



Sveučilište u Zagrebu

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Danijel Glavač

**SINTEZA, KRISTALOGRAFSKA ANALIZA I
CITOSTATSKA DJELOVANJA C-5 HETEROARILNIH
I ALKINILNIH N-ACIKLIČKIH PIRIMIDINSKIH
NUKLEOZIDNIH ANALOGA**

Zagreb, 2014.

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 2013. / 2014.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Pirimidin	3
1.2. Nukleozidi.....	4
1.3. C-5 supstituirani nukleozidni derivati kao antivirolici i citostatici.....	5
1.4. Aciklički nukleozidni analozi	6
1.5. Reakcije unakrsnog povezivanja katalizirane paladijem	8
1.5.1. Stille-ova reakcija	8
1.5.2. Sonogashira-ina reakcija.....	10
2. CILJ RADA	13
2.1. Cilj rada.....	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Opće napomene.....	16
3.2. Procedure za pripravu spojeva	17
3.2.1 Derivati lanca poput penciklovirnog.....	17
3.2.2 C-5 supstituirani heteroarilni pirimidinski derivati.....	19
3.2.3 N-aciklički C-5 alkinilni pirimidinski derivati.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Sinteza.....	28
4.2. Strukturna karakterizacija novopripređenih spojeva	32
4.2.1 Kristalna i molekulska struktura spojeva 8a , 11 i 14c	32
4.2.2 Spektroskopska karakterizacija.....	36
4.3. Ispitivanje antitumorskog djelovanja <i>in vitro</i> za spojeve 8a i 12	40
5. ZAKLJUČAK.....	42
6. ZAHVALE.....	44
7. LITERATURA	46
8. SAŽETAK	49

9.	SUMMARY	51
10.	ŽIVOTOPIS	53
11.	PRILOZI	55

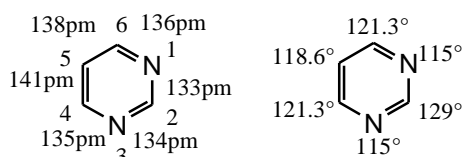
1. UVOD

Rak je, prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, uzročnik oko 25% smrti u razvijenim zemljama i približno 15% u svjetskim razmjerima. Stoga je karcinom jedan od glavnih zdravstvenih problema današnjice [1]. Rak je bolest u kojoj stanica ili više njih izgube kontrolu nad dijeljenjem, što rezultira nakupinom stanica poznatom kako tumor. Tumor je abnormalna masa tkiva koja nastaje zbog stanja u kojem se poremete kontrolni mehanizmi koji reguliraju rast stanice što dovodi do nekontroliranog dijeljenja, proliferacije stanica. Normalno tkivo odrasle osobe ne teži rastu nego održavanju stalnog broja stanica. Početni tumor nazivamo i primarnim tumorom. Primarni tumor blokira krvne žile i organe te tako postaje opasan za život. Tumorske stanice u ranoj fazi rasta nalikuju originalnim stanicama ali u kasnijoj fazi mogu izgubiti izgled i funkciju originalnih stanica. Proces širenja primarnog tumora na više od jednog mjesta u tijelu se zove metastaziranje. Za tumorske stanice koje napadaju i koloniziraju okolno tkivo kažemo da su maligne [2]. Poteškoće kod liječenja tumora uspoređuju se s poteškoćom pri odstranjivanju korova, stanice raka se mogu odstraniti kirurški, toksičnim kemikalijama ili radijacijom, ali teško je odstraniti baš svaku stanicu. Kirurški se ne mogu odstraniti sve stanice raka, a lijekovi koji ubijaju stanice raka štetni su uglavnom i za normalne stanice. Ako i samo nekoliko stanica raka zaostane, one mogu proliferirati, uzrokovati povratak bolesti, a za razliku od normalnih stanica, često stiču otpornost na citotoksične lijekove kojima se tretiraju [3]. Ipak, neki oblici raka se danas uspješno liječe s antitumorskim lijekovima, a za neke neizlječive oblike raka, terapija produžuje i olakšava život pacijentima. Značajan napredak u razvoju novih lijekova i terapija je postignut zadnjih 60 godina, a zahvaljujući otkriću lijekova kao što su cisplatin, taksani i derivati dušikova iperita, uspješno se liječe neki oblici bolesti [2]. Usprkos napredcima moderne medicine, liječenje mnogih vrsta tumora ostaje problematično, a stopa smrtnosti je razočaravajuće visoka [4].

Kemija općenito, i posebice organska kemija, u uskoj su vezi s dizajniranjem i razvojem lijekova. Granice između biologije i kemije sve su manje izražene. Napredak u razumijevanju složenih bioloških procesa na molekularnoj razini omogućio je dizajniranje lijekova pogodnih za selektivnu interakciju s biološkim metama.

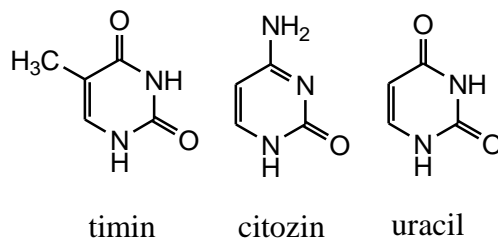
1.1. Pirimidin

Pirimidin (1,3-diazin) je sastavni dio mnogih biološki aktivnih tvari, lijekova. Pirimidin je aromatska, organska molekula slična benzenu i piridinu, ali za razliku od benzena, tvori nepravilnu heksagonsku strukturu sa šest različiti dužina veza i četiri različita kuta veza. Sadrži dva dušikova atoma na položajima 1 i 3 šesteročlanog prstena (Slika 1.).



Slika 1. Struktura pirimidina.

Dva dušikova atoma pirimidinskog prstena djeluju elektron-odvlačeće što smanjuje elektronsku gustoću na atomima C-2, C-4 i C-6 i čini ove položaje podložnim za nukleofilni napad, dok se elektrofilne reakcije odvijaju na atomu C-5 ili dušikovom atomu [5]. Pirimidin je osnovna gradivna jedinica nukleozidnih baza timina, citozina i uracila (Slika 2.)

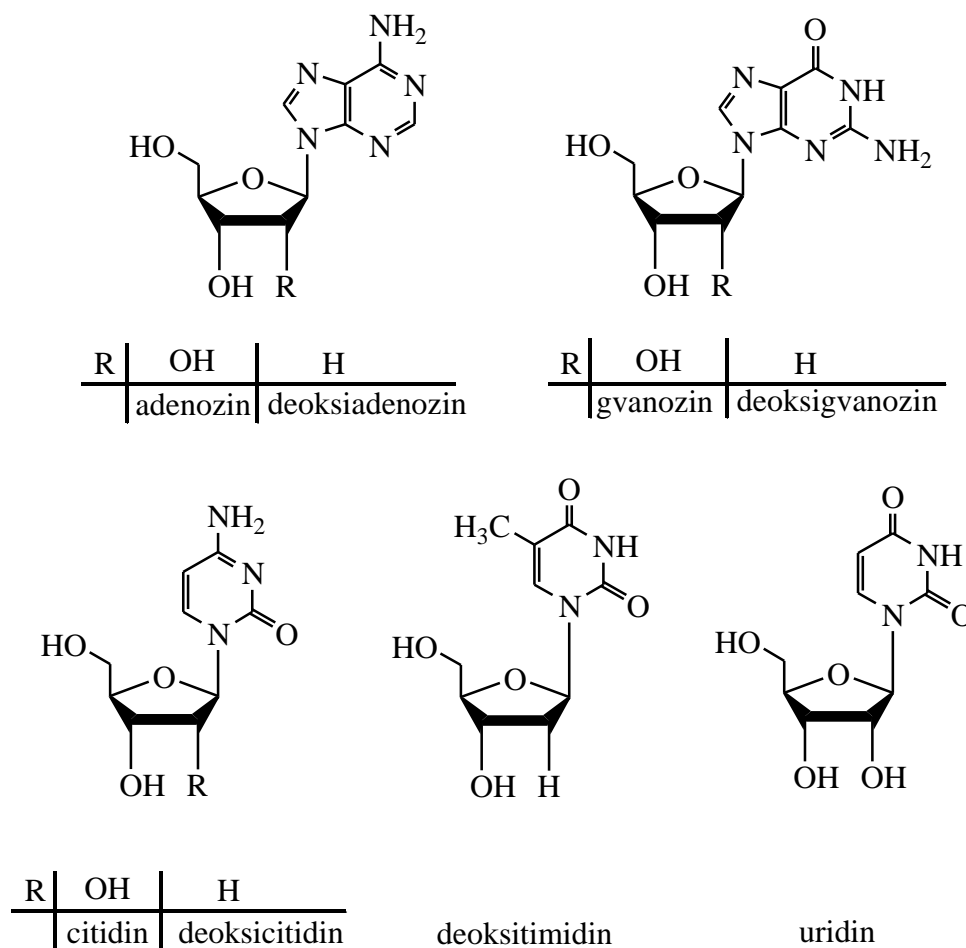


Slika 2. Struktura pirimidinskih baza.

Osnovna struktura pirimidina je pronađena u nekim vitaminima kao što su tiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2) i folna kiselina (vitamin B9). Za razliku od osnovne molekule pirimidina koja ne pokazuje nikakva farmakološka svojstva, derivati pirimidina su se pokazali kao dobri kemoterapijski agensi [6]. George Hitchings je 1948. godine otkrio da su 2,4-diaminopirimidini i 2-amino-4-hidroksipirimidini antagonisti folne kiseline. Kasnije je otkriveno da navedeni derivati pirimidina inhibiraju enzim dihidrofolat-reduktazu [7]. Pirimidin je također baza u velikom broju antimetabolita, što je još jedan razlog koji dovodi do zaključka da njegovi derivati pokazuju širok spektar antitumorske aktivnosti [6].

1.2. Nukleozidi

Nukleozidi su glikozamini koji se sastoje od dušikove heterocikličke baze koja je vezana na šećer (riboza u RNA ili deoksiriboza u DNA) pomoću *N*-glikozidne veze (Slika 3.). Nukleozidne baze se dijele na pirimidinske (timin, citozin i uracil) i purinske (adenin i gvanin) [8].



Slika 3. Pirimidinski i purinski nukleozidi.

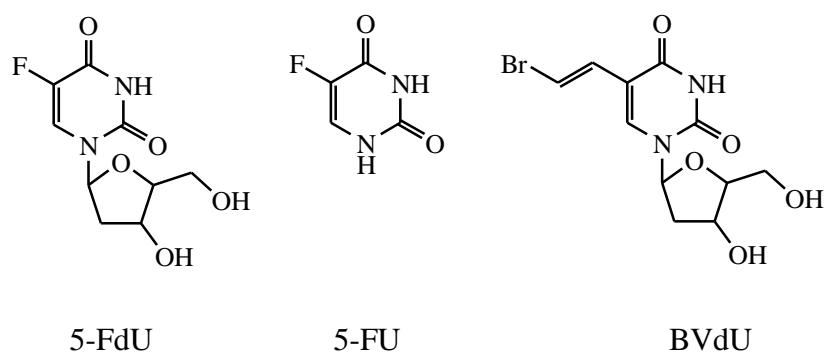
Nukleozidi se u stanici pomoću enzima prevode u fosfatne derivate, nukleotide koji predstavljaju osnovne gradivne jedinice molekula DNA i RNA. Transformacija je temeljena na djelovanju enzima kinaza, pri čemu dolazi do fosforiliranja na primarnoj hidroksilnoj skupini šećera nukleozida. Adenozin-trifosfat (ATP) je primjer nukleotida koji ima važnu ulogu u opskrbljivanju stanica energijom [6]. Adenozin-nukleotid je i sastavni dio nekih važnih dinukleotida: nikotinamid-adenin-dinukleotida (NADH/NAD⁺), flavin-adenin-

dinukleotida ($FADH_2/FAD$) te koenzima A (CoA) [9]. Svi oni pripadaju skupini koenzima, prijenosnika različitih kemijskih skupina među enzimima.

1.3. C-5 supstituirani nukleozidni derivati kao antivirusni i citostatici

Velik broj nukleozidnih analoga koji su supstituirani u položaju C-5 pokazali su snažna biološka djelovanja te se sintetiziraju zbog daljnjih ispitivanja njihovih antivirusnih i citostatskih djelovanja [10]. Alkinilna skupina na položaju C-5 pirimidina povoljna je za kemijske transformacije.

Jedan od najčešće korištenih lijekova za liječenje oboljelih od raka dojke i raka jetre je 5-fluoruracil. Djeluje tako da se umetne u RNA i metabolički aktivira do 5-fluor-2'-deoksiuridin-5'-monofosfata i tako inhibira enzim timidilat-sintetazu, ključni enzim za sintezu DNA [11]. 5-fluor-2'-deoksiuridin (5-FdU) je lijek koji se koristi u liječenju raka debelog crijeva (slika 4.).

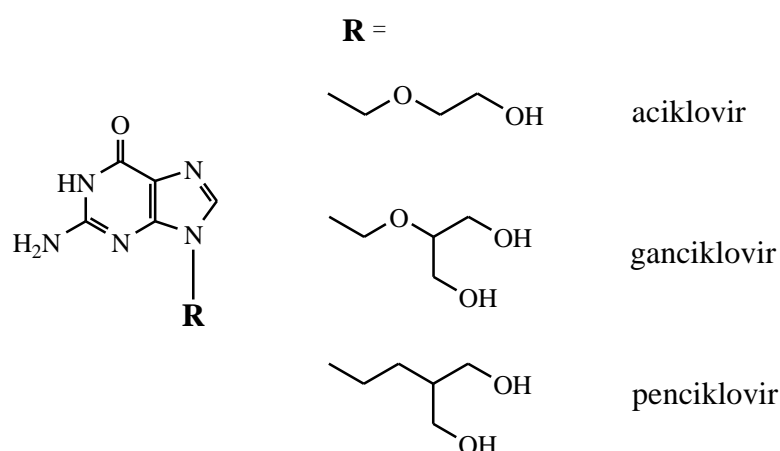


Slika 4. Neki biološki značajni C-5 supstituirani analozi nukleozida

Brivudin (BVdU) je snažan antivirusni agens koji se pokazao izrazito djelotvornim u liječenju infekcija uzrokovanih virusom herpes simpleks tipa I (HSV-1), te varicella-zoster virusa (VZV). BVdU se može naći na tržištu pod imenima Zostex, te Brivirac za liječenje infekcija uzrokovanih virusom herpes zoster [12]. Mehanizam djelovanja temelji se na specifičnom fosforiliranju u 5'-mono- i 5'-difosfatne derivate pomoću VZV i HSV-1 kodirane timidin-kinazom. Moguća je konverzija i do 5'-trifosfata koji mogu inhibirati virusnu DNA-polimerazu, te se ugraditi u virusnu DNA. Gledajući strukturu ovog spoja, supstituent na C-5 položaju deoksiuridina, presudna je komponenta zaslužna za njegovo antivirusno djelovanje [13]. Mnogi derivati brivudina, baš kao i on sam pokazuju specifičnu aktivnost protiv infekcija uzrokovanih virusom HSV-1, a posebice VZV [12].

1.4. Aciklički nukleozidni analozi

Aciklički nukleozidni analozi su sintetski analozi prirodnih nukleozida u čijoj je strukturi šećerni prsten zamijenjen acikličkim lancem koji oponaša dio ili cijeli prsten (Slika 5.) [14]. Sintetski nukleozidi su slični prirodnim nukleozidima što omogućava, nakon fosforiliranja, njihovu ugradnju u rastući polinukleotidni lanac, a to dovodi do prekidanja daljnje sinteze polinukleotida ili izmjene funkcije novonastale nukleinske kiseline, posljedica čega je smrt stanice. Također je otkriveno kako bi ova vrsta spojeva mogla imati važnu ulogu i u kontroli virusnih infekcija [14]. Neki od najpoznatijih acikličkih nukleozidnih analoga su aciklovir, ganciklovir i penciklovir.

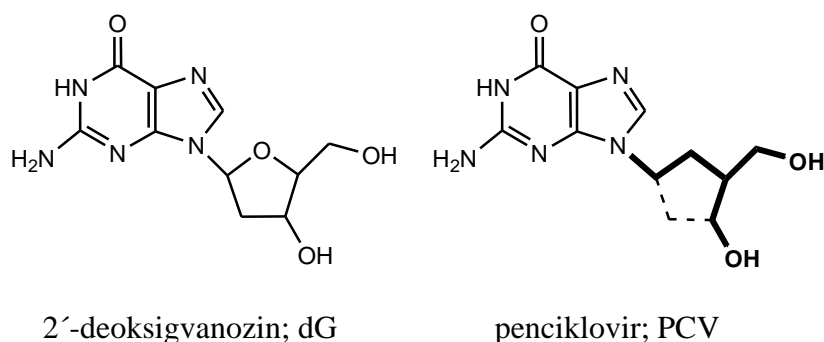


Slika 5. Aciklički nukleozidni analozi.

Aciklovir (ACV; 9-(2-hidroksietoksimetil)gvanin) je zlatni standard u liječenju virusnih oboljenja. Jedini je lijek za genitalni herpes. Selektivni je inhibitor virusa herpes simpleks (HSV), virusa varicella zoster (VZV) i citomegalovirusa (CMV) i štoviše siguran je za oralnu upotrebu [15]. Antivirusno se djelovanje aciklovira može objasniti inhibitornim djelovanjem njegova trifosfata na DNA-polimerazu virusa herpes [16]. Ganciklovir (GCV; 9-(1,3-dihidroksi-2-propoksimetil)gvanin) u određenim uvjetima ima bolje djelovanje i jači učinak na HSV od ACV. Primjenjuje se u liječenju bolesti uzrokovanih citomegalovirusom osoba s oslabljenim imunološkim sustavom [15].

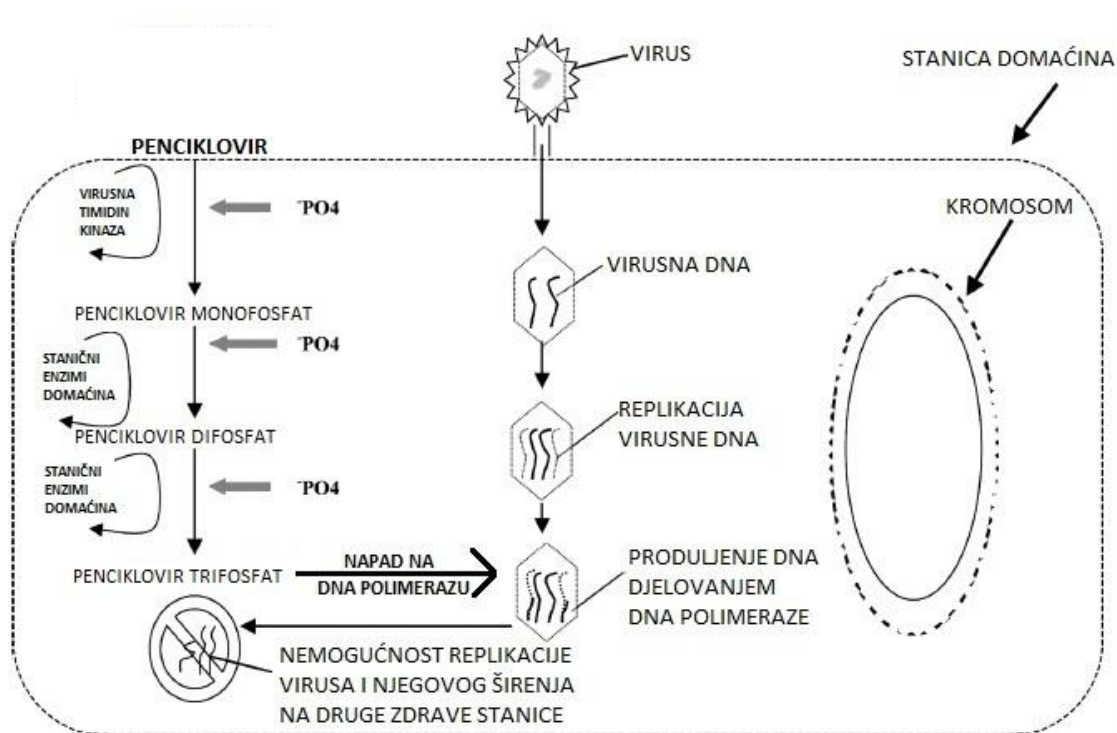
Penciklovir (PCV; 9-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]gvanin) pokazuje snažno i selektivno antivirusno djelovanje. To je aciklički nukleozidni analog strukturno srodan gancikloviru čija je struktura temeljena na zamjeni šećerne komponente otvorenim lancem

(1,3-dihidroksiizobutilnim lancem) koji je izravno vezan na gvanin, a pokazuje slabu toksičnost i dobru selektivnost (Slika 6.)



Slika 6. Usporedba struktura 2'-deoksigvanozina i penciklovira. Isprekidanim linijama je označen dio šećera koji nije dio strukture penciklovira [17].

Penciklovir je neaktivan u početnom obliku. Unutar virusom zaražene stanice virusna timidin-kinaza dodaje fosfatnu skupinu na molekulu penciklovira, čime nastaje penciklovir-monofosfat, a to je ograničavajući korak u aktivaciji samog penciklovira. Stanične kinaze fosforiliraju dodatno penciklovir-monofosfat do aktivnog oblika, penciklovir-trifosfata, preko međuprodukta difosfata. Ovaj aktivni oblik inhibira virusnu DNA-polimerazu tako što ometa sposobnost virusa da se replicira unutar stanice, slično kao i aciklovir (Slika 7).



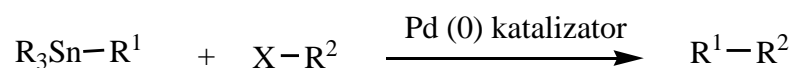
Slika 7. Shematski prikaz mehanizma djelovanja penciklovira

Stanična timidin-kinaza fosforilira penciklovir-difosfat znatno sporije nego virusna timidin-kinaza, stoga je aktivni trifosfatni oblik prisutan u puno većim koncentracijama u virusom inficiranim stanicama nego u nezaraženim stanicama. Aktivirani lijek se veže za virusnu DNA-polimerazu s većim afinitetom nego za ljudsku DNA-polimerazu, zbog čega penciklovir nije toksičan za normalne stanice nezaražene virusom. Aktivni trifosfatni oblik penciklovira postoji unutar stanice puno duže vrijeme nego aktivni oblik aciklovira pa će i koncentracija unešenog penciklovira biti veća unutar stanice [11].

1.5. Reakcije unakrsnog povezivanja katalizirane paladijem

1.5.1. Stille-ova reakcija

Stille-ova reakcija je reakcija nezasićenih organohalogenida i organokositrovih spojeva uz paladijev katalizator te je jedna od najčešće korištenih i najučinkovitijih reakcija za dobivanje veze C-C definirane stereokemije (shema 1.) [18]. Moguće je sintetizirati različite organokositrove spojeve i tako u molekulu elektrofilnog halogenida uvesti alkilni, vinilni, alilni ili arilni supstituent. Odlazeća skupina je obično halogen ili triflat. Reakcija se odvija u blagim reakcijskim uvjetima i daje velika iskorištenja.



R = alkil, aril

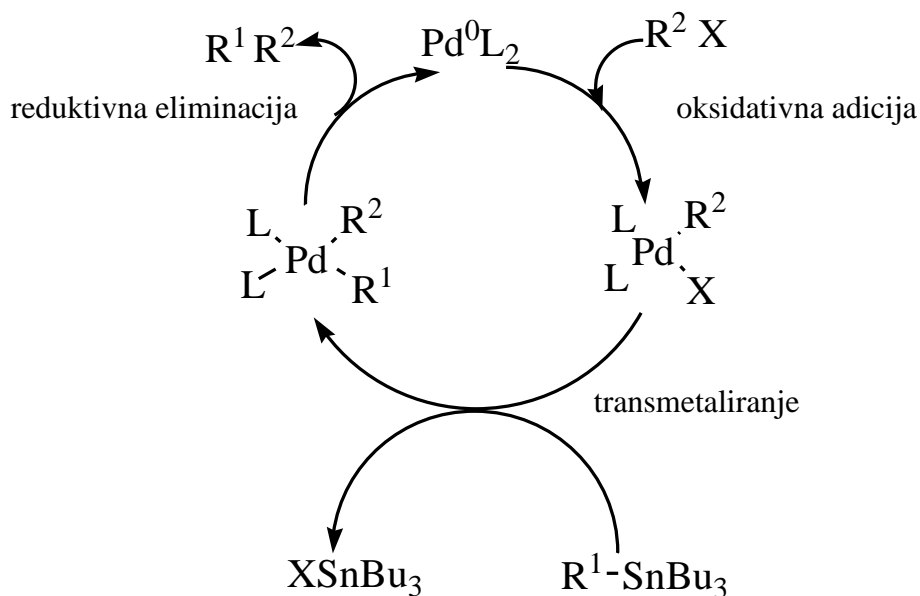
R¹ = alkil, vinil, alil, aril

R² = aril, alil, acil, vinil

X = I, Br, Cl, OTf

Shema 1. Općeniti prikaz Stille-ove reakcije.

Mehanizam Stille-ove reakcije se sastoji od oksidativne adicije, transmetaliranja i reduktivne eliminacije koja vodi do produkta i regeneracije katalizatora (slika 8.) [19]. Mehanizam započinje oksidativnom adicijom tako da se elektrofil oksidativno adira na paladij, potom se organostanan podvrgne transmetaliranju, što je i odlučujući korak. Konačno, produkt nastaje brzom reduktivnom eliminacijom.



Slika 8. Mehanizam Stille-ove reakcije.

Organokositrovi spojevi su toksični, ali su jedni od rijetkih organometalnih reagensa koji se mogu lako pripremiti na više načina. Za razliku od ostalih organometalnih reagensa organokositrovi spojevi nisu osjetljivi na zrak i vlagu te se mogu izolirati kolonskom kromatografijom na silika-gelu ili destilacijom i lako uskladištiti. U reakciji nastali tributilstanil-halogenidi (Bu_3SnX) se teško uklanjaju iz reakcijske smjese jer se polako hidroliziraju na silika-gel-u prilikom pročišćavanja. Postoji nekoliko metoda za njihovo uklanjanje kao što su: ekstrakcija s heksanom, obrada s DBU- I_2 , obrada reakcije s KF u metanolu ili redukcija s NaBH_3CN (konverzija Bu_3SnX u Bu_3SnH) [20, 21]. Jedan od načina uklanjanja Bu_3SnX je obrada reakcije s vodenom otopinom NaOH pri čemu nastaju Bu_3SnOH i $(\text{Bu}_3\text{Sn}_2)\text{O}$ koji su znatno polarniji i zaostaju na koloni. Organokositrovi halogenidi (jodidi, bromidi ili kloridi) se obradom reakcijske smjese s KF pretvaraju u organokositrove fluorida [22]. Trialkil- ili triarilkositrovi fluorida su nehlapljivi, netopljivi (u organskim otapalima i vodi) polimeri.

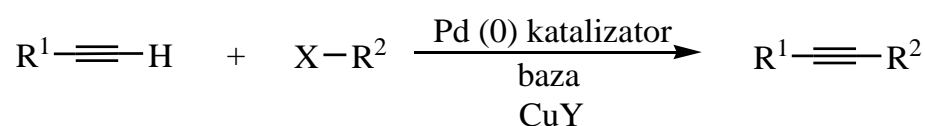
Kao katalizator se koriste paladijevi kompleksi pri čemu je važno da ligandi na paladiju budu elektron-donirajući (snažni σ donori) kako bi se pospješila oksidativna adicija. Najčešće korišteni katalizatori u Stille-ovim reakcijama su: tetrakis(trifenilfosfin)paladij ($(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$) i benzilbis(trifenilfosfin)klorpaladij ($\text{BnPdCl}(\text{PPh}_3)_2$). Upotreba kokatalizatora kao i izbor odgovarajućeg otapala utječu na optimiziranje Stille-ovih reakcija [23]. C.M. Crawforth i suradnici slučajno su 2005 god. otkrili kako zaostaci *N*-bromsukcinimida (NBS) pospješuju

Stille-ovu reakciju [23]. Otapala koja se najčešće koriste su: toluen, tetrahidrofuran (THF), *N*-metil-2-pirolidon (NMP), *N,N*-dimetilformamid (DMF) i dimetilsulfoksid (DMSO).

