



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Silvio Jakopec, Helena Prpić, Helena Šimek

**KONVENCIONALNA I MEHANOKEMIJSKA SINTEZA
HIBRIDA PURINA, PSEUDOPURINA I PIRIMIDINA S
L-ASKORBINSKOM KISELINOM**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Silvane Raić-Malić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

POPIS KORIŠTENIH KRATICA

ATP	adenozin-trifosfat
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije (eng. <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat
CDK	ciklin ovisna kinaza
CoA	koenzim A
CuAAC	bakrom katalizirana azid-alkin cikoadicija
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dTMP	deoksitimidin-monofosfat
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FDA	eng. <i>Food and Drug Administration</i>
FMN	flavin-mononukleotid
HIV	virus humane imunodeficijencije
HOAc	octena kiselina
HSV-1	herpes simpleks virus tipa 1
HSV-2	herpes simpleks virus tipa 2
IC ₅₀	koncentracija koja uzrokuje 50% inhibiciju rasta stanica
IR	infracrveno zračenje
JAK	Janus kinaza
JAK1	Janus kinaza 1
JAK2	Janus kinaza 2
LAG	mljevenje potpomognuto tekućinom
MAPK	kinaza aktivirana mitogenom

NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PTFE	politetrafluoretilen
PTP1B	protein tirozin fosfataza
Raf	kinaza brzo rastućih fibrosarkoma
RNA	ribonukleinska kiselina
S _N 2	bimolekularna nukleofilna supstitucija
TLC	tankoslojna kromatografija
VZC	Varicella zoster virus
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	4
2.1. Biološki važni dušikovi heterocikli	5
2.2. Nukleozidi i nukleozidni analozi	6
2.3. Pirimidini	7
2.4. Purini	9
2.4.2. Deazapurini	12
2.4.2. 7-deazapurini	12
2.5. L-askorbinska kiselina	14
2.6. Triazoli i <i>click</i> kemija	16
2.7. Molekularna hibridizacija	18
2.8. Zelena kemija	20
2.9. Mehanokemija	22
3. CILJ RADA	25
3.1. Cilj rada	26
4. EKSPERIMENTALNI DIO	27
4.1. Opće napomene	28
4.2. Pregled sintetiziranih spojeva	29
4.3. Priprava spojeva	30
4.3.1. Opći postupak pripreme propargiliranih purinskih izostera 10–13	30
4.3.2. Opći postupak pripreme propargiliranih pirimidinskih izostera 14–18	31
4.3.3. Priprava 2,3- <i>O,O</i> -dibenzil-L-askorbinske kiseline (22)	32
4.3.4. Priprava 6- <i>O</i> -tosil-2,3- <i>O,O</i> -dibenzil-L-askorbinske kiseline (23)	32
4.3.5. Priprava 2,3-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-di- <i>O</i> -tosil-L-askorbinske kiseline (24) ...	33
4.3.6. Priprava 6-azido-2,3- <i>O,O</i> -dibenzil-L-askorbinske kiseline (25)	33
4.3.7. Priprava 6-azido-2,3- <i>O,O</i> -dibenzil-4,5-didehidro-5,6-dehidroksi-L-askorbinske kiseline (26)	33
4.3.8. Opći postupak pripreme zasićenih triazolilnih nukleozidnih analoga 27–35	34
4.3.9. Opći postupak pripreme nezasićenih triazolilnih nukleozidnih analoga 36–44	39
5. REZULTATI I RASPRAVA	44
5.1. Sinteza spojeva	45
5.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva	53

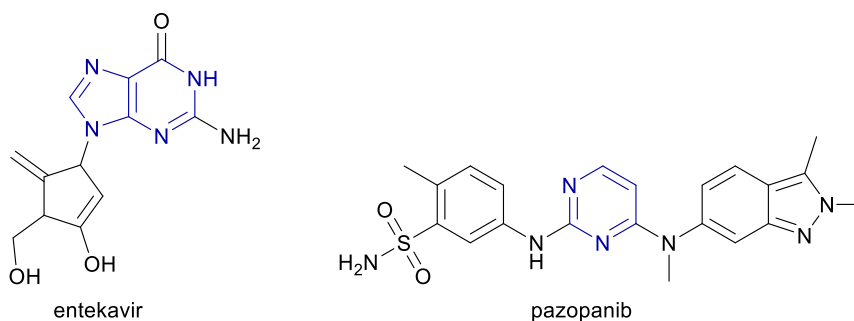
6. ZAKLJUČAK.....	60
7. POPIS LITERATURE.....	63
SAŽETAK RADA	71
SUMMARY	72
8. PRILOZI	73
ŽIVOTOPISI	92

1. UVOD

Rak (karcinom) je bolest koja razara strukturu i normalno funkcioniranje tkiva, te se očituje brzim i nekontroliranim umnažanjem zloćudnih tumorskih stanica.¹ Predstavlja jedan od glavnih zdravstvenih problema današnjice kako u nerazvijenim, tako i u razvijenim zemljama. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organisation*, WHO), ova je bolest odgovorna za 8,8 milijuna smrtnih slučajeva godišnje, a najveći postotak smrtnosti uzrokovan je karcinomom pluća.² Iako je dizajn kemoterapeutika tijekom godina postao uspješan, još uvijek ne postoji terapija koja je u potpunosti djelotvorna protiv karcinoma.³ Dugoročan problem kemoterapije je nedostatak terapije selektivne na pojedini tumor i razvoj rezistentnosti, stoga postoji veliki interes za istraživanje i sintezu novih biološki aktivnih spojeva koji će smanjiti citotoksičnost i rezistentnost te povećati učinkovitost lijeka protiv raka.²

Karcinomi, ali i druge bolesti poput ateroskleroze, Alzheimerove bolesti, astme, reumatoidnog artritisa, osteoartritisa, malarije, tuberkuloze i multiple skleroze ovise o više čimbenika, pa se djelovanje na takve bolesti jednim lijekom pokazalo neefikasnim. Različitim terapijskim pristupima razvijene su strategije za njihovo učinkovitije liječenje, uključujući kombiniranu terapiju. Međutim, kombinirane terapije pokazuju nedostatke poput međudjelovanja lijekova, što može dovesti do različitih nuspojava. Strategija racionalnog dizajna dvaju ili više farmakofora u novi kemijski entitet s boljim farmakološkim svojstvima naziva se molekularna hibridizacija. Molekulski hibridi u odnosu na početne farmakofore mogu imati učinkovitije biološko djelovanje, smanjene nuspojave te mogu djelovati na više meta istovremeno. Jedan od najznačajnijih alata u sintezi molekulskih hibrida je *click* kemija, kojom se farmakofori povezuju preko 1,2,3-triazolne prenosnice.⁴ 1,2,3-triazol posjeduje svojstva idealne prenosnice poput velikog dipolnog karaktera, mogućnosti stvaranja vodikovih veza i stabilnosti *in vivo*. Jaki dipolni moment 1,4-disupstituiranih triazola čini ih akceptorima vodikovih veza pa su skloni vezanju za biološke mete i poboljšavaju topljivost.⁵

Strukturnim promjenama na šećernoj komponenti nukleozida kao i na dušikovim bazama, pirimidinu i purinu, priređen je velik broj analoga koji pokazuju antitumorska, antivirusna, antifungalna, antiparazitska i antibakterijska djelovanja (slika 1).^{6,7}



Slika 1. Primjer purinskog i pirimidinskog antitumorskog lijeka.

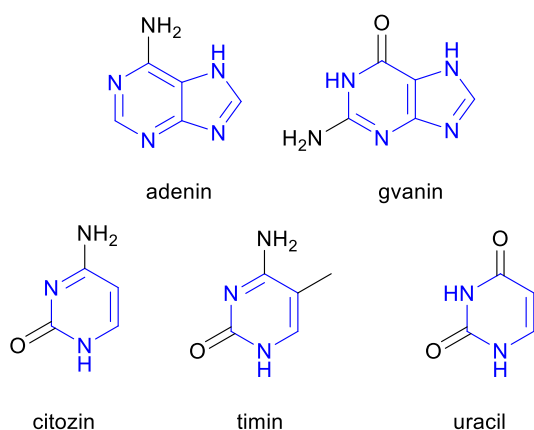
Veliki napori ulažu se u upotrebu obnovljivih izvora energije u kemijskim reakcijama, smanjenje nastanka nusprodukata i njihovog otpuštanja u okoliš te povećanje upotrebe netoksičnih otapala s ciljem veće zaštite ljudskog zdravlja i okoliša, što se naziva zelenom kemijom. Takav pristup pronašao je primjenu u različitim područjima poput farmaceutske industrije, razvoju metoda za pripremu naftnih derivata iz materijala biološkog podrijetla te zelenih katalizatora nove generacije. Uzevši u obzir sve njene prednosti, smatra se da je zelena kemija “*kemija budućnosti*”.⁸ Mehanokemija kao jedna od metodologija zelene kemije predstavlja alternativu klasičnoj sintezi, odnosno ekološki prihvatljiv način provedbe kemijskih reakcija bez upotrebe otapala. Pokretačka sila ovakvih reakcija je mehanička sila, a one se koriste za selektivno dobivanje željenog produkta. Provedbom mehanokemijskih reakcija smanjuje se nastanak štetnih i neželjenih produkata te upotreba otapala što povećava ekonomičnost procesa i smanjuje utjecaj na zdravlje i okoliš, stoga se mehanokemijske reakcije ubrzano razvijaju u posljednjem desetljeću.⁹

U ovom radu pristupom molekularne hibridizacije priređeni su hibridi purina i pirimidina s L-askorbinskom kiselinom vezani preko triazolnog prstena kako bi se priredili spojevi s antitumorskim djelovanjem. U sintezi ciljanih spojeva uspoređene su reakcije provedene konvencionalnom sintezom i mehanokemijske reakcije.

2. OPĆI DIO

2.1. Biološki važni dušikovi heterocikli

Heterocikli koji sadrže dušik široko su rasprostranjeni u prirodi i imaju ključnu ulogu u metabolizmu živih stanica.¹⁰ Sastavni su dijelovi velikog broja prirodnih spojeva poput nukleobaza (slika 2), vitamina B-kompleksa, porfirina, alkaloida, te biološki aktivnih spojeva izoliranih iz morskih organizama, poput antimalarijskog agensa kvinina, lamelarina D i variolina, koji posjeduju citostatsku aktivnost, antimikrobnog agensa benzoskeptrina C i mnogih drugih.¹¹

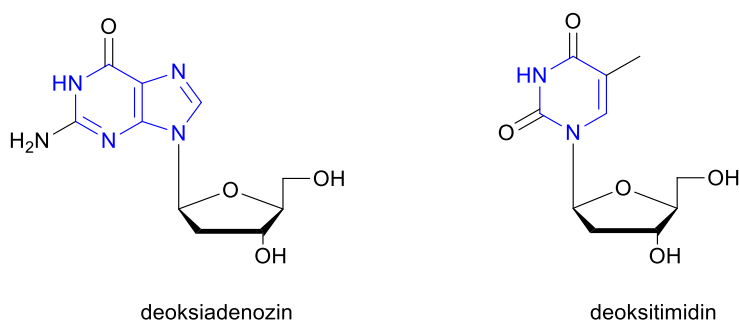


Slika 2. Purinske i pirimidinske nukleobaze.

Nadalje, dušikovi heterocikli jedne su od glavnih strukturnih jedinica lijekova,¹² što ilustrira činjenica da 59% lijekova odobrenih od strane FDA (eng. *Food and Drug Administration*) u svojoj strukturi sadrži dušikov atom.¹³ Dušikovi heterocikli imaju široki spektar biološke aktivnosti, stoga su i jedne od najpoželjnijih struktura pri izboru sinteze molekulskih hibrida.⁴

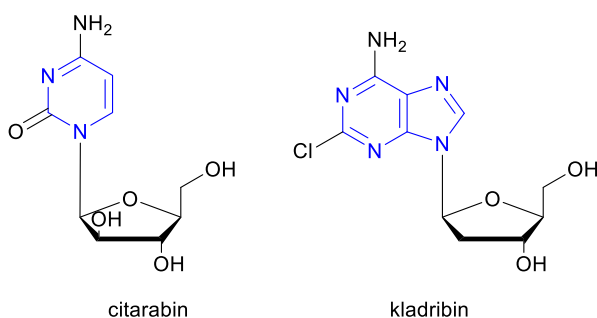
2.2. Nukleozidi i nukleozidni analozi

Ribonukleozidi i deoksiribonukleozidi su glikozilamini građeni od dušikovih heterocikla, purinskih baza adenina i gvanina te pirimidinskih baza citozina, timina i uracila povezanih *N*-glikozidnom vezom na šećer ribozu ili deoksiribozu (slika 3). Povezivanjem 5'-kraja na 3'-kraj fosfatnim skupinama nastaju nukleinske kiseline.



Slika 3. Deoksiribonukleozidi kao sastavni dijelovi nukleinskih kiselina.

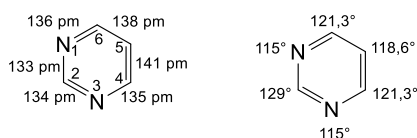
Važno je napomenuti da purinske i pirimidinske baze ne nalazimo u prirodi, već oni postoje u obliku različitih derivata.¹⁴ Njihovi analozi pokazuju različite biološke aktivnosti kao što su antitumorska, antivirusna, antifungalna, antiparazitska i antibakterijska, stoga se smatraju izuzetno važnim strukturnim jednicama u razvoju novih biološki aktivnih spojeva.⁶ Antiproliferativna aktivnost jedna je od najizraženijih aktivnosti analoga dušičnih baza. Utvrđeno je da takvi derivati induciraju apoptozu tijekom rasta i diobe stanica inhibicijom enzima koji sudjeluju u tim procesima. Brojni nukleozidni analozi, poput citarabina i kladribina, odobreni su kao antitumorski lijekovi (slika 4).¹⁵



Slika 4. Primjeri nukleozidnih derivata odobrenih kao antitumorski lijekovi.

2.3. Pirimidini

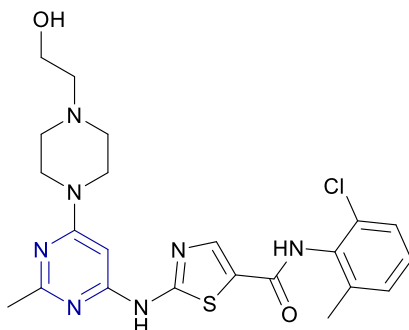
Pirimidin (1,3-diazin) je aromatski, šesteročlani prsten građen od četiri atoma ugljika i dva atoma dušika u položaju 1 i 3. Strukturno je sličan benzenu i piridinu, ali za razliku od benzena ima nepravilnu heksagonsku strukturu sa šest različitih duljina veza i četiri različita vezna kuta (slika 5).



Slika 5. Strukturni prikaz pirimidina.

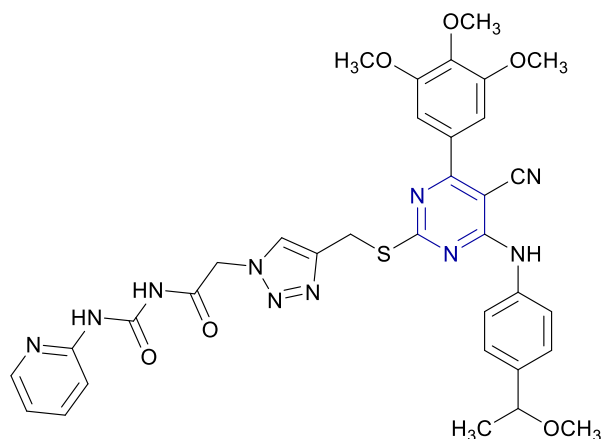
Dva dušikova atoma pirimidinskog prstena imaju elektron-odvlačeća svojstva te smanjuju elektronsku gustoću na atomima C-2, C-4 i C-6. Zbog toga su ti položaji podložni nukleofilnom napadu, dok se elektrofilne reakcije odvijaju na atomu C-5 ili dušikovom atomu.¹⁶

Kao što je već navedeno, pirimidin je sastavni dio nukleobaza timina, uracila i citozina (slika 2). Nalazi se u strukturi nekih vitamina poput tiamina (vitamin B₁), riboflavina (vitamin B₂) i folne kiseline (B₉).¹ Iako osnovna struktura pirimidina ne pokazuje farmakološku aktivnost, derivati pirimidina pokazali su izvrsna biološka djelovanja.¹² Zbog toga se derivati pirimidina nalaze u strukturi brojnih lijekova poput dasantiniba (slika 6), citostatika koji se koristi u liječenje raka pluća i gušterače, te drugih antitumorskih (imatinib, nilotinib), anti-HIV (zidovuzin, stavudin), antiinflamatornih lijekova (sulfadiazin), te antidepresiva (buspiron), lijekova za kardiovaskularne bolesti (minoksidil, bosentan) i urološka oboljenja (avanfil).^{12,13}



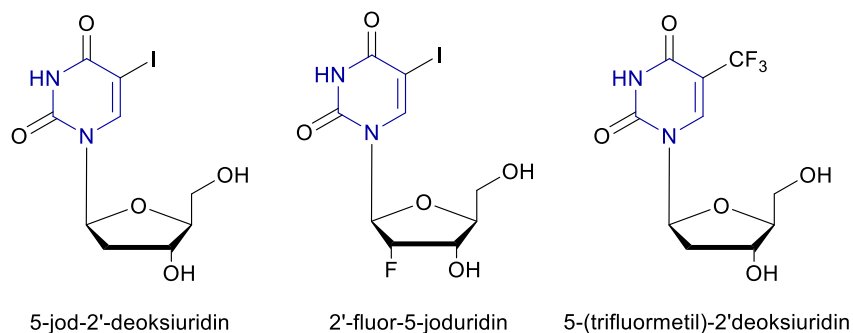
Slika 6. Strukturna formula citostatika dasantiniba.

Konjugati pirimidina s različitim heterociklima pokazali su poboljšano biološko djelovanje u odnosu na polazni pirimidin. Primjerice, konjugati 1,2,3-triazola i pirimidina pokazuju povećanu citostatsku aktivnost od samog triazola i pirimidina. Pirimidinski derivat prikazan na slici 7 pokazao je snažnu antiproliferativnu aktivnost protiv stanica raka kože ($IC_{50} = 32 \text{ nM}$).²



Slika 7. Primjer derivata pirimidina i triazola s antitumorskim djelovanjem.

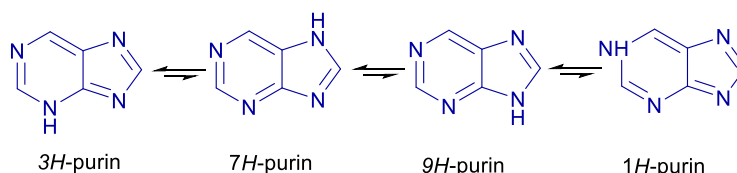
Nadalje, velik broj nukleozidnih analoga supstituiranih na C-5 položaju pirimidina pokazuju snažnu biološku aktivnost, poput 5-jod-2'-deoksiuridina, 2'-fluor-5-joduridina i 5-(trifluormetil)-2'-deoksiuridina, koji se koriste kao antivirusni lijekovi protiv infekcija uzrokovanih virusom herpes simpleks (HSV) (slika 8).¹⁷



Slika 8. Primjeri C-5 supstituiranih pirimidinskih antivirusnih lijekova.

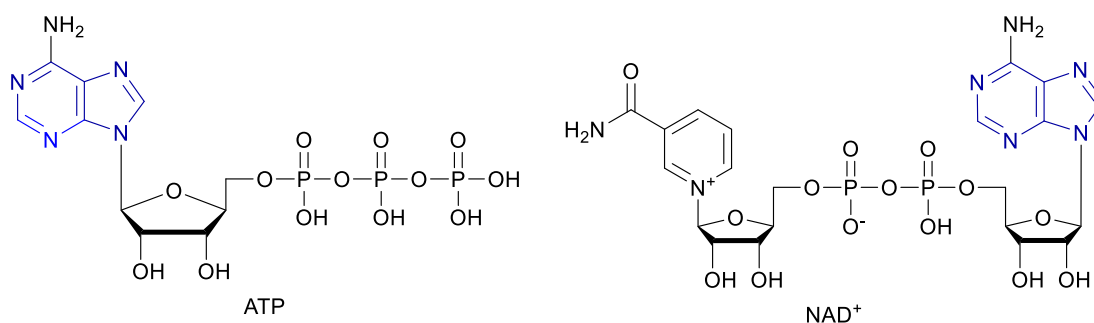
2.4. Purini

Purin ili imidazo[4,5-*d*]pirimidin¹⁸ jedan je od najraširenijih heterocikla u prirodi.¹⁹ Može se nalaziti u četiri tautomerna oblika: *1H*, *3H*, *7H* i *9H* (slika 9). U otopini su najstabilniji *7H* i *9H* tautomerni oblici, dok je *7H* oblik dominantan u krutom stanju. Prvi ga je sintetizirao nobelovac Emil Fischer prije više od 100 godina.¹⁸



Slika 9. Strukturni prikaz tautomera purina.²⁰

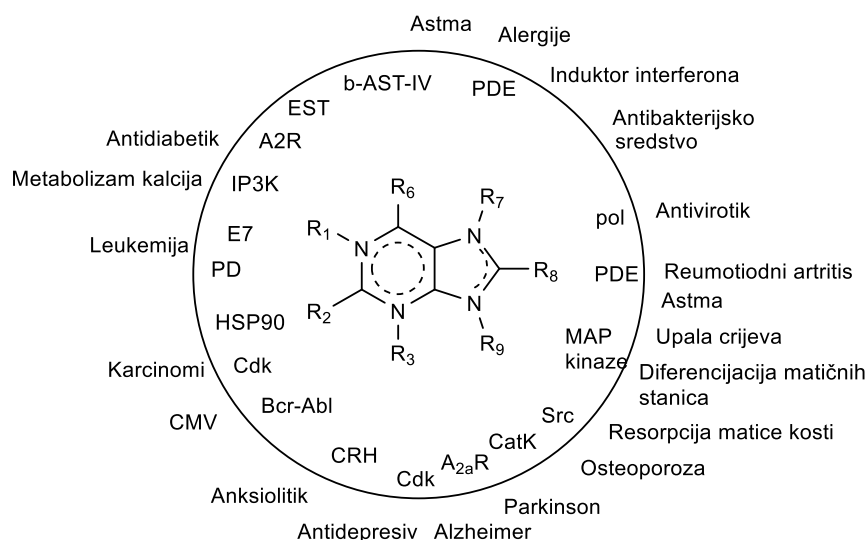
Purinski derivati sastavni su dio biološki važnih biomolekula poput ATP-a i njihovih cikličkih analoga, prenositelja elektrona (NAD^+ , FAD, FMN), koenzima (CoA), ksantinskih alkaloidnih derivata (teofilina, kofeina) i mnogih drugih (slika 10).¹⁹ ATP sudjeluje u metaboličkim procesima i odgovoran je za prijenos energije te je jedan od četiriju monomera nužnih za sintezu RNA. NAD^+ i FAD su kofaktori enzimskih redoks reakcija, acetil-koenzim A središnja je molekula biokemijskih ciklusa koja prenosi aktiviranu acetilnu skupinu, dok je teofilin zadužen za unutarstaničnu distribuciju i regulaciju protoka kalcija kroz organizam te stimulira srčane mišiće.¹⁴



Slika 10. Purinske biomolekule ključne u primarnom metabolizmu.

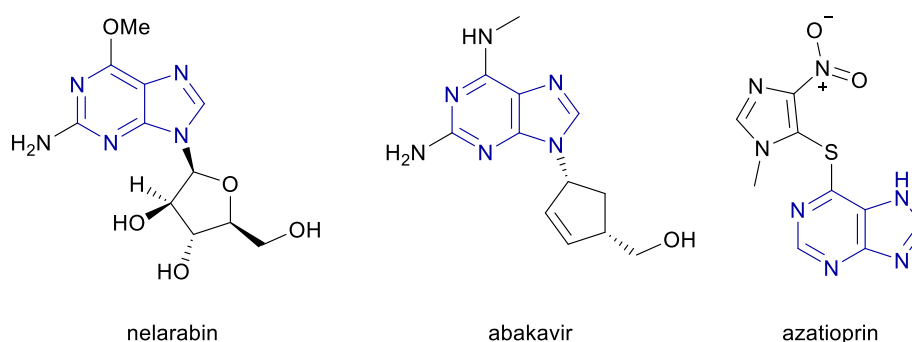
Zbog ključne uloge u različitim biološki važnim procesima purinsku jezgru prepoznaje velik broj enzima poput različitih proteinskih kinaza (CDK, MAPK, JAK, Raf i dr.), sulfontransferaza, fosfodiesteraza i dr. (slika 11). Proteinske kinaze su enzimi koji kataliziraju prijenos γ -fosfatne skupine molekule ATP na supstrat i reguliraju različite stanične aktivnosti, uključujući proliferaciju, apoptozu, razgradnju, diferencijaciju i mnoge druge. Važna su meta lijekova protiv raznih bolesti kao što su tumori, upalne bolesti, bolesti središnjeg živčanog

sustava, kardiovaskularnih bolesti i komplikacija kod dijabetesa.²¹⁻²⁶ Od 28 klinički odobrenih inhibitora kinaza, većina su inhibitori tirozin-kinaze.²⁷ Purinska jezgra važan je farmakofor koji utječe na sintezu i funkcije nukleinskih kiselina i enzima te je jedna od najzastupljenijih heterocikličkih jezgri koji se nalazi u strukturi inhibitora kinaza.²⁸



Slika 11. Shematski prikaz potencijalnog djelovanja purinskih derivata kao lijekova (unutar kruga prikazane su mete djelovanja, a izvan kruga bolesti na koje se odnosi meta).²⁹

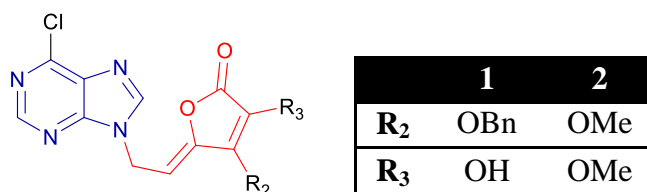
Analozi purina pokazali su antitumorsku, antituberkuloznu, antimikrobnu, antifungalnu, antineoplastičnu i antivirusnu,³⁰ te su odobreni kao antitumorski lijekovi (nelarabin, kladribin), antivirusni lijekovi (abakavir) i imunosupresivi (azatioprin) (slika 12).¹³



Slika 12. Primjeri purinskih lijekova.

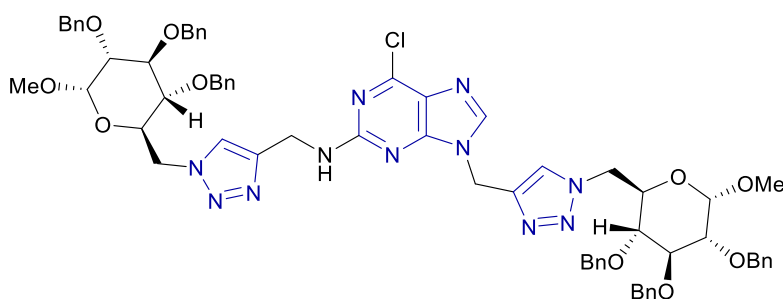
Istraživanja su pokazala da 6-klorpurinski derivati purina i L-askorbinske kiseline, koja imitira šećer, pokazuju snažnu inhibitornu aktivnost prema zloćudnim tumorskim stanicama leukemije limfoblasta (CEM), mišje leukemije (L1210), karcinoma grlića maternice (HeLa) i karcinoma gušterače (Mia-PaCa-2) (slika 13). Osim antumorskog,

pokazali su i antivirusno djelovanje na herpes simpleks tipa 1 i 2 (HSV-1, HSV-2) te varicella zoster virus (VZC).³³



Slika 13. Strukturni prikaz 6-klorpurinskih nukleozidnih analoga.

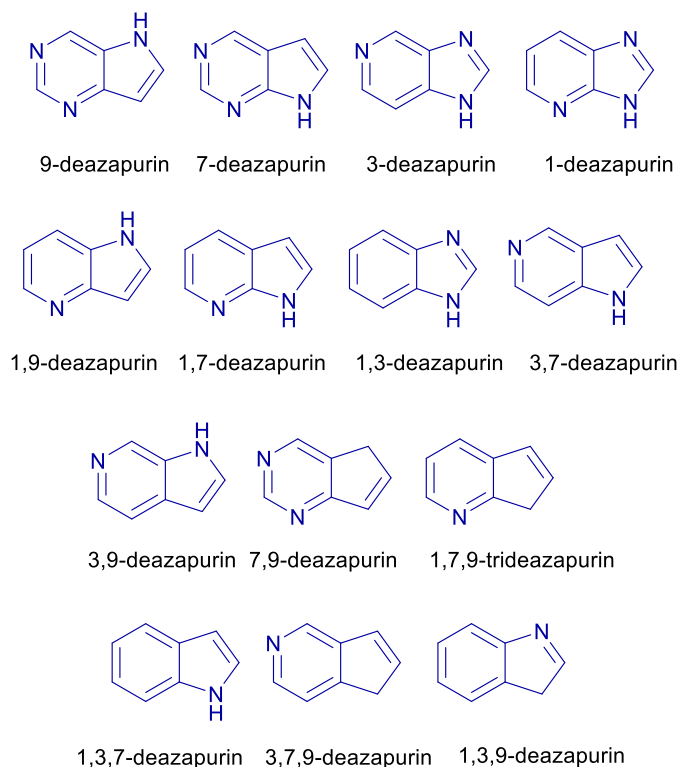
Luo i suradnici¹⁸ su primjenom azid-alkin cikloadicije kataliziranom bakrom(I) uspješno priredili hibride purina s glukopiranozilom vezanih preko 1,2,3-triazolnog prstena. Priređeni spojevi pokazali su snažno inhibitorno djelovanje na PTP1B kinazu ($IC_{50}=2,2\mu M$) (slika 14).



Slika 14. Primjer purinskog derivata koji djeluje kao inhibitor kinaze.

2.4.2. Deazapurini

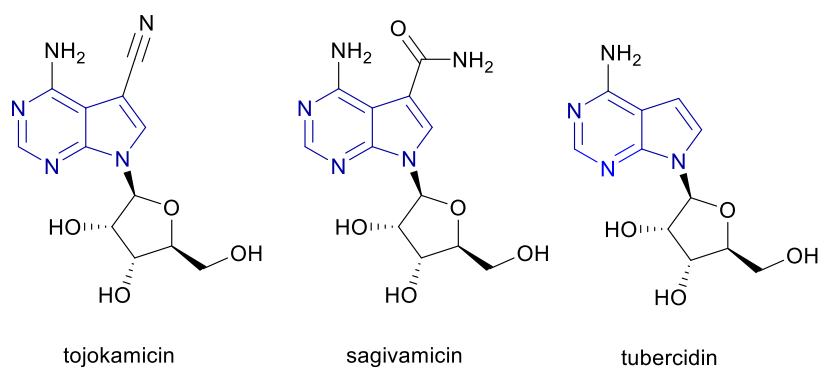
Bioizosteri su spojevi s izmijenjenim osnovnim skeletom molekule i/ili supstituentom na molekuli, u svrhu dobivanja novih spojeva s poboljšanom biološkom aktivnosti.³¹ Deazapurini su purinski izosteri kojima je dušikov atom zamijenjen ugljikovim atomom (slika 15). Njihovi derivati pokazuju širok spektar biološkog djelovanja poput antitumorske, antivirusne i antituberkulozne aktivnosti.³²



Slika 15. Prikaz deazapurinskih izostera.

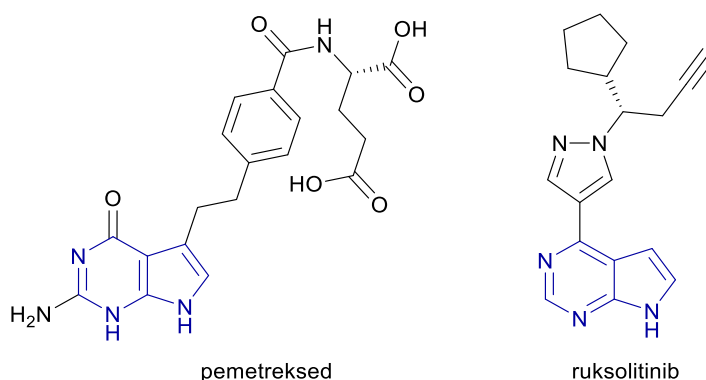
2.4.2.1. 7-deazapurini

Pirol[2,3-*d*]pirimidini ili 7-deazapurini purinski su izosteri kod kojih je dušikov atom u položaju 7 zamijenjen ugljikovim atomom.³⁴ Zamjenom N-7 atoma peteročlani prsten postaje bogatiji elektronima, što omogućuje uvođenje dodatnih supstituenata u C-7 položaj. Zbog male razlike u strukturi u odnosu na purine, ti se spojevi umeću u nukleinske kiseline i inhibiraju njihovu sintezu i replikaciju.³⁵ 7-deazapurinski nukleozidi pokazuju antitumorsku, antibakterijsku, antivirusnu, antiinflamatornu i antihiperглиkemijsku aktivnost,³⁴ prisutni su u prirodnim antibioticima poput tojokamicina, sagivamicina i tubercidina (slika 16).³⁶



Slika 16. Strukturni prikaz prirodnih antibiotika.

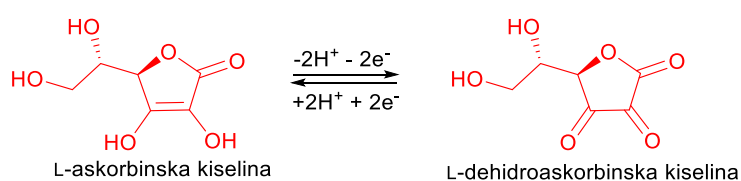
Ovaj purinski izoster sastavni je dio i nekih antitumorskih lijekova poput pemetrekseda i ruksolitiniba (slika 17). Pemetreksed je 7-deazagvaninski derivat koji inhibira rast staničnih linija mezotelioma (MSTO-211H, NCI-H2052), malignog karcinoma koji najčešće zahvaća pluća. Djeluje na način da se veže i inhibira enzim timidilat-sintazu koja katalizira nastanak dTMP-a, prekursora nužnog za sintezu DNA.³⁷ Ruksolitinib se koristi u liječenju srednje do visoko rizične mijelofibroze. On se veže i inhibira Janus kinaze, JAK1 i JAK2, smanjujući upalu i inhibira proliferaciju stanica.³⁸



Slika 17. 7-deazapurinski citostatici.

2.5. L-askorbinska kiselina

L-askorbinska kiselina, poznata još i kao vitamin C, strukturno je jedinstvena peteročlana kiselina laktonskog šećera,³⁹ vrlo slična glukozi i topljiva u vodi.⁴⁰ Sadrži kiselu hidroksilnu skupinu koja je u neutralnom mediju potpuno disocirana. Ostale četiri hidroksilne skupine prisutne u strukturi kiseline pokazuju različitu reaktivnost prema elektrofilima u bazičnim uvjetima. Zbog njihovog jako hidrofilnog karaktera kiselina je netopljiva u organskim otapalima. Jedna je od najvažnijih biomolekula³⁹ prisutnih u aerobnim organizmima,⁴¹ gdje sudjeluje u mnogim biokemijskim procesima poput reakcija hidroksiliranja, pri čemu se oksidira do dehidroaskorbinske kiseline (shema 1).³⁹



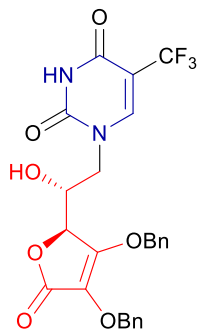
Shema 1. Prikaz oksidacije i redukcije L-askorbinske kiseline.

