

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Livia Kurajica, Mande Miošić, Moris Mihovilović

**SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I
CITOSTATSKA ISPITIVANJA DERIVATA
CITUZINA I 7-DEAZAPURINA**

Zagreb, travanj 2015.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Tatjane Gazivoda Kraljević i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.

Popis kratica:

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

RNK – ribonukleinska kiselina

ATP – adenzin-trifosfat

SAR - odnos strukture i aktivnosti

UV/Vis – ultraljubičasta vidljiva spektroskopija

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

TLC – tankoslojna kromatografija

DMSO – dimetilsulfoksid

PASS – predviđanje spektra aktivnosti spojeva

λ_{em} – valna duljina emisije

λ_{exc} – valna duljina ekscitacije

ϵ – molarni ekstinkcijski koeficijent

DMF – dimetilformamid

ct-DNA – polinukleotid iz timusa teleta

BPE – puffer 6,0 mM Na₂HPO₄; 2,0 mM NaH₂PO₄ i 1,0 mM EDTA

CaCo-2 – adenokarcinom gušterače

HELA – adenokarcinom grlića maternice

Raji – Burkittov limfom

K562 – humana eritromijeloblastična leukemija

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	
2.1. Nukleozidi i nukleotidi.....	2
2.2. Nukleozidni analozi.....	4
2.2.1. Citozin.....	5
2.2.2. C-5 supstituirani pirimidinski analozi nukleozida.....	6
2.2.3. C-5 supstituirani analozi citozina.....	8
2.2.4. C-5 alkenilni i alkinilni derivati citozina.....	9
2.3. Derivati 1,2,3-triazola.....	9
2.4. 7-Deazapurini.....	13
2.4.1. 7-deazapurini kao inhibitori proteinskih kinaza.....	15
2.5. N-alkiliranje pirimidina.....	20
2.6. Sonogashira-ina reakcija.....	25
2.7. „Klik“ kemija.....	27
2.8. UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija.....	29
2.9. Vežanje malih molekula za molekulu DNK.....	32
2.10. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva <i>in silico</i> analizom (PASS).....	36
3. EKSPERIMENTALNI DIO	
3.1. Opće napomene.....	38
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva.....	39
3.3. Priprava spojeva.....	45
3.4. Preliminarna ispitivanja interakcija nekih pripremljenih spojeva s ct-DNA.....	55
4. REZULTATI I RASPRAVA	
4.1. Sinteze spojeva.....	56
4.2. Strukturna karakterizacija novopripremljenih spojeva ¹ H NMR spektroskopijom....	63
4.2.1. Analiza spektara ¹ H NMR C-5 supstituiranih, N-1 i C-5 disupstituiranih citozinskih derivata i C-6 i N-1 supstituiranih derivata 7-deazapurina.....	63
4.2.2. Analiza spektara ¹ H NMR N,N-1,3-ditriazolilnih citozinskih derivata i 1,2,3-triazolo[4,5- <i>d</i>]1,2,3-trihidropirimido[1,6- <i>a</i>]pirimidinskih derivata.....	70
4.3. Spektroskopska karakterizacija spojeva UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom.....	84
4.4. <i>In silico</i> analiza novopripremljenih spojeva (2-31).....	86
4.5. Citostatska ispitivanja novopripremljenih spojeva.....	94

4.6.. Ispitivanje interakcije spojeva 14, 18, 23 i 30-31 s <i>ct</i> -DNA UV/Vis i fluorimetrijskim titracijama.....	95
5. ZAKLJUČCI.....	101
6. LITERATURA.....	103
7. ZAHVALE	
8. SAŽETAK	
9. ŽIVOTOPISI	

1. UVOD

Najteži zadatak današnje medicine predstavlja borba protiv raka i virusnih bolesti. Kemoterapija se u velikom broju slučajeva pokazala vrlo učinkovitim rješenjem, no njena štetnost za zdravi dio organizma i rezistentnost koju takve bolesti pokazuju dokaz su da je potrebno stalno razvijati nove potencijalne antitumorske i antivirusne agense. Među vodećim klasama spojeva u tom području često se spominju nukleozidni analozi pirimidina i purina. Pirimidinski su nukleozidi, pogotovo njihovi C-5 supstituirani derivati, pokazali jaku biološku aktivnost.^{1,2,3} Mnogi izosteri purina važni su inhibitori DNK i RNK polimeraze te ometaju brojne procese koji inače omogućavaju proliferaciju odnosno širenje tumora. Tako su 7-deazapurini poznatiji i kao pirolo[2,3-*d*]pirimidini dio mnogih danas već korištenih lijekova, ali i prirodnih produkata, kao i važnih biomolekula.^{4,5} Spojevi koji sadrže 7-deazapurinsku okosnicu mogu se vezati na mnoge receptore pa je zato njihova primjena vrlo raširena. Najčešće je spominjana njihova uloga kao inhibitora proteinskih tirozin-kinaza koje su odgovorne za transport mnogih signala do stanica. Njihovom inhibicijom sprječava se proliferacija tumorskog tkiva i zaustavlja njegov rast.⁶ Nadalje, deazapurini supstituirani u položaju C-7 pokazali su se kao dobri inhibitori dihidrofolat-reduktaze (DHFR) i timidilat-sintaze, te kao antitumorski agensi, dok su *N*-1 supstituirani 7-deazapurini inhibitori tirozin-kinaze.⁷ Zato 7-deazapurinski derivati mogu biti smatrani jednom od predvodnih klasa u razvoju antitumorskih i antivirusnih lijekova. Značajni su inhibitori brojnih receptora što znači da imaju širok spektar biološkog djelovanja i predstavljaju važnu klasu spojeva u sintezi novih biološki aktivnih agenasa.

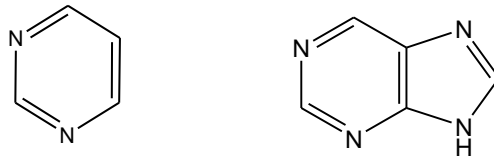
Značajnu biološku aktivnost pokazali su i spojevi koji sadrže triazolne prstenove, pogotovo oni sa 1,2,3-triazolnom strukturom. Takvi su spojevi, osim što se koriste kao fungicidi i antigljivični lijekovi, prisutni su u raznim farmaceuticima poput antibiotika, antituberkulotika, inhibitora HIV-proteaze i antitumorskih lijekova.⁸ Najpoznatiji primjer je ribavirin, prvi triazolni nukleozid sa širokim spektrom snažnog antivirusnog djelovanja odobrenog za korištenje protiv hepatitis C virusa koji se danas koristi diljem svijeta.⁹ Vezivanje triazolnih prstenova na purinsku okosnicu česta je strategija imitiranja strukture molekule ATP-a čime se postiže značajna inhibicija mnogih procesa preživljavanja tumora.

Osnovni je cilj ovih istraživanja razvoj novih C-5 alkinilnih te *N*-1 i/ili *N*-3 triazolilnih citozinskih i 7-deazapurinskih derivata u svrhu vezivanja za *ct*-DNA, kako bi se utvrdio mogući mehanizam citostatskog djelovanja i radi ispitivanja *in vitro* na staničnim tumorskim linijama porijeklom iz čovjeka: HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi).

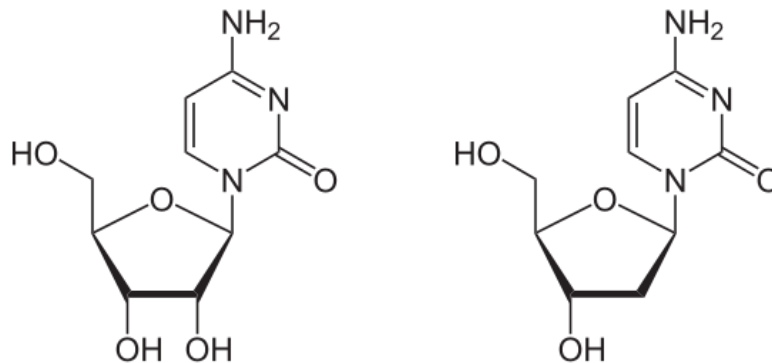
2. OPĆI DIO

2.1. Nukleozidi i nukleotidi

Nukleozidi i nukleotidi među najvažnijim su biomolekulama živućih organizama. Nukleozidi se odnose na purinske ili pirimidinske baze (Slika 1) vezane na šećernu komponentu *N*-glikozidnom vezom. Šećerni dio molekule može biti građen od D-riboze ili D-2'-deoksiriboze, a svoje β -glikozidne derivate čine kad se povežu sa nešećernom komponentom, odnosno aglikonskim komponentama u obliku purinskih i pirimidinskih baza. (Slika 2)

