

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

**Leo Mandić**

**Tomislav Suhina**

*Sinteza novih acikličkih analoga nukleozida iz reda 3-supsituiranih derivata 1,2,4-triazola i gvanina kao potencijalnih antivirotika*

**Zagreb, 2012.**

*Ovaj rad je izrađen u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju  
Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom prof. dr. sc. Mladena Mintasa  
i predan je za natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011./2012.*

## SADRŽAJ RADA

<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1. OPĆI DIO .....</b>	<b>2</b>
1.1. Herpes simpleks virus (HSV).....	2
1.1.1. Struktura .....	2
1.1.2. Prijenos .....	4
1.1.3. Rasprostranjenost.....	5
1.1.4. Životni ciklus i replikacija .....	6
1.1.5. Najvažniji antivirusni agensi.....	9
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>16</b>
2.1. Materijali i metode .....	16
2.2. Sinteza ciljnih molekula .....	17
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>22</b>
3.1. Sinteza spojeva.....	22
3.2. Analiza <sup>1</sup> H i <sup>13</sup> C spektara.....	25
<b>4. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>26</b>
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
<b>SAŽETAK.....</b>	<b>29</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>30</b>
<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>31</b>

*Zahvaljujemo se prof. dr. sc. Mladenu Mintasu na predloženoj temi i mentorstvu u izradi ovog rada, a posebno dipl. ing. Krešimiru Benciju na strpljenju, podršci i velikoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

## UVOD

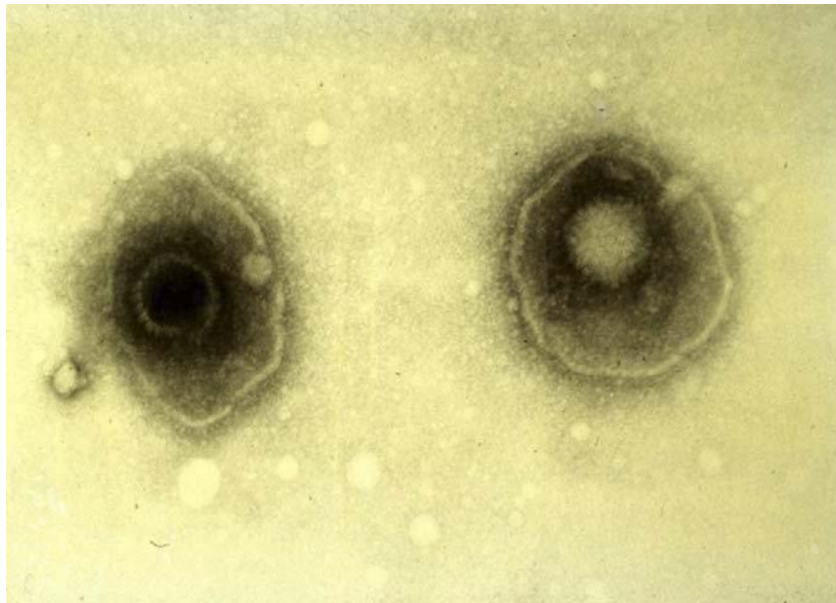
Poznato je više od 80 virusa herpesa, od toga je 8 ljudskih patogena. Herpes simpleks virusi (HSV) pripadaju porodici virusa *Herpesviridae*, koja obuhvaća herpes simpleks virus 1 (HSV-1), herpes simpleks virus 2 (HSV-2), varicella zoster virus (VZV), citomegalovirus (HCMV), Epstein-Barr virus (EBV), te humane herpesviruse 6, 7 i 8 (HHV-6, HHV-7 i HHV-8).<sup>1</sup> Porodica *Herpesviridae* spada u red *Herpesvirales*, a uključuje tri potporodice – *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae*. Od navedenih, HSV-1, HSV-2 i VZV pripadaju potporodici *Alphaherpesvirinae*, HHV-6, HHV-7 i HCMV spadaju u *Betaherpesvirinae*, a HHV-8 i EBV potpadaju pod potporodicu *Gammaherpesvirinae*.<sup>2</sup> Prvu od navedenih potporodica karakterizira kratak reproduktivni ciklus i sposobnost latencije u senzorskim ganglijima. Također potiču razaranje stanice domaćina.<sup>3</sup> Oboljenja uzrokovana herpes simpleks virusima pogađaju između najmanje 60 posto odraslih osoba. Bolesti su neizlječive i ostaju doživotno u domaćinu, najčešće u latentnom obliku.<sup>1</sup> HSV-1 je uobičajeno uzrok orolabijalnog herpesa, a HSV-2 genitalnog herpesa<sup>4</sup>, međutim, oba tipa virusa su sposobna uzrokovati i orolabijalne i genitalne infekcije.<sup>5</sup> HSV-1 uzrokuje najveći broj slučajeva sljepoće rožnice u svijetu.<sup>6</sup> Najčešće infekcije uzrokovane herpes simpleks virusom su orolabijalni, okularni i genitalni herpes, herpesni prištevi na prstima, herpes gladiatorum i herpesni ekcem, neonatalni herpes i herpesni encefalitis.<sup>1</sup>

# 1. OPĆI DIO

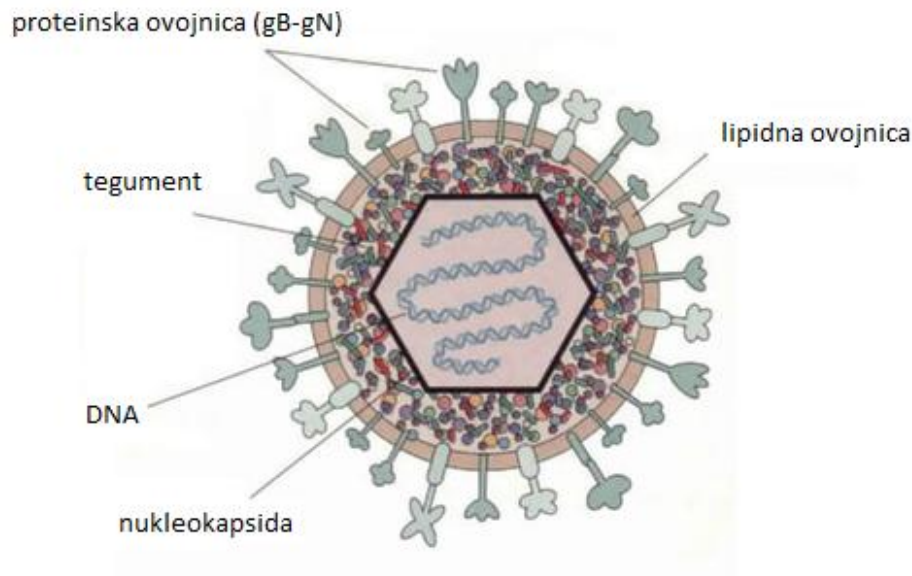
## 1.1. Herpes simpleks virus (HSV)

### 1.1.1. Struktura

Promjer čestice herpes simpleks virusa iznosi približno 200 nanometara, te se njezin genom sastoji od otprilike 152 tisuće parova baza.<sup>1</sup> Virusna čestica se sastoji od relativno velike dvolančane molekule DNA uklopljene ikozaedarski proteinski kavez – nukleokapsidu, koja je omotana lipidnom dvoslojnom ovojnicom. Između ovojnice i nukleokapside se nalazi tegument<sup>7</sup>, amorfna struktura sa proteinima i enzimima, poput proteina za „isključivanje“ stanice domaćina (*virion host shut – off protein*, VHS). Lipidna ovojnica, osim lipidnog dvosloja, u svojoj strukturi sadrži i glikoproteine, čije su uloge raznovrsne.<sup>8</sup>

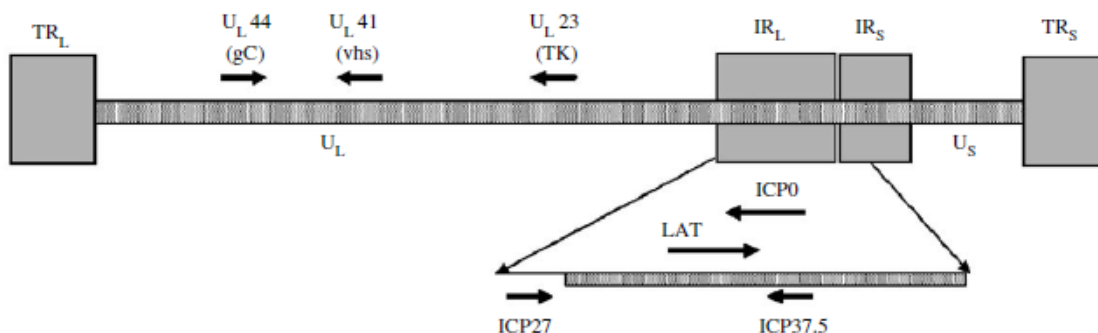


**Slika 1.** Virusne čestice herpes simpleksa snimljene elektronskim mikroskopom.<sup>8</sup>



**Slika 2.** Struktura herpes simpleks virusa.<sup>9</sup>

Genom herpes simpleks virusa je složen i sadrži dvije sekvence - duga jedinstvena sekvenca ( $U_L$ ) i kratka jedinstvena sekvenca ( $U_S$ ).<sup>7,8</sup>  $U_L$  i  $U_S$  regije su obavijene sa obje strane parom invertiranih ponavljajućih sekvenci ( $TR_L - IR_L$  i  $IR_S - TR_S$ ). Postoji jedinstvena kopija sekvence 'a', koja sadrži specifične signale za pakiranje virusne DNA u kapside, na svakom kraju, kao i jedna na razmeđu  $IR_L$  i  $IR_S$  regije.<sup>10</sup> Od 74 poznata gena,  $U_L$  sadrži njih 56 (među ostalim i za timidin kinazu (TK) –  $U_L$  23)<sup>8</sup>, dok ih  $U_S$  sadrži 12. Transkripcija gena herpes simpleks virusa je katalizirana RNA polimerazom II stanice domaćina. Alfa geni su prvi koji ulaze u ekspresiju nakon infekcije, te šifriraju proteine za regulaciju ekspresije beta i gama gena. Ekspresija alfa gena se odvija kako bi se omogućila sinteza enzima koji sudjeluju u replikaciji DNA i u stvaranju određenih glikoproteina na omotaču.<sup>7</sup> Gama geni pretežno kodiraju proteine kojima se formira virionska čestica.<sup>7,8</sup>