Elektronima bogata endiolna skupina odgovorna je za njena elektron-donorska i elektron-akceptorska svojstva, a mogućnost doniranja elektrona odgovoran je za većinu kemijskih i bioloških funkcija L-askorbinske kiseline.³⁹ Biokemijski mehanizam djelovanja u različitim sustavima povezan je s njenim antioksidativnim svojstvima.⁴¹ L-askorbinska kiselina, primarno djeluje kao antioksidans i uklanja radikale³⁹ uključene u razvoj mnogih kroničnih bolesti poput karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, oštećenja mozga, starenja, reume, upala, moždanih udara i AIDS-a.⁴¹

Vitamin C pri fiziološkoj pH-vrijednosti uglavnom postoji u obliku askorbatnog aniona.⁴² Količina vitamina C u ljudskom tijelu značajno utječe na mnoge metaboličke puteve kao što su ravnoteža željeza i bakra, transport masnih kiselina, endokrine funkcije, kontrola krvnog tlaka, sinteza kolagena, metabolizam peptida, imunološki odgovor i ostale. Njegov nedostatak uzrokuje skorbut koji može dovesti do smrti.⁴¹ U prirodi ga nalazimo u brokoli, kupusu, kelju, krumpiru, grašku, crvenoj paprici, prokulicama, cvjetači, jagodama, mangu i citrusu.⁴³

Derivati L-askorbinske kiseline imaju važna farmakološka svojstva,⁴¹ kao što su citotoksičnost⁴³ i antivirusno djelovanje.⁴⁴ 6-bromo-6-amino-*N,N*-dimetil-6-amino-6-deoksi-derivati L-askorbinske kiseline pokazali su inhibitorsko djelovanje na rast stanica karcinoma

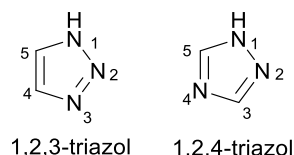
grlića maternice (HeLa), karcinoma gušterače (MiaPaCa2) i karcinoma grkljana (Hep2). Raić-Malić i suradnici pripremili su niz purinskih i pirimidinskih derivata L-askorbinske kiseline koji su se pokazali izraženo inhibitorско djelovanje protiv stanica leukemije Molt4/C8 (slika 18).⁴⁵



Slika 18. Pirimidinski derivat L-askorbinske kiseline koji je pokazao najbolja antiproliferativna svojstva na stanice limfocita ($IC_{50} = 0,9 \mu M$).⁴⁵

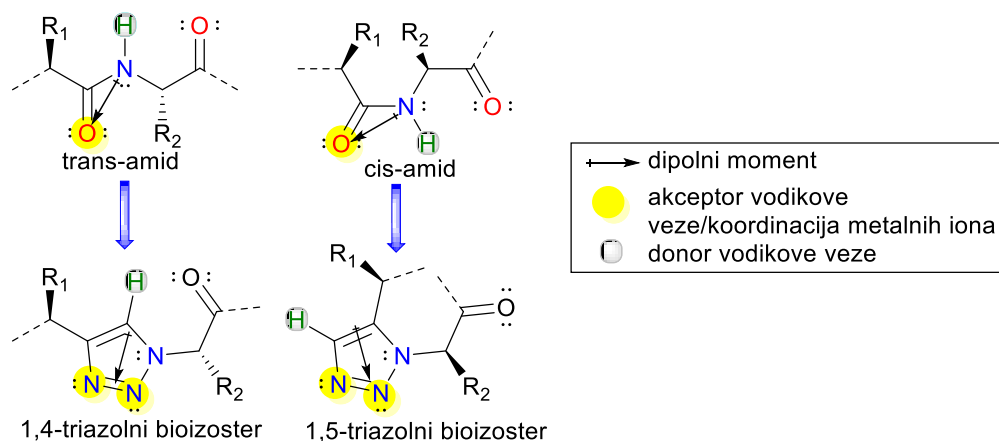
2.6. Triazoli i *click* kemija

Triazoli su heterociklički aromati koji se sastoje od peteročlanog prstena s dvije nezasićene veze te dva ugljikova i tri dušikova atoma, a mogu se nalaziti u obliku 1,2,3- i 1,2,4- izomera (slika 19).



Slika 19. Izomerni oblici triazola.

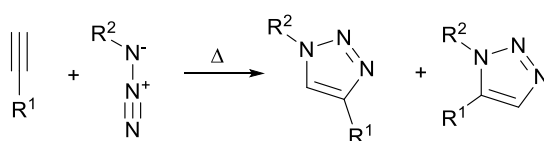
Zbog snažnog dipolnog momenta, 1,2,3-triazoli ponašaju se kao bioizosteri amidne veze u bioaktivnim molekulama, a mogućnost stvaranja vodikovih veza povećava njihovu topljivost.⁴⁶ Kod 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola, N2 i N3-atomi akceptori su vodikove veze poput karbonilne skupine amidne veze, a vodik vezan na položaju 3 donor je vodikove veze i oponaša vodikov atom amidne veze (slika 20). Visok afinitet prema biološkim metama posljedica je stvaranja vodikovih veza te dipol-dipol interakcija i π -slaganja.⁴⁷⁻⁵¹ Nadalje, oni su stabilni prema metaboličkoj i kemijskoj razgradnji te inertni prema oksidativnim i reduktivnim uvjetima i hidrolizi, čak i na visokim temperaturama. 1,2,3-triazolni derivati pokazali su antitumorsku, anti-HIV, antituberkuloznu, antifungalnu i antiparazitsku aktivnost.⁵²



Slika 20. Izosteri 1,2,3-triazola.

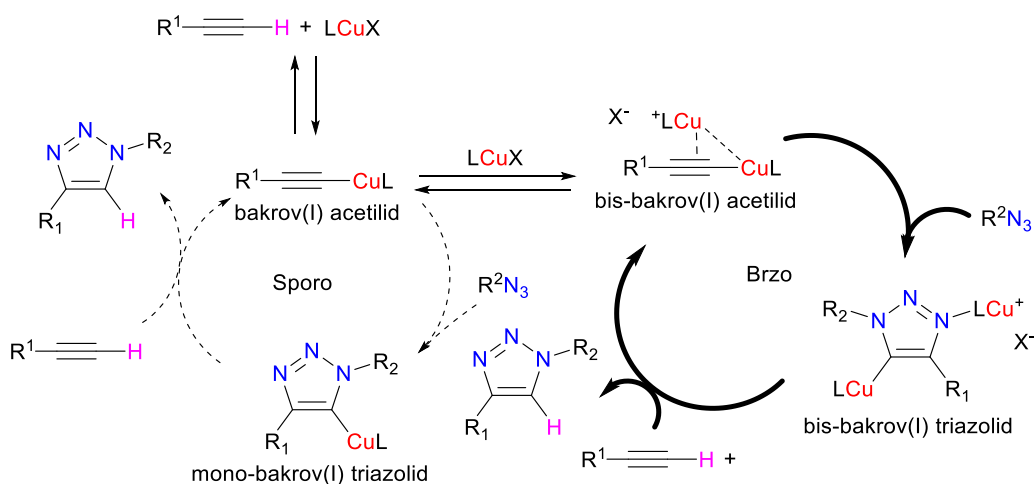
Sintezu triazola opisao je Huisgen 1961. godine, pri čemu je reaktante cikloadicije promatrao kao 1,3-dipole, s razdvojenim nabojem koji posjeduje više rezonantnih struktura, i nezasićene dipolarofile.⁵²

Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija predstavlja veliki potencijal za dobivanje spojeva sa širokim spektrom biološke aktivnosti zbog raznih mogućnosti supstitucije polaznih alkina i azida. Međutim, sama reakcija pri visokim temperaturama nije selektivna te mogu nastati 1,4- ili 1,5-regioizomeri (shema 2), koji se teško odvajaju klasičnim kromatografskim metodama. Sharpless i suradnici opisali su *click* kemiju kao skup reakcija koje se mogu prirediti primjenom jednostavnih, selektivnih kemijskih transformacija u visokom iskorištenju s velikim opsegom supstrata neosjetljivih na kisik i vodu. *Click* reakcijama nastaje neznatan broj nusprodukata, te osim jednostavnih reakcijskih uvjeta, odlikuju se i visokom čistoćom produkta.⁵³



Shema 2. Huisgenova cikloadicija kojom nastaje smjesa 1,4- i 1,5-regioizomera.

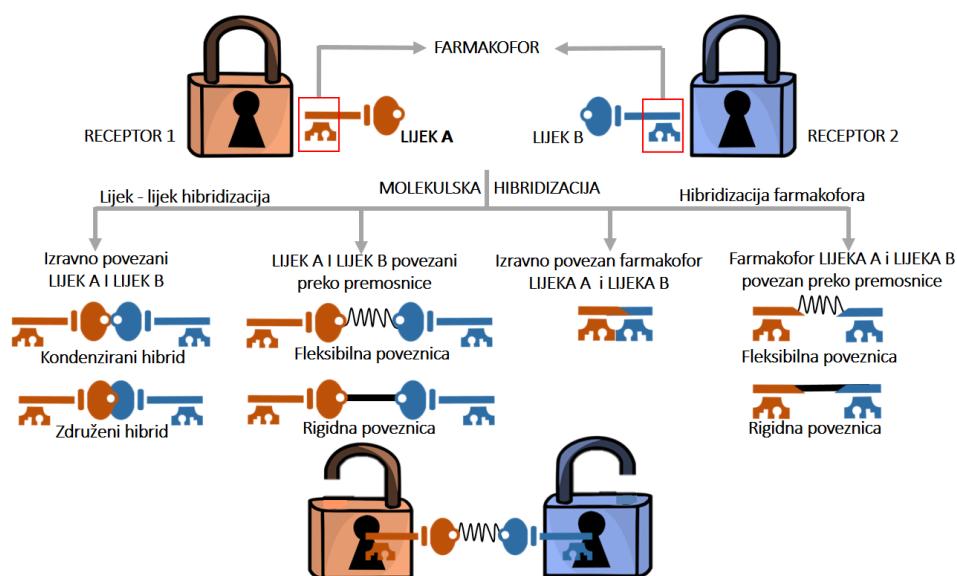
Sharpless, vođen tom idejom, u okviru *click* kemije optimirao je Huisgenovu reakciju dobivanja triazola korištenjem bakrovih(I) soli kao katalizatora te poboljšao regiospecifičnost cikloadicije. Tako je razvijena azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom(I) (CuAAC) čiji je produkt samo 1,4-disupstituirani izomer.⁵⁴ Fokin i suradnici dokazali su da se sama reakcija odvija uz prisutnost dva atoma bakra.⁵⁵ Izolacijom reaktivnih intermedijera dokazano je formiranje σ,π -bis(bakar)-acetilidnih kompleksa i otkrila nastajanje bis-metalnih triazolnih kompleksa. Izolirani katalitički kompleksi pokazali su izrazitu stabilnost i neosjetljivost na zrak, otapalo i vlagu, čime je objašnjena primjenjivost CuAAC reakcije u velikom broju otapala pri blagim reakcijskim uvjetima. Spektroskopska karakterizacija izoliranih kompleksa uz kinetičke eksperimente pokazala je da se reakcija odvija u dva katalitička ciklusa, preko mono- i bis-bakrovih kompleksa (shema 3). U sporom katalitičkom ciklusu, bakrov(I) acetilid reakcijom s azidom daje mononuklearni bakrov(I) triazolidni prsten koji uslijed protoniranja alkinom daje konačni produkt, a bakrov(I) acetilid vraća se u katalitički ciklus. Brzi katalitički ciklus odvija se preko σ,π -bis(bakar)-acetilidnog kompleksa od kojih σ -vezani bakrov atom utječe na nukleofilna svojstva acetilida, a π -vezani bakrov atom koordinira cikloadiciju.⁵⁶



Shema 3. Mehanizam 1,3-dipolarne cikloadicije katalizirane bakrom(I).

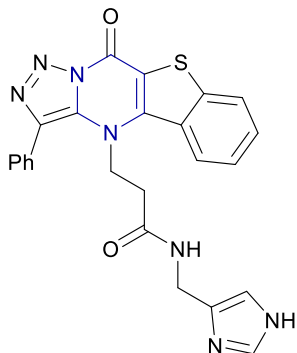
2.7. Molekularna hibridizacija

Molekularna hibridizacija je strategija racionalnog dizajna novih spojeva koja se temelji na kovalentnom povezivanju dvaju ili više farmakofora s ciljem dobivanja novih spojeva sa snažnijim djelovanjem u odnosu na početne spojeve (slika 21).⁵⁷ Ovaj pristup omogućio je optimizaciju bioloških svojstava, poput afiniteta i selektivnosti već poznatih citostatika.⁵⁸ Nadalje, uvođenjem dodatnog farmakofora u već poznati lijek mogu se ublažiti njegove nuspojave, smanjiti toksičnost i pojačati djelovanje, ujedno smanjujući mogućnost međudjelovanja lijekova i razvoja rezistentnosti.⁵⁹ Ovom strategijom uspješno su priređeni hibridi koji ciljano djeluju na bolesti ovisne o više faktora poput karcinoma, malarije, tuberkuloze, AIDS-a i drugih.⁵⁸



Slika 21. Shematski prikaz molekulske hibridizacije.⁵⁷

Lauria i suradnici¹² sintetizirali su hibride tieno-triazolo-pirimidina koji su pokazali snažnu antiproliferativnu aktivnost pri nanomolarnim koncentracijama, a *in vivo* istraživanja pokazala su da imaju nisku citotoksičnost na normalne stanice (slika 22).



Slika 22. Spoj koji je među sintetiziranim konjugatima tieno-triazolo-pirimidina pokazao najjaču antiproliferativnu aktivnost i nisku citotoksičnost.

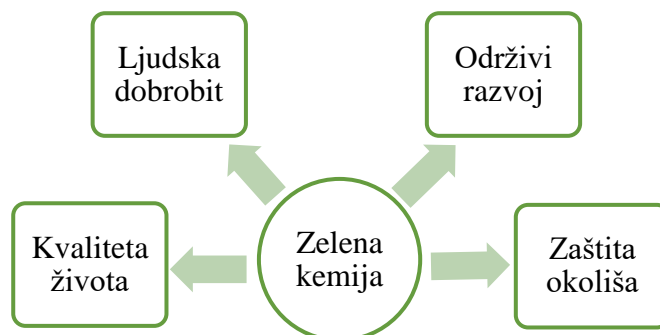
2.8. Zelena kemija

Zelena kemija definirana je kao područje kemije koje osmišljava kemijske proizvode i procese neškodljive za okoliš, te sprječava nastajanje onečišćenja ili ih pokušava umanjiti.⁶⁰ Temelji zelene ili održive kemije započeli su devedesetih godina dvadesetog stoljeća, kada su Anatas i Warner utvrdili dvanaest načela zelene kemije, koja govore o uklanjanju ili smanjenju štetnih tvari iz sinteze, proizvodnje i primjene kemijskih produkata, odnosno iskorištenju procesa, broju potrebnih sintetskih stupnjeva, selektivnosti reakcija itd. (slika 23).⁶¹ Ciljevi zelene kemije u zaštiti okoliša i ekonomskoj dobiti mogu se ostvariti u biokatalizi, katalizi, uporabi alternativnih obnovljivih sirovina (biomasa), alternativnih reakcijskih medija (voda, ionske kapljevine, superkritične tekućine) i alternativnih reakcijskih uvjeta (aktivacija mikrovalnim zračenjem i dr.).⁶²



Slika 23. Dvanaest načela zelene kemije.

Najznačajniji alternativni izvori energije su mikrovalno zračenje, ultrazvučno zračenje, reakcije inducirane svjetlošću i mehanokemijske reakcije. Upotrebom alternativnih izvora energije u organskoj sintezi omogućeno je prevladanje problema poput prekomjernog zagrijavanja ili gubljenja energije, što dovodi do učinkovitije provedbe reakcije, te korištenje ekološki prihvatljivijih reakcijskih uvjeta (slika 24).⁶³



Slika 24. Zelena kemija u kontekstu glavnih pokretača razvoja suvremene kemije.⁶³

2.9. Mehanokemija

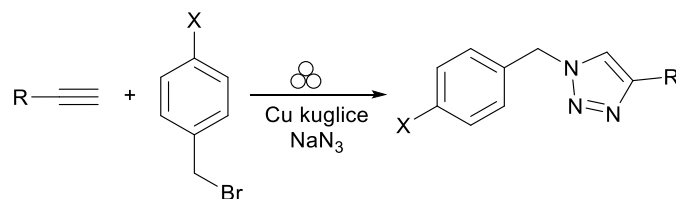
Mehanokemijske reakcije su općenito reakcije potaknute mehaničkom silom.⁶⁴ Razvile su se kao dio zelene kemije, s ciljem smanjenja kemijskog onečišćenja.⁶⁵ Takve se reakcije provode u zatvorenim mlinovima, koji omogućuju izolaciju uzorka, te kontrolu parametara za optimiranje reaktivnosti, poput frekvencije, te omogućuju preciznu i ciljanu konverziju reaktanata, odnosno pokazuju veću kontrolu stehiometrije.⁶⁶ Energija mehanokemijskih reakcija velikim dijelom ovisi o miješanju kuglica i površinskoj aktivaciji te ne zahtjeva smanjenje čestica na nanometarske veličine. Iako se razumijevanje i tehnike procjene unosa energije u mehanokemijskim reakcijama još uvijek istražuju, pokazano je kako su reakcije u krutom stanju energetski povoljnije u odnosu na reakcije u otopinama.⁶⁷ Kemijske reakcije inducirane mehaničkim silama brzo se razvijaju u različitim područjima sinteze i znanosti o materijalima, uključujući anorganske, organske i supramolekulske materijale, intermetalne spojeve, nanočestice i u sintezi farmaceutskih spojeva. Smatra se da će medicinska mehanokemija kao nova istraživačka disciplina imati snažan utjecaj na razvoj novih biološki aktivnih sredstava te zadovoljiti sve veće zahtjeve farmaceutske industrije za zelenim i učinkovitim pristupom organskoj sintezi.⁶⁸

Mehanokemija obuhvaća tri glavna istraživačka područja u kojima mehanička sila potiče promjenu kemijskih veza, a to su mljevenje, sonokemijske reakcije i jednomolekulska manipulacija reakcije.⁶⁵ Najčešće se upotrebljavaju planetarni (eng. *planetary mill*) i vibracijski mlinovi (eng. *shaking mill*). U vibracijskom mlinu posude s reaktantom gibaju se naprijed-nazad, frekvencijom koja određuje intenzitet mljevenja. Ova metoda koristi se za male količine krute tvari, dok se u planetarnom mlinu posude s reaktantom rotiraju oko centralne i vlastite osi, poput planeta u Sunčevom sustavu, pri čemu nastaje centrifugalna sila koja oponaša gravitaciju. Planetarni mlinovi imaju široku primjenu u industriji uz moguću *scale-up* procesa. Reakcijske posude i kuglice u mlinu najčešće su građene od nehrđajućeg čelika, cirkonijeva oksida, volfram karbida ili politetrafluoretilen (teflon).⁶⁹⁻⁷¹ Kako bi se omogućila što veća kontrola reaktivnosti, istražuju se nove tehnike upotrebe katalitičkih aditiva, među kojima se najviše ističe mljevenje potpomognuto tekućinom (eng. *liquid-assisted grinding*, LAG).⁶ Tu se koristi mala količina tekućine kako bi se reakcija ubrzala i usmjerila.^{68,72}

Mehanokemija je našla sve veću primjenu u organometalnim reakcijama poput Suzuki-Miyaurine reakcija, Huisgenove cikloadicije, reakcija metateze olefina, aktivacije C–H veze i drugim reakcijama. Primjerice, reakcije CuAAC provedene bez otapala pokazale su

znatno skraćivanje vremena reakcije, smanjenje potrebne energije i veća iskorištenja. Uspješno su primijenjeni standardni katalitički sustavi poput bakrovih(II) soli, ali i heterogenih bakrovih(0) katalizatora, poput posuda za mljevenje bakra ili bakrov prah.⁶⁹

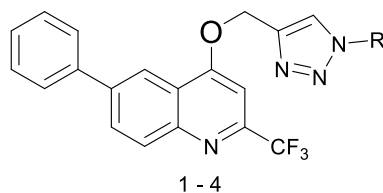
Mack i suradnici⁷³ uspješno su zamijenili konvencionalne katalizatore metalnim površinama. Tako je korištenjem kuglica za mljevenje od bakra provedena Huisgenova cikloadicija (shema 4).



Shema 4. Reakcija Huisgenovog unakrsnog povezivanja bez upotrebe bakra kao katalizatora.

Raić-Malić i suradnici⁶⁸ istražili su *click* reakcije *N*-heterocikličkih hibrida kinolina i 1,2,3-triazola katalizirane bakrom i usporedili učinkovitost konvencionalnih i mehanokemijskih *click* reakcija (tablica 1). CuAAC-reakcije potpomognute mehaničkom silom, bez upotrebe otapala, pokazale su znatno bolja iskorištenja u odnosu na reakcije provedene konvencionalnim putem, pri čemu je iskorištenje reakcije povećano između 10% i 20% korištenjem bakrovog(I) jodida, kao katalizatora, uz bazu *N,N*-diizopropiletilamin.

Tablica 1. Reakcijski uvjeti i iskorištenja u *click* sintezi 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola, mehanokemijski (bez otapala) i konvencionalnim putem (s otapalom).⁶⁸



Spoj	R	Konvencionalna <i>click</i> reakcija	Iskorištenje (%)	Mehanokemijska <i>click</i> reakcija	Iskorištenje (%)
<u>1</u>		Metoda 1a	21	Metoda 2a	57
		Metoda 1b	5	Metoda 2b	85
		Metoda 1a*	77	Metoda 2c	77
<u>2</u>		Metoda 1a	45	Metoda 2a	60
		Metoda 1b	40	Metoda 2b	87
		Metoda 1a*	76	Metoda 2c	80
<u>3</u>		Metoda 1a	89	Metoda 2a	77
		Metoda 1b	52	Metoda 2b	92
		Metoda 1a*	89	Metoda 2c	87
<u>4</u>		Metoda 1a	10	Metoda 2a	72
		Metoda 1b	5	Metoda 2b	79
		Metoda 1a*	21	Metoda 2c	76

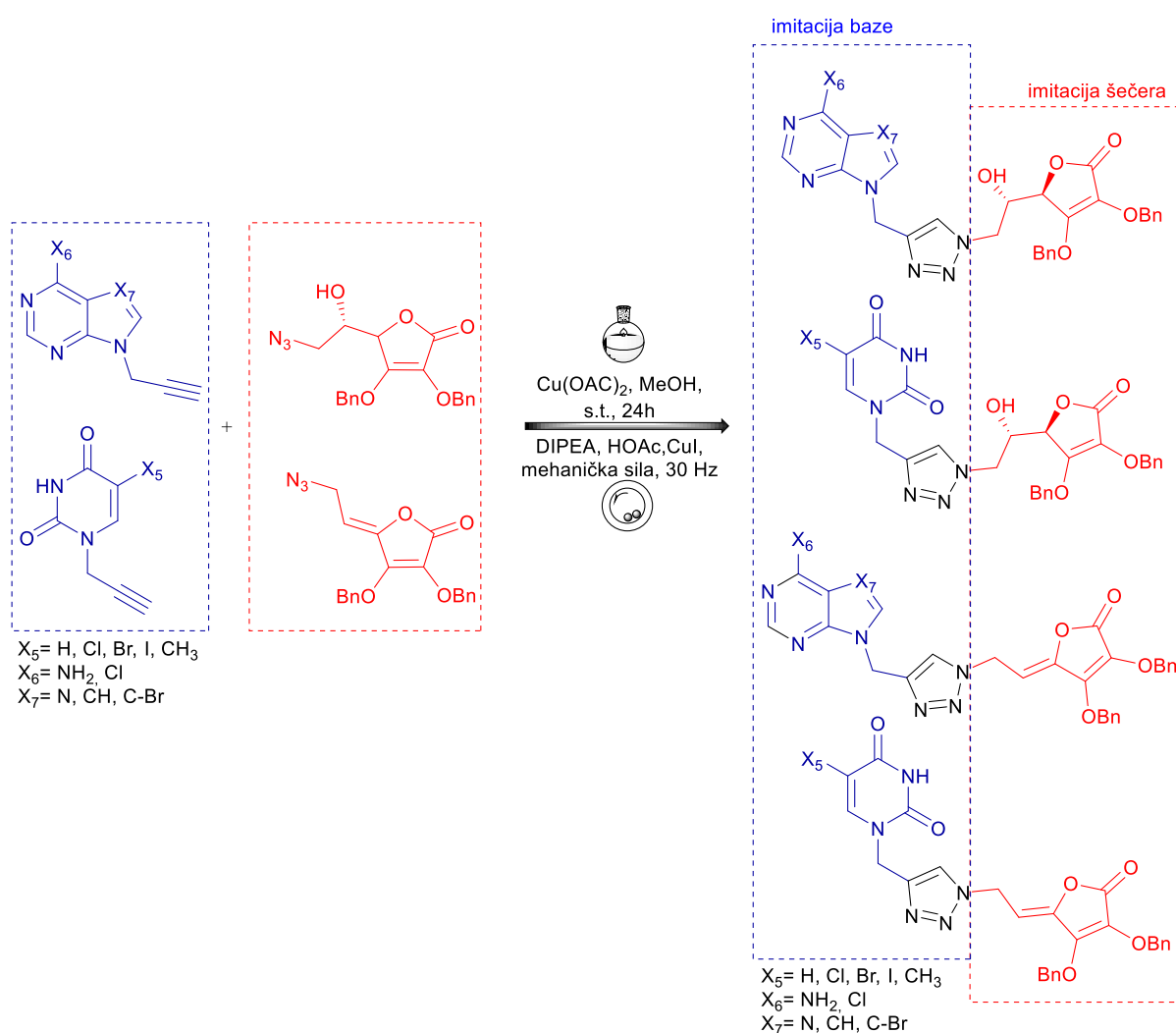
Konvencionalne *click* reakcije: Metoda 1a: Cu(OAc)₂·H₂O, CH₃OH, 60°C, vrijeme reakcije 3,5 sata; Metoda 1a*: Cu(OAc)₂·H₂O, CH₃OH, 60°C, preko noći; Metoda 1b: CuI, DIPEA, octena kiselina, CH₂Cl₂, rt, vrijeme reakcije 3,5 sati. Mehanokemijske *click* reakcije: Metoda 2a: Cu(OAc)₂·H₂O, dvije kuglice od nehrđajućeg čelika (7 mm), PTFE posuda, 3,5 sata, rt, 30 Hz; Metoda 2b: CuI, DIPEA, octena kiselina, dvije kuglice od nehrđajućeg čelika (7 mm), PTFE posuda, 3,5 sata, rt, 30 Hz; Metoda 2c: DIPEA, octena kiselina, PTFE posuda, dvije mjedene kuglice (7 mm), rt, 3,5 sata.

Minimalna količina štetnih otapala, jednostavni postupci pročišćavanja i manji broj neželjenih produkata ukazuju da su mehanokemijske reakcije ekonomičnije, vremenski učinkovitije i okolišu prihvatljivije u odnosu na konvencionalne metode. S druge strane, pri rukovanju s tekućinama niskog vrelišta, za temperaturno i vremenski kontrolirane reakcije, reakcije pod tlakom te za heterogene reakcije nije razvijen sustav kontrole mehanokemijskih reakcije. Kako se mehanokemijske reakcije provode bez otapala, ili s vrlo malom količinom otapala, a mnogi sintetski putevi zahtijevaju upotrebu otapala, potrebno je razvijati inovativne metode stvaranja kemijskih veza utjecajem mehaničke sile, koje zaobilaze klasičnu sintezu uz pomoć otapala.⁶⁷

3. CILJ RADA

3.1. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je usmjeren na provedbu sinteze nukleozidnih analoga povezivanjem *N*-propargiliranih dušičnih baza i derivata L-askorbinske kiseline preko 1,2,3-triazolne prenosnice kako bi se priredili biološki aktivni spojevi. Nadanje, s ciljem optimiranja reakcijskih uvjeta, sinteza novih 1,4-disupstituiranih triazolnih derivata provedena je *click* reakcijom na sobnoj temperaturi klasičnom sintezom, kao i reakcijom potaknutom mehaničkom silom (slika 25).



Slika 25. Strukturni prikaz hibrida purina i pirimidina s L-askorbinskom kiselinom, povezanih 1,2,3-triazolnom prenosnicom priređenih u ovom radu.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

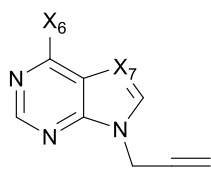
4.1. Opće napomene

Sva otapala su sušena/pročišćivana prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3Å. Za tankoslojnu kromatografiju (TLC) korištene su ploče 60F-254 prevučene slojem silikagela *Merck*, a za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm. Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (*Fluka*, 0,063-0,2 mm), staklene kolone punjene su pod utjecajem gravitacije, a kao eluens korištene su odgovarajuće smjese CH₂Cl₂/CH₃OH. Točke tališta sintetiziranih spojeva određene su na instrumentu Kofler (*Reichert*, Wien) i nisu korigirane.

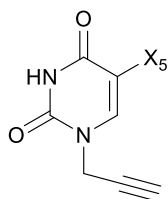
Spektri ¹H NMR i ¹³C NMR snimljeni su na spektrometru Bruker 300 i 600 MHz. Svi uzorci otopljeni su u DMSO-*d*₆ i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u ¹H NMR spektrima i ¹³C NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema DMSO na δ 2,50 ppm. Pojedine rezonancije pridružene su na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i H-H konstante sprege.

Mehanokemijske reakcije provedene su u mlinu IST500 (*InSolido Technologies*, Croatia), pri 30 Hz u PTFE reakcijskim posudama koristeći kuglice od nehrđajućeg čelika.

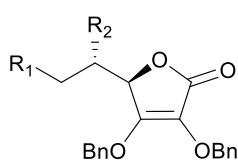
4.2. Pregled sintetiziranih spojeva



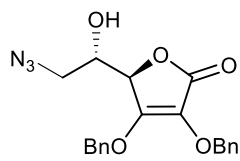
- 10; X₆= NH₂, X₇= N
 11; X₆= Cl, X₇= N
 12; X₆= Cl, X₇= C-H
 13; X₆= Cl, X₇= C-Br



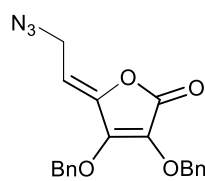
- 14; X₅= H
 15; X₅= Cl
 16; X₅= Br
 17; X₅= I
 18; X₅= CH₃



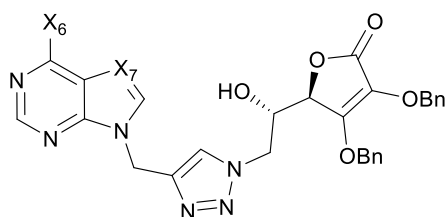
- 22; R₁= OH, R₂= OH
 23; R₁= OTs, R₂= OH
 24; R₁= OTs, R₂= OTs



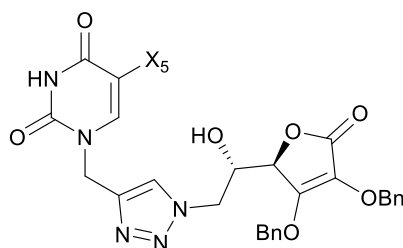
25



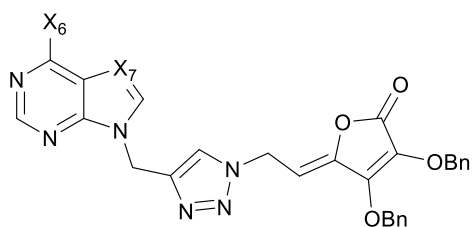
26



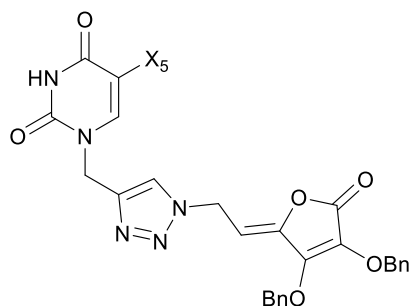
- 27; X₆= NH₂, X₇= N
 28; X₆= Cl, X₇= N
 29; X₆= Cl, X₇= C-H
 30; X₆= Cl, X₇= C-Br



- 31; X₅= H
 32; X₅= Cl
 33; X₅= Br
 34; X₅= I
 35; X₅= CH₃



- 36; X₆= NH₂, X₇= N
 37; X₆= Cl, X₇= N-H
 38; X₆= Cl, X₇= C-H
 39; X₆= Cl, X₇= C-Br



- 40; X₅= H
 41; X₅= Cl
 42; X₅= Br
 43; X₅= I
 44; X₅= CH₃

4.3. Priprava spojeva

4.3.1. Opći postupak pripreme propargiliranih purinskih izostera 10–13

Odgovarajući purinski izoster (adenin **1**, 6-klorpurin **2**, 6-klor-7-deazapurin **3**, 7-brom-6-klor-7-deazapurin **4**) otopljen je u DMF-u (5–10 mL), te je dodan NaH (1 ekv.). Nakon pola sata dodan je propargil-bromid (1,2 ekv.) i reakcijska smjesa miješana je 24 sata na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan-metanol.

9-(prop-2-in-1-il)-9H-purin-6-amin (**10**)

Spoj **10** dobiven je prema navedenom općem postupku iz adenina (**1**; 500,0 mg; 3,70 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 20 : 1) izoliran je spoj **10** kao bijeli prah (467,8 mg; 73,0%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,18 (1H, s, H2"), 8,17 (1H, s, H8"), 7,25 (2H, s, NH₂), 5,02 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂CCH), 3,44 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CH₂CCH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156,46 (C6"), 153,15 (C2"), 149,55 (C4"), 140,54 (C8"), 118,97 (C5"), 78,74 (CH₂CCH), 76,26 (CH₂CCH), 32,69 (CH₂CCH).

6-klor-9-(prop-2-in-1-il)-9H-purin (**11**)

Spoj **11** dobiven je prema navedenom općem postupku iz 6-klorpurina (**2**; 800,0 mg; 5,18 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 : 1) izoliran spoj **11** kao bijeli prah (549,0 mg; 72,0%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,83 (1H, s, H2"), 8,76 (1H, s, H8"), 5,21 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂CCH), 3,55 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CH₂CCH). ¹³C (151 MHz, DMSO): δ 153,23 (C2"), 151,38 (C6"), 149,20 (C4"), 130,72 (C5"), 77,26 (CH₂CCH), 76,67 (CH₂CCH), 33,25 (CH₂CCH). MS (ESI, m/z) 193.0 [M+H]⁺.

4-klor-7-(prop-2-in-1-il)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (**12**)

Spoj **12** dobiven je prema navedenom općem postupku iz 6-klor-7-deazapurina (**3**; 500,0 mg; 3,26 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran je spoj **12** kao bijeli prah (439,9 mg; 71,0%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,69 (1H, s, H2"), 7,82 (1H, d, *J* = 3,7 Hz, H6"), 6,71 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5"), 5,17 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂CCH), 3,46 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CH₂CCH). ¹³C (75 MHz, DMSO): δ 150,75

(C4"), 150,51 (C2"), 150,14 (7a"), 130,71 (C6"), 116,77 (C3a"), 99,08 (C5"), 78,31 (CH₂CCH), 75,76 (CH₂CCH), 33,69 (CH₂CCH). MS (ESI, m/z) 192.0 [M+H]⁺.

5-brom-4-klor-7-(prop-2-in-1-il)-7H-pirol[2,3-d]pirimidin (13)

Spoj **13** dobiven je prema gore navedenom postupku iz 7-brom-6-klor-7-deazaprina (**4**; 400,0 mg; 1,72 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 : 1) izoliran je spoj **13** kao bijeli prah (244,0 mg; 70,0%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8,73 (1H, s, H2"), 8,08 (1H, s, H6"), 5,15 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,50 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C (151 MHz, DMSO): δ 151,26 (C2"), 150,72 (C4"), 149,61 (C7a"), 130,64 (C6"), 114,13 (C3a"), 86,34 (C5"), 77,96 (CCH), 76,32 (CCH), 34,17 (CH₂).

4.3.2. Opći postupak pripreve propargiliranih pirimidinskih derivata 14–18

Odgovarajući pirimidin (uracil **5**, 5-kloruracil **6**, 5-bromuracil **7**, 5-joduracil **8**, timin **9**) otopljen je u DMF-u (5–10 mL), te je dodan NaH (1 ekv.). Nakon pola sata dodan je propargil-bromid (1,2 ekv.) i reakcijska smjesa miješana je 24 sata na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan-metanol.

***N*-1-(-prop-2-in-1-il)pirimidin-2,4-dion (14)⁷⁴**

Spoj **14** dobiven je prema navedenom općem postupku iz uracila (**5**; 5,0 g; 44,61 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran spoj **14** kao bijeli prah (3,6 g; 54,0%). ¹H (300 MHz, DMSO): δ 11,44 (1H, s, NH), 7,75 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H6), 5,7 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H5), 4,57 (2H, d, *J* = 2,3 Hz, CH₂), 3,43 (1H, t, *J* = 2,3 Hz, CCH).

5-klor-*N*-1-(-prop-2-in-1-il)pirimidin-2,4-dion (15)⁷⁵

Spoj **15** dobiven je prema navedenom općem postupku iz 5-kloruracila (**6**; 3,0 g; 20,54 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 20 : 1) izoliran spoj **15** kao bijeli prah (1,7 g; 46,0 %). ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 11,86 (1H, s, NH), 8,20 (1H, s, H6), 4,50 (2H, d, *J* = 2,4 Hz, CH₂), 3,46 (1H, t, *J* = 2,4 Hz, CCH).

5-brom-*N*-1-(-prop-2-in-1-il)pirimidin-2,4-dion (16)⁷⁶

Spoj **16** dobiven je prema navedenom općem postupku iz 5-bromuracila (**7**; 1,0 g; 5,24 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran spoj **16** kao bijeli prah (415,0 mg; 41,0%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ: 11,90 (1H, s, NH), 8,26 (1H, s, H6), 4,50 (2H, d, *J* = 2,7 Hz, CH₂), 3,45 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH).