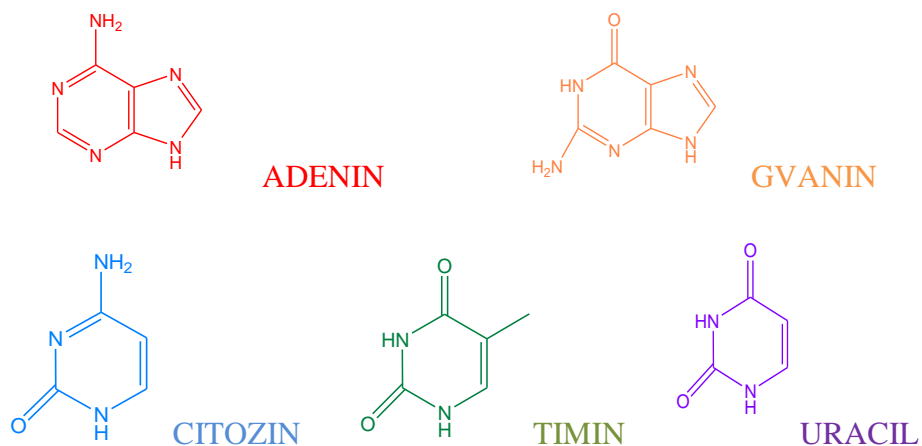


Slika 1. Strukture pirimidinskog i purinskog prstena



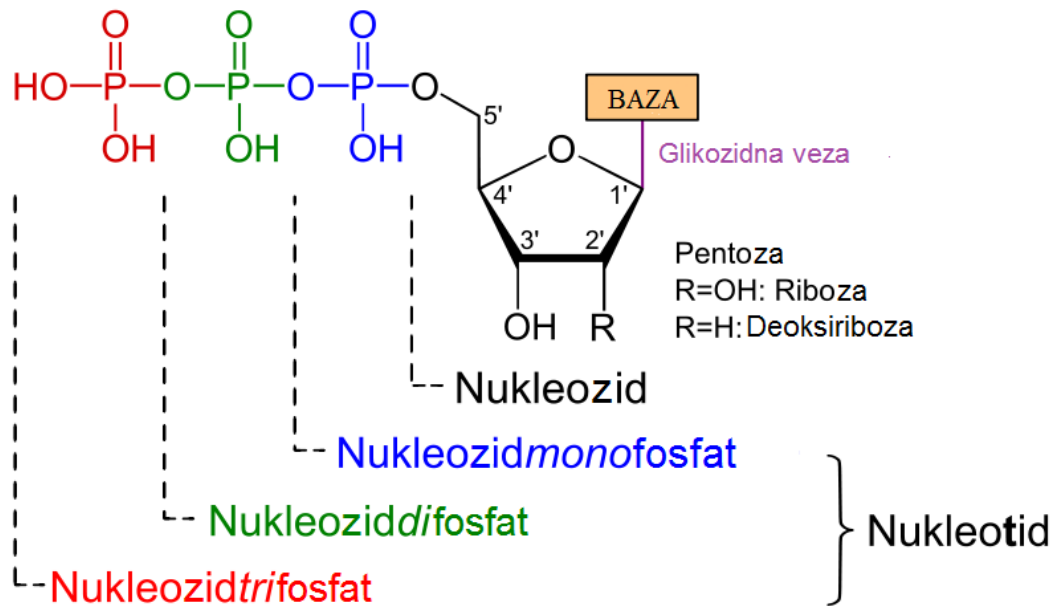
Slika 2. Strukture nukleozida s ribozom i deoksiribozom

Aglikonske baze koje se pojavljuju u strukturama nukleozida su adenin, gvanin (purinske) i timin, citozin te uracil (pirimidinske) (Slika 3).



Slika 3. Purinske i pirimidinske baze

Povezivanjem nukleozida sačinjenih od navedenih baza i šećernih komponenti sa fosfatnom skupinom nastaju nukleotidi (Slika 4), monomeri nukleinskih kiselina koji su odgovorni za najvažnije funkcije i preživljavanje organizma. Oni su osnovne građevne jedinice nasljednog materijala (DNK i RNK), koji omogućava rast i razmnožavanje živih bića, a imaju i ključnu ulogu u prijenosu energije do svih stanica i organa u obliku adenzin-trifosfata (ATP).



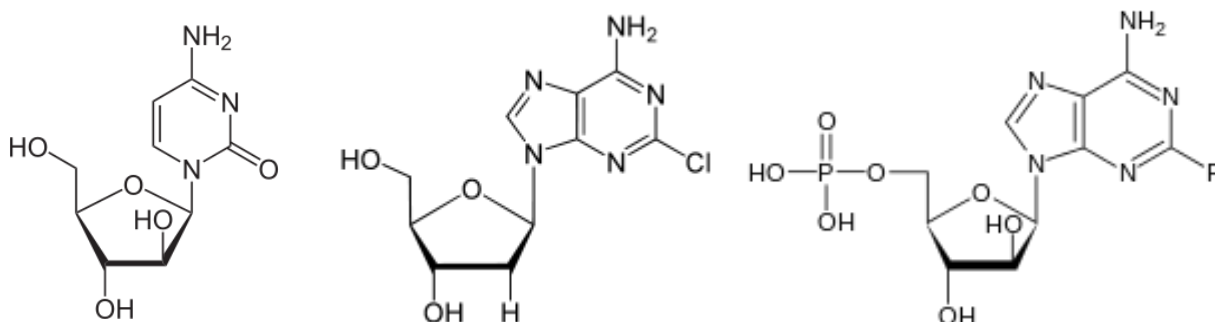
Slika 4. Strukturne razlike između nukleozida i nukleotida

Nukleozidi se mogu sintetizirati raznim metodama. Jedan od načina je supstitucija s dušikovim nukleofilom na monosaharidu katalizirana kiselinom, što je analogno nastajanju glikozida. Drugi način je *de novo* sinteza koja se jednim dijelom odvija u jetri. No, u većoj se mjeri nukleozidi dobivaju razgradnjom nukleinskih kiselina, pri čemu nukleotidaze razgrađuju nukleotide na nukleozide i fosfate. Nukleozidi se dalje razgrađuju nukleotidazama na baze i šećer ribozu, odnosno deoksiribozu.^{10a,b} Sinteza nukleotida teče dako da se nukleozidi fosforiliraju nukleozidnim monofosfat kinazama pa tako nadalje do trifosfata.¹¹

2.2. Nukleozidni analozi

Nukleozidni analozi su spojevi dobiveni sintetski, koji su kreirani s namjerom da imitiraju prirodne nukleozide i zamijene njihovo mjesto u nukleinskim kiselinama. Oni se u postupku izgradnje nukleinskog lanca umeću umjesto prirodnih nukleozidnih baza te na taj način inhibiraju staničnu ili virusnu DNK i RNK polimerazu. Jedan od najvećih pomaka u medicini 20. stoljeća bio je otkriće antibiotika koji inhibiraju proliferaciju bakterija u zaraženom organizmu. Prikupljena znanja omogućavaju sličan napredak na području antitumorske i antivirusne terapije. Istraživani procesi replikacije tumorskih stanica i virusa sve više su objašnjivi i poznatiji pa je tako postalo moguće identificirati spojeve koji bi mogli selektivno interferirati njihove funkcije. Među ovakvim spojevima ključnu ulogu imaju nukleozidni analozi.¹²

Analozi nukleozida već duže vrijeme čine važnu klasu antimetabolita korištenih u liječenju hematoloških zloćudnih tkiva, a odnedavno i u čvrstim tumorima. Oni oponašaju fiziološke nukleozide, odnosno njihovu ulogu u metabolizmu te se ugrađuju u rastući lanac DNA inhibirajući njegovu sintezu i uzrokujući terminaciju lanca. Neki od analoga također inhibiraju enzime koji su od ključnog značenja za generiranje purinskih i pirimidinskih nukleozida i sintezu RNA te direktno aktiviraju apoptozu ili staničnu smrt. Klasa nukleozidnih analoga uključuje razne pirimidinske i purinske derivate od kojih su značajni pirimidinski analozi citozinarabinozid (citarabin) koji se rašireno koristi za liječenje akutne leukemije, dok gemicitabin pokazuje aktivnost u borbi protiv raka gušterače, pluća i dojke (Slika 5). Prva dva razvijena purinska analoga su tiopurini 6-merkaptopurin (6-MP) i tiogvanin (6-TG). Ostali purinski analozi su 2-klordeoksiadenozin (2-CdA, kladribin) i fludarabin (Slika 5), čija uporaba obuhvaća samo hematološka maligna tkiva.



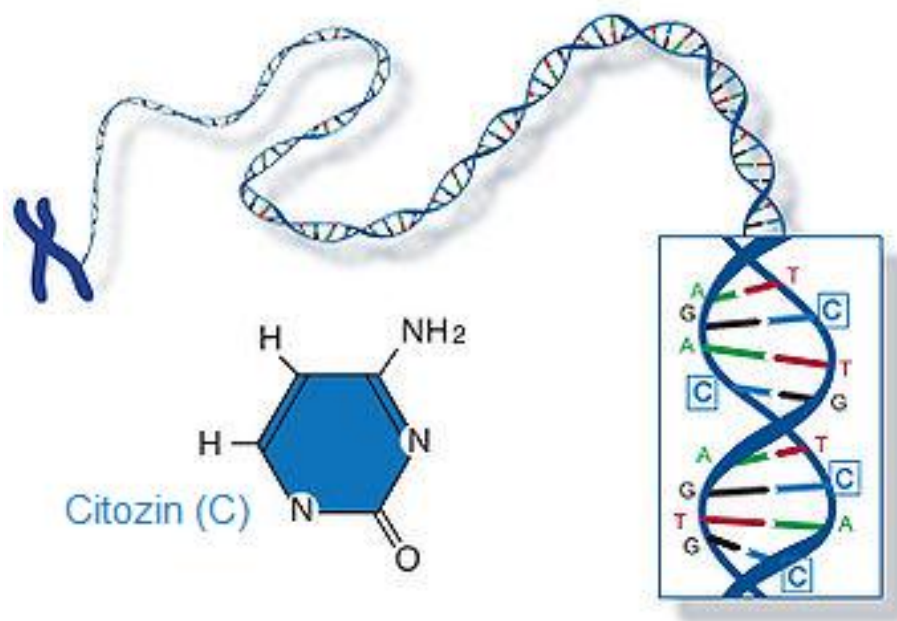
Slika 5. Strukture citarabina, kladribina i fludarabina

Važnost nukleozidnih analoga kao kemoterapeutskih agenasa porasla je kao rezultat uvođenja novih molekula u kliničku uporabu i širenje u područje čvrstih tumora. Tijekom tog

razdoblja, postignut je golem napredak u razumijevanju mehanizama otpornosti lijekova na nukleozidne derivate. Jedna od metoda koja je obećavajuća u smjeru borbe protiv navedene otpornosti je korištenje kombinacija lijekova koje optimiraju efikasnost trenutno dostupnih lijekova i trudi se razviti nove, učinkovitije analoge koji su manje podložni mehanizmima razvijanja otpornosti. Vodeću ulogu u tome imaju ugrađivanje fosforiliranih nukleozidnih derivata u DNA u kombinaciji s agensima koji potiču apoptotičke odgovore u organizmu. Kao što je kombinirana kemoterapija pronašla rješenja za liječenje nekih oblika raka, tako pronalaženje novih nukleozidnih analoga s više različitih funkcija može biti osnova napretka u borbi protiv bolesti otpornih na postojeće kemoterapeutike.¹³

2.2.1. Citozin

Citozin je pirimidinska nukleozidna baza koja je jedna od osnovnih sastavnica nukleinskih kiselina (Slika 6), stoga su njeni analozi jedni od glavnih spojeva inhibitora rasta DNK i RNK.