**Slika 3.** Genom herpes simpleks virusa.<sup>8</sup>

### 1.1.2. Prijenos

HSV-1 i HSV-2 se prenose bliskim kontaktom sa zaraženom osobom, često putem sline ili spolnih izlučevina. Prijenos je najčešći kad su prisutne rane. HSV-1 se obično stekne oralnim putem tijekom djetinjstva, no može se dobiti i spolnim putem. HSV-2 je prvenstveno spolno prenosiva infekcija. Oba virusa se također mogu prenijeti vertikalno s majke na dijete prije ili tijekom rođenja djeteta. Rizik od infekcije je reduciran ukoliko majka nema simptome ili izražene plikove tijekom poroda. Neki oblici herpes simpleks virusa mogu biti fatalni za novorođenče, jer njegov imunološki sustav nije sposoban se obraniti od virusa, a to rezultira upalom mozga (encefalitisom) koji uzrokuje oštećenja mozga.<sup>7</sup> Za bebe koje dobiju encefalitis, njih 5 % umre, pa makar bile liječene i visokim dozama aciklovira.<sup>11</sup> Simptomi koji proizlaze iz primarne infekcije sa HSV su obično ozbiljniji od naknadnih izbivanja.<sup>7</sup>



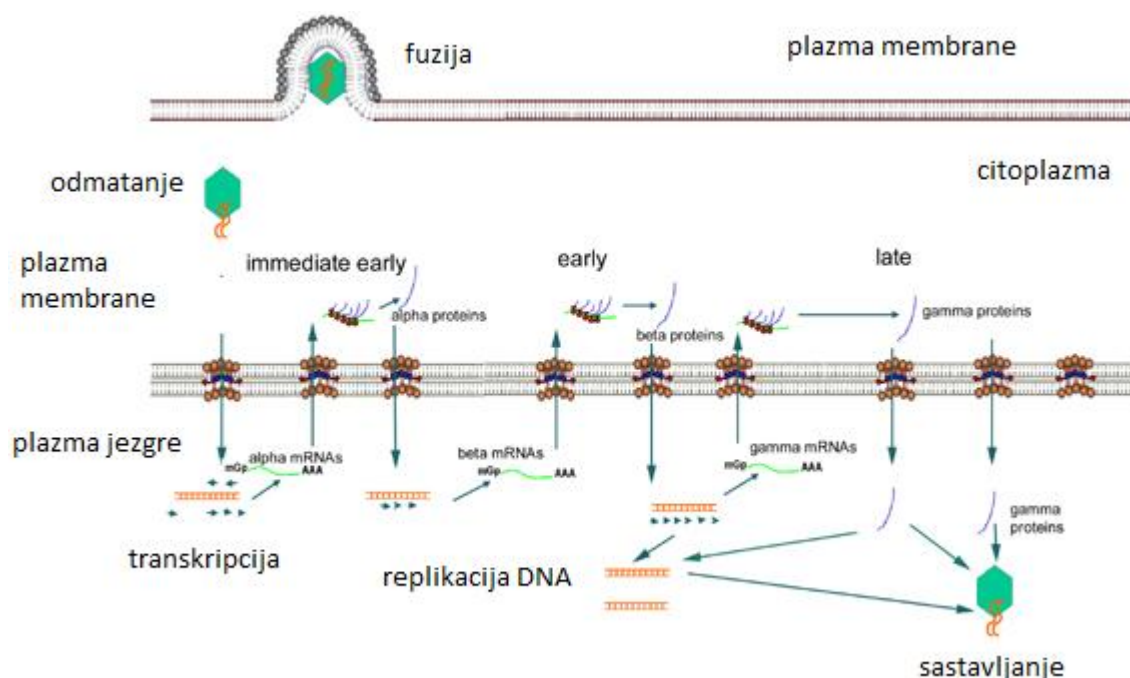
### 1.1.3. Rasprostranjenost

Rasprostranjenost HSV-1 po svijetu varira po pitanju dobi, rase, zemljopisne lokacije i socioekonomskog statusa, viša razina seropozitivnosti je zabilježena u slabije razvijenim zemljama. Do dobi od 60 godina, 60 do 85 posto odraslih u SAD-u pokazuju serokonverziju HSV-1. U SAD-u 35 posto tamnopute i 18 posto bijelopute petogodišnje djece ima antitijela na HSV-1 serum. U nižim slojevima populacije u SAD-u HSV-1 pogađa gotovo 33 posto djece do 5 godina i 70 do 80 posto njih do kraja puberteta. Nasuprot tome, djeca koja žive u boljim socioekonomskim uvjetima kasnije steknu infekciju sa HSV, sa rasprostranjenošću od 20 posto do pete godine života i 40 do 60 posto do rane zrele dobi. U SAD-u gotovo 50 milijuna ljudi ima genitalni herpes, s time da se na godišnjoj razini pojavljuje pola milijuna novih slučajeva sa simptomima genitalne HSV infekcije, odnosno, 20 do 25 posto testiranih odraslih do četrdesete godine života ima pozitivni nalaz na HSV-2 antitijela.<sup>1</sup> Navedeni podaci su u skladu sa činjenicom da je stopa raširenosti infekcija herpes simpleks virusom u SAD-u veća nego u Europi i subsaharskoj Africi.<sup>12</sup>

Rizični faktori koji doprinose infekciji sa HSV-2 su starost, slab socioekonomski status, niska razina edukacije, prijašnje spolno prenosive bolesti, rano stupanje u spolne odnose i velik broj seksualnih partnera. Pretpubertetna pojava antitijela na HSV-2 je rijetka. Rasprostranjenost HSV-2 je u jakoj korelaciji sa seksualnom zrelošću i promiskuitetom. Zabilježena je veća prisutnost antitijela na HSV-2 kod žena. Antitijela protiv jednog tipa HSV (na primjer, HSV-1) daje ukrštenu imunost, smanjujući težinu, trajanje i učestalost naknadnih infekcija drugog tipa (primjerice, HSV-2).<sup>12</sup> HSV-1 seropozitivne žene imaju 5 do 20 posto manje šanse za HSV-2 serokonverziju kroz godinu dana nego žene koje su HSV-1 seronegativne.<sup>1</sup>

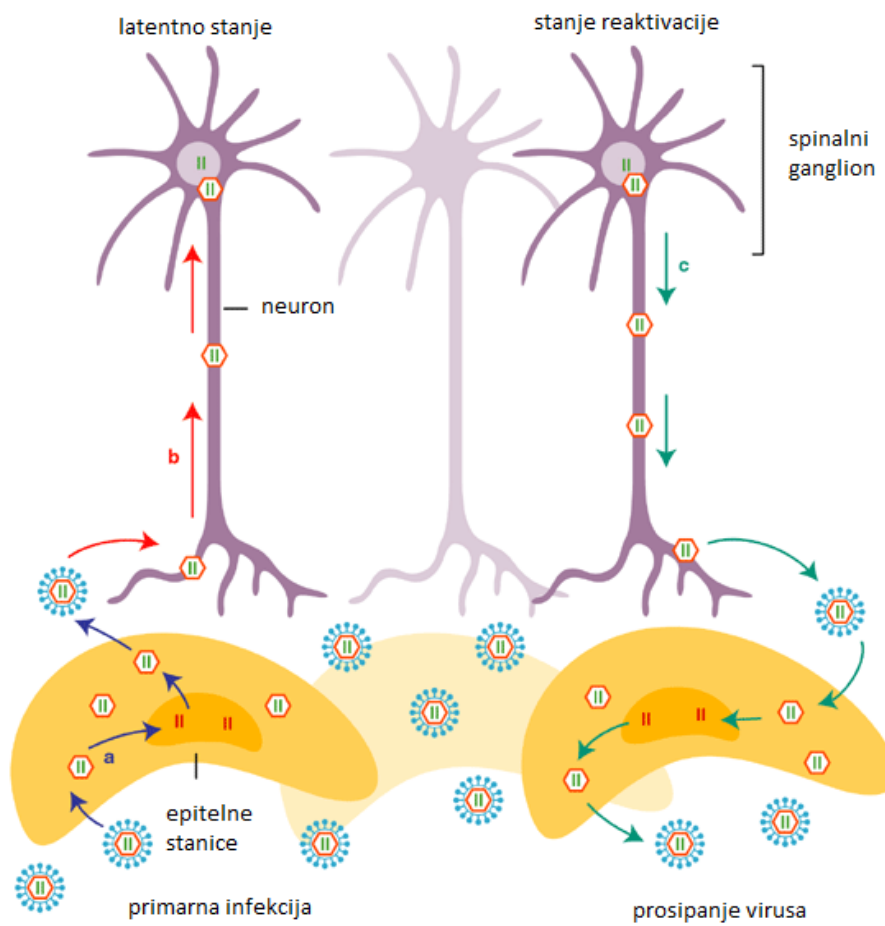
### 1.1.4. Životni ciklus i replikacija

Genom herpes simpleks virusa kodira za više od 80 proteina.<sup>13</sup> Replikacija herpes simpleks virusa se odvija u staničnoj jezgri i njome upravlja replisom sastavljen od šest virusnih proteina.<sup>14</sup> Postoje tri razreda virusnih gena koji podliježu transkripciji i translaciji u specifičnom redoslijedu, uključujući vrlo rane (*immediate early*, IE,  $\alpha$ ), rane (*early*, E,  $\beta$ ) i kasne (*late*, L,  $\gamma$ ) gene. Alfa geni (kao  $\alpha$ -TIF) su prvi transkriptirani i translirani. Četiri (ICP0, ICP4, ICP22 i ICP27) od tih pet proteina iz IE gena služe kao regulatorni proteini koji iniciraju transkripciju beta gena RNA polimerazom stanice domaćina.<sup>13</sup> ICP4 je glavni regulatorni protein herpes simpleks virusa.<sup>13,14</sup> Beta geni služe za podregulaciju ekspresije alfa gena, kao i nadregulaciju trećeg seta gena u infekciji – gama gena. Gama geni podreguliraju ekspresiju beta gena i strukturni su proteini. Nakon kasne faze infekcije formirana je virusna kapsida, kao i nukleus koji sadrži virusnu DNA. Kapsida prolazi kroz membranu jezgre i napušta stanicu preko Golgijevog kompleksa. Tijekom ovog procesa virus dobiva tegument i ovojniju, te stanica domaćin umire nakon što je ispušten virus. HSV je tada retrogradno transportiran preko aksona u tijelo neurona da bi se postigla latentna infekcija. Ovaj transport je moguć zahvaljujući dineinu i dinaktinu koji pomiču kapside HSV-a kroz mikrotubule.<sup>13</sup>