5-jod-*N*-1-(-prop-2-in-1-il)pirimidin-2,4-dion (17)⁷⁶

Spoj **17** dobiven je prema navedenom općem postupku iz 5-joduracila (**8**; 2,0 g; 8,404 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran spoj **17** kao bijeli prah (347,8 mg; 15,0%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO): 8,35 (1H, s, H6), 4,58 (2H, d, H-1', *J* = 2,3 Hz, CH₂), 3,46 (1H, t, *J* = 2,4 Hz, CH).

5-metil-*N*-1-(-prop-2-in-1-il)pirimidin-2,4-dion (18)⁷⁴

Spoj **18** dobiven je prema navedenom općem postupku iz timina (**9**; 2,0 g; 16,52 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1) izoliran spoj **18** kao bijeli prah (1,5 g, 56,0%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO): 11,35 (1H, s, NH), 7,55 (1H, s, H6), 4,46 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,37 (1H, *J* = 2,2 Hz, CH), 1,75 (3H, s, CH₃)

4.3.3. Priprava 2,3-*O,O*-dibenzil-*L*-askorbinske kiseline (22)⁷⁷

2,3-*O,O*-dibenzil-5,6-*O,O*-izopropiliden-*L*-askorbinska kiselina (**21**; 10,0 g; 25,22 mmol) otopljena je u metanolu (101 mL) i 50% octenoj kiselini (252,40 ml). Reakcijska smjesa miješa se preko noći na temperaturi od 100 °C. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a uljasti produkt je otopljen u etil-acetatu (120 mL) te ekstrahiran sa zasićenom otopinom natrijevog karbonata (120 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog magnezijevog sulfata, a otapalo upareno pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 40 : 1. Izoliran je spoj **22** (3,8 g; 42,0%).

4.3.4. Priprava 6-*O*-tosil-2,3-*O,O*-dibenzil-*L*-askorbinske kiseline (23)

Spoj **22** (3,8 g; 10,61 mmol) otopljen je u suhom diklormetanu (31,43 mL) i suhom piridinu (4,25 ml). Reakcijska smjesa miješana je na 0 °C, pri čemu je pola sata dokapavan *p*-toluensulfonil-klorid (2,3 g; 11,80 mmol) otopljen u diklormetanu (21,18 mL). Reakcijska

smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno pri sniženom tlaku, te je ostatak otopljen u diklometanu (120 mL) i ekstrahiran s vodom (2 x 55 mL). Organski sloj sušen je iznad bezvodnog magnezijevog sulfata. Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 100 : 1$ izolirani je spoj **23** (2,9 g; 53,0%).

4.3.5. Priprava 2,3-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-di-O-tosil-L-askorbinske kiseline (24)

Spoj **22** (5,1 g, 14,31 mmol) otopljen je u suhom diklormetanu (42,00 mL) i suhom piridinu 14 mL). Reakcijska smjesa miješana je na 0 °C, pri čemu je pola sata dokapavan *p*-toluensulfonil-klorid (9,2 g, 48,3 mmol) otopljen u diklormetanu (29 ml). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno pri sniženom tlaku, te je ostatak otopljen u diklometanu (170 mL) i ekstrahiran s vodom (2 x 85 mL). Organski sloj sušen je iznad bezvodnog magnezijevog sulfata. Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom uz eluens CH_2Cl_2 izolirani je spoj **24** (5,4 g; 57,0%).

4.3.6. Priprava 6-azido-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinske kiseline (25)

Spoj **23** (2,9 g; 5,63 mmol) otopljen je u DMF-u (10 mL), te je dokapan natrijev azid (1,8 g; 28,17 mmol) otopljen u vodi (3 mL). Reakcijska smjesa zagrijavana je na temperaturi refleksa preko noći. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku. Zatim je produkt otopljen u etil-acetatu (100 mL) i ekstrahiran s destiliranom vodom (2 x 50 ml). Organski sloj sušen je iznad bezvodnog natrijevog sulfata, koji je zatim odfiltrira. Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 100 : 1$ izoliran je spoj **25** (570,50 mg; 27,0%).

4.3.7. Priprava 6-azido-2,3-O,O-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinske kiseline (26)

Spoj **24** (5,4 g, 8,56 mmol) otopljen je u DMF-u (10 mL), te je dokapan natrijev azid (2,2 g; 34,26 mmol) otopljen u vodi (5 mL). Reakcijska smjesa zagrijavana je na temperaturi preko noći. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku. Zatim je produkt otopljen u etil-acetatu (120 mL) i ekstrahiran s destiliranom vodom (2 x 55 mL). Organski sloj sušen je iznad bezvodnog natrijevog sulfata, koji se zatim odfiltrira. Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom uz eluens CH_2Cl_2 izoliran je spoj **26** (1,1 g; 36,0%).

4.3.8. Opći postupak pripreve zasićenih triazolilnih nukleozidnih analoga 27–35

METODA A: U jednu polovicu reakcijske posude dodan je 6-azido-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina **25** (0,9 ekv.), DIPEA (0,1 ekv.) i octena kiselina (0,1 ekv.), a u drugu polovicu odgovarajući propargilirani purinski ili pirimidinski izoster **10–13**, **14–18** (1 ekv.), dvije kuglice od nehrđajućeg čelika (7 mm; 1,3 g) i bakrov(I) jodid (0,02 ekv.). Reakcijska smjesa melje se pri 30 Hz i prati tankoslojnom kromatografijom. Po završetku reakcijska smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH.

METODA B: 6-azido-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina **25** (0,9 ekv.), odgovarajući propargilirani purinski ili pirimidinski izoster **10–18** (1 ekv.), Cu(OAc)₂ (0,05 ekv.), otopljeni su u metanolu (~5 mL). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a reakcijska smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH.

6-{4-[(6-amino-9*H*-purin-9-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il}-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (27)

Spoj **27** dobiven je iz spoja **25** (Metoda A: 50,00 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 199,08 mg, 0,52 mmol) i spoja **10** (Metoda A: 22,51 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 100,00 mg, 0,58 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 10 : 1 izoliran je spoj **27** kao bijeli prah (Metoda A: 65,80 mg, 90,5%; Metoda B: 203,80 mg, 70,4%; T_t = 113–115 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,17 (1H, s, H2), 8,15 (1H, s, H8), 8,12 (1H, s, H5'), 7,45–7,25 (10H, m, OCH₂Ph), 7,19 (2H, s, NH₂), 5,63 (1H, d, J = 7,0 Hz, H4''), 5,43 (2H, s, CH₂), 5,21 (2H, dd, J = 25,5; 11,6 Hz, OCH₂Ph), 4,97 (2H, d, J = 1,6 Hz, OCH₂Ph), 4,95 (1H, d, J = 1,4 Hz, OH), 4,67–4,57 (1H, dd, J = 13,8; 3,5 Hz, H6''), 4,43–4,31 (1H, dd, J = 13,8; 9,7 Hz, H6''), 4,18–4,07 (1H, m, H5''), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169,0 (C1''), 157,1 (C3''), 155,9 (C6), 152,5 (C2), 149,3 (C4), 142,2 (C4'), 140,6 (C8), 136,1 (Ph-q), 135,5 (Ph-q), 128,6 (Ph), 128,4 (Ph), 128,4 (Ph), 128,4 (Ph), 127,8 (Ph), 124,6 (C5'), 121,0 (C2''), 118,5 (C5), 75,8 (C4''), 73,6 (OCH₂Ph), 72,8 (OCH₂Ph), 67,3 (C5''), 52,4 (C6''), 37,9 (CH₂).

6-[4-[(6-klor-9H-purin-9-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (28)

Spoj **28** dobiven je iz spoja **25** (Metoda A: 50,00 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 356,4 mg, 0,94 mmol) i spoja **11** (Metoda A: 25,04 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 200,0 mg, 1,04 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 10 : 1 dobiven je spoj **28** kao bijeli prah (Metoda A: 62,50 mg, 77,2%; Metoda B: 159,4 mg, 27,5% T_i = 106–109 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,80 (1H, s, H2), 8,78 (1H, s, H8), 8,20 (1H, s, H5'), 7,46–7,25 (10H, m, OCH₂Ph), 5,70–5,54 (3H, m, H4'', CH₂), 5,20 (2H, dd, J = 25,9; 11,6 Hz, OCH₂Ph), 4,98–4,96 (3H, m, OCH₂Ph, OH), 4,62 (1H, dd, J = 13,7; 3,3 Hz, H6), 4,38 (1H, dd, J = 13,6; 9,6 Hz, H6), 4,19–4,03 (1H, m, H5), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169,0 (C1''), 157,2 (C3''), 156,5 (C4, C6), 149,5 (C2), 149,0 (C4'), 136,1 (Ph-q), 135,8 (C8), 135,5 (Ph-q), 130,8 (C5), 128,7 (Ph), 128,5 (Ph), 128,4 (Ph), 128,4 (Ph), 127,8 (Ph), 124,9 (C5'), 120,9 (C2''), 75,5 (C4''), 73,6 (OCH₂Ph), 72,8 (OCH₂Ph), 67,2 (C5''), 52,4 (C6''), CH₂ u DMSO.

6-[4-[(4-klor-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-7-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (29)

Spoj **29** dobiven je iz spoja **25** (Metoda A: 50,00 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 356,97 mg, 0,94 mmol) i spoja **12** (Metoda A: 24,91 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 200,00 mg, 1,04 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 izoliran je spoj **29** kao bijeli prah (Metoda A: 53,50 mg, 71,9%; Metoda B: 273,30 mg, 50,7%; T_i = 84–87 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,67 (1H, s, H2), 8,10 (1H, s, H5'), 7,80 (1H, d, J = 3,6 Hz, H6), 7,47–7,31 (10H, m, OCH₂Ph), 6,67 (1H, d, J = 3,6 Hz, H5), 5,62 (1H, d, J = 7,0 Hz, H4''), 5,58 (2H, s, CH₂), 5,24 (1H, d, J = 11,5 Hz, OCH₂Ph), 5,16 (1H, d, J = 11,6 Hz, OCH₂Ph), 4,97 (2H, d, J = 6,3 Hz, OCH₂Ph), 4,95 (1H, d, J = 1,1 Hz, OH), 4,60 (1H, dd, J = 13,8; 3,4 Hz, H6''), 4,36 (1H, dd, J = 13,8; 9,7 Hz, H6''), 4,13–4,10 (1H, m, H5''), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169,0 (C1''), 157,2 (C3''), 150,7 (C4), 150,4 (C2), 150,4 (C7a), 142,3 (C4''), 136,1 (Ph-q), 135,56 (Ph-q), 131,3 (C6), 128,7 (Ph), 128,5 (Ph), 128,4 (Ph), 128,4 (Ph), 127,8 (Ph), 124,6 (C5'), 121,0 (C2''), 116,7 (C4a), 98,8 (C5), 75,6 (C4''), 73,7 (OCH₂Ph), 72,8 (OCH₂Ph), 67,3 (C5''), 52,4 (C6''), CH₂ u DMSO.

6-{4-[(5-brom-4-klor-7H-pirol[2,3,-d]pirimidin-7-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il}-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (30)

Spoj **30** dobiven je iz spoja **25** (Metoda A: 50,00 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 319,22 mg, 0,84 mmol) i spoja **13** (Metoda A: 35,16 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 200,00 mg, 0,93 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1 izoliran je spoj **30** kao bijeli prah (Metoda A: 308,30 mg, 56,3%; Metoda B: 210,30 mg, 48,2%; T_f = 146–149 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,70 (1H, s, H5'), 8,13 (1H, s, H2), 8,04 (1H, s, H6), 7,53–7,14 (10H, m, OCH₂Ph), 5,62 (1H, d, J = 7,0 Hz, H4''), 5,56 (2H, s, CH₂), 5,25 (1H, d, J = 11,6 Hz, OCH₂Ph), 5,17 (1H, d, J = 11,6 Hz, OCH₂Ph), 4,99–4,93 (3H, m, OCH₂Ph, OH), 4,61 (1H, dd, J = 13,8; 3,5 Hz, H6''), 4,36 (1H, dd, J = 13,8; 9,7 Hz, H6''), 4,15–4,08 (1H, m, H5''), ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 168,9 (C1''), 157,1 (C3''), 151,0 (C2), 150,4 (C4), 149,7 (C7a), 141,2 (C4'), 136,1 (Ph-q), 135,5 (Ph-q), 131,0 (C6), 128,7 (Ph), 128,4 (Ph), 128,4 (Ph), 128,3 (Ph), 127,8 (Ph), 124,8 (C5'), 120,9 (C2''), 113,9 (C4a), 85,8 (C5), 75,5 (C4''), 73,6 (OCH₂Ph), 72,8 (OCH₂Ph), 67,2 (C5''), 52,4 (C6''), 39,7 (CH₂).

6-{4-[(pirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il}-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (31)

Spoj **31** dobiven je iz spoja **25** (Metoda A: 50,00 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,13 mmol) i spoja **14** (Metoda A: 17,68 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 21,76 mg, 0,16 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 20 : 1 izoliran je spoj **31** kao bijeli prah (Metoda A: 54,60 mg, 78,4%; Metoda B: 62,90 mg, 91,0%; T_f = 119–122 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,30 (1H, bs, NH), 8,10 (1H, s, H5'), 7,73 (1H, d, J = 7,9 Hz, H6), 7,44–7,29 (10H, m, OCH₂Ph), 5,58 (1H, d, J = 7,9 Hz, H5), 5,22 (2H, dd, J = 25,4; 11,6 Hz, OCH₂Ph), 5,00–4,91 (5H, m, OCH₂Ph, CH₂, OH), 4,63 (1H, dd, J = 14,4; 4,1 Hz, H6''), 4,39 (1H, dd, J = 13,7; 9,6 Hz, H6''), 4,17–4,12 (1H, m, H5''), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169,1 (C1''), 163,7 (C4), 157,3 (C3''), 151,0 (C2), 145,5 (C6), 142,1 (C4', C4''), 136,2 (Ph-q), 135,6 (Ph-q), 128,8 (Ph), 128,5 (Ph), 128,5 (Ph), 128,5 (Ph), 127,9 (Ph), 124,7 (C5'), 121,0 (C7''), 101,2 (C5), 75,7 (C4''), 73,7 (OCH₂Ph), 72,9 (OCH₂Ph), 67,3 (C5''), 52,4 (C6''), 42,3 (CH₂).

6-[4-[(5-klorpirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (32)

Spoj **32** dobiven je iz spoja **25** (Metoda A: 50,00 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,13 mmol) i spoja **15** (Metoda A: 22,17 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 27,28 mg, 0,16 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 20 : 1 izoliran je spoj **32** kao bijeli prah (Metoda A: 70,10 mg, 94,5%; Metoda B: 49,20 mg, 66,3%; T_f = 124–126 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 11,86 (1H, bs, NH), 8,24 (1H, s, H6), 8,13 (1H, s, H5'), 7,54–7,19 (10H, m, OCH₂Ph), 5,67 (1H, d, J = 6,9 Hz, H4), 5,22 (2H, dd, J = 45,5; 11,6 Hz, OCH₂Ph), 5,01–4,94 (5H, m, OCH₂Ph, CH₂, OH), 4,63 (1H, dd, J = 13,8; 3,5 Hz, H6''), 4,39 (1H, dd, J = 13,8; 9,7 Hz, H6''), 4,17–4,13 (1H, m, H5''), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169,1 (C1''), 159,6 (C4), 157,3 (C3''), 149,9 (C2), 142,8 (C6), 141,9 (C4'), 136,2 (Ph-q), 135,6 (Ph-q), 128,8 (Ph), 128,6 (Ph), 128,5 (Ph), 127,9 (Ph), 124,8 (C5''), 121,0 (C2''), 106,5 (C5), 75,7 (C4''), 73,7 (OCH₂Ph), 72,9 (OCH₂Ph), 67,3 (C5''), 52,5 (C5''), 42,8 (CH₂).

6-[4-[(5-brompirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (33)

Spoj **33** dobiven je iz spoja **25** (Metoda A: 50,00 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,13 mmol) i spoja **16** (Metoda A: 27,95 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 34,40 mg, 0,16 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 10 : 1 izoliran je spoj **33** kao bijeli prah (Metoda A: 68,40 mg, 86,4%; Metoda B: 61,10 mg, 77,0%; T_f = 116–120 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,82 (1H, s, NH), 8,31 (1H, s, H6), 8,13 (1H, s, H5'), 7,44–7,28 (10H, m, OCH₂Ph), 5,66 (1H, d, J = 6,9 Hz, H4), 5,26 (1H, d, J = 11,6 Hz, OCH₂Ph), 5,18 (1H, d, J = 11,6 Hz, OCH₂Ph), 5,01–4,93 (5H, m, OCH₂Ph, CH₂, OH), 4,63 (1H, dd, J = 13,6; 3,2 Hz, H6''), 4,39 (1H, dd, J = 13,7; 9,6 Hz, H6''), 4,20–4,10 (1H, m, H5''), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169,1 (C1''), 159,7 (C4), 157,3 (C3''), 150,1 (C2), 145,2 (C6), 141,9 (C4'), 136,2 (Ph-q), 135,6 (Ph-q), 128,8 (Ph), 128,6 (Ph), 128,5 (Ph), 128,5 (Ph), 127,9 (Ph), 124,8 (C5''), 121,0 (C2''), 95,0 (C5), 75,7 (C4''), 73,7 (OCH₂Ph), 72,9 (OCH₂Ph), 67,4 (C5''), 52,5 (C6''), 42,8 (CH₂).

6-[4-[(5-jodpirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (34)

Spoj **34** dobiven je iz spoja **25** (Metoda A: 50,00 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,13 mmol) i spoja **17** (Metoda A: 33,93 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 41,76 mg, 0,16 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 20 : 1 izoliran je spoj **34** kao bijeli prah (Metoda A: 58,90 mg, 68,9%; Metoda B: 74,00 mg, 85,6%; T_t = 118–121 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 11,67 (1H, bs, NH), 8,30 (1H, s, H6), 8,11 (1H, s, H5'), 7,44–7,34 (10H, m, OCH₂Ph), 5,66 (1H, d, J = 7,0 Hz, H4''), 5,22 (2H, dd, J = 45,6; 11,6 Hz, OCH₂Ph), 5,03–4,92 (5H, m, OCH₂Ph, CH₂, OH), 4,63 (1H, dd, J = 13,8; 3,5 Hz, H6''), 4,38 (1H, dd, J = 13,8; 9,7 Hz, H6''), 4,19–4,10 (1H, m, H5''), ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 169,01 (C1'') 161,1 (C4), 157,2 (C3''), 150,5 (C2), 149,7 (C6), 142,0 (C4'), 136,1 (Ph-q), 135,6 (Ph-q), 128,7 (Ph), 128,5 (Ph), 128,5 (Ph), 128,4 (Ph), 127,9 (Ph), 124,7 (C5'), 121,0 (C2''), 75,7 (C4''), 73,7 (OCH₂Ph), 72,9 (OCH₂Ph), 68,4 (C5''), 67,3 (OCH₂Ph), 52,4 (C6''), 42,6 (CH₂).

6-[4-[(5-metilpirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (35)

Spoj **35** dobiven je iz spoja **25** (Metoda A: 50,00 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,13 mmol) i spoja **18** (Metoda A: 19,50 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 24,00 mg, 0,16 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 20 : 1 izoliran je spoj **35** kao bijeli prah (Metoda A: 68,40 mg, 96,5%; Metoda B: 68,10 mg, 96,0%; T_t = 94–97 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,29 (1H, s, NH), 8,09 (1H, s, H5'), 7,60 (1H, d, J = 1,1 Hz, H6), 7,44–7,27 (10H, m, OCH₂Ph), 5,67 (1H, d, J = 7,0 Hz, H4''), 5,21 (2H, dd, J = 25,5; 11,6 Hz, OCH₂Ph), 4,99–4,96 (3H, m, OCH₂Ph, OH), 4,89 (2H, s, CH₂), 4,63 (1H, dd, J = 13,7; 3,3 Hz, H6''), 4,38 (1H, dd, J = 13,8; 9,7 Hz, H6''), 4,19–4,10 (1H, m, H5''), 1,75 (3H, d, J = 0,7 Hz, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169,0 (C1''), 164,2 (C4), 157,2 (C3''), 150,7 (C2), 142,2 (C4'), 141,1 (C6), 136,1 (Ph-q), 135,6 (Ph-q), 128,7 (Ph), 128,5 (Ph), 128,4 (Ph), 128,4 (Ph), 127,8 (Ph), 127,7 (Ph), 124,6 (C4'), 121,0 (C2''), 108,8 (C5), 75,6 (C4''), 73,7 (OCH₂Ph), 72,8 (OCH₂Ph), 67,3 (C5''), 52,4 (C6''), 42,1 (CH₂), 11,9 (CH₃).

4.3.9. Opći postupak pripreve nezasićenih triazolilnih nukleozidnih analoga 36–44

METODA A: U jednu polovicu reakcijske posude dodan je 6-azido-2,3-*O,O*-benzil-4,5-didehidro-5,6-dehidroksi-L-askorbinska kiselina **26** (0,9 ekv.), DIPEA (0,1 ekv.) i octena kiselina (0,1 ekv.), a u drugu odgovarajući propargilirani purinski ili pirimidinski izoster **10–13, 14–18** (1 ekv.), dvije kuglice od nehrđajućeg čelika (7 mm; 1,3 g) i bakrov(I) jodid (0,02 ekv.). Reakcijska smjesa melje se (30 Hz) i prati tankoslojnom kromatografijom. Po završetku reakcijska smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH.

METODA B: 6-azido-2,3-*O,O*-benzil-4,5-didehidro-5,6-dehidroksi-L-askorbinska kiselina **26** (0,9 ekv.), odgovarajući propargilirani purinski ili pirimidinski izoster **10–13, 14–18** (1,1 ekv.), Cu(OAc)₂ (0,05 ekv.), otopljeni su u metanolu (~5 mL). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a reakcijska smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH.

6-[4-[(6-amino-9*H*-purin-9-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-(*Z*)-2,3-*O,O*-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinska kiselina (36)

Spoj **36** dobiven je iz spoja **26** (Metoda A: 50,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,14 mmol) i spoja **10** (Metoda A: 24,24 mmol 0,14 mmol; Metoda B: 29,09 mg, 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 10 : 1 izoliran je spoj **36** kao bijeli prah (Metoda A: 62,40 mg, 84,6%; Metoda B: 48,50 mg, 65,7%; T_t = 90–93 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,23–8,06 (3H, m, H2, H8, H5'), 7,45–7,14 (12 H, m, OCH₂Ph, NH₂), 5,62 (1H, t, J = 7,5 Hz, H3''), 5,43 (2H, s, CH₂), 5,30 (2H, s, OCH₂Ph), 5,22–5,12 (4H, m, OCH₂Ph, H6''), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165,8 (C1''), 1556,0 (C6), 153,6 (C4), 152,7 (C2), 152,5 (C8), 149,3 (C3''), 147,9 (C4'), 142,5 (C4''), 135,7 (Ph-q), 135,2 (Ph-q), 128,8 (Ph), 128,7 (Ph), 128,6 (Ph), 128,5 (Ph), 128,1 (Ph), 127,9 (Ph), 123,8 (C5'), 121,6 (C2''), 118,5 (C5), 102,0 (C5''), 74,0 (OCH₂Ph), 73,7 (OCH₂Ph), 44,0 (C6''), 37,9 (CH₂).

6-[4-[(6-klor-9*H*-purin-9-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-(*Z*)-2,3-*O,O*-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinska kiselina (37)

Spoj **37** dobiven je iz spoja **26** (Metoda A: 50,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,14 mmol) i spoja **11** (Metoda A: 25,04 mg, 0,13 mmol; Metoda B: 26,27 mg, 0,14 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu

CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 dobiven je spoj **37** kao bijeli prah (Metoda A: 76,40 mg, 99,7%; Metoda B: 58,80 mg, 76,9% T_i = 63–67 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,78 (1H, s, H₂), 8,77 (1H, s, H₈), 8,20 (1H, s, H_{5'}), 7,45–7,28 (10H, m, OCH₂Ph), 5,63–5,58 (3H, m, CH₂, H_{3''}), 5,31 (2H, s, OCH₂Ph), 5,18 (2H, t, J = 6,4 Hz, H_{6''}), 5,15 (2H, s, OCH₂Ph). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,5 (C1''), 151,7 (C₆), 151,7 (C₂), 149,1 (C₄), 147,9 (C_{3''}), 143,2 (C_{4''}), 141,9 (C_{4'}), 137,2 (C₈), 135,7 (Ph-q), 135,3 (Ph-q), 128,8 (Ph), 128,7 (Ph), 128,6 (Ph), 128,5 (Ph), 127,9 (Ph), 123,9 (C_{5'}), 123,3 (C_{2''}), 101,9 (C_{5''}), 74,0 (OCH₂Ph), 73,0 (OCH₂Ph), 44,2 (C_{6''}), 38,9 (CH₂).

6-{4-[(4-klor-7H-pirol[2,3-d]pirimidin-7-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il}-(Z)-2,3-O,O-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinska kiselina (38)

Spoj **38** dobiven je iz spoja **26** (Metoda A: 50,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,14 mmol) i spoja **12** (Metoda A: 26,83 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 26,11 mg, 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1 izoliran je spoj **38** kao bijeli prah (Metoda A: 55,00 mg, 72,0%; Metoda B: 67,10 mg, 87,9%; T_i = 56–60 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,66 (1H, s, H₂), 8,12 (1H, s, H₈), 7,80 (1H, d, J = 3,6 Hz, H₆), 7, 50–7,23 (10H, m, OCH₂Ph), 6,67 (1H, d, J = 3,6 Hz, H₅), 5,65–5,52 (3H, m, CH₂, H_{3''}), 5,30 (2H, s, OCH₂Ph), 5,21–5,13 (4H, m, OCH₂Ph, H_{6''}), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,5 (C1''), 150,6 (C₄), 150,4 (C₂), 150,4 (C_{7a}), 147,9 (C_{3''}), 143,2 (C_{4''}), 142,8 (C_{4'}), 135,7 (Ph-q), 135,3 (Ph-q), 131,3 (C₆), 128,8 (Ph), 128,7 (Ph), 128,6 (Ph), 128,5 (Ph), 127,9 (Ph), 123,7 (C_{5'}), 116,7 (C_{4a}), 101,9 (C_{5''}), 98,8 (C₅), 74,0 (OCH₂Ph), 73,0 (OCH₂Ph), 44,1 (C_{6''}), CH₂ u DMSO.

6-{4-[(5-brom-4-klor-7H-pirol[2,3-d]pirimidin-7-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il}-(Z)-2,3-O,O-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinska kiselina (39)

Spoj **39** dobiven je iz spoja **26** (Metoda A: 50,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,14 mmol) i spoja **13** (Metoda A: 37,87 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 45,98 mg, 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1 izoliran je spoj **39** kao bijeli prah (Metoda A: 85,00 mg, 97,5%; Metoda B: 83,20 mg, 95,4%; T_i = 115–119 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,69 (1H, s, H_{5'}), 8,14 (1H, s, H₂), 8,04 (1H, s, H₆), 7,50–7,24 (10H, m, OCH₂Ph), 5,60 (1H, t, J = 7,5 Hz, H_{3''}), 5,55 (2H, s, CH₂), 5,31 (2H, s, OCH₂Ph), 5,18 (2H, d, J = 7,5 Hz, H_{6''}), 5,15 (2H, s, OCH₂Ph), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,5 (C1''), 151,0 (C₂), 150,5 (C₄), 149,7 (C_{7a}),

147,9 (C3"), 143,2 (C4"), 142,4 (C4'), 135,7 (Ph-q), 135,3 (Ph-q), 131,2 (C6), 128,8 (Ph), 128,7 (Ph), 128,6 (Ph), 128,5 (Ph), 127,9 (Ph), 123,9 (C5'), 123,3 (C2"), 101,9 (C5"), 85,9 (C5), 74,0 (OCH₂Ph), 73,0 (OCH₂Ph), 44,2 (C6"), 39,7 (CH₂).

6-[4-[(pirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-(Z)-2,3-O,O-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinska kiselina (40)

Spoj **40** dobiven je iz spoja **26** (Metoda A: 50,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 50,00 mg; 0,14 mmol) i spoja **14** (Metoda A: 19,04 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 23,12 mg, 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 30 : 1 izoliran je spoj **40** kao bijeli prah (Metoda A: 64,30 mg, 91,1%; Metoda B: 62,30 mg, 88,2%; T_t = 143–145 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,30 (1H, s, NH), 8,12 (1H, s, H5'), 7,72 (1H, d, J = 7,9 Hz, H6), 7,47–7,28 (10H, m, OCH₂Ph), 5,63 (1H, t, J = 7,5 Hz, H3"), 5,57 (1H, dd, J = 7,9, 2,3 Hz, H5), 5,32 (2H, s, CH₂), 5,20 (2H, d, J = 7,5 Hz, H6"), 5,16 (2H, s, OCH₂Ph), 4,92 (2H, s, OCH₂Ph), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,7 (C1"), 163,6 (C4), 150,8 (C2), 148,0 (C3"), 145,6 (C6), 143,3 (C4"), 142,6 (C4'), 135,7 (Ph-q), 135,4 (Ph-q), 128,9 (Ph), 128,8 (Ph), 128,7 (Ph), 128,6 (Ph), 128,0 (Ph), 123,8 (C5'), 123,4 (C2"), 102,0 (C5"), 101,3 (C5), 74,1 (OCH₂Ph), 73,1 (OCH₂Ph), 44,2 (C6"), 42,4 (CH₂).

6-[4-[(5-klorpirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il]-(Z)-2,3-O,O-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinska kiselina (41)

Spoj **41** dobiven je iz spoja **26** (Metoda A: 50,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,14 mmol) i spoja **15** (Metoda A: 23,99 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 31,38 mg, 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 20 : 1 izoliran je spoj **33** kao bijeli prah (Metoda A: 51,60 mg, 68,5%; Metoda B: 64,20 mg, 85,1%; T_t = 159–162 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,85 (1H, s, NH), 8,25 (1H, s, H5'), 8,15 (1H, s, H6), 7,51–7,24 (10H, m, OCH₂Ph), 5,63 (1H, t, J = 7,5 Hz, H3"), 5,32 (2H, s, CH₂), 5,21 (2H, d, J = 7,5 Hz, H6"), 5,16 (2H, s, OCH₂Ph), 4,94 (2H, s, OCH₂Ph), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,7 (C1"), 159,6 (C4), 150,0 (C2), 148,0 (C3"), 143,3 (C4"), 142,9 (C6), 142,4 (C4'), 135,8 (Ph-q), 135,4 (Ph-q), 128,9 (Ph), 128,8 (Ph), 128,7 (Ph), 128,7 (Ph), 128,0 (Ph), 123,9 (C5'), 123,4 (C2"), 106,7 (C5), 102,0 (C5"), 74,1 (OCH₂Ph), 73,1 (OCH₂Ph), 44,2 (C6"), 42,9 (CH₂).

6-{4-[(5-brompirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il}-(Z)-2,3-O,O-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinska kiselina (42)

Spoj **42** dobiven je iz spoja **26** (Metoda A: 50,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,14 mmol) i spoja **16** (Metoda A: 30,10 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 36,55 mg, 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1 izoliran je spoj **42** kao bijeli prah (Metoda A: 73,50 mg, 90,2%; Metoda B: 70,00 mg, 85,9%; T_i = 162–164 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 11,79 (1H, s, NH), 8,30 (1H, s, H5'), 8,14 (1H, s, H6), 7,55–7,20 (10H, m, OCH₂Ph), 5,63 (1H, t, J = 7,5 Hz, H3''), 5,32 (2H, s, CH₂), 5,21 (2H, d, J = 7,5 Hz, H6''), 5,16 (2H, s, OCH₂Ph), 4,94 (2H, s, OCH₂Ph), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,6 (C1''), 159,7 (C2), 150,1 (C4), 148,0 (C3''), 145,2 (C6), 143,3 (C4''), 142,4 (C4'), 135,7 (Ph-q), 135,4 (Ph-q), 128,9 (Ph), 128,8 (Ph), 128,7 (Ph), 128,6 (Ph), 128,0 (Ph), 123,9 (C5'), 123,4 (C2''), 102,0 (C5''), 95,0 (C5), 74,1 (OCH₂Ph), 73,1 (OCH₂Ph), 44,2 (C6''), 42,8 (CH₂).

6-{4-[(5-jodpirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il}-(Z)-2,3-O,O-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinska kiselina (43)

Spoj **43** dobiven je iz spoja **26** (Metoda A: 50,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,14 mmol) i spoja **17** (Metoda A: 36,54 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 43,85 mg, 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1 izoliran je spoj **43** kao bijeli prah (Metoda A: 70,00 mg, 79,6%; Metoda B: 68,70 mg, 78,1%; T_i = 90–93 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 11,67 (1H, s, NH), 8,29 (1H, s, H5'), 8,13 (1H, s, H6), 7,50–7,21 (10H, m, OCH₂Ph), 5,63 (1H, t, J = 7,5 Hz, H3''), 5,32 (2H, s, OCH₂Ph), 5,20 (2H, d, J = 7,5 Hz, H6''), 5,16 (2H, s, OCH₂Ph), 4,93 (2H, s, CH₂), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,5 (C1''), 161,0 (C4), 150,4 (C2), 149,7 (C6), 147,9 (C3''), 143,2 (C4''), 142,5 (C4'), 135,7 (Ph-q), 135,4 (Ph-q), 128,8 (Ph), 128,7 (Ph), 128,6 (Ph), 128,6 (Ph), 127,9 (Ph), 127,8 (Ph), 123,8 (C5'), 123,3 (C2''), 74,0 (OCH₂Ph), 73,0 (OCH₂Ph), 68,5 (C5), 44,1 (C6''), 42,6 (CH₂).

6-{4-[(5-metilpirimidin-2,4-dion-1-il)metilen]-1,2,3-triazol-1-il}-(Z)-2,3-O,O-dibenzil-4,5-didehidro-5,6-didehidroksi-L-askorbinska kiselina (44)

Spoj **44** dobiven je iz spoja **26** (Metoda A: 50,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 50,00 mg, 0,14 mmol) i spoja **18** (Metoda A: 21,00 mg, 0,14 mmol; Metoda B: 25,50 mg, 0,17 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH₂Cl₂ : CH₃OH =

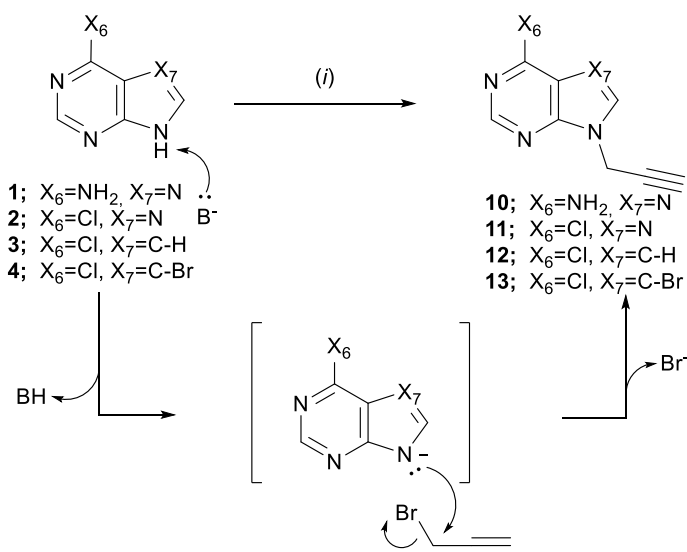
20 : 1 izoliran je spoj **44** kao bijeli prah (Metoda A: 63,00 mg, 86,9%; Metoda B: 56,30 mg, 77,6%; $T_f = 77-80\text{ }^\circ\text{C}$). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 11,29 (1H, s, NH), 8,11 (1H, s, H5'), 7,60 (1H, d, $J = 1,1\text{ Hz}$, H6), 7,46–7,30 (10H, m, OCH_2Ph), 5,63 (1H, t, $J = 7,5\text{ Hz}$, H3''), 5,32 (2H, s, CH_2), 5,20 (2H, d, $J = 7,5\text{ Hz}$, H6''), 5,16 (2H, s, OCH_2Ph), 4,88 (2H, s, OCH_2Ph), 1,74 (3H, d, $J = 0,8\text{ Hz}$, CH_3), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO) δ 164,3 (C1''), 163,6 (C4), 150,7 (C2), 148,0 (C3''), 143,2 (C4''), 142,8 (C4'), 141,2 (C6), 135,7 (Ph-q), 135,4 (Ph-q), 128,9 (Ph), 128,7 (Ph), 128,7 (Ph), 128,6 (Ph), 128,0 (Ph), 123,8 (C5'), 123,4 (C2''), 108,9 (C5), 102,0 (C5''), 74,1 (OCH_2Ph), 73,1 (OCH_2Ph), 44,2 (C6''), 42,2 (CH_2), 12,0 (CH_3).