Slika 6. Struktura nukleozidne baze citozina

Jedan od derivata citozina, citarabin, već je u kliničkoj uporabi za liječenje akutne leukemije. On je dokaz da su citozinski derivati obećavajuće područje koje može dati djelotvorna i sigurna rješenja u borbi protiv nekih od najtežih dosad neizlječivih bolesti.

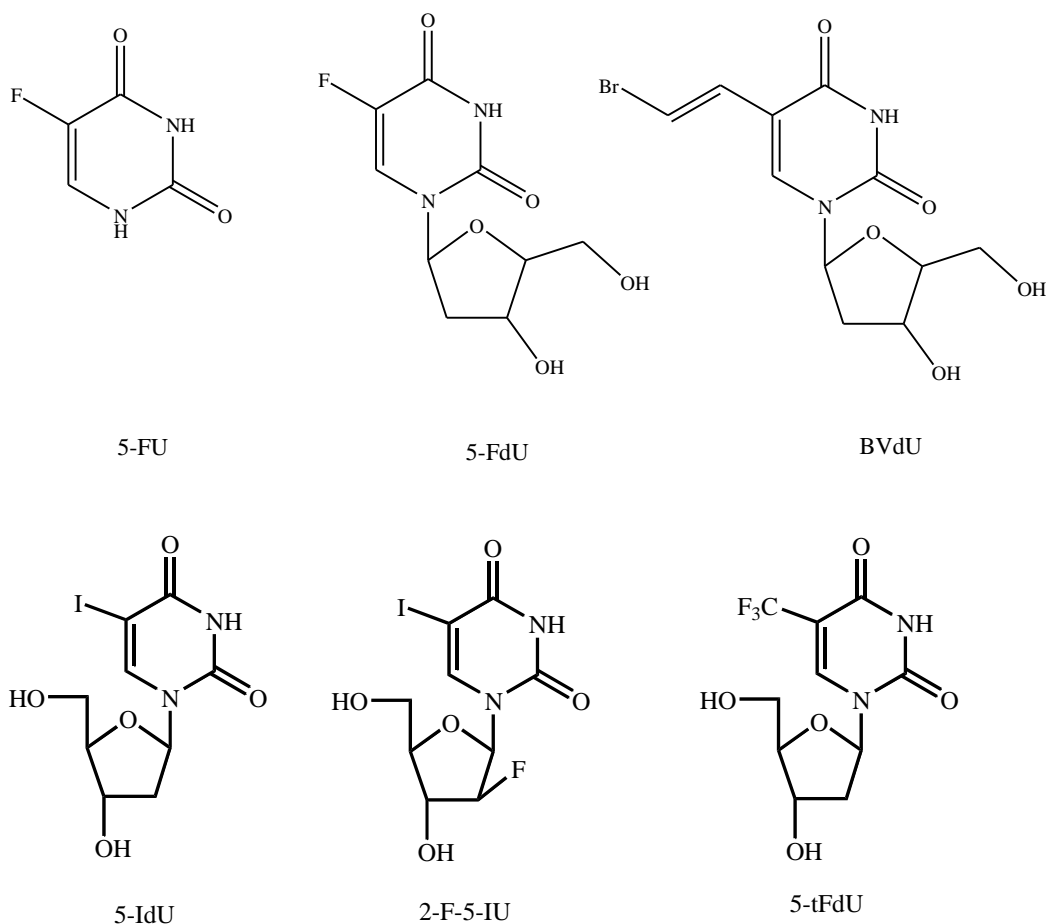
Među takvim spojevima nalazi se i (*S*)-1-(3-hidroksi-2-fosfonilmetoksipropil)citozin (HPMPC), snažan i selektivan inhibitor replikacije humanog citomegalovirusa (CMV). Njegova aktivnost vrlo je visoka i slična ekvivalentnom adeninskom derivatu HPMPA, a oba su pokazala vrlo niske koncentracije potrebne za inhibiciju virusa. HPMPC djeluje inhibitorno čak i nakon dodavanja 24 do 48 sati nakon infekcije.¹⁴

Citozinski derivati pokazali su i značajnu antitumorsku aktivnost. Učinkovitost antitumorskog nukleozidnog derivata citozina 3'-etinilcitidina (ECyd) analizirana je *in vitro* i *in vivo*. *In vivo* antitumorski učinak uključivao je kapsuliranje u liposome, a farmakokinetičkim i farmakodinamičkim analizama dobiven je model koji kvantitativno objašnjava *in vivo* utjecaj ECyd-a. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da je raspoloživost ECyd-a u tumorskom tkivu bila vrlo važna za borbu organizma protiv malignog tkiva. Sintetizirani su i fosfolipidni derivati koji su povećali antitumorsko djelovanje. Istraživanja su pokazala da su citozinski derivati vrlo snažni biološki agensi, kao i da je vrlo važno dizajnirati nosioce antitumorskih lijekova modeliranjem njihovih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava.¹⁵

2.2.2. C-5 supstituirani pirimidinski analozi nukleozida

Osim u dušičnim bazama nukleotida, pirimidinski prsten dio je strukture u vitaminima (riboflavin, tiamin, folna kiselina) te u barbiturnoj kiselini i aloksanu, koji je poznat po dijabetogenoj aktivnosti u mnogih životinja. Upravo zbog tako raširene prirodne pojave pirimidinskog prstena možemo uočiti važnost te strukture u funkcioniranju organizama svih živih bića.

Nukleozidni analozi supstituirani u položaju C-5 pirimidinskog prstena ističu se dobrim biološkim djelovanjem pa su u taj položaj uvedeni različiti supstituenti u dizajniranju molekula koje će interagirati sa procesima u tijelu i imati željenu aktivnost. Alkinilna skupina na položaju C-5 pirimidina, koji je u položaju *N*-1 vezan na neki šećer (npr. deoksiribozu), povoljna je za kemijske transformacije. Važno je napomenuti da selektivnost antivirusnog djelovanja tih spojeva raste sa povećanjem veličine supstituenta.¹⁶ Tako su sintetizirani 5-fluoruracil (5-FU), 5-fluor-2'-deoksiuridin (5-FdU), te (*E*)-5-(2-bromvinil)-2'-deoksiuridin (BVdU), 5-jod-2'-deoksiuridin, 2'-fluor-5-joduridin i 5-(trifluormetil)-2'-deoksiuridin koji se rabe kao antivirusni lijekovi protiv infekcija uzrokovanih virusom herpes simplex (*HSV*) (Slika 7).¹⁷



Slika 7. C-5 supstituirani analozi nukleozida

Najdjelotvorniji spojevi iz reda spomenutih 5-supstituiranih 2'-deoksiuridina spadaju C-5-(2-halogenvinil)-2'-deoksiuridini i 5-heteroaril-2'-deoksiuridini. Navedeni su spojevi selektivni inhibitori virusa herpes simplex tipa 1 i 2 (*HSV-1* i *HSV-2*) i virusa varicella-zoster (*VZV*). Detaljnijom analizom njihovih struktura i određivanjem odnosa biološkog djelovanja i rasporeda funkcionalnih skupina unutar molekule utvrđeno je da elektron-odvlačeća skupina u C-5 položaju pirimidinskog prstena koja je s njime u konjugaciji ima značajan utjecaj na antivirusno djelovanje.¹⁸

Razlog selektivnosti određenih C-5 supstituiranih nukleozidnih analoga u djelovanju na herpes viruse je to što su bolji supstrati za virusnu timidin kinazu od prirodne, pa se lakše fosforiliraju, a u trifosfatnom obliku bolje inhibiraju virusnu DNK polimerazu od stanične.¹⁹

2.2.3. C-5 supstituirani analozi citozina

Jedan od primjera biološki aktivnih derivata citozina vrlo je jednostavna struktura 5-metilcitozina. Ispitivana je fotoinducirana reakcija izmjene elektrona s *N*- α -acetil-L-lizinom, derivatom esencijalne aminokiseline L-lizina. Reakcije su provođene pri pH 7,5 i pri tome su nastali metilcitozinilni derivati heksanske kiseline. Manji dio produkata je bio podvrgnut deaminaciji pri čemu je izoliran timinski analog. Konačni korak uključivao je deacetiliranje hidrolizom u kiselom mediju. Sve ove fotoinducirane reakcije pri pH sličnom fiziološkoj vrijednosti mogle bi imati biološku primjenu pogotovo u citozinskim komponentama DNA koje mogu reagirati s amino skupinama lizinskih ogranaka proteina nakon izloženosti UV ozračivanju nukleosoma i ostalih kompleksa DNA proteina u fiziološkim uvjetima.¹

Slijedeći u nizu aktivnih derivata je 5-azacitidin, čija interakcija s citozin metiltransferazom uzrokuje mutagenazu u bakterijskoj vrsti *Escherichia coli*. Korištene su razne analize da bi se mjerile mutacije u genu, sa i bez prisutnosti aktivne molekule. Iz tih su istraživanja proizašli zaključci koji upućuju na visoku korelaciju mutacija i 5-azacitidina, uz veliku ovisnost o koncentraciji, odnosno dozi.²

