra, na pomjeranjima 7,82 ppm i 7,20 ppm odgovaraju vodikovim atomima sa triazola, odnosno pirimidina (H-25 i H-31).

3. Signal u obliku dubleta, jednostrukog integrala, na hemijskom pomjeranju 5,74 ppm, sa konstantom kuplovanja $J = 9,8$ Hz odgovara H-10 što je u skladu sa podacima prijavljenim u literaturi. Vrijednost konstante kuplovanja u dobroj je saglasnosti sa literaturnim podacima za α -artesusat ($J = 9,9$ Hz), pri čemu velika vrijednost J ukazuje na *trans*-diaksijalni raspored protona H-10 i H-9 u piranoznom prstenu, potvrđujući α -konfiguraciju sintetisanog derivata.¹

4. Singlet na pomjeranju 5,39, jednostrukog integrala, odgovara H-12 atomu vodonika što je takođe u saglasnosti sa literaturnim podacima za H-12 α .²

5. Singlet dvostrukog integrala na 5,66 ppm, pripisan je protonima metilenske grupe H-27 u susjedstvu 1,2,3-triazolskog prstena.

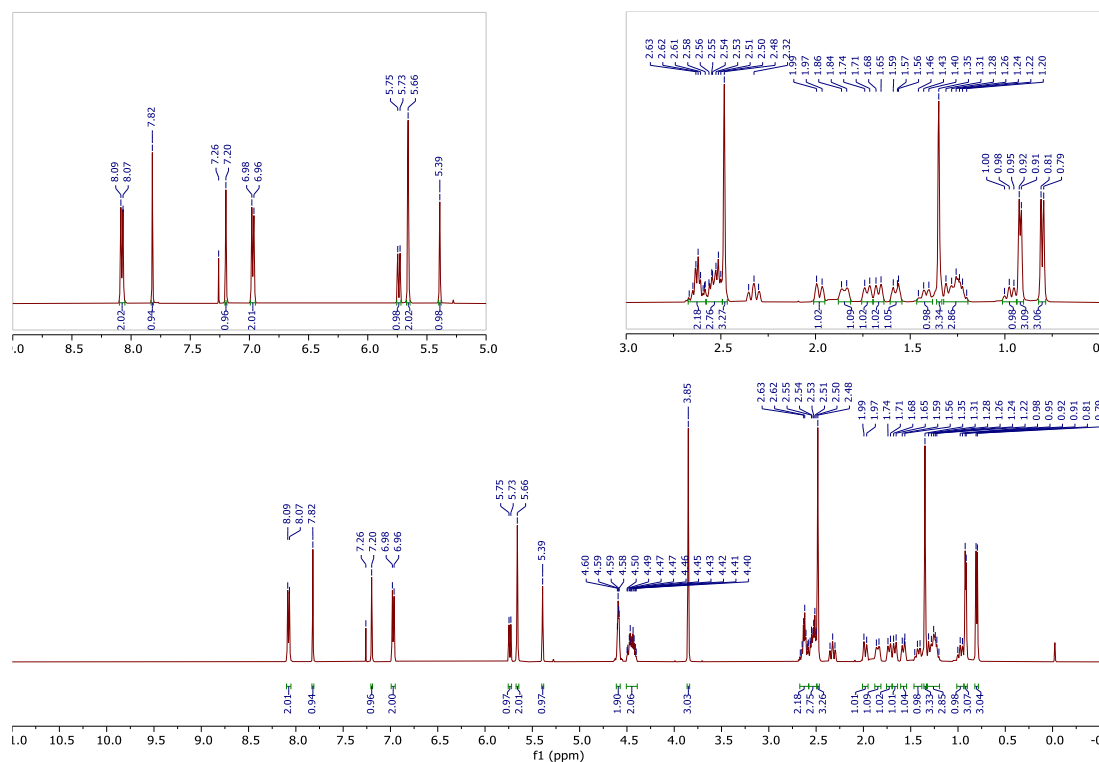
6. Signali u oblasti 4,50-4,40 ppm i 4,60-4,58 ppm, oba u obliku multiplleta, pripisani su metilenskim protonima H-23 i H-24, koji se nalaze u susjedstvu atoma kiseonika, odnosno azota.

7. Singlet na hemijskom pomjeranju 3,85 ppm, trostrukog integrala, pripisan je protonima metoksi-grupe H₃-39.

8. Multiplleti u oblasti 2,58-2,50 ppm i 2,66-2,59 ppm pripisani su metilenskim protonima H₂-19 i H₂-20 sukcinatnog fragmenta.

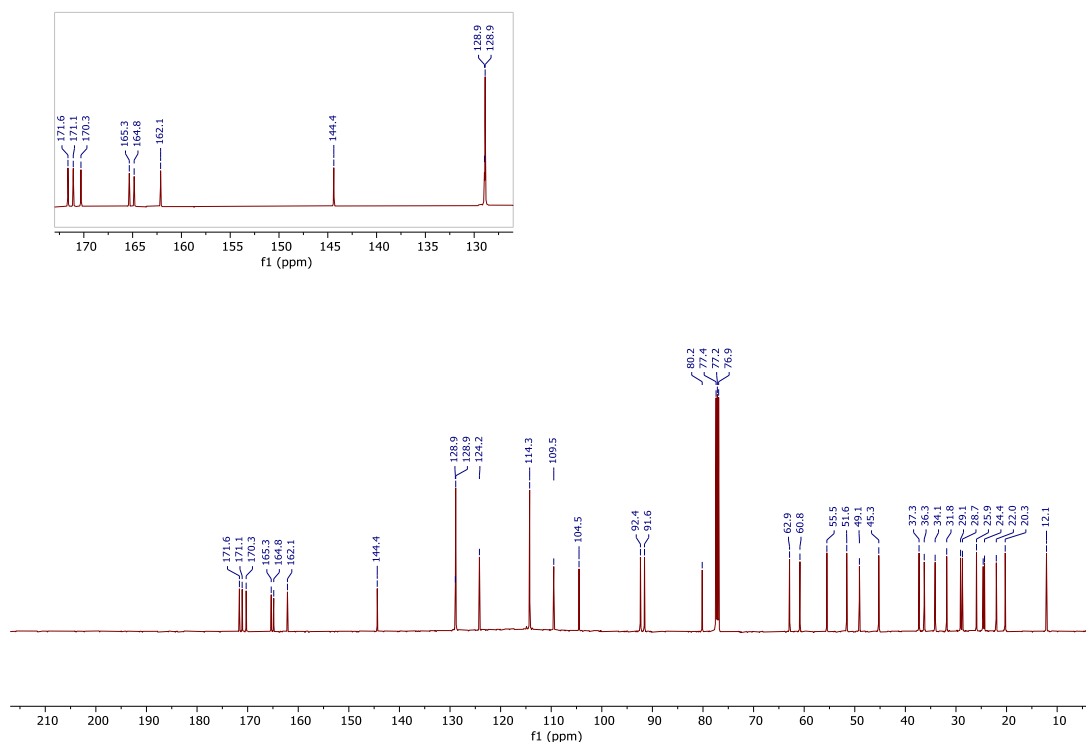
9. U alifatičnom dijelu spektra dva dubleta na 0,92 ppm i 0,80 ppm sa trostrukim integralima, odgovaraju protonima metil-grupa H₃-15 i H₃-16 sa artemizininskog dijela molekula, redom.

10. Singlet na hemijskom pomjeranju 2,48 ppm, trostrukog integrala, pripisan je protonima metil-grupe vezane za pirimidinsko aromatično jezgro (H₃-33), dok singlet na 1,35 ppm, takođe trostrukog integrala, odgovara protonima metil-grupe H₃-14 artemizininskog fragmenta.



Slika P1. ¹H NMR spektar jedinjenja 210.

Analizom ^{13}C NMR spektra (Slika P2) jedinjenja **210** mogu se uočiti 34 signala ugljenika kojima su kasnijom detaljnom analizom HSQC spektra pripisani odgovarajući vodonikovi atomi.

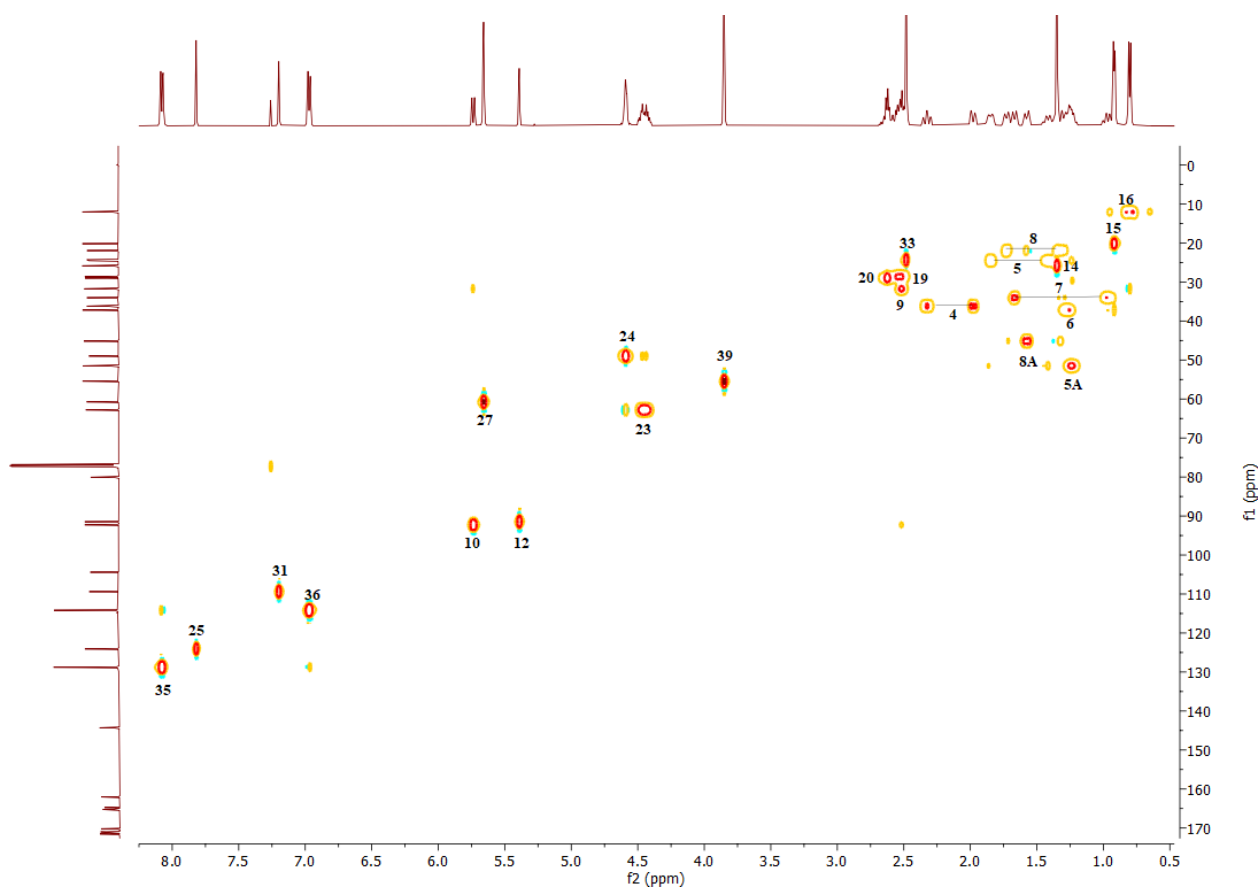


Slika P2. ^{13}C NMR spektar jedinjenja **210**.