5. REZULTATI I RASPRAVA

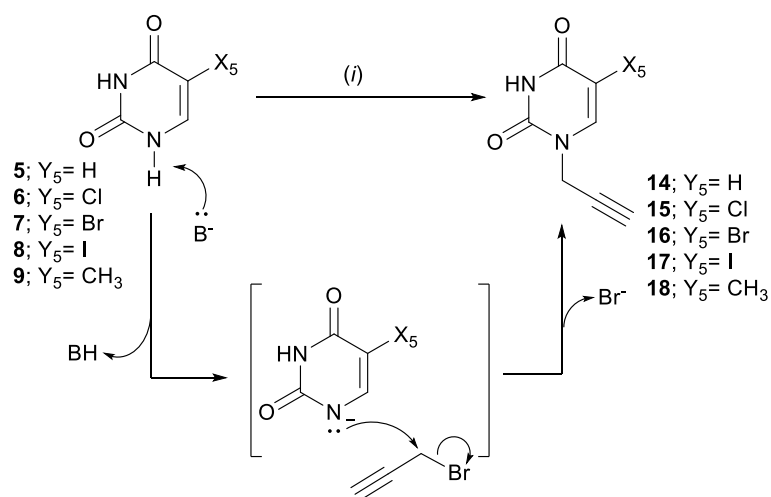
5.1. Sinteza spojeva

U ovom radu pripremljeni su potencijalno biološki aktivni hibridi purina i purinskih izostera (**27–30** i **36–39**) i pirimidina (**31–35** i **40–44**) s derivatima L-askorbinske kiseline povezani preko 1,2,3-triazolne prenosnice. Ciljani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli dobiveni su regioselektivnom bakar(I)-kataliziranom cikloadicijom azida askorbinske kiseline (**25** i **26**) i odgovarajuće *N*-propargilirane nukleozidne baze (**10–18**). U svrhu uspoređivanja odnosa strukture i antitumorskog djelovanja priređeni su hibridi s farmakoforom L-askorbinske kiseline (**27–35**) i njezinim 4,5-nezasićenim analogom (**36–44**).

Kako bi se priredili heterociklički dipolarofili, ključni prekursori za *click* reakciju, provedena je prvo reakcija *N*-alkiliranja odgovarajućih purina, pseudopurina i pirimidina s propargil-bromidom u DMF-u, uz bazu natrijev hidrid ili natrijev karbonat (shema 5 i 6). Baza je odgovorna za deprotoniranje N-1 atoma pirimidinskih (**5–9**), odnosno N-9 atoma purinskih (**1–2**) i pseudopurinskih izostera (**3–4**) pri čemu nastaje anionski intermedijer koji nukleofilnom supstitucijom daje odgovarajući *N*-propargilirani dušikov heterocikl (**10–18**).

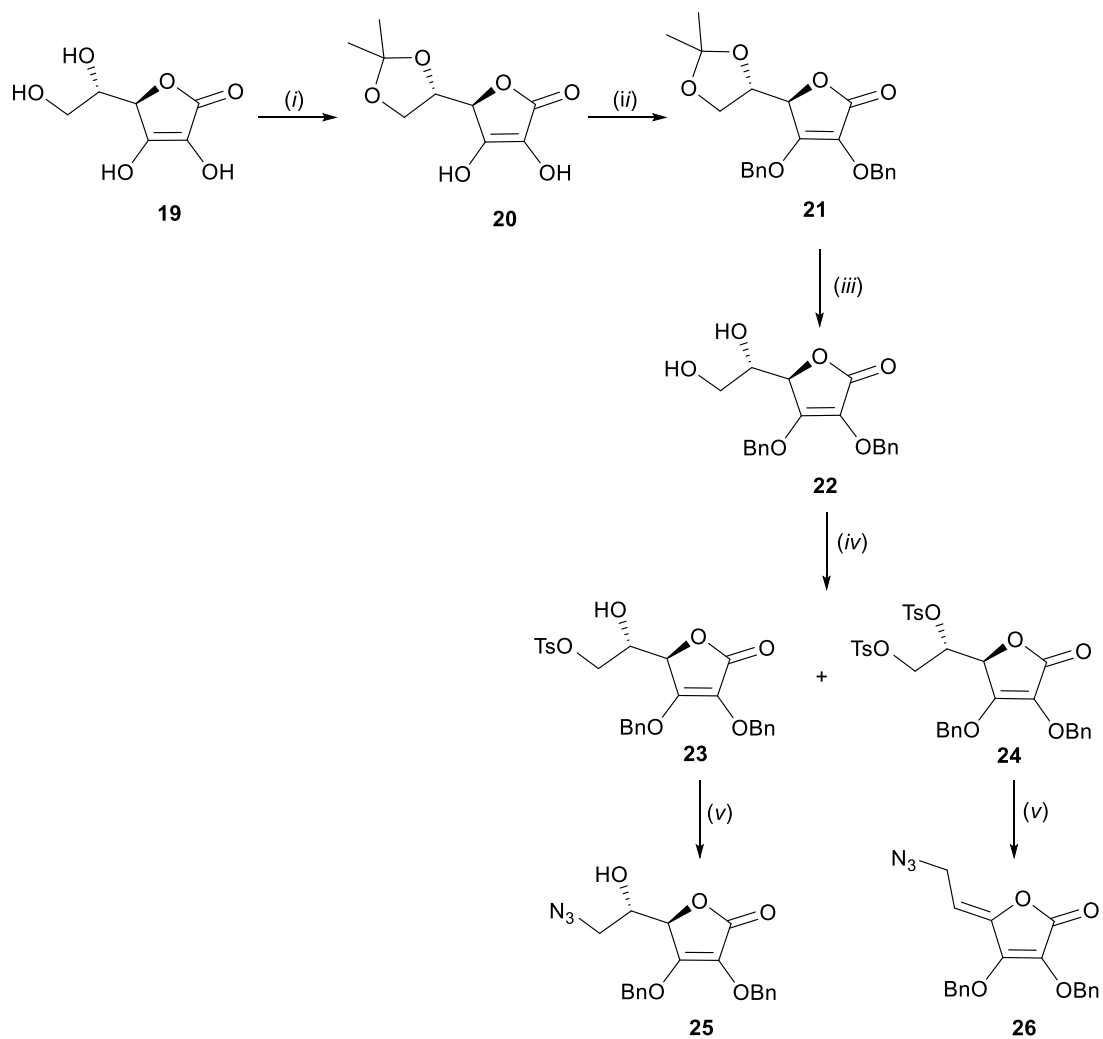


Shema 5. *Reagensi i uvjeti:* (i) natrijev hidrid ili kalijev karbonat, propargil-bromid, DMF, s.t., 24 h.



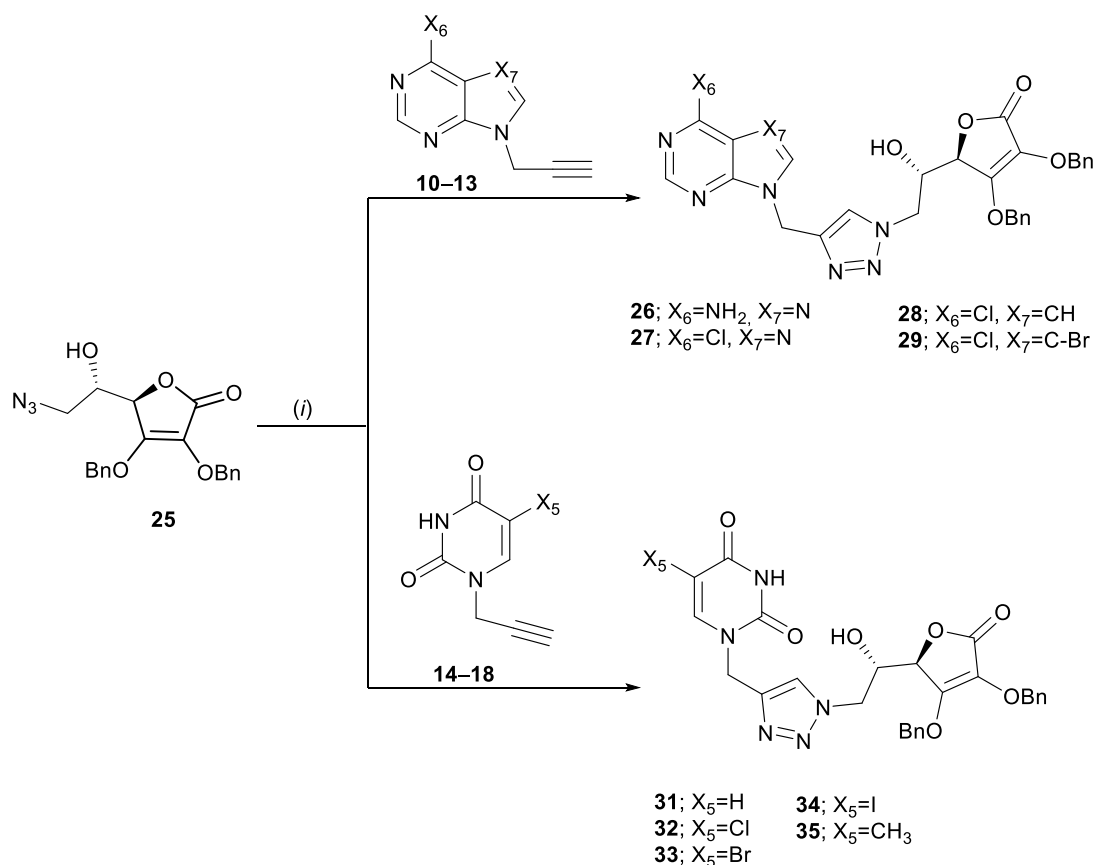
Shema 6. Reagensi i uvjeti: (i) natrijev hidrid ili kalijev karbonat, propargil-bromid, DMF, s.t., 24 h.

Azido-derivati L-askorbinske kiseline (**25** i **26**) pripremljeni su sintezom u nekoliko koraka iz početnog prekursora **19** (shema 7). U prvom stupnju se reakcijom L-askorbinske kiseline **19** s acetil-kloridom uvodi izopropilidenska zaštita u položaj C-5 i C-6. C-2 i C-3 hidroksilne skupine laktonskog prstena potom su zaštićene reakcijom benziliranja u prisutnosti kalijevog karbonata. Spoj **22** pripremljen je skidanjem izopropilidenske zaštite u kiselom mediju. Kako bi se pripravili C-6 azidni derivati, hidroksilne skupine bočnog lanca prevedene su u dobre izlazeće skupine supstitucijom s *p*-toluensulfonil-kloridom u piridinu. Monosilni derivat **23** izoliran je u iskorištenju od 53% te je korišten za pripremu azida **25** nukleofilnom supstitucijom S_N2. Ditosilni derivat **24** dobiven je u iskorištenju od 57% i korišten za pripremu C-6 azidnog derivata 4,5-nezasićene L-askorbinske kiseline **26**. Reakcijom eliminacije C-5 tosilne skupine nastaje egzociklički alilni tosilat koji u sljedećem stupnju supstitucije S_N2 s natrijevim azidom daje spoj **26**.



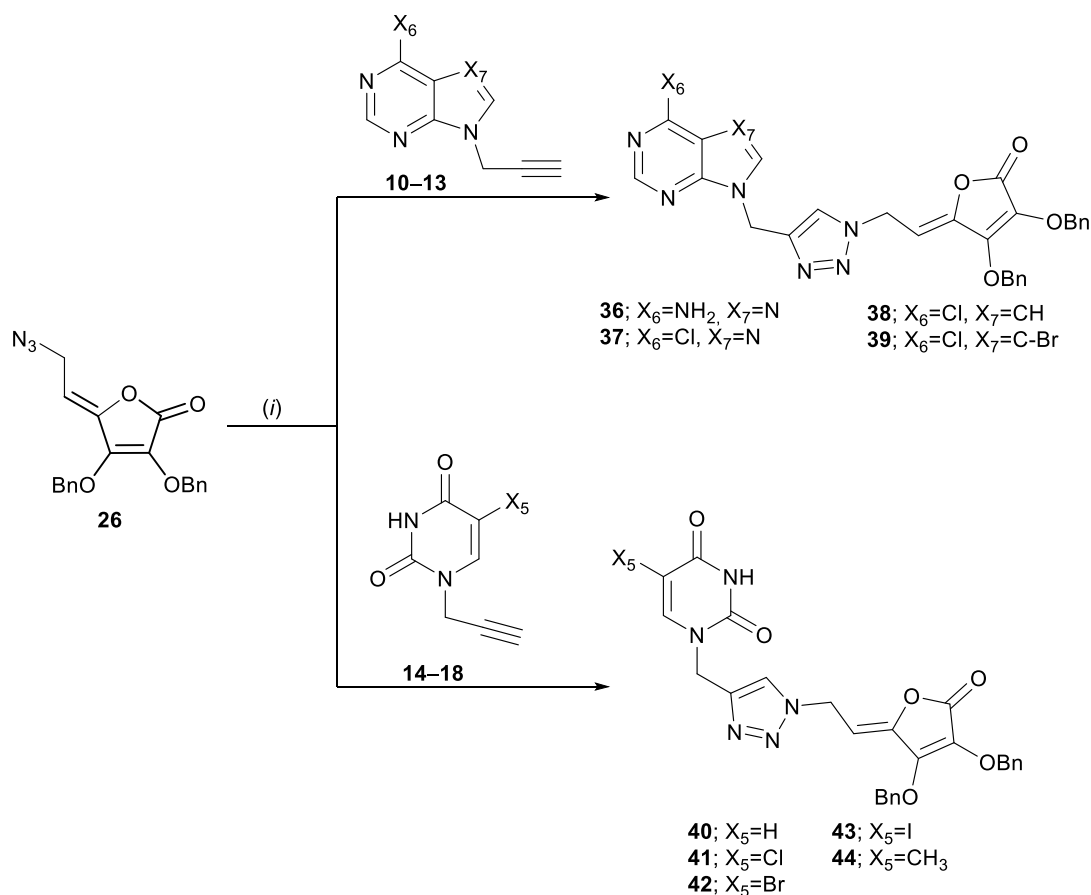
Shema 7. Reagensi i uvjeti: (i) AcCl, aceton, 4 h, s.t.; (ii) BnCl, K₂CO₃, DMF, 60 °C, preko noći; (iii) 50% HOAc, metanol, 100 °C, 24 h; (iv) *p*-toluensulfonil-klorid, bezvodni CH₂Cl₂, piridin, 0–25 °C, 24 h; (v) DMF, voda, NaN₃, 80 °C, s.t., 24 h

Ciljani nukleozidni analozi (**27–44**) priređeni su Husigenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom iz priređenih 1,3-dipola askorbinske kiseline (**25** i **26**) i terminalnih alkina dušikovih baza (**10–18**) kataliziranom bakrom(I) (shema 8 i 9).



Shema 8. Reagensi i uvjeti: (i) Metoda A: DIPEA, HOAc, CuI, mlin, dvije kuglice od nehrđajućeg čelika (7 mm; 1,3 g), 30 Hz, 3,5 h; Metoda B: Cu(OAc)₂, CH₃OH, s.t., 24 h.

U svrhu optimiranja reakcijskih parametara mehanokemijske metode provedene su testne CuAAC reakcije N-1 propargiliranog 5-joduracila (**17**) i odgovarajućih azida L-askorbinske kiseline (**25** i **26**) (tablica 2). Reakcije provedene s CuI i DIPEA pokazale su značajno bolja iskorištenja, te su sinteze ciljanih spojeva provedene primjenom sljedećih sintetskih metoda: mehanokemijskom reakcijom u mlinu uz CuI/DIPEA/HOAc katalitički sustav (metoda A) i u uvjetima klasične organske sinteze primjenom bakrovog(II) acetata u metanolu na sobnoj temperaturi (metoda B).

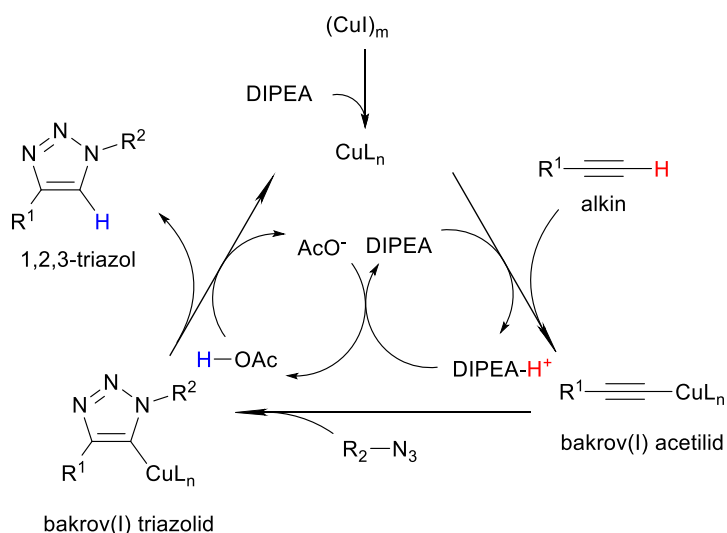


Shema 9. Reagensi i uvjeti: (i) Metoda A: DIPEA, HOAc, CuI, mlin, dvije kuglice od nehrđajućeg čelika (7 mm; 1,3 g), 30 Hz, 3,5 h; Metoda B: Cu(OAc)₂, CH₃OH, s.t., 24 h.

Tablica 2. Sinteza spojeva **34** i **43** primijenom mehanokemijskih metoda.

Reakcijski parametri	Iskorištenje [%]	
	34	43
Cu(OAc) ₂ /Na-askorbat	54	39
CuI/DIPEA/HOAc	68	79

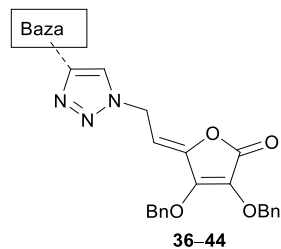
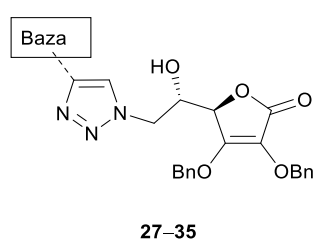
U tom kiselo-bazno katalitičkom sustav tercijarni amin (DIPEA) ima ulogu liganda za kompleksiranje Cu(I)-iona. S obzirom da se bakrov(I) jodid nalazi u polimernom neaktivnom obliku, prisutnost amina omogućuje kompleksiranje uz nastanak aktivnog oblika Cu(I)-iona, te ubrzavanje stvaranja bakrovog(I) acetilida i bakrovog triazolida. Octena kiselina protonira C-Cu vezu bakrovog triazolida kako bi nastao 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni produkt (shema 10).⁷⁸

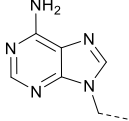
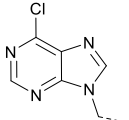
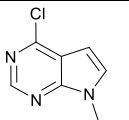
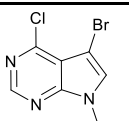
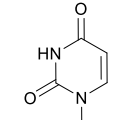
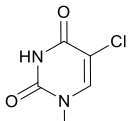
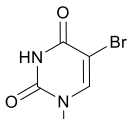
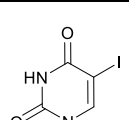
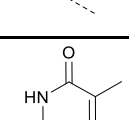


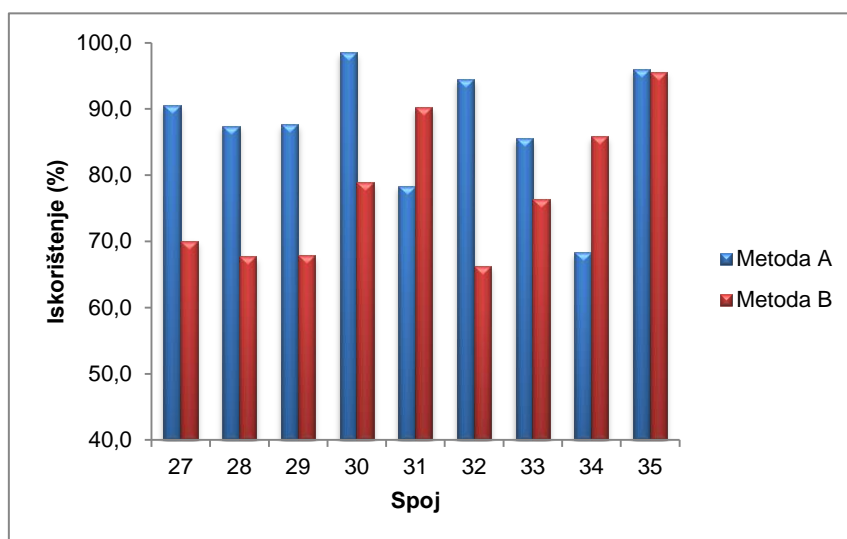
Shema 10. Kiselo-bazno kontrolirana reakcija CuAAC.

Iskorištenja *click* reakcija prikazana su u tablici 3 i na slikama 28 i 29. Iskorištenja u sintezi ciljanih zasićenih triazolnih hibrida L-askorbinske kiseline (**27–35**) iznose od 68,3% do 90,5% za mehanokemijsku metodu i od 50,9% do 95,6% za klasičnu metodu sinteze. Nezasićeni derivati L-askorbinske kiseline (**36–44**) dobiveni su u iskorištenju od 68,4% do 99,8% mehanokemijskom reakcijom, a od 65,7% do 95,4% klasičnom reakcijom na sobnoj temperaturi. Vidljivo je da *click* reakcije provedene mehanokemijskom reakcijom pokazuju bolja iskorištenja u reakciji s 6-azido derivatom L-askorbinske kiseline (**25**) s gotovo svim alkinima, izuzev uracilnog i 5-joduracilnog derivata, dok su u reakciji s timinskim terminalnim alkinom dobivena gotovo jednaka iskorištenja prijenom obje metode (slika 26). U reakciji s nezasićenim azidom **26**, također su ciljani produkti priređeni u boljem iskorištenju mehanokemijskom reakcijom, izuzev spojeva **38** i **41** (slika 27). Općenito, ciljani derivati **27–35** dobiveni su u većem iskorištenju u odnosu na njihove odgovarajuće 4,5-nezasićene analoge **36–44**. Nadalje, mehanokemijskom sintezom vrijeme svih provedenih reakcija smanjeno je s 24 sata (metoda B) na 3,5 sata u mlinu (metoda A).

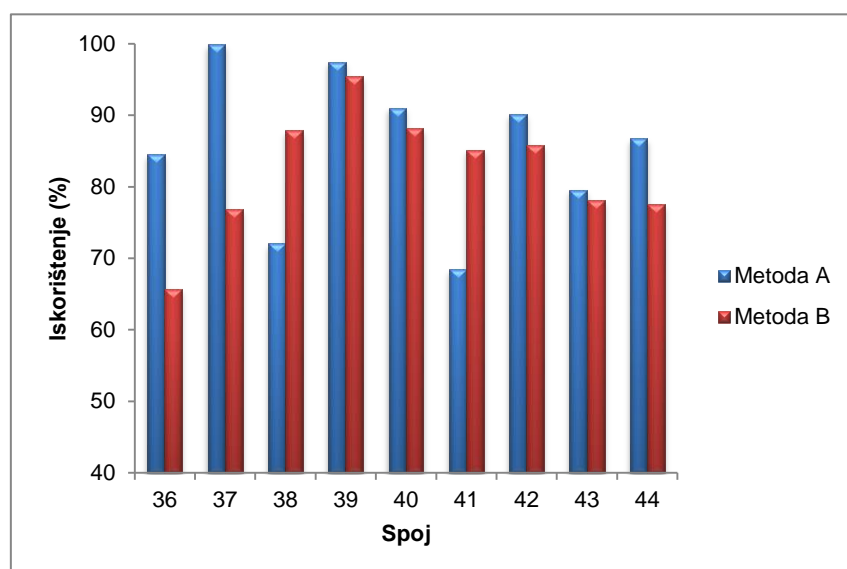
Tablica 3. Iskorištenja (%) *click* reakcija u sintezi spojeva **27–44** provedenih u mlinu (metoda A) i klasičnom sintezom (metoda B).



Spoj	Baza	Iskorištenje (%)		Spoj	Iskorištenje (%)	
		Metoda A	Metoda B		Metoda A	Metoda B
27		90,5	70,1	36	84,5	65,7
28		87,4	67,7	37	99,8	76,9
29		87,6	67,8	38	72,0	87,9
30		98,6	78,9	39	97,5	95,4
31		78,4	90,3	40	91,0	88,2
32		94,5	66,3	41	68,4	85,1
33		85,5	76,3	42	90,2	85,9
34		68,3	85,9	43	79,6	78,1
35		96,0	95,6	44	86,8	77,6



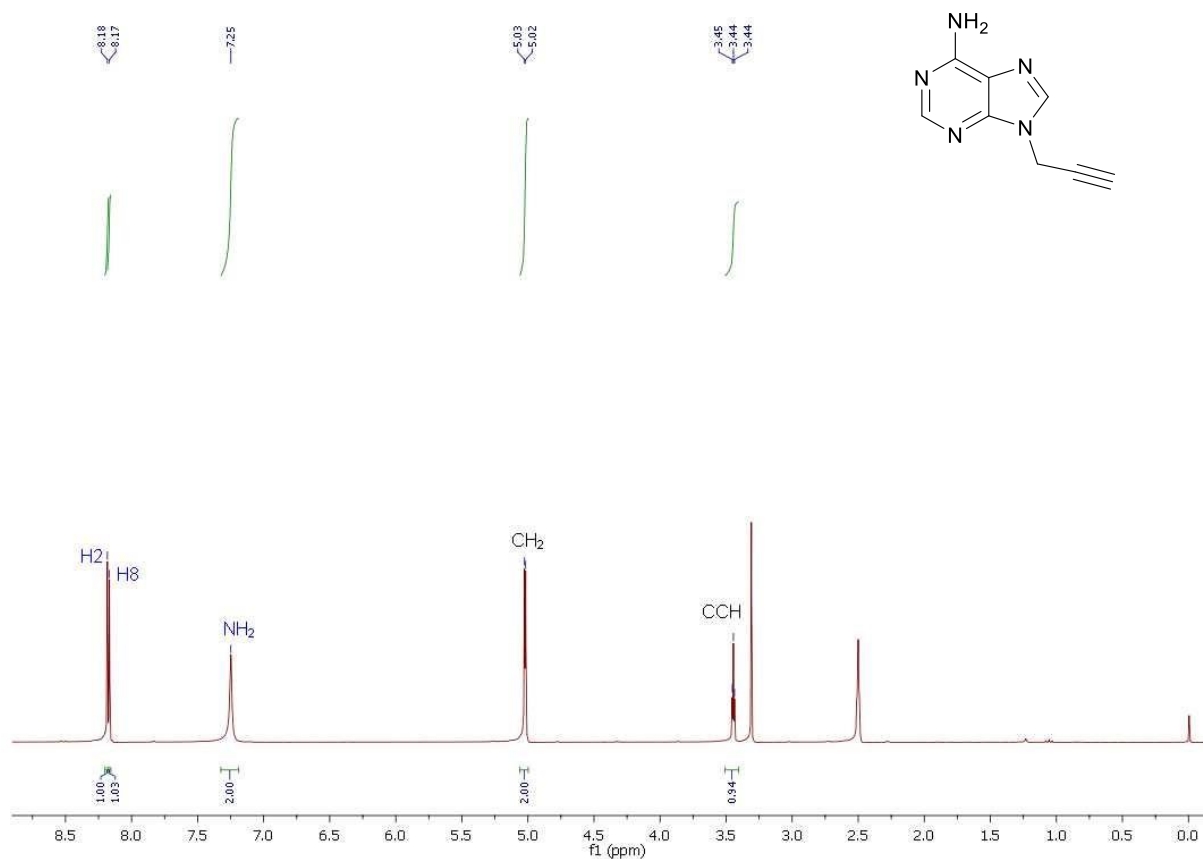
Slika 26. Iskorištenja *click* reakcija u sintezi spojeva **27–35**.



Slika 27. Iskorištenja *click* reakcija u sintezi spojeva **36–44**.

5.2. Spektroskopska karakterizacija novopripremljenih spojeva

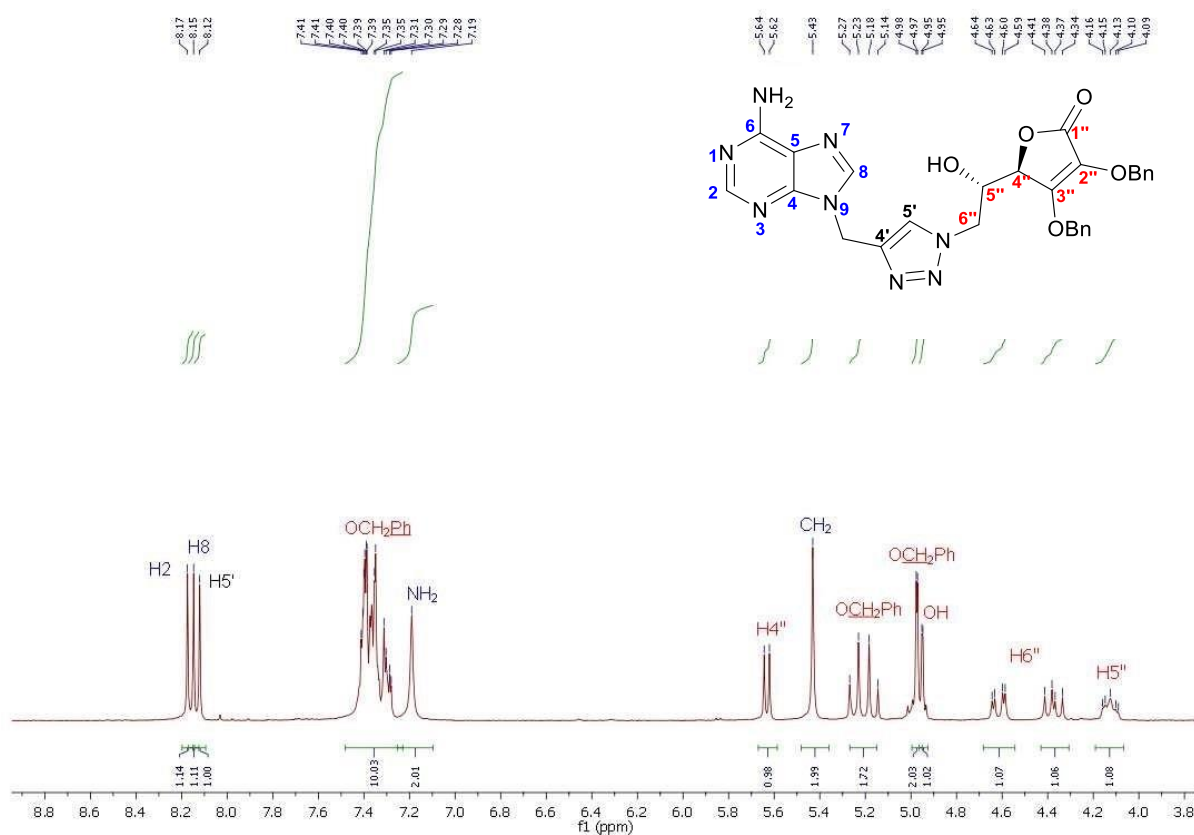
Strukture svih priređenih spojeva određene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom na temelju kemijskih pomaka, veličine signala, veličine i multipliciteta rezonancija te H-H konstanti sprega. Uvođenje propargilne skupine na dušikov atom heterocikličke baze potvrđeno je karakterističnim signalima protona terminalnog alkina na ~3,4 ppm i metilenske skupine vezane za dušikov atomu nukleozidne baze u području ~5 ppm (slika 28).



Slika 28. ^1H NMR spektar spoja 10.

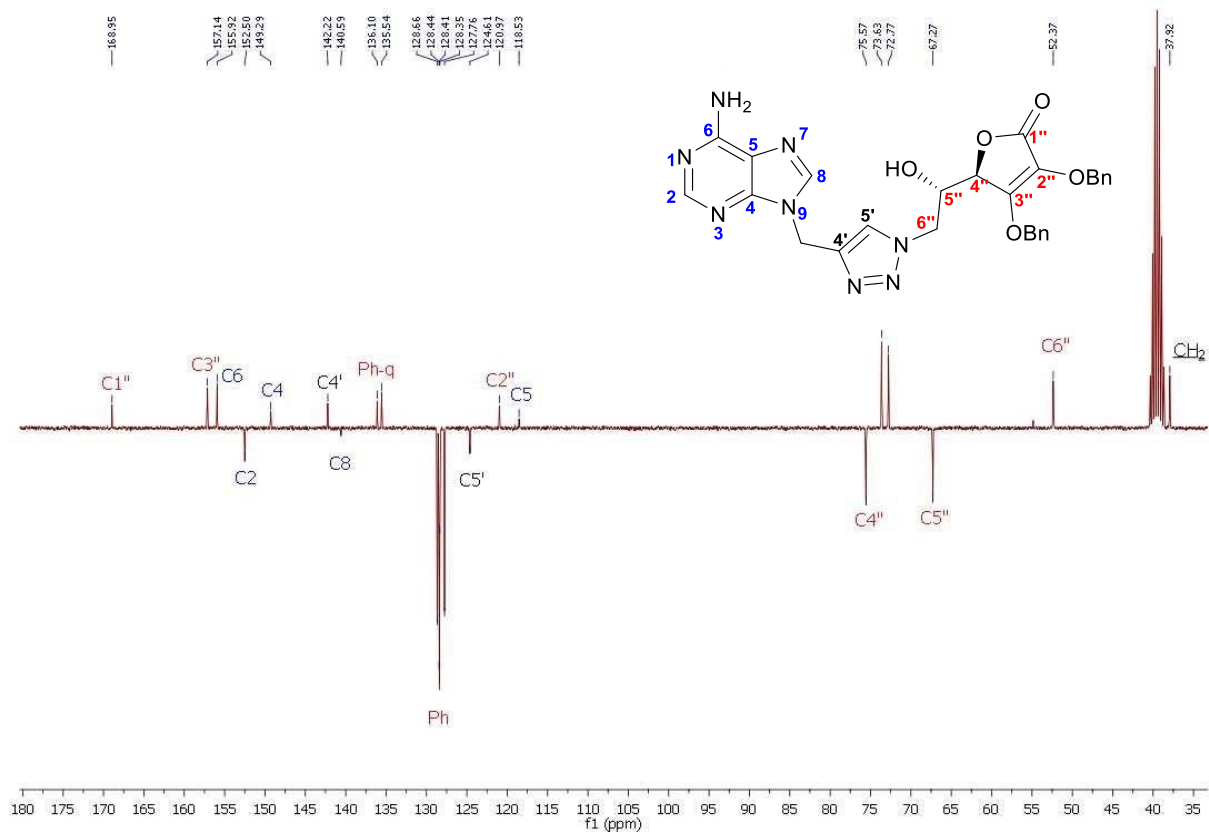
Osnovna karakteristika spektara ^1H NMR spojeva **27–35** su signali protona laktonskog prstena L-askorbinske kiseline (H4'', H5'' i H6''), te metilenski protoni (~5 ppm) kao i fenilni protoni benzilne zaštitne skupine (~7,4 ppm). Prisutnost triazolnog prstena potvrđena je karakterističnim signalom protona H5' (~8 ppm). Nadalje, purinski derivati **27** i **28** u aromatskom području pokazuju također odgovarajuće signale purinskog prstena H2 i H8 (~8 ppm), dok 7-deazapurinski analog **29** posjeduje signale pirolimidinskog prstena H2 (~8 ppm), H5 (~6,6 ppm) i H6 (~7,7 ppm). 5-supstituirani pirimidinski analozi **32–35** pokazuju

signal koji se pripisuje protonu H6 (~8,2 ppm), dok uracilni derivat **31** posjeduje signale za protone H6 (~7,7 ppm) i H5 (~5,6 ppm). Na slici 29 prikazan je spektar ^1H NMR spoja **27**.



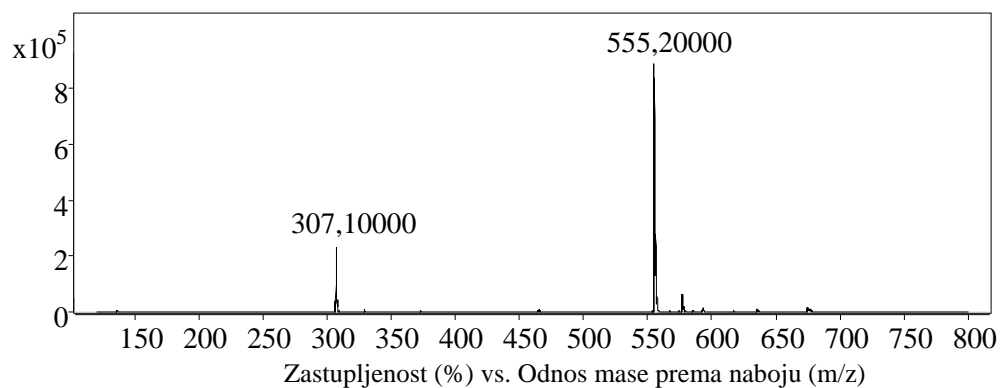
Slika 29. ^1H NMR spektar spoja **27**.