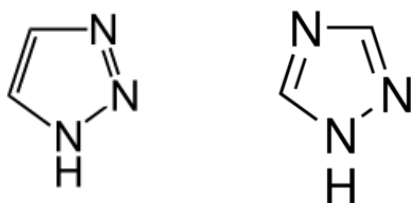
Epigenetika svoj nagli napredak duguje između ostalog DNA metiliranju, odnosno adiciji metilne skupine u položaj C-5 citozina iz C-G dinukleotida. Taj je korak opće priznat zbog svojih važnih epigenetičkih funkcija u razvoju stanica i patogeneze. Naime, brojna su istraživanja koja se baziraju na karakterizaciji DNA metiliranja povezana sa razvojem bolesti i mogućnosti njenog korištenja kao biomarkera za dijagnozu, prognozu i predviđanje odgovora na terapiju. Nedavno su otkrivene nove modifikacije citozina koje posjeduju regulatornu ulogu poput 5-hidroksimetilcitozina, 5-formilcitozina i 5-karboksilcitozina. Funkcije 5-metilcitozina i njegovih oksidiranih derivata promiču razumijevanje mehanizma epigenetskih modifikacija s biologijom bolesti. Stoga, mnogo je toga postignuto u razvoju metoda za otkrivanje, detekciju i analizu lokacije 5-metilcitozina i njegovih derivata koji dokazuju svoju neizmjernu važnost u polju interakcije nukleozidnih analoga i važnih bioloških meta u organizmu.³

2.2.4. C-5 alkenilni i alkinilni derivati citozina

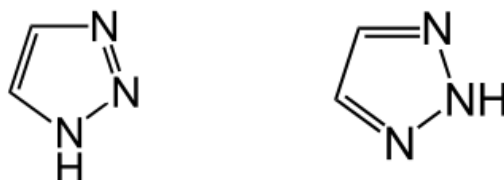
Nukleozidni analozi supstituirani na C-5 položaju pirimidinskog prstena alkenilnim i alkinilnim supstuentima pokazuju izraženu biološku aktivnost. Tako primjerice derivati arabinofuranozilcitozina s halovinilnim ili vinilnim supstuentima pokazuju aktivnost *in vitro* prema HSV-1 i HSV-2 virusima, kao i odgovarajući 5-alkenilni urcilni nukleozidi. Terapeutske primjene ovih spojeva su u nekim slučajevima superiorne nad uracilnima i protiv leukemije, što je primijećeno *in vitro* u slučajevima alkinilnih kao i vinilnih supstuentata. Proučavano je i uspoređivano također i djelovanje na virusom inducirane timidin-kinaze.²⁰ C-5-alkinilni citozinski derivati bez supstuentata na prstenu sintetizirani su Sonogashira-inom reakcijom 5-jodcitozina i terminalnih alkina. Nadalje, sintetizirani su i 7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirimidini domino reakcijom unakrsnog povezivanja i reakcijama ciklizacije iz *N*-4-benzoil-5-jodcitozina. Obje vrste dobivenih spojeva, i 5-feniletinilcitozinske i bicikličke specije pokazale su fluorescenciju koja je ovisila o supstituiranosti molekule ostalim funkcionalnim skupinama.²¹ U sličnom su istraživanju C-5 alkinilni derivati sintetizirani iz 5-jodcitozinskih derivata i terminalnih alkina također Sonogashira-inom reakcijom ali uz mikrovalno zračenje. Svim je dobivenim molekulama ispitano citostatsko i antivirusno djelovanje. Neke od njih pokazale su inhibitorne koncentracije protiv više vrsta tumora u niskom mikromolarnom području, uz izostanak antivirusne aktivnosti.²²

2.3. Derivati 1,2,3-triazola

Triazoli su aromatski heterociklički spojevi opće kemijske formule C₂H₃N₃. Dolaze u obliku dva izomera: 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol (Slika 8), koji se međusobno razlikuju u rasporedu dušikovih atoma unutar prstena. Svaki od njih ima 2 tautomerna oblika u kojima se mijenja položaj vodika na dušikovim atomima. Na slici 9 prikazani su tautomerni oblici 1,2,3-triazola. Derivati triazola imaju široko područje primjene, od kojih je najpoznatije njihovo djelovanje protiv gljivica pa se zato koriste kao lijekovi u tu svrhu i kao fungicidi u poljoprivredi. Osim u antigljivičnim lijekovima, derivati triazola su prisutni u raznim farmaceuticima poput antibiotika, antituberkulotika, inhibitora HIV proteaze i antitumorskih lijekova.⁸



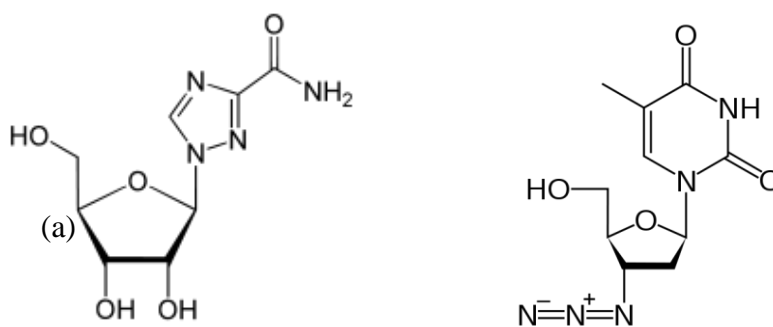
Slika 8. Strukture 1,2,3-triazola i 1,2,4-triazola



Slika 9. Strukture 1*H*-1,2,3-triazola i 2*H*-1,2,3-triazola

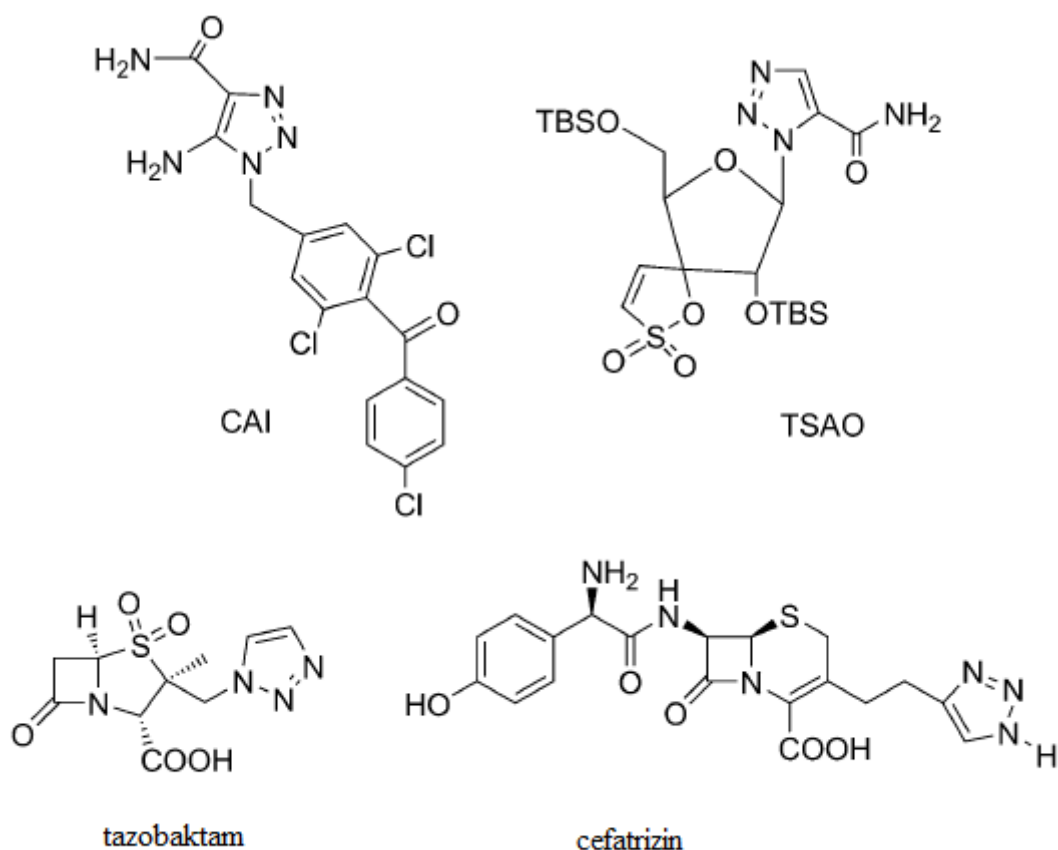
Derivati 1,2,3-triazola posebno su zanimljivi jer su stabilni, odnosno nisu podložni metaboličkoj degradaciji, stvaraju jake vodikove veze koje mogu biti ključne u vezivanju s mnogim biomolekulskim metama i dobro su topljivi. U prirodi se ne pojavljuju, iako sintetske molekule koje sadrže 1,2,3-triazolni prsten pokazuju raznoliku biološku aktivnost. Važnost triazolnih spojeva u medicinskoj kemiji je neupitan jer, za razliku od ostalih azaheterocikla, 1,2,3-triazolni prsten nije protoniran pri fiziološkom pH zbog svoje slabe bazičnosti. Stoga, njihovi neprotonirani sp^2 hibridizirani dušikovi atomi mogu bolje imitirati djelomično pozitivni naboj anomernog ugljika u prijelaznom stanju reakcija kataliziranih glukoza-oksidadama nego što to čine slični bazični dušikovi atomi iminošećera.¹ Brojni 1,2,3-triazoli svoje biološko djelovanje duguju svojoj mogućnosti da djeluju kao rigidne poveznice kojima imitiraju zamjenu atoma i elektronska svojstva peptidne veze bez podložnosti hidrolizi.⁹