Slika 8. Replikacija herpes simpleks virusa.<sup>15</sup>

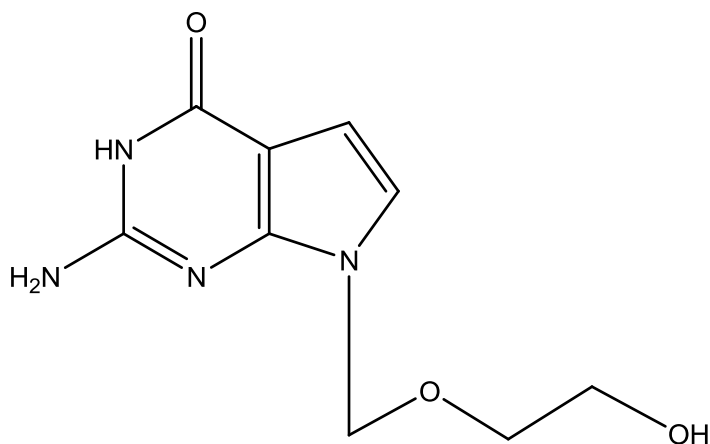
HSV inficira svojeg domaćina i litičkom i latentnom infekcijom, a replikacija se odvija unutar 15 sati od same infekcije. U litičkom ciklusu, HSV inficira epitelne stanice sluznice, replicira se i uzrokuje smrt epitelnih stanica. HSV-1 najčešće napada usne i očne epitelne stanice, dok HSV-2 inficira genitalna područja, no oba soja imaju sposobnost uzrokovati infekciju u bilo kojem dijelu tijela. Da bi se epitelna stanica inficirala, glikoproteini (gB, gC i gD) na površini HSV se spajaju sa ulaznim receptorima membrane stanice domaćina. Jedna studija je pokazala da, kad virionu nedostaje gC, virus gubi dio funkcija u povezivanju sa stanicama domaćinima, te je infektivnost virusa smanjena za red veličine. Za gD je također utvrđeno da je potreban za fuziju virusne ovojnice i membrane stanice domaćina, kao i za ulazak virusnih čestica u stanicu domaćina. Poznata su tri tipa ulaznih receptora smještenih na stanici domaćinu koji se vežu sa HSV tijekom infekcije stanice i fuzije. Heparan sulfat je glikozaminoglikan (GAG), te se on veže sa gB i gC. Drugi ulazni receptor je posrednik unosa herpesvirusa (*herpesvirus entry mediator*, HVEM), koji je član obitelji TNF receptora. Ovaj receptor je posebno prisutan na NK-T stanicama i CD8+ stanicama, te manje zastupljen na CD4+ stanicama i stanicama dendrita. HVEM je također prisutan na B stanicama, epitelnim stanicama i fibroblastima, stoga HSV ima potencijal da inficira bio koje od navedenih stanica. Treći tip ulaznih receptora su nektin-1 i nektin-2 koji potpadaju pod imunoglobuline, i ti receptori se nalaze u epitelnim stanicama, fibroblastima i neuronima. I HSV-1 i HSV-2 se vežu na HVEM i nektin-1, dok se HSV-1 također veže na heparan sulfat, a HSV-2 na nektin-2. Da bi se uspostavila latentnost, virus ulazi u senzorne neurone koji su nedjeljivi.<sup>13</sup> Latentna infekcija je karakterizirana gašenjem viralnih replikativnih funkcija i nemogućnošću detekcije virusa. Periodička reaktivacija takve latentne infekcije omogućuje naknadnu infekciju drugih domaćina.<sup>16</sup> Radi se o vrlo učinkovitom mehanizmu preživljavanja virusa koji je težak za analizu na molekularnoj analizi.<sup>17</sup> Transkripti povezani sa latencijom (latency-associated transcripts, LAT) su jedini tipovi mRNA koje se pojavljuju tijekom latencije, te ti proteini služe da bi pomogli neuronu da preživi početnu infekciju. LAT su također potrebni da bi uspostavili i održavali latenciju virusa, kao i za njegovu reaktivaciju. Reaktivacija može biti uzrokovana brojnim faktorima, uključujući stres, ultraljubičastu svjetlost, toplinu, groznicu, hormonske promjene, menstruaciju i fizička oštećenja neurona.<sup>13</sup> Ključnu ulogu u reaktivaciji HSV-1 ima ICP0.<sup>18</sup>



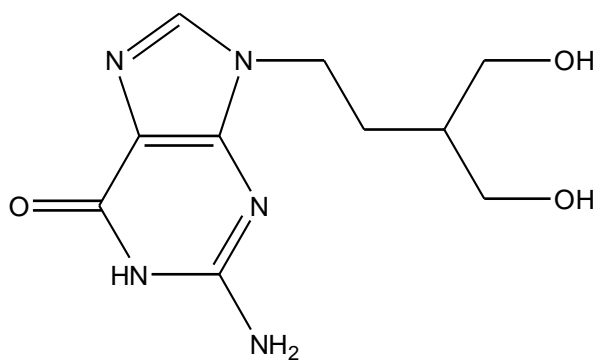
Slika 9. Životni ciklus herpes simpleks virusa.<sup>19</sup>

### 1.1.5. Najvažniji antivirusni agensi

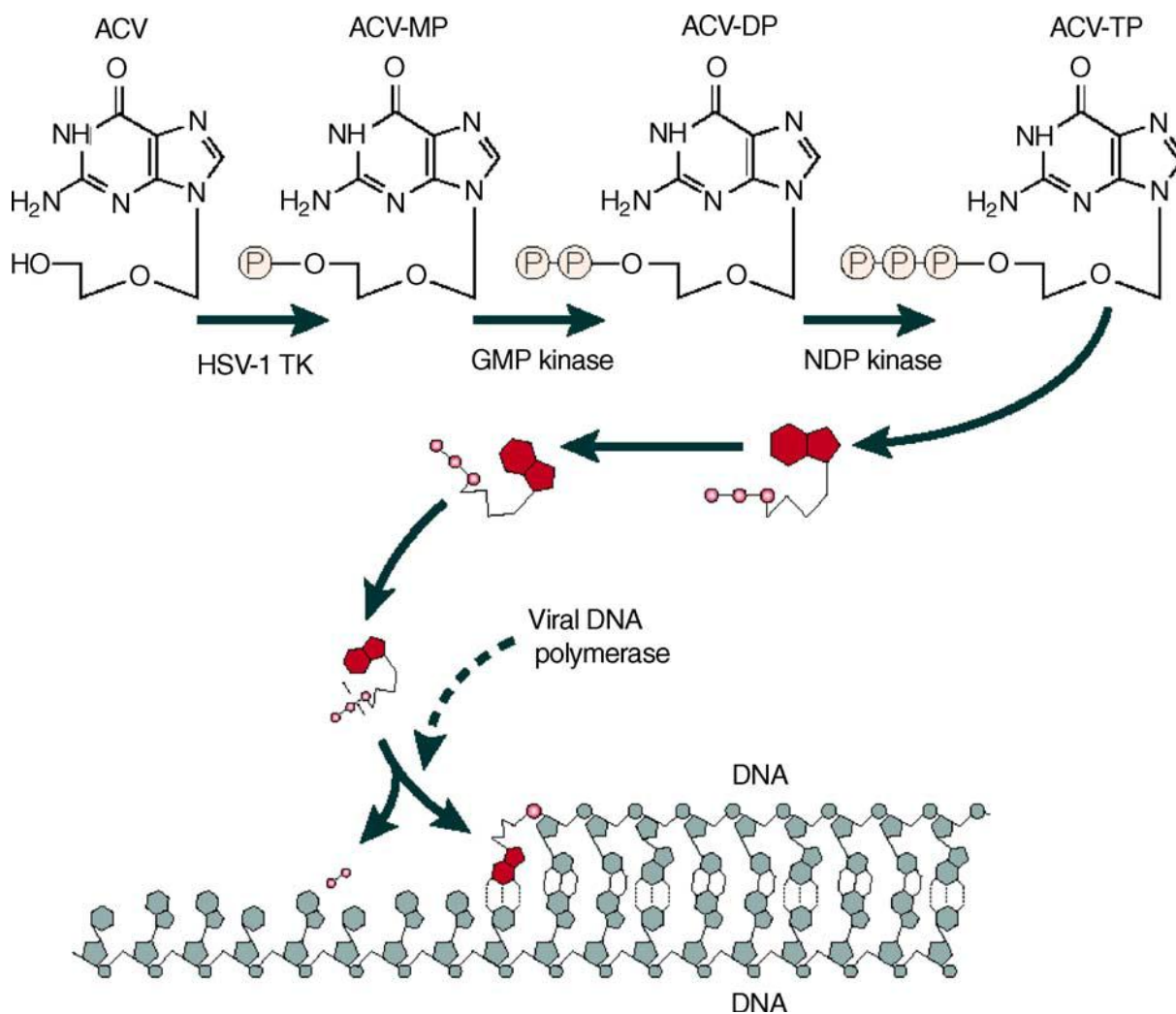
U liječenju infekcija mogu se koristiti kožni, oralni ili intravenski antivirusni agensi.<sup>1</sup> Penciklovir (Denavir, 2-amino-9-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]-6,9-dihidro-3*H*-purin-6-on)<sup>20</sup> i aciklovir (Zovirax, 2-amino-1,9-dihidro-9-((2-hidroksietoksi)metil)-6*H*-purin-6-on)<sup>21</sup> su prikladni za tretman rekurentnog labijalnog herpesa kod imunokompetentnih pojedinaca, kao i mukokutanih infekcija kod imunokompromitiranih domaćina.<sup>1</sup>