U spektrima ^{13}C NMR spojeva **27–35** vidljivi su karakteristični signali laktonskog prstena L-askorbinske kiseline C4'' (~76 ppm), C5'' (~67 ppm) i C6'' (~7,4 ppm), karbonilnog ugljika C1'' (~169 ppm), te metilenske skupine (~73 ppm) kao i fenila benzilne zaštitne skupine (~128 ppm). Prisutnost triazolnog prstena potvrđeno je karakterističnim signalima za ugljikove atome C5' (~125 ppm) i C4' (~142 ppm). Na slici 30 prikazan je spektar ^{13}C NMR spoja **27**.

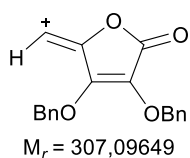


Slika 30. ^{13}C NMR spektar spoja **27**.

Strukture spojeva potvrđene su i masenom spektrometrijom. Tako je u masenom spektru spoja **27** (slika 31) vidljiv signal molekulskog iona ($M^+ = 555,2$) te $M^+ = 307,1$ signal koji se može pripisati nastalom laktonskom fragmentu **45** (slika 32).



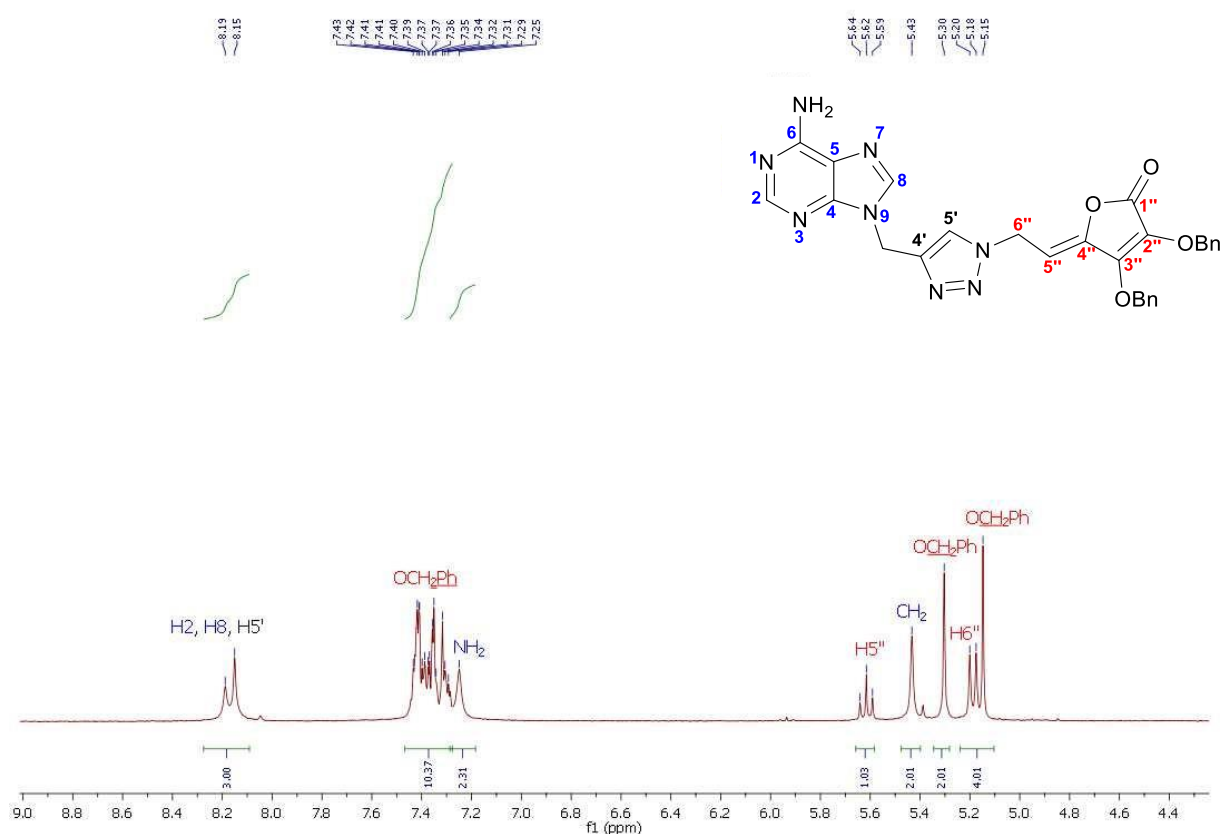
Slika 31. MS spektar spoja **27**.

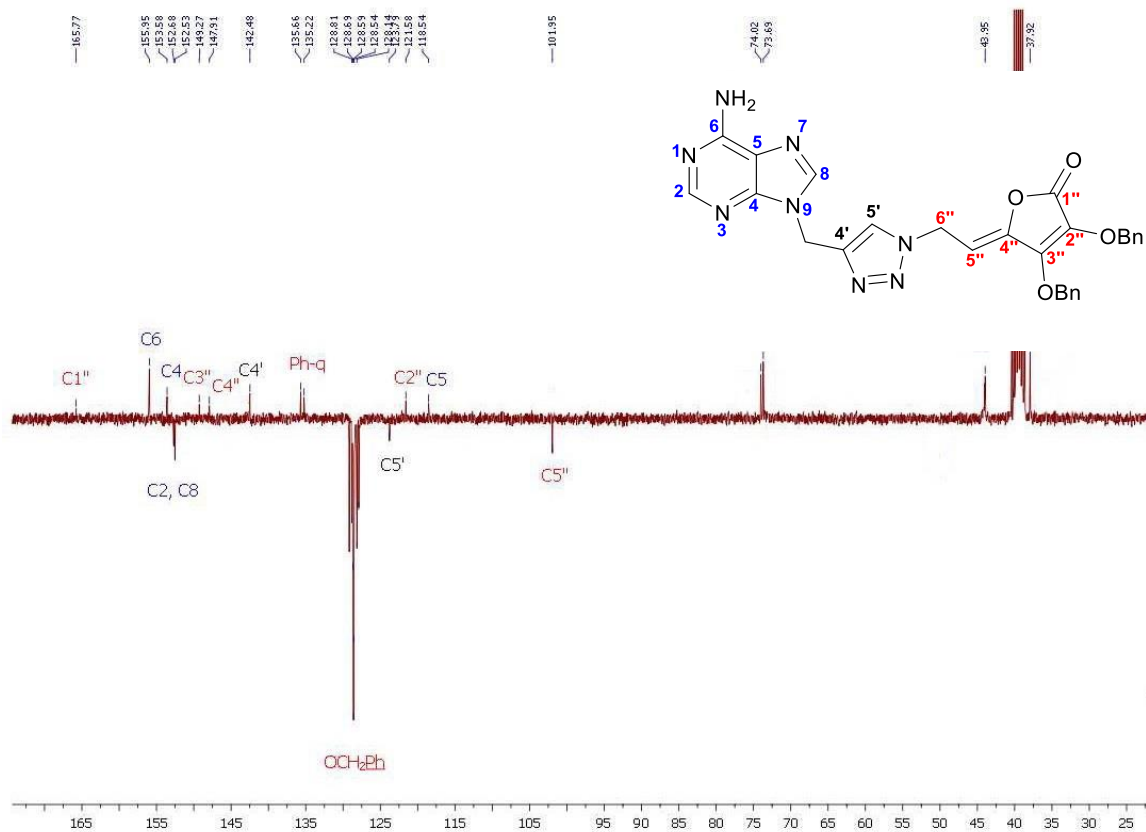


45

Slika 32. Struktura nastala fragmentiranjem spoja **27**.

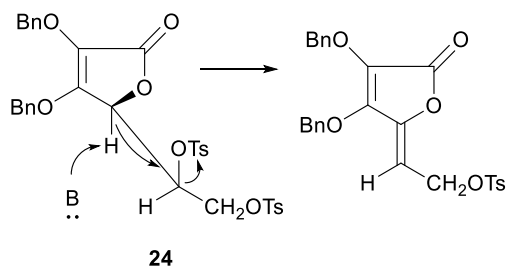
Hibridi nezasićenog derivata L-askorbinske kiseline s purinskim (**36–39**) i pirimidinskim (**40–44**) bazama za razliku od njihovih zasićenih analoga (**27–35**) ne posjeduju signal H4'' u ^1H NMR spektru dok su signali H6'' (~5,6 ppm) i H5'' (~5,2 ppm) znatno otklonjeniji. U ^{13}C NMR spektru također je najznačajnija razlika C5'' (~102 ppm) signala koji je odsjenjen u odnosu na zasićeni analog. ^1H i ^{13}C NMR spektri nezasićenog purinskog derivata **36** prikazani su na slikama 33 i 34.





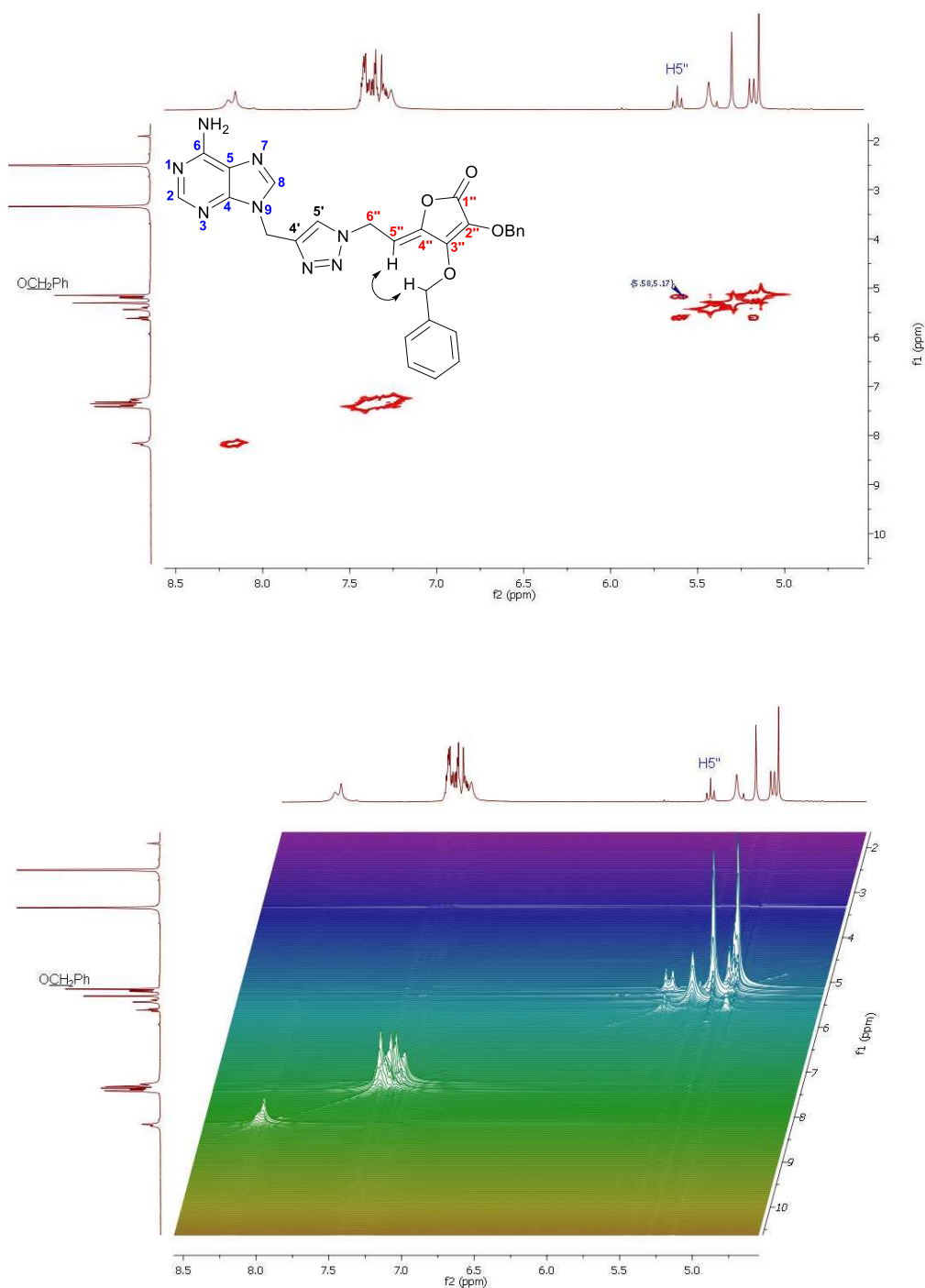
Slika 34. ^{13}C NMR spektar spoja **36**.

Reakcijom natrijevog azida i ditosilnog derivata L-askorbinske kiseline **24** dolazi do stvaranja dvostruke veze, a produkt reakcije je asimetrično supstituirani alken, te je određena konfiguracija $\text{C4}''=\text{C5}''$ veze. Kako dolazi do stvaranja nove π -veze, vodikov atom vezan na ugljikov atom $\text{C4}''$ i izlazeća tosilna skupina na susjednom ugljikovom atomu su u antiperiplanarnom položaju. Posljedica toga je stvaranje 4,5-nezasićenog produkta (*Z*)-konfiguracije (shema 11).



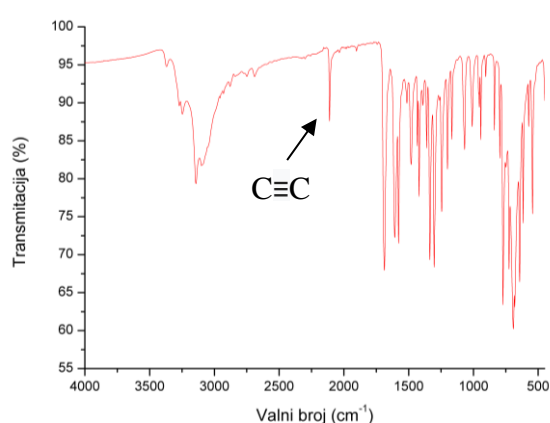
Shema 11. Nastajanje alilnog tosilata eliminacijom.

Konfiguracija dvostruke veze potvrđena je dvodimenzijskim ROESY spektrom (slika 35). Unakrsni signal između *O*-metilenske skupine na C3'' i metinskog protona na C5'' potvrđuje (*Z*)-konfiguraciju spoja. U alternativnoj (*E*)-konfiguraciji ti protoni previše su udaljeni, pa se ne mogu opaziti opisane interakcije. Takva konfiguracija spojeva u skladu je s konfoguracijom opisanom za srodne purinske i pirimidinske derivate L-askorbinske kiseline.^{79,80}

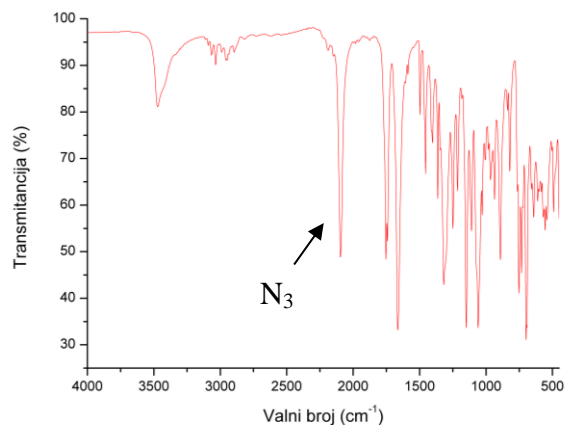


Slika 35. ROESY spektar spoja **36**.

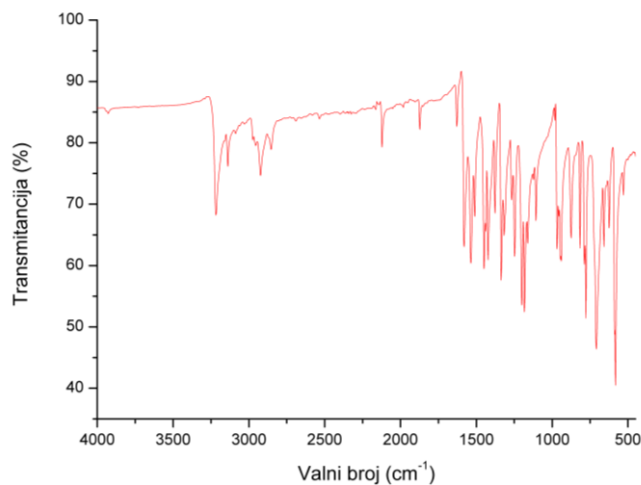
Tijek reakcije je također uspješno praćen IR-spektroskopijom. U spektrima propargiliranih baza vidljiva je pojava vrpce na $\sim 2100\text{ cm}^{-1}$ karakteristična za vibracije istezanja $\text{C}\equiv\text{C}$ veze (slika 36a).⁸¹ U IR-spekttru azida L-askorbinske kiseline (**26**) je vidljiva snažna vrpca u području 2100 cm^{-1} koja ukazuje na asimetrična istezanja azidne skupine (slika 36b).⁸² Sintezom 1,4-disupstituiranog 1,2,3-triazola dolazi do nestanka vrpca karakterističnih za alkine i azidnu skupinu što ukazuje na uspješno formiranje triazolnog prstena (slika 36c). Povećanje transmitacijske vrpce na $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ u odnosu na IR-spektar početnog *N*-propargilnog spoja **10** također potvrđuje nastanak triazolnog prstena.⁸³



a)



b)



c)

Slika 36. IR-spektri spojeva **10** (a), **26** (b) i **36** (c).

6. ZAKLJUČAK

- U ovom radu uspješno je provedena sinteza hibrida purina, purinskih izostera i pirimidina s L-askorbinskom kiselinom povezivanjem preko 1,2,3-triazolne premosnice (27–44).
- Sintetizirani su odgovarajući *N*-propargilni purinski (10–13) i pirimidinski (14–18) prekursori, koji su poslužili kao dipolarofili u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji.
- Višestupnjevitom sintezom pripravljeni su također 6-azidni derivati L-askorbinske kiseline (25 i 26) za sintezu ciljanih hibrida 27–44.
- Regioselektivnom Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom 6-azido derivata L-askorbinske kiseline (25 i 26) i odgovarajućih terminalnih alkena purinskih (10–13) i pirimidinskih derivata (14–18) priređeni su odgovarajući regioselektivni 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni hibridi (27–44) uz katalizator Cu(I).
- Radi optimiranja reakcijskih uvjeta ciljani hibridi (27–44) pripravljeni su na dva načina: (i) mehanokemijskom reakcijom u mlinu koristeći CuI kao izvor Cu(I) iona (metoda A) i (ii) klasičnom sintezom primjenom Cu(OAc)₂ kao izvor Cu(I) iona (metoda B).
- Mehanokemijske *click* reakcije su općenito imale bolja iskorištenja u odnosu na klasične reakcije na sobnoj temperaturi te značajno smanjenje vrijeme reakcija. Pored toga, mehanokemijskom reakcijom je dobiven manji broj nusprodukata te je pročišćavanje produkata bilo učinkovitije.
- Novopripravljenim spojevima potvrđena je struktura primjenom 1D i 2D ¹H NMR, ¹³C NMR spektroskopije, masene spektrometrije i IR-spektroskopije.
- Ispitivanje antiproliferativnog djelovanja hibrida purina, purinskih izostera i pirimidina s L-askorbinskom kiselinom (27–44) na zloćudne tumorske stanice porijeklom iz čovjeka je u tijeku.

U prvom redu zahvaljujemo se našoj mentorici, prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić na predloženoj temi i pomoći pri radu, kao i asistentici Andrei Bistrović koja nas je svojim savjetima vodila i uvijek je imala strpljenja za nas.

Zahvaljujemo se i asistenticama Silviji Maračić i dr. sc. Andrijani Meščić koje su nas poučavale od samog početka našeg rada na Zavodu za organsku kemiju, te svim djelatnicima Zavoda na ugodnoj radnoj atmosferi.

Veliku zahvalnost dugujemo članovima Laboratorija za zelenu sintezu, a posebno dr. sc. Krunoslavu Užareviću i mag. appl. chem. Martina Tireli, što su nam omogućili svu potrebnu opremu, pomogli savjetima i stručnom pomoći.

Posebno hvala želimo iskazati i našim roditeljima koji su nas uvijek bili tu za nas, podupirali nas i poticali da težimo ka ostvarenju sve viših i viših ciljeva.

7. POPIS LITERATURE

1. Mintas, M., *Medicinska kemija protutumorskih lijekova*, Medicinska naklada, Zagreb, 2013.
2. Kerru, N., Singh, P., Koorbanally, N., Raj, R., Kumar, V., Recent advances (2015-2016) in anticancer hybrids, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **142**, 179–212
3. Nepali, K., Sharma, S., Sharma, M., Bedi, P.M.S., Dhar, K.L., Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **77**, 422–487
4. Berube, G., An overview of molecular hybrids in drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2016, **11**, 281–305
5. Ruddarraju, R.R., Murugulla, A.C., Kotla, R., Tirumalasetty, M.C.B., Wudayagiri, R., Donthabakthuni, S., Maroju, R., Baburao, K., Parasa, L.S., Design, synthesis, anticancer, antimicrobial activities and molecular docking studies of theophylline containing acetylenes and theophylline containing 1,2,3-triazoles with variant nucleoside derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **123**, 379–396
6. Peitsinis, Z., Mitrakas, A.G., Nakiou, E.A., Melidou, D.A., Kalamida, D., Kakouratos, C., Koukourakis, M.I., Koumbis, A.E., Trachycladines and Analogues: Synthesis and Anti-cancer Activity Evaluation, *Chem. Med. Chem.*, 2017, **12**, 448–455
7. Helguera, A.M., Rodriguez-Borges, J.E., CaamaCo, O., Garcia-Mera, X., Gonzalez, M.P., Cordeiro, M.N.D.S., Design, Synthesis, and Evaluation of Antineoplastic Activity of Novel Carbocyclic Nucleosides, *Mol. Inf.*, 2010, **29**, 213–231
8. <https://www.epa.gov/greenchemistry> (pristup: 12.3.2018.)
9. Ying, S., Tan, D., Ganguly, R., Li, Y., Garcia, F., Orthogonality in Main Group Compounds: Direct One-step Synthesis of Air- and Moisture-stable Cyclophosphazanes by Mechanochemistry, *Chem. Commun.*, 2018, accepted.
10. Zhou, Z.-Z., Shi, X.-D., Feng, H.-F., Cheng, Y.-F., Wang, H.-T., Xu, J.-P., Discovery of 9H-purines as potential tubulin polymerization inhibitors: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **138**, 1126–1134
11. Joule, J.A., Natural Products Containing Nitrogen Heterocycles - Some Highlights 1990-2015, *Adv. Heterocycl. Chem.*, 2016, **119**, 81–106
12. Akhtar, J., Khan, A.A., Ali, Z., Haider, R., Shahar Yar, M., Structure-activity relationship (SAR) study and design strategies of nitrogen-containing heterocyclic moieties for their anticancer activities, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **125**, 143–189

13. 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
14. Carey, F.A., Organic Chemistry, New York, McGraw-Hill, 2003, str. 1155–1160
15. Demir, Z., Guven, E.B., Ozbey, S., Kazak, C., Atalay, R.C., Tuncbilek, M., Synthesis of novel substituted purine derivatives and Identification of the Cell death mechanism, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **89**, 701–720
16. Von Angerger, S., Science of Synthesis, Georg Thieme Verlag KG, 2004, str. 379–380.
17. Blewett, S., McGuigan, C., Barucki, H., Andrei, G., Snoeck, R., De Clerq, E., Balzarini, J., Bicyclic furo pyrimidine nucleosides with aryloxyphenyl and halophenyl substituted side chains as potent and selective varicella-zoster virus inhibitors, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2001, **20**, 1063–1066
18. Luo, L., He, X.P., Shen, Q., Li, J.-Y., Shi, X.-X., Xie, J., Li, J., Chen, G.-R., Synthesis of (Glycopyranosyl-triazolyl)-purines and Their Inhibitory Activities against Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B), *Chem. Biodivers.*, 2011, **8**, 2035–2044
19. Mohamed, A.R., Synthesis and antitumor evaluation of some xanthine derivatives, 2016
20. Joule, J. A., Milles, K., Heterocyclic Chemistry, JohnWiley and Sons, UK, 2010, str 515.
21. Park, S.J., Kim, E., Yoo, M., Lee, J.-Y., Park, C.H., Hwang, J.Y., Ha, J.D., Synthesis and biological evaluation of N9-cis-cyclobutylpurine derivatives for use as cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, **27**, 4399–4404
22. Yang, W., Chen, Y., Zhou, X., Gu, Y., Qian, W., Zhang, F., Han, W., Lu, T., Tang, W., Design, synthesis and biological evaluation of bis-aryl ureas and amides based on 2-amino-3-puranylpyridine scaffold as DFG-out-B-Raf kinase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **89**, 581–596
23. Bistrovic, A., Grbčić, P., Harej, A., Sedić, M., Kraljević-Pavelić, S., Koštrun, S., Plavec, J., Makuc, D., Raić-Malić, S., Small molecule purine and pseudopurine derivatives: synthesis, cytostatic evaluations and investigation of growth inhibitory effect in nonsmall cell lung cancer A549, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2018, **33**, 271–285
24. Hakimelahi, G.H., Mei, N.-W., Moosavi-Movahedi, A.A., Davari, H., Hakimelahi, S., King, K.-Y., Hwu, J.R., Wen, Y.-S., Synthesis and Biological Evaluation of Purine-Containing Butenolides, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 1749–1757

25. Gehringer, M., Forster, M., Laufer, S.A., Solution-Phase Parallel Synthesis of Ruxolitinib-derived Janus Kinase Inhibitors via Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition, *ACS Comb. Sci.*, 2015, **17**,5–10
26. Ganesan, M., Muraleedharan, M., Synthesis of β -Hydroxyphosphonate and 1,2-Dihydroxy Acyclic Nucleoside Analogs via 1,3-Dipolar Cycloaddition Strategy, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2010, **29**, 91–96
27. Wu, P., Nielsen, T.E., Clausen, M.H., FDA-approved small molecule kinase inhibitors, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2015, **36**, 422–439
28. Sharma, S., Singh, J., Ojha, E., Singh, H., Kaur, M., Bedi, P., Nepali, K., Design Strategies, Structure Activity Relationship and Mechanistic Insights for Purines as Kinase Inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **112**, 298–346
29. Legraverend, M., Grierson, D.S., The purines: potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 3987–4006
30. Kinali-Demirci, S., Idil, O., Disli, A., Synthesis of some novel purine derivatives incorporating tetrazole ring and investigation of their antimicrobial activity and DNA interactions, *Med. Chem. Res.*, 2015, **24**, 1218–1225
31. Hakimelahi, G.H., Mei, N.-W., Mosavi-Movahedi, A.A., Davari, H., Hakimelahi, S., King, K.Y., Whu, J.R., Wen, Y.-S., Synthesis and biological evaluation of purine - containing butenolides; *Journal of Medicinal Chemistry*, 2001, **44**, 1749–1757
32. Desaphy, J., Rognan, D., sc-PDB-Frag: a database of protein-ligand interaction patterns for Bioisosteric replacements, *J. Chem. Inf. Model.*, 2014, **54**, 1908–1918
33. Legraverend, M., Grierson, D.S., The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 3987–4006
34. De Coen, L.M., Haugebaert, T.S.A., Garcia, D., Stevens, C.V., Synthetic Entries to and Biological Activity of Pyrrolopyrimidines, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 80–139
35. Perlikova, P., Hocek, M., Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (7-deazapurine) as a privileged scaffold in design of antitumor and antiviral nucleosides, *Med. Res. Rev.*, 2017, **37**, 1429–1460
36. Bandraian, V., Drennan, C.L., Radical-mediated ring contraction in the biosynthesis of 7-deazapurines, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2015, **35**, 116–124

37. Schaefer, N.G., Veit-Haibach, P., Soyka, J.D., Steinert, H.C., Stahel, R.A., Continued pemetrexed and platin-based chemotherapy in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM): Value of 18F-FDG-PET/CT, *Eur. J. Radiol.*, 2016, **81**, 19–25
38. Plosker, G.L., Ruxolitinib: A Review of Its Use in Patients with Myelofibrosis, *Drugs*, 2015, **75**, 297–308
39. Pari Tripathi, R., Singh, B., Singh Bisht, S., Pandey J., L-Ascorbic acid in Organic Synthesis: An overview, *Curr. Org. Chem.*, 2009, **13**, 99–1220
40. González, M. J., Miranda-Massari, J. R., Mora, E. M., Guzmán, A., Riordan, N. H., Riordan, H.D., Casciari, J. J., Jackson, J.A., Román-Franco, A., Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later, *Integr. Cancer Ther.*, **2005**, **4(1)**, 32–44
41. Olabisi, A.O., The chemistry of L-ascorbic acid derivatives in the asymmetric synthesis of C2 and C3 substituted aldono-gama-lactones, 2005
42. Camarena, V., Wang, G., The epigenetic role of vitamin C in health and disease, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2016, **73**, 1645–1658
43. Gonzalez M.J., Miranda-Massari, J.R., 2014, New Insights on Vitamin C and Cancer, Springer New York, str. 69-74
44. Wittine, K., Stipković-Babić, M., Makuč, D., Plavec, J., Kraljević Pavelić, S., Sedić, M., Pavelić, K., Leyssen, P., Neyts, J., Balzarini, J., Mintas, M., Novel 1,2,4-triazole and imidazole derivatives of L-ascorbic and imino-ascorbic acid: Synthesis, anti HCV and antitumor activity evaluations, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **20**, 3675–3685
45. Raić Malić, S., Hergold-Brunđić, A., Nagl, A., Grdiša, M., Pavelić, K., De Clerq, E., Mintas, M., Novel Pyrimidine and Purine Derivatives of L-Ascorbic Acid: Synthesis and Biological Evaluation, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 2673–2678
46. Bonandi, E., Christodoulou, M., 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**, 1572–1581
47. Agalve, S.A., Maujan, S.R., Pore, V.S., Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores, *Chem. Asian J.*, 2011, **6**, 2696–2718
48. 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**, 1572–1581
49. Haider, S., Sarwar Alam, M., Hamid, H., 1, 2, 3-Triazoles: scaffold with medicinal significance, *Inflamm. and Cell Signal.*, 2014, **1**, e95.

50. Xia, Y., Qu, F., Peng, L., Triazole Nucleoside Derivatives Bearing Aryl Functionalities on the Nucleobases Show Antiviral and Anticancer Activity, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2010, **10**, 806–821
51. Dheer, D., Singh, V., Shankar, R., Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments, *Bioorg. Chem.*, 2017, **71**, 30–54
52. Firestone, R. A., Mechanism of 1,3-dipolar cycloadditions, *J. Org. Chem.*, 1968, **33**, 2285–2290
53. Sharpless, K. B., Kolb, H.C., The growing impact of click chemistry on drug discovery, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 1128–1137
54. Boren, B.C., Narayan, S., Rasmussen, L.K., Zhang, L., Zhao, H., Lin, Z., Jia, G., Fokin, V.V., Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: scope and mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8923–8930
55. Dohler, D., Michael, P., Binder, W.F., CuAAC-Based Click Chemistry in Self-Healing Polymers, *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 2610–2620
56. Calvo-Losada, S., Quirante, J.J., Exploring the regioselectivity in the cycloaddition of azides to alkynes catalyzed by dinuclear copper clusters (Cu₂AAC reaction) using the topologies of $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ and $\nabla\nabla^2\rho(\mathbf{r})$, *J. Mol. Model*, 2017, **23**, 141-152
57. Viegas- Junior, C., Danuello, A., Da Silva, B.V., Barreiro, E.J., Fraga, C.A., Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 1829–1852.
58. Decker, M., Hybrid Molecules Incorporating Natural Products: Applications in Cancer Therapy, Neurodegenerative Disorders and Beyond, *Curr. Med. Chem.*, 2018, **18**, 1464–1475
59. Contelles, J.M., Soriano, E., The medicinal chemistry of hybrid-based drugs targeting multiple sites of action, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2011, **11(22)**, 2714-5
60. <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry.html> (pristup: 12.3.2018.)
61. Jukić, M., Đaković, S., Filipović- Kovačević, Ž., Vorkapić-Furč, J., „Zelena“ kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskih procesima, *Kem. Ind.*, 2004, **53(5)**, 217–224
62. Varma, R.S., Chemical activation by mechanochemical mixing, microwave and ultrasonic irradiation, *Green Chem.*, 2008, **10**, 1129–1130.
63. Tundo, P., Anastas, P., Black, D.StC., Breen, J., Collins, T., Memoli, S., Miyamoto, J., Polyakoff, M., Tumas, W., Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview, *Pure Appl. Chem.*, 2000, **72 (7)**, 1207–1228.

64. Cincčić, D., Brekalo, I., Kaitner, B., Effect of atmosphere on solid-state amine-aldehyde condensations: gas-phase catalysts for solid-state transformations, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 11683–11685.
65. Achar, T.K., Bose, A., Mal, P., Mechanochemical synthesis of small organic molecules, *J. Org. Chem.*, 2017, **13**, 1907–1931
66. Štrukil, V., Fábíán, L., Reid, D. G., Duer, M. J., Jackson, G. J., Eckert-Maksić, M., Friščić, T., Towards an environmentally-friendly laboratory: dimensionality and reactivity in the mechanochemistry of metal–organic compounds, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 9191–9193.
67. Do, J.-L., Friščić, T., Mechanochemistry: A Force of Synthesis, *ACS Cent. Sci.*, 2017, **3**(1), 13–19
68. Tireli, M., Maričić, S., Lukin, S., Juribašić Kulcsar, M., Žilić, D., Cetina, M., Halasz, I., Raić-Malić, S., Užarević, K., Solvent-free copper-catalyzed click chemistry for the synthesis of N-heterocyclic hybrids based on quinoline and 1,2,3-triazole, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2017, **13**, 2352–2363
69. Stolle, A., Schmidt, R., Jacob, K., Scale-up of organic reactions in ball mills: process intensification with regard to energy efficiency and economy of scale, *Faraday Discuss.*, 2014, **170**, 267–286.
70. Schmidt, R., Burmeister, C. F., Baláž, M., Kwade, A., Stolle, A., Effect of Reaction Parameters on the Synthesis of 5-Arylidene Barbituric Acid Derivatives in Ball Mills, *Org. Process Res. Dev.*, 2015, **19**, 427–436.
71. Baláž, P., Mechanochemistry in Nanoscience and Minerals Engineering, Springer-Verlag, Berlin, 2008, 8–14
72. Štrukil, V., Igrc, M. D., Fábíán, L., Eckert-Maksić, M., Childs, S. L., Reid, D. G., Duer, M. J., Halasz, I., Mottillo, C., Friščić, T., A model for a solvent-free synthetic organic research laboratory: clickmechanochemistry and structural characterization of thioureas without bulk solvents, *Green Chem.*, 2012, **14**, 2462–2473.
73. Cook, T.L., Walker, J.A.Jr., Mack, J., Scratching the catalytic surface of mechanochemistry: a multi-component CuAAC reaction using a copper reaction vial, *Green Chem.*, 2013, **15**, 617–619.
74. Krim, J., Sillahi, B., Taourirte, M., Rakib, E.M., Engels, J.W., Microwave-assisted click chemistry: synthesis of mono and bis-1,2,3-triazole acyclonucleoside analogues of ACV via copper(I)-catalyzed cycloaddition, *ARKIVOC*, 2009, **8**, 142–152.

75. Lazrek, H.B., Taourirte, M., Oulih, T., Barascut, J.L., Imbach, J.L., Pannecouque, C., Witrouw, M. and De Clercq, E., Synthesis and anti-HIV activity of new modified 1, 2, 3-triazole acyclonucleosides, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2001, **20(12)**, 1949–1960.
76. Gregorić, T., Sedić, M., Grbčić, P., Paravić, A.T., Pavelić, S.K., Cetina, M., Vianello, R. and Raić-Malić, S., Novel pyrimidine-2,4-dione–1,2,3-triazole and furo[2,3-d] pyrimidine-2-one–1,2,3-triazole hybrids as potential anti-cancer agents: Synthesis, computational and X-ray analysis and biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **125**, 1247–1267.
77. Raić-Malić, S., Meščić, A., Recent Trends in 1,2,3-Triazolo-Nucleosides as Promising Anti-Infective and Anticancer Agents, *Curr. Med. Chem.*, 2015, **22**, 1462–1499
78. Shao, C., Wang, X., Zhang, Q., Luo, S., Zhao, J., Hu, Y., Acid-base jointly promoted copper(I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 6832–6836.
79. Gazivoda, T., Plevnik, M., Plavec, J., Kraljević, S., Kralj, M., Pavelić, K., Balzarini, J., De Clercq, E., Mintas, M., Raić-Malić, S., The novel pyrimidine and purine derivatives of l-ascorbic acid: synthesis, one- and two- dimensional ¹H and ¹³C NMR study, cytostatic and antiviral evaluation, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 131–139.
80. Meščić, A., Šalić, A., Gregorić, T., Zelić, B., Raić-Malić, S., Continuous flow-ultrasonic synergy in click reactions for the synthesis of novel 1, 2, 3- triazolyl appended 4,5-unsaturated L-ascorbic acid derivatives, *RSC Advances*, 2017, **7**, 791–800
81. Pretsch, E., Buhlmann, P., Martin, B., Structure Determination of Organic Compounds, Tables of Spectral Data, 2009, 276 str.
82. Lieber, E., Rao, C.N.R., Chao, T.S., Hoffman, C.W.W., Infrared Spectra of Organic Azides, *Anal. Chem.*, 1957, **29(6)**, 916–918
83. Hartzel, L.W., Benson, F.R., Synthesis of 4-Alkyl-1,2,3-triazoles from Acetylenic Compounds and Hydrogen Azide, *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **73**, 667–670

SAŽETAK RADA

Silvio Jakopec, Helena Prpić, Helena Šimek

Konvencionalna i mehanokemijska sinteza hibrida purina, pseudopurina i pirimidina s L-askorbinskom kiselinom

Cilj ovoga rada bila je sinteza novih hibrida purina, purinskih izostera i 5-supstituiranih pirimidina s derivatima L-askorbinske kiseline povezanih preko 1,2,3-triazolne prenosnice s potencijalnim antitumorskim djelovanjem. 1,4-disupstituirana 1,2,3-triazolna prenosnica priređena je Cu(I)-kataliziranom regioselektivnom 1,3-dipolarnom cikloadicijom 6-azido derivata L-askorbinske kiseline i odgovarajućih terminalnih alkina purinskih i pirimidinskih derivata. U svrhu optimiranja reakcijskih uvjeta ciljani hibridi pripremljeni su: (i) klasičnom sintezom na sobnoj temperaturi u kojoj je kao izvor Cu(I) iona korišten $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ u metanolu i (ii) mehanokemijskom reakcijom u mlinu primjenom katalitičkog sustava CuI/HOAc/DIPEA. Uporabom ekološki prihvatljive mehanokemijske reakcije bez otapala priređeni su ciljani nukleozidni analozi L-askorbinske kiseline u većem iskorištenju i znatno kraćem vremenu reakcije u odnosu na konvencionalnu sintezu. Strukture svih priređenih spojeva potvrđene su spektroskopijom ^1H i ^{13}C NMR, masenom spektrometrijom i IR-spektroskopijom. Antiproliferativna ispitivanja novopriređenih spojeva su u tijeku.