Mnoge paladijem katalizirane reakcije pokazale su se odličnima za sintezu C-5 supstituiranih uracila. Kako bi se sintetizirali potencijalno aktivni antitumorski spojevi, radilo se na sintezi supstituiranih uracila s raznim heterocikličkim prstenovima poput pirimidina, tiazola, furana, alkil-tiofena, 1-metilpirola, kao i acilnih skupina vezanih na položaj C-5 pirimidina. Tako se C-5 supstituirani pirimidinski derivati mogu pripremiti direktnom kondenzacijom 5-brom ili 5-joduracila sa željenim organokositrovim spojem [24].

1.5.2. Sonogashira-ina reakcija

Otkrićem antivirusnog i antitumorskog djelovanja derivata nukleozida težnja znanstvenika bila je optimirati i unaprijediti njihovu sintezu. Ubrzo je utvrđeno da reakcije potpomognute metalnim katalizatorima predstavljaju najefikasniji pristup stvaranju nove veze ugljik-ugljik. Sonogashira-ina reakcija omogućuje sintezu supstituiranih alkina povezivanjem arilnih ili alkenilnih halogenida (ili triflata) i terminalnih alkina u prisutnosti paladija kao katalizatora, baze te bakrovog halogenida kao kokatalizatora (shema 2.) [18, 25]. Omogućuje nastanak sp²-sp veze ugljik-ugljik i dobivanje enin- i arilalkin- konjugiranih veza koje se često susreću u prirodnim spojevima, farmaceuticima i biološki važnim molekulama, a predstavljaju i važne sintetske intermedijare [26].



R¹ = aril, heteroaril, alkil

R² = aril, heteroaril, vinil

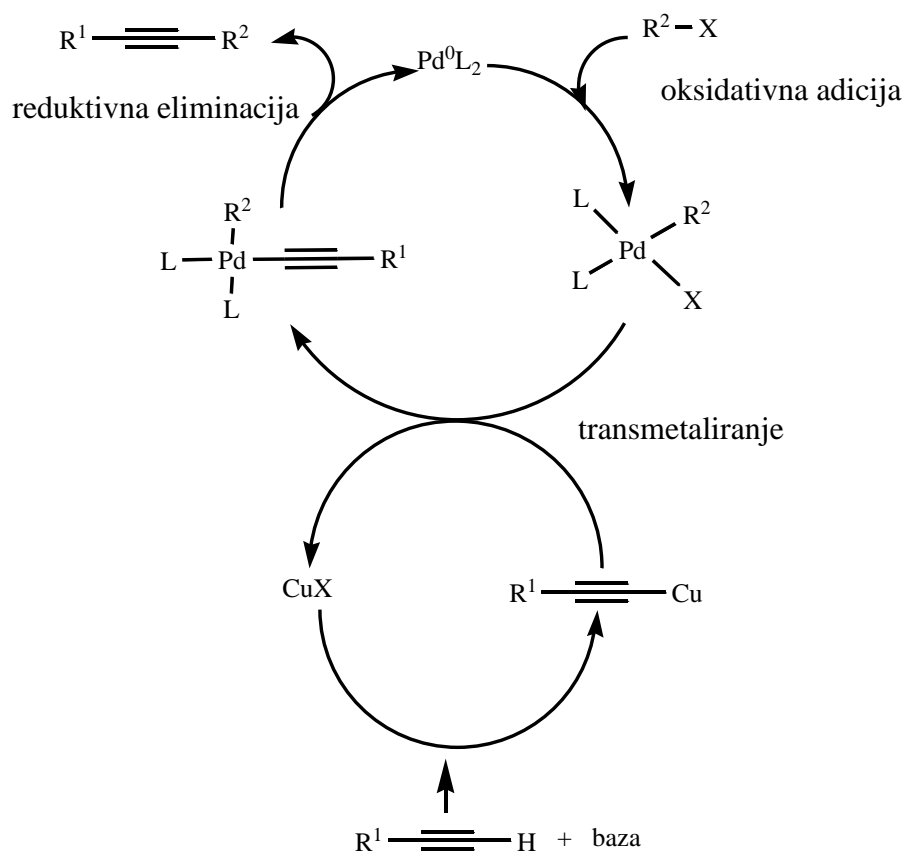
X = I, Br, Cl, OTf

Y = I, Br

Shema 2. Općeniti prikaz Sonogashira-ine reakcije.

Mehanizam Sonogashira-ine reakcije temelji se na tri osnovna stupnja: oksidativna adicija, transmetaliranje i reduktivna eliminacija. s time da nije u potpunosti razjašnjen. U prvom se stupnju na Pd(0)L₂ kompleks (L = ligand) adira nezasićeni arilni ili vinilni

halogenid, pri čemu nastaje planarni Pd(II) kompleks. Adicija je olakšana ako je smanjena elektronska gustoća na vezi C-X organohalogenida R^2-X zbog prisutnih elektron-odvlačećih supstituenata. U drugom stupnju dolazi do transmetaliranja nastalog paladijevog intermedijara. Dodatkom CuI dolazi do aktiviranja alkina, pri čemu nastaje bakrov-acetilid koji reagira s paladijevim intermedijarom pri čemu nastaje kompleks paladija i alkina. Nakon reaktivne eliminacije regenerira se $Pd(0)L_2$ kompleks i izolira se supstituirani alkin (slika 9.) [18].



Slika 9. Mehanizam Sonogashira-ine reakcije.

Reakcije se najčešće izvode na sobnoj temperaturi, iako blago povećanje temperature reakcijske smjese ponekad pogoduje nastanku nove veze C-C i većem iskorištenju reakcije. Najčešće upotrebljavani paladijevi kompleksi su tris(dibenzilidenacetone)dipaladij ($Pd_2(dba)_3$) i tetrakis(trifenilfosfin)paladij(0) ($(PPh_3)_4Pd$). $(PPh_3)_4Pd$ je fotoosjetljiv i nestabilan u atmosferskim uvjetima. Njegovi nedostaci su otežano uklanjanje iz smjese produkata kao i povremena slaba reaktivnost koja je posljedica velikih liganada. Halogene soli bakra koje se najčešće rabe kao kokatalizator su bakrov (I) jodid (CuI) i bakrov (I) bromid ($CuBr$). Kao baza se najčešće koriste trietilamin (Et_3N), dietilamin (Et_2NH), dipropilamin (Pr_2NH) ili

morfolin, dok se kao otapala najviše upotrebljavaju *N,N*-dimetilformamid (DMF), dimetilsulfoksid (DMSO), THF ili *N*-metilpirolidon (NMP). Sonogashirne reakcije omogućuju sintezu nekih C-5 derivata pirimidina sa vrlo visokim iskorištenjem. Optimalni omjeri reaktanta Sonogashirinih reakcija za nastajanje C-5 derivata pirimidina su 2.0-2.5 ekvivalenata terminalnih alkina, 10% $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ katalizatora, 20% CuI i 1.2 ekvivalenata Et_3N . Otapala se dodaje u minimalnim potrebnim količinama zbog lakšeg uklanjanja nakon provedene reakcije [27].

2. CILJ RADA

2.1. Cilj rada

Cilj rada bio je usmjeren na sintezu novih spojeva koji svojom strukturom oponašaju prirodne spojeve, nukleozide, s potencijalnim selektivnim antiproliferativnim djelovanjem. U radu je opisana sinteza novih C-5 supstituiranih heteroarilnih i alkinilnih *N*-acikličkih nukleozidnih analoga. Različiti alkinilni supstituenti uvedeni su u položaj C-5 *N*-acikličkog pirimidina Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja odgovarajućeg jodiranog derivata i odabranih terminalnih alkina, a heteroarilni supstituenti uvedeni su u položaj C-5 uracila Stille-ovom reakcijom odgovarajućeg jodiranog derivata i organokositrovog spoja. Novopripravljenim spojevima određena je struktura primjenom 1D i 2D spektroskopije NMR i spektrometrije masa. Pored toga, strukture spojeva **8a**, **11** i **14c** određene su rentgenskom strukturnom analizom. Ispitano je antiproliferativno djelovanje nekih novopripravljenih spojeva na odabrane tumorske stanične linije porijeklom iz čovjeka i normalne ljudske fibroblaste.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. Opće napomene

Sva otapala su sušena prema preporučenom postupku sušenja sredstvima za sušenje, odnosno destilirana iznad odgovarajućih molekulskih sita.

Za praćenje tijeka reakcije je korištena tankoslojna kromatografija. Tankoslojna kromatografija je rađena na pločama 60F-254 presvučenih slojem silikagela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata je korištena UV-svjetlost valne duljine 254 nm.

Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (*Fluka*, 0,063–0,2 mm), staklene kolone su punjene pod utjecajem gravitacije, a kao eluens su korištene odgovarajuće smjese $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ te *n*-heksan/ Et_2O .

Spektri ^1H i ^{13}C NMR snimljeni su na spektrometru Bruker 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u $\text{DMSO}-d_6$ i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u ^1H i ^{13}C NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema signalu DMSO na δ 2,50 ppm za ^1H i δ 39,50 ppm za ^{13}C . Pojedinačne rezonancije su asignirane na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprega H-H.

Maseni spektri su snimljeni na instrumentu Agilent 6410 opremljenim sa elektrosprejem i trostrukim kvadropolom (LC/MS/MS). Visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC) je provedena na instrumentu Agilent 1100 s UV detektorom koristeći Zorbax C18 kolonu (2,1 x 30 nm; 3,5 μm).

Monokristali spojeva **8a**, **11** i **14c** dobiveni su pri sobnoj temperaturi iz otopine CH_2Cl_2 : CH_3OH = 10 : 1. Podaci su prikupljeni pomoću Oxford Diffraction Xcalibur 2 difraktometra i Sapphire 3 CCD detektora uz monokromatsko MoK_α zračenje ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) i grafitni monokromator na Zavodu za primijenjenu kemiju Tekstilno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prikupljanje podataka provedeno je *CrysAlisPro* programom.

3.2. Procedure za pripravu spojeva

3.2.1 Derivati lanca poput penciklovirnog

2-(1-etoksietoksi)-1-kloretan (1)

U 2-kloretanol (129 ml; 1,92 mmol) oprezno je dokapan etil-vinil-eter (185 ml, 1,93 mol) na 0 °C. Potom je reakcijskoj smjesi dodana trifluorocetna kiselina (0,73 ml; 9,53 mmol), a nakon 1 sat miješanja dodan je i trietilamin (2,76 ml; 19,91 mmol). Produkti su destilirani nad bezvodnim kalijevim karbonatom, $T_v = 70\text{--}102$ °C. Dobiven je spoj žuti uljasti spoj **1** (133,4 ml; 46 %).

Dietil[2-(1-etoksietoksi)etil]malonat (2)

Dietilmalonat (131,5 ml; 0,87 mol) je dokapan tijekom jednog sata u otopinu natrijevog metoksida koji je priređen otopanjem elementarnog natrija (20,22 g; 0,88 g) u apsolutnom etanolu (387 ml) pri temperaturi od 60 °C. Nakon 2 sata, u reakcijsku smjesu je dodan spoj **1** (133,4 ml; 0,87 mol) i miješanje je nastavljeno 20 h na temperaturi refluksa. Reakcija je prekinuta uparavanjem do suha, a potom je produkt ekstrahiran etil-acetatom (400 ml) i vodom (150 ml). Organski sloj sušen je iznad MgSO_4 , filtriran i uparen te je dobiven uljasti spoj **2** (190 g; 86 %). MS (ESI): $m/z=276,16$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

1-acetoksi-2-acetoksimetil-4-(1-etoksietoksi)butan (3)

Spoj **2** (190 g; 0,68 mol) otopljen je u *tert*-butanolu (440 ml) i otopini je postepeno dodan natrijev borhidrid (43,55 g; 1,14 mol). Reakcijska smjesa zagrijavana je na temperaturu refluksa (80 °C) te je tijekom 30 minuta dodan metanol (56,10 ml) tri puta. Nakon što je dodana cijela količina metanola reakcijska smjesa je miješana na temperaturi refluksa 3 h. U ohlađenu reakcijsku smjesu, dodana je otopina natrij-fosfata (90,8 g; 0,55 mol) otopljenog u 200 ml destilirane vode, te je zakiseljena sa približno 20 ml klorovodične kiseline do pH 4. Potom je dodavana čista klorovodična kiselina (50 ml) do pH=7. Otapalo je upareno, a produkt je nekoliko puta ispiran metanolom. Dobiven je uljasti produkt kojem je dodan suhi piridin (150 ml) i acetanhidrid (120 ml; 1,26 mol). Reakcijska smjesa je ohlađena na 0 °C. Trietilamin (405 ml; 2,87 mol) dokapan je u reakcijsku smjesu, a nakon 10 minuta i

metanol (74 ml). Produkt je tako ostavljen na sobnoj temperaturi 1 sat i nakon toga uparen do $\frac{1}{4}$ volumena. Zaostali produkt je ekstrahiran kloroformom (200 ml) i zasićenom otopinom natrijevog karbonata (3 x 120 ml). Organski sloj otopljen u kloroformu sušen je iznad bezvodnog MgSO_4 . Otapalo je upareno i dobiven je žuti uljasti spoj **3** (55 g; 30 %). MS (ESI): $m/z=276,16$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

4-(acetoksi)-3-(acetoksimetil)butanol (4)

Spoj **3** (55 g; 0,20 mol) otopljen je u octenoj kiselini (48 ml; 0,85 mol) i vodi (12 ml). Reakcijska smjesa je zagrijavana preko noći na 30 °C. Otapalo je upareno i dobiven je žuti uljasti spoj **4** (19,6 g; 48 %). MS (ESI): $m/z=205,11$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

4-(acetoksi)-3-(acetoksimetil)butil-metansulfonat (5)

Spoj **4** (16,92 g; 0,08 mol) je otopljen u suhom diklorometanu (80 ml; 1,25 mol), te je reakcijska smjesa ohlađena na -5 °C. Dokapavan je trietilamin (25,6 mL; 0,18 mol) te smjesa metansulfonil-klorida (12,86 mL; 0,166 mol) i diklorometana (40 ml; 0,63 mol). Reakcija je miješana 2 h na -5 °C. Smjesa je ekstrahirana s 1 M HCl (95,74 ml), a potom zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (100 ml) i zasićenom otopinom natrijevog klorida (100 ml). Organski sloj sušen je iznad bezvodnog MgSO_4 i filtriran. Otapalo je upareno i dobiven je uljasti spoj **5** (9,96 g; 43 %).

4-(acetoksi)-3-(acetoksimetil)butil-jodid (6)

Reakcijska smjesa natrijevog jodida (10,60 g; 0,07 mol), spoja **5** (9,96 g; 0,035 mol) i suhog acetona (100 ml) miješana na temperaturi refluksa 2 h. Otapalo je upareno, a ostatku nakon uparavanja dodana je voda (200 ml) te je produkt ekstrahiran dietil-eterom (3 x 100 ml). Organski sloj je odvojen i ispran sa zasićenom otopinom natrijevog hidrogensulfita (100 ml), a potom i sa zasićenom otopinom NaCl (100 ml). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog MgSO_4 , potom je profiltriran. Otapalo je upareno uz sniženi tlak. Produkt je pročišćen kromatografijom na koloni (n-heksan : Et_2O = 4 : 3) te je dobiven uljasti spoj **6** (6,83 g; 31 %).

3.2.2 C-5 supstituirani heteroarilni pirimidinski derivati

5-(furan-2-il)pirimidin-2,4-dion (7a)

Reakcijska smjesa 5-joduracila (300,0 mg; 1,26 mmol), katalizatora bis(trifenilfosfin)paladijev(II) diklorid ((Ph₃P)₂PdCl₂; 97,0 mg; 0,14 mmol) i 2-(tributilstanil)furana (3 ml; 9,56 mmol) u THF-u (25 ml), zagrijavana je 3 sata na temperaturi refluksa. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, reakcijskoj smjesi je dodan KF i miješanje je nastavljeno tijekom 2 h. Krutina je odfiltrirana, a otapalo je upareno uz sniženi tlak. Zaostala crno ulje je pročišćeno kromatografijom na koloni (diklormetan : metanol = 20 : 1) pri čemu je izoliran bijeli praškasti spoj **7a** (139,1 mg; 62 %).

¹H NMR: (δ) 11,37 (1H, s, NH), 11,20 (1H, s, NH), 7,70 (1H, s, H-6), 7,65–7,60 (1H, m, H-5'), 6,82 (1H, d, H-3', *J* = 3,2 Hz), 6,50 (1H, dd, H-4', *J* = 3,3 Hz, *J* = 1,9 Hz) ppm.

¹³C NMR: (δ) 161,6 (C-4), 150,8 (C-2), 147,2 (C-2'), 141,7 (C-6), 136,7 (C-5'), 112,0 (C-4'), 107,8 (C-3'), 104,9 (C-5) ppm.

5-(tiofen-2-il)pirimidin-2,4-dion (7b)

Spoj **7b** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **7a**. Reagensi: 5-joduracila (1000,0 mg; 4,20 mmol), (Ph₃P)₂PdCl₂ (150,0 mg; 0,21 mmol), 2-(tributilstanil)tiofen (2,37 ml; 8,94 mmol), DMF (13 ml). Nakon kolonske kromatografije (diklormetan : metanol = 10 : 1) izoliran je bijeli kristalini spoj **7b** (114,6 mg; 26 %).

5-(furan-2-il)-*N*-1-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]pirimidin-2,4-dion (8a) i 5-(furan-2-il)-*N,N*-1,3-bis[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]pirimidin-2,4-dion (9a)

Otopini spoja **7a** (195,0 mg; 0,57 mmol) u DMF-u (11 ml) dodan je K₂CO₃ (113,7 mg; 0,57 mmol) u atmosferi argona, a nakon pola sata dokapan je spoj **6** (258,0 mg; 0,82 mmol) te je miješanje nastavljeno 2 h. Otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak od uparavanja pročišćen kromatografijom na koloni (diklormetan : metanol = 20 : 1). Izolirani su praškasti spoj **8a** (27,6 mg; 14 %; t.t. = 200–203 °C) MS (ESI): *m/z* = 281,2 ([M+H]⁺) i uljasti spoj **8b** (13,3 mg; 7 %) MS (ESI): *m/z* = 383,2 ([M+H]⁺).

8a: ^1H NMR: (δ) 11,54 (1H, s, NH), 8,08 (1H, s, H-6), 7,66 (1H, d, H-5', $J = 1,1$ Hz), 6,86 (1H, d, H-3', $J = 3,3$ Hz), 6,54 (1H, dd, H-4', $J = 3,3$ Hz, $J = 1,8$ Hz), 4,42 (2H, t, OH, $J = 5,2$ Hz), 3,95–3,74 (2H, m, H-1"), 3,44–3,40 (4H, m, H-4"), 1,63 (2H, q, H-2", $J = 6,9$ Hz), 1,58–1,47 (1H, m, H-3") ppm.

^{13}C NMR: (δ) 161,0 (C-4), 150,3 (C-2), 147,0 (C-2'), 140,7 (C-6), 136,3 (C-5'), 112,5 (C-4'), 108,2 (C-3'), 107,8 (C-5), 61,9 (C-4"), 46,6 (C-1"), 41,3 (C-3"), 28,5 (C-2") ppm.

9a: ^1H NMR: (δ) 8,13 (1H, s, H-6), 7,67 (1H, d, H-5', $J = 1,1$ Hz), 6,91 (1H, d, H-3', $J = 3,1$ Hz), 6,55 (1H, dd, H-4', $J = 3,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz), 4,43 (2H, t, OH, $J = 5,2$ Hz), 4,35 (2H, t, OH, $J = 5,0$ Hz), 3,97–3,90 (4H, m, H-1"), 3,49–3,36 (8H, m, H-4"), 1,69–1,60 (2H, m, H-3"), 1,60–1,43 (4H, m, H-2") ppm.

^{13}C NMR: (δ) 159,3 (C-4), 149,7 (C-2), 146,5 (C-2'), 141,4 (C-6), 138,4 (C-5'), 111,6 (C-4'), 107,8 (C-3'), 104,2 (C-5), 61,5 (C-4"), 61,4 (C-4"), 47,7 (C-1"), 41,3 (C-3"), 40,7 (C-3"), 27,7 (C-2"), 26,2 (C-2") ppm.

5-(tiofen-2-il)-*N*-1-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]pirimidin-2,4-dion (**8b**)

Spoj **8b** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **8a**. Reagensi: spoj **7b** (100,0 mg; 0,52 mmol), spoj **6** (234,9 mg; 0,75 mmol), K_2CO_3 (71,9 mg; 0,52 mmol) i DMF (6 ml). Nakon kolonske kromatografije (diklormetan : metanol = 20 : 1) izoliran je spoj **8b** (11,1 mg; 7 %). MS (ESI): $m/z = 297,1$ ($[M+H]^+$)

^1H NMR: (δ) 11,57 (1H, s, NH), 8,26 (1H, s, H-6), 7,48–7,41 (2H, m, H-5', H-3'), 7,06 (1H, dd, H-4', $J = 5,1$ Hz, $J = 3,7$ Hz), 4,40 (2H, t, OH, $J = 5,2$ Hz), 3,89–3,78 (2H, m, H-1"), 3,49–3,35 (4H, m, H-4"), 1,63 (2H, q, H-2", $J = 6,9$ Hz), 1,53–1,49 (1H, m, H-3") ppm.

3.2.3 *N*-aciklički C-5 alkinilni pirimidinski derivati

3-benzoilpirimidin-2,4-dion (**10**)

Reakcijska smjesa uracila (4,5 g; 40,0 mmol), benzoil-klorida (10,4 ml; 89,6 mmol), acetonitrila (40 ml) i piridina (16 ml) miješana je 24 h na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno, a u ostatak od uparavanja dodan je diklormetan i voda (1 : 1; 150 ml) pri čemu je iskristalizirao bijeli sirasti talog koji je odfiltriran. Dobiveni talog je prekrizaliziran u smjesi otapala aceton/voda (1 : 1). Dobiven je bijeli kristalinični spoj **10** (7,4 g; 85 %; t.t. = 218–221 °C).

^1H NMR: (δ) 11,57 (1H, s, NH), 7,98–7,92 (2H, m, Ph-2'''), 7,82–7,74 (1H, m, Ph-4'''), 7,65 (1H, d, H-6, $J = 7,7$ Hz), 7,60 (2H, t, Ph-3''', $J = 7,7$ Hz), 5,73 (1H, d, H-5, $J = 7,7$ Hz) ppm.

3-benzoil-5-jodpirimidin-2,4-dion (11)

U reakcijsku smjesu spoja **10** (2,2 g; 10,28 mmol) u acetonitrilu (102 ml) dodan je jod (1,6 g; 10,28 mmol) i amonijev cerijev(IV) nitrat (CAN; 3,4 g; 10,28 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijavana na temperaturi refluksa 2 sata. Otapalo je upareno, a dobiveni produkti ekstrahirani su s etil-acetatom i vodom te zasićenom otopinom Na_2SO_3 . Organski sloj je sušen iznad bezvodnog MgSO_4 . Nakon filtriranja, izoliran je bijeli kristalinični spoj **11** (1,9 g; 55 %; t.t. = 209–211 °C).

^1H NMR: (δ) 11,89 (1H, s, NH), 8,13 (1H, s, H-6), 8,00–7,95 (m, 2H, Ph-2'''), 7,79 (1H, t, Ph-4''', $J = 7,4$ Hz), 7,60 (2H, t, Ph-3''', $J = 7,9$ Hz) ppm.

^{13}C NMR: (δ) 170,2 (CO), 161,0 (C-4), 150,7 (C-2), 148,8 (C-6), 136,5 (Ph-4'''), 131,9 (Ph-1'''), 131,3 (Ph-3'''), 130,4 (Ph-2'''), 67,5 (C-5) ppm.

N-1-[4-acetoksi-3-(acetoksimetil)butil]-N-3-benzoil-5-jodpirimidin-2,4-dion (12)

Otopini spoja **11** (572,8 mg; 1,68 mmol) u DMF-u (8 ml) dodan je K_2CO_3 (231,5 mg; 1,68 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 30 minuta na sobnoj temperaturi i dodan je spoj **6** (684,2 mg; 2,18 mmol) otopljen u DMF-u (2 ml) te je miješanje nastavljeno preko noći. Otapalo je upareno, a ostatak od uparavanja pročišćen kolonskom kromatografijom (diklormetan : metanol = 200 : 1) pri čemu je izoliran žuti uljasti spoj **12** (607,0 mg; 67 %).

^1H NMR: (δ) 8,48 (1H, s, H-6), 8,04–7,95 (2H, m, Ph-2'''), 7,80 (1H, t, Ph-4''', $J = 7,4$ Hz), 7,61 (2H, t, Ph-3''', $J = 7,8$ Hz), 4,04 (4H, d, H-4'', $J = 5,7$ Hz), 3,91–3,70 (2H, m, H-1''), 2,14–1,95 (7H, m, COCH_3 , H-3''), 1,72 (2H, q, H-2'', $J = 6,8$ Hz) ppm.

^{13}C NMR: (δ) 170,3 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 168,9 (CO), 159,6 (C-4), 150,7 (C-2), 149,3 (C-6), 135,6 (Ph-4'''), 130,7 (Ph-1'''), 130,4 (Ph-3'''), 129,5 (Ph-2'''), 67,2 (C-4''), 63,6 (C-4''), 46,4 (C-1''), 34,4 (C-3''), 27,3 (C-2''), 20,6 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$).

N-1-[4-acetoksi-3-(acetoksimetil)butil]-N-3-benzoil-5-(heptinil)pirimidin-2,4-dion (13a)

Metoda A: U otopinu spoja **12** (137,5 mg; 0,26 mmol) u toluenu (5 ml) dodani su CuI (10,4 mg; 0,05 mmol), $(\text{PPH}_3)_4\text{Pd}$ (30,1 mg; 0,03 mmol) i Et_3N (0,1 ml; 0,55 mmol) u

atmosfera argona Potom je dokapan heptin (0,04 ml; 0,31 mmol). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na sobnoj temperaturi te je potom dodan Amberlit IRA 400 i aktivni ugljen. Reakcijska smjesa je odfiltrirana, a filtrat uparen. Zaostalo žuto ulje pročišćeno je kolonskom kromatografijom (diklormetan : metanol = 200 : 1) pri čemu je izoliran bezbojni uljasti spoj **13a** (93,0 mg; 72 %). MS (ESI): $m/z = 497,2$ ($[M+H]^+$)

Metoda B: U reakcijsku smjesu spoja **12** (138,2 mg; 0,26 mmol) u toluenu (5ml) dodani su CuI (10,5 mg; 0,05 mmol), Et₃N (0,1 ml; 0,55 mmol), (PPh₃)₄Pd (30,2 mg; 0,03 mmol), i heptin (0,04 ml; 0,31 mmol) te je zatim reakcijska smjesa zagrijavana 4 h u mikrovalnom reaktoru pri temperaturi 60 °C. Nakon kolonske kromatografije (diklormetan : metanol = 200 : 1) izoliran je spoj **13a** (87,8 mg; 68 %). MS (ESI): $m/z = 497,2$ ($[M+H]^+$)

¹H NMR: 8,26 (1H, s, H-6), 8,04–7,96 (2H, m, H-2'''), 7,79 (1H, t, H-4''', $J = 7,4$ Hz), 7,60 (2H, t, H-3''', $J = 7,8$ Hz), 4,01 (4H, d, H-4'', $J = 5,7$ Hz), 3,88–3,76 (2H, m, H-1''), 2,38 (2H, t, H-3', $J = 6,9$ Hz), 2,03–2,00 (1H, m, H-3''), 2,00 (6H, s, COCH₃), 1,71 (2H, q, H-2'', $J = 7,1$ Hz), 1,55–1,44 (2H, m, H-4'), 1,43–1,22 (4H, m, H-5', H-6'), 0,87 (3H, t, CH₃-7', $J = 7,1$ Hz) ppm.