7.1.2. Analiza ^1H - ^{13}C HSQC spektra

Analizom ^1H - ^{13}C HSQC spektra identifikovana je korelacija između protona i direktno vezanih ugljenikovih atoma, čime je olakšana asignacija signala u ^1H i ^{13}C NMR spektrima, pri čemu je konačna potvrda strukture izvršena na osnovu podataka dobijenih iz COSY, HMBC i NOESY korelacija. Analizom slike P3 moglo se uočiti sledeće:

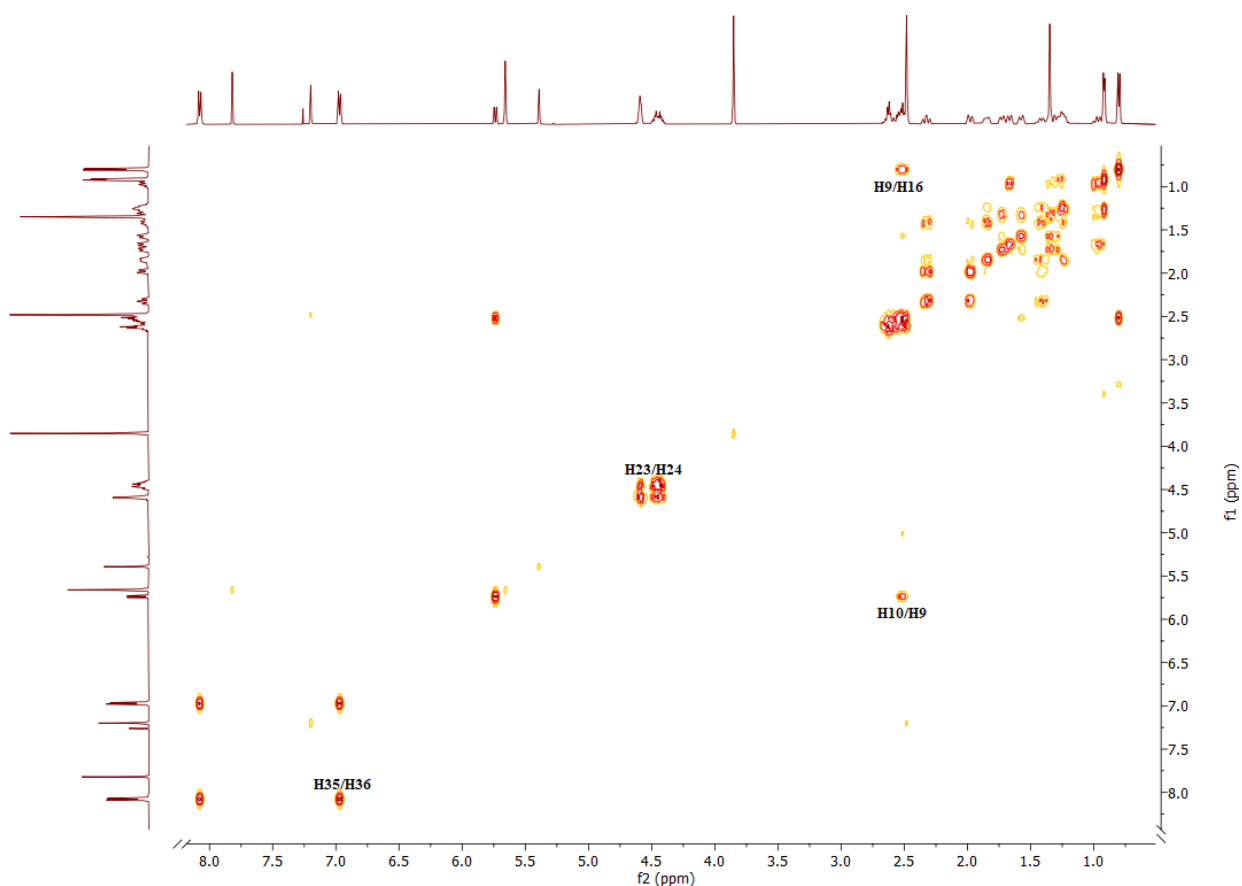
1. Deset ugljenikovih atoma ne pokazuje korelaciju sa vodonikovim atomima, što ukazuje na prisustvo deset kvaternarnih ugljenikovih atoma u strukturi jedinjenja **210**.
2. U strukturi jedinjenja **210** identifikovane su četiri dijastereotopne metilenske grupe (H_2 -4, H_2 -5, H_2 -7 i H_2 -8).



Slika P3. ^1H - ^{13}C HSQC spektar jedinjenja **210**.

7.1.3 Analiza ^1H - ^1H COSY spektra

Analiza ^1H - ^1H COSY spektra (Slika P4) omogućila je identifikaciju međusobno kuplovanih protona i potvrdu protonskih spinskih sistema prisutnih u strukturi sintetisanog jedinjenja **210**. Uočene korelacije između susjednih protona bile su u skladu sa predloženom strukturom molekula, a utvrđeni spinski sistemi su: H-35/H-36, H-10/H-9/H₃-16, H-23/H-24. Dalje korelacije nisu bile pouzdane jer se u alifatičnoj oblasti spektra može uočiti prisustvo velikog broja preklapajućih korelacija.



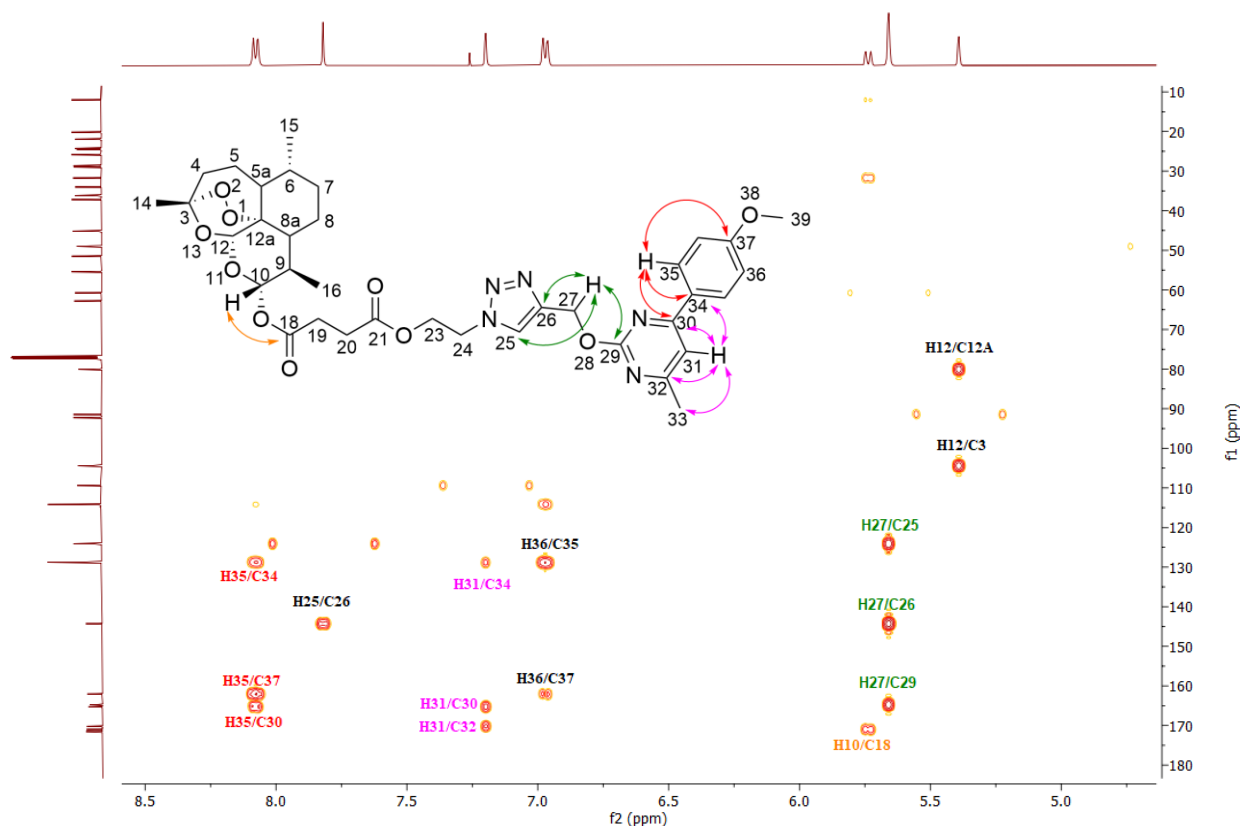
Slika P4. ^1H - ^1H COSY spektar jedinjenja **210**.

7.1.4. Analiza ^1H - ^{13}C HMBC spektra

HMBC predstavlja dvodimenzionalnu NMR spektroskopsku tehniku koja omogućava prikaz korelacije između hemijskih pomjeranja protona i ugljenikovih atoma povezanih preko dve do četiri hemijske veze i omogućava identifikaciju kvaternarnih ugljenikovih atoma i povezivanje pojedinačnih strukturnih fragmenata molekula. Na osnovu analize HMBC spektra u oblasti od 5 do 9 ppm uočene su sledeće korelacije (Slika P5):

- proton H-35 pokazuje korelaciju sa kvaternarnim ugljenikovim atomima C-37, C-34 i C-30;
- proton H-25 pokazuje korelaciju sa kvaternarnim ugljenikovim atomom na pomjeranju 144,4 ppm čime je potvrđeno da se radi o ugljeniku C-26 1,2,3-triazolskog prstena;
- proton H-31 pokazuje korelaciju sa ugljenikovim atomima C-30, C-32, C-33, C-34 čime je potvrđen položaj metil-grupe H₃-33, kao i određen kvaternarni ugljenikov atom C-30;
- proton H-36 pokazuje korelaciju sa C-35 i C-37 čime je potvrđeno da ugljenik na pomjeranju 162,1 ppm odgovara kvaternarnom ugljenikovom atomu C-37;
- protoni H-27 pokazuju korelacije sa ugljenikovim atomima 1,2,3-triazolskog prstena C-25 i C-26, ali i korelaciju sa kvaternarnim ugljenikovim atomom na 164,8 ppm čime je potvrđen pirimidinski ugljenik C-29 koji se nalazi između dva azotova atoma;
- proton H-12 pokazuje korelaciju sa kvaternarnim ugljenikovim atomima artemizininskog fragmenta C-3 i C-12A;