Ključne riječi: purinski izosteri, pirimidini, L-askorbinska kiselina, Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija, mehanokemija

SUMMARY

Silvio Jakopec, Helena Prpić, Helena Šimek

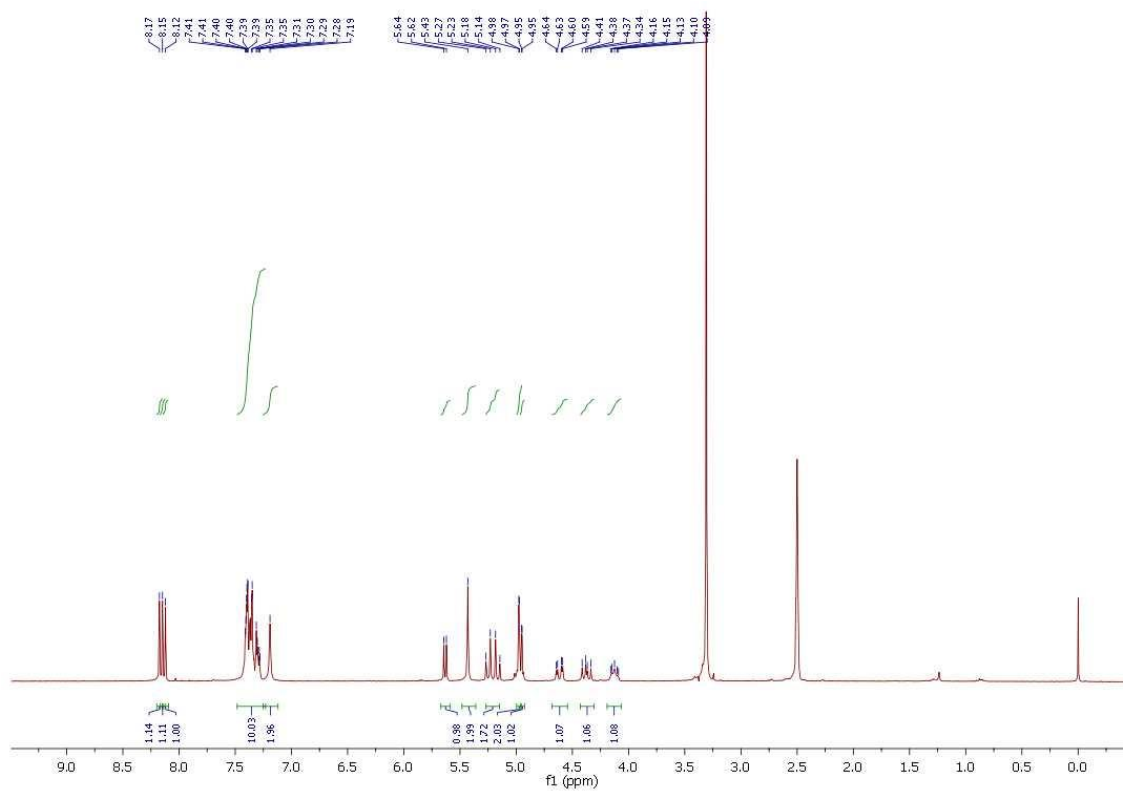
Conventional and mechanochemical synthesis of purine, pseudopurine and pyrimidine, and L-ascorbic acid hybrids

The aim of this work was the synthesis of novel purine, purine isostere and 5-substituted pyrimidine and L-ascorbic acid hybrids connected *via* 1,2,3-triazole linker to evaluate their antitumor activity. The 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles were prepared by Cu(I)-catalyzed regioselective 1,3-dipolar cycloaddition of 6-azido derivatives of L-ascorbic acid and corresponding terminal alkynes of purine and pyrimidine derivatives. To optimize the reaction conditions, the targeted hybrids were prepared by two methods: (i) classical synthesis at room temperature in which Cu(OAc)₂ was used as the Cu(I) source, and (ii) mechanochemical reaction in mill using CuI/HOAc/DIPEA catalytic system. Generally, implementation of environmentally friendly solvent-free mechanochemical method for the synthesis of nucleoside analogues of L-ascorbic acid improved yields, and significantly accelerated the reaction time in comparison to the conventional synthesis. The structures of all synthesized compounds were confirmed by ¹H and ¹³C spectroscopy, mass spectrometry and IR spectroscopy. Antiproliferative evaluations of novel hybrids of purine, purine isostere and 5-substituted pyrimidine, and L-ascorbic acid are in progress.

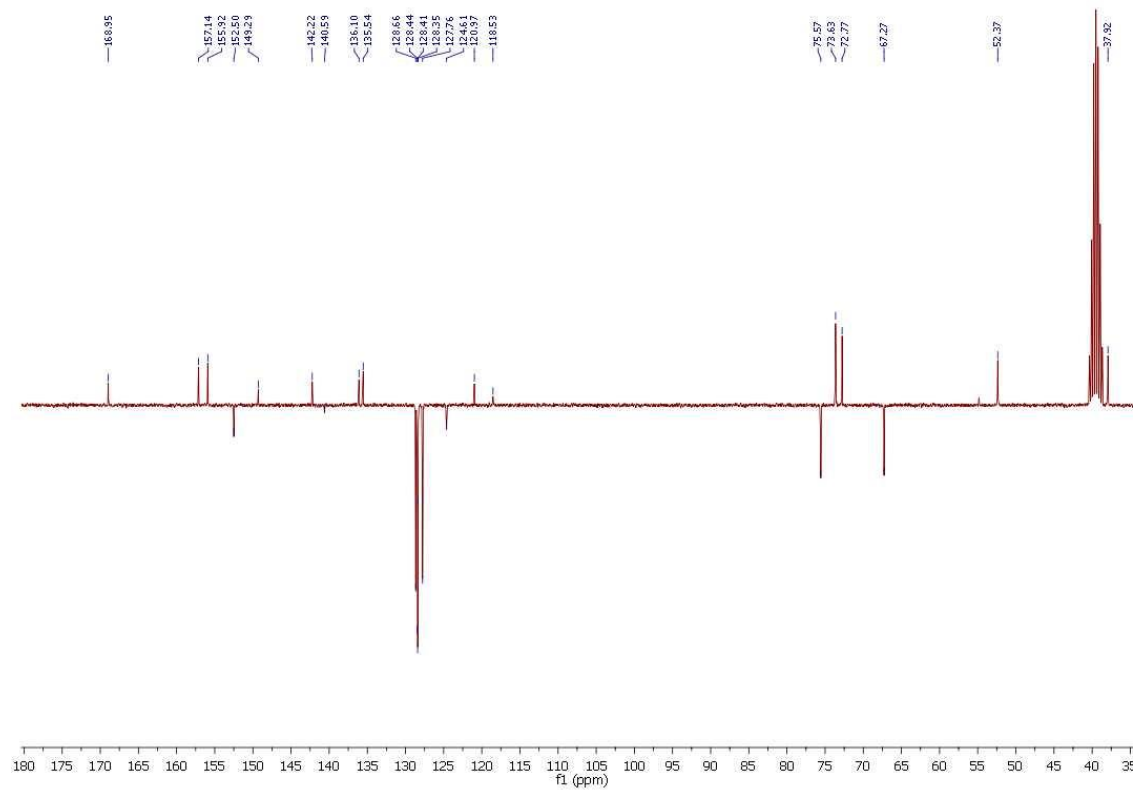
Key words: purine isosteres, pyrimidines, L-ascorbic acid, Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition, mechanochemistry

8. PRILOZI

a)

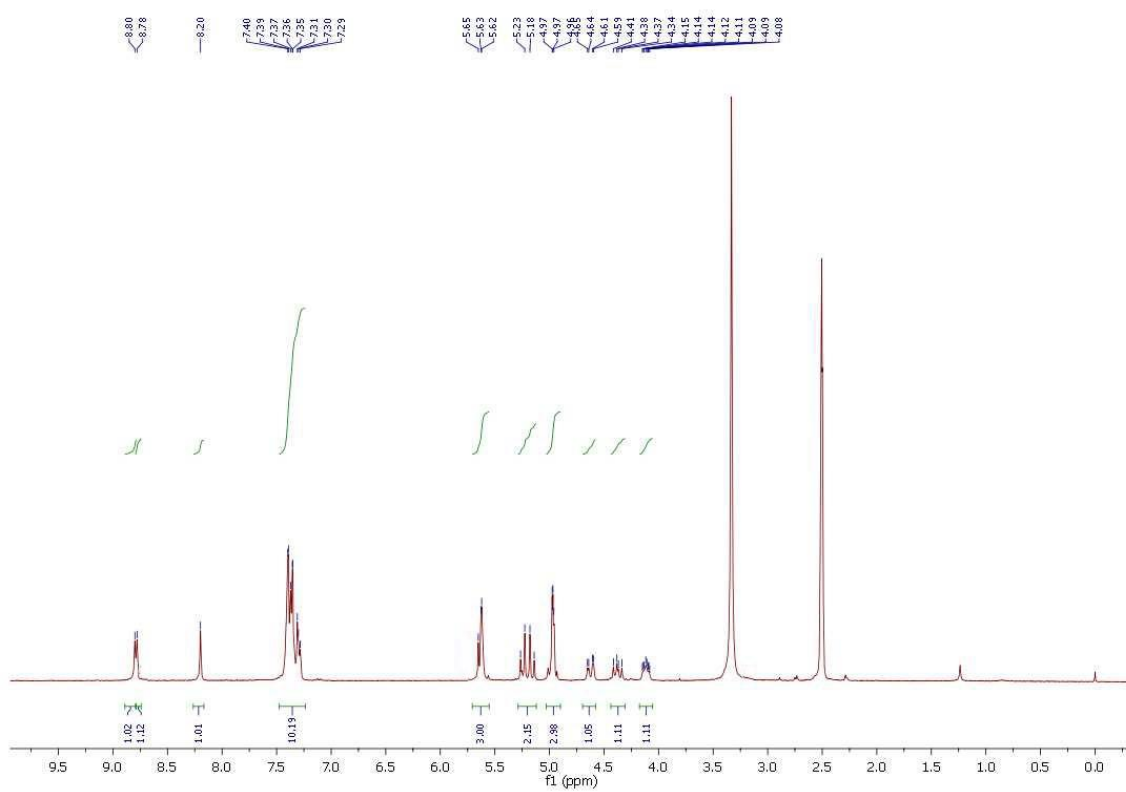


b)

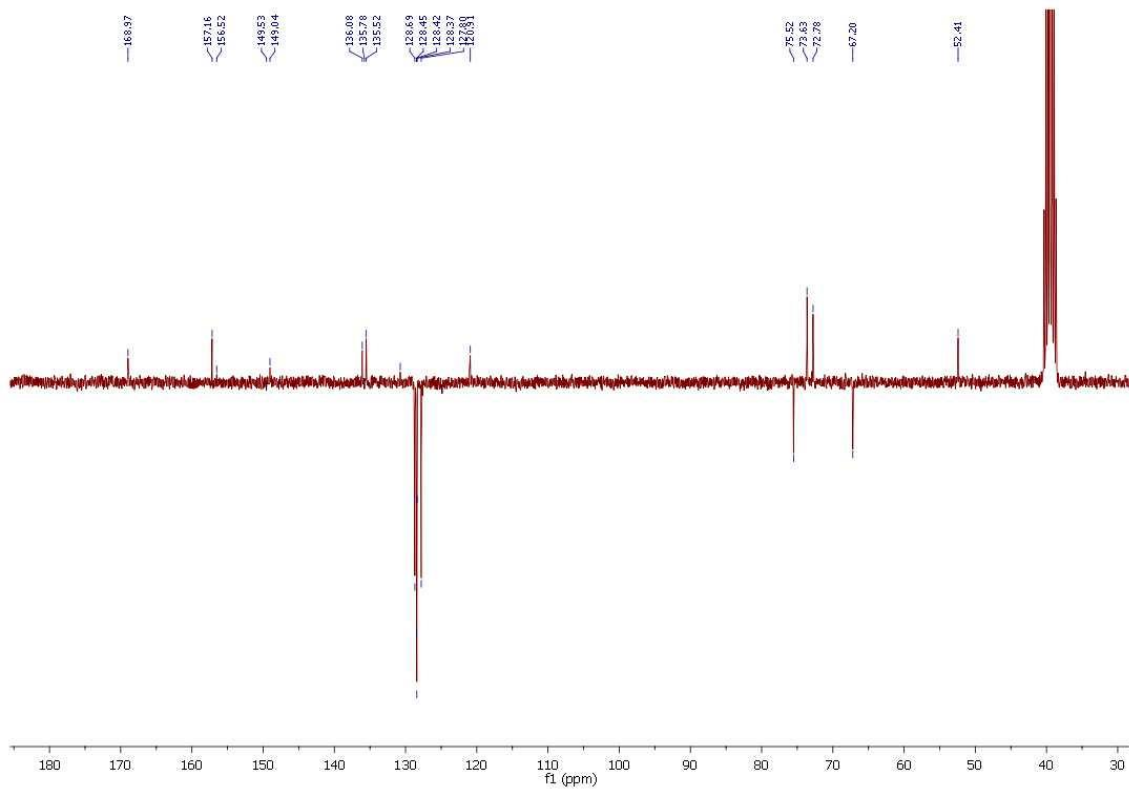


Slika 37. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 27.

a)

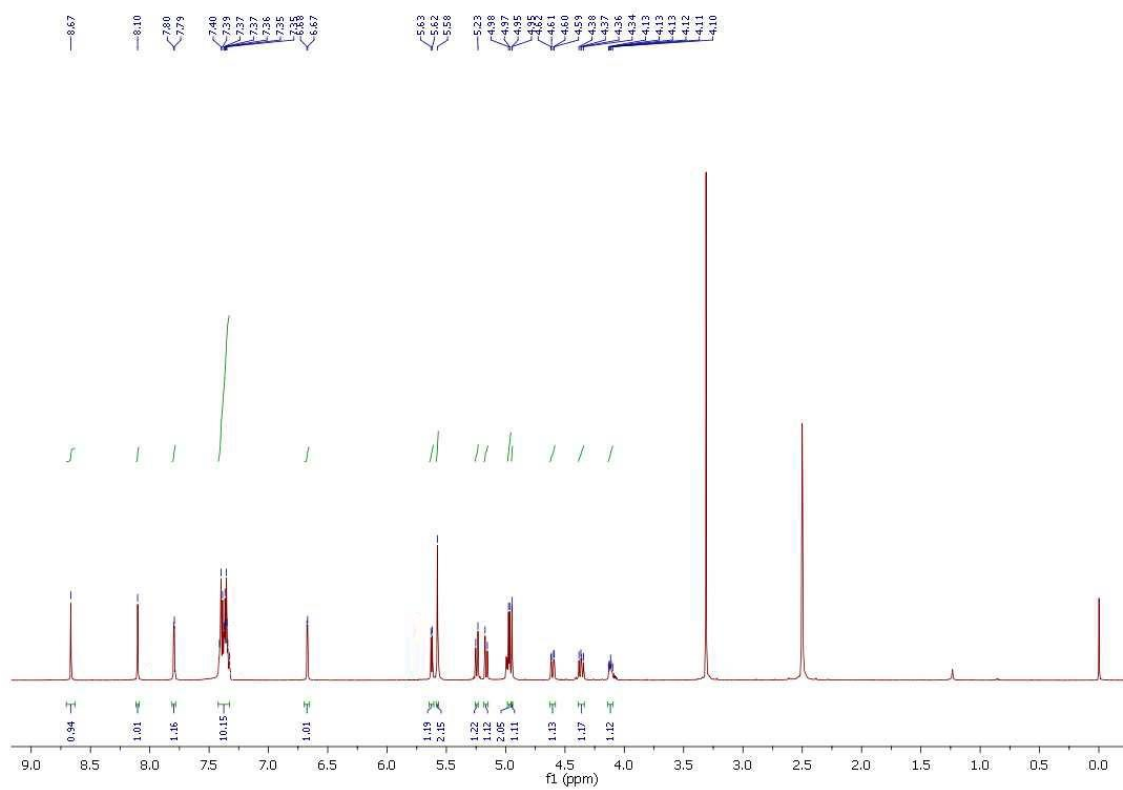


b)

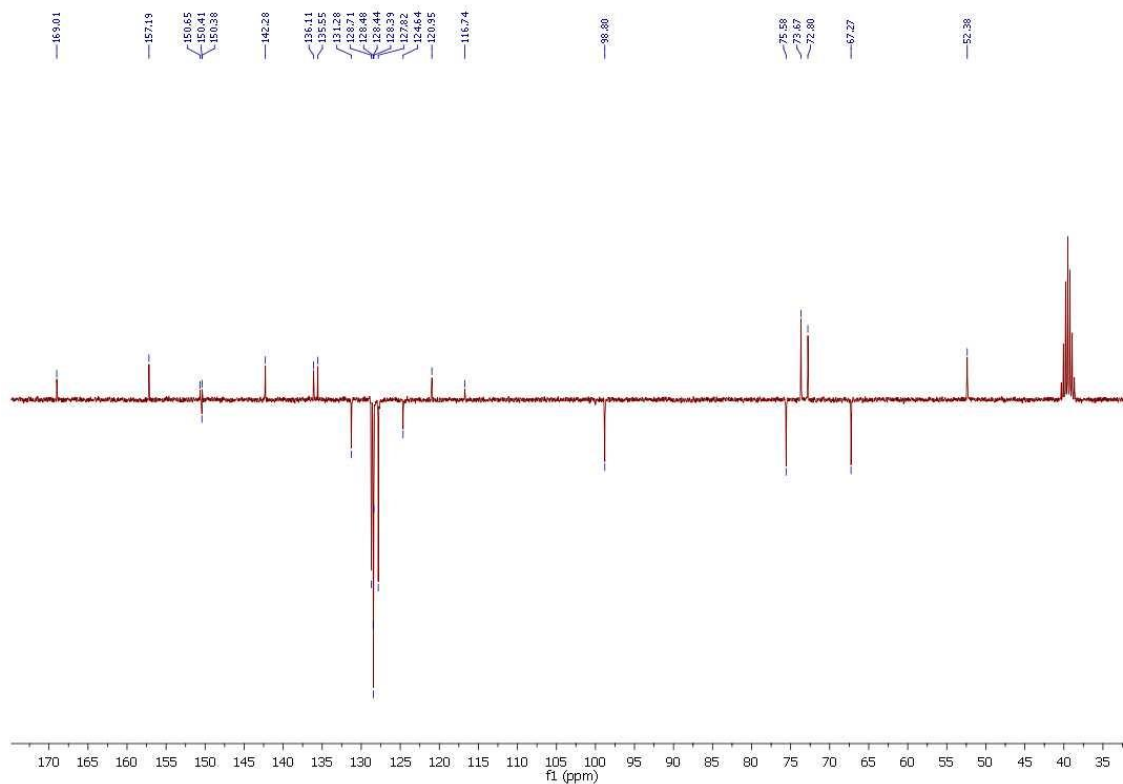


Slika 38. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 28.

a)

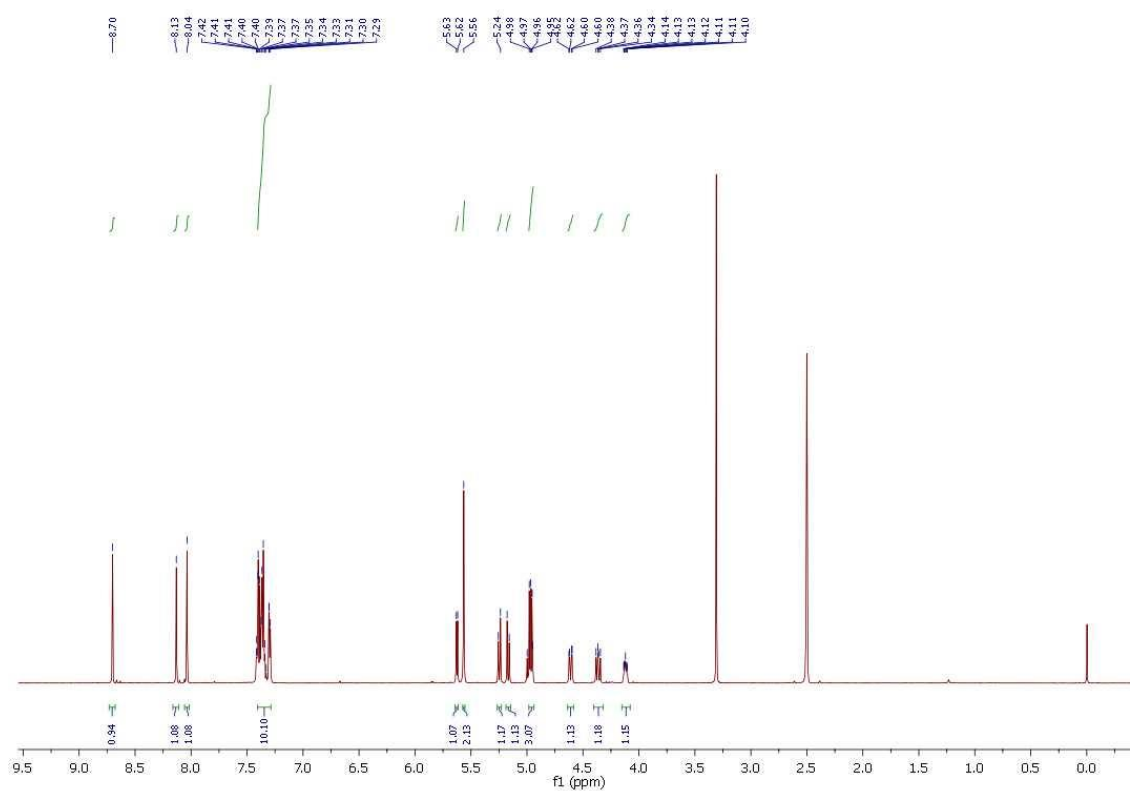


b)

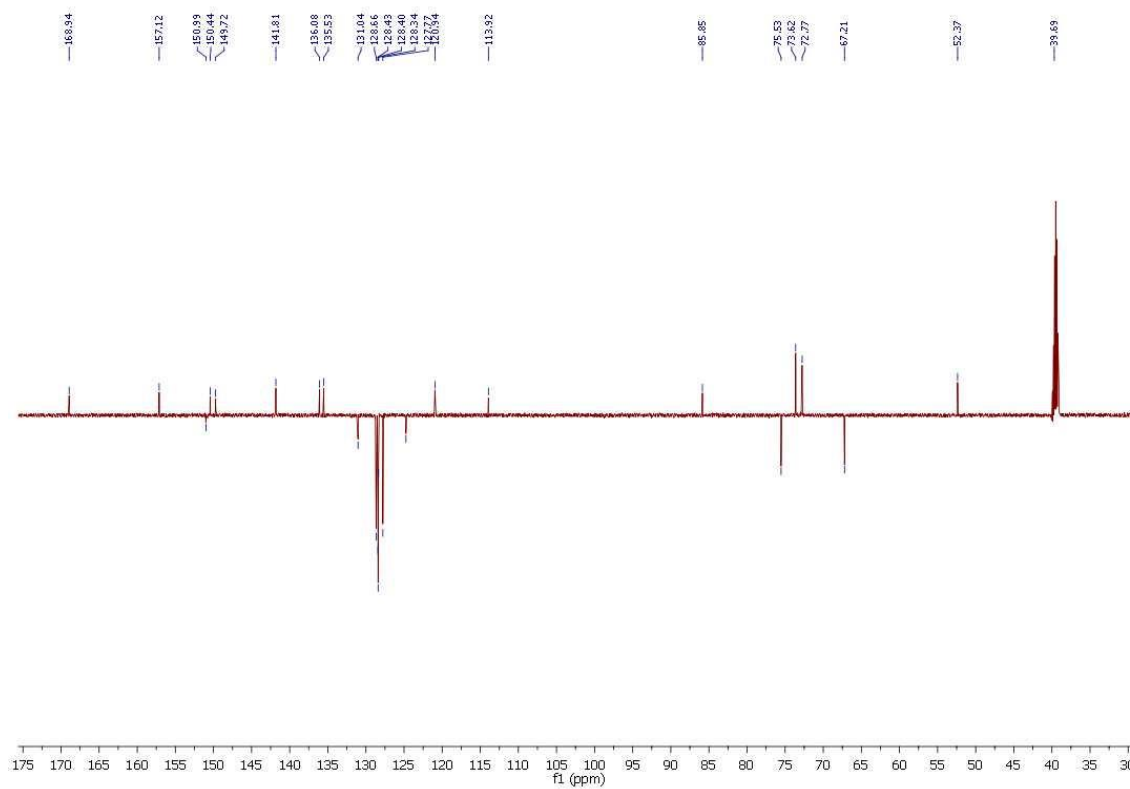


Slika 39. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 29.

a)

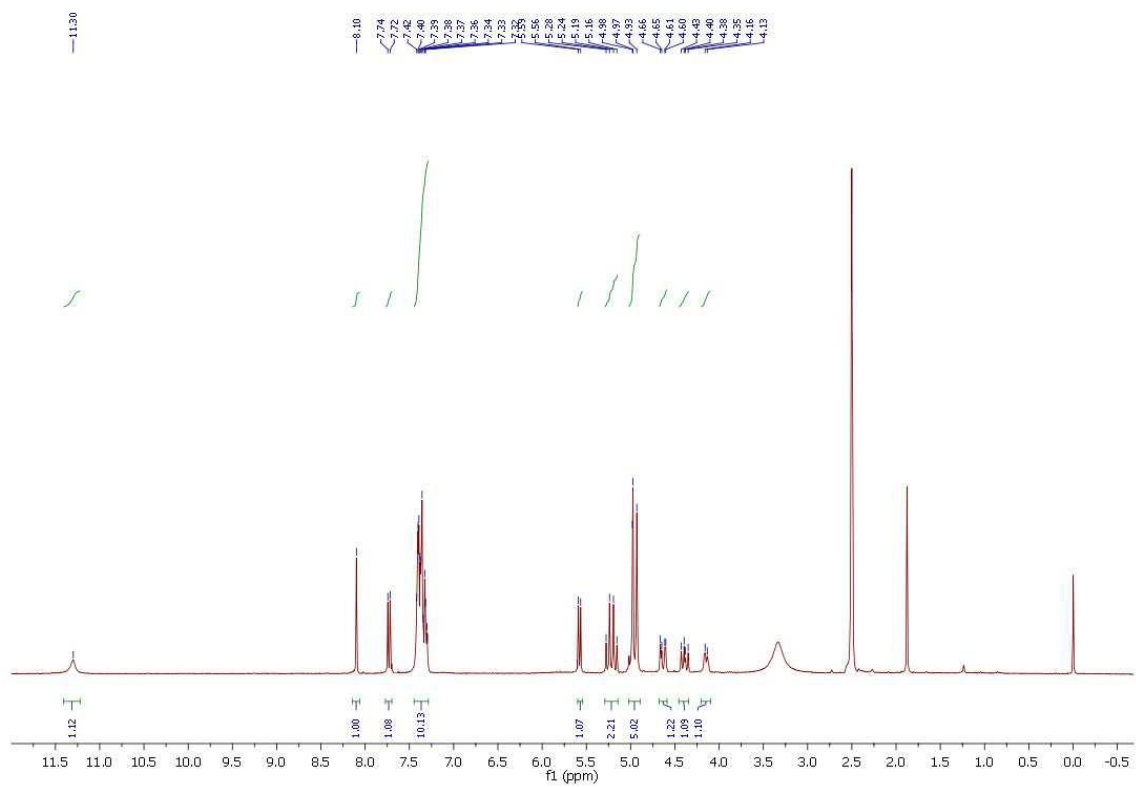


b)

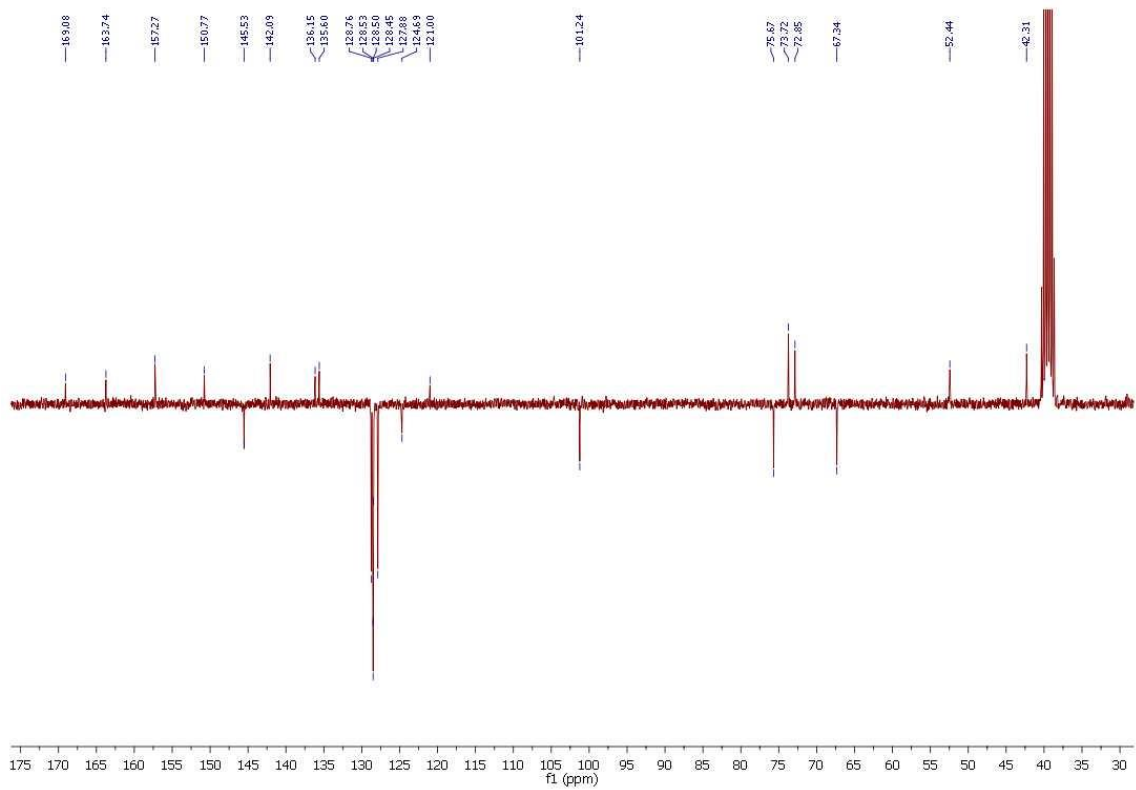


Slika 40. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 30.

a)

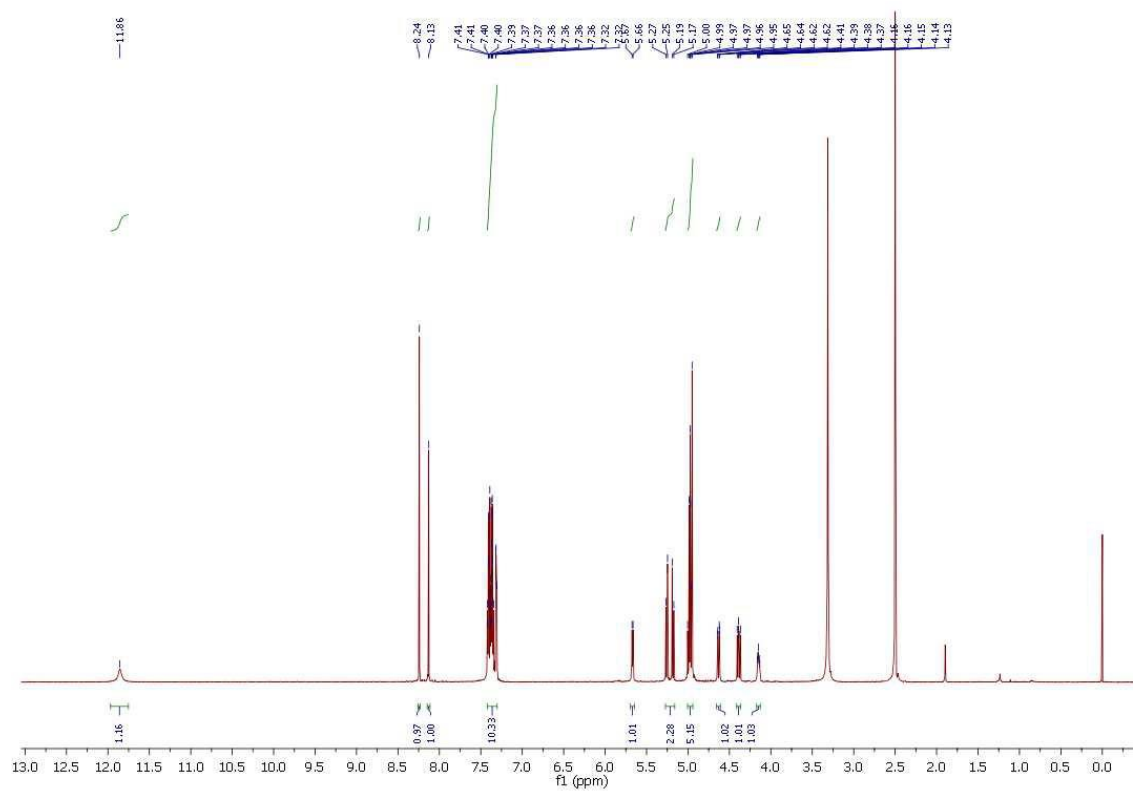


b)

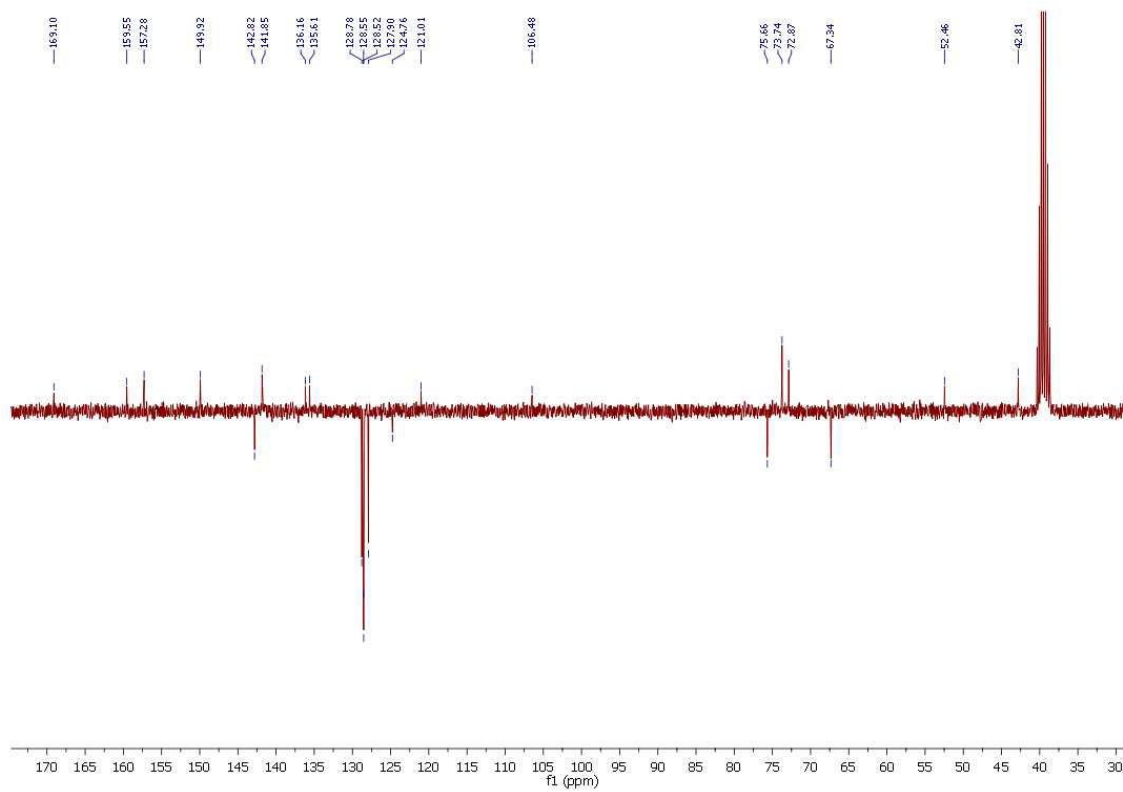


Slika 41. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 31.