¹³C NMR: (δ) 170,8 (COCH₃), 169,4 (CO), 161,6 (C-4), 153,1 (C-2), 149,1 (C-6), 136,0 (Ph-4'''), 131,4 (Ph-1'''), 130,9 (Ph-3'''), 130,0 (Ph-2'''), 98,8 (C-5), 94,7 (C-2'), 72,3 (C-1'), 64,1 (C-4''), 47,0 (C-1''), 34,9 (C-3''), 30,9 (CH₂), 28,2 (CH₂), 27,7 (C-2''), 22,1 (CH₂), 21,1 (COCH₃), 19,1 (CH₂), 14,3 (CH₃-7') ppm.

N-1-[4-acetoksi-3-(acetoksimetil)butil]-*N*-3-benzoil-5-(5-klorpentinil)pirimidin-2,4-dion (**13b**)

Metoda A: Spoj **13b** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **13a**. Reagensi: spoj **12** (212,3 mg; 0,40 mmol), CuI (16,1 mg; 0,08 mmol), Et₃N (0,1 ml; 0,86 mmol), (PPh₃)₄Pd (46,5 mg; 0,04 mmol), 5-klorpentin (0,1 ml; 0,48 mmol), toluen (10 ml). Nakon kolonske kromatografije (diklormetan : metanol = 200 : 1) izoliran je bezbojni uljasti spoj **13b** (115,7 mg; 57 %). MS (ESI): $m/z = 503,2$ ($[M+H]^+$)

Metoda B: Spoj **13b** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **13a**. Reagensi: spoj **12** (137,2 mg; 0,26 mmol), CuI (10,4 mg; 0,05 mmol), Et₃N (0,08 ml; 0,68 mmol), (PPh₃)₄Pd (30,0 mg; 0,02 mmol), 5-klorpentin (0,1 ml; 0,48 mmol), toluen (5 ml). Nakon kolonske kromatografije (diklormetan : metanol = 200 : 1) izoliran je bezbojni uljasti spoj **13b** (17,2 mg; 13 %). MS (ESI): $m/z = 503,2$ ($[M+H]^+$)

^1H NMR: (δ) 8,30 (1H, s, H-6), 8,01–7,98 (2H, m, Ph-2'''), 7,79 (1H, t, H-4''', $J = 7,4$ Hz), 7,60 (2H, t, H-3''', $J = 7,9$ Hz), 4,02 (4H, d, H-4'', $J = 5,7$ Hz), 3,85–3,80 (2H, m, H-1''), 3,75 (2H, t, H-5', $J = 6,4$ Hz), 2,55 (2H, t, H-3', $J = 6,9$ Hz), 2,05–2,01 (1H, m, H-3''), 2,00 (6H, s, COCH₃), 1,94 (2H, p, H-4', $J = 6,7$ Hz), 1,72 (2H, q, H-2'', $J = 6,9$ Hz) ppm.

^{13}C NMR: 170,8 (COCH₃), 169,4 (CO), 161,6 (C-4), 149,5 (C-6), 149,1 (C-2), 136,1 (Ph-4'''), 131,4 (Ph-1'''), 130,9 (Ph-3'''), 130,0 (Ph-2'''), 98,5 (C-5), 92,9 (H-2'), 73,1 (C-1'), 64,1 (C-4''), 47,0 (C-1''), 44,5 (C-5'), 34,9 (C-3''), 31,4 (C-4'), 27,7 (C-2''), 21,1 (COCH₃), 16,7 (C-3') ppm.

***N*-1-[4-acetoksi-3-(acetoksimetil)butil]-*N*-3-benzoil-5-(dekinil)pirimidin-2,4-dion (13c)**

Spoj **13c** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **13a**. Reagensi: spoj **12** (313,0 mg; 0,06 mmol), CuI (23,7 mg; 0,12 mmol), Et₃N (0,2 ml; 1,29 mmol), (PPh₃)₄Pd (68,6 mg; 0,06 mmol), dekin (0,1 ml; 0,71 mmol), toluen (15 ml). Nakon kolonske kromatografije (diklormetan : metanol = 200 : 1) izoliran je žuti uljasti spoj **13c** (214,0 mg; 67 %).

^1H NMR: (δ) 8,26 (1H, s, H-6), 8,03–7,96 (2H, m, Ph-2'''), 7,79 (1H, t, H-4''', $J = 7,4$ Hz), 7,60 (2H, t, H-3''', $J = 7,8$ Hz), 4,01 (4H, d, H-4'', $J = 5,7$ Hz), 3,88–3,78 (2H, m, H-1''), 2,37 (2H, t, H-3', $J = 6,8$ Hz), 2,10–2,02 (1H, m, H-3''), 2,04–1,91 (6H, m, COCH₃), 1,71 (2H, q, H-2'', $J = 6,9$ Hz), 1,54–1,42 (2H, m, CH₂), 1,44–1,20 (10H, m, 5 x CH₂), 0,84 (3H, t, CH₃, $J = 6,7$ Hz) ppm.

^{13}C NMR: (δ) 170,3 (COCH₃), 167,0 (CO), 161,1 (C-4), 148,4 (C-6), 145,1 (C-2), 135,6 (Ph-4'''), 130,9 (Ph-1'''), 130,4 (Ph-3'''), 129,5 (Ph-2'''), 98,3 (C-5), 94,2 (C-2'), 71,8 (C-1'), 63,5 (C-4''), 46,4 (C-1''), 34,3 (C-3''), 31,2 (CH₂), 28,6 (CH₂), 28,5 (CH₂), 28,2 (CH₂), 28,1 (CH₂), 27,2 (C-2''), 20,6 (COCH₃), 18,7 (CH₂), 13,9 (CH₃) ppm.

***N*-1-[4-acetoksi-3-(acetoksimetil)butil]-*N*-3-benzoil-5-(3-fenilpropinil)pirimidin-2,4-dion (13d)**

Spoj **13d** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **13a**. Reagensi: spoj **12** (308,0 mg; 0,58 mmol), CuI (23,3 mg; 0,12 mmol), Et₃N (0,2 ml; 1,22 mmol), (PPh₃)₄Pd (68,5 mg; 0,06 mmol), 3-fenilpropin (0,1 ml; 0,91 mmol), toluen (15 ml). Nakon kolonske kromatografije (diklormetan : metanol = 200 : 1) izoliran je žuti uljasti spoj **13d** (211,1 mg; 70 %). MS (ESI): $m/z = 517,3$ ($[M+H]^+$)

^1H NMR: (δ) 8,36 (1H, s, H-6), 8,05–7,98 (2H, m, Ph-2'''), 7,80 (1H, t, Ph-4''', $J = 7,4$ Hz), 7,60 (2H, t, Ph-3''', $J = 7,8$ Hz), 7,42–7,29 (4H, m, Ph-2', Ph-3'), 7,28–7,21 (1H, m, Ph-4'), 4,01 (4H, d, H-4'', $J = 5,7$ Hz), 3,87 (2H, s, H-3'), 3,87–3,81 (2H, m, H-1''), 2,09–2,01 (1H, m, H-3''), 2,00 (6H, s, COCH_3), 1,72 (2H, q, H-2'', $J = 6,9$ Hz) ppm.

^{13}C NMR: (δ) 170,8 (COCH_3), 169,4 (CO), 161,6 (C-4), 149,5 (C-6), 149,2 (C-2), 136,8 (Ph-1'), 136,1 (Ph-4'''), 131,4 (Ph-1'''), 131,0 (Ph-3'''), 130,0 (Ph-2'''), 128,95 (Ph-2'), 128,35 (Ph-3'), 127,0 (Ph-4'), 98,5 (C-5), 92,4 (C-2'), 74,1 (C-1'), 64,1 (C-4''), 47,0 (C-1''), 34,9 (C-3''), 27,7 (C-2''), 25,3 (C-3'), 21,1 (CH_3) ppm.

***N*-1-[4-acetoksi-3-(acetoksimetil)butil]-*N*-3-benzoil-5-(3,3-dimetilbutinil)pirimidin-2,4-dion (13e)**

Spoj **13e** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **13a**. Reagensi: spoj **12** (187,0 mg; 0,35 mmol), CuI (14,1 mg; 0,07 mmol), Et_3N (0,1 ml; 0,88 mmol), $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ (40,9 mg; 0,04 mmol), 3,3-dimetilbutin (0,1 ml; 0,42 mmol), toluen (10 ml). Nakon kolonske kromatografije (diklormetan : metanol = 200 : 1) izoliran je spoj **13e** kao bezbojno ulje (140,0 mg; 83 %).

^1H NMR: (δ) 8,23 (1H, s, H-6), 8,08–7,90 (2H, m, Ph-2'''), 7,79 (1H, t, Ph-4''', $J = 7,4$ Hz), 7,60 (2H, t, Ph-3''', $J = 7,8$ Hz), 4,02 (4H, d, H-4'', $J = 5,7$ Hz), 3,89–3,70 (2H, m, H-1''), 2,08–2,02 (1H, m, H-3''), 2,02 (6H, s, COCH_3), 1,78–1,60 (2H, m, H-2''), 1,24 (9H, s, CH_3) ppm.

^{13}C NMR: (δ) 170,3 (COCH_3), 168,9 (CO), 160,9 (C-4), 159,9 (C-2), 148,6 (C-6), 135,5 (Ph-4'''), 130,9 (Ph-3'''), 130,4 (Ph-1'''), 129,4 (Ph-2'''), 101,9 (C-5), 98,1 (C-2'), 70,3 (C-1'), 63,6 (C-4''), 46,4 (C-1''), 34,4 (C-3''), 30,6 (CH_3), 27,7 (C-3'), 27,2 (C-2''), 20,6 (COCH_3) ppm.

5-(heptinil)-*N*-1-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]pirimidin-2,4-dion (14a)

Otopini spoja **13a** (82,6 mg; 0,17 mmol) u metanolu (1,7 ml) je dodana svježe pripravljena 0,1 M otopina $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (0,7 ml). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na sobnoj temperaturi, te potom neutralizirana dodatkom Amberlysta 15. Reakcijska smjesa je filtrirana, filtrat uparen, a ostatak od uparavanja pročišćen kolonskom kromatografijom (diklormetan : metanol = 20 : 1). Izoliran je bijeli kristalinični spoj **14a** (35,5 mg; 70 %; t.t. = 89–92 °C). MS (ESI): $m/z = 309,2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

^1H NMR: (δ) 11,45 (1H, s, NH), 7,95 (1H, s, H-6), 4,41 (2H, t, OH, $J = 5,2$ Hz), 3,79–3,65 (2H, m, H-1"), 3,48–3,34 (4H, m, H-4"), 2,35 (2H, t, H-3', $J = 7,0$ Hz), 1,61–1,41 (4H, m, H-2", H-4'), 1,41–1,20 (4H, m, H-5', H-6'), 0,88 (3H, t, CH₃, $J = 7,1$ Hz) ppm.

^{13}C NMR: (δ) 162,3 (C-4), 149,9 (C-2), 147,9 (C-6), 98,1 (C-5), 93,0 (C-2'), 72,8 (C-1'), 61,5 (C-4"), 46,3 (C-1"), 40,7 (C-3"), 30,4 (CH₂), 27,9 (CH₂), 27,7 (C-2"), 21,6 (CH₂), 18,7 (C-3'), 13,8 (CH₃) ppm.

***N*-1-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]-5-(5-klorpentinil)pirimidin-2,4-dion (14b)**

Spoj **14b** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **14a**. Reagensi: spoj **13b** (78,0 mg; 0,16 mmol), metanol (1,4 ml) i 0,1 M NaOCH₃/CH₃OH (0,7 ml). Kolonskom kromatografijom (diklormetan : metanol = 20 : 1) izoliran je bijeli kristalinični spoj **14b** (44,4 mg; 91 %; t.t. = 133–135 °). MS (ESI): $m/z = 315,1$ ($[M+H]^+$)

^1H NMR: (δ) 11,46 (1H, s, NH), 7,99 (1H, s, H-6), 4,39 (2H, t, OH, $J = 5,2$ Hz), 3,80–3,68 (4H, m, H-1", H-5'), 3,44–3,33 (4H, m, H-4"), unutar signala za DMSO (H-3'), 1,93 (2H, p, H-4', $J = 6,7$ Hz), 1,56 (2H, q, H-2", $J = 6,8$ Hz), 1,51–1,41 (1H, m, H-3") ppm.

^{13}C NMR: (δ) 162,8 (C-4), 150,4 (C-2), 148,7 (C-6), 98,2 (C-5), 91,8 (C-2'), 74,1 (C-1'), 61,9 (C-4"), 46,8 (C-1"), 44,6 (C-5'), 41,2 (C-3"), 31,6 (C-4'), 28,2 (C-2"), 16,8 (C-3') ppm.

5-(dekinil)-*N*-1-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]pirimidin-2,4-dion (14c)

Spoj **14c** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **14a**. Reagensi: spoj **13c** (145,0 mg; 0,27 mmol), metanol (2,6 ml) i 0,1 M NaOCH₃/CH₃OH (1,3 ml). Kolonskom kromatografijom (diklormetan : metanol = 20 : 1) izoliran je bijeli kristalinični spoj **14c** (75,5 mg; 80 %; t.t. = 132–135 °C). MS (ESI): $m/z = 351,3$ ($[M+H]^+$)

^1H NMR: (δ) 11,45 (1H, s, NH), 7,95 (1H, s, H-6), 4,40 (2H, t, OH, $J = 5,2$ Hz), 3,76–3,66 (2H, m, H-1"), 3,46–3,33 (4H, m, H-4"), 2,35 (2H, t, H-3', $J = 6,9$ Hz), 1,62–1,19 (15H, m, H-2", H-3", H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9'), 0,86 (3H, t, CH₃-10', $J = 6,7$ Hz) ppm.

^{13}C NMR: (δ) 162,8 (C-4), 150,4 (C-2), 148,4 (C-6), 98,6 (C-5), 93,5 (C-2'), 73,3 (C-1'), 62,0 (C-4"), 46,8 (C-1"), 41,2 (C-3"), 31,7 (CH₂), 29,1 (CH₂), 29,0 (CH₂), 28,8 (CH₂), 28,7 (CH₂), 28,2 (C-2"), 22,5 (CH₂), 19,3 (C-3'), 14,4 (CH₃-10') ppm.

5-(3-fenilpropinil)-N-1-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]pirimidin-2,4-dion (14d)

Spoj **14d** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **14a**. Reagensi: spoj **13d** (152,0 mg; 0,29 mmol), metanol (2,7 ml) i 0,1 M NaOCH₃/CH₃OH (1,4 ml). Kolonskom kromatografijom (etil-acetat : metanol = 10: 1, a zatim diklormetan : metanol = 20 : 1) izoliran je uljasti spoj **14d** (50 mg; 52 %).

¹H NMR: δ 11,48 (1H, s, NH), 8,05 (1H, s, H-6), 7,43–7,19 (5H, m, Ph), 4,39 (2H, t, OH, *J* = 5,2 Hz), 3,84 (2H, s, H-3'), 3,79–3,64 (2H, m, H-1''), 3,48–3,29 (4H, m, H-4''), 1,57 (2H, q, H-2'', *J* = 6,8 Hz), 1,44–1,47 (1H, m, H-3'') ppm.

¹³C NMR: (δ) 162,4 (C-4), 149,9 (C-2), 148,4 (C-6), 136,6 (Ph-1'), 128,5 (CH-Ph), 127,9 (CH-Ph), 126,6 (Ph-4'), 97,7 (C-5), 90,8 (C-2'), 74,7 (C-1'), 61,4 (C-4''), 46,4 (C-1''), 40,7 (C-3''), 27,7 (C-2''), 24,9 (C-3') ppm.

5-(3,3-dimetilbutinil)-N-1-[4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butil]pirimidin-2,4-dion (14e)

Spoj **14e** sintetiziran je prema postupku opisanom za pripravu spoja **14a**. Reagensi: spoj **13e** (100,0 mg; 0,21 mmol), metanol (1,8 ml) i 0,1 M NaOCH₃/CH₃OH (1 ml). Kolonskom kromatografijom (etil-acetat : metanol = 10: 1, a zatim diklormetan : metanol = 20 : 1) izoliran je bijeli kristalinični spoj **14e** (31 mg; 51 %; t.t. = 95–98 °C). MS (ESI): *m/z* = 295,2 ([*M*+H]⁺)

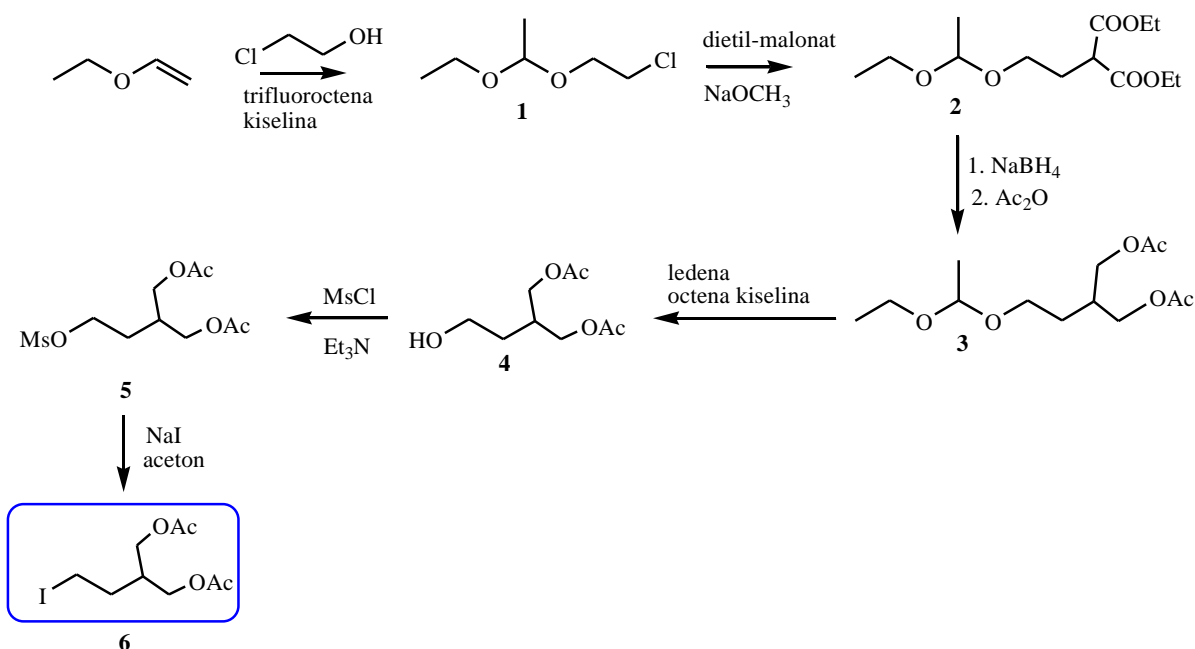
¹H NMR: (δ) 11,41 (1H, s, NH), 7,92 (1H, s, H-6), 4,39 (2H, t, OH, *J* = 5,2 Hz), 3,75–3,67 (2H, m, H-1''), 3,46–3,35 (2H, m, H-4''), 3,35–3,32 (2H, m, H-4''), 1,55 (2H, dd, *J* = 14,9 Hz, *J* = 6,8 Hz), 1,49–1,42 (1H, m, H-3''), 1,24 (9H, s, CH₃) ppm.

¹³C NMR: (δ) 162,7 (C-4), 150,4 (C-2), 148,4 (C-6), 101,2 (C-5), 98,4 (C-2'), 71,8 (C-1'), 61,9 (C-4''), 46,8 (C-1''), 41,2 (C-3''), 31,3 (CH₃), 28,2 (C-2''), 28,1 (C-3') ppm.

4.REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza

Sintetiziran je niz modificiranih nukleozida, C-5 supstituiranih heteroarilnih (**8a-b**) i alkinilnih (**14a-e**) *N*-acikličkih derivata pirimidina koristeći reakcije unakrsnog povezivanja katalizirane paladijem. U C-5 položaj pirimidina uvedeni su heteroarilni (furalni i tienilni) supstituenti te linearni alkinilni supstituenti, fenilni te razgranati izobutilni supstituent kako bi se promatrao utjecaj prirode supstituenta na antiproliferativno djelovanje novopripređenih spojeva. U položaj *N*-1 pirimidina uveden je lanac poput penciklovirnog. Lanac poput penciklovirnog sa zaštićenim hidroksilnim skupinama i jodom kao odlazećom skupinom (**6**) pripremljen je sintezom u šest stupnjeva (shema 3) [28, 29].

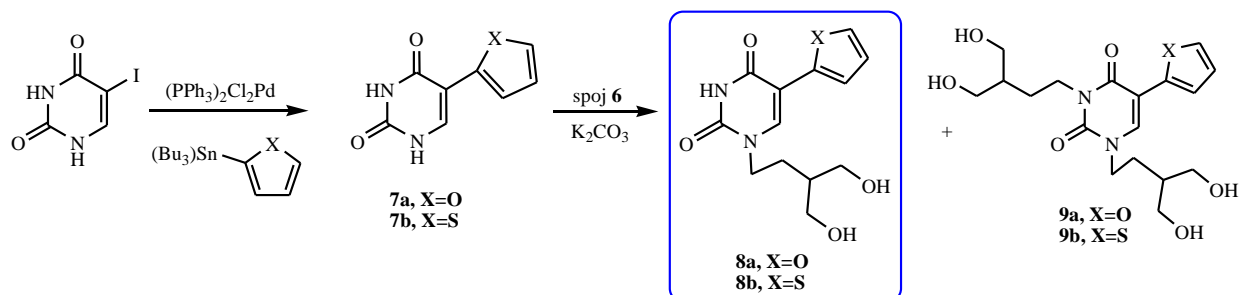


Shema 3. Sinteza derivata penciklovirnog lanca (**6**).

Spoj **1** dobiven je reakcijom 2-kloretanola i etil-vinil-etera u prisutnosti trifluoroctene kiseline kao katalizatora uz iskorištenje reakcije od 46 %. Reakcijom alkiliranja acetala **1** s natrijevim dietil-malonatom pripremljen je diester **2** uz iskorištenje od 86 %. Redukcijom esterskih skupina spoja **2** koja je provedena uz natrijev tetrahidroborat dobiven je diol u kojem su *in situ* hidroksilne skupine zaštićene acetiliranjem uz acetanhidrid pri čemu je izoliran diacetoksi-acetal **3** uz iskorištenje od 30 %. Uklanjanje 1-etoksietilne zaštitne skupine spoja **3** provedeno je u kiselim uvjetima pri čemu je nastao 4-acetoksi-3-(acetoksimetil)butanol (**4**). Mesiliranjem primarne hidroksilne skupine u spoju **4** uz metansulfonil-klorid dobiven je spoj **5** uz iskorištenje reakcije od 43 %. Jodiranjem spoja **5**

pomoću natrij-jodida sintetiziran je lanac poput penciklovirnog **6** uz iskorištenje od 31 % (shema 3.).

C-5 furilni i tienilni derivati pirimidina s lancem poput penciklovirnog u položaju *N*-1 (**11a-b**) pripremljeni su sintezom u dva stupnja (shema 4).

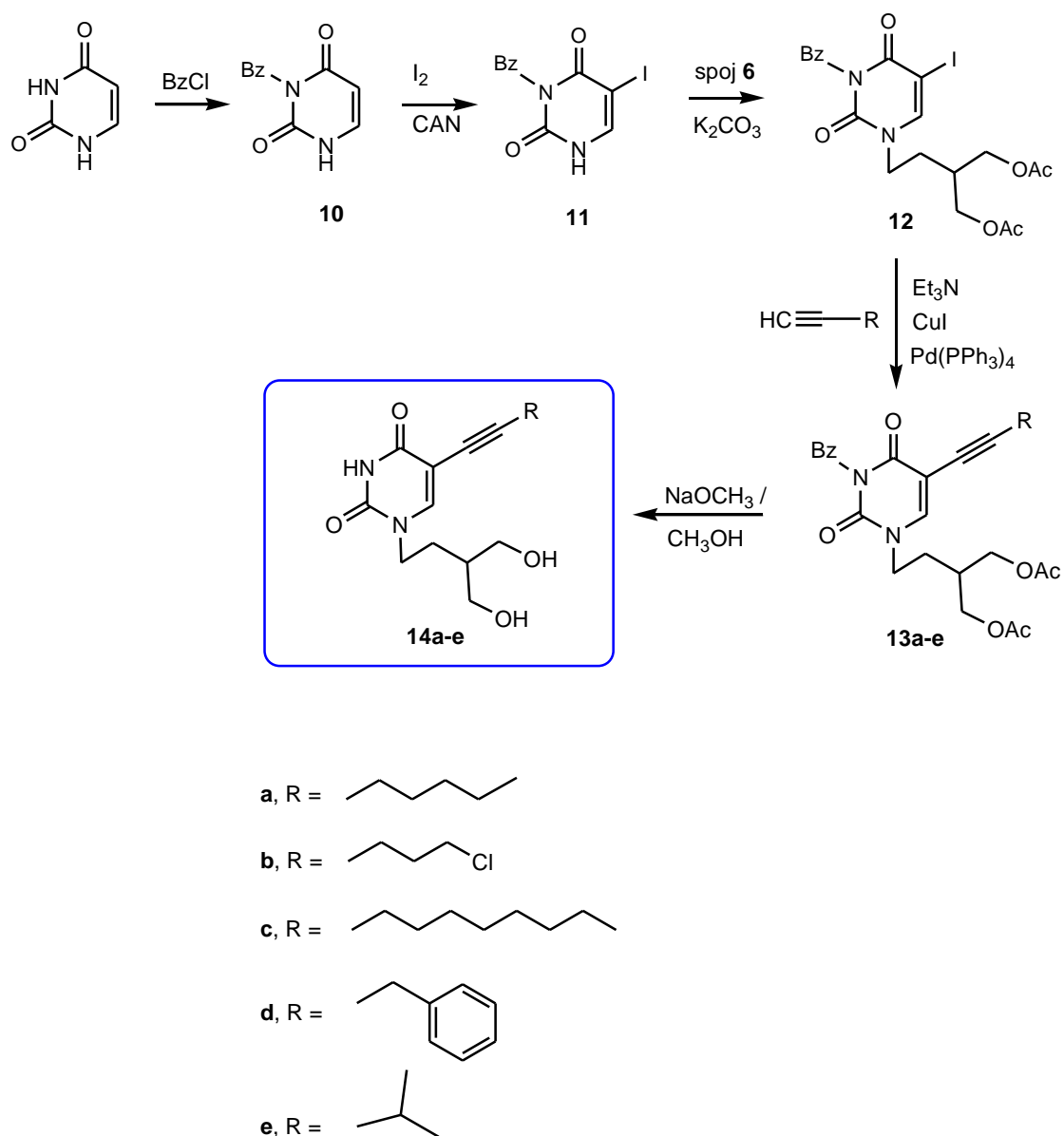


Shema 4. Sinteza *N*-acikličkih derivata pirimidina (**8a-b**).