Korištenje 1,2,3-triazolnih derivata kao farmaceutika mnogo duguje razvoju nukleozidnih analoga korištenih u medicinske svrhe koji je imao značajan utjecaj na antivirusnu i antitumorsku kemoterapiju. Više takvih analoga uspješno je razvijeno za liječenje humanog virusa imunodeficijencije (HIV), hepatitis B virusa (HBV), hepatitis C virusa (HCV), herpes simpleks virusa (HSV), citomegalovirusa (CMV) i varicella zoster virusa (VZV). Uvođenje triazolnog prstena u nukleozidne derivate postalo je često u praksi dizajniranja lijekova zbog poboljšanja biološke aktivnosti u antitumorske ili antivirusne svrhe. Najpoznatiji primjer je ribavirin, prvi triazolni nukleozid sa širokim spektrom snažnog antivirusnog djelovanja odobrenog za korištenje protiv hepatitis C virusa koji je danas korišten diljem svijeta. Razvoj azidotimidina (AZT) i ribavirina (Slika 10) kao antivirusnih lijekova bio je poticaj sintezi i procjeni biološkog djelovanja 1,2,3-triazolnih nukleozida.⁹



Slika 10. Strukture ribavirina i zidovudina

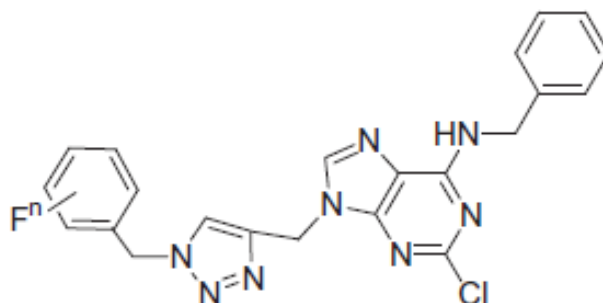
Brojni su 1,2,3-triazolni derivati na tržištu ili u zadnjim fazama kliničkih ispitivanja. Potencijalni lijekovi koji su bazirani na 1,2,3-triazolnom prstenu su antitumorski spoj karboksiamidotriazol (CAI), nukleozidni derivat kao inhibitor nenukleozidne reverzne transkriptaze (TSAO), β -laktamski antibiotik tazobaktam, cefalosporin cefatrizin i mnogi drugi.⁸ (Slika 11)



Slika 11. Potencijalni lijekovi bazirani na strukturi 1,2,3-triazola

Vezivanje triazolnih prstena na purinsku okosnicu česta je praksa imitiranja strukture molekule ATP-a koja je odgovorna za velik broj funkcija u organizmu, između ostalog i opskrbljivanja tumorskih stanica energijom. Pripravljanjem njenih biomimetika želi se inhibirati enzime koji ju prihvaćaju u svoje aktivno mjesto, pomoću nje šalju signale te između ostalog i dobivaju energiju.

Upravo su s ciljem inhibicije mnogih bioloških meta sintetizirani fluorarilni triazolni derivati bazirani na purinskoj jezgri (Slika 12). Pripravljene su bakrom kataliziranom 1,3-dipolarnom cikloadicijskom reakcijom, tzv. „klik“ reakcijom, a spojevima je ispitana biološka aktivnost i neurozaštitni učinci fluorescencijskom elektronskom mikroskopijom.

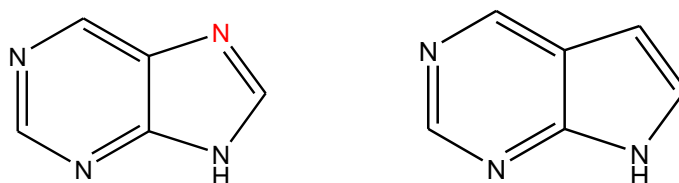


Slika 12. Triazolilni derivat purina

Razvoj ove klase spojeva potaknut je biološkim djelovanjem derivata prirodnog spoja flavona, flavopiridola koji je također pokazao učinkovitost u širokom spektru inhibicije kinaza ovisnih o ciklinu. Njegova negativna strana je relativno visoka citotoksičnost i nespecifičnost za određene ciljane kinaze, stoga je potrebno pronaći spojeve analogne njegovoj strukturi koji bi odgovarali zahtjevima i strukturno i djelovanjem. Štoviše, derivati flavopiridola trebali bi imati neurozaštitnu aktivnost bez prisutnosti štetnih posljedica. U pokušaju povećanja selektivnosti na određene vrste kinaza, pokušano je moduliranje hidrofobnosti molekula supstituiranjem fluoroarilnim prstenovima preko 1,2,3-triazolnih poveznica. Periodi inkubacije živčanih stanica i sintetiziranih spojeva od 48 sati i njihove analize koje su uslijedile imale su za posljedicu vrlo zanimljive zaključke. Naime, primijećen je trend ovisnosti broja fluorovih atoma u supstuentima molekule i neurozaštitnih učinaka. Nadalje, rezultati pokazuju da su pripravljene molekule mogući supstrati CDK5/p25 kompleksa, koji je odgovoran za ponovni ulazak u stanični ciklus, te bi u konačnici mogao dovesti do smrti živčane stanice. Povećanu neurotoksičnost moguće je objasniti pretjeranom aktivacijom spomenutog kompleksa, ali unatoč tomu, mnogi pripravljene produkti pokazali su zadovoljavajuću aktivnost.²³

2.4. 7-Deazapurini

7-Deazapurini (pirolo[2,3-*d*]pirimidini) su analozi purina u kojima je N-atom na položaju 7 purinskog prstena zamijenjen C-atomom (Slika 13), a zbog strukturne sličnosti s purinom njihovi derivati sintetiziraju se u razvoju lijekova najčešće radi biomimetičkih svojstava.⁴ Pirolo[2,3-*d*]pirimidini su poznati po širokom spektru biološke aktivnosti, uključujući i antitumorsku aktivnost. Također posjeduju antioksidativna svojstva, zbog čega imaju aktivnost i protiv zračenja. Osim toga, imaju istaknuta svojstva kao antimetaboliti u biokemijskim reakcijama purina. Djeluju kao inhibitori: dihidrofolat-reduktaze, tirozin-kinaze c-Src ili Lck, CDK te kao antagonisti receptora adenoзина.⁵

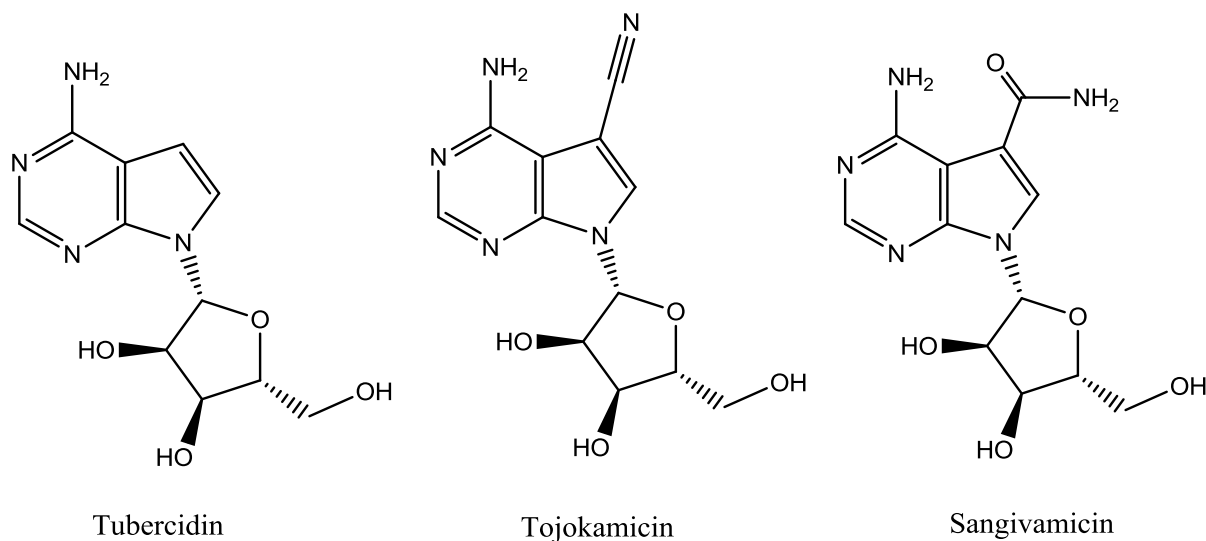


Slika 13. Struktura purinskog prstena i 7-deazapurina

Djelovanje ovih spojeva temelji se na mehanizmu umetanja u sintetizirajući lanac DNK umjesto 'pravih' dušičnih baza i prekidanje daljnje sinteze, čime se sprečava razmnožavanje tumorskih stanica, kao i onih koje su zaražene virusom. Uz djelotvornost učinka na zaražene, važno je promatrati i učinak koji molekula ima na zdrave stanice, odnosno citotoksičnost prema zdravim stanicama. Pronalaženje molekule koja će imati željenu selektivnu aktivnost prema zdravim i zaraženim stanicama cilj je razvoja derivata ove klase spojeva. U laboratoriju, nukleotidi koji nastaju sa 7-deazapurinima mogu zamijeniti prirodne nukleotide u lančanim reakcijama polimeraze, što može dovesti do modificirane DNK sa poboljšanim svojstvima. PCR (eng. polymerase chain reactions) predstavljaju reakcije u biokemijskoj tehnologiji koje se koriste za poboljšanje jednog dijela genetskog koda te sintetiziranja mnogobrojnih kopija određenog dijela DNK sekvence. Navedena poboljšanja odnose se na smanjenje temperature tališta dvostruke uzvojnice DNK, ali moguće je korištenje PCR-a i za jačanje heliksa DNK molekule. Prema tome, primjene variraju od jačanja veza za korištenje u poliakrilamidnoj gel elektroforezi, do reakcija sekvencioniranja DNK.⁴