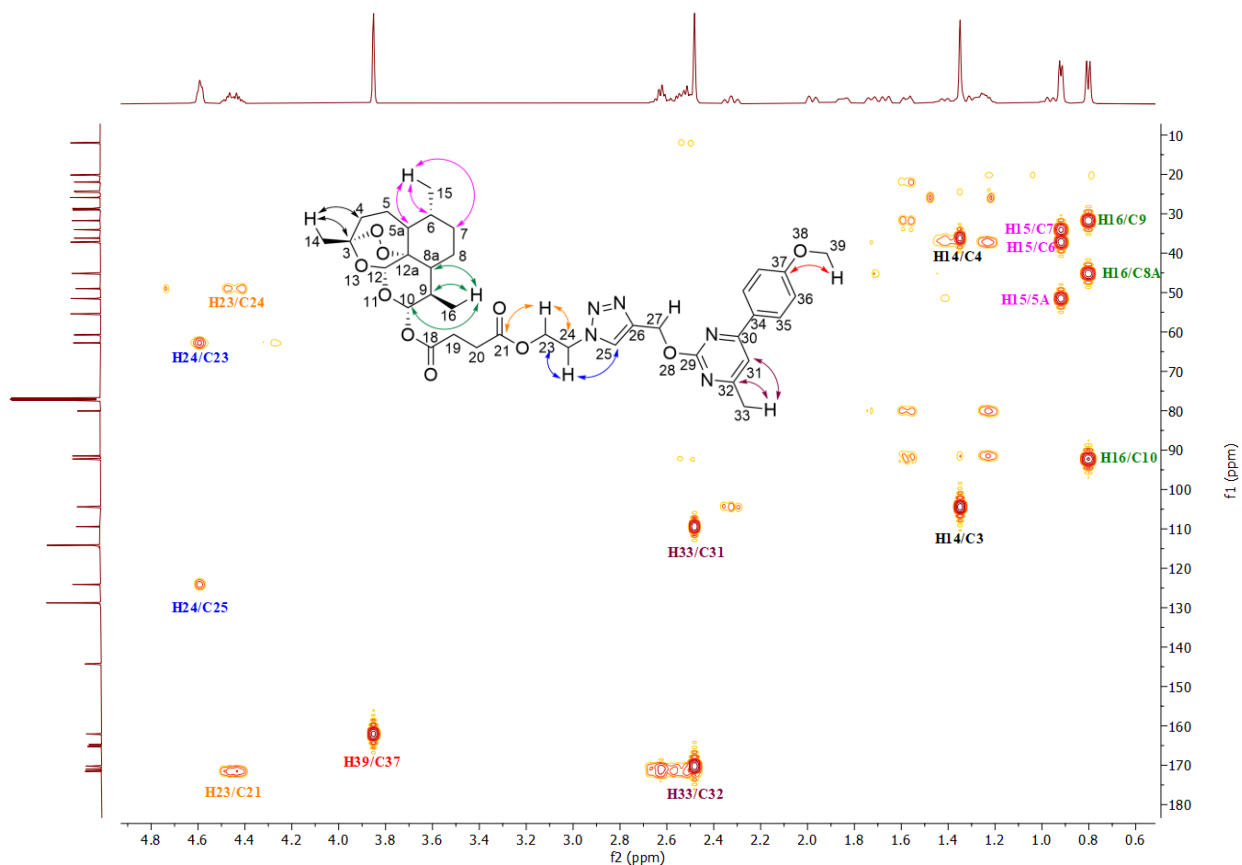
- uočena je i korelacija protona H-10 sa kvaternarnim ugljenikovim atomom na pomjeranju 171,1 ppm čime je identifikovan karbonilni C-18 atom.



Slika P5. ^1H - ^{13}C HMBC spektar jedinjenja **210**.

Dalje, u oblasti od 0,5 do 5 ppm (Slika P6) mogu se uočiti sledeće korelacije:

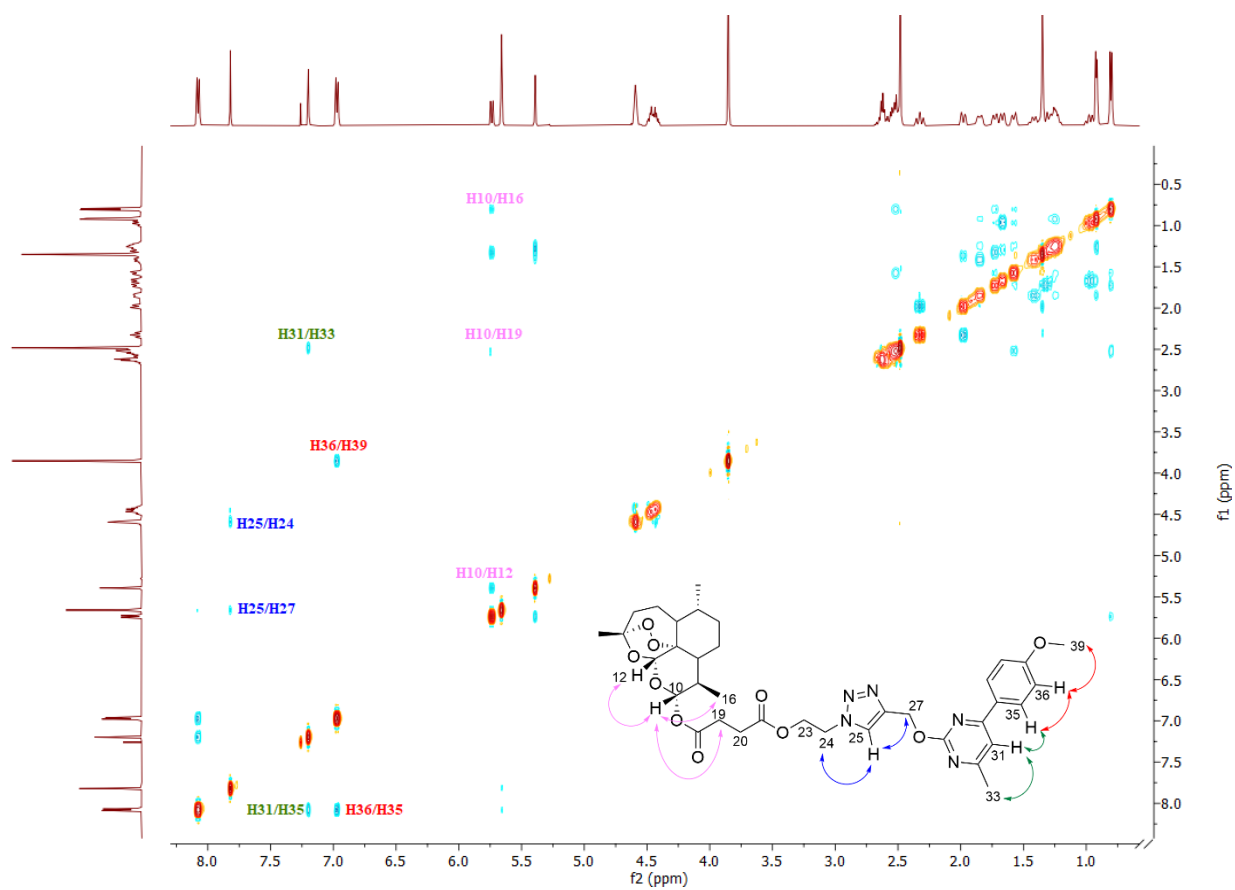
- protoni H-24 pokazuju korelaciju sa C-23 i C-25 čime je dodatno potvrđeno da se na pomjeranju 124,2 ppm nalazi 1,2,3-triazolski ugljenikov atom;
- protoni H-23 pokazuju sprezanje sa C-24 i C-21 pri čemu je potvrđen drugi karbonilni C atom suksinatnog fragmenta koji se nalazi na pomjeranju 171,6 ppm i odgovara C-21;
- protoni metoksi-grupe H₃-39 pokazuju korelaciju sa C-37 čime je nedvosmisleno potvrđeno da ugljenik na 162,1 ppm odgovara kvaternarnom ugljenikovom atomu C-37 benzenovog prstena;
- protoni metil-grupe H₃-33 pokazuju sprezanje sa ugljenicima C-31, C-32;
- protoni metil-grupe H₃-14 pokazuju korelaciju sa kvaternarnim C-3, kao i metilenskim ugljenikovim atomom C-4;
- protoni metil-grupe H₃-15 pokazuju sprezanje sa C-5A, C-6 i C-7;
- protoni metil-grupe H₃-16 pokazuju korelaciju sa C-8A, C-9, C-10.



Slika P6. ^1H - ^{13}C HMBC spektar jedinjenja **210**.

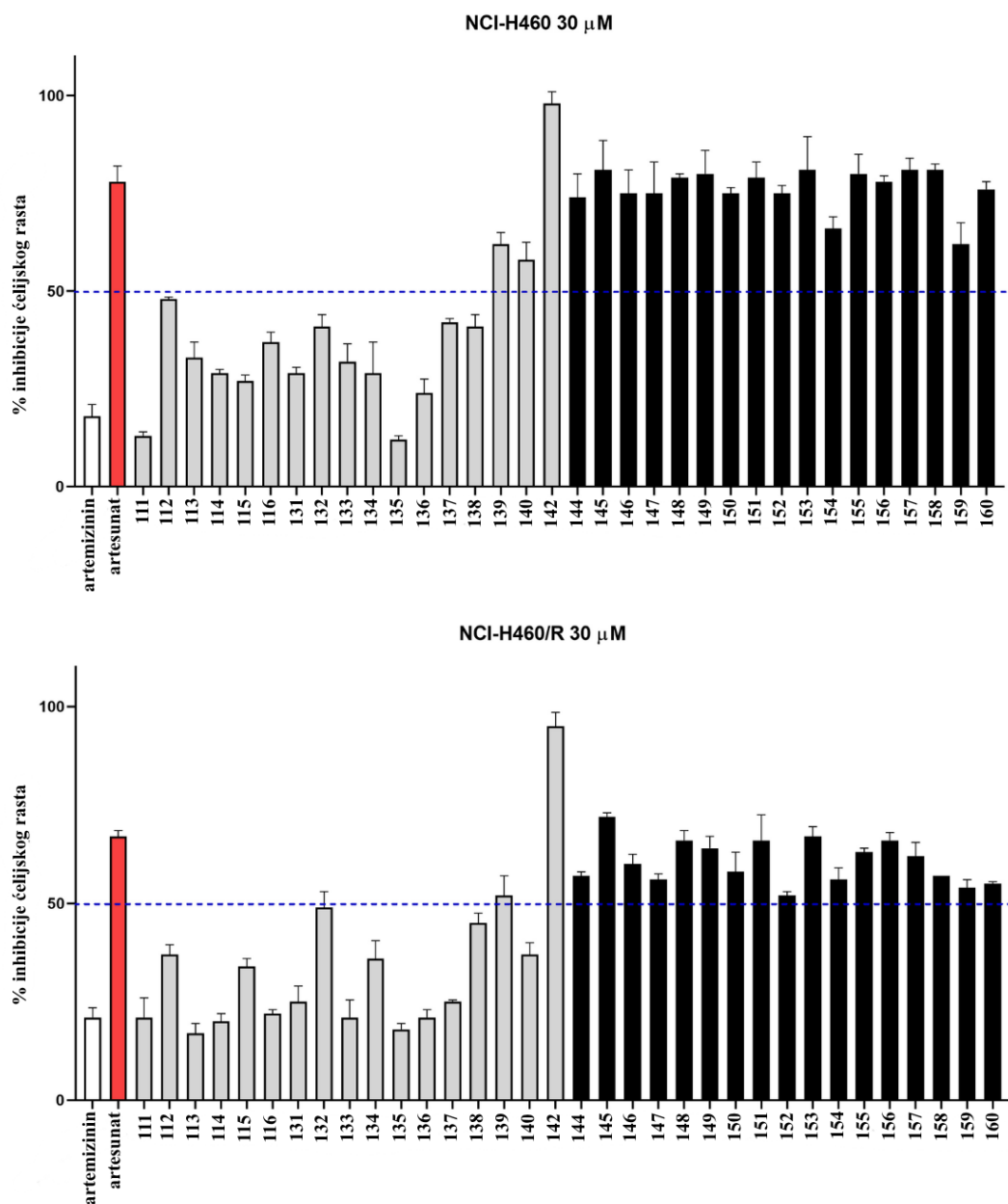
7.1.5. Analiza ^1H - ^1H NOESY spektra

^1H - ^1H NOESY spektar korišćen je za identifikaciju protona koji se nalaze u prostoru u neposrednoj blizini. Uočene korelacije su u skladu sa prethodno asigniranim signalima i dodatno su potvrdile predloženu strukturu, međutim, diastereotopni protoni nisu mogli biti jednoznačno identifikovani jer u odgovarajućim oblastima spektra dolazi do preklapanja signala. H-36 pokazuje korelaciju sa protonima metil-grupe H₃-39, kao i H-35, dok proton H-31, na piriminskom jezgru pokazuje korelaciju sa H-35 i protonima metil-grupe H₃-33. Takođe, H-25 na triazolskom prstenu pokazuje korelaciju sa H-24 i H-27. Analizom ovog spektra, dodatno je potvrđena orijentacija protona H-12 i H-10 koji se nalaze u α -položaju, kao i protoni metil-grupe H₃-16.