Stille-ovom reakcijom 5-joduracila i odgovarajućeg heteroarilnogstanana uz katalizator bis(trifenilfosfin)paladijev(II) diklorid ((Ph₃P)₂PdCl₂) sintetizirani su spojevi **7a** i **7b** u iskorištenju od 62 i 26 % (shema 4.). Alkiliranjem spojeva **7a** i **7b** uz alkil-jodid **6** te kalijev karbonat kao bazu uveden je lanac u *N*-1 položaj pirimidina pri čemu su kao sporedni produkti nastali i dialkilirani derivati **9a** i **9b**. Masenom spektrometrijom potvrđen je nastanak disupstituiranog tienilnog derivata, ali u nedovoljnoj količini za potpunu spektroskopsku karakterizaciju. Zbog bazičnih uvjeta reakcije alkiliranja, u istoj reakciji je došlo do uklanjanja zaštitnih acetilnih skupina pobočnog lanca.

S obzirom na slabo iskorištenje ovog sintetskog puta, za uvođenje alkinilnih supstuenata u položaj C-5 uracila, pripremljen je 5-jod-*N*-aciklički derivat pirimidina (**12**) kao prekursor za reakcije katalizirane paladijem (shema 5).

Budući da reakcijom 5-joduracila i alkil-jodida **6** može nastati *N,N*-1,3-disupstituirani derivat, uvedena je zaštitna skupina u položaj *N*-3 uracila. Nakon reakcije benzoiliranja uracila s benzoil-kloridom (BzCl) izoliran je spoj **10** u iskorištenju od 85 % (shema 5).



Shema 5. Sinteza C-5 alkinilnih *N*-acikličkih derivata pirimidina Sonogashira-inom reakcijom.

Položaj C-5 spoja **10** je potom jodiran uz jod i amonijev cerijev(IV) nitrat (CAN) pri čemu je izoliran spoj **11** u iskorištenju od 55 %. Spoj **12** je sintetiziran alkiliranjem spoja **11** uz alkil-jodid **6** i kalijev karbonat (shema 5.). Spojevi iz serije C-5 supstituiranih alkinilnih derivata uracila pripremljeni su Sonogashira-inom reakcijom spoja **12** i odgovarajućih terminalnih alkina (shema 5.). Sonogashira-ina reakcija je provedena uz Et_3N , katalizator $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, i kokatalizator CuI . Reakcijska smjesa je nakon završetka reakcije obrađena dodatkom Amberlita IRA 400 koji na sebe veže u reakciji nastali Et_3NHI i time olakšava pročišćavanje produkta. Najveća iskorištenja dobivena su u reakciji sinteze *N*-acikličkog 3,3-

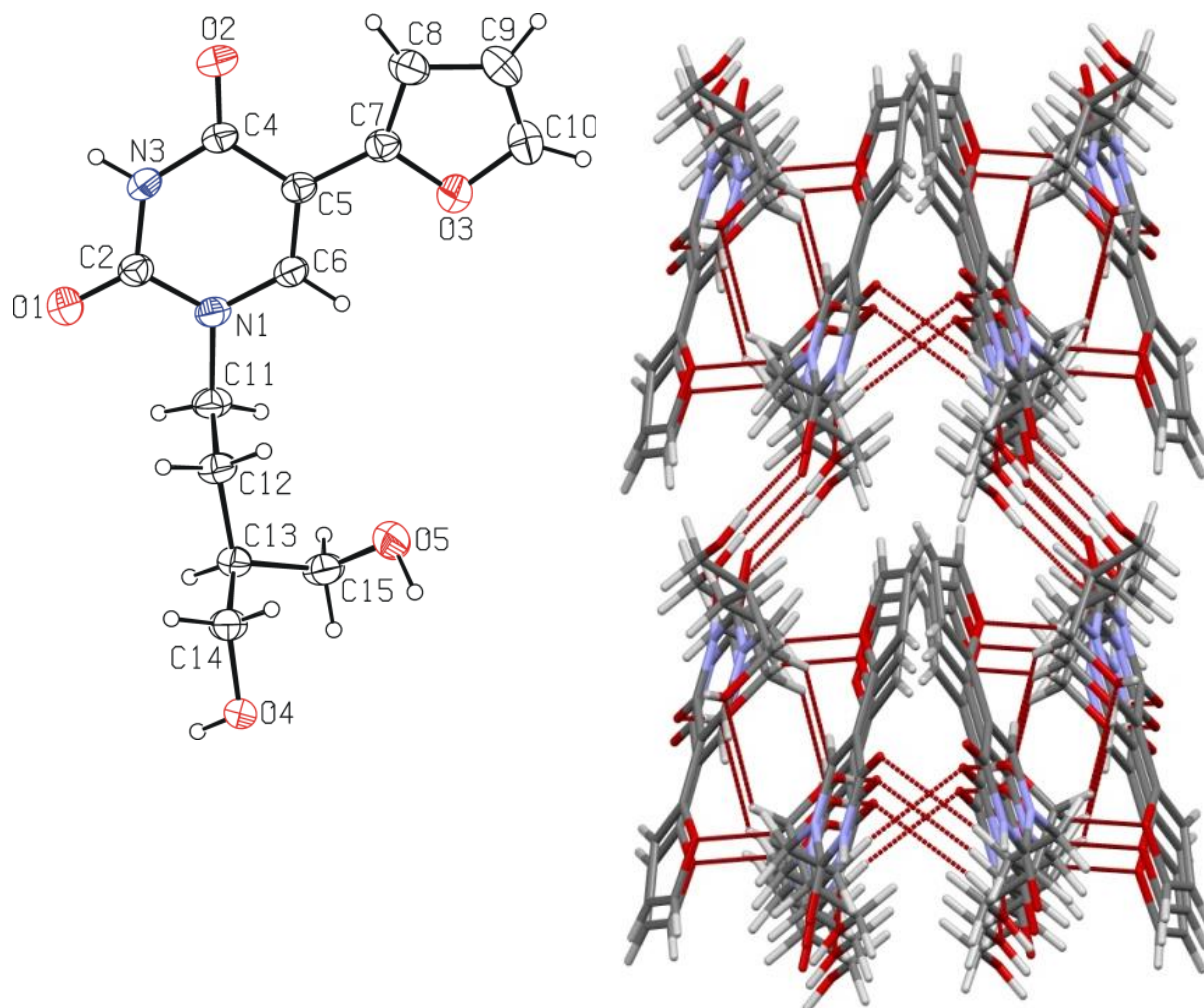
dimetilbutinilnog **13e** (83 %) i 5-heptinilnog derivata **13a** (72 %). Nasuprot tome, najniže iskorištenje je dobiveno u reakciji sinteze *N*-acikličkog 5-klorpentinil derivata pirimidina **13b** (57 %). Spojevi **13a** i **13b** dobiveni su sintezom potpomognutom mikrovalovima uz iskorištenje od 68 i 13 %. Sinteze potpomognute mikrovalovima nisu dale očekivane rezultate jer su prilikom tih sinteza nastali nuz-produkti reakcije, pa je iskorištenje tih reakcija bilo manje.

Acetilne skupine u *N*-1 pobočnom lancu i benzoilna zaštitna skupina uklonjene su u bazičnim uvjetima uz NaOCH₃ pri sobnoj temperaturi pri čemu su izolirani spojevi **14a–e**. Uklanjanje zaštitnih skupina uz 1 M NaOH, zatim provođenje reakcije pri povišenoj temperaturi ili produljenjem vremena reakcije rezultiralo je nastankom većeg broja sporednih produkata i nižim iskorištenjem reakcije.

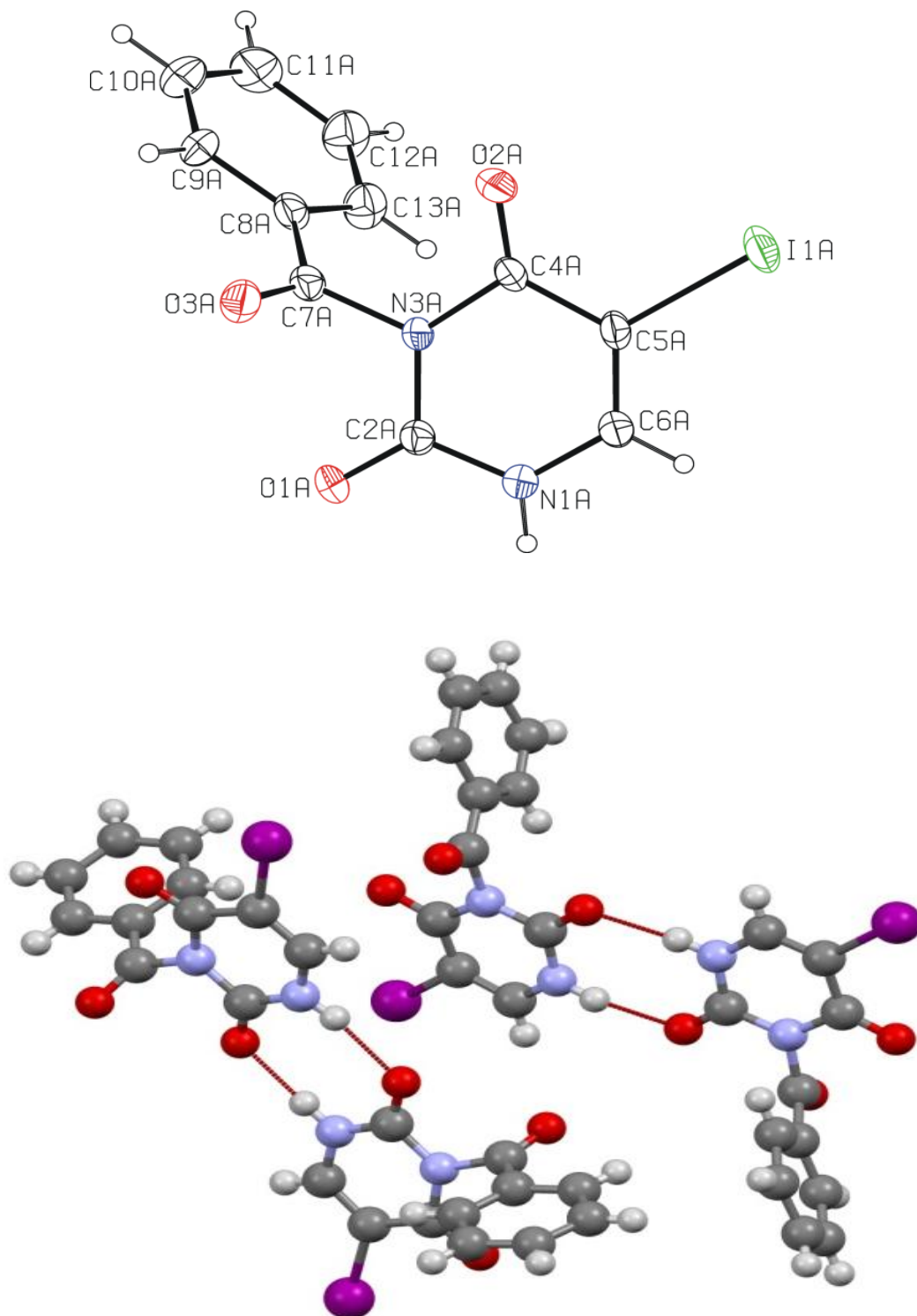
4.2. Strukturna karakterizacija novopriređenih spojeva

4.2.1 Kristalna i molekulska struktura spojeva **8a**, **11** i **14c**

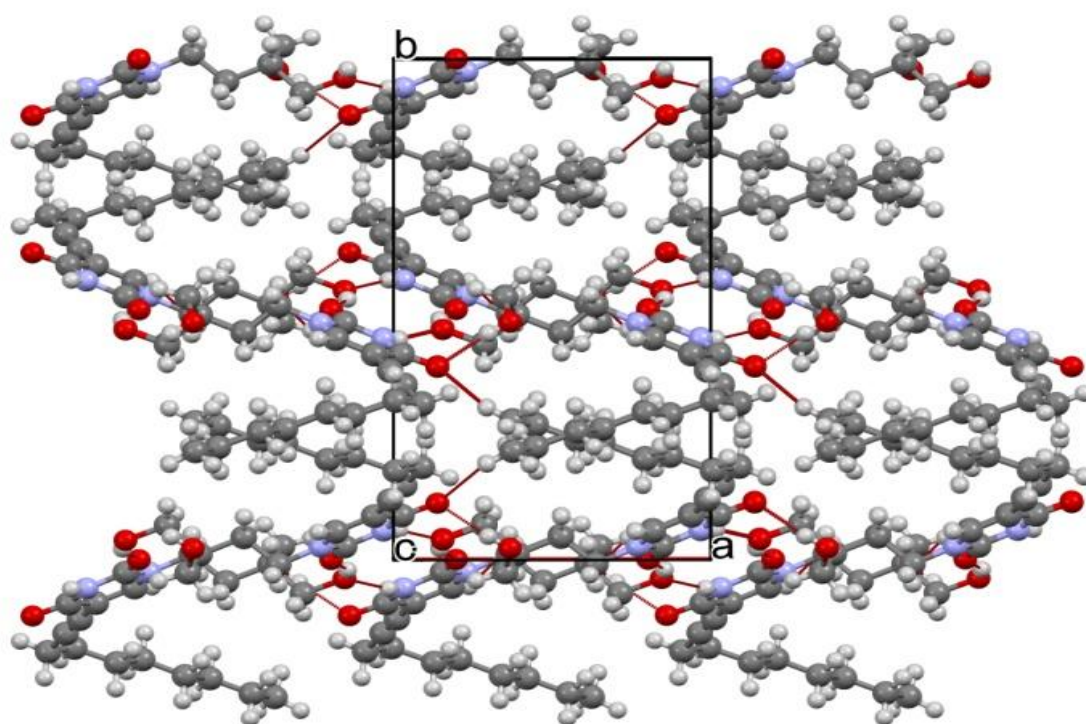
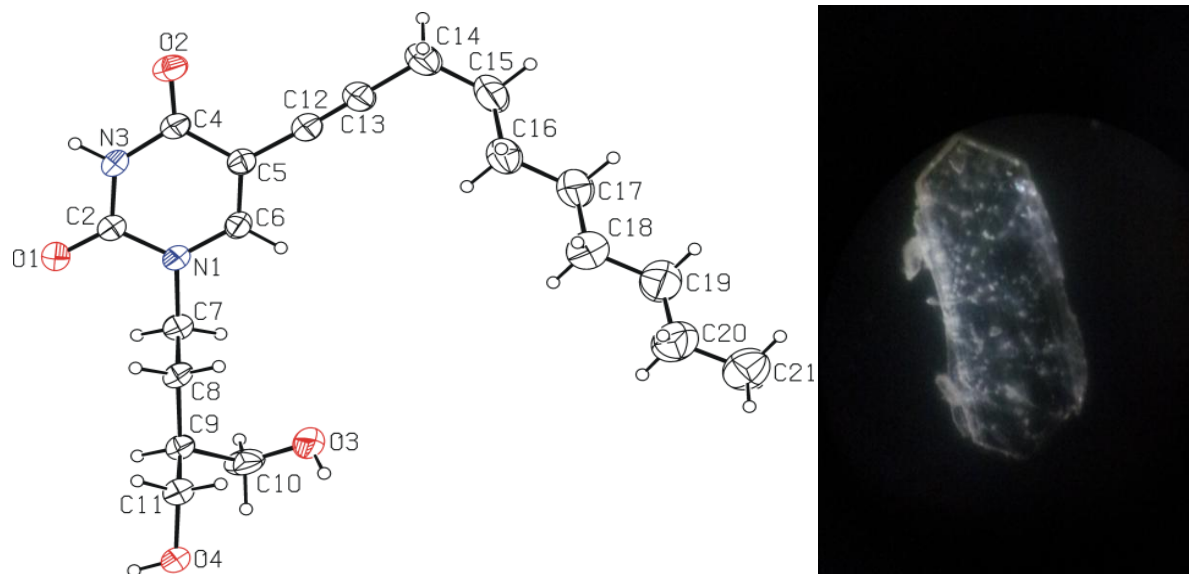
Kristalne strukture spojeva **8a**, **11** i **14c** određene su rentgenskom strukturnom analizom, a njihova molekulska struktura prikazana je na slikama 9, 10 i 11.



Slika 9. a) Molekulska struktura spoja **8a**; b) dio kristalne strukture spoja **8a**. Vodikove veze su prikazane isprekidanom linijom.



Slika 10. a) Molekulska struktura spoja **11**. Samo je jedna od dvije neovisne molekule prikazana na slici; b) dio kristalne strukture spoja **11**. Vodikove veze su prikazane isprekidanom linijom.



Slika 11. a) Molekulska struktura spoja **14c** i te fotografija monokristala spoja **14c** pod mikroskopom; b) kristalno pakiranje spoja **14c**, prikazano duž kristalografske osi *c*. Vodikove veze su prikazane isprekidanom linijom.

U spoju **8a** i **14c**, 4-hidroksi-3-(hidroksimetil)butilni lanac vezan je na atom *N*-1 pirimidinskog prstena. Ove se dvije strukture razlikuju u supstituentu na atomu C-5 pirimidinskog prstena. U spoju **8a** to je furanski prsten, dok je u spoju **14c** dekinilni lanac.

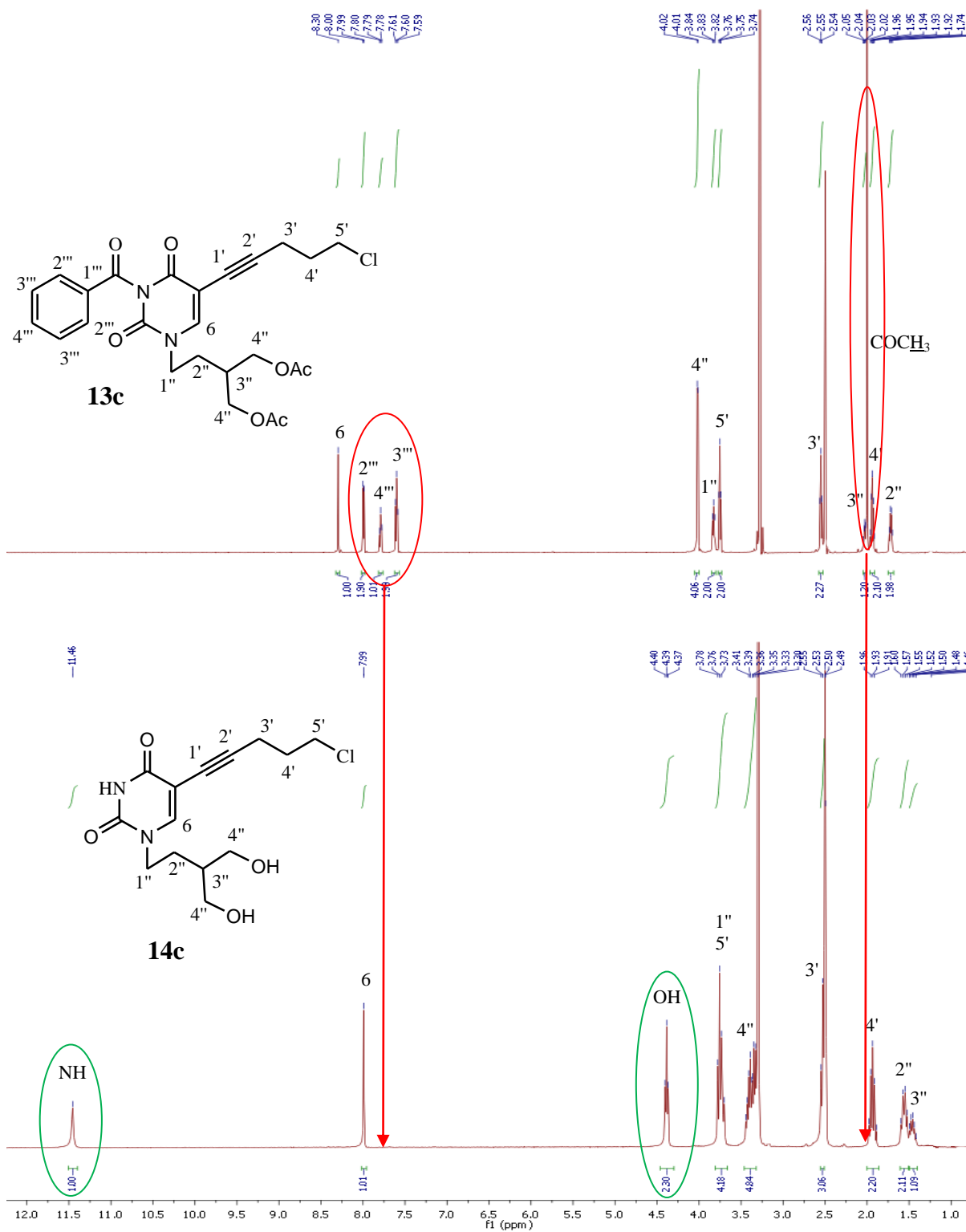
Spoj **11**, kod kojeg su benzoilna skupina i jod vezani na atome *N*-3 i C-5 pirimidinskog prstena, kristalizirao je s dvije neovisne molekule (označene s A i B) u asimetričnoj jedinici. Vezni kut C2–N3–C4 u pirimidinskom prstenu u sve tri strukture je proširen [**11a**, 127,79(14)°; **16c**, 127,3(2)°; **13**, 126,5(4) i 125,2(5)°]. Ipak, zbroj svih endocikličkih veznih kuteva u prstenu iznosi 720°, kao što se i očekuje za aromatski šesteročlani prsten [**11a**, 719,8°; **16c**, 720,0°; **13**, 719,6 i 719,9°].

U spoju **8a**, furanski i pirimidinski prsten su gotovo koplanarni jer diedarski kut između ravnina prstenova iznosi približno 6° [5,87(10)°]. S druge strane, atomi C11/C12/C13/C14 čine ravninu koja je gotovo okomita u odnosu na pirimidinski prsten, s kutem približne vrijednosti 85° [84,53(15)°]. Isto je i s atomima C7/C8/C9/C11 u strukturi spoja **14c**, gdje taj kut iznosi 89,7(2)°. Dvije hidroksimetilne skupine u strukturama spojeva **8a** i **14c** poprimaju dvije različite konformacije, *antiperiplanarnu* [C12–C13–C14–O4 = 178,15(14)° u spoju **8a**, C8–C9–C11–O4 = 176,0(2)° u spoju **14c**] i *sinklinalnu* [C12–C13–C15–O5 = 55,10(19)° u spoju **8a**, C8–C9–C10–O3 = 53,2(4)° u spoju **14c**]. Fenilni i pirimidinski prstenovi u dvije neovisne molekule strukture spoja **11** su gotovo okomiti jer vrijednosti diedarskih kuteva između ravnina iznose 73,0(3)° i 81,7(3)°.

Molekule spoja **8a** međusobno su povezane jakim N–H···O i O–H···O vodikovim vezama u vrpce, koje su povezane slabim C–H···O vodikovim vezama u trodimenzijsku mrežu (slika 9.). Zanimljivo je da se osnovna supramolekulska struktura spoja **14c** vrlo malo razlikuje (slika 11.). Jedna N–H···O i dvije O–H···O vodikove veze povezuju molekule u lance prstenova, koji su potom povezani u trodimenzijsku mrežu vodikovim vezama C–H···O tipa. U strukturi spoja **11**, dvije N–H···O vodikove veze povezuju dvije neovisne molekule u dimere (slika 12.). Dimeri su povezani slabijim C–H···O vodikovim vezama u trodimenzijsku mrežu. Tako, osnovna supramolekulska struktura je u svim strukturama drugačija, u spoju **8a** jake vodikove veze čine vrpce, u strukturi spoja **14c** lance prstenova, a strukturi spoja **11** dimere, dok je konačna supramolekulska struktura u svim strukturama trodimenzijska mreža.

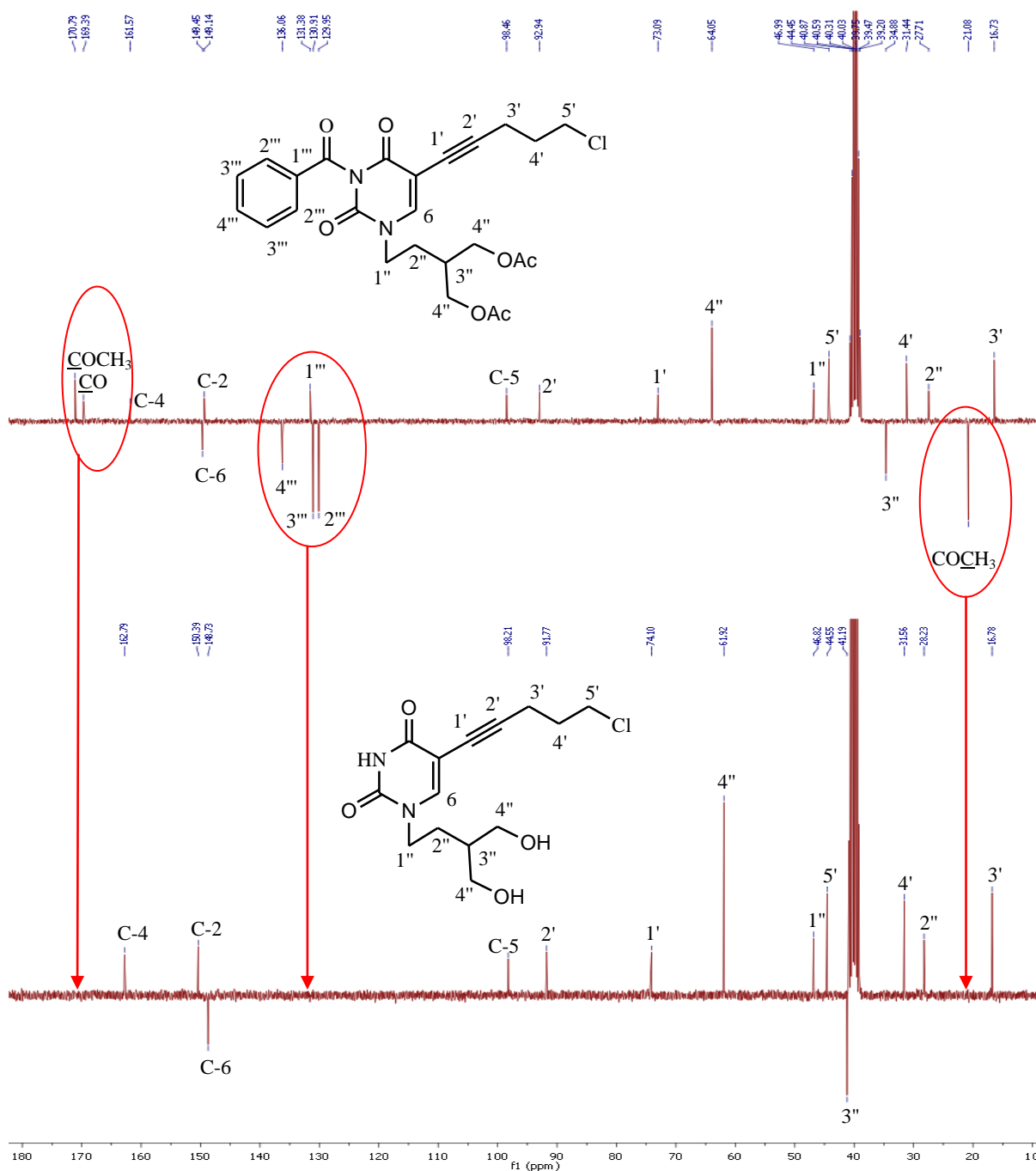
4.2.2 Spektroskopska karakterizacija

Struktura svih novopriredjenih spojeva potvrđena je spektrima ^1H i ^{13}C NMR. Na slici 12 je prikazana usporedba spektara ^1H NMR spojeva **13c** i **14c**.



Slika 12. Usporedba spektara ^1H NMR spojeva **15c** i **16c**.