Struktura 7-deazapurina prisutna je i u prirodnim spojevima, primjerice u tubercidinu (7-deaza-ATP) iz *Streptomyces spp.*, tojokamicinu u *Streptomyces rimosus* ili 5-jod-2'-

deoksitubercidinu iz crvene alge *Hypnea valendiae*.⁴ Neki od derivata sintetiziranih po uzoru na te biološke molekule pokazali su potpunu inhibiciju diobe stanica u oplodjenom jajetu morskog ježa. To istraživanje donijelo je korisna saznanja za razvoj i sintezu novih insekticida.²⁴ Brojni derivati 7-deazapurina već se nalaze na tržištu kao temeljni gradivni elementi antivirusnih i antitumorskih lijekova, ali i antibiotika. Od njih su najpoznatiji tubercidin, tojokamicin, i sangivamicin.²⁵

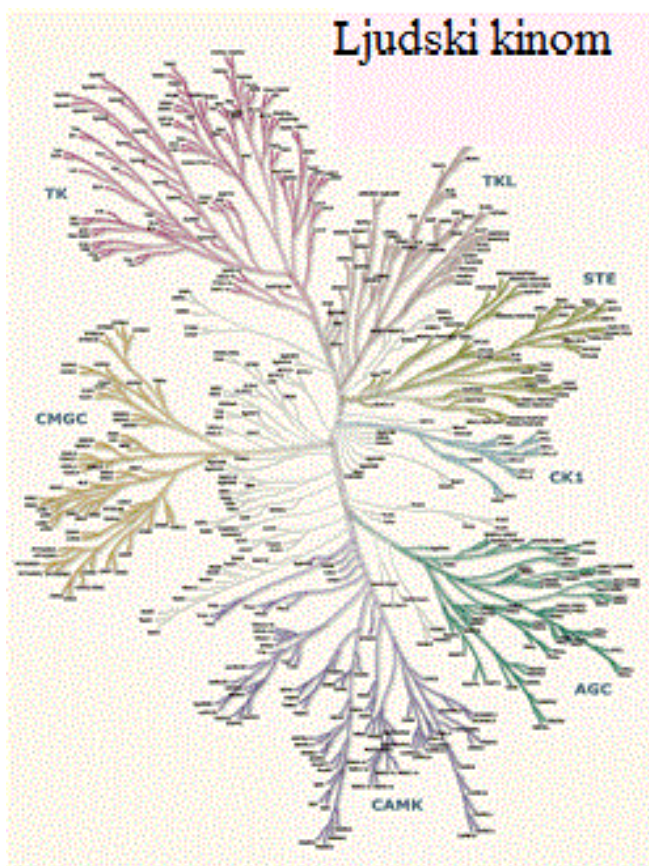


Slika 14. Strukture tubercidina, tojokamicina i sangivamicina

Iz njihovih struktura (Slika 14), vidljivo je da su svi spomenuti derivati adenoza, a tubercidin je 7-dezaadenozin. Tubercidin pokazuje širok spektar djelovanja kao kemoterapeutski agens protiv tumora, virusa, bakterija i gljivica, sudjelujući u procesiranju RNA i sintezi proteina kao mimetik adenoza.²⁶ Njegov analog tojokamicin pokazuje slična antitumorska i antibiotska svojstva, koja proizlaze iz njegovog jakog inhibitornog djelovanja. Inhibitor je samopucanja veza u RNK molekulama unutar stanica sisavaca, inhibitor fosfatidilinozitol-kinaze, te inhibitor signaliziranja auksina u biljaka.²⁷ Tojokamicin je pokazao specifičnu inhibiciju transkripcije gena reguliranu auksinima, a auksini su biljni hormoni koji imaju ključnu ulogu u razvoju biljke.²⁸ Sangivamicin je nukleozidni derivat koji pokazuje citotoksična i inhibitorna svojstva. Citotoksičan je za humani citomegalovirus (HCMV), a pokazao se kao učinkovit i selektivan inhibitor protein-kinaze C (PKC, $IC_{50} = 10\mu\text{M}$) koju inhibira kompetitivno u odnosu na ATP i nekompetitivno u odnosu na histonske i lipidne kofaktore.²⁹

2.4.1. 7-deazapurini kao inhibitori proteinskih kinaza

Proteinske kinaze su široka skupina evolucionarnih i strukturno povezanih enzima, koji fosforilacijom određenih aminokiselina, pretežito serina/treonina i tirozina, aktiviraju brojne proteine. Oni posreduju u prijenosu signala tijekom rasta stanica i diferencijacije. Terapeutski potencijal inhibitora kinaza proizlazi iz njihove ključne uloge u progresiji tumora i drugih bolesti. Postoji više od 500 različitih kinaza te one čine oko 2% ukupnog ljudskog genoma (Slika 15).



Slika 15. Prikaz svih kinaza u ljudskom tijelu-kinoma

Prva 3D struktura određena je 1991. godine, a danas postoji cijela baza podataka u kojoj se nalaze brojne kinaze te protein-ligand kompleksi sa više od 1000 različitih liganada. Njihove strukture pokazuju veliku kompleksnost alosteričkog utjecaja. Budući da sve kinaze pokazuju izrazito visok afinitet vezivanja za ATP, dugo su se smatrale metama koje je nemoguće inhibirati. Međutim, s povećanjem saznanja o strukturi, pronađeni su novi džepovi u blizini mjesta vezivanja adeninskog dijela ATP-a, tzv. Hinge regija. Iz brojnih istraživanja proizašli su lijekovi koji se danas nalaze na tržištu i vrlo su učinkoviti inhibitori različitih kinaza (npr. imatinib, Gleevec®, Novartis).⁶

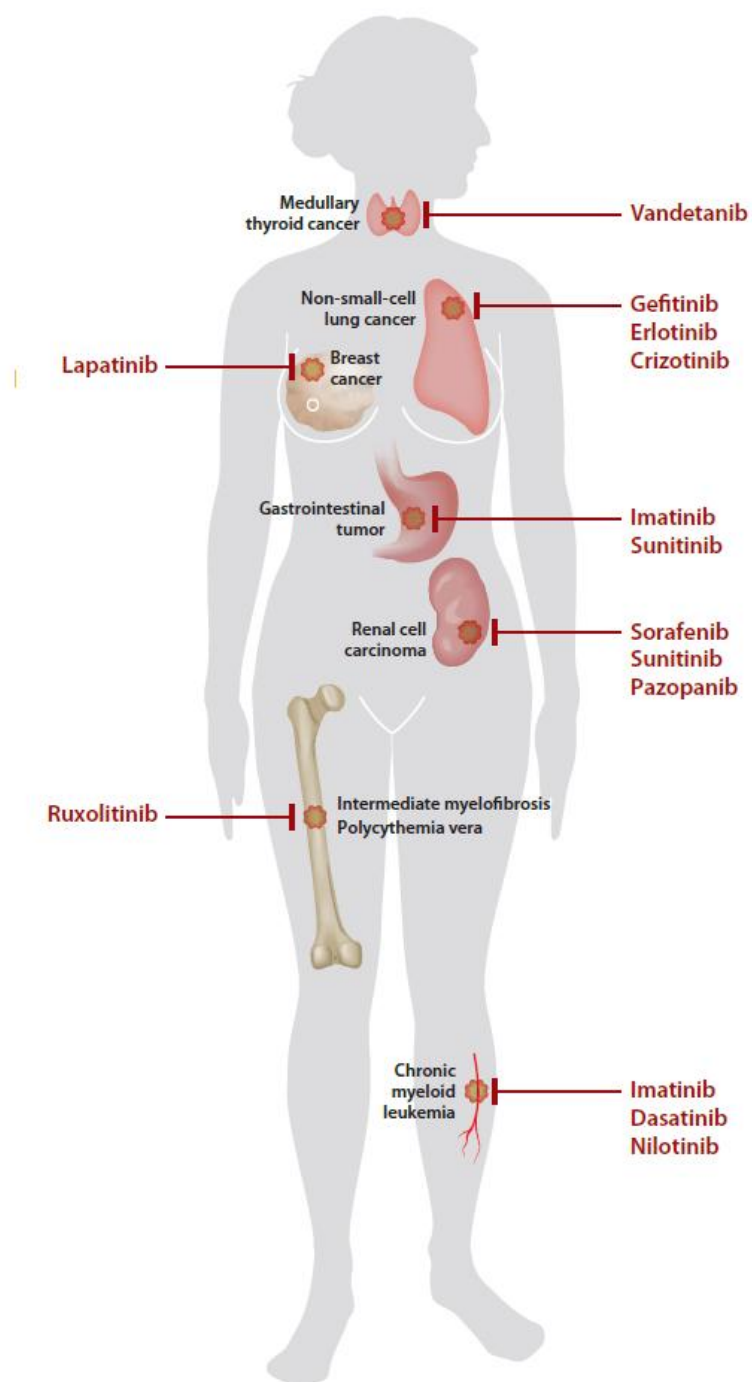
Inhibitori tirozin-kinaze, predstavljaju klasu kemoterapijskih lijekova koji inhibiraju ili blokiraju enzim tirozin-kinazu. Stvoreni su modernom genetikom, razumijevanjem molekule DNK, staničnog ciklusa, te načinima prijenosa signala u molekuli, zbog čega predstavljaju promjenu u odnosu na molekularne metode liječenja raka. Ta činjenica umanjuje rizik oštećenja zdravih stanica i povećava efikasnost liječenja jer omogućava utjecanje na specifične vrste raka.