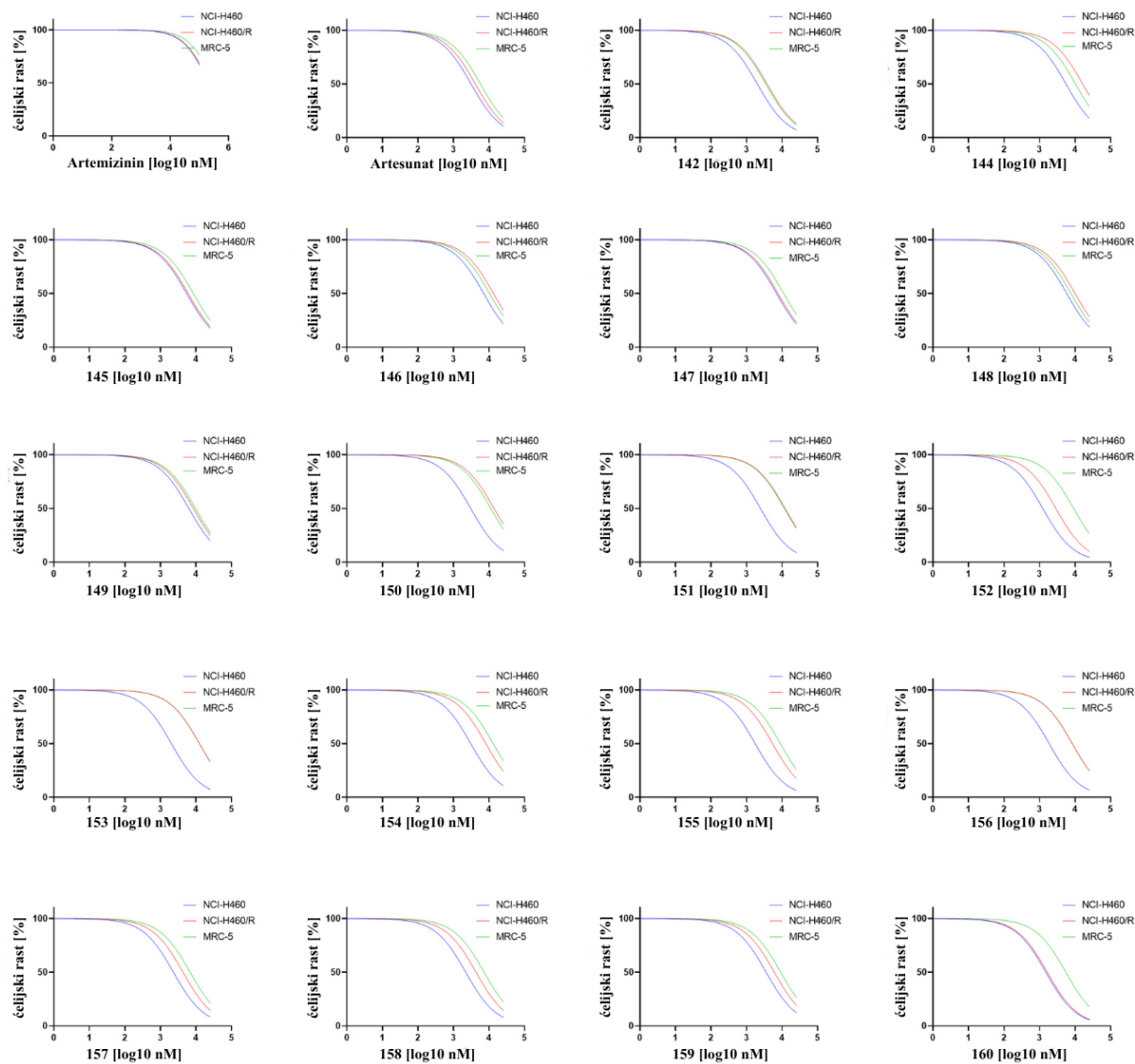


Slika P7. ^1H - ^1H NOESY spektar jedinjenja **210**.

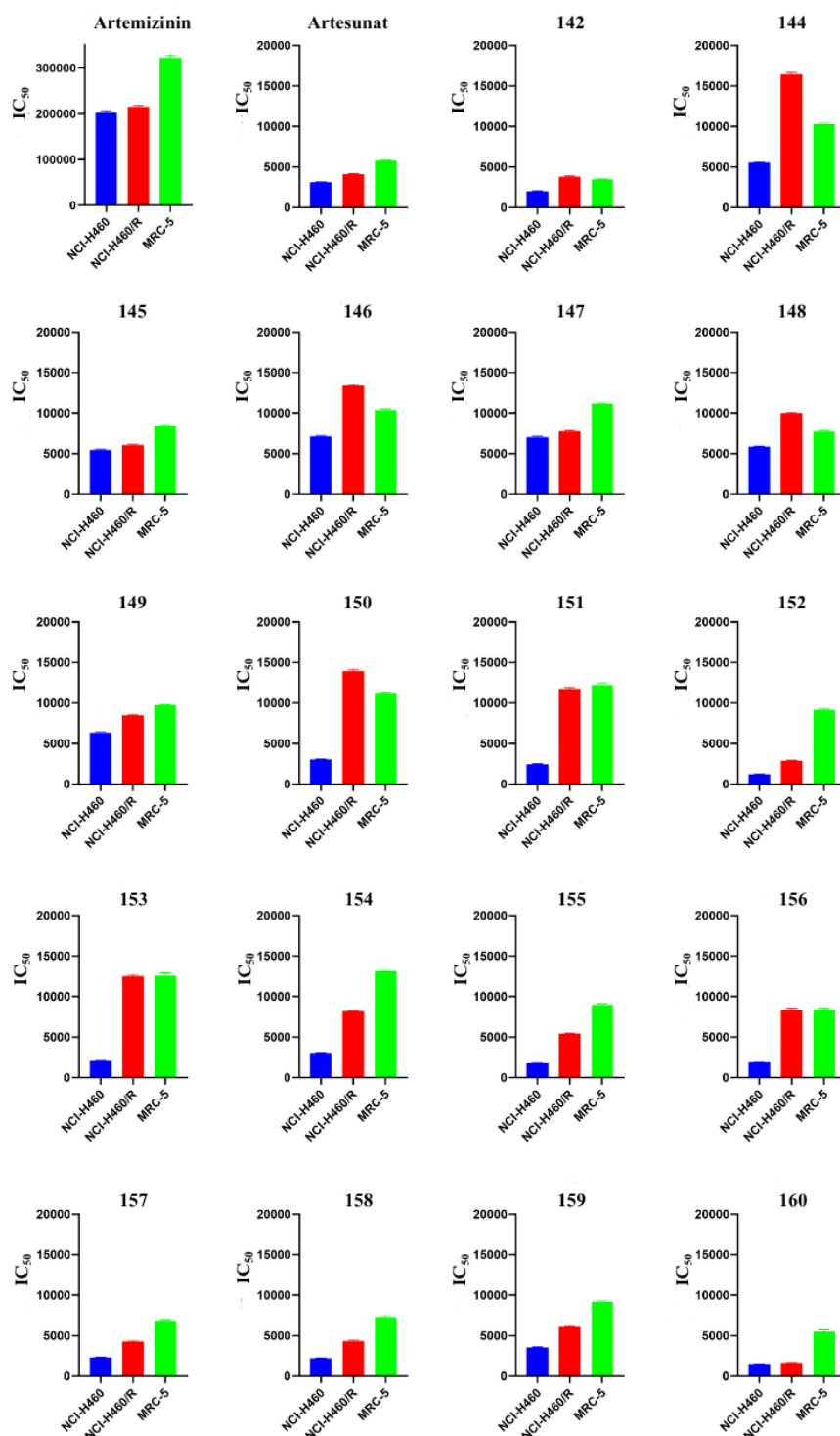
7.2. Antitumorska aktivnost derivata pirimidina **111-116**, **131-140**, **142** kao i hibridnih molekula **144-160** i in silico ispitivanja za **144-160**