Iz usporedbe spektara ^1H NMR spojeva **13c** i **14c** (slika 12) vidljivo je da su zaštitne skupine uspješno uklonjene. Signali koji odgovaraju benzoilnoj zaštitnoj skupini te acetilnim zaštitnim skupinama u pobočnom lancu označeni su elipsom crvene boje i nisu prisutni u spektru spoja **14c**. U spektru ^1H NMR spoja **14c** vidljiv je novi signal na 11,5 ppm koji odgovara NH protonu te triplet od 2 H na 4,4 ppm koji odgovara hidroksilnim skupinama *N*-1 pobočnog lanca. Nadalje, vidljiv je i pomak metilenskih protona H-4'' u viša polja (s 4 ppm u spoju **13c** na 3,4 ppm u spoju **14c**). Ostali signali odgovaraju pretpostavljenim strukturama.

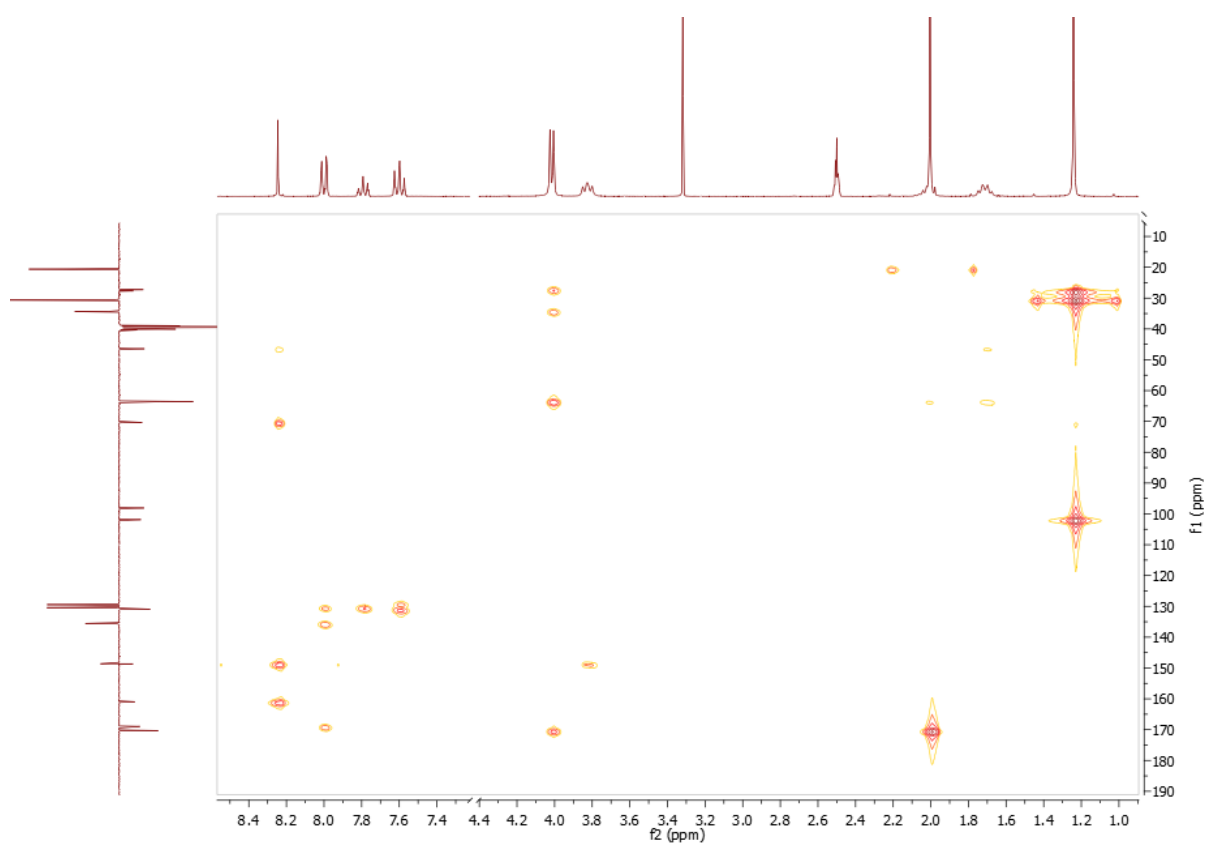


Slika 13. Usporedba spektara ^{13}C NMR spoja **15c** i **16c**.

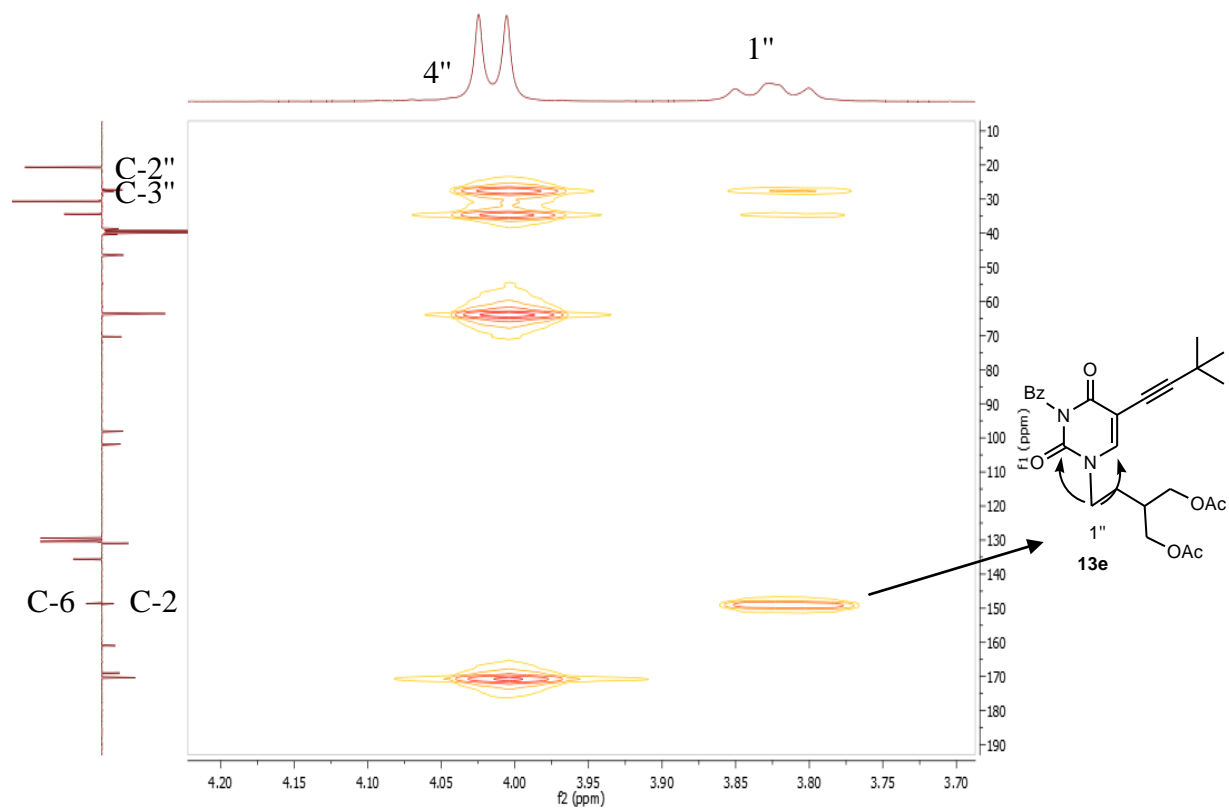
Usporedbom spektara ^{13}C NMR spojeva **13c** i **14c** (Slika 13.) također je potvrđeno da signali koji odgovaraju benzoilnoj zaštitnoj skupini te acetilnim skupinama u spektru spoja **13c** nisu prisutni u spektru spoja **14c**.

Kako bi se utvrdilo da li se benzoilna skupina nalazi na položaju *N*-3, a lanac poput penciklovirnog na položaju *N*-1 pirimidina, snimljen je spektar 2 D HMBC spoja **13e** (slika 14 a i b). Interakcije ugljikovih i vodikovih atoma odgovaraju pretpostavljenoj strukturi. Jasno su vidljive interakcije metilenskih protona H-1" s ugljikovim atomima C-2 i C-6 dok se ne vide interakcije s ugljikovim atomom C-4 što potvrđuje kako se lanac poput penciklovirnog nalazi na položaju *N*-1 pirimidina.

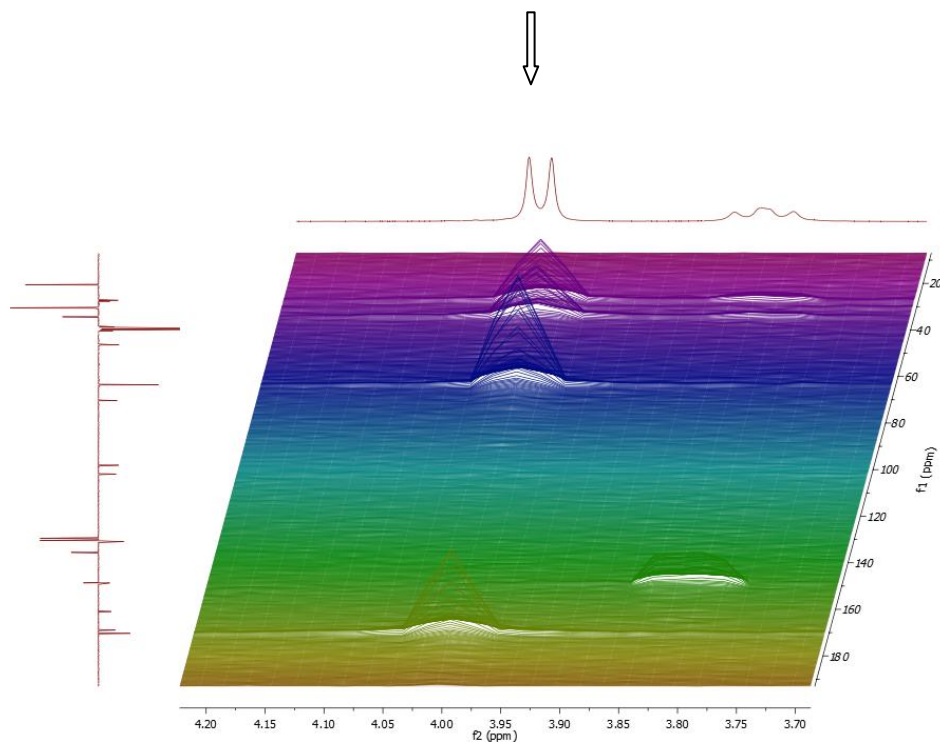
a)



b)



c)



Slika 14. a) Spektar HMBC spoja **13e**; b) dio spektra HMBC spoja **13e**; c) dio spektra HMBC spoja **13e** prikazan kao trodimenzijska slika. Ključne interakcije prikazane su strelicama.

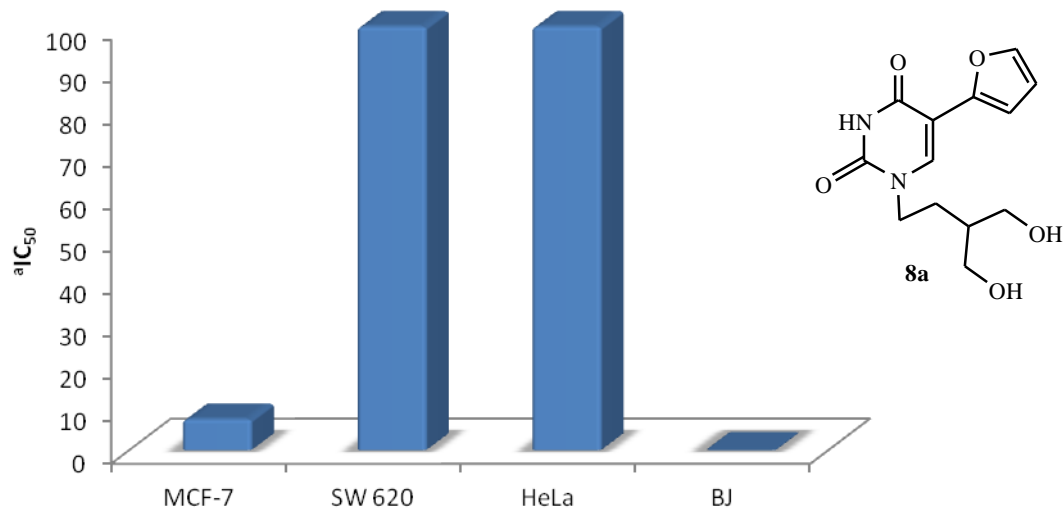
4.3. Ispitivanje antitumorskog djelovanja *in vitro* za spojeve **8a** i **12**.

Ispitano je antiproliferativno djelovanje *in vitro* spojeva **8a** i **12** na tri stanične linije zloćudnih tumora porijeklom iz čovjeka: karcinom vrata maternice (HeLa), karcinom debelog crijeva (SW 620) i karcinom dojke (MCF-7) te na normalne diploidne fibroblaste porijeklom iz čovjeka (BJ) (tablica 1). Spojevi su pokazali antiproliferativno djelovanje na odabrane stanične linije pri najvećoj testiranoj koncentraciji (100 μM). Ispitani spojevi su pokazali slabo djelovanje na stanice karcinoma vrata maternice (HeLa) te na stanice karcinoma debelog crijeva (SW 620). 5-jodpirimidinski derivat **12** i 5-furilni derivat **8a** su pokazali izraženo antiproliferativno djelovanje (1,2 i 7,3 μM) na stanice karcinoma dojke MCF-7, ali i na normalne fibroblaste porijeklom iz čovjeka (BJ). S obzirom da su spojevi **12** i **8a** pokazali selektivno antiproliferativno djelovanje, ali istovremeno i toksičnost na normalne ljudske fibroblaste, odabrani su za daljnje optimiranje strukture. U tijeku je testiranje ostalih spojeva ove serije spojeva iz kojeg će se zaključiti kako supstituent na položaju C-5 pirimidina utječe na antiproliferativno djelovanje.

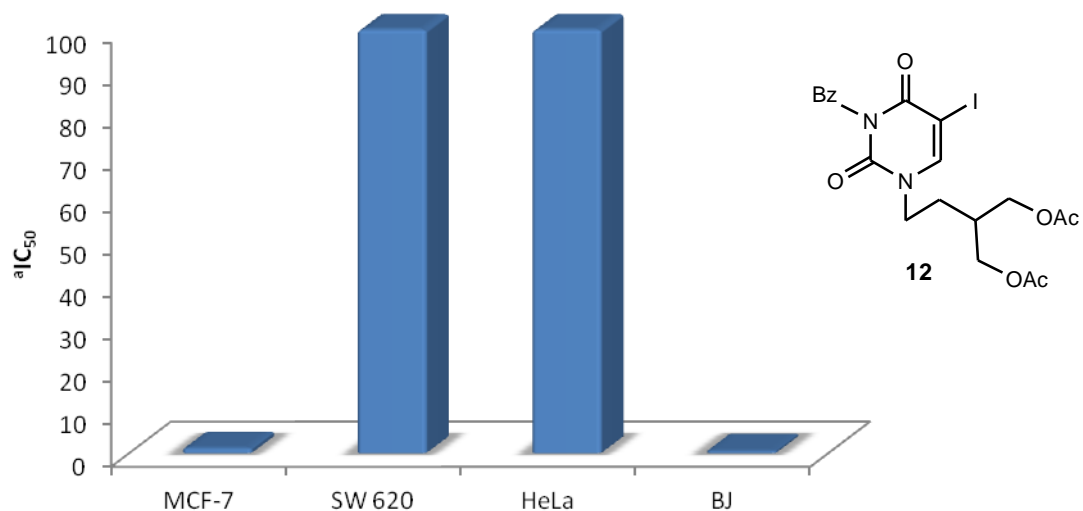
Tablica 1. Vrijednosti za IC_{50} (μM) ispitivanih spojeva na odabrane stanične linije.

spojevi	$\text{IC}_{50}^{\text{a}}$ (μM)			
	stanične linije			
	MCF-7	SW 620	HeLa	BJ
8a	7,3	>100	>100	>0,1
12	1,2	>100	>100	0,6

^a IC_{50} ; koncentracija spoja koja inhibira rast stanica za 50 %



Slika 15. Antiproliferativno djelovanje *in vitro* spoja **8a** na stanične linije zloćudnih tumora porijeklom iz čovjeka te na normalne diploidne fibroblaste porijeklom iz čovjeka



Slika 16. Antiproliferativno djelovanje *in vitro* spoja **12** na stanične linije zloćudnih tumora porijeklom iz čovjeka te na normalne diploidne fibroblaste porijeklom iz čovjeka

5. ZAKLJUČAK

Opisana je sinteza novih, C-5 heteroarilnih i alkinilnih *N*-acikličkih pirimidinskih nukleozidnih analoga.

Višestupnjevitom sintezom, polazeći od 2-kloretanola i etil-vinil-etera pripremljen je lanac nalik penciklovirnom **6** koji je poslužio kao alkilirajući agens za *N*-1 alkiliranje. C-5 supstituirani derivati pirimidina pripremljeni su Stille-ovom i Sonogashira-inom reakcijom.

Stille-ovom reakcijom 5-joduracila i odgovarajućeg heteroarilnog stanana uz katalizator bis(trifenilfosfin)paladijev(II) diklorid ((Ph₃P)₂PdCl₂) sintetizirani su spojevi **7a** i **7b** koji su potom reakcijom alkiliranja i deprotekcije dali ciljane C-5 supstituirane heteroarilne *N*-acikličke pirimidine (**8a-b**).

Spojevi iz serije C-5 supstituiranih alkinilnih derivata uracila (**14a-e**) pripremljeni su Sonogashira-inom reakcijom spoja **12** uz Et₃N, katalizator Pd(PPh₃)₄, i kokatalizator CuI te odgovarajućih terminalnih alkina.

Strukture svih sintetiziranih spojeva su potvrđene spektroskopskim metodama ¹H- i ¹³C-NMR, te spektrometrijom masa.

Određena je kristalna struktura spojevima **8a**, **11** i **14c**. Atomi dihidroxiizobutilnog lanca spojeva **8a** i **14c** čine ravninu koja je gotovo okomita u odnosu na pirimidinski prsten, a furilni i alkinilni supstituent su gotovo koplanarni s pirimidinskim prstenom.

N-aciklički pirimidinski derivat s 5-furilnim supstituentom **8a** i 5-jod *N*-aciklički derivat **12** pokazali su izraženo antiproliferativno djelovanje (7,3 i 1,2 μM) na karcinom dojke (MCF-7) te na normalne fibroblaste porijeklom iz čovjeka (BJ) te su odabrani kao predvodni spojevi za daljnje optimiranje strukture. U tijeku je testiranje ostalih novopripremljenih spojeva.

6. ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem mentorici red. prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić, na povjerenju i pruženoj prilici da izradim ovaj rad te steknem nova i korisna znanja. Također jedno veliko hvala na podršci, strpljenju, svesrdnoj pomoći i nebrojenim korisnim savjetima prilikom izrade ovoga rada.

Posebno se želim zahvaliti dr. sc. Andrijani Meščić, na njezinom velikom doprinosu, osobito u području rada u laboratoriju, predanosti u ispravljanju ovog rada u svim etapama njegovog nastanka te na ljudskoj i stručnoj potpori, strpljenju i brojnim korisnim raspravama bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Mariu Cetina, na rentgenskoj strukturnoj analizi.

Zahvaljujem se svim članovima Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na ugodnoj atmosferi, koja je uljepšala moj boravak pri izradi eksperimentalnog dijela.

Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji koja me tokom čitavog mog školovanja podupirala i poticala moju težnju k ostvarivanju sve viših i viših ciljeva.

7.LITERATURA

1. Mintas, M.; Raić-Malić, S.; Raos, N. *Načela dizajniranja lijekova*, Hinus, 2000.
2. Avendano, C.; Menendez, J.C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier, Amsterdam, 2008.
3. Blasberg, R. *Eur. J. Cancer* **38** (2002) 2137–46.
4. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, fourth ed., Garland Science, New York, 2002.
5. Von Angerer, S., *Science of Synthesis*, Georg Thieme Verlag KG, 2004., 379–80.
6. Mishra, R.; Tomar, I. *IJPSSDR*, **2** (2011) 758–62.
7. Futterman, S. *J. Biol. Chem.*, **228** (1957) 1031–35.
8. Solomons, T.W.G.; Fryhle, C.B. *Organic chemistry*, 9th edition, John Wiley & Sons, 2008.
9. Mintas, M.; Raić-Malić, S. *Medicinska kemija*, Medicinska naklada, 2009.
10. Blewett, S.; McGuigan, C.; Barucki, H.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini J. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **20** (2001) 1063–69.
11. De Clercq, E. *Am. J. Clin. Viro.*, **30** (2004) 115–121.
12. De Clercq, E. *Antiviral Res.*, **67** (2005) 56–75.
13. Balzarini, J.; McGuigan, J. *Biochemica et Biophysica*, **158** (2002) 287–91.
14. De Clercq, E.; Field, H.J. *Brit. J. Pharmacol.* **147** (2006) 1–11.
15. Lazrek, H.B. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **20** (2001) 1949–55.
16. Raić-Malić, S.; Mintas, M. *Kem. Ind.*, **48** (1999) 297–304.
17. De Clercq, E.; Holý, A. *J. Med. Chem.* **22** (1979) 510–3.
18. Agrofoglio, L.A.; Gillaizeau, I.; Saito, Y. *Chem. Rev.* **203** (2003) 1875–916.
19. Domini, C.E.; Silbestri, G.F.; Band, B.F.; Chopa, A.B. *Ultrason. Sonochem.* **19** (2012) 410–4.
20. Crich, D.; Sun, S. *J. Org. Chem.* **61** (1996) 7200–1.
21. Renaud, P.; Lacote, E.; Quaranta, L. *Tetrahedron Lett.* **39** (1998) 2131–2.
22. Leibner, J.E.; Jacobus, J. *J. Org. Chem.* **44** (1979) 449–50.
23. Crawforth, C.M.; Burling, S.; Fairlamb, I.J.S.; Kapdi, A.R.; Taylor, R.J.K.; Whitwood, A.C. *Tetrahedron* **61** (2005) 9736–51.
24. Dachs, U. G.; Hunt, A. M.; Sydall, S.; Singleton, D.; Patterson, A. *Molecules*, **14** (2009) 4517–45.
25. Chinchilla, R.; Nájera, C. *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 5084–121.
26. Samantaray, M.K.; Shaikh, M.M.; Ghosh, P. *J. Organomet. Chem.* **694** (2009) 3477–86.
27. Agrofoglio, L.A. et al., *Chem. Rev.*, **103** (2003) 1875–81.

28. Brand, B.; Reese, C. B.; Song, Q.; Visinti, C. *Tetrahedon* **55** (1999) 5239–52.
29. Geen, G. R.; Grinter, T. J.; Kinsey, P. M.; Jarvest, R. L. *Tetrahedon* **46** (1990) 6903–14.

8.SAŽETAK

Danijel Glavač

SINTEZA, KRISTALOGRAFSKA ANALIZA I CITOSTATSKA DJELOVANJA C-5 HETEROARILNIH I ALKINILNIH *N*-ACIKLIČKIH PIRIMIDINSKIH NUKLEOZIDNIH ANALOGA

Strukturni analozi prirodnih nukleozida u kojima je purinski, pirimidinski ili šećerni prsten zamijenjen strukturno srodnom heterocikličkom bazom ili acikličkim lancem imaju izraženu citostatsku i antivirusnu aktivnost. Istraživanje je usmjereno na sintezu novih pirimidinskih analoga, koji svojom strukturom oponašaju prirodne spojeve, pirimidinske nukleozide. Derivati pirimidina s heteroarilnim supstituentom u položaju C-5 pirimidina **8a-b** pripremljeni su Stille-ovom reakcijom povezivanja organokositrovih intermedijara s nezasićenim organskim elektrofilima pomoću paladijevog katalizatora. C-5 alkinilni derivati pirimidina **14a-e** priređeni su Sonogashira-inom reakcijom acikličkog 5-joduracilnog derivata s odgovarajućim terminalnim alkinima pomoću paladijevog(0) katalizatora, bakrovog (I) jodida (CuI) i baze, tercijarnog amina. Novopriređeni spojevi su okarakterizirani spektroskopskim metodama ^1H i ^{13}C NMR, te masenom spektrometrijom. Rentgenskom strukturnom analizom određena je kristalna i molekulska struktura spojeva **8a**, **11** i **14c**. *N*-aciklički pirimidinski derivat s 5-furilnim supstituentom **8a** i 5-jod *N*-aciklički derivat **12** pokazali su snažno i selektivno antiproliferativno djelovanje na karcinom dojke (MCF-7) te na normalne fibroblaste porijeklom iz čovjeka (BJ).

9.SUMMARY

Danijel Glavač

**SYNTHESIS , CRYSTALLOGRAPHIC ANALYSIS AND CYTOSTATIC
ACTIVITY OF C-5 ALKYNYL AND HETEROARYL *N* - ACYCLIC
PYRIMIDINE NUCLEOSIDE ANALOGUES**

Structural analogs of natural nucleosides in which a purine, pyrimidine or sugar ring is replaced by structurally related heterocyclic base or an acyclic side chain have pronounced cytostatic and antiviral activities. The study is focused on the synthesis of the novel pyrimidine analogues that mimic the structure of natural pyrimidine nucleosides. Pyrimidine derivatives with a heteroaryl substituent at C-5 of pyrimidine moiety **8a-b** were prepared using palladium catalysed Stille coupling reaction of the corresponding organostannane and unsaturated organic electrophile. C-5 alkynyl pyrimidine derivatives **14a-e** were prepared *via* Sonogashira coupling of the *N*-acyclic 5-iodouracil derivative with suitable terminal alkynes in the presence of palladium (0) catalyst, copper (I) iodide (CuI) and tertiary amine as a base. Novel compounds were characterized by ^1H and ^{13}C NMR as well as mass spectrometry. X-ray crystal structure analysis and molecular structure of compounds **8a**, **11** and **14c** were also determined. *N*-acyclic pyrimidine derivatives with a furyl **8a** and iodo substituent **12** at C-5 position of pyrimidine ring have shown significant and selective antiproliferative effect on breast cancer carcinoma cells (MCF-7) and normal human fibroblast (BJ).

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zagrebu 17. ožujka 1990. godine. Osnovnu školu završio sam u Zagrebu, a potom sam upisao i završio Prirodoslovnu školu Vladmira Preloga smjer Kemijski tehničar. U četvrtom razredu sam sudjelovao na državnom natjecanju iz kemije u kategoriji samostalni rad na kojem sam osvojio četvrto mjesto. Nakon što sam maturirao s odličnim uspjehom, 2008. godine upisao sam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija. Godine 2013. upisao sam diplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer – primijenjena organska kemija. Od 2012. godine bavim se organskom sintezom na Zavodu za organsku kemiju u laboratoriju prof. dr. sc. Silvane Raić-Malić. Autor sam na jednom znanstvenom radu te dva posterska priopćenja.