**Slika 10.** Struktura aciklovira.

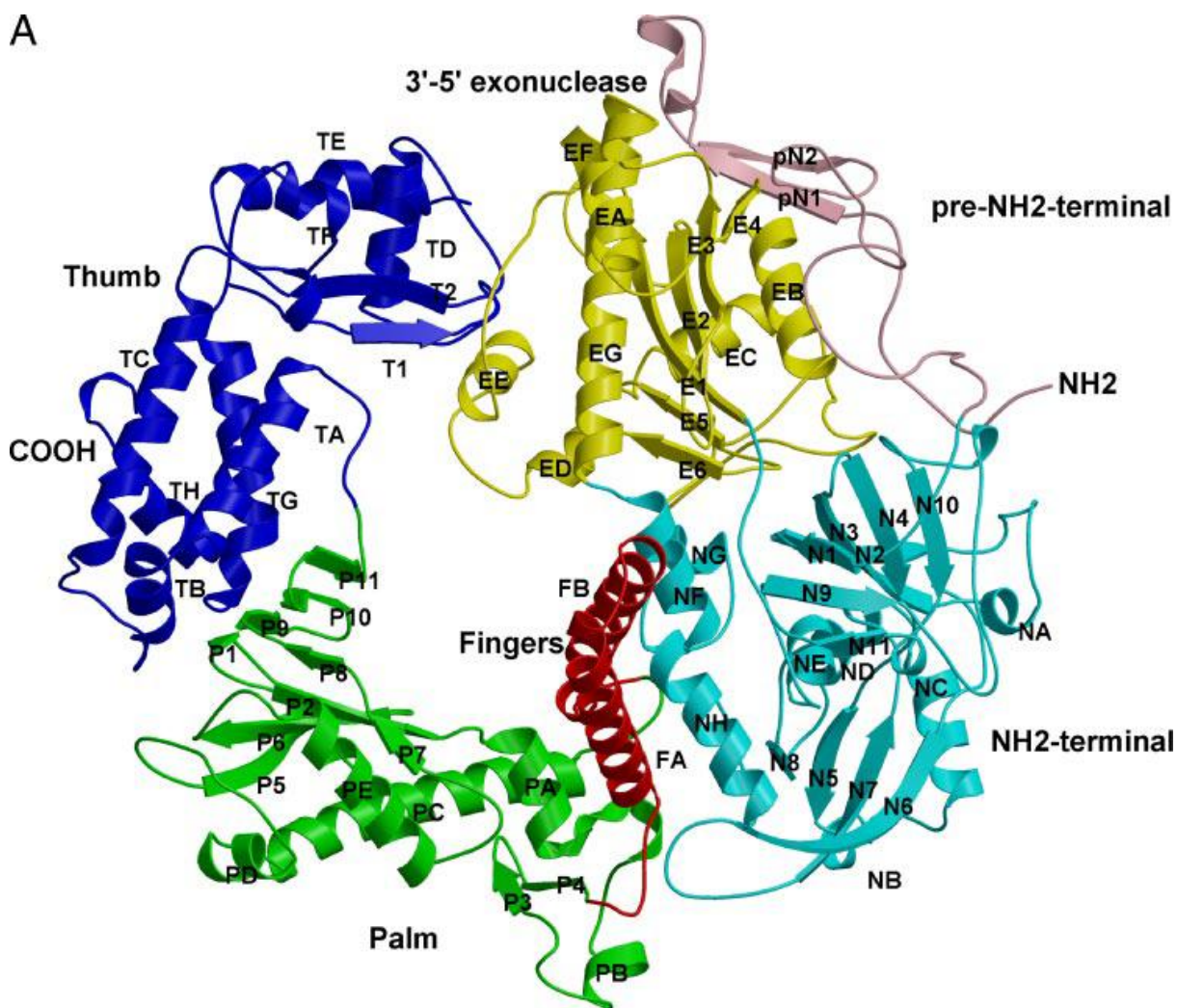


**Slika 11.** Struktura penciklovira.



**Slika 12.** Mehanizam antivirusnog djelovanja aciklovira.<sup>22</sup>

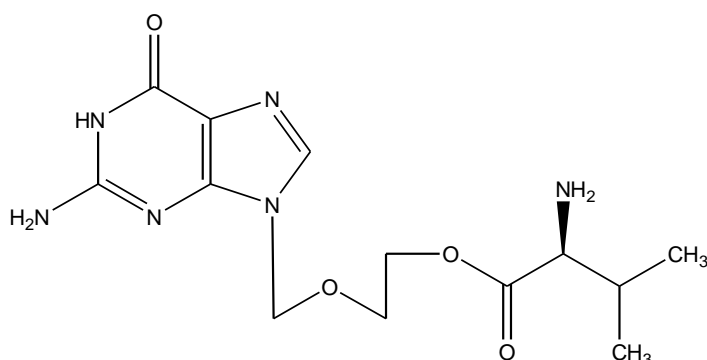
Aciklovir je također dostupan u oralnom i injekcijskom obliku, ima dobar sigurnosni profil, te ga pacijenti dobro podnose. Mana oralnog aciklovira jest slaba bioraspodjivost (10 – 20 posto) i kratko vrijeme poluživota u plazmi, zbog čega je potrebno često doziranje. Aciklovir, valaciklovir i penciklovir su aciklički guanozinski analozi koji za metu imaju virusnu polimerazu i virusnu replikaciju DNA.<sup>1</sup>



Slika 13. Struktura HSV-1 DNA polimeraze.<sup>23</sup>

Ti lijekovi moraju proći sekvencijalnu fosforilaciju od strane virusne timidin kinaze (TK) i kinaza stanica domaćina u cilju da se prevede u biološki aktivni trifosfatni oblik.<sup>1</sup> Aciklovir se prevodi u pripadni monofosfat uz pomoć virusne TK, koja je 3000 puta efikasnija u fosforilaciji nego stanične kinaze.<sup>20</sup> Kako prvi korak u kaskadi fosforilacije zahtijeva virusne enzime, nepovoljni učinci guanozinskih analoga na stanice domaćina su ublaženi. Primarni način djelovanja aciklovirnog i valciklovirnog trifosfata jest selektivna inhibicija DNA polimeraze i naknadna ugradnja u rastući virusni DNA lanac, nepovratno zaustavljajući njenu daljnju elongaciju. U usporedbi s aciklovirom, penciklovir ima dulje vrijeme poluživota i veću unutarstaničnu koncentraciju u stanicama zaraženim sa HSV, ali je 100 do 160 puta slabiji u inhibiranju virusne DNA polimeraze.

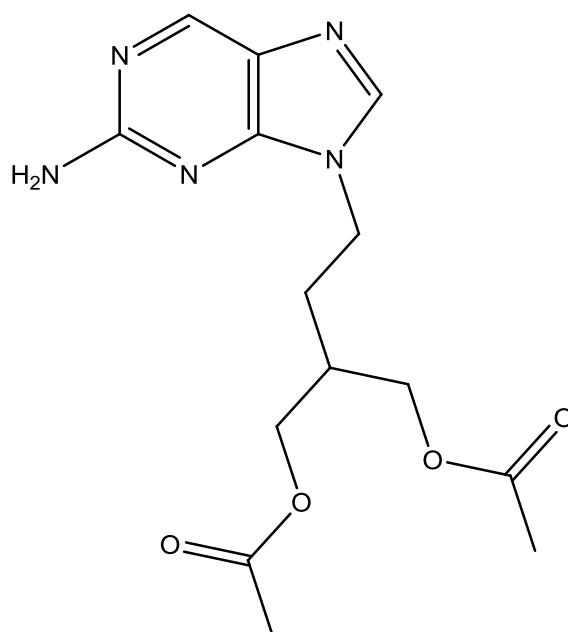
Penciklovir zaustavlja sintezu virusne DNA putem ireverzibilne kompetitivne inhibicije DNA polimeraze, no ne i terminacijom lanca DNA. Valaciklovir (Valtrex, (*S*)-2-[(2-amino-6-okso-6,9-dihidro-3*H*-purin-9-il)metoksi]etil-2-amino-3-metil butanoat)<sup>24</sup> je valin-esterski prolijek aciklovira koji se lakše apsorbira i u potpunosti se metabolizira kao L-valin i aciklovir u jetri i crijevima.<sup>1</sup> Valaciklovir ima veću biorasploživost (55 posto)<sup>24</sup>, dozvoljavajući manje učestalo oralno doziranje i poboljšanu usklađenost kod pacijenata.<sup>1</sup>