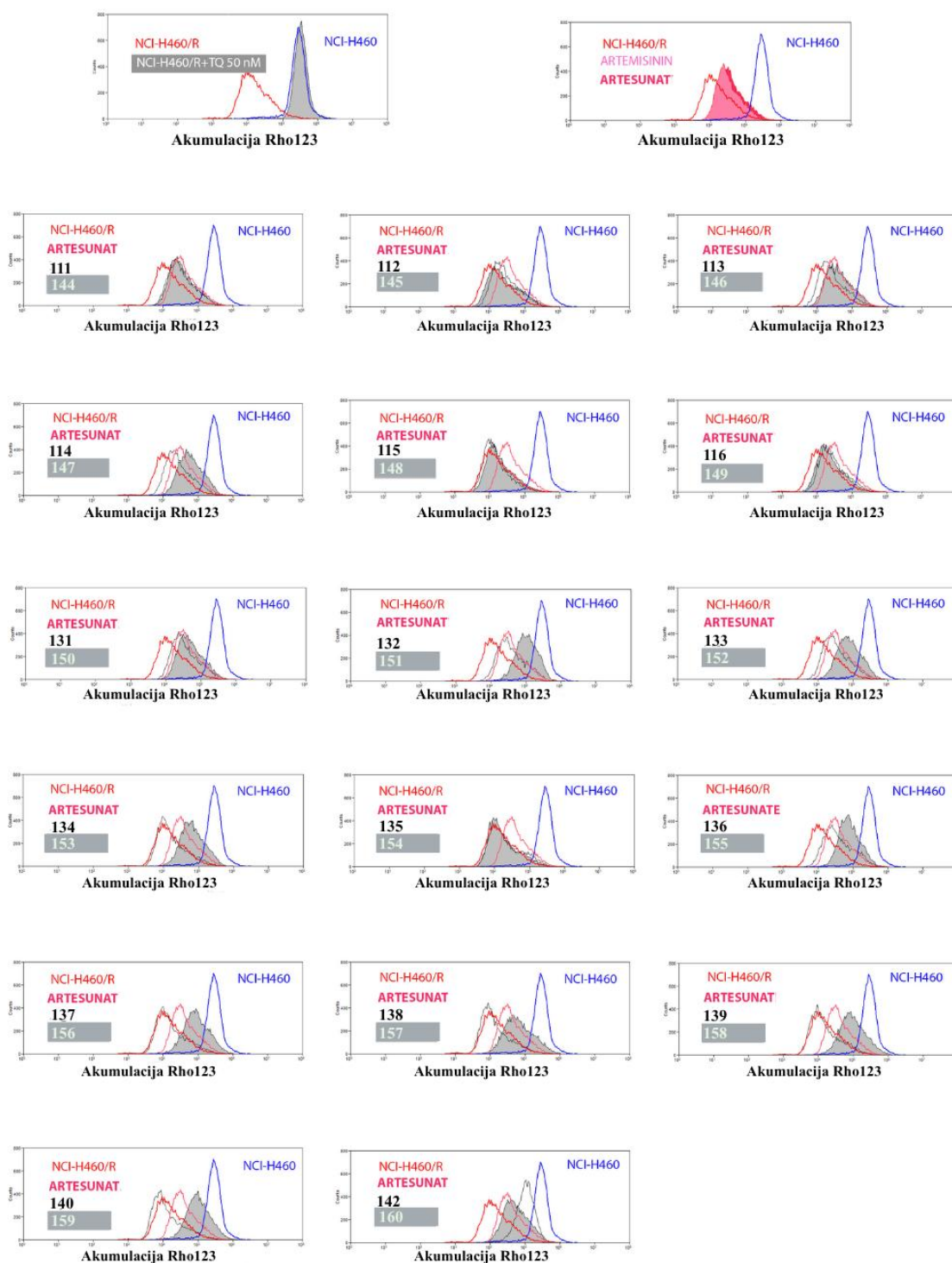
Slika P8. Preliminarni skrining citotoksičnog dejstva novih pirimidinskih derivata **111-116**, **131-140**, **142** i hibridnih molekula **144-160**. Senzitivne NCI-H460 i rezistentne NCI-H460/R ćelije su bile tretirane, redom, artemizininom, artesunatom i sintetisanim jedinjenjima, derivatima pirimidina **111-116**, **131-140**, **142** kao i hibridnim molekulima **144-149**, **150-160** pri koncentraciji od 30 µM. Prikazane su srednje vrijednosti procenta inhibicije rasta ćelija i standardna devijacija, određene MTT testom nakon 72 sata tretmana. Eksperiment je nezavisno ponavljen 3 puta. Plava isprekidana linija označava granicu 50% inhibicije rasta ćelija.



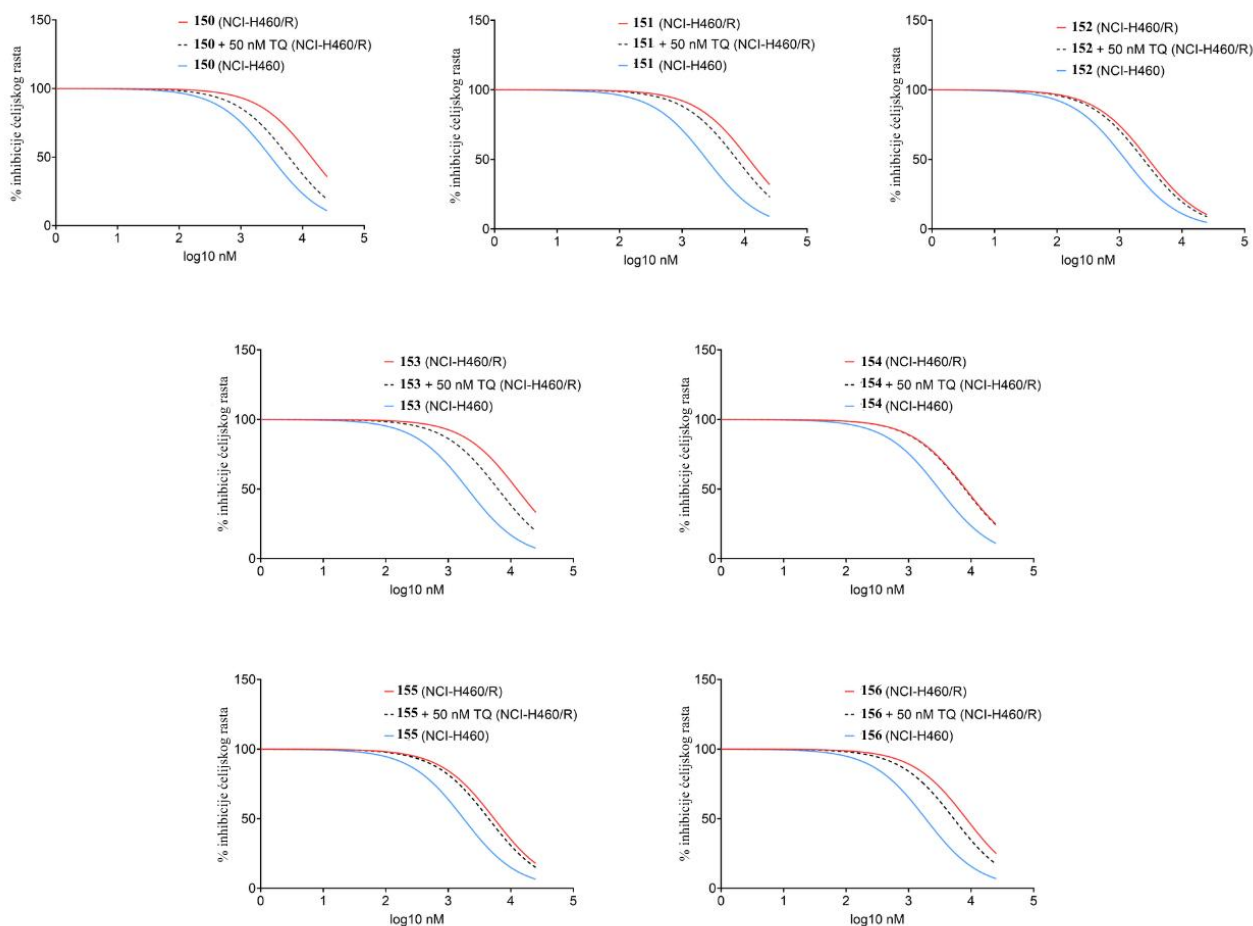
Slika P9. Profili inhibicije rasta senzitivnih i rezistentnih NSCLC ćelija i normalnih humanih fibroblasta pluća, MRC-5, nakon tretmana sintetisanim jedinjenjima **142**, **144-160**, dobijeni primjenom nelinearne regresije. Citotoksični efekat artemizininina (opseg koncentracija 5-100 μM), artesunata, pirimidinskog derivata **142** i hibridnih jedinjenja **144-149**, **150-160** (opseg koncentracija 1-25 μM) je ispitan primjenom MTT testa, nakon 72 sata tretmana ($n \geq 3$). Dobijeni rezultati, analizirani su nelinearnom regresijom koristeći softver GraphPad Prism 8.0.2. Plava linija, predstavlja efekat jedinjenja na senzitivnoj ćelijskoj liniji NCI-H460, crvena linija na odgovarajućoj rezistentnoj liniji NCI-H460/R, dok zelena linija pokazuje efekat jedinjenja na MRC-5 ćelijama. Na x-osi prikazan je $\log_{10}$ koncentracije (nM), dok y-osa predstavlja procenat (%) inhibicije ćelijskog rasta.



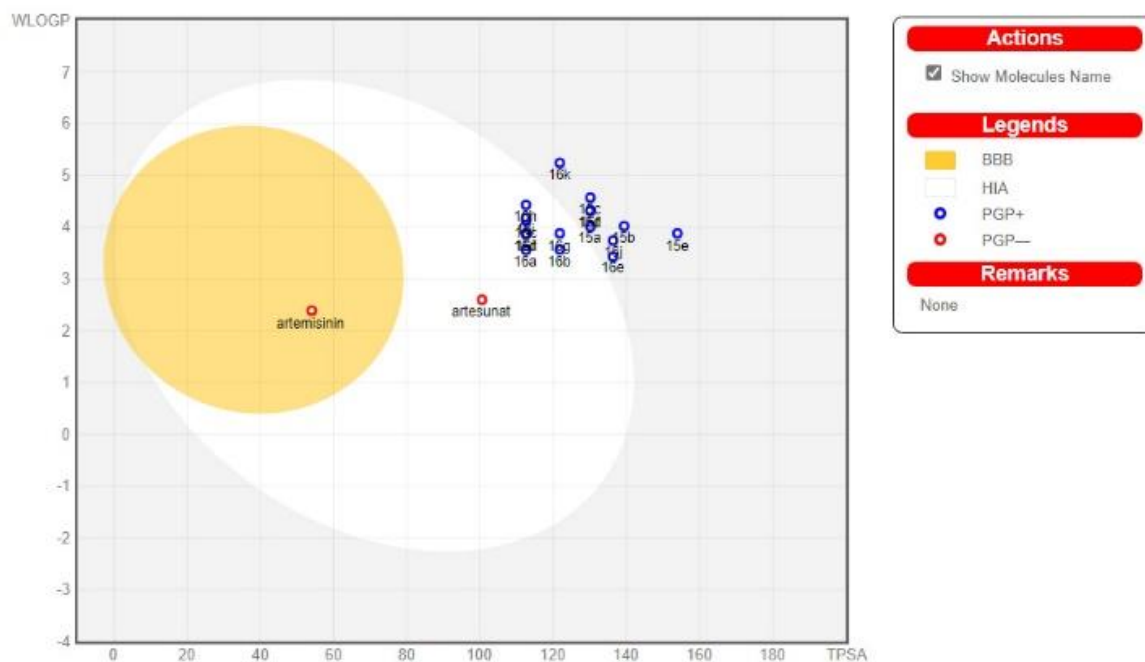
Slika P10. IC₅₀ vrijednosti artemizinin, artesunata, jedinjenja **142** kao i hibridnih molekula **144-149**, **150-160** na senzitivnoj i rezistentnoj ćelijskoj liniji NSCLC, kao i na ćelijskoj liniji MRC-5. Citotoksični efekat artemizinin (opseg koncentracija 5-100 µM), artesunata, pirimidinskog derivata **142** i hibridnih jedinjenja **144-149**, **150-160** (opseg koncentracija 1-25 µM) je ispitan primjenom MTT testa, nakon 72 sata tretmana (n ≥ 3). Dobijeni rezultati, analizirani su nelinearnom regresijom koristeći softver GraphPad Prism 8.0.2. Plavi stubić, predstavlja IC₅₀ vrijednost u nM dobijenu na senzitivnoj ćelijskoj liniji NCI-H460, crveni stubić na odgovarajućoj rezistentnoj liniji NCI-H460/R, dok zeleni stubić pokazuje efekat jedinjenja na MRC-5 ćelijama.