Za razumijevanje načina na koji funkcioniraju inhibitori tirozin-kinaze, potrebno je problem prmatrati na razini stanice. Receptorske tirozin-kinaze (RTK) su skupina proteinskih tirozin-kinaza, koje su smještene sa unutarnje (intracelularne) i vanjske (ekstracelularne) strane stanične membrane. Unutarnje imaju ulogu uklanjanja fosfatne skupine, procesa koji se naziva fosforilacija, sa koenzima ATP, dok vanjske sadrže mjesta na koja se mogu vezivati proteini i hormoni koji donose signale. Mnogi od tih vezujućih signalizatora predstavljaju čimbenike rasta. Čimbenici rasta su uključeni u inicijalizaciju i regulaciju ciklusa u stanici, a ovisno o utjecaju čimbenika na stanicu postoje različite vrste. Među čimbenicima koji su povezani sa djelovanjem na tirozin-kinazu poznajemo tri glavne skupine, a svi njihovi receptori pripadaju skupini receptorskih tirozin-kinaza. Epidermalni čimbenici rasta (EGF) pomažu pri regulaciji staničnog rasta i diferencijaciji, trombocitni derivirani čimbenici rasta (PDGF) reguliraju stanični rast i razvoj, a vaskularni endotelijalni čimbenici rasta (VEGFR) su uključeni u nastajanje krvnih živa. Čimbenici rasta i kinaze ponašaju se kao da imaju uključenu i isključenu fazu. Uključenje staničnih procesa postiže se uklanjanjem fosfatne skupine, čime se mijenja oblik i rad proteina. Kada je jedan od procesa završen, fosfatna skupina je uklonjena i taj protein je „isključen“. Ukoliko dođe do mutacije, proces „uključivanje/isključivanje“ može biti ometan, zbog čega dolazi do nereguliranosti staničnog rada. Takvo stanje podrazumijeva i nereguliranu receptorsku tirozin-kinazu, koja vezana za epidermalni čimbenik rasta, može dovesti do nekontroliranog rasta i diobe stanice. Ubrzani stanični rast može tada dovesti do raka. Mutacije receptorske tirozin-kinaze često vode do onkogeno, odnosno gena koji pomažu pretvaranju zdrave stanice u tumorsku stanicu. Inhibitori tirozin-kinaze djeluju na rak ispravljajući tu neregularnost, ali mehanizam kojim se taj proces odvija uvelike ovisi o lijeku. Mnogi se primjeri mogu naći u lijekovima koji su dostupni na tržištu, kao što je već spomenuti imatinib koji, primjerice, blokira vezivanje jednog od gena kinaze na ATP, sprečavajući fosforilaciju koja bi pridonijela tumorskoj stanici i potakla diobu zaraženih stanica. Drugi lijek, gefinitib (Iressa®, AstraZeneca i Teva), inhibira endotelne čimbenike rasta te tako onemogućava zadržavanje signala „uključenja“

stanice i stvaranje nekontroliranog razvoja zaraženog tkiva. Jedan od glavnih problema tradicionalne kemoterapije je uništavanje zdravih stanica. No, inhibitori tirozin-kinaze su usmjereni tako da njihove različite vrste mogu biti specifične za pojedinu vrstu raka, te kao takvi djeluju na glavne uzroke rasta zaraženih stanica. Osim toga, čest je slučaj da i sama kinaza biva modificirana, što znači da inhibitor može specifično djelovati na tumorske stanice. Trenutno jedini tretman koji se bazira na sličnom principu je korištenje monoklonalnih antitijela, koja mogu biti korištena za ciljano djelovanje na stanice raka preferirano u odnosu na zdrave. Upravo zbog te specifičnosti, djelovanje inhibitora tirozin-kinaze rezultira manjom vjerojatnosti nuspojava i kraćim vremenom provedenim u bolnici za pacijenta.³⁰

Ovo je područje vrlo aktualno u razvoju farmaceutika zbog velikog broja vrsta inhibitora i njihove interakcije s proteinskim tirozin-kinazama. Sve trenutno korištene specije vežu se u aktivna mjesta predviđena za molekule ATP-a, a upravo je to razlog zbog kojih su derivati 7-deazapurina toliko važni predstavnici u ovom polju, zbog svoje strukturne sličnosti s aktivnim molekulama. Analizom dosad sintetiziranih derivata utvrđeno je da prostora za modeliranje i dizajn novih spojeva i dalje ima, odnosno da nisu iscrpljene sve mogućnosti koje bi mogle pokazati djelovanje uzrokovano imitiranjem biomolekula koje inače intereagiraju s enzimima. Logično je zaključiti da će se primjena 7-deazapurinskih derivata proširiti i na druge vrste enzima i aktivnih mjesta, zbog učestalosti njima sličnih biomolekula u svim živim organizmima.³¹

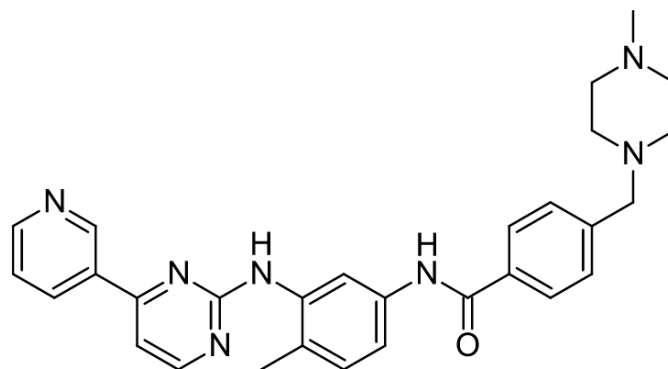
Vrlo učinkovit način otkrivanja novih inhibitora je pretraživanje bazirano na fragmentima. Prema tom konceptu, lijek može biti iskrojen od sitnih fragmenata, za razliku od skeniranja aktivnog mjesta i potrage za visoko aktivnom supstancom. Prije svega, velika baza malih fragmenata uspoređuje se s metom te se naknadno ustanovljuje koje su se specije najbolje vezale, čak i uz male afinitete. Koristeći strukturne podatke i kompjutorsko modeliranje, istraživači su dizajnirali, sistematski sintetizirali i pregledali nove molekule bazirane na pronađenim okosnicama. Spomenutim je pristupom vrlo selektivni agens Plexxikon u 6 godina dospio iz koncepta do tržišta.³¹



Slika 16. Prikaz raširenosti primjene nukleozidnih analoga

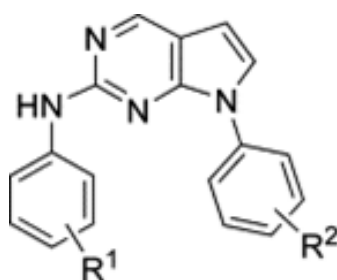
Noviji pristup nalaže potragu za kompetitivnom inhibicijom supstrata, a ne kompetitivnom inhibicijom molekule ATP-a. Razlog leži u činjenici da je mnogo veći broj enzima za koje se ATP veže u aktivno mjesto, nego što postoji serin/treonin i tirozin kinaza (one predstavljaju tek 30-tak posto svih enzima kojima je potreban ATP). Iz tog se razloga dizajniraju molekule prema aktivnom mjestu koje je potrebno „popuniti“, drugim riječima,

kreiranja ključa zadovoljavanjem potreba brave, a ne kopiranjem postojećeg ključa. Takve su pretpostavke već dugo poznate, ali novi inhibitori se i dalje sintetiziraju prema svojoj sličnosti obliku molekule ATP-a, jer su njena kompaktnost i strukturna definicija u odnosu na onu aktivnog mjesta enzima neusporedivo veće. Pristup je to koji je dao mnoge snažne derivate 7-deazapurina poput imatiniba (Slika 17), koji već godinama u kliničkoj uporabi služi pacijentima oboljelima od kronične mijeloične leukemije te služi kao dokaz da su 7-deazapurini strukturno od neizmjerne važnosti kao novi potencijalni inhibitori kinaza.³¹



Slika 17. Struktura imantiniba

Sintetiziran je niz 2-amino-9-aryl-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidina čija je meta fokalna adhezijska kinaza (FAK). Veliki broj ovih 7-deazapurina pokazuje inhibirajuće djelovanje prema fokalnoj adhezijskoj kinazi u niskom mikromolarnom području, a njihov preliminarni SAR potvrđen je sistematskom kemijskom modifikacijom, te je utvrđeno da 2-amino-9-aryl-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidini predstavljaju novu grupu inhibitora kinaza.³²



Slika 18. Inhibitor fokalne adhezijske kinaze

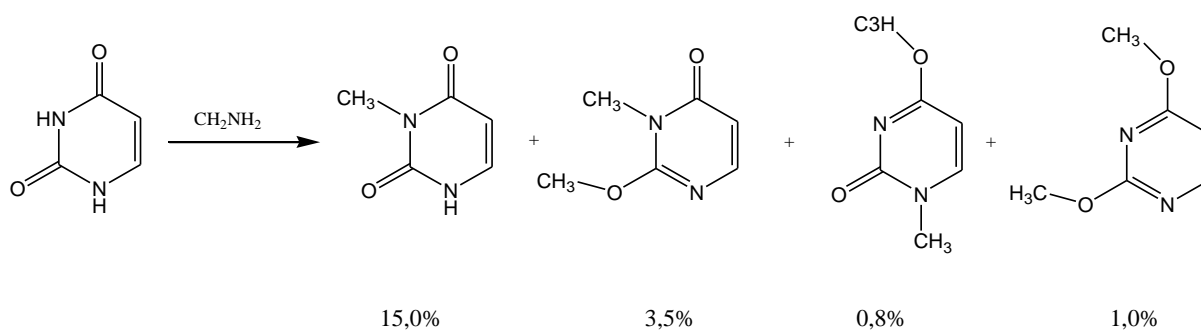
Timidilat-sintaza (TS) i dihidrofolat-reduktaza (DHFR) esencijalni su enzimi u biosintezi folne kiseline. TS katalizira reakciju deoksihidrin-monofosfata s metilen tetrahidrofolatom čiji je produkt deoksitimidin-monofosfat i dihidrofolat (H₂F). DHFR katalizira redukciju H₂F u prisutnosti nikotinamidadenin dinukleotid-fosfata (NADPH) čime

nastaje tetrahydrofolat (H₄F). Stoga je sintetizirana serija 2-amino-4-okso-6-supstituiranih pirolo[2,3-*d*]pirimidina kao potencijalnih antifolata čija su meta timidilat-sintaza i biosinteza purinskih nukleotida. Kondenzacijom 2,4-diamino-6-hidroksipirimidina i etil-4-kloroacetata, a potom hidrolizom nastaje ključni intermedijer, 2-amino-4-okso-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-6-il-octena kiselina. Povezivanje s raznim metilnim esterima amino kiselina, a potom saponifikacijom i kondenzacijom s 3-(aminometil)piridinom nastaju ciljani derivati pirolo[2,3-*d*]pirimidina, koji su pokazali antiproliferativnu aktivnost u mikromolarnim i submikromolarnim koncentracijama protiv staničnih tumorskih linija, uključujući KB, A549 i HepG2. Rezultati studija pokazali su da se amidino supstituirani derivat 7-deazapurina (Slika 19) može vezati i inhibirati timidilat-sintazu (TS) i dva purinska biosintetska enzima (GARFTaza i AICARFTaza), što je u skladu s rezultatima metaboličkih analiza *in vitro*. Nadalje, ustanovljeno je da je navedeni derivat odličan predvodni spoj za daljnje optimiranje strukture kao antifolat širokog spektra djelovanja.⁷