**Slika 14.** Struktura valaciklovira.

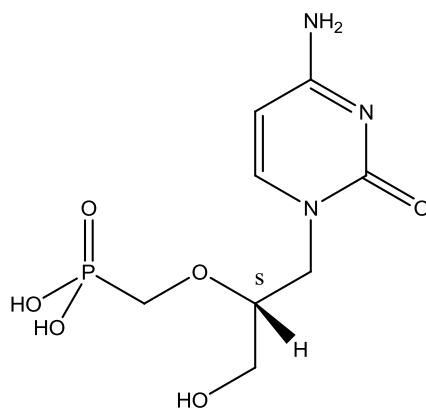
Famciklovir (Famvir, 2-[(acetiloksi)metil]-4-(2-amino-9*H*-purin-9-il)butil acetat)<sup>25</sup> je diacetil-esterski prolijek penciklovira, vrlo brzo se apsorbira u gastrointestinalnom traktu i pretvara se nakon konzumacije u sam penciklovir. Famciklovir ima poboljšanu oralnu apsorpciju, veću biorasploživost i dulje intervale između dva doziranja u usporedbi sa penciklovirom pri tretmanu HSV oboljenja. Famciklovir dijeli sa penciklovirom isti mehanizam djelovanja inhibiranja DNA polimeraze, ali za razliku od penciklovira, uzrokuje i prekid rasta lanca DNA.<sup>1</sup>



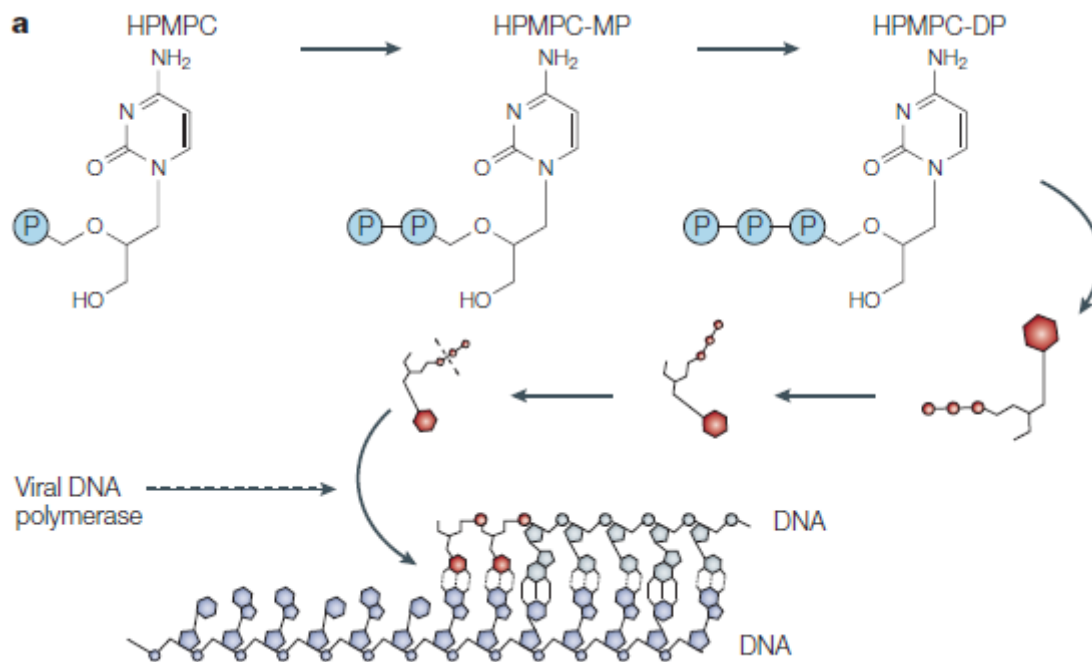


**Slika 15.** Struktura famciklovira.

Cidofovir (Vistide, ([[S]-1-(4-amino-2-okso-1,2-dihidropirimidin-1-il)-3-hidroksiopropan-2-il]oksi)metil)fosfonatna kiselina)<sup>26</sup> je aciklički nukleozidni 5-monofosfat koji, nakon fosforilacije od strane kinaza domaćina, selektivno inhibira virusnu DNA polimerazu. Jako je nefrotoksičan. Pošto cidofovir ne treba timidin kinazu za aktivaciju, djelotvoran je i kod HSV bez timidin kinaze. Cidofovir ima dugo vrijeme poluživota i primjenjuje se jednom tjedno intravenskim putem. Mutacije u virusnoj DNA polimerazi mogu dovesti do otpornosti na cidofovir.<sup>1</sup>

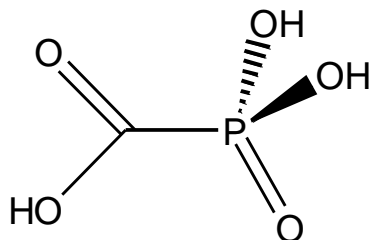


**Slika 16.** Struktura cidofovira.



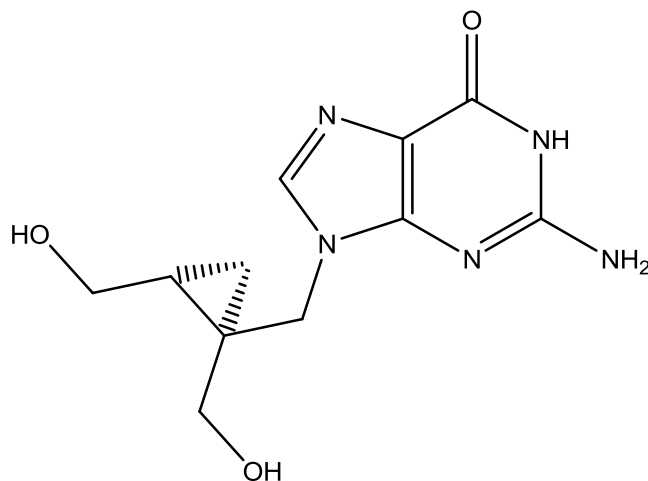
**Slika 16.** Mehanizam djelovanja cidofovira (HPMPC).<sup>27</sup>

Foskarnet (Foscavir, fosfonomravljna kiselina)<sup>28</sup> je intravenski antiviralni lijek prikladan za liječenje herpes simpleks virusa otpornog na aciklovir i pirofosfatni je analog sa mehanizmom djelovanja neovisnim o fosforilaciji od strane virusne ili staničnih kinaza. Kompetitivno blokira pirofosfatna vezna mjesta na virusnoj DNA polimerazi, te na taj način direktno inhibira njenu aktivnost. Otpornost na foskarnet je rijetka i može biti uzrokovana točkastim mutacijama u HSV DNA polimerazi.<sup>1</sup>



**Slika 17.** Struktura foskarneta.

Od novijih nukleozidnih analoga se posebno ističe A-5021 (2-amino-9-(((1*S*,2*R*)-1,2-bis(hidroksimetil)ciklopropil)metil)-1*H*-purin-6(9*H*)-on), koji je pokazao raznovrsno i jako antivirusno djelovanje protiv HSV-1, HSV-2, EBV i HHV-6.<sup>29</sup> Karakteriziraju ga dva kiralna centra na ciklopropanskom prstenu i aciklošećerni dio.<sup>30</sup>



**Slika 18.** Struktura A-5021.

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Materijali i metode

Tališta sintetiziranih spojeva određena su na instrumentu Kofler (Reichert, Wien) i nisu korigirana. Za tankoslojnu kromatografiju (TLC) korištene su pločice 60F-254 prevučene slojem silikagela (Merck), a za detekciju izoliranih komponenti korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm. Kromatografija na koloni (CLC) provedena je na silikagelu (0.063-0.2 mm, Fluka). Spektri masa su snimljeni na *Agilent 6410* instrumentu (LC/MS/MS). Visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC) je izvedena na *Agilent 1100 series* sistemu na analitičkoj koloni s reverznom fazom Zorbax C18 (2.1 x 30 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ). Spektri  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR snimljeni su na spektrometru Bruker (300 MHz). Uzorci su snimljeni u DMSO- $d_6$  pri 298 K. Zamijećeni su rezidualni signali DMSO na  $\delta$  2.50 ppm for  $^1\text{H}$  i  $\delta$  39.50 ppm for  $^{13}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR vrijednosti kemijskog pomaka ( $\delta$ ) su izražene u ppm-ima u odnosu na TMS i vrijednosti konstante sprezanja ( $J$ ) u Hz.

## 2.2. Sinteza ciljnih molekula

*Postupak pripreme kumarinskih derivata 3-supstituiranih 1,2,4-triazola (2, 3) i purina (4, 5)*

U otopinu, koja se miješa i sadrži 1*H*-1,2,4-triazol, 1*H*-4,5-dicijanoimidazol ili 1*H*-purinske nukleozidne baze i NaH (1.5 ekv.) u DMF (30 mL), dodaje se 4-klormetil-7-metoksikumarin (**1**) (500 mg, 2.23 mmol) nakon 2 sata na sobnoj temperaturi bez prisutnosti vlage. Smjesa se miješa na 80 °C preko noći. Nakon uparavanja, zaostalo ulje se separira kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 50 : 1), te se dobiju spojevi **2 – 5** kao bijele krutine.

*Priprava spojeva 2 – 5:*

### **Metil 1-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)-1,2,4-triazol-3-karboksilat (2)**

Spoj je sintetiziran korištenjem metil 1*H*-1,2,4-triazol-3-karboksilata (283.14 mg, 2.23 mmol), te se dobije spoj **2** (528 mg, 75 %, t. t. = 234 – 237 °C).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ/ppm: 8.09 (H-5-triazol, s, 1H), 7.77 (H-5', d, 1H, *J* = 8.88 Hz), 7.05 (H-6', AB, dd, 1H, *J* = 2.46, 6.60 Hz), 7.01 (H-8', dt, 1H, *J* = 2.62, 8.82 Hz), 5.84 (CH<sub>2</sub>-N, s, 2H), 5.76 (H-3', s, 1H), 3.87 (COOCH<sub>3</sub>-triazol, s, 3H), 3.85 (O-CH<sub>3</sub>, s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO) δ/ppm: 162.75 (C-2'), 159.69 (C=O-triazol), 155.05 (C-3-triazol), 150.61 (C-9'), 149.61 (C-4'), 125.82 (C-5'), 112.44 (C-3'), 110.56 (C-10'), 110.26 (C-6'), 101.16 (C-8'), 56.01 (O-CH<sub>3</sub>, s, 3H), 52.21 (COOCH<sub>3</sub>-triazol), 49.21 (CH<sub>2</sub>-N); MS *m/z* 316.1 [MH]<sup>+</sup>.