a)

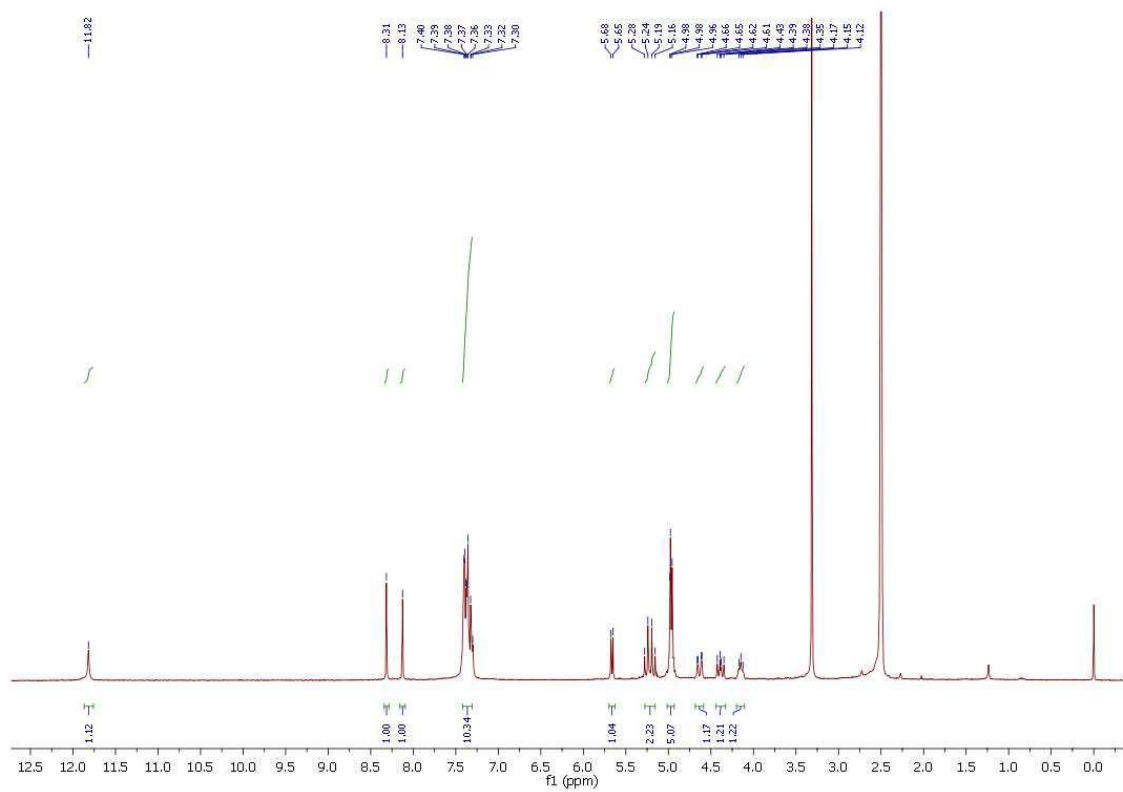


b)

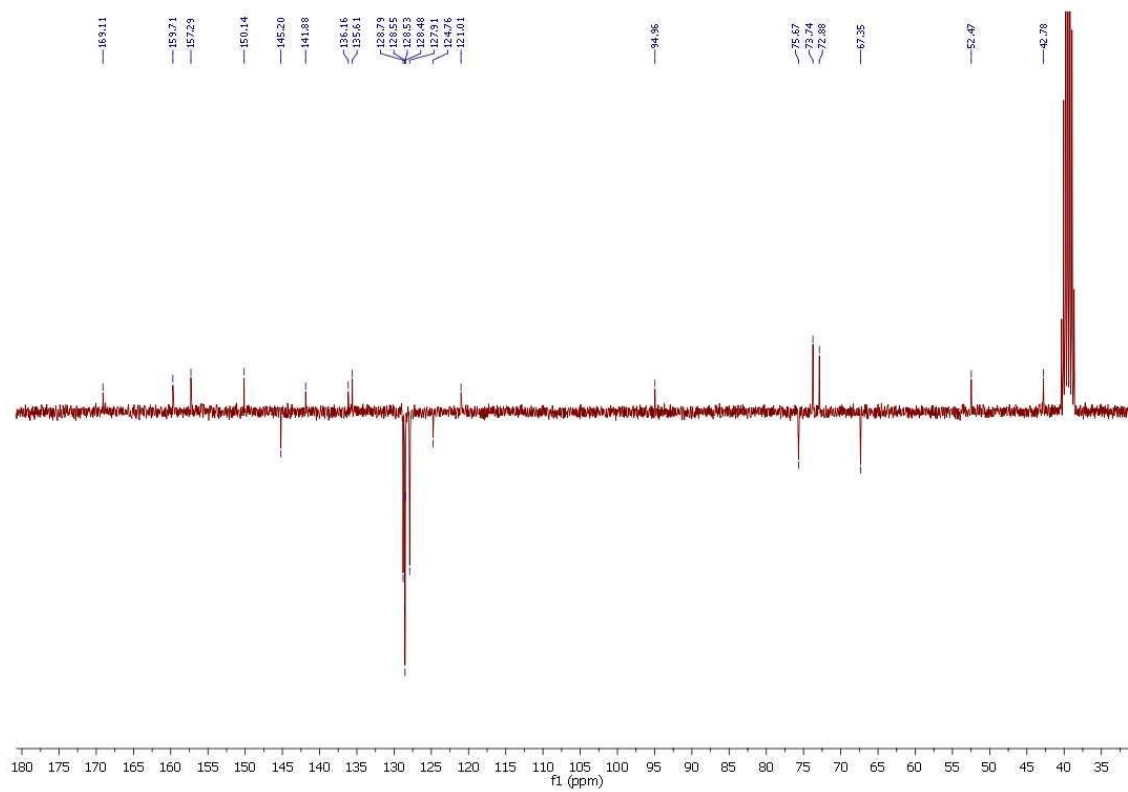


Slika 42. a) ¹H i b) ¹³C NMR spoja 32.

a)

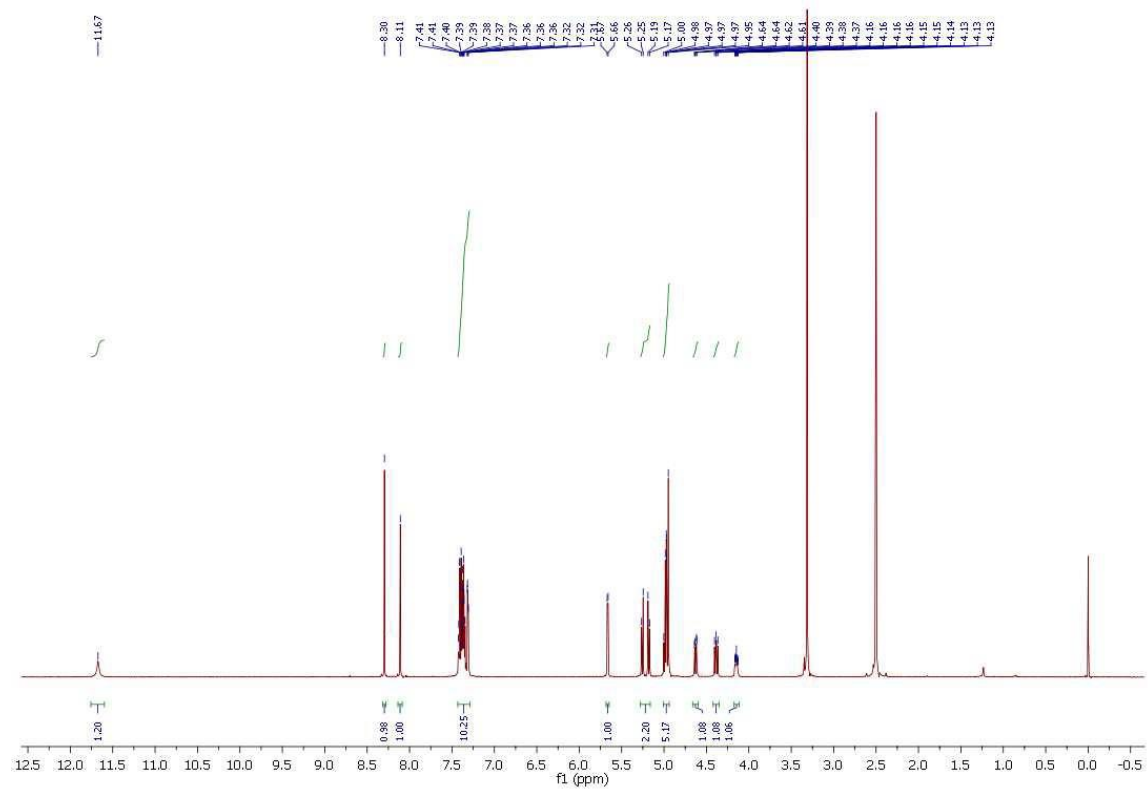


b)

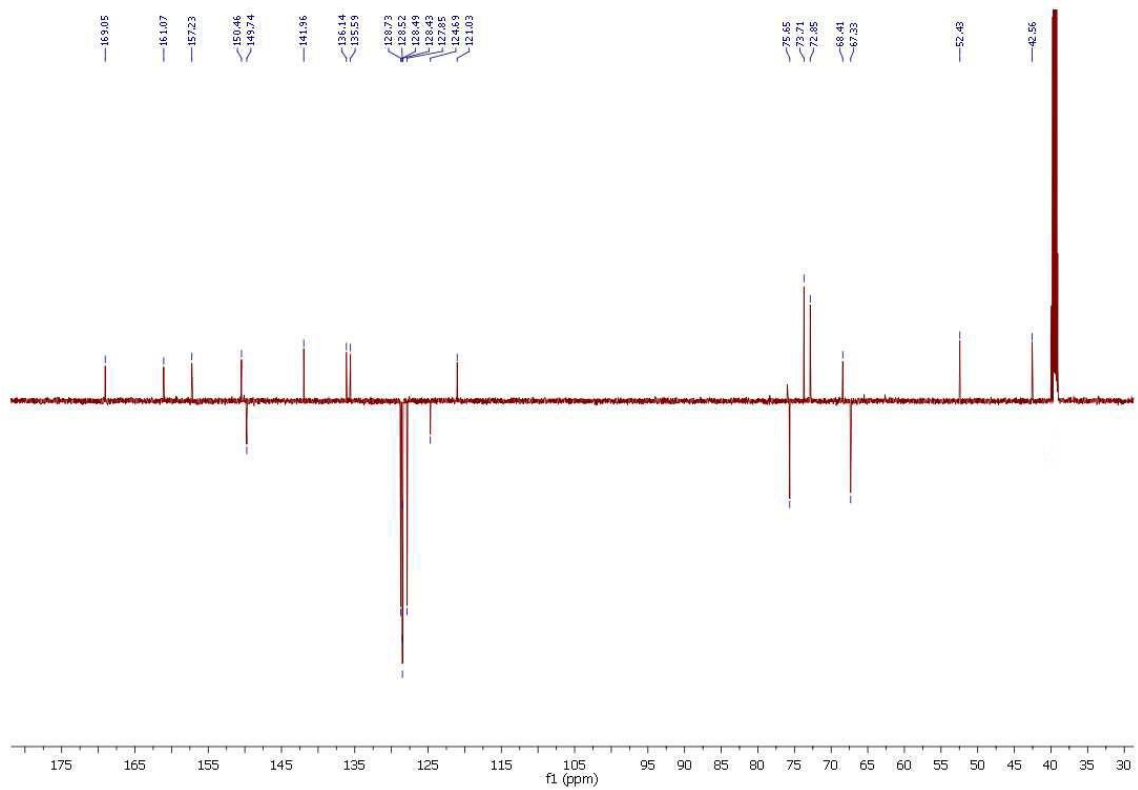


Slika 43. a) ¹H i b) ¹³C NMR spoja 33.

a)

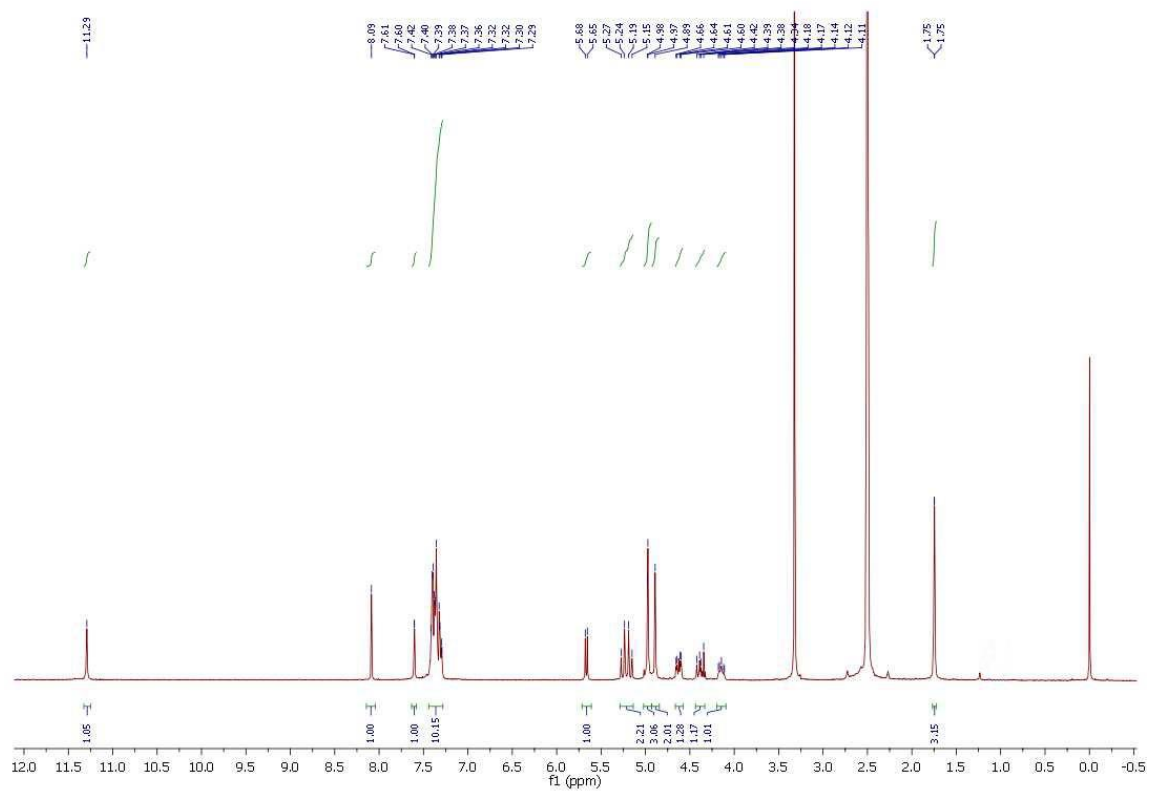


b)

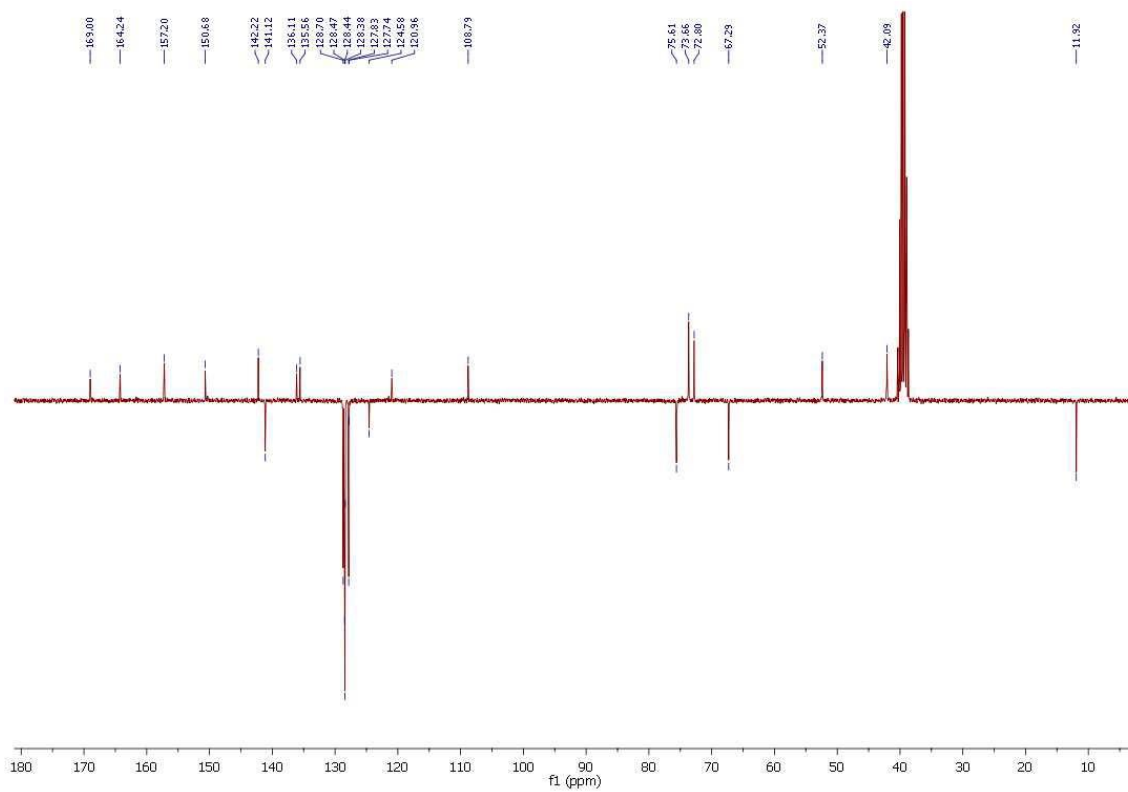


Slika 44. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 34.

a)

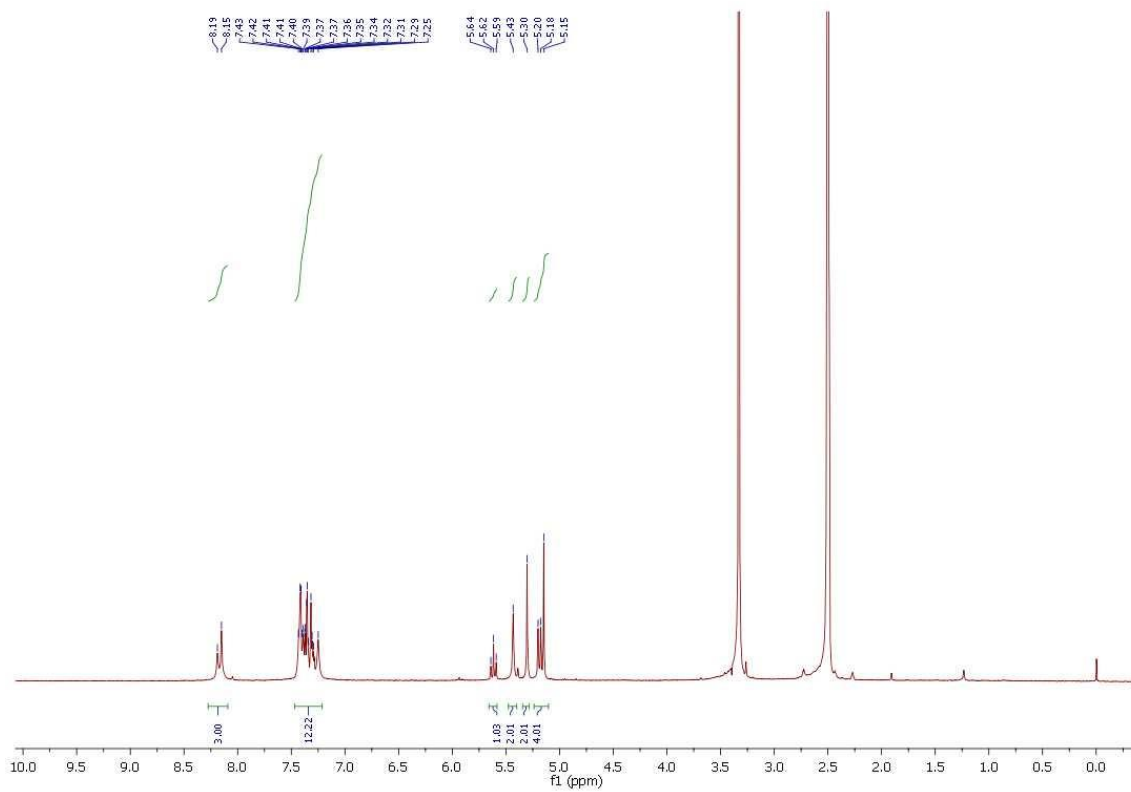


b)

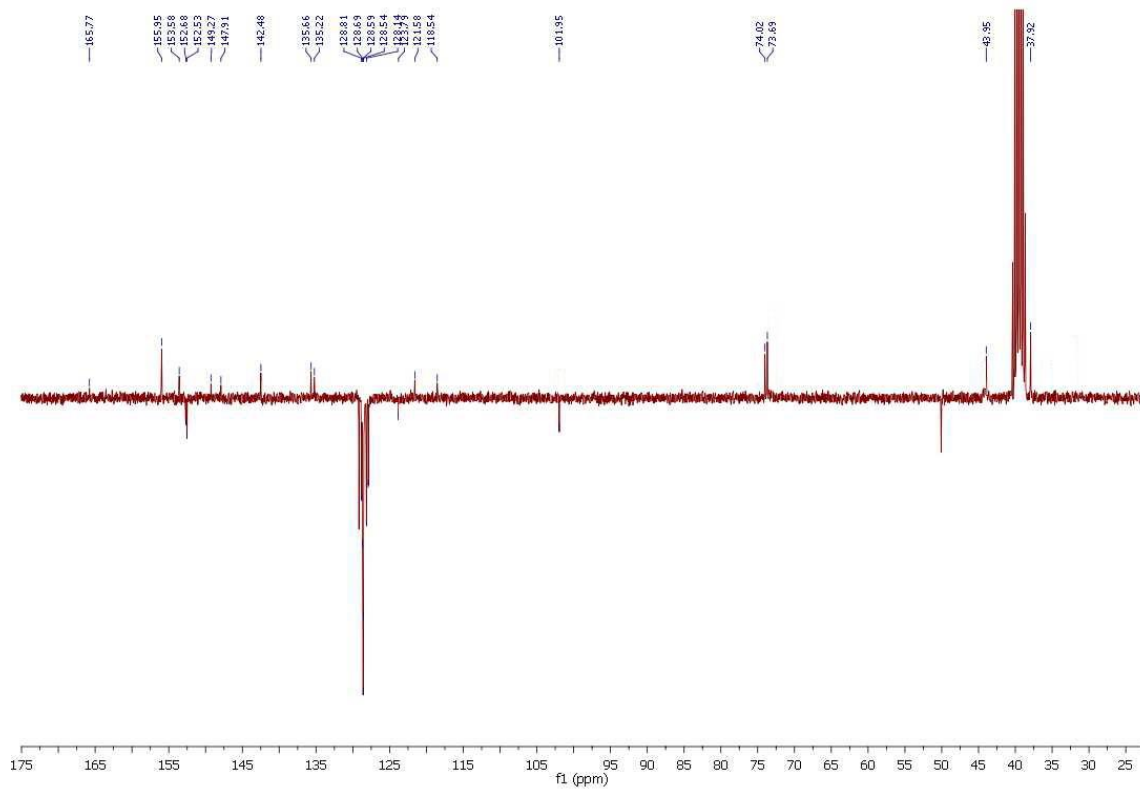


Slika 45. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 35.

a)

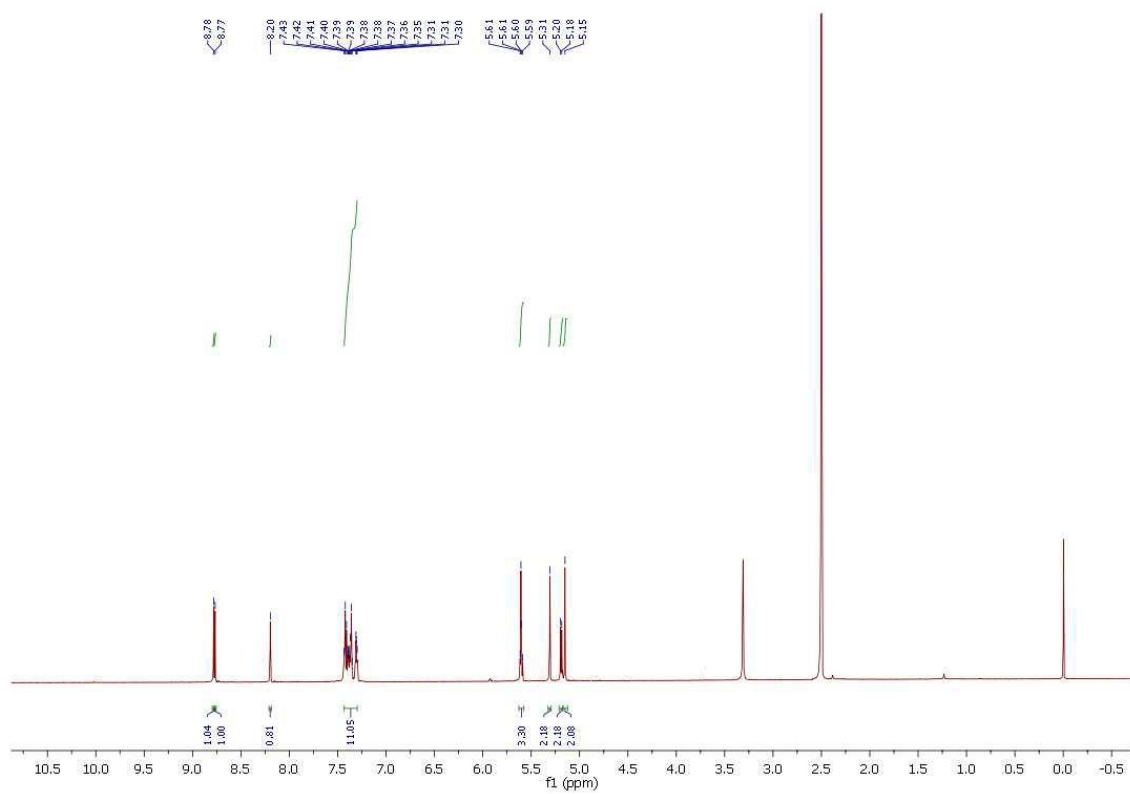


b)

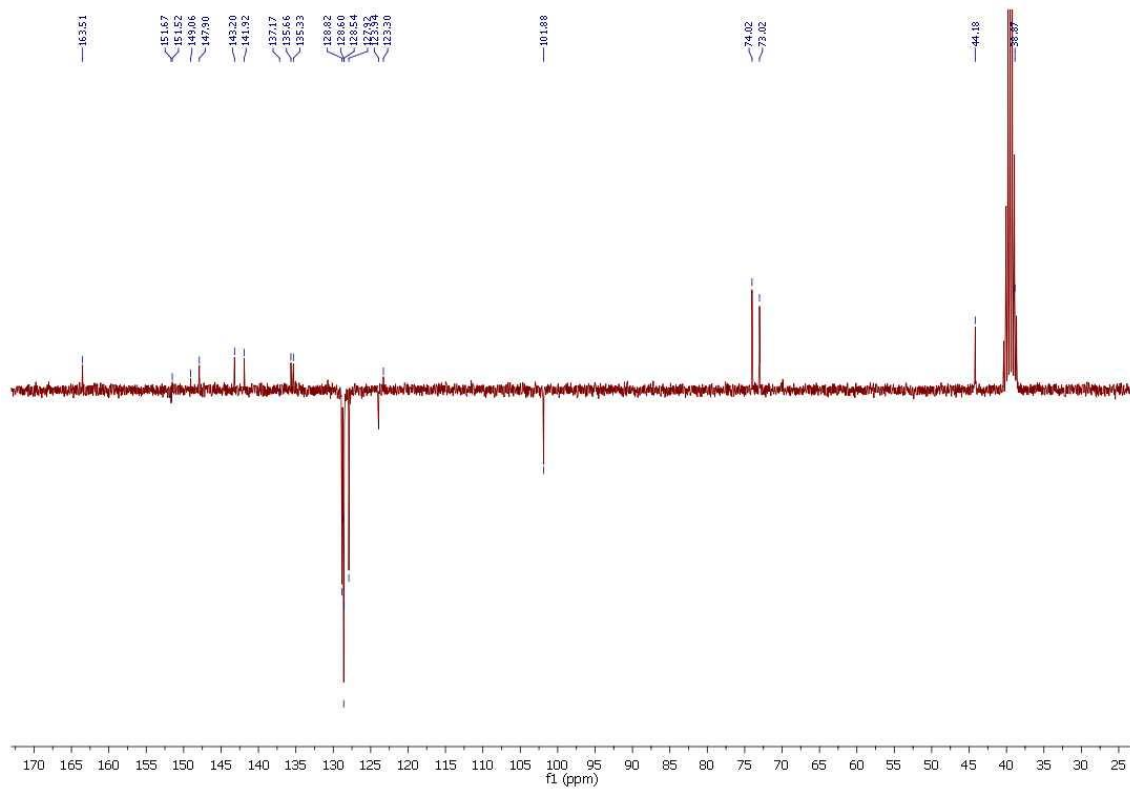


Slika 46. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 36.

a)

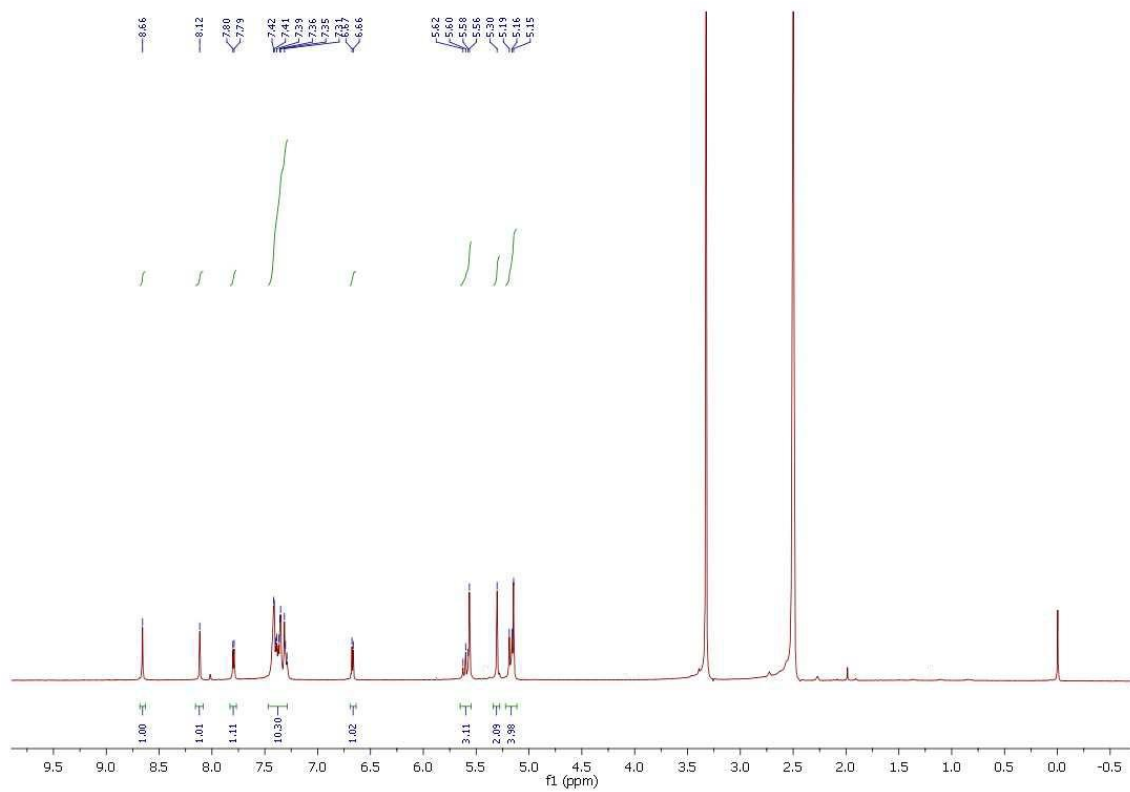


b)

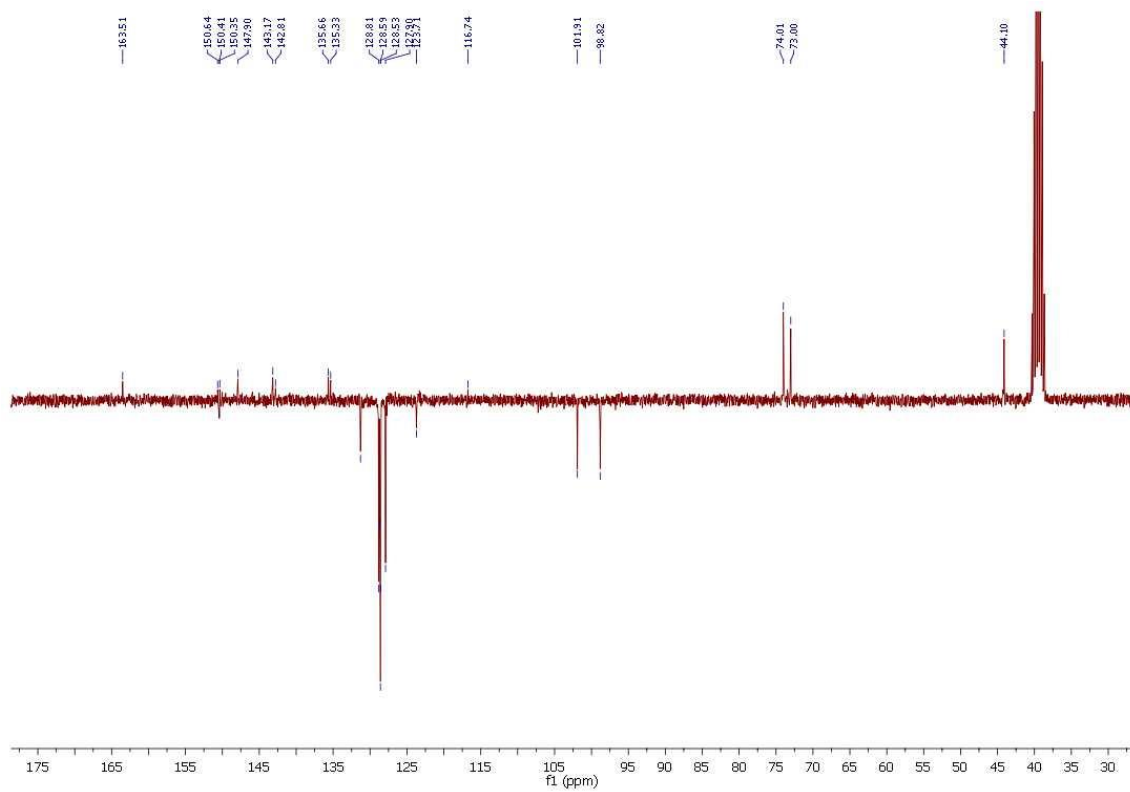


Slika 47. a) ¹H i b) ¹³C NMR spoja 37.

a)