Popis znanstvenih radova:

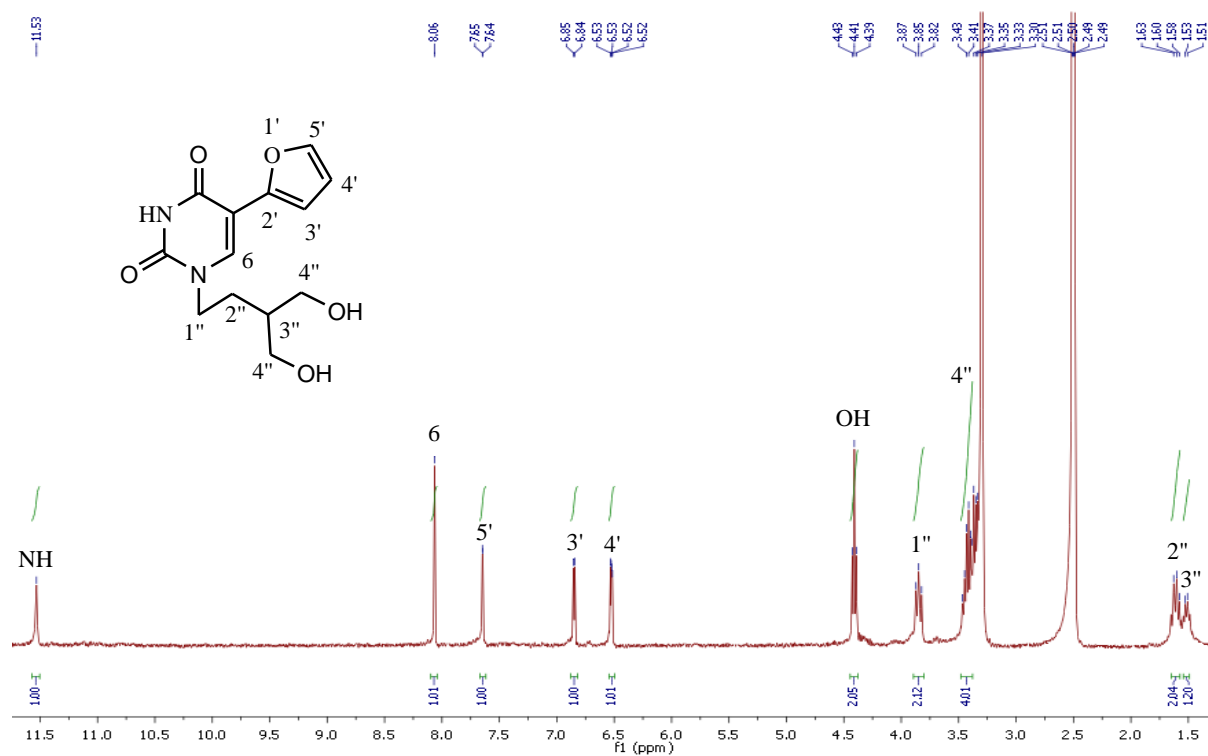
1. A. Meščić, D. Glavač, A. Osmanović, D. Završnik, M. Cetina, D. Makuc, J. Plavec, S. M. Ametamey, S. Raić-Malić, *N-alkylated and O-alkylated Regioisomers of 5-(Hydroxyalkyl)pyrimidines: Synthesis, Structural and Conformational Study*, J. Mol. Struct. **1039** (2013) 160–6.

Popis posterskih priopćenja:

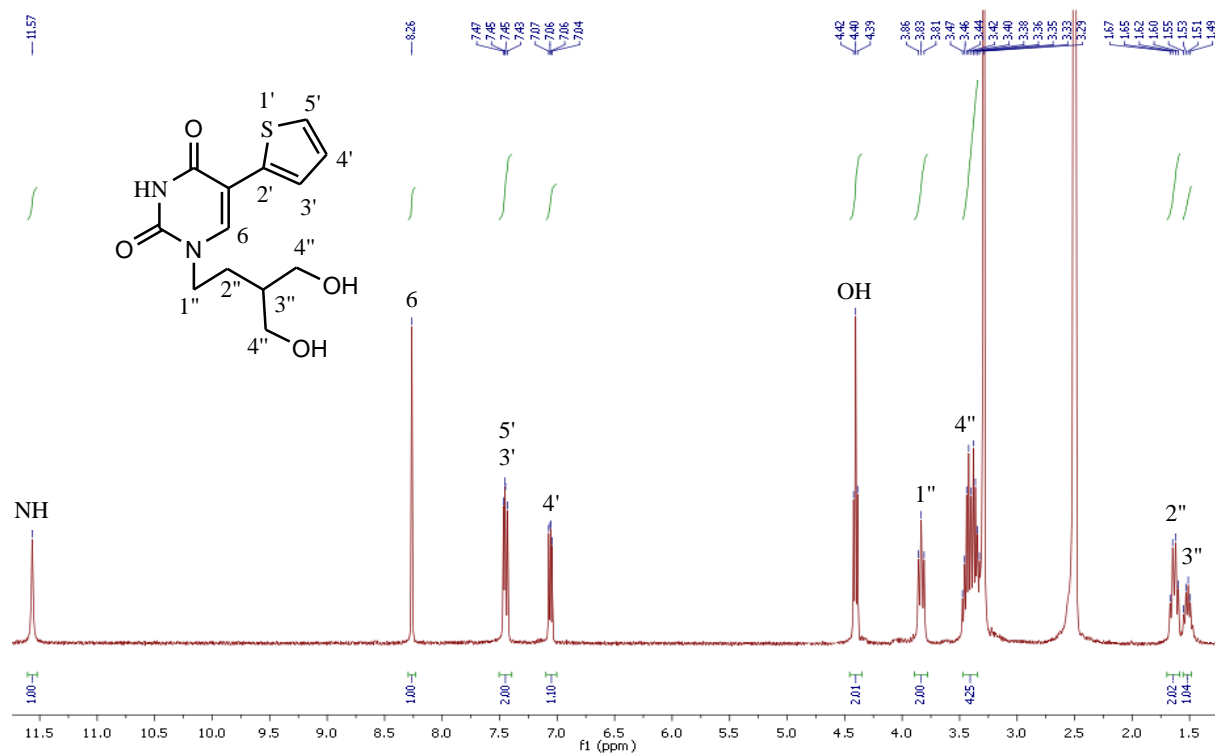
1. Glavač, Danijel; Meščić, Andrijana; Raić-Malić, Silvana; *Sinteza C-5 supstituiranih N-dihidroksiizobutilnih derivata pirimidina reakcijama kataliziranim paladijem*, X. Susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, RH, **2014** (poster, sažetak).
2. Meščić, Andrijana; Glavač, Danijel; Raić-Malić, Silvana; *Sinteza i biološka ispitivanja C-5 supstituiranih N-dihidroksiizobutilnih derivata pirimidina*, IX. susret mladih kemijskih inženjera "Nove tehnologije i transfer znanja", Zagreb, RH, **2012** (poster, sažetak).

11.PRILOZI

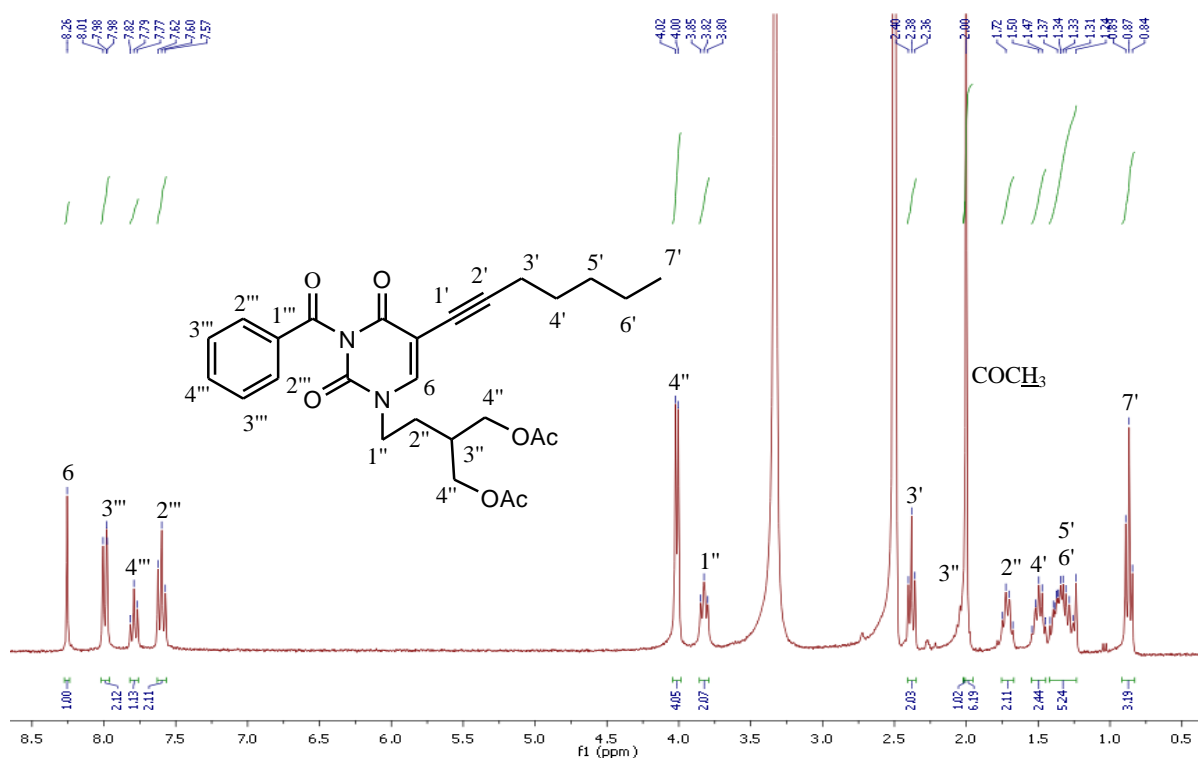
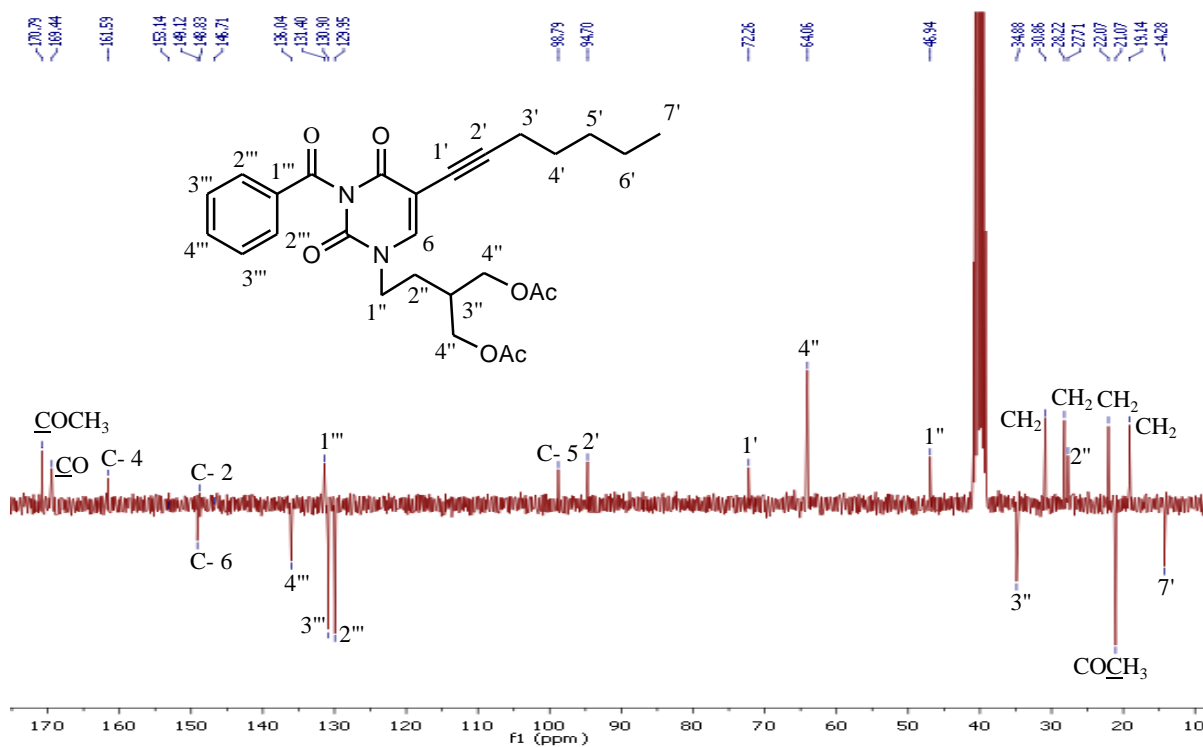
Slika P1.

a) Spektar ^1H NMR spoja **8a**;

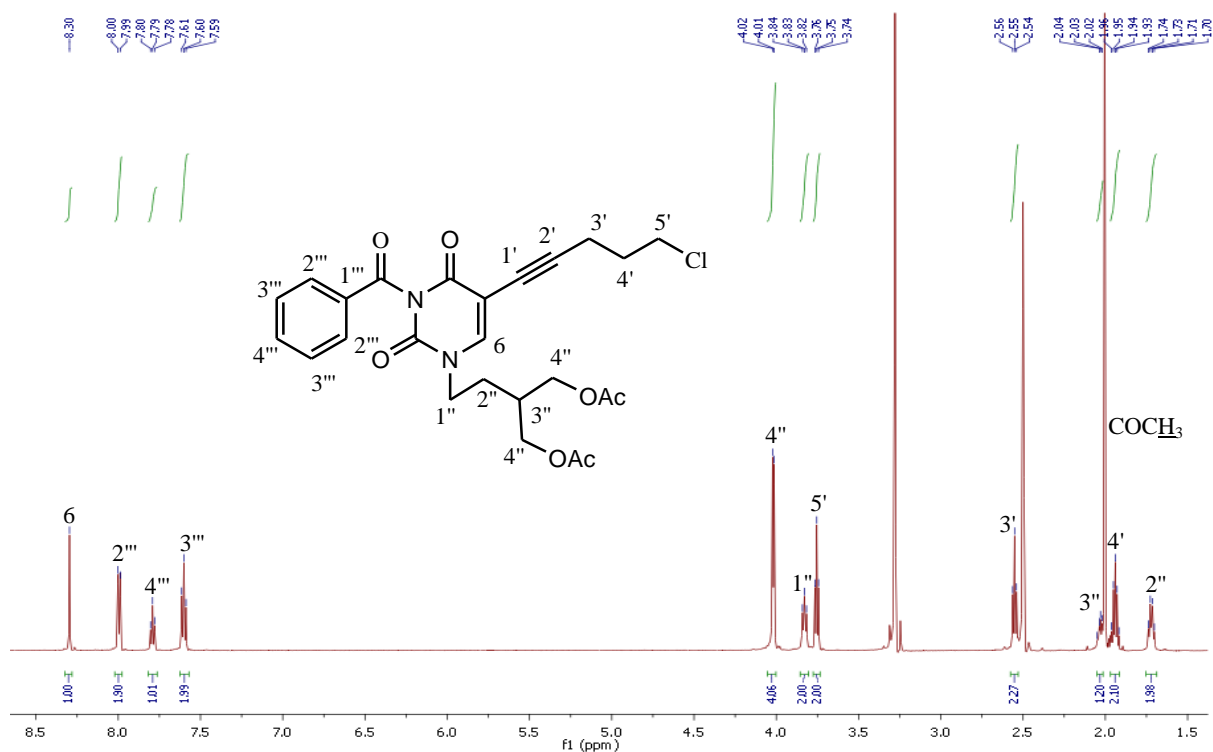
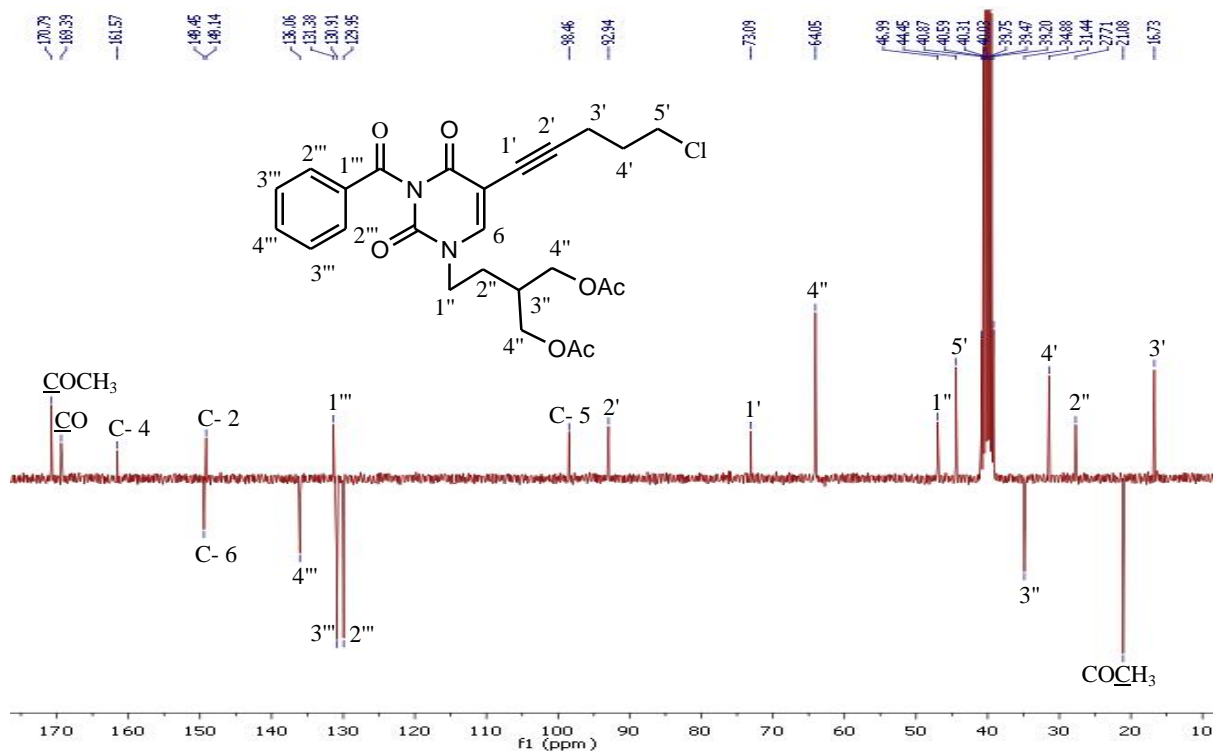
SlikaP2.

a) Spektar ^1H NMR spoja **8b**;

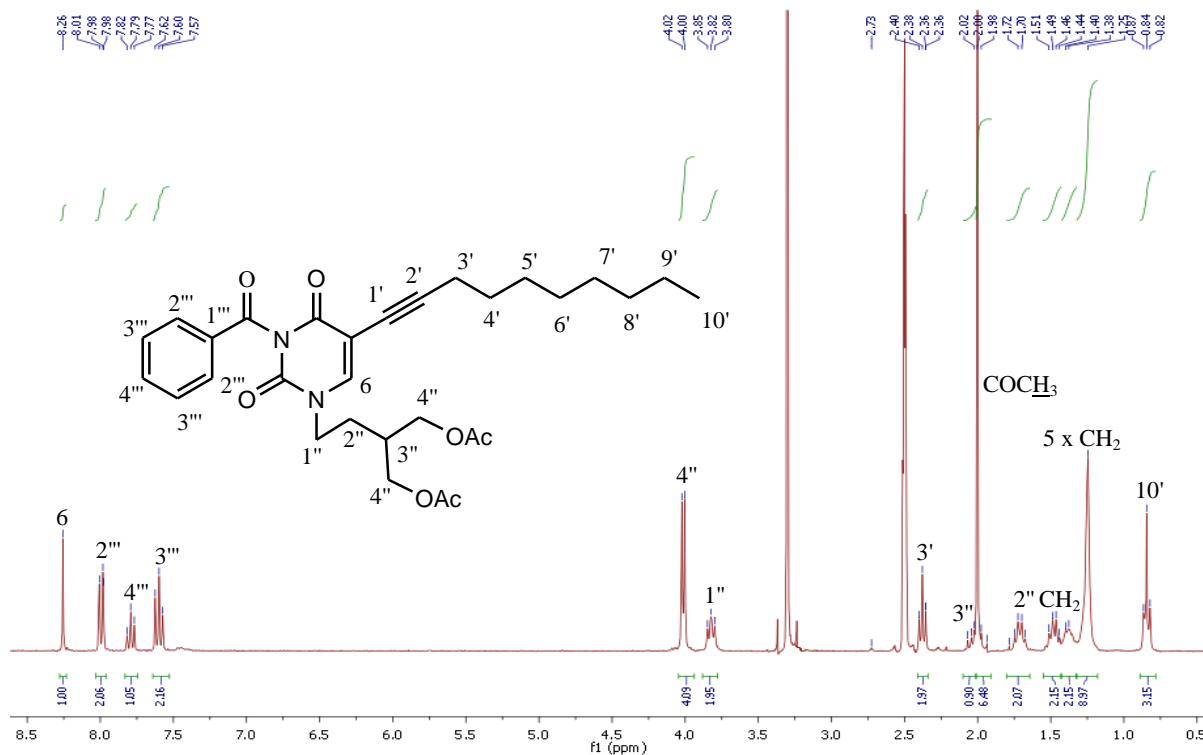
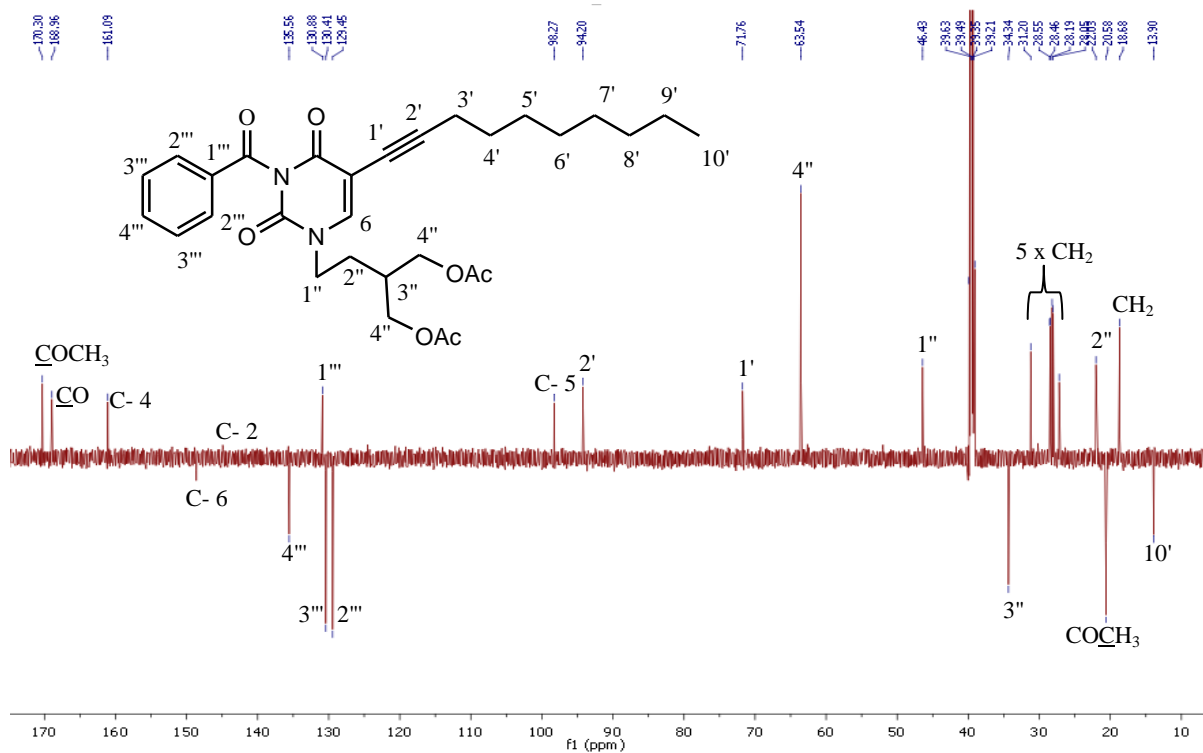
Slika P3.

a) Spektar ^1H NMR spoja **13a**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **13a**;

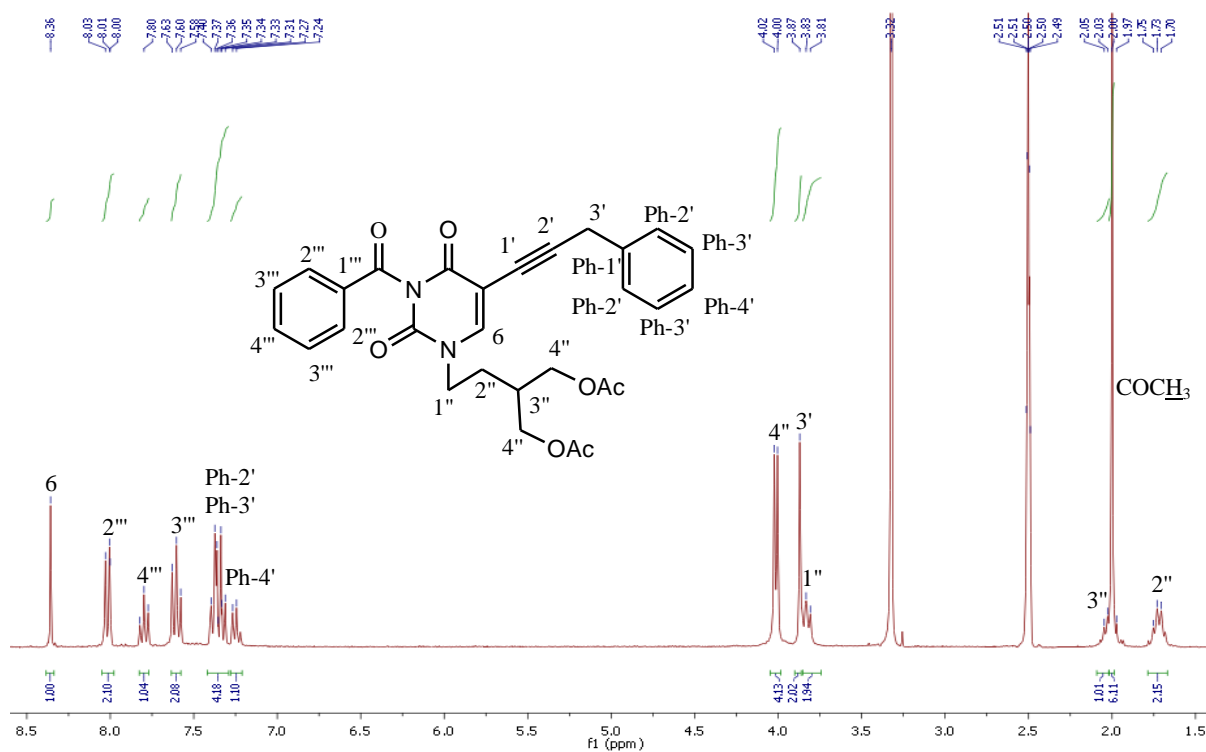
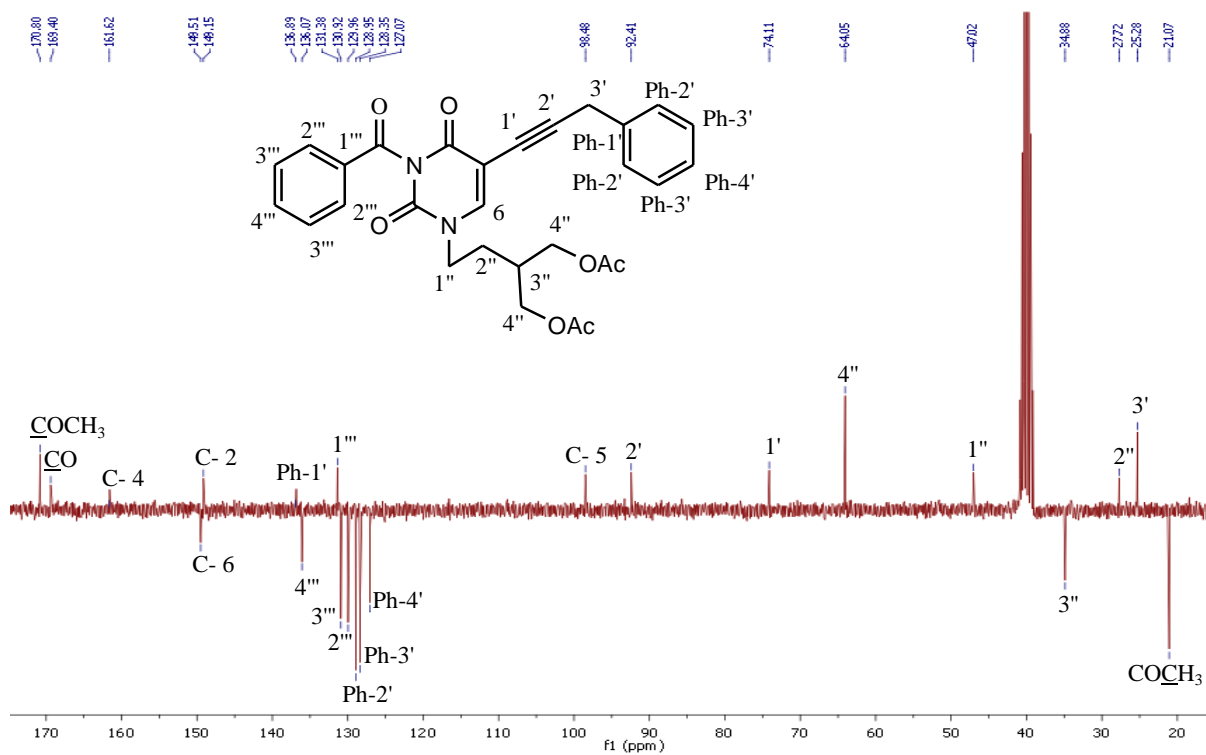
Slika P4.