### 1-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)-1,2,4-triazol-3-karboksamid (3)

Metil 1-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)-1,2,4-triazol-3-karboksilat (2) (500 mg, 1.59 mmol) se tretira sa plinovitim amonijakom u metanolnoj otopini (20 mL) u ledenoj kupelji na 0 °C 30 minuta. Potom se reakcijska smjesa miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon uparavanja i kolonske kromatografije (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 40 : 1), dobiju se bijeli kristali spoja 3 (402 mg, 84 %, t. t. = 261 – 264 °C).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ/ppm: 8.83 (H-5-triazol, s, 1H), 7.84 i 7.64 (CONH<sub>2</sub>-triazol), 7.73 (H-5', d, 1H, *J* = 8.85 Hz), 7.07 (H-6', d, 1H, *J* = 2.04 Hz), 7.02 (H-8', AB, dd, 1H, *J* = 2.04, 8.82 Hz), 5.81 (CH<sub>2</sub>-N, s, 2H), 5.79 (H-3', s, 1H), 3.87 (O-CH<sub>3</sub>, s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO) δ/ppm: 163.21 (C-2'), 160.75 (C=O-triazol), 160.24 (C-7'), 155.54 (C-3-triazol), 150.39 (C-9'), 126.28 (C-5'), 112.93 (C-3'), 111.24 (C-6'), 110.98 (C-10'), 101.63 (C-8'), 56, 42 (O-CH<sub>3</sub>), 56.42 (CH<sub>2</sub>-N); MS *m/z* 301.1 [MH]<sup>+</sup>.

### 1-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)-2-amino-6-klorpurin (4)

Spoj je sintetiziran korištenjem 1*H*-2-amino-6-klorpurina (378 mg, 2.23 mmol), te se dobije spoj 4 (328 mg, 41 %, t. t. > 300 °C).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ/ppm: 8.20 (H-8-purin), 7.85 (H-5', d, 1H, *J* = 8.82 Hz), 7.05 (H-8', d, 1H, *J* = 1.86 Hz), 7.02 (H-6', AB, dd, 1H, *J* = 2.04, 8.76 Hz), 6.97 (NH<sub>2</sub>-purin, s, 2H), 5.56 (CH<sub>2</sub>-N, s, 2H), 5.54 (H-3', s, 1H), 3.87 (O-CH<sub>3</sub>, s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO) δ/ppm: 162.76 (C-2'), 160.02 (C-7'), 159.67 (C-9'), 154.95 (C-4-purin), 154.10 (C-5-purin), 150.62 (C-2-purin), 149.80 (C-4'), 125.56 (C-5'), 112.48 (C-3'), 109.41 (C-10'), 108.99 (C-6'), 101.14 (C-8'), 56.00 (O-CH<sub>3</sub>), 42.91 (CH<sub>2</sub>-N); MS *m/z* 359.1 [MH]<sup>+</sup>.

### **1-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)gvanin (5)**

Spoj **4** (500 mg, 1.40 mmol) se zagrijava u mravljoj kiselini (85 % <sub>(aq)</sub>, 20 mL) na 100 °C tri sata. Nakon uparavanja i separacije kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 30 : 1), dobije se spoj **5** kao bijela krutina (177 mg, 37 %, t. t. > 300 °C).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ/ppm: 10.67 (NH-purin, s, 1H), 7.86 (H-5', d, 1H, *J* = 8.82 Hz), 7.78 (H-8-purin, s, 1H), 7.06 (H-8', d, 1H, *J* = 1.86 Hz), 6.84 (H-6', AB, dd, 1H, *J* = 1.90, 8.71 Hz), 6.53 (NH<sub>2</sub>-purin, s, 2H) 5.46 (CH<sub>2</sub>-N, s, 2H), 5.41 (H-3', s, 1H), 3.88 (OCH-3, s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO) δ/ppm: 162.75 (C-2'), 159.75 (C-9'), 156.74 (C-4-purin), 154.90 (C-5-purin), 153.96 (C-2-purin), 151.53 (C-4'), 151.31 (C-8-purin), 125.58 (C-5'), 112.47 (C-3'), 110.46 (C-10'), 108.60 (C-6'), 101.11 (C-8'), 56.00 (O-CH<sub>3</sub>), 42.67 (CH<sub>2</sub>-N); MS *m/z* 340.1 [MH]<sup>+</sup>.

### **Postupak priprave acikličkih nukleozidnih analoga 1,2,4-triazola (6 – 9) i purina (10)**

Spojevi (**2**, **3**, **5**) su tretirani pet sati sa NaBH<sub>4</sub> (3 ekv.) u EtOH (20 mL) na 70 °C. Nakon uparavanja reakcijske smjese i separacije kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 10 : 1), dobiju se bezbojna ulja triazolnih (**6 – 9**) i purinskih derivata (**10**).

#### **Etil 1-(4-hidroksi-2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)butil)-1,2,4-triazol-3-karboksilat (6)**

#### **1-(4-hidroksi-2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)butil)-1,2,4-triazol (8)**

#### **1-(4-hidroksi-2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)butil)-3-hidroksimetil-1,2,4-triazol (9)**

Spojevi su sintetizirani korištenjem metil 1-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)-1,2,4-triazol-3-karboksilata (**2**) (1000 mg, 3.17 mmol), te se dobiju spojevi **6** (289 mg, 27 %), **8** (256 mg, 31 %) i **9** (153 mg, 16 %).

*Spoj 6:*

$^1\text{H}$  NMR (DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 9.64 (OH-6'', s, 1H), 8.11 (H-5-triazol, s, 1H), 6.88 (H-2'', AB, dd, 1H,  $J = 3.27, 8.43$  Hz), 6.36 (H-5'', AB, dd, 1H,  $J = 2.34, 6.30$  Hz), 6.31 (H-3'', d, 1H,  $J = 8.43$  Hz), 5.19 (H-2''', t, 1H,  $J = 6.00$  Hz), 3.65 (O-CH<sub>3</sub>, s, 1H), 3.22 (H-1''', 2H, m), 2.70 (COOCH<sub>2</sub>-triazol, m, 2H), 1.78 i 1.63 (H-3', 2x 1H, m), 1.05 (-CH<sub>3</sub>-triazol, t, 3H,  $J = 7.08$  Hz);

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 171.69 (C=O-triazol), 163.89 (C-3), 159.48 (C-4''), 156.46 (C-6''), 129.67 (C-2''), 119.62 (C-1''), 104.71 (C-3''), 101.80 (C-5''), 57.25 (CH<sub>2</sub>-N), 55.22 (O-CH<sub>3</sub>), 53.03 (C-3'''), 35.00 (C-2'''); MS  $m/z$  336.2 [MH]<sup>+</sup>.

*Spoj 8:*

$^1\text{H}$  NMR (DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 9.47 (OH-6'', s, 1H), 8.17 (H-5-triazol, s, 1H), 7.88 (H-3-triazol, s, 1H), 6.87 (H-2'', d, 1H,  $J = 8.40$  Hz), 6.35 (H-5'', d, 1H,  $J = 2.28$  Hz), 6.29 (H-3'', AB, dd, 1H,  $J = 2.28, 8.40$  Hz), 3.65 (O-CH<sub>3</sub>, s, 1H), 3.25 i 3.19 (H-1''', 2H, m), 1.78 i 1.63 (H-3', 2x 1H, m);

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 158.60 (C-4''), 156.08 (C-6''), 151.57 (C-3-triazol), 129.15 (C-2''), 119.09 (C-1''), 104.19 (C-3''), 101.28 (C-5''), 58.74 (CH<sub>2</sub>-N), 54.71 (O-CH<sub>3</sub>), 52.51 (C-3'''), 34.48 (C-2'''); MS  $m/z$  264.1 [MH]<sup>+</sup>.

*Spoj 9:*

$^1\text{H}$  NMR (DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 9.42 (OH-6'', s, 1H), 8.07 (H-5-triazol, s, 1H), 6.91 (H-2'', d, 1H,  $J = 8.40$  Hz), 6.36 (H-3'', d, 1H,  $J = 2.46$  Hz), 6.31 (H-5'', AB, dd, 1H,  $J = 2.40, 8.34$  Hz), 5.11 (H-2''', t, 1H,  $J = 6.00$  Hz), 4.37 (CH<sub>2</sub>-OH, d, 2H,  $J = 6.00$  Hz), 4.31 (H-4'', d, 2H,  $J = 7.44$  Hz), 3.66 (O-CH<sub>3</sub>, s, 1H), 3.18 (H-1''', 2H, m), 1.78 i 1.63 (H-3', 2x 1H, m), 1.05 (CH<sub>3</sub>-triazol, t, 3H,  $J = 7.08$  Hz);

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 161.08 (C=O-triazol), 159.19 (C-3), 156.63 (C-4''), 156.00 (C-6''), 129.68 (C-2''), 119.32 (C-1''), 104.79 (C-3''), 101.83 (C-5''), 59.20 (CH<sub>2</sub>-N), 55.23 (O-CH<sub>3</sub>), 53.66 (C-3''), 34.96 (C-2'''); MS  $m/z$  294.1 [MH]<sup>+</sup>.