Slika P11. Poređenje uticaja pirimidinskih jedinjenja **111-116/131-140, 142** i odgovarajućih hibridnih molekula **144-149/150-160** na aktivnost P-gp. Profili akumulacije Rho123 (2 μ M) određeni su metodom protočne citometrije nakon 30 minuta istovremene inkubacije sa ispitivanim jedinjenjima (5 μ M). Crvena linija predstavlja profil akumulacije rodamina 123 u netretiranim rezistentnim NCI-H460/R ćelijama, plava linija u netretiranim NCI-H460 ćelijama, dok su NCI-H460/R ćelije tretirane pirimidinskim derivatima prikazane roze linijom, a ćelije tretirane odgovarajućim hibridnim jedinjenjima sivim profilom. Akumulacija Rho123 određena je protočnom citometrijom u zelenom kanalu (emisija na 525 nm), pri čemu je za svaki uzorak analizirano najmanje 10 000 događaja (ćelija).



Slika P12. Ispitivanje efekta reverzije rezistencije hibridnih molekula **150-156** primjenom TQ. Efekat jedinjenja **150-156** prikazan je na senzitivnim NCI-H460 ćelijama (plava linija), rezistentnim NCI-H460/R ćelijama (crvena linija), kao i za istovremeni tretman sa TQ na NCI-H460/R ćelijama (crna isprekidana linija). Hibridna jedinjenja **150-156** ispitivana su u opsegu koncentracija 1-25 μ M, primjenom MTT testa nakon 72 sata tretmana ($n \geq 3$), a rezultati su analizirani nelinearnom regresijom u softveru GraphPad Prism 8.0.2. Na x-osi prikazan je log₁₀ koncentracije (nM), dok y-osa predstavlja procenat (%) inhibicije ćelijskog rasta.



Slika P13. BOILED-Egg dijagram-prediktivni model permeabilnosti (Brain Or IntestinaL Estimated permeation). Prikaz odnosa WLOGP i TPSA za sintetisana hibridna jedinjenja, artemizinin i artesunat, dobijen primjenom SwissADME platforme. Molekuli pozicionirani u žutom području („žumance“) predviđeni su da pasivno prolaze krvno-moždanu barijeru, dok se za molekule smještene u bijelom području („bjelance“) predviđa pasivna apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta. Plave tačke (PGP+) predstavljaju molekule za koje se predviđa da su supstrati za P-gp, dok crvene tačke (PGP-) označavaju molekule za koje se ne očekuje da su supstrati za P-gp. Šifre jedinjenja 15a–f i 16a–k prikazane na slici P13 odgovaraju jedinjenjima **144-149** i **150-160** navedenim u eksperimentalnom dijelu.

Tabela P2. Uticaj sintetisanih jedinjenja na aktivnost P-gp određena primjenom testa akumulacije Rho123 (nakon 30 minuta istovremenog tretmana sa ispitivanim jedinjenjima).

Ćelijska linija/jedinjenje	MFI ^a	FAR ± S.E. ^b
NCI-H460 ^c	340 061	11,57 ± 0,46
NCI-H460/R	29 394	-
Artemizinin	52 361	1,78 ± 0,15
Artesunat ^{INH}	63 674	2,17 ± 0,16
TQ ^d	390 460	13,28 ± 0,58
111	57 434	1,95 ± 0,20
112	47 518	1,62 ± 0,17
113	46 024	1,57 ± 0,14
114	46 716	1,59 ± 0,13
115	25 161	0,86 ± 0,09
116	47 105	1,60 ± 0,15
131	58 586	1,99 ± 0,16
132	64 105	2,18 ± 0,18
133	56 502	1,92 ± 0,16
134	33 433	1,14 ± 0,17
135	40 590	1,38 ± 0,13
136	66 614	2,27 ± 0,18
137	33 466	1,14 ± 0,12
138	28 165	0,96 ± 0,14
139	29 903	1,02 ± 0,10
140	27 968	0,95 ± 0,11
142^{INH}	128 209	4,36 ± 0,21
144	54 489	1,85 ± 0,16
145	46 478	1,58 ± 0,19
146^{INH}	67 715	2,30 ± 0,21
147^{INH}	91 112	3,10 ± 0,20
148	33 825	1,15 ± 0,13
149	39 075	1,33 ± 0,12
150^{SUB}	76 266	2,59 ± 0,19
151^{SUB}	143 802	4,89 ± 0,28
152^{SUB}	114 129	3,88 ± 0,24
153^{SUB}	99 563	3,39 ± 0,20
154	33 757	1,15 ± 0,12
155^{SUB}	111 450	3,79 ± 0,22
156^{SUB}	132 961	4,52 ± 0,30
157^{INH}	109 620	3,73 ± 0,28
158^{INH}	147 315	5,01 ± 0,36
159^{INH}	147 583	5,02 ± 0,31
160^{INH}	83 011	2,82 ± 0,19

^a MFI - izmjereni srednji intezitet fluorescencije korišćen je za izračunavanje FAR;

^b FAR - odnos fluorescence i aktivnosti izračunat je prema formuli: FAR = MFI tretiranih rezistentnih ćelija / MFI netretiranih rezistentnih ćelija;

^c senzitivna ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 kao pozitivna kontrola za akumulaciju Rho123 u odnosu na njenu odgovarajuću višestruko rezistentnu liniju NCI-H460/R na kojoj su testirani efekti jedinjenja;

^d Tarikvidar (TQ) - inhibitor P-gp treće generacije, primjenjen je kao pozitivna kontrola za inhibiciju P-gp;

^{INH} Jedinjenja koja se ponašaju kao inhibitori P-gp, zaobilaze MDR fenotip i inhibiraju aktivnost P-gp (prema MTT testu i rezultatima akumulacije Rho123);

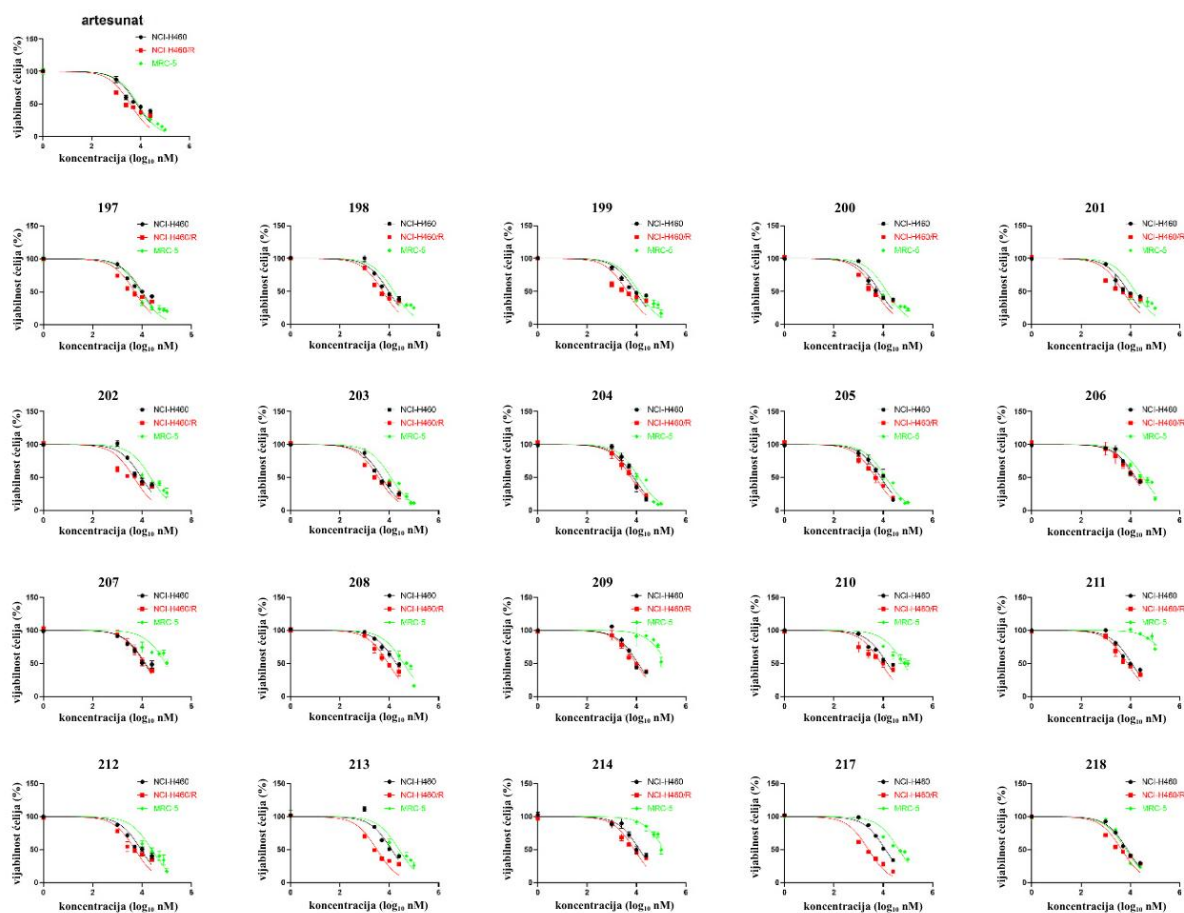
^{SUB} Jedinjenja koja se ponašaju kao supstrati za P-gp čija je IC₅₀ vrijednost značajno viša u rezistentnim ćelijama u poređenju sa senzitivnim (pokazujući profil rezistencije prema MTT testu), ali istovremeno sposobna da povećaju akumulaciju Rho123.

Tabela P3. Parametri sličnosti sa lijekovima (engl. *drug-likeness*) ispitivanih jedinjenja.