a) Spektar ^1H NMR spoja **13b**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **13b**;

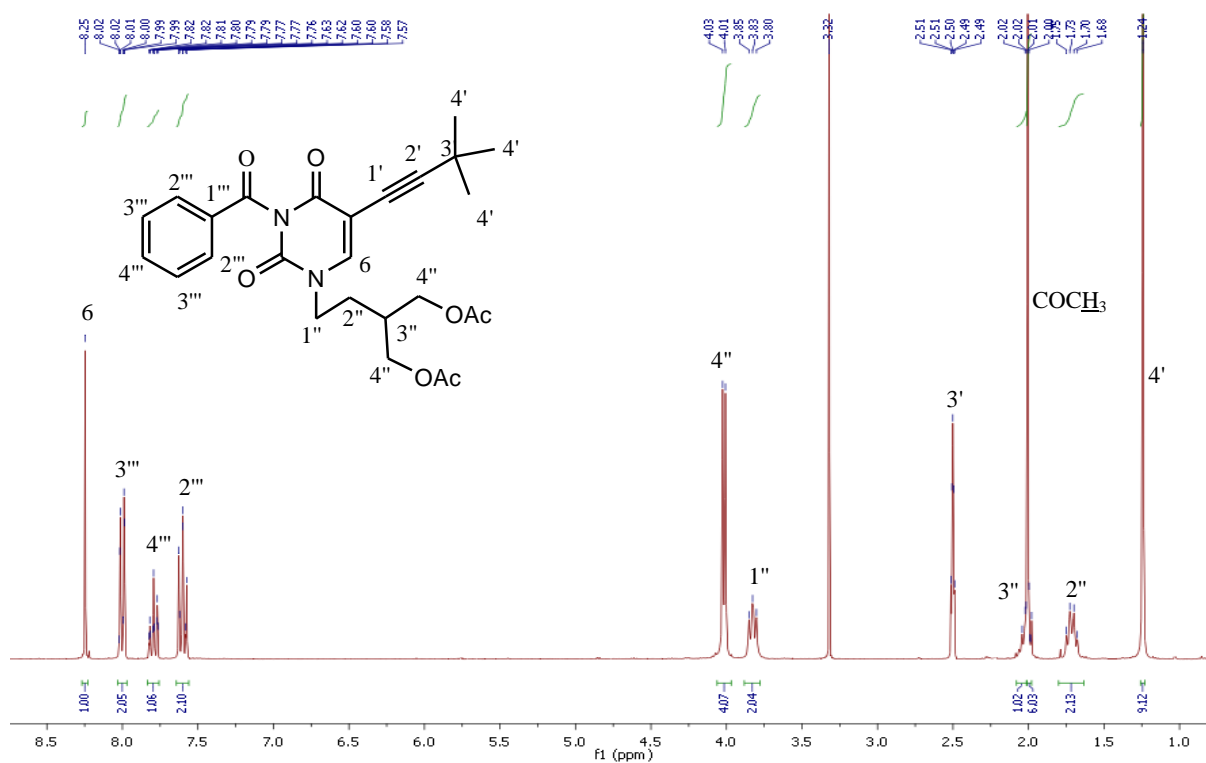
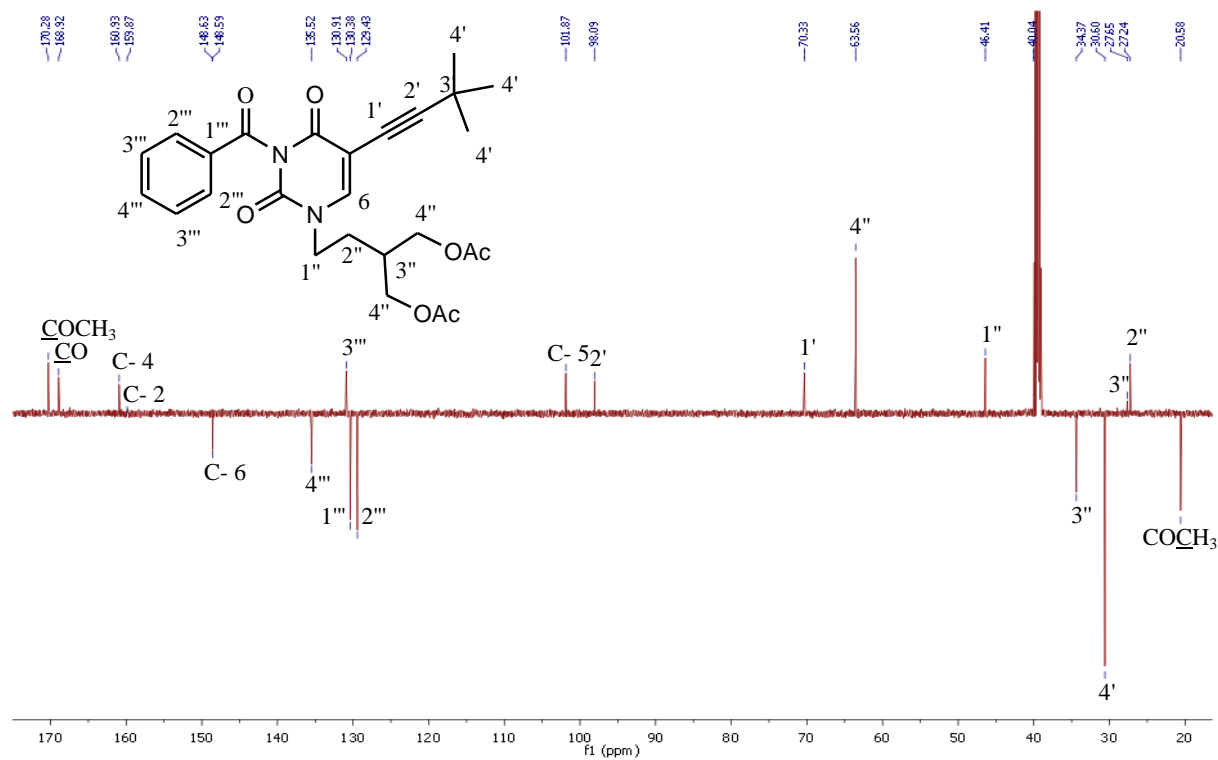
Slika P5.

a) Spektar ^1H NMR spoja **13c**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **13c**;

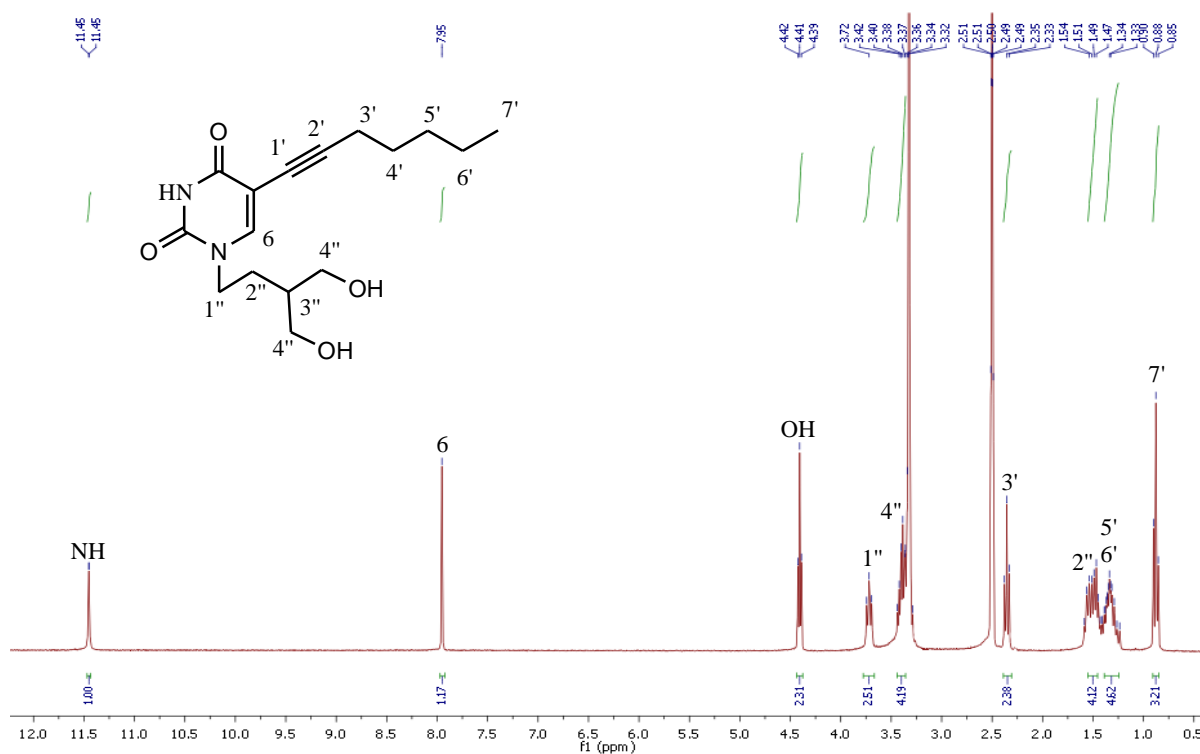
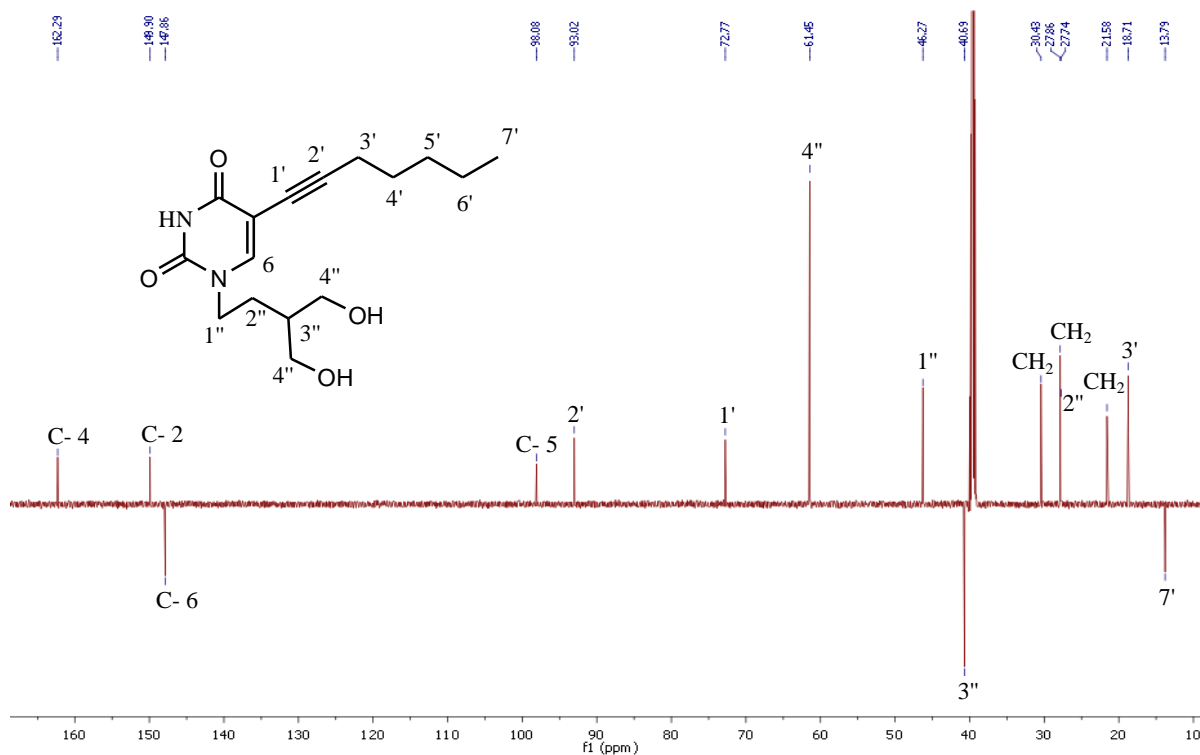
Slika P6.

a) Spektar ^1H NMR spoja **13d**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **13d**;

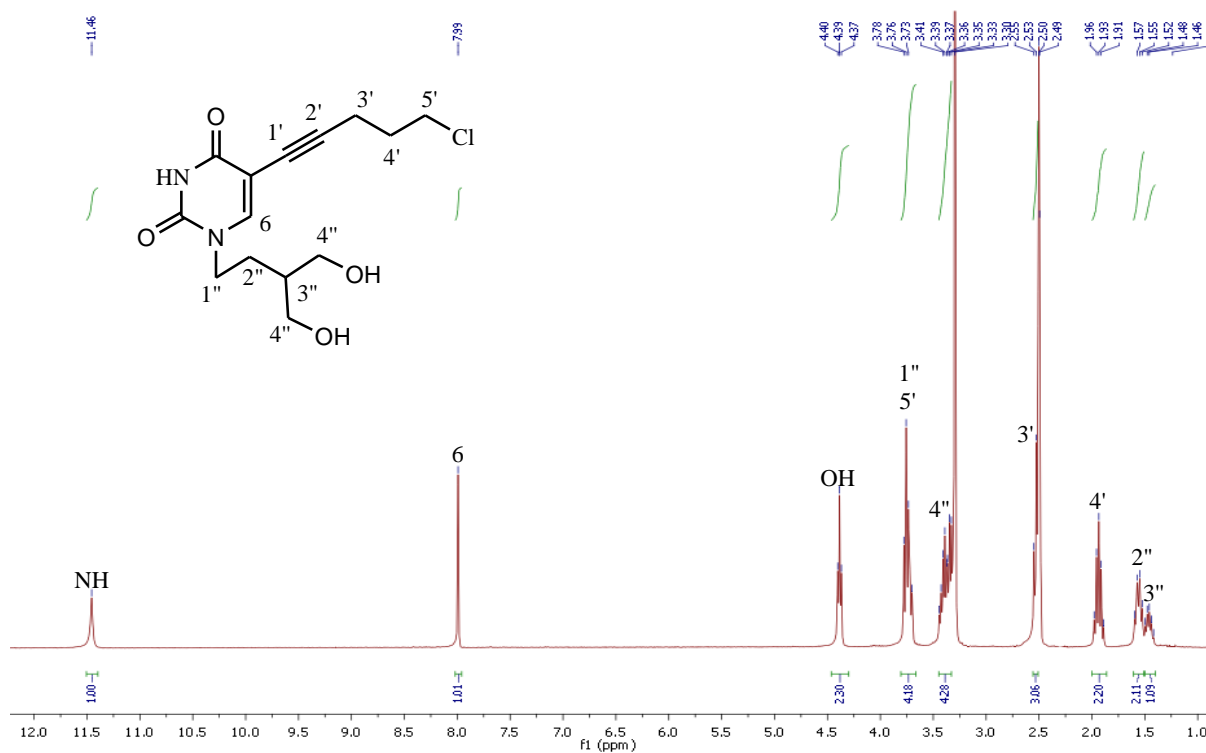
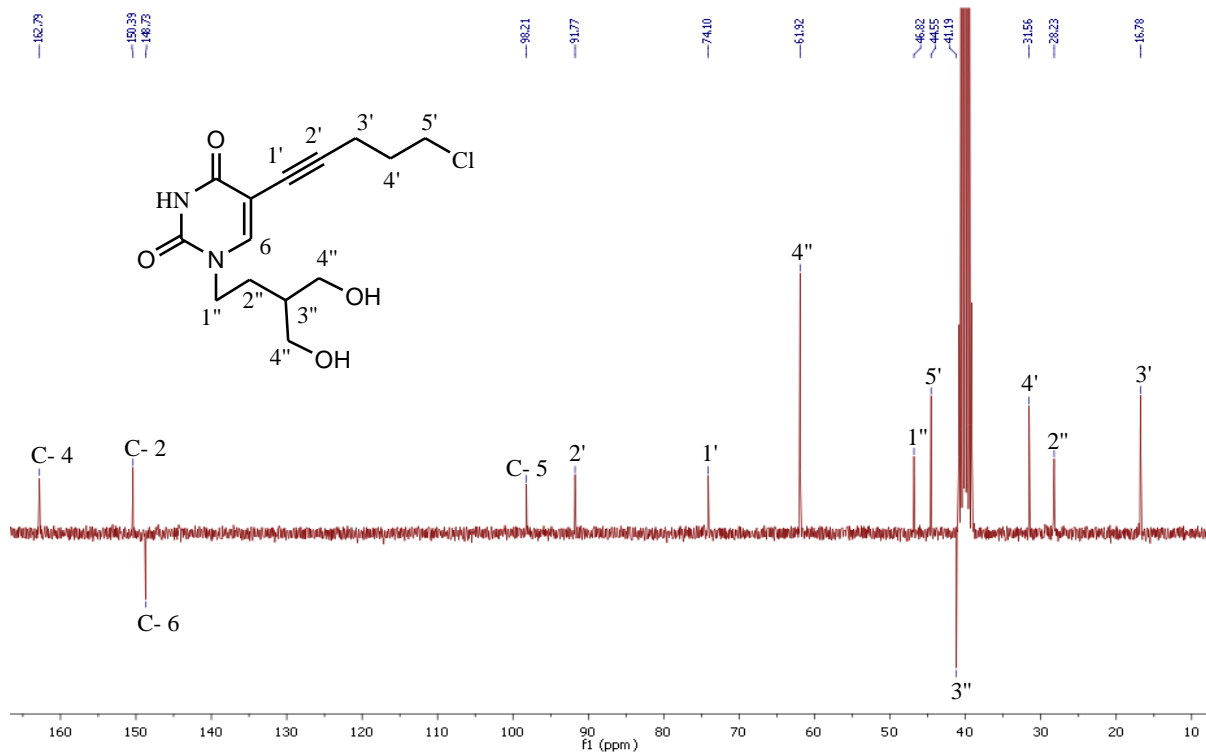
Slika P7.

a) Spektar ^1H NMR spoja **13e**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **13e**;

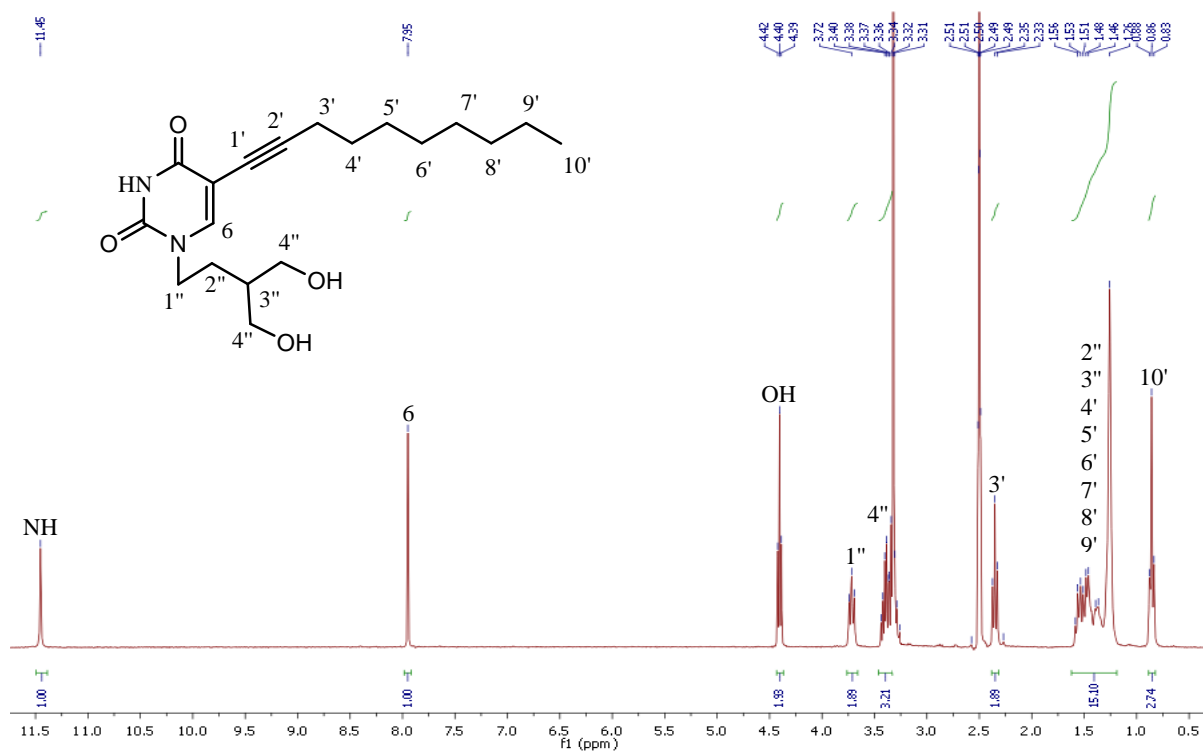
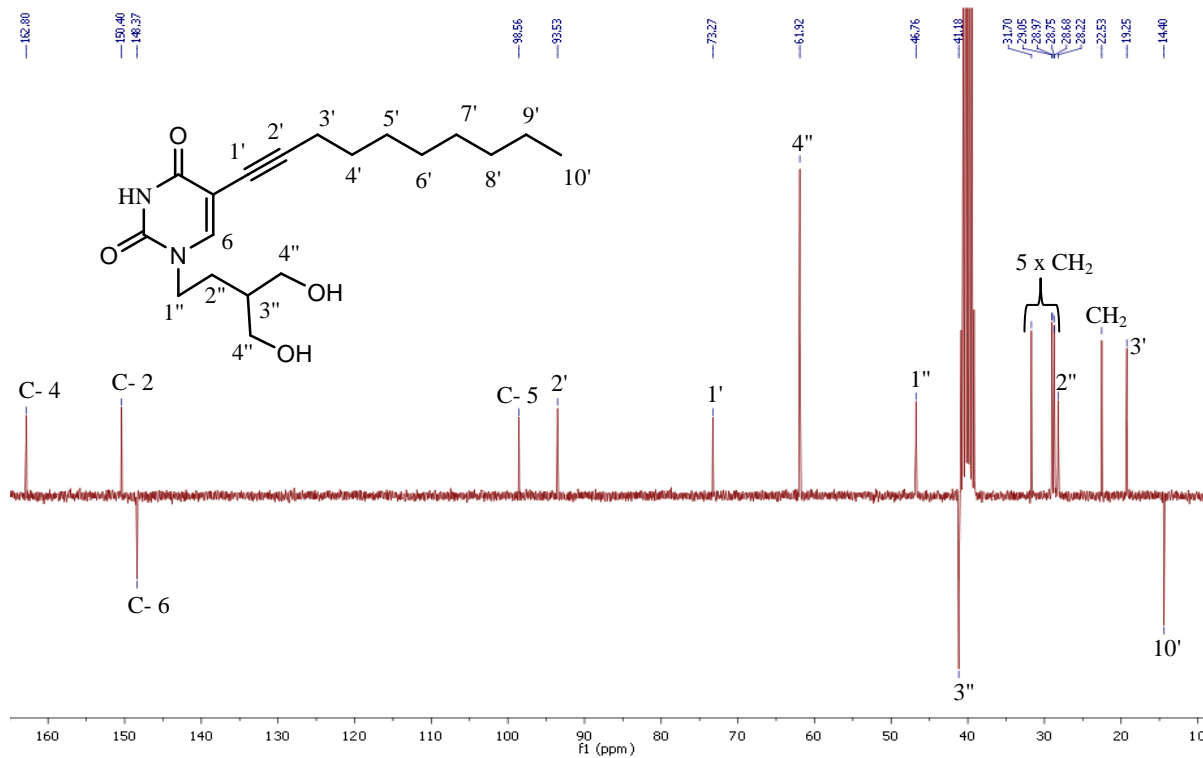
Slika P8.

a) Spektar ^1H NMR spoja **14a**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **14a**;

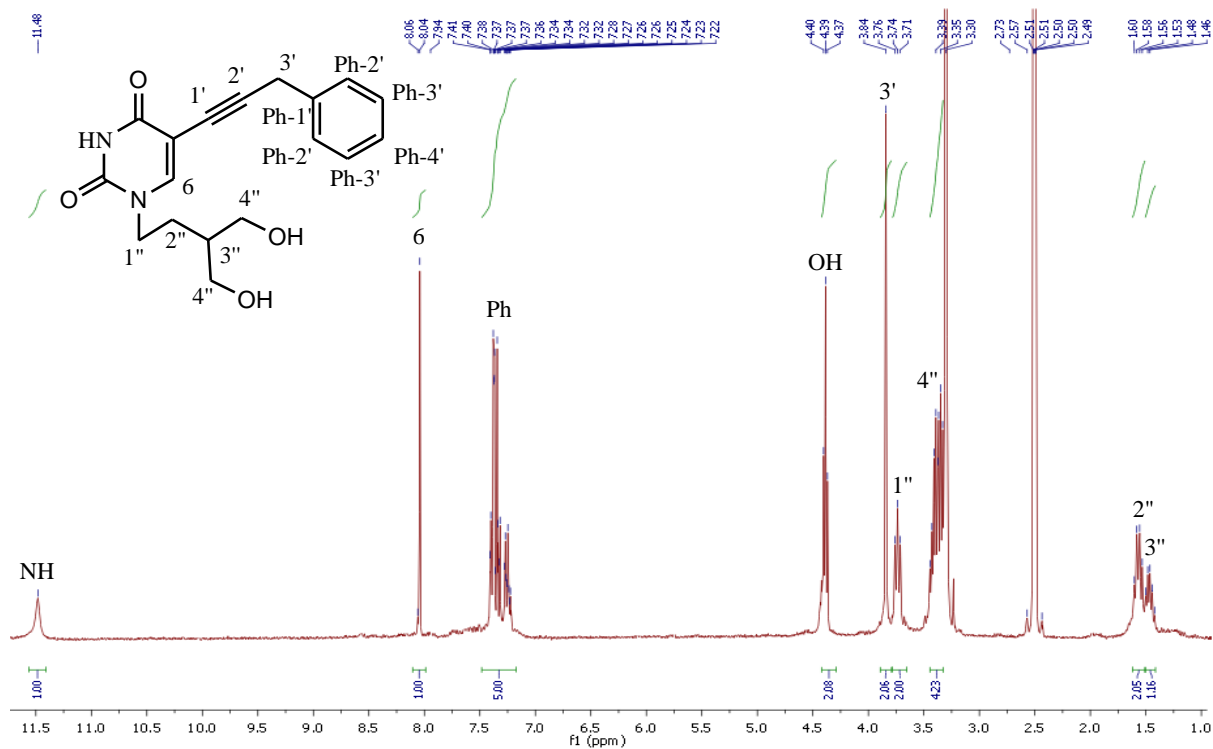
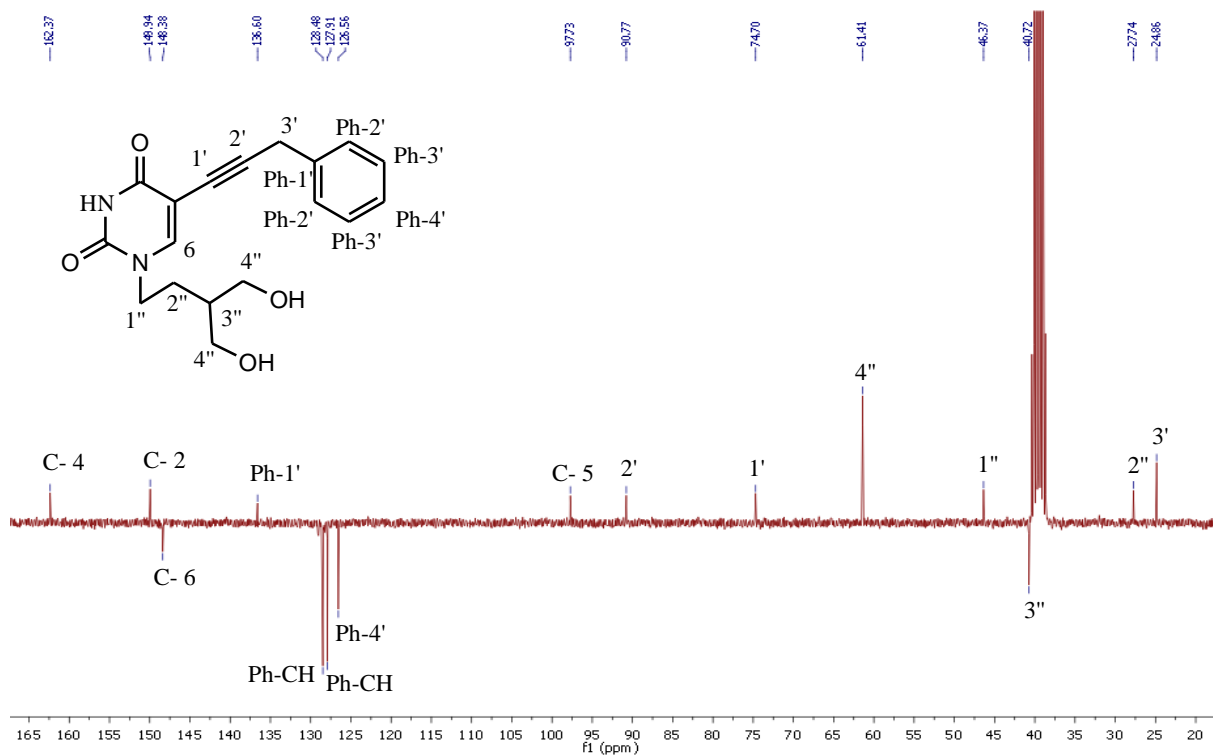
SlikaP9.