### 1-(4-hidroksi-2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)butil)-1,2,4-triazol-3-karboksamid (7)

Spoj je sintetiziran korištenjem 1-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)-1,2,4-triazol-3-karboksamida (**3**) (1500 mg, 4.996 mmol), te se dobije spoj **7** (392 mg, 26 %).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ/ppm: 9.49 (OH-6'', s, 1H), 8.25 (H-5-triazol, s, 1H), 7.69 i 7.50 (CONH<sub>2</sub>-triazol, 2x s, 2x 1H), 6.91 (H-2'', d, 1H, *J* = 3.37 Hz), 6.35 (H-3'', d, 1H, *J* = 2.31 Hz), 6.30 (H-5'', AB, dd, 1H, *J* = 2.28, 8.34 Hz), 5.11 (H-2''', s, 1H), 3.65 (O-CH<sub>3</sub>, s, 1H), 3.22 (H-1''', 2H, d, *J* = 5.10 Hz), 1.79 i 1.64 (H-3', 2x 1H, m);

<sup>13</sup>C NMR (DMSO) δ/ppm: 163.93 (C-5-triazol), 145.21 (C-3-triazol), 64.34 (CH<sub>2</sub>-triazol) 61.42 (C-2'a), 60.17 (C-1'a), 54.41 (C-1'b), 27.49 (C-1'), 25.31 (C-2'), 14.73 (C-3'); MS *m/z* 307.1 [MH]<sup>+</sup>.

### 1-(4-hidroksi-2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)butil)gvanin (10)

Primjenom 1-((7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)metil)gvanina (**5**) (260 mg, 0.7667 mmol) dobije se spoj **10** (95 mg, 36 %).

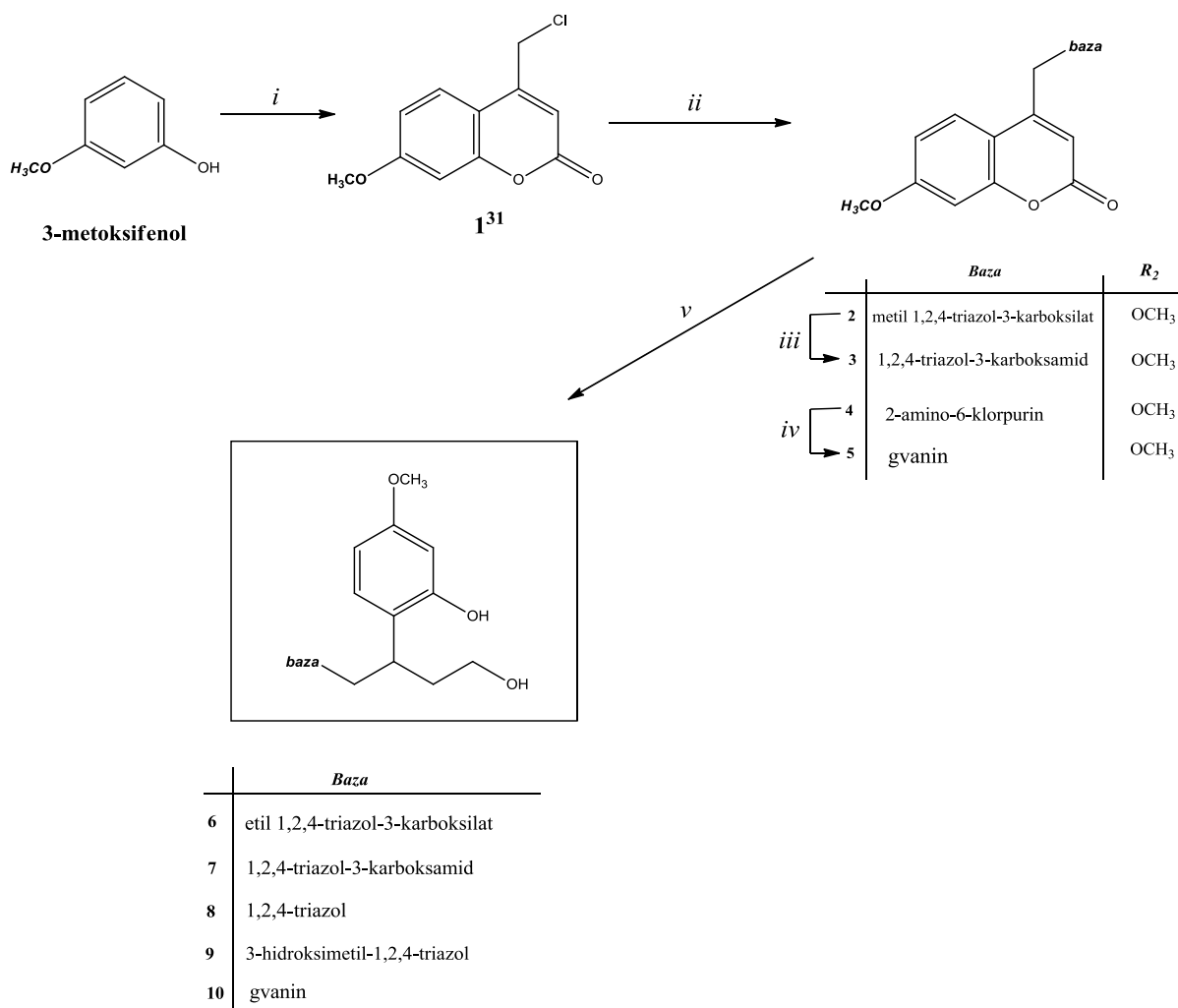
<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ/ppm: 10.70 (NH-purin, s, 1H), 9.46 (OH-6'', s, 1H), 6.92 (H-2'', d, 1H, *J* = 8.34 Hz), 6.56 (NH<sub>2</sub>-purin, s, 2H), 6.36 (H-5'', d, 1H, *J* = 5.04 Hz), 6.31 (H-3'', AB, dd, 1H, *J* = 1.95, 8.31 Hz), 4.15 (H-4''', d, 2H, *J* = 5.34 Hz), 3.66 (O-CH<sub>3</sub>, s, 1H), 3.25 (H-1''', 2H, m), 1.78 i 1.64 (H-3', 2x 1H, m);

<sup>13</sup>C NMR (DMSO) δ/ppm: 160.29 (C-6-purin), 159.09 (C-2-purin), 157.21 (C-4''), 156.80 (C-6''), 153.94 (C-4-purin), 151.74 (C-5-purin), 129.80 (C-2''), 119.72 (C-1''), 104.74 (C-3''), 101.81 (C-5''), 59.29 (CH<sub>2</sub>-N), 55.21 (O-CH-3), 47.17 (C-3''), 35.30 (C-2'''); MS *m/z* 346.1 [MH]<sup>+</sup>.

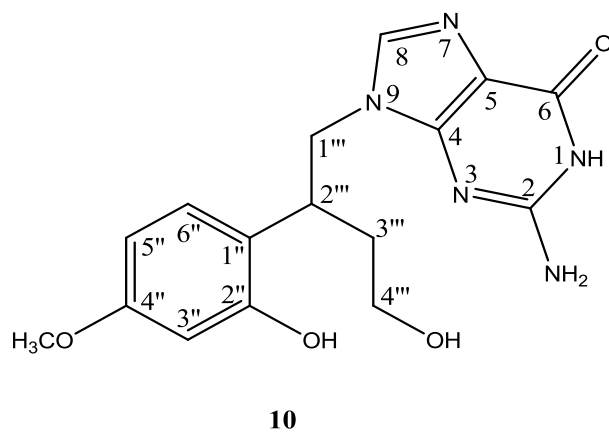
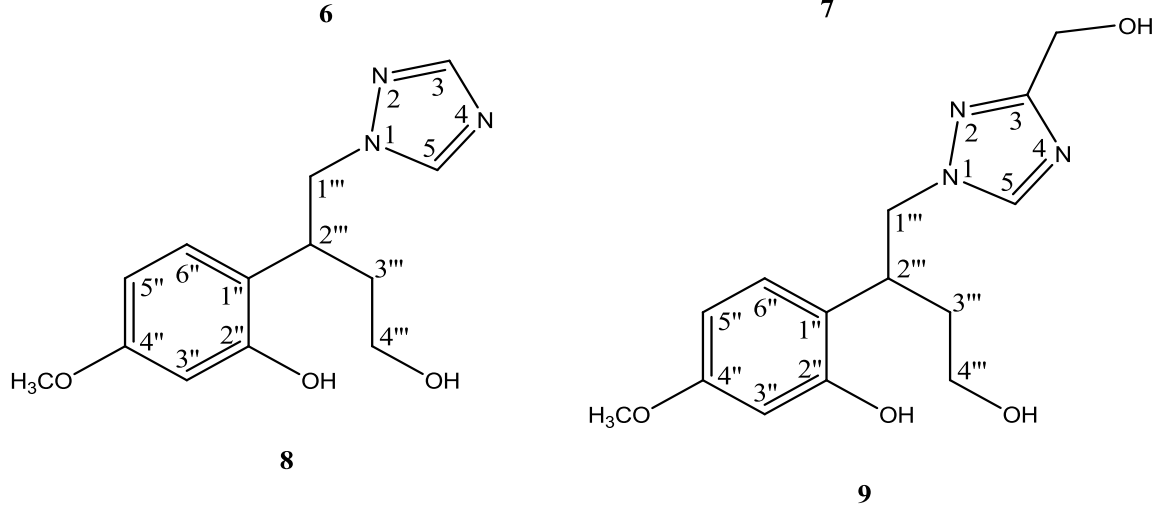
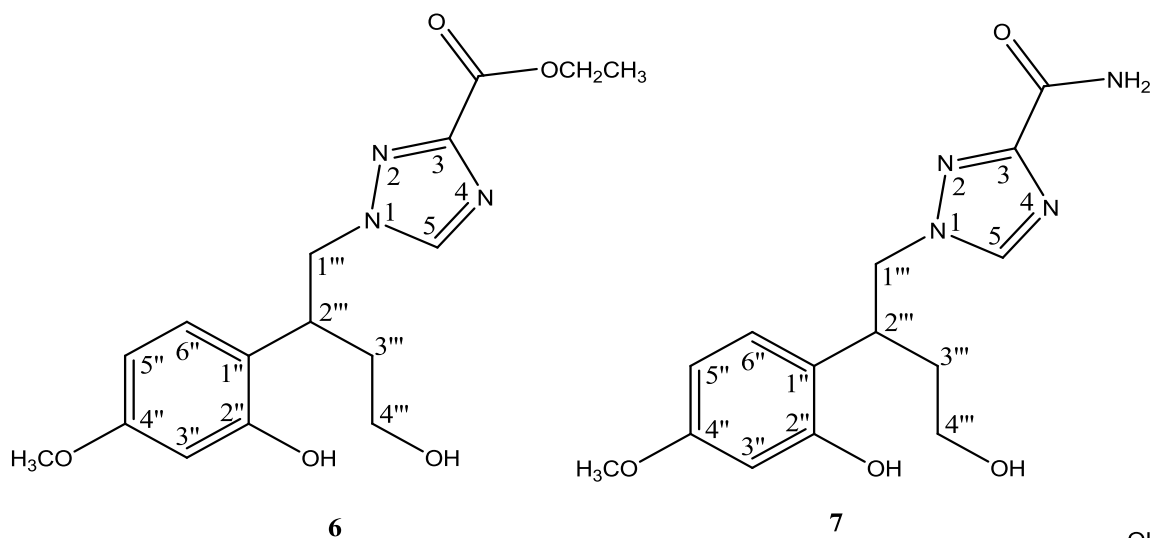
### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. Sinteza spojeva