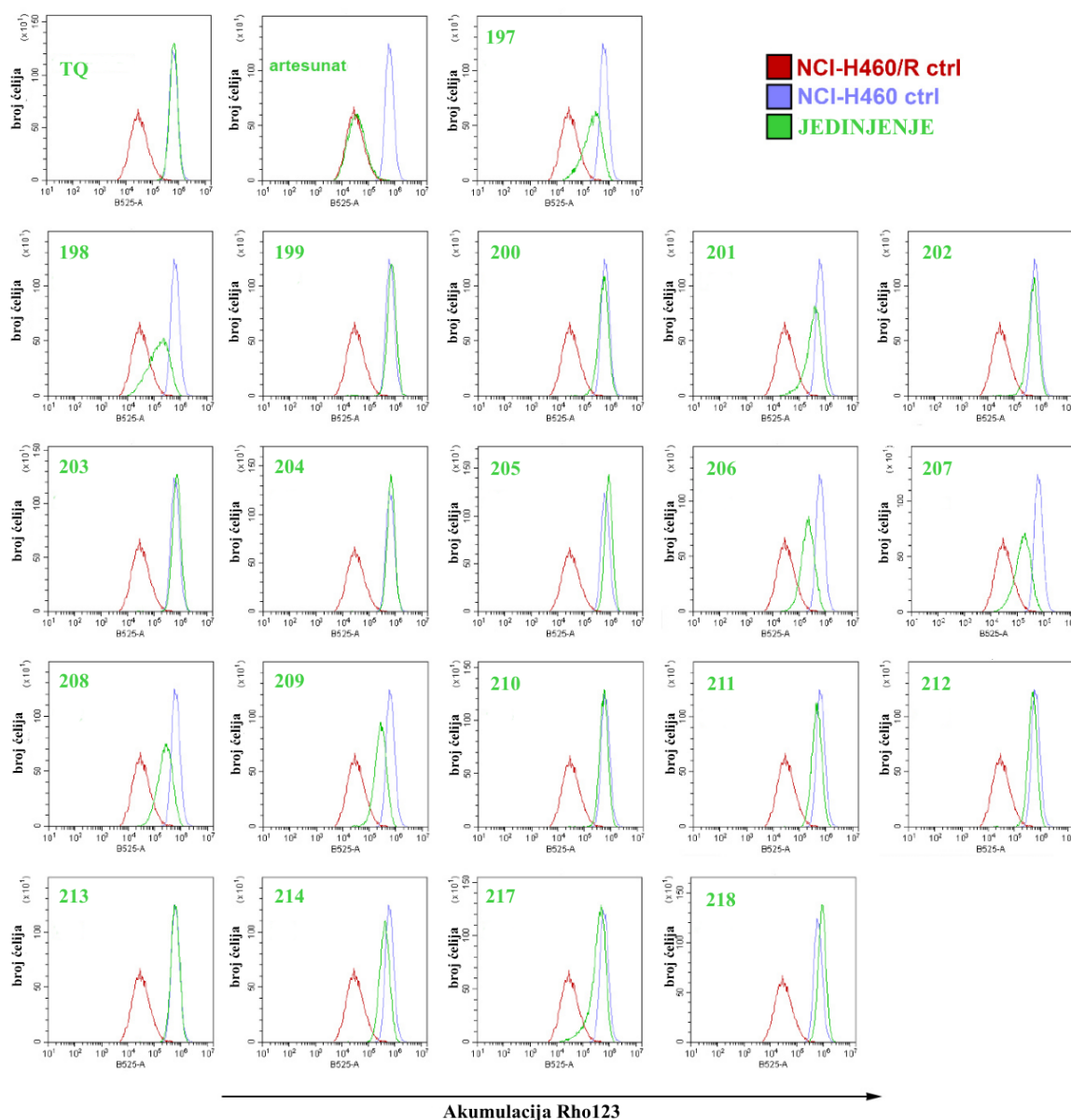
Jedinjenje	MM	Broj akceptora vodonične veze	Broj donora vodonične veze	TPSA (Å ²) ^a	WLOGP ^b	MLOGP ^c
artemizinin	282,33	5	0	53,99	2,39	2,21
artesanat	384,42	8	1	100,52	2,6	2,29
144	580,67	9	2	130,13	4,01	2,62
145	610,70	10	2	139,36	4,02	2,33
146	598,66	10	2	130,13	4,57	2,99
147	564,70	9	2	130,13	4,32	2,81
148	605,68	10	2	153,92	3,88	1,98
149	594,70	9	2	130,13	4,32	2,81
150	606,71	9	0	112,55	3,56	3
151	636,74	10	0	121,78	3,57	2,69
152	624,70	10	0	112,55	4,12	3,36
153	620,74	9	0	112,55	3,87	3,18
154	631,72	10	0	136,34	3,43	2,35
155	620,74	9	0	112,55	3,87	3,18
156	650,76	10	0	121,78	3,88	2,88
157	638,73	10	0	112,55	4,43	3,54
158	634,76	9	0	112,55	4,18	3,36
159	645,75	10	0	136,34	3,74	2,53
160	712,83	10	0	121,78	5,24	3,53

^a Toploška polarna površina (TPSA);^b Vrijednost logP određena primjenom metode koju su razvili Wildman i Crippen;^c Vrijednost logP određena primjenom metode koju je razvio Moriguchi.

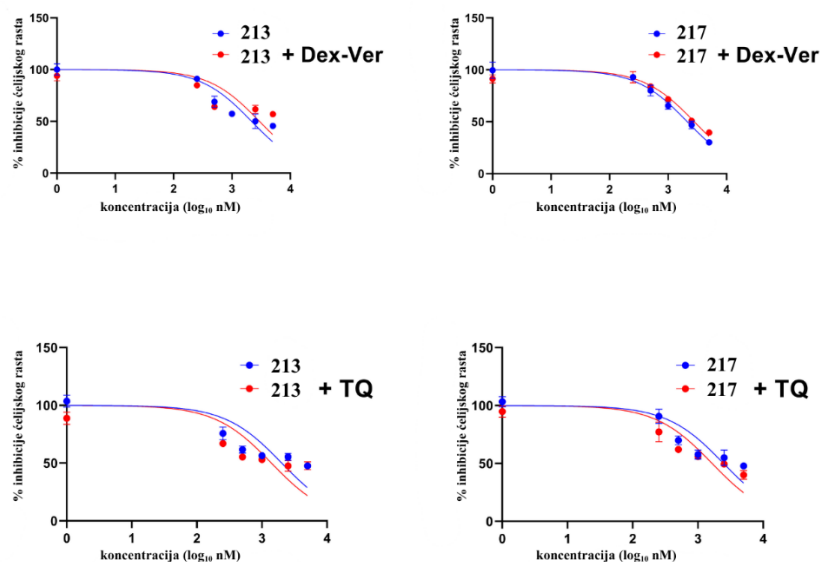
7.3. Antitumorska aktivnost derivata artesunata koji sadrže 1,2,3-triazolski fragment



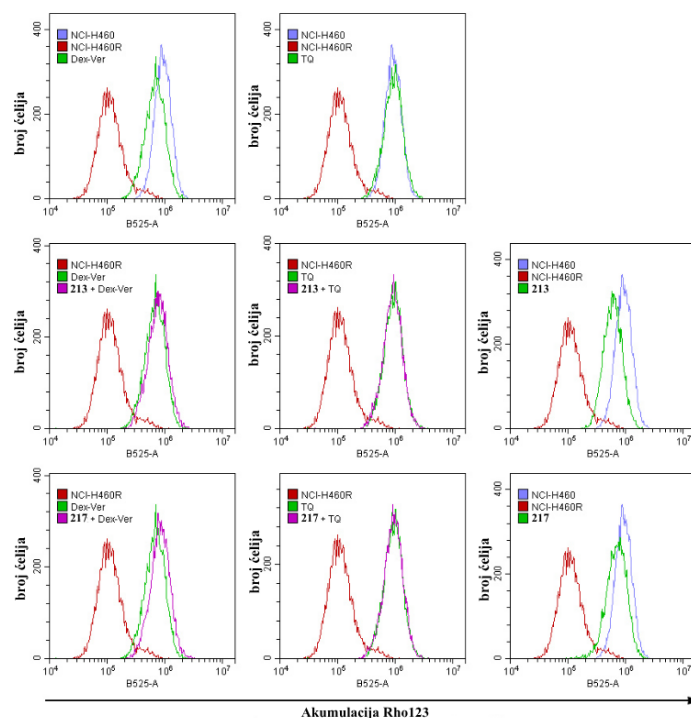
Slika P14. Selektivnost hibridnih jedinjenja artesunata **197-214**, **217** i **218** prema ćelijama tumora i višestruko rezistentnim ćelijama tumora. Artesunat i 20 hibridnih jedinjenja artesunata su ispitani u koncentracionom opsegu 1-25 μM na senzitivnoj NCI-H460 kao i na rezistentnoj NCI-H460/R ćelijskoj liniji NSCLC, dok su na normalni humanim fibroplastima pluća MRC-5 primjenjene koncentracije od 10 do 100 μM . Citotoksični efekat određen je primjenom MTT testa, nakon 72 sata tretmana ($n \geq 3$). Dobijeni rezultati, analizirani su i grafički predstavljeni, koristeći softver GraphPad Prism 8.0.2.



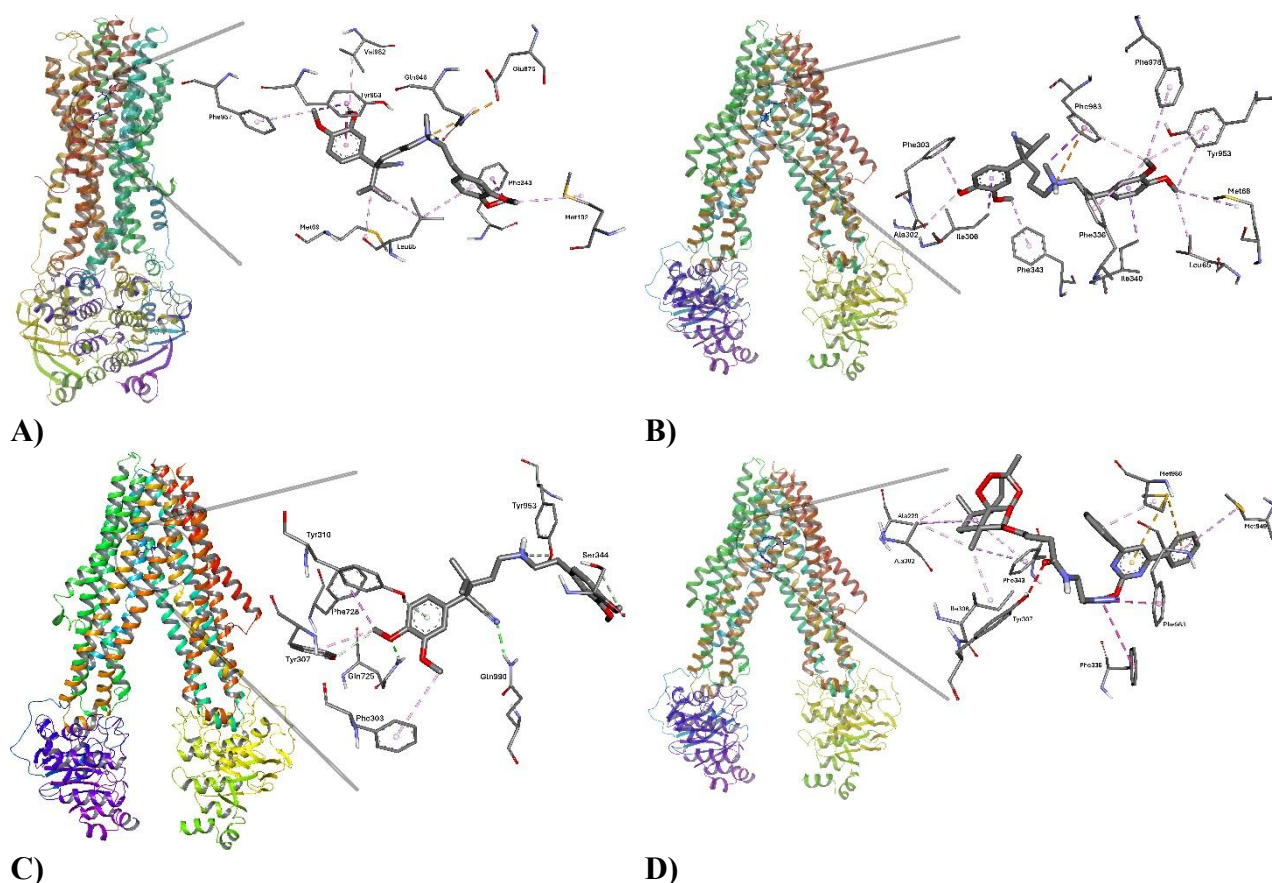
Slika P15. Inhibicija aktivnosti P-gp novim artesunatskim derivatima **197-214**, **217** i **218** ispitana određivanjem akumulacije Rho123. Akumulacija Rho123, u koncentraciji od 1 μM , određivana je tokom istovremenog tretmana sa artesunatom i 20 novih hibridnih jedinjenja, primjenjenih u koncentraciji od 5 μM . Ispitivanje je sprovedeno primjenom protočne citometrije na NCI-H460/R ćelijama, koje karakteriše visoka ekspresija P-gp. Kao pozitivna kontrola za akumulaciju Rho123 korišćene su senzitivne NCI-H460 ćelije, koje ne ekspimiraju P-gp, dok je TQ, u koncentraciji od 50 nM, korišćen kao pozitivna kontrola za inhibiciju P-gp. Za svaki uzorak analizirano je najmanje 10 000 događaja (ćelija), a akumulacija Rho123 određivana je mjerenjem fluorescence u zelenom kanalu (emisioni maksimum na 525 nm), na protočnom citometru CytoFLEX, uz obradu podataka u softveru CytExpert.