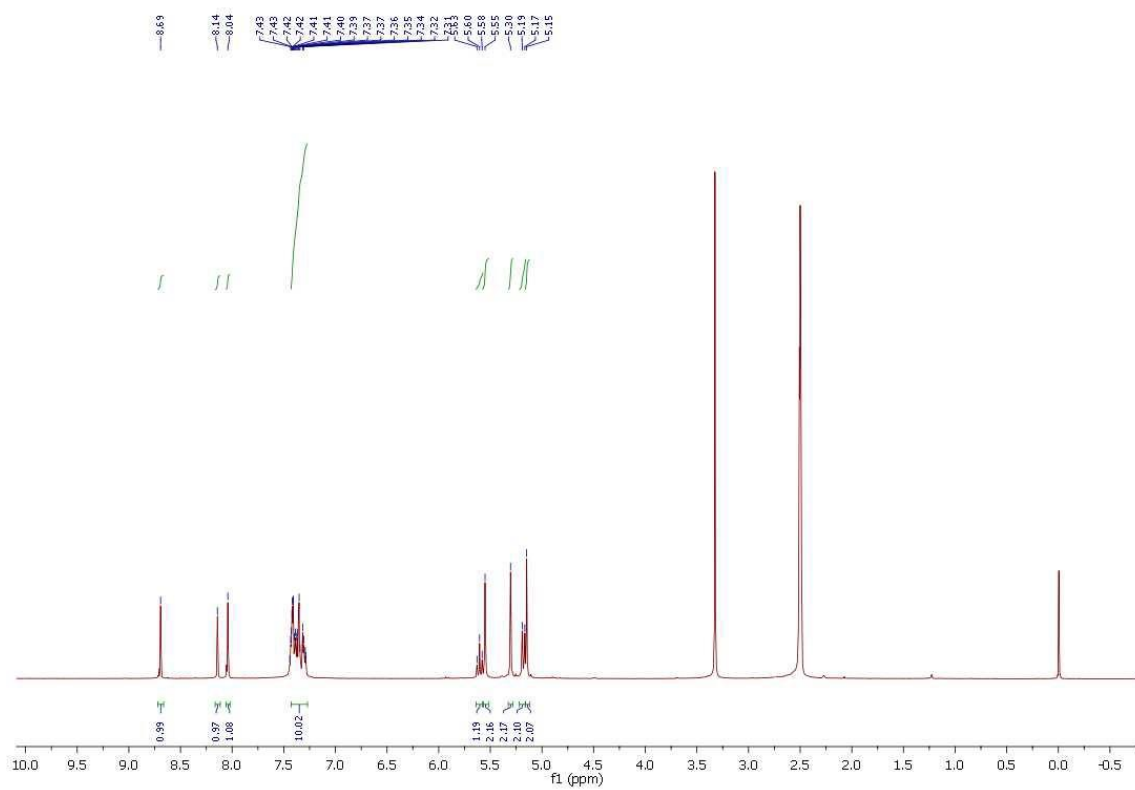


b)

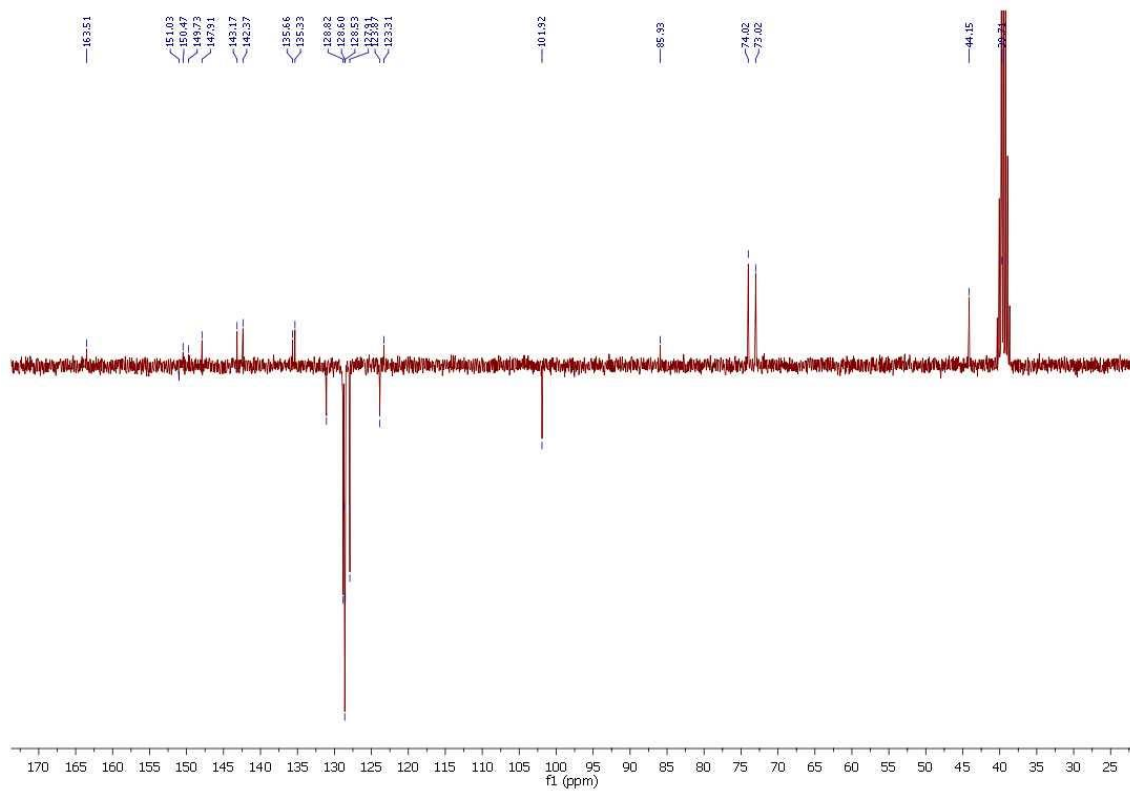


Slika 48. a) ¹H i b) ¹³C NMR spoja 38.

a)

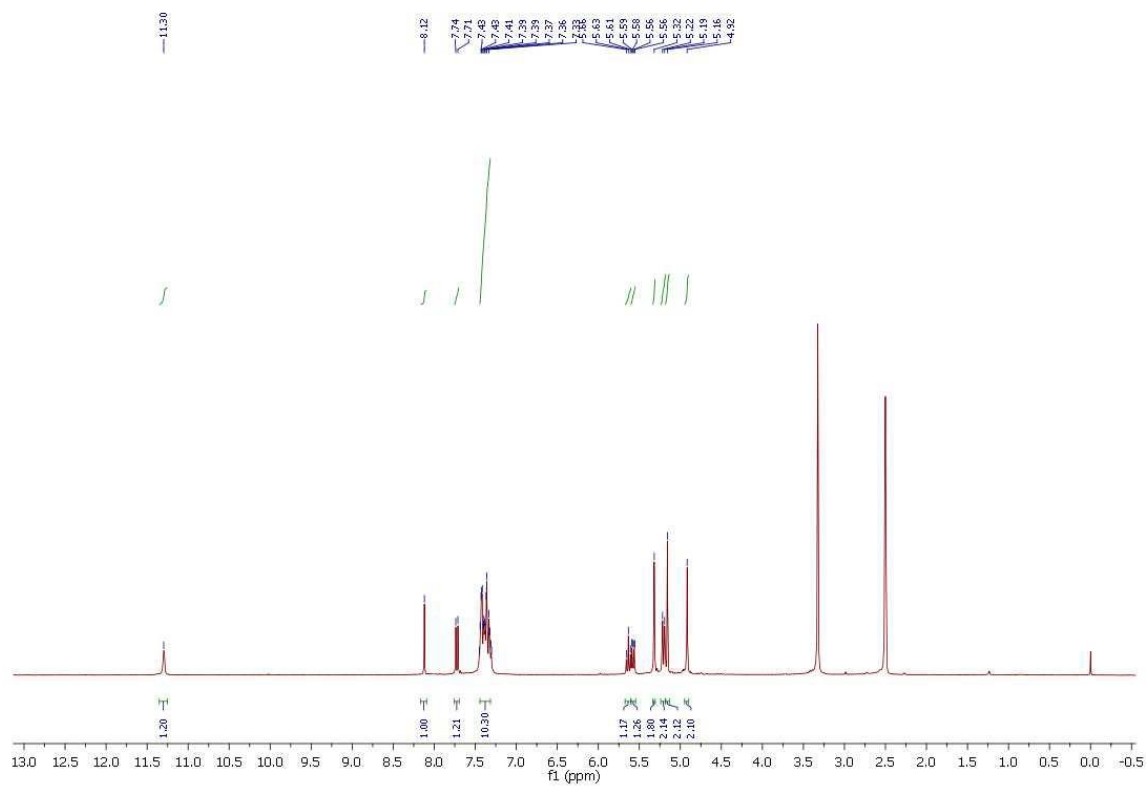


b)

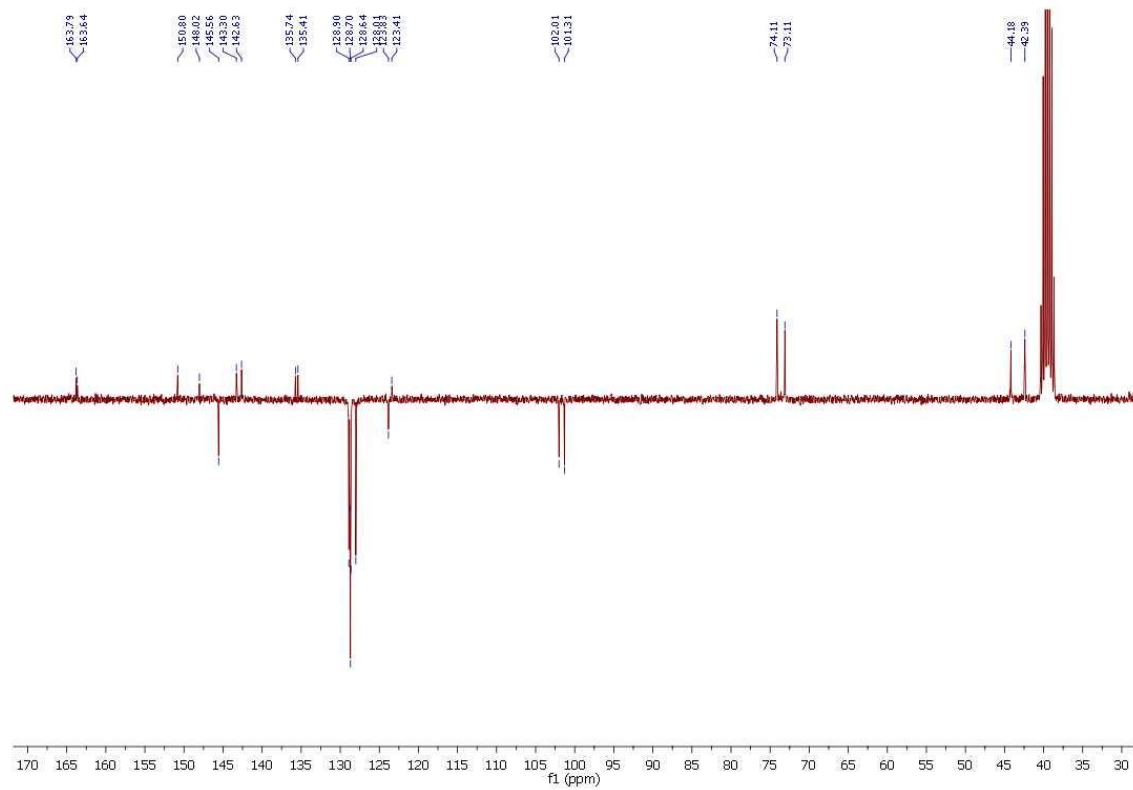


Slika 49. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 39.

a)

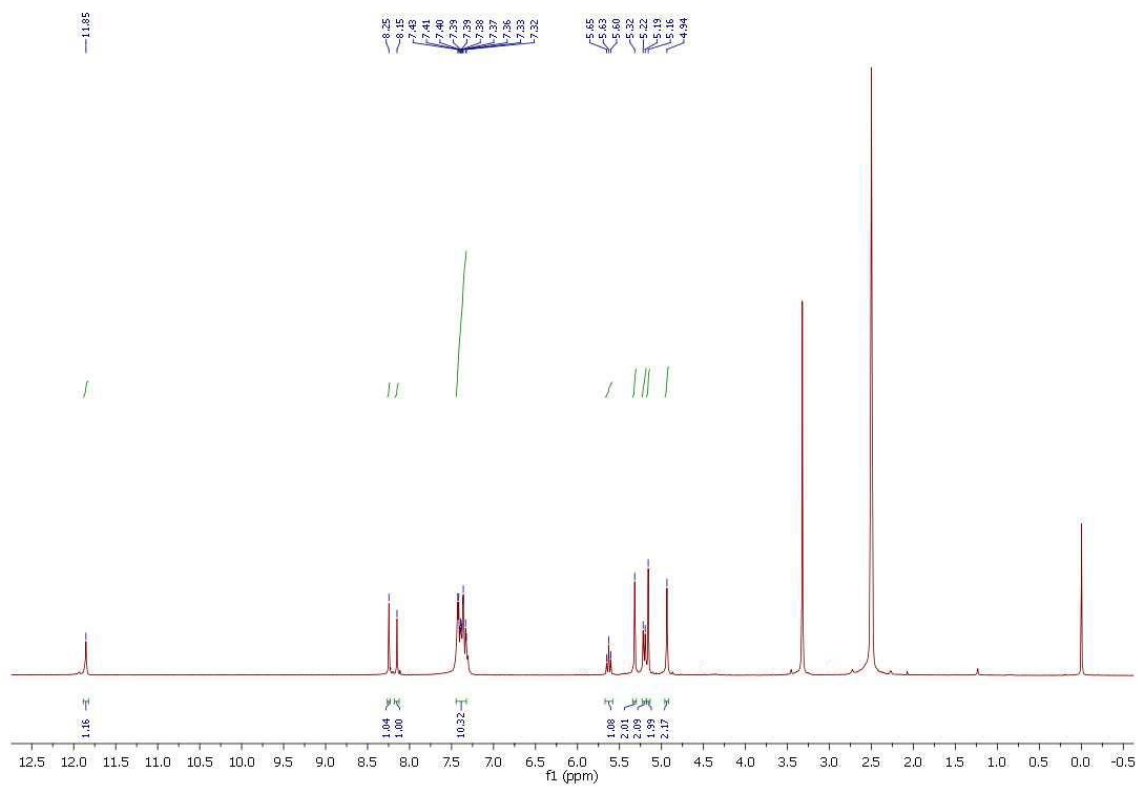


b)

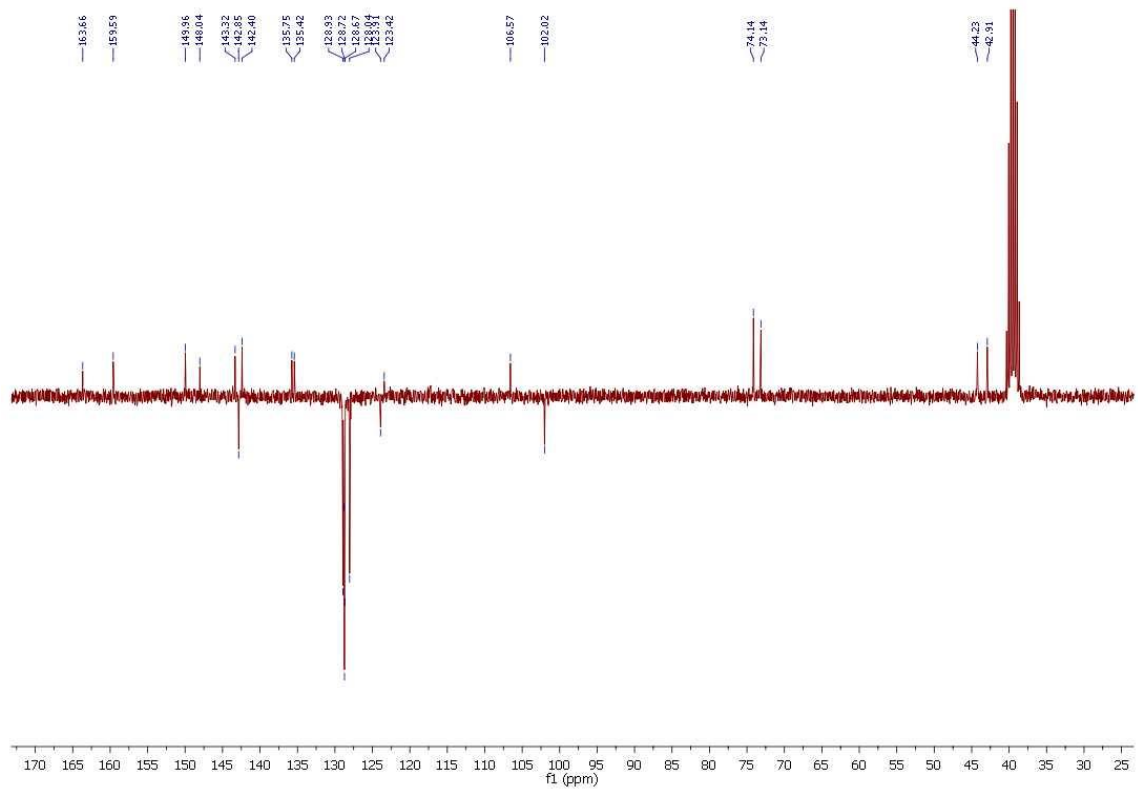


Slika 50. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 40.

a)

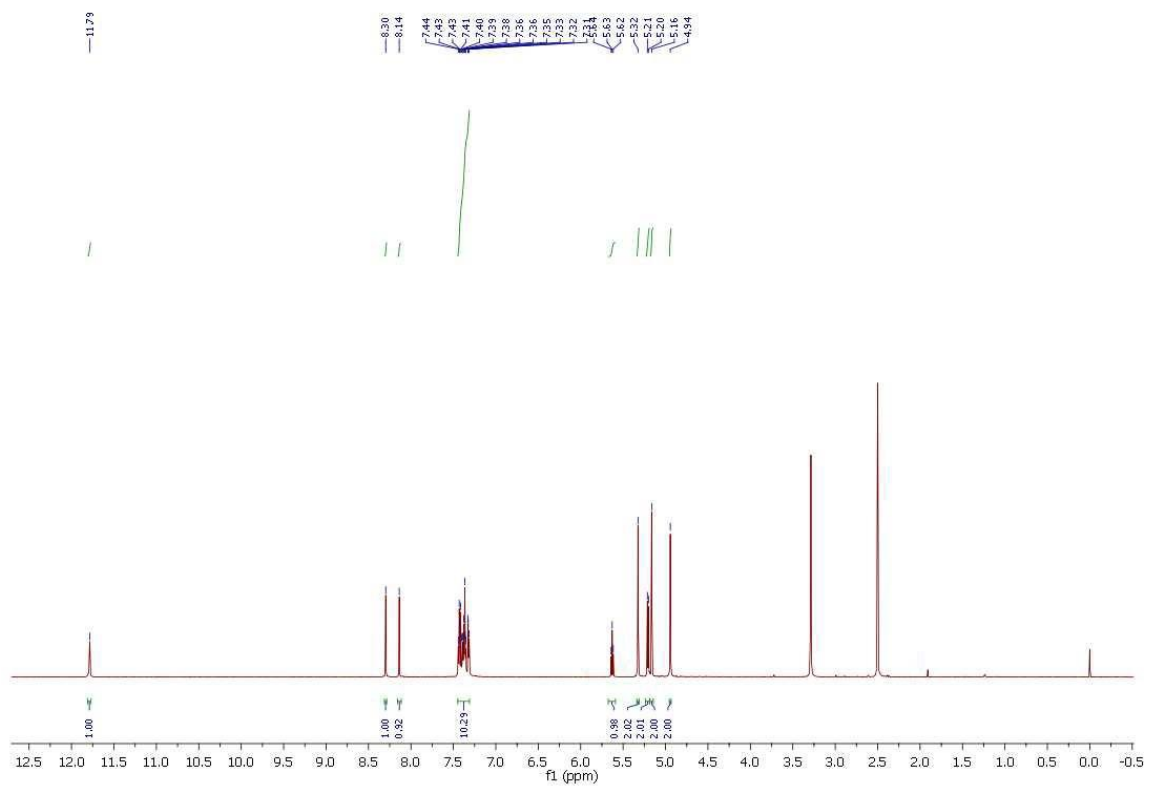


b)

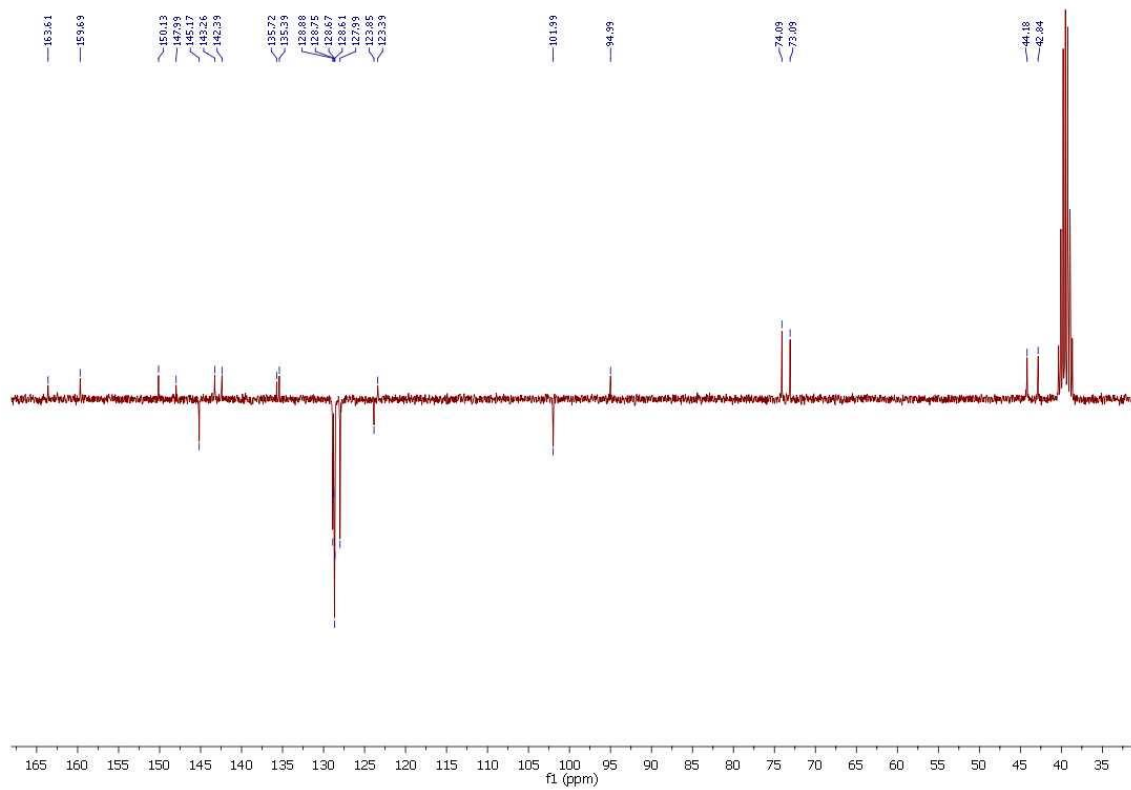


Slika 51. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 41.

a)

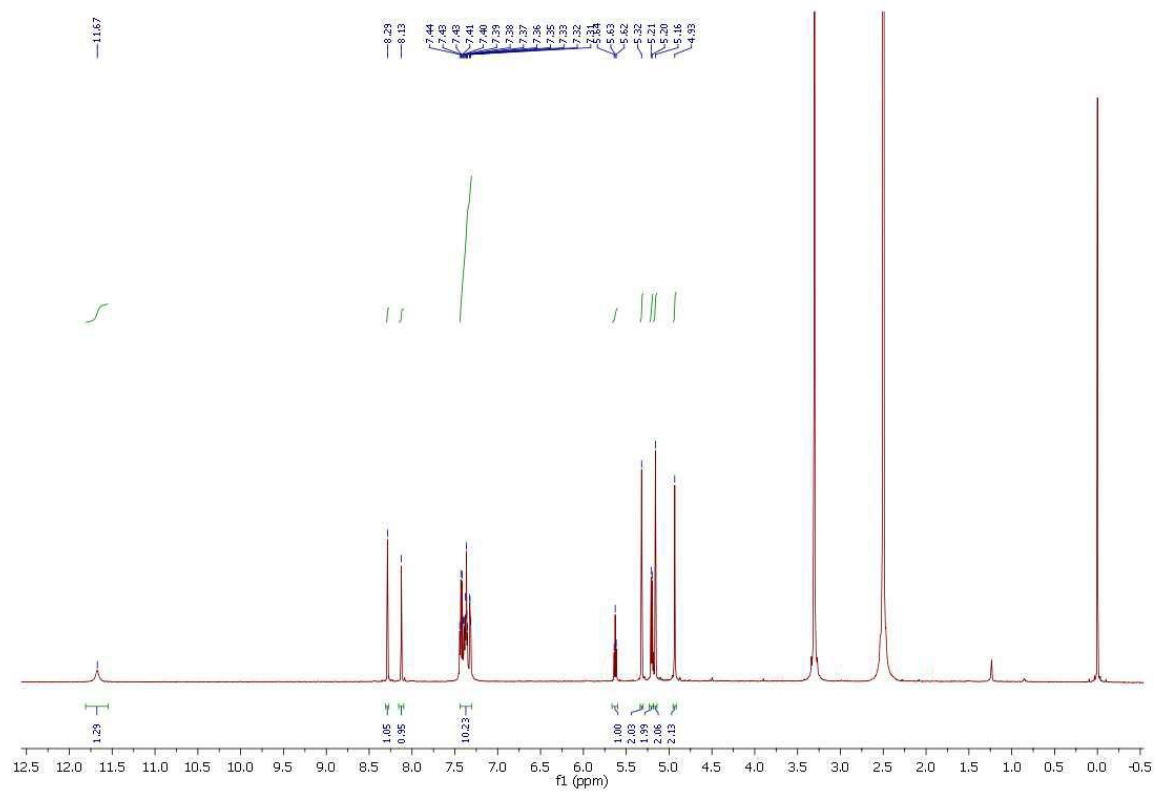


b)

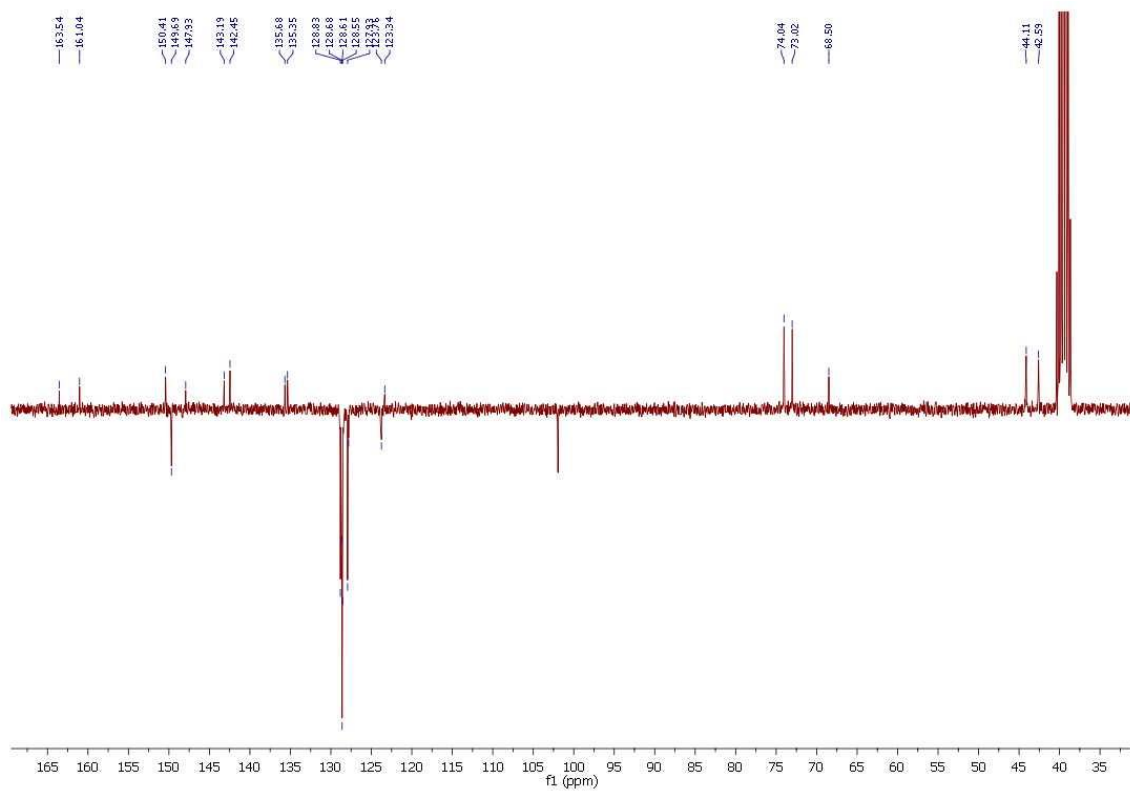


Slika 521. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 42.

a)

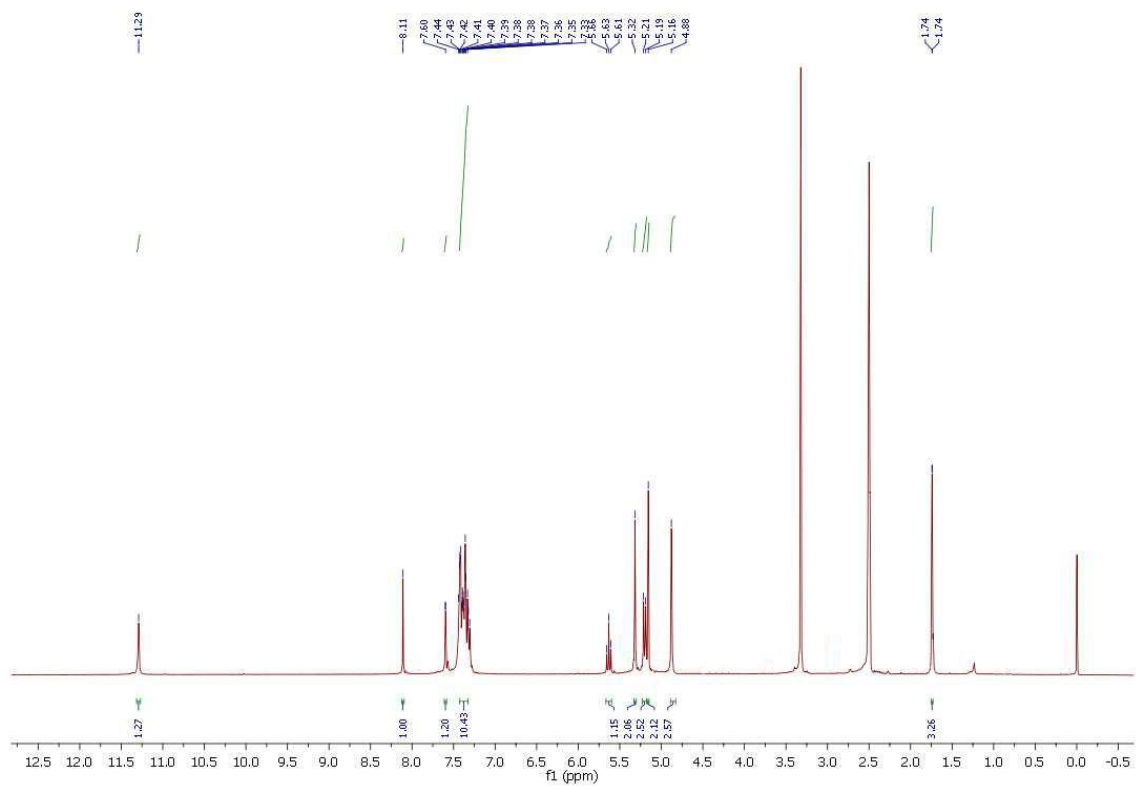


b)

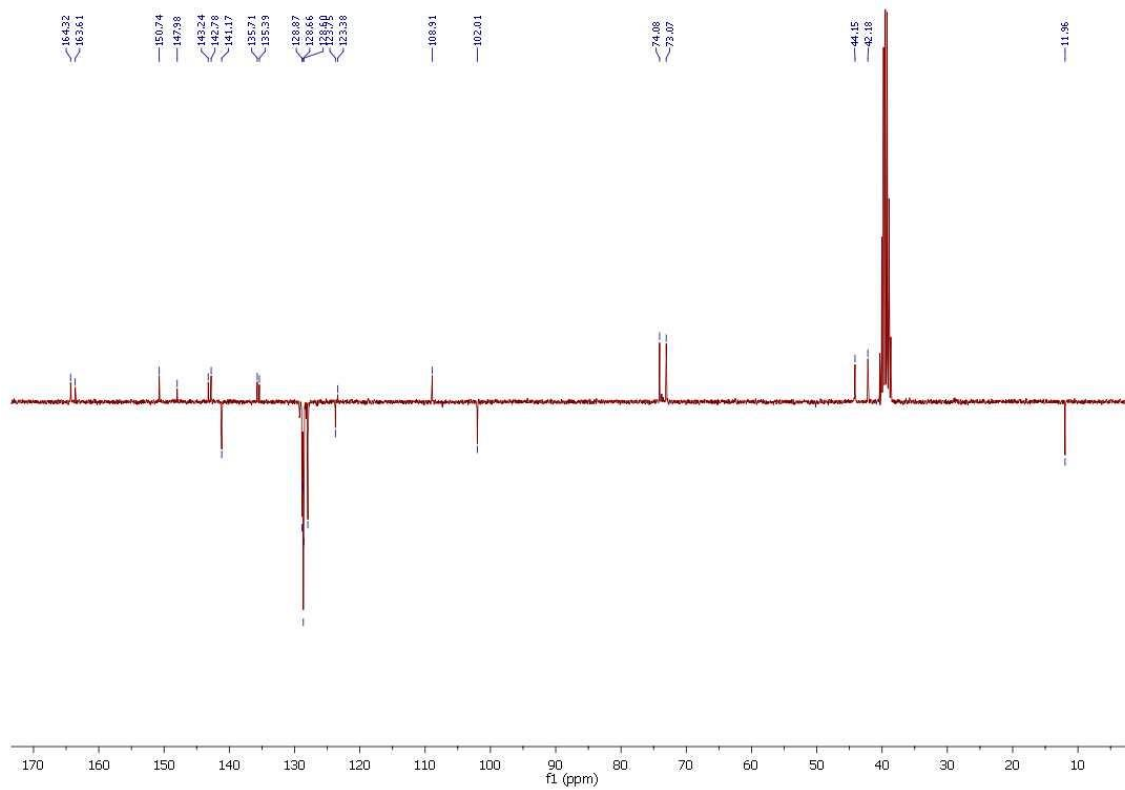


Slika 53. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 43.

a)



b)



Slika 54. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 44.

ŽIVOTOPISI

Silvio Jakopec

Silvio Jakopec rođen je 20. 02. 1997. u Zaboku. Od 2003. do 2011. pohađao je Osnovnu školu Donja Stubica, nakon čega je 2011. upisao strukovni program kemijski tehničar u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga te maturirao 2015. s odličnim uspjehom. Studij Primijenjene kemije Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2015. godine. Stručnu praksu odradio je na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za kemiju čvrstog stanja i kompleksnih spojeva. Završni i znanstveni rad radio je na Zavodu za organsku kemiju. Akademske godine 2017/18. obraniti će završni rad na temu *Mono- i bis-1,2,3-triazolilni derivati benzimidazo[1,2-a]kinolina: sinteza i biološka ispitivanja*.

Helena Prpić

Helena Prpić rođena je 3. 04. 1996. u Rijeci. Od 2002. do 2010. pohađala je Osnovnu školu Silvija Strahimira Kranjčevića u Senju. Od 2010. do 2014. pohađala je gimnazijski program S. Š. Paval Rittera Vitezovića u Senju te je maturirala kao učenica generacije. U razdoblju od 2003. do 2009. pohađala je Glazbenu školu Vjenceslava Novaka u Senju, te je u razdoblju od 2010. do 2013. pohađala Govorničku školu 'Ivo Škarić'. Preddiplomski studij Primijenjene kemije Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2014. godine. Stručnu praksu odradila je u Plivi. Završni na temu *Sinteza purina, pseudopurina i L-askorbinske kiseline s 1,2,3-triazolnom premostnicom* obranila je 2017. godine i stekla naziv sveučilišna prvostupnica primijenjene kemije, te se uključila u znanstveni rad na Zavodu za organsku kemiju. 2017. godine upisala je diplomski studija Primijenjene organske kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Helena Šimek

Helena Šimek rođena je 20. 05. 1995. u Virovitici. Osnovnu školu završila je u Novoj Bukovici, a Opću gimnaziju u Slatini. Sve razrede osnovne i srednje škole prošla je s odličnim uspjehom, a nakon položene državne mature 2014. godine upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, smjer Kemijsko inženjerstvo. Tijekom fakultetskog obrazovanja odradila je stručnu studentsku praksu u tvrtki M-SAN Eko, sudjelovala je na radionici o NMR spektroskopiji koju je održao profesor Tomislav Portada, te sudjelovala u znanstvenom radu na projektu prof. Raić Malić. 2017. godine obranila je završni rad na temu *Sinteza O-alkiliranih derivata 4-kinolinona* s ocjenom odličan i stekla naziv Sveučilišna prvostupnica inženjerka kemijskog inženjerstva.

Sudjelovanje na skupovima :

1. Maračić, Silvija; Šimek, Helena; Grbčić, Petra; Sedić, Mirela; Stolić, Ivana; Kraljević Pavelić, Sandra; Raić-Malić, Silvana. Biological evaluations of amidine and amidoxime substituted heterocycles with 1,2,3-triazolyl spacer, The 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Book of abstracts, Zagreb: Croatian Chemical Society, 2017. 88-88 (postersko priopćenje).