Reakcijom 3-metoksifenola sa etil 4-kloracetoacetatom dobije se 4-klormetil-7-metoksikumarin (**1**). Kondenzacijom **1** sa nukleozidnim bazama: metil 1*H*-1,2,4-triazol-3-karboksilat, 2-amino-6-klorpurin sintetizirani su derivati kumarina i 3-supstituiranih 1,2,4-triazola (**2**, **3**), odnosno gvanina (**4**, **5**). Njihovom redukcijom dobiveni su aciklički nukleozidni analozi 3-supstituiranih 1,2,4-triazola (**6 – 9**) i gvanina (**10**) (sheme 1. i 2.).



**Shema 1.** Sinteza novih acikličkih nukleozidnih analoga 3-supstituiranih 1,2,4-triazola i gvanina. **Reagensi i reakcijski uvjeti:** (i) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, etil 4-kloroacetat, s. t., 10 h; (ii) NaH, DMF, metil 1,2,4-triazol-3-karboksilat ili 2-amino-6-klorpurin, 80 °C, 24 h; (iii) NH<sub>3</sub> (g), MeOH, s. t., 30 min; (iv) 85 % HCOOH, 100 °C, 3 h; (v) NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 70 °C, 5 h.



**Shema 2.** Strukture sintetiziranih ciljnih molekula.

### 3.2. Analiza $^1\text{H}$ i $^{13}\text{C}$ NMR spektara

Strukture novosintetiziranih ciljnih molekula (**6** - **10**) određene su analizom njihovih  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara, te spektara masa. Asignacija  $^1\text{H}$  NMR spektara je izvedena na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala i veličini konstanta sprege H - H.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektralni podaci su dani u eksperimentalnom dijelu rada. Ti su podaci u skladu s predloženim strukturama. DMSO- $d_6$  je korišten kao otapalo za sve spojeve, a kemijski pomaci su asignirani u odnosu na TMS.

#### 4. ZAKLJUČAK

U ovom radu je prikazana sinteza novih spojeva iz reda acikličkih nukleozidnih analoga 3-supstituiranih 1,2,4-triazola (**6** - **9**) i gvanina (**10**) kao potencijalnih protuvirusnih agenasa protiv herpes simpleks virusa (HSV). Njihove strukture su potvrđene analizom spektara masa,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara.

## 5. LITERATURA

1. Fatahzadeh, M.; Schwartz, R. A., *Journal of the American Academy of Dermatology*, **57** (2007), 737 – 756.
2. Kelly, B. J. et al., *Virus Research*, **145** (2009), 174.
3. James, S. H. et al., *Antiviral Research*, **83** (2009), 207.
4. Wauters, O. et al., *Journal of the American Academy of Dermatology*, (2010), u tisku.
5. Herget, G. W. et al., *Pathology Research and Practice*, **201** (2005), 123.
6. Knickelbein, J. E. et al., *Survey of Ophthalmology*, **54** (2009), 226.
7. [http://en.wikipedia.org/wiki/Herpes\\_simplex\\_virus](http://en.wikipedia.org/wiki/Herpes_simplex_virus), travanj 2012.
8. Kaye, S.; Choudhary, A., *Progress in Retinal and Eye Research*, **25** (2006), 355, 357.
9. [<http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/hsv1struc.jpg>]
10. Watanabe, D., *Journal of Dermatological Science*, **57** (2010), 76.
11. Sacks, S. L. et al., *Antiviral Research*, **63S1** (2004), S28.
12. Beydoun, H. A. et al., *International Journal of Infectious Diseases*, **14S** (2010), e154.
13. <http://www.bio.davidson.edu/people/sosarafova/Assets/Bio307/jehodge/page01.html>, travanj 2012.
14. Muylaert, I. et al., *Journal of Biological Chemistry*, **286** (2011), 15619.
15. <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>, travanj 2012.
16. Bloom, D. C. et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1799** (2010), 246.
17. Efstathiou, S.; Preston, C. M., *Virus Research*, **111** (2005), 108.
18. Boehmer, P. E.; Nimonkar, A. V., *Life*, **55** (2003), 18.
19. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03006987h.htm>, travanj 2012.
20. <http://en.wikipedia.org/wiki/Aciclovir>, travanj 2012.
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/Penciclovir>, travanj 2012.

22. De Clercq, E., *Journal of Clinical Virology*, **30** (2004), 125.
23. Liu, S. et al., *Journal of Biological Chemistry*, **281** (2006), 18196.
24. <http://en.wikipedia.org/wiki/Valaciclovir>, travanj 2012.
25. <http://en.wikipedia.org/wiki/Famciclovir>, travanj 2012.
26. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cidofovir>, travanj 2012.
27. De Clercq, E., *Nature*, **2** (2004), 709.
28. <http://en.wikipedia.org/wiki/Foscarnet>, travanj 2012.
29. Ostrowski, T. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14** (2006), 3535 – 3536.
30. Onishi, T. et al., *Tetrahedron Letters*, **40** (1999), 8845.
31. Zagotto, G.; Gia, O.; Baccichetti, F.; Uriarte, E.; Palumbo, M., *Photochemistry and Photobiology*, **58** (1993), 486.



## *SAŽETAK*

Virusne infekcije predstavljaju značajan problem širom svijeta, stoga je nužna potreba za razvojem novih antivirusnih lijekova. Ovo je istraživanje usmjereno na razvoj novih antivirusnih lijekova iz reda acikličkih zasićenih analoga nukleozida. U tu smo svrhu pripravili acikličke nukleozidne analoge 3-supstituiranih 1,2,4-triazola i gvanina kao potencijalnih agenasa za liječenje infekcija uzrokovanih herpes simpleks virusima.

**Ključne riječi:** sinteza, herpes simpleks virus, nukleozidne baze i njihovi analozi

## *SUMMARY*

Viral infections represent problem all around the world. Therefore, it is necessary to develop new antiviral agents. This research is focused on development of novel acyclic saturated nucleoside analogues as new antiviral agents. Therefore, we have prepared novel saturated acyclic nucleoside analogues of 1,2,4-triazole and purine as potential antiviral agents used to treat infections caused by herpes simplex viruses.

**Key words:** synthesis, herpes simplex virus, nucleoside bases and their analogues

## ŽIVOTOPIS

### Leo Mandić

Rođen je 16. 9. 1988. godine u Zagrebu. Osnovnu školu je završio u Jakovlju. Školovanje je nastavio u Gimnaziji Lucijana Vranjanina (prirodoslovno - matematički smjer) u Zagrebu, gdje je maturirao 2007. god. sa odličnim uspjehom. Iste godine je izravno upisao Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, sveučilišni preddiplomski studij Primijenjena kemija, koji je završio 2010. godine s prosjekom 4,914. Nakon stečene titule sveučilišnog prvostupnika primijenjene kemije, upisao je diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na već spomenutom fakultetu iste godine (prosjeck 5,0). Dobitnik je Dekanove nagrade za zapaženi studentski rad u akademskoj godini (2011.). Sudjeluje u istraživanju različitih klasa spojeva kao potencijalnih antivirusnih i antitumorskih lijekova, o čemu govori i znanstveni rad (koautor u radu) u časopisu *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* pod nazivom "*Novel 1,2,4-triazole and purine acyclic cyclopropane nucleoside analogues: synthesis, antiviral and cytostatic activity evaluations*" (**21** (2011), 221 - 230).

### Tomislav Suhina

Rođen je 25. 4. 1988. godine u Zagrebu. Osnovnu školu je završio u Jakovlju. Školovanje je nastavio u Gimnaziji Lucijana Vranjanina (prirodoslovno - matematički smjer) u Zagrebu, gdje je maturirao 2007. god. sa odličnim uspjehom. Iste godine je upisao Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, sveučilišni preddiplomski studij Primijenjena kemija, koji je završio 2010. godine s prosjekom 4,971. Dobitnik je tri Dekanove nagrade: za najboljeg studenta (2008. i 2009.) i za zapaženi studentski rad (2011.). Nakon stečene titule sveučilišnog prvostupnika primijenjene kemije, upisao je diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na već spomenutom fakultetu iste godine (prosjeck 5,0). Sudjeluje u istraživanju različitih klasa spojeva kao potencijalnih antivirusnih i antitumorskih lijekova, o čemu govori i znanstveni rad (koautor u radu) u časopisu *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* pod nazivom "*Novel 1,2,4-triazole and purine acyclic cyclopropane nucleoside analogues: synthesis, antiviral and cytostatic activity evaluations*" (**21** (2011), 221 - 230).