Slika P16. Određivanje citotoksičnosti hibridnih jedinjenja **213** i **217** u kombinaciji sa inhibitorima P-gp, deksverapamilom (Dex-Ver) i tarikvidarom (TQ). Jedinjenja **213** i **217**, koja su u rezistentnim ćelijama NCI-H460/R ostvarila najizraženiju kolateralnu senzitivnost, ispitivana su u kombinaciji sa Dex-Ver (5 μ M) ili TQ (50 nM). Citotoksičnost je određena MTT testom nakon 72 sata tretmana, dok su grafički prikazi generisani u softveru GraphPad Prism 8.0.2. Eksperiment je nezavisno ponovljen 3 puta.



Slika P17. Ispitivanje inhibicije aktivnosti P-gp pod dejstvom kombinacije hibridnih jedinjenja **213** i **217** i inhibitora P-gp, deksverapamila (Dex-Ver) i tarikvidara (TQ). Akumulacija Rho123 u koncentraciji od 1 μ M, određivana je tokom pojedinačnih i kombinovanih tretmana jedinjenjima **213** (5 μ M) i **217** (5 μ M) sa Dex-Ver (5 μ M) i TQ (50 nM) na rezistentnoj ćelijskoj liniji NCI-H460/R. Senzitivne NCI-H460 ćelije, koje ne eksprimiraju P-gp, korišćene su kao pozitivna kontrola za akumulaciju Rho123. Za svaki uzorak analizirano je najmanje 10 000 događaja (ćelija), a akumulacija Rho123 određivana je mjerenjem fluorescence u zelenom kanalu (emisioni maksimum na 525 nm), na protočnom citometru CytoFLEX, uz obradu podataka u softveru CytExpert.



Slika P18. (A) Deksverapamil dokovan u vezivno mjesto zatvorene konformacije humanog P-glikoproteina (PDB ID: 8SA0) sa detaljnim prikazom interakcija sa aminokiselinskim ostacima u vezivnom mjestu; (B) Deksverapamil dokovan u vezivno mjesto konformacije *inward-facing 1* P-gp (PDB ID: 8SB7) sa detaljnim prikazom interakcija sa aminokiselinskim ostacima u vezivnom mjestu; (C) Deksverapamil dokovan u vezivno mjesto konformacije *inward-facing 2* P-gp (PDB ID: 8SA1) sa detaljnim prikazom interakcija sa aminokiselinskim ostacima u vezivnom mjestu; (D) Jedinjenje **217** dokovano u vezivno mjesto konformacije *inward-facing 1* P-gp (PDB ID: 8SB7) sa detaljnim prikazom interakcija sa aminokiselinskim ostacima u vezivnom mjestu.

REFERENCE:

- Haynes, R. K.; Chan, H.-W.; Cheung, M.-K.; Lam, W.-L.; Soo, M.-K.; Tsang, H.-W.; Voerste, A.; Williams, I. D. C-10 Ester and Ether Derivatives of Dihydroartemisinin - 10- α Artesunate, Preparation of Authentic 10- β Artesunate, and of Other Ester and Ether Derivatives Bearing Potential Aromatic Intercalating Groups at C-10. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2002 (1), 113-132. [https://doi.org/10.1002/1099-0690\(20021\)2002:1%3C113::AID-EJOC113%3E3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1099-0690(20021)2002:1%3C113::AID-EJOC113%3E3.0.CO;2-N)
- Presser, A.; Feichtinger, A.; Buzzi, S. A simplified and scalable synthesis of artesunate. *Monatsh. Chem.* **2017**, 148, 63-68. <https://doi.org/10.1007/s00706-016-1865-9>

BIOGRAFIJA

Ljiljana Koračak je rođena 13.03.1996. godine u Banjaluci gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju društveno-jezičkog smjera. Osnovne akademske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemija, upisala je školske 2015/16. godine. Diplomirala je 2019. godine sa prosječnom ocjenom 8,71 i ocjenom 10 na završnom radu, koji je uradila i odbranila na katedri za organsku hemiju. Master akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, studijski program Hemija, upisala je školske 2019/20. godine, a završila 2020. godine sa prosječnom ocjenom 10 i ocjenom 10 na završnom radu. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, studijski program Hemija, upisala je školske 2020/21. godine.

Od 2021. godine do aprila 2023. godine bila je stipendista Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija, a od juna 2023. godine zaposlena je na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u Beogradu kao istraživač saradnik. Od školske 2020/21. godine učestvovala je u izvođenju vježbi iz predmeta: Organska hemija 2, Hemija heterocikličnih jedinjenja, Zelena hemija, Odabrane oblasti organske hemije, kao i na predmetu Organska hemija za studente Biološkog fakulteta.

Od 2023. godine je angažovana na projektu PhotoSCLART (Razvoj fotoreaktivnih agenasa protiv raka zasnovanih na prirodnim proizvodima – derivati sklareola i artemizina u modelima raka rezistentnih na više lekova: osnova za teranostički pristup) koje finansira Fond za nauku Republike Srbije.

Objavljeni radovi koji čine dio disertacije

Ljiljana Koračak je koautor sedam naučnih radova (jedan rad objavljen u vodećem međunarodnom časopisu kategorije M21a, jedan rad objavljen u vodećem međunarodnom časopisu kategorije M21, četiri rada objavljena u međunarodnim časopisima kategorije M22 i jedan rad objavljen u međunarodnom časopisu kategorije 23) i trinaest saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja. Dio ove doktorske disertacije čine sledeći radovi i saopštenja:

Rad objavljen u vodećem međunarodnom časopisu kategorije **M21a**:

1. **Lj. Koračak**, V. Ajdačić, M. Selaković, M. Pajović, M. Novakovic, E. Lupšić, A. Podolski-Renić, M. Zlatović, M. Pešić, I. M. Opsenica, Novel pyrimidine-artesunate hybrids overcome multidrug-resistance in non-small cell lung carcinoma through collateral sensitivity, *Bioorg. Chem.*, **2026**, 168, 109307. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2025.109307>

Rad objavljen u međunarodnom časopisu **M22**:

1. **Lj. Koračak**, E. Lupšić, N. Terzić-Jovanović, M. Jovanović, M. Novakovic, P. Nedialkov, A. Trendafilova, M. V. Zlatovic, M. Pesic, I. Opsenica, Novel artesunate – pyrimidine-based hybrids with anticancer potential against multidrug-resistant cancer cells, *New J. Chem.*, **2023**, 47, 6844-6855. <https://doi.org/10.1039/D3NJ00427A>

M34 – Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

1. I. Opsenica, **Lj. Koračak**, E. Lupšić, M. Jovanović, M. Novakovic, M. Pešić, "Synthesis of novel artemisinin derivatives with potent anticancer activities against multidrug-resistant cancer cells", 22nd European Symposium on Organic Chemistry, Ghent, Belgium, July 9th–13th 2023, Book of Abstracts, P099, page 213.

2. A. M. Nikolić, **Lj. Koračak**, E. Lupšić, A. Podolski-Renić, M. Pešić, I. M. Opsenica, "The use of pyrimidines in medicinal chemistry: Derivatives with artesunic acid", 20th Blue Danube Symposium on Heterocycles in Chemistry, Prague, Czech Republic, August 25th–28th 2024, Book of Abstracts P_31, page 101; ISBN 978-80-907779-3-4.

3. **Lj. Koračak**, M. Selaković, E. Lupšić, A. Podolski-Renić, Ž. Selaković, M. Novakovic, M. Pešić, I. M. Opsenica, "Synthesis of artesunate-pyrimidine hybrids and evaluation of their activity against multidrug-resistant cancer cells", XXVIII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Rome, Italy, September 1-5, 2024, Book of Abstracts P336, page

4. M. Pajović, A. Podolski-Renić, E. Lupšić, **Lj. Koračak**, V. Ajdačić, M. Selaković, M. Novakovic, I. M. Opsenica, M. Pešić, "Two novel pyrimidine-artesunate hybrids overcome multidrug-resistance in non-small cell lung carcinoma through collateral sensitivity", The 1st Regional SDIR-HDIR-MOKAD Congress, Belgrade, Serbia, October 8-10, 2025, Book of Abstracts, P78, page 151.

5. Ž. Selaković, **Lj. Koračak**, V. Ajdačić, M. Selaković, E. Lupšić, M. Pajović, A. Podolski-Renić, M. Novakovic, M. Pešić, I. Opsenica, "New pyrimidine-artesunate hybrid compounds for countering multidrug resistance in non-small cell lung cancer through mechanisms of collateral sensitivity", XXIX EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Basel, Switzerland, September 6–10th, 2026, Book of Abstracts P069, pg. 191.

M64 – Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu

1. **Lj. K. Koračak**, E. Lupšić, M. Jovanović, M. Novakovic, M. Pešić, I. M. Opsenica, "Sinteza novih derivata artemizina sa antitumorskom aktivnošću na rezistentne ćelije raka", 59. Savetovanje

Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 1 – 2. jun **2023**, izvodi radova MH-3, str. 70; ISBN 978-86-7132-081-8.

2. **Lj. Koračak**, V. Ajdačić, M. Selaković, M. Pajović, M. Novaković, E. Lupšić, A. Podolski-Renić, M. Pešić, I. M. Opsenica, "Sinteza novih derivata artesunata i njihova in vitro aktivnost prema ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća", 61. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kragujevac, 4 – 5. jun 2026, izvodi radova P-MH-6, str. 86; ISBN 978-86-7132-091-7.

3. M. Selaković, **Lj. Koračak**, V. Ajdačić, M. Pajović, M. Novaković, E. Lupšić, A. Podolski-Renić, M. Zlatović, M. Pešić, I. M. Opsenica, Novi hibridi artesunata suzbijaju rezistenciju posredovanu P-glikoproteinom u ćelijskoj liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća, 61. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kragujevac, 4 – 5. jun 2026, Kratki izvodi radova (P-MH-10), str. 90; ISBN 978-86-7132-091-7.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Љиљана К. Корачак**

Број индекса: **ДХ02/2020**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синтеза деривата артемизинина који испољавају секетивност ка туморским ћелијама и потенцијал за реверзију резистенције

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Љиљана К. Корачак**

Број индекса: **ДХ02/2020**

Студијски програм: Хемија

Наслов рада: **Синтеза деривата артемизинина који испољавају секетивност ка туморским ћелијама и потенцијал за реверзију резистенције**

Ментори: др Игор Опсеница, др Мирослав Новаковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Синтеза деривата артемизинина који испољавају секетивност ка туморским ћелијама и потенцијал за реверзију резистенције

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. **Ауторство** - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.