a) Spektar ^1H NMR spoja **14b**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **14b**;

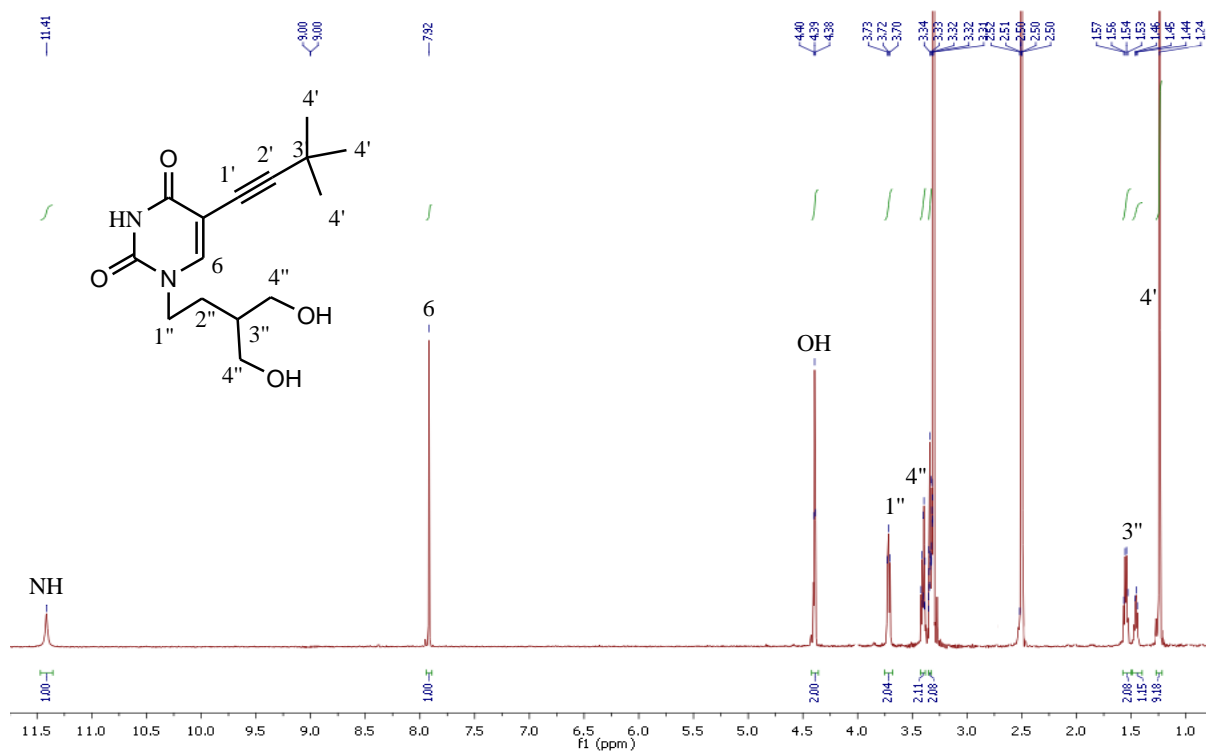
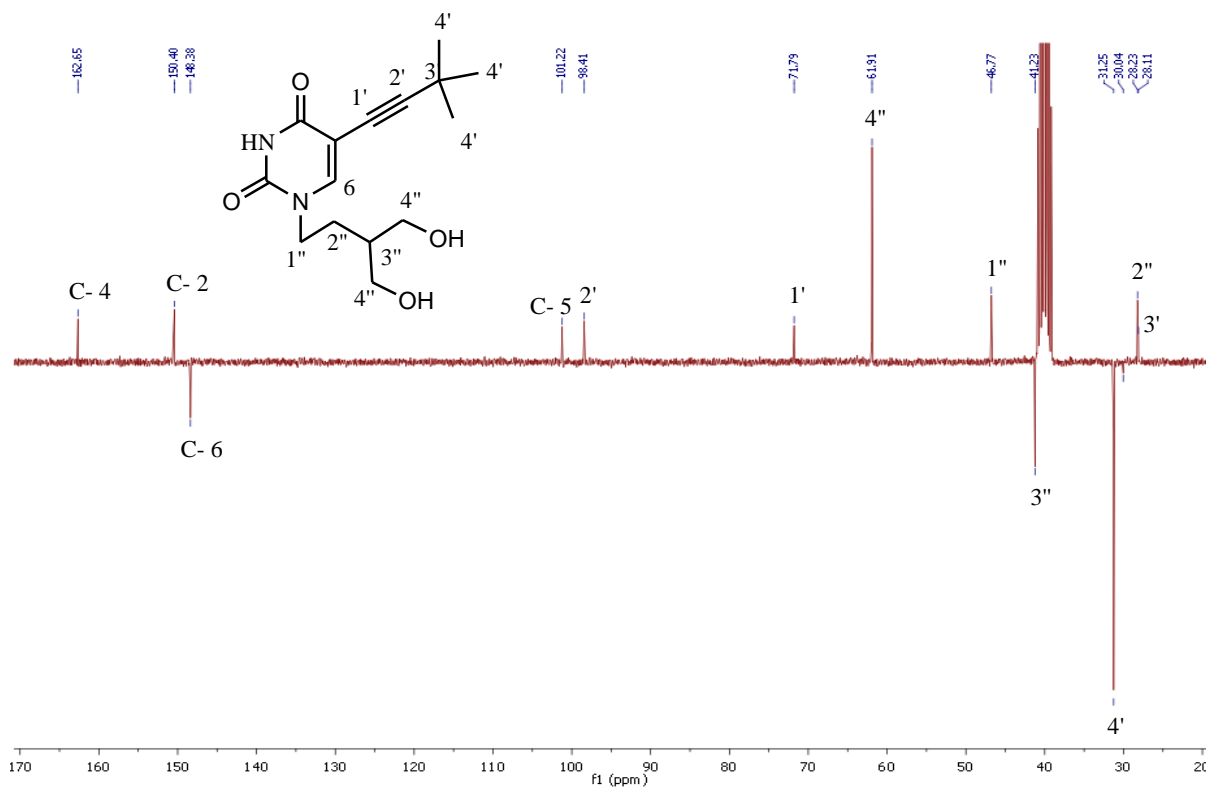
Slika P10.

a) Spektar ^1H NMR spoja **14c**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **14c**;

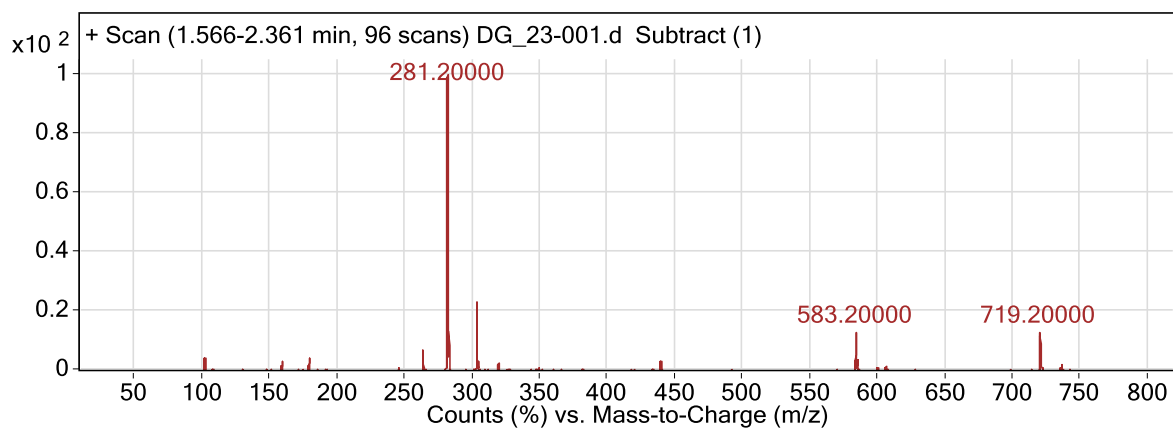
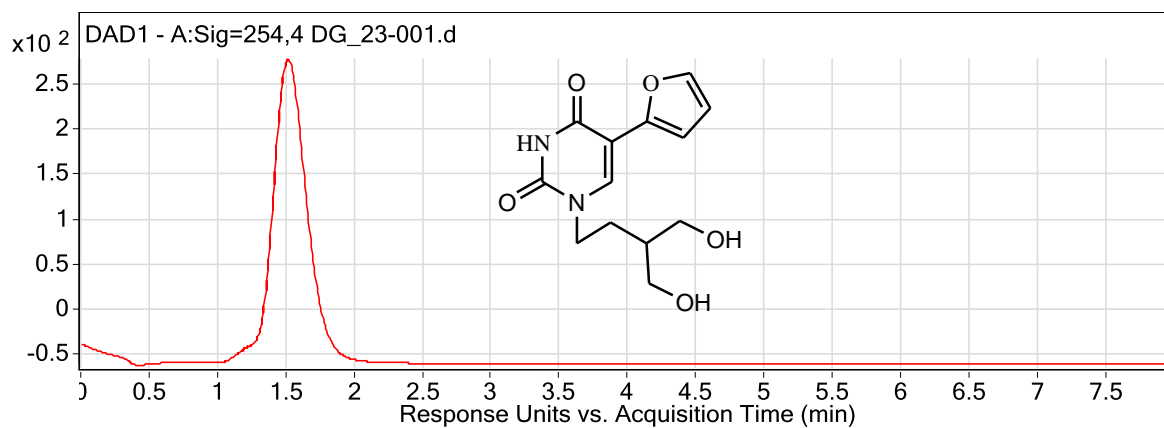
Slika P11.

a) Spektar ^1H NMR spoja **14d**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **14d**;

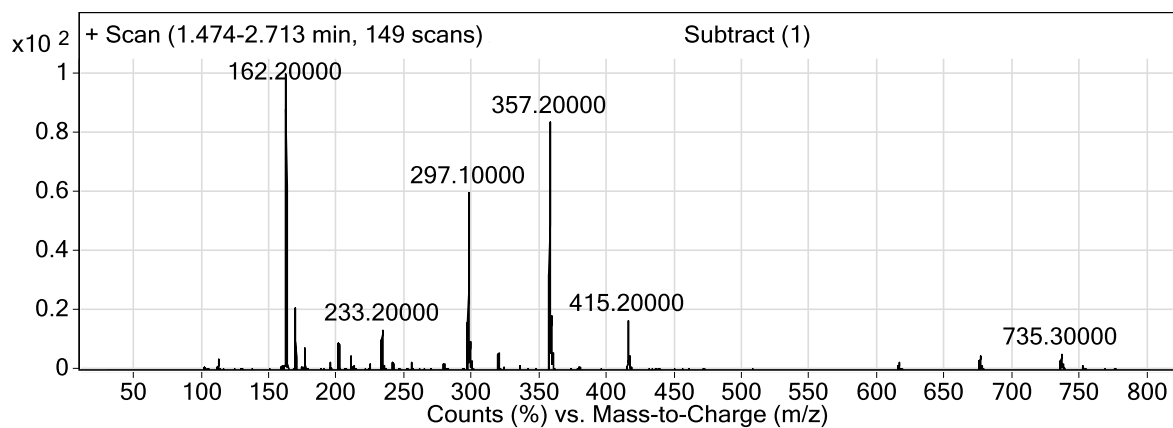
SlikaP12.

a) Spektar ^1H NMR spoja **14e**;b) spektar ^{13}C NMR spoja **14e**;

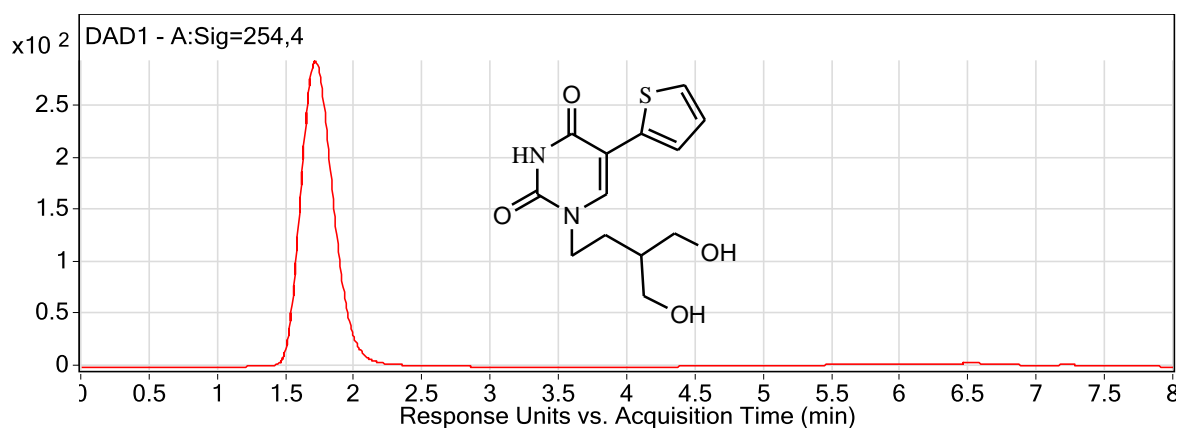
Slika P13.

a) Maseni spektar spoja **8a**;b) Kromatogram HPLC (254,4 nm) spoja **8a**;

Slika P14.

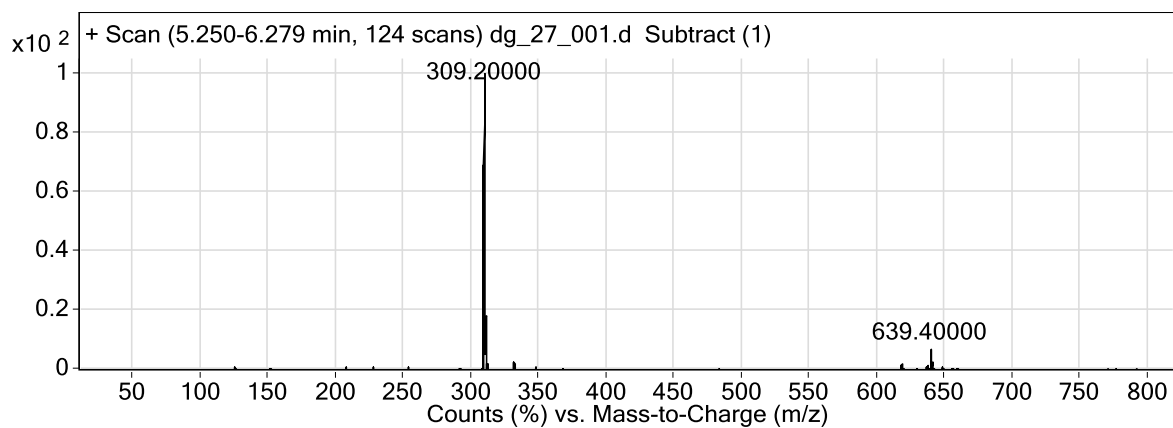
a) Maseni spektar spoja **8b**;

b) kromatogram HPLC (254,4 nm) spoja **8b**;

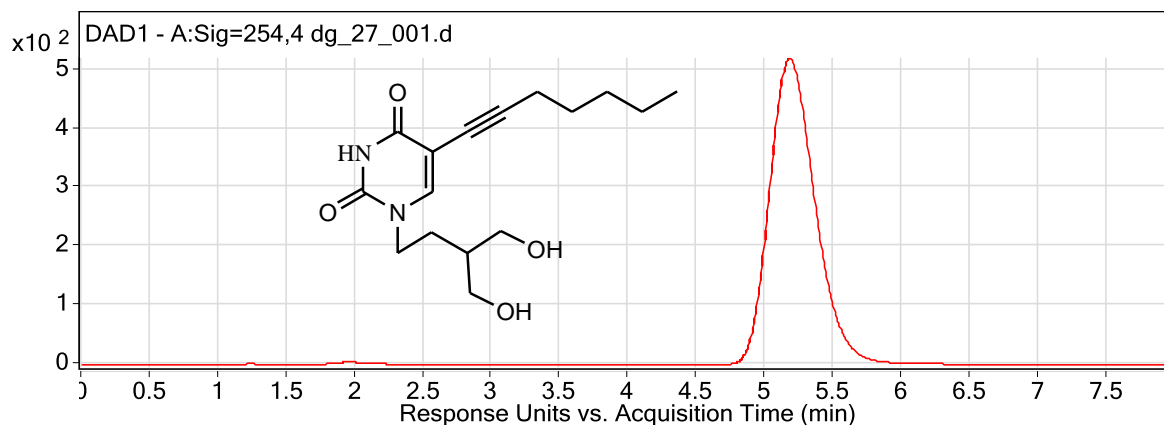


Slika P15.

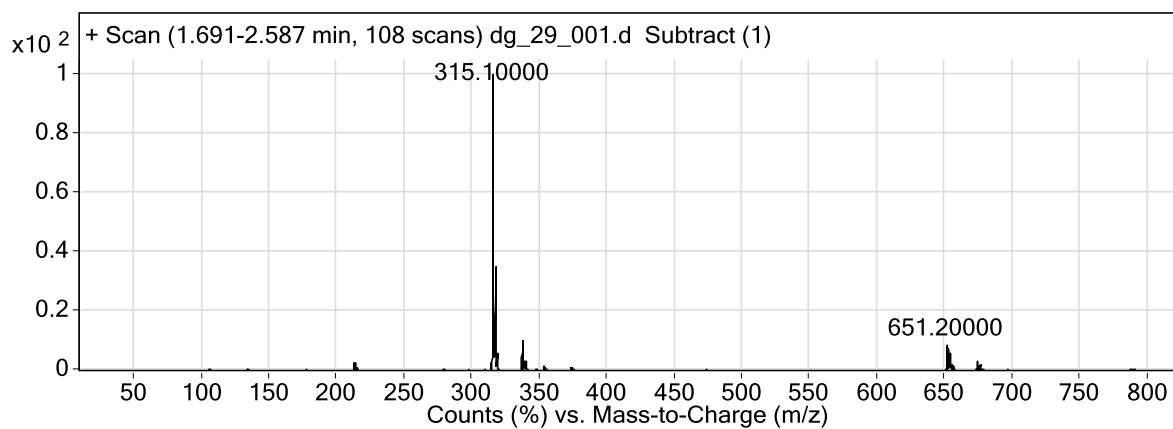
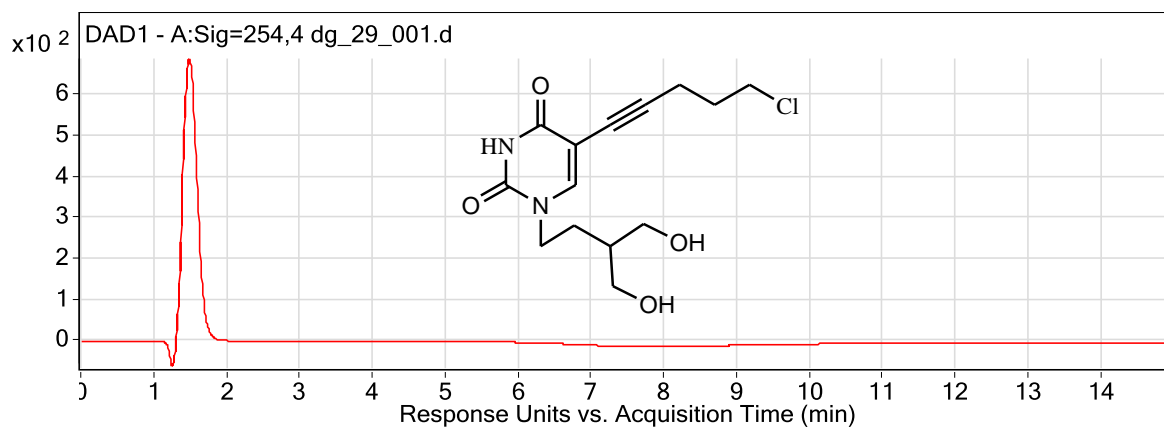
a) Maseni spektar spoja **14a**;



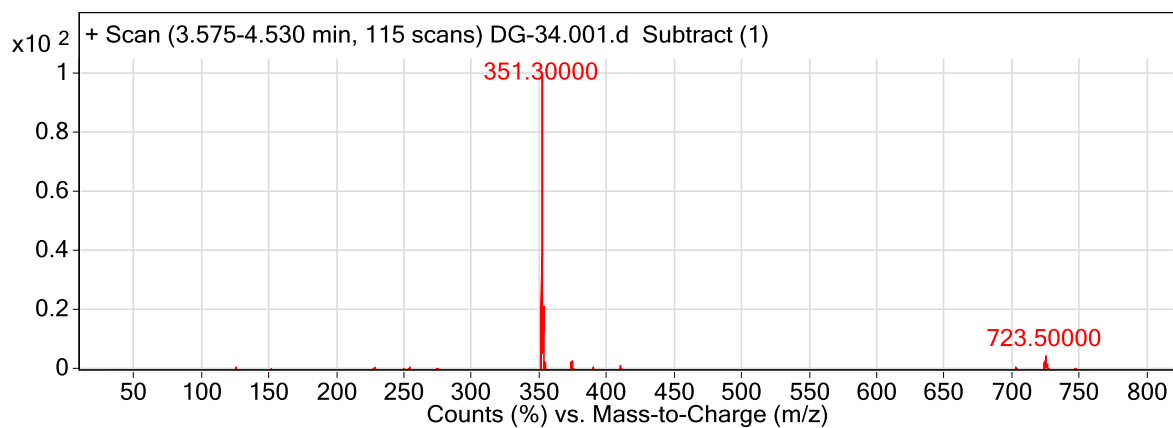
b) kromatogram HPLC (254,4 nm) spoja **14a**.



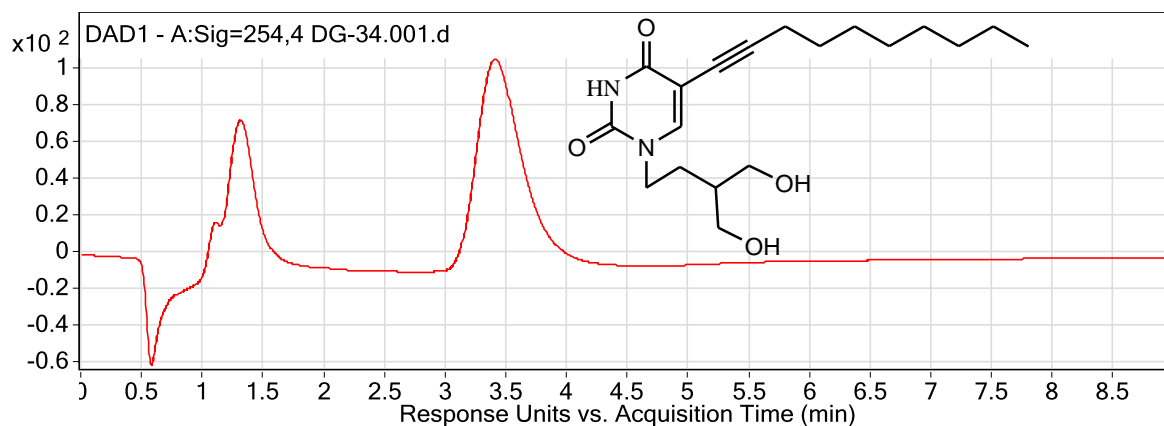
Slika P16.

a) Maseni spektar spoja **14b**;b) kromatogram HPLC (254,4 nm) spoja **14b**;

Slika P17.

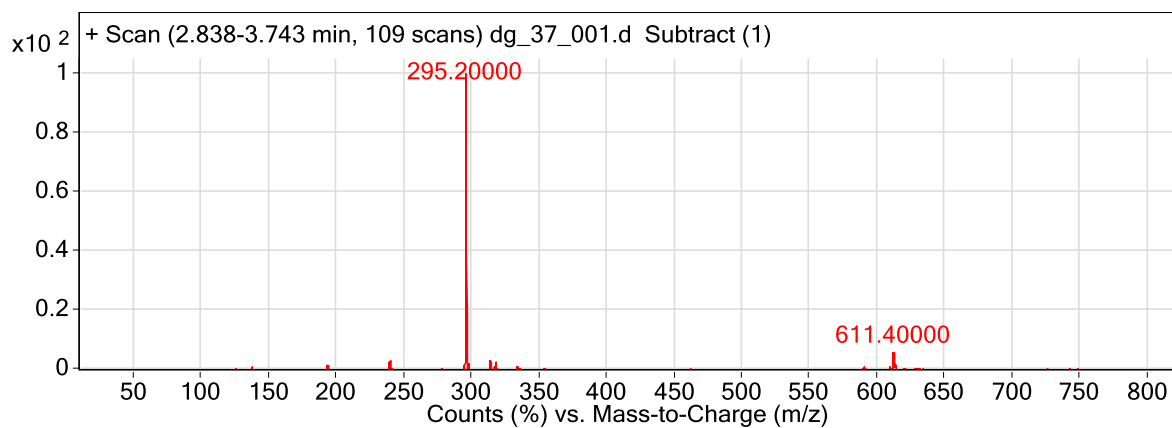
a) Maseni spektar spoja **14c**;

b) kromatogram HPLC (254,4 nm) spoja **14c**;



Slika P18.

a) Maseni spektar spoja **14e**;



b) kromatogram HPLC (254,4 nm) spoja **14e**;