Slika 19. Struktura amidino supstituiranog derivata 7-deazapurina

2.5. *N*-alkiliranje pirimidina

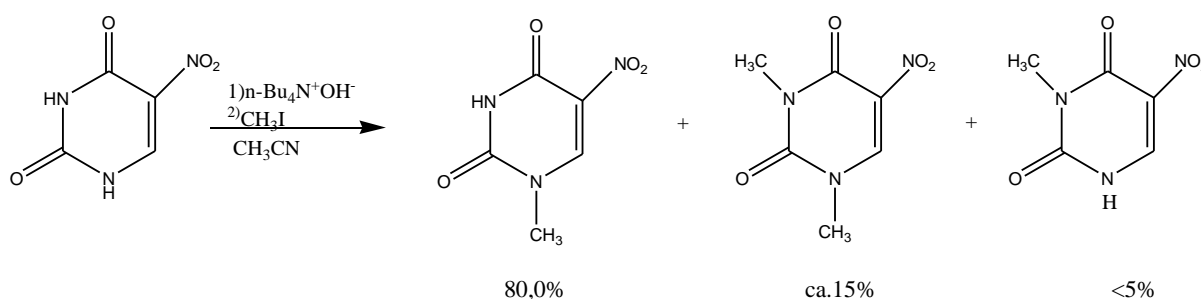
Uracil podliježe alkiliranju na dušikovom atomu u reakciji s pogodnim alkilirajućim reagensima. Metiliranjem uracila nastaju dimetilni derivati (Shema 1). Glavni je produkt 1,3-dimetiluracil, a reakcijom nastaju i određene količine 3-metoksi-1-metil-[1*H*]-2-pirimidona, 2-metoksi-3-metil-[3*H*]-4-pirimidona i 2,4-dimetokspirimidina.



Shema 1.

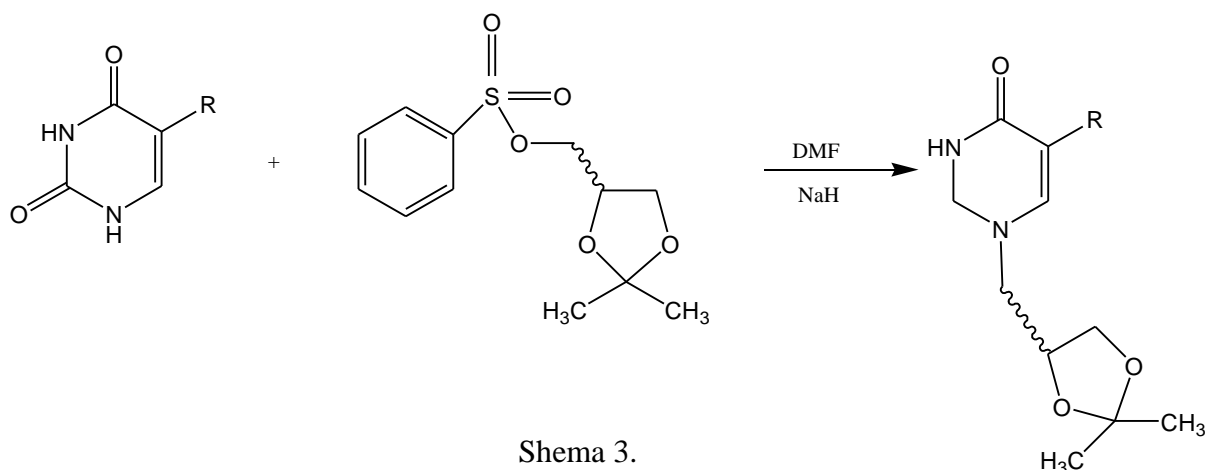
Alkiliranje uracila često se temelji na supstituciji dobro odlazeće skupine koja je prisutna u alkilirajućem reagensu s aktiviranom molekulom uracila. Najpopularniji alkilirajući reagensi su alkilni halogenidi.³³

Derivati uracila slabi su nukleofili pa zahtijevaju aktiviranje deprotoniranjem. Kao deprotonirajući reagensi upotrebljavaju se: NaH, K₂CO₃ ili organske baze poput dimetilaminopiridina (DMAP), trietilamina (TEA), ili diazabicikloundekena (DBU). Soli uracila koje su dobivene *in situ* reagiraju s alkilirajućim reagensom u polarnom otapalu (DMF, DMSO).³⁴ U skladu sa steričkim uvjetima, *N*-1-supstitucija je preferirana. Međutim, kao sporedni produkti nastaju i *N,N*-1,3-disupstituirani i *N*-3-supstituirani derivati uracila (Shema 2).



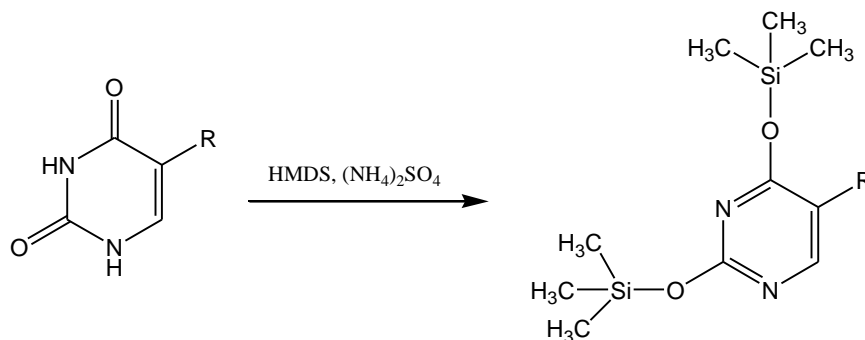
Shema 2.

Na položaj *N*-3 i na kisikove atome karbonilnih skupina vežu se glomazni alkil-halidi. *O*-Alkilni eteri uracila izomerizacijom prelaze u odgovarajuće *N*-alkilne derivate. Pod uvjetima Hilbert-Johnsonove reakcije 2,4-dialkoksipirimidini reagiraju sa zaštićenim glikozil-kloridima dajući pirimidinske nukleozide.³⁵ Jedan od načina *N*-alkiliranja uracila i njegovih derivata je korištenje alkil-sulfata. Metiliranje s dimetilsulfatom u vodenoj otopini NaOH daje 1,3-dimetiluracil u visokom iskorištenju. Areno-sulfatni esteri primarnih alkohola također se ubrajaju u učinkovite alkilirajuće reagense (Shema 3).³⁶



Shema 3.

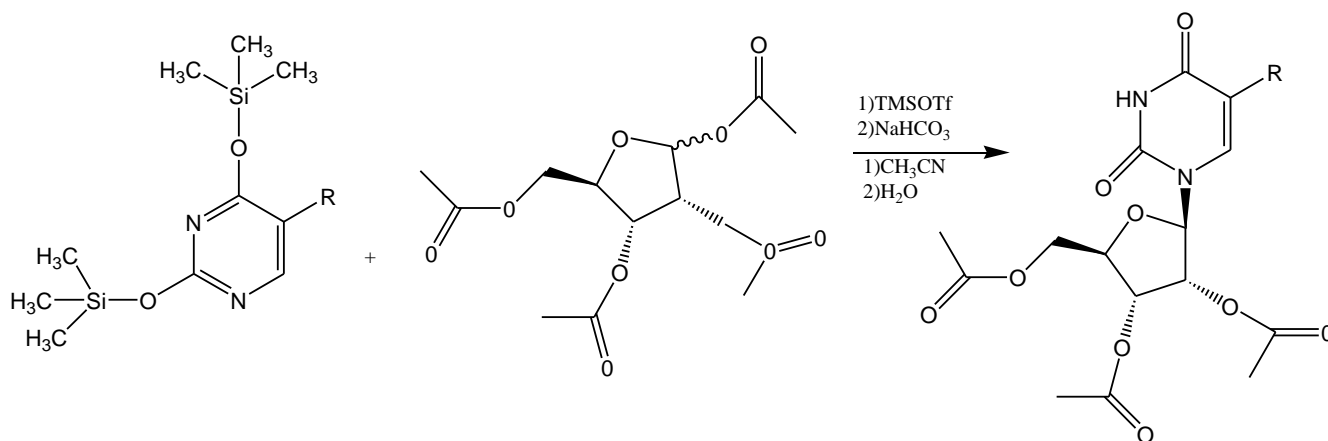
1,1,1,3,3,3-Heksametildisilazan (HMDS) prevodi uracil i njegove derivate u odgovarajuće 2,4-bis(trimetilsililoksi)-pirimidine u prisutnosti katalitičke količine amonijevog sulfata (Shema 4). Klortrimetilsilan se također može primijeniti kao sililirajući reagens, a reakcija se provodi u neutralnom organskom otapalu u prisutnosti tercijarnog amina. *O*-Trimetilsililni pirimidinski eteri hidrolizom prelaze u uracil.



R=H, CH₃, F, Cl, Br, NO₂

Shema 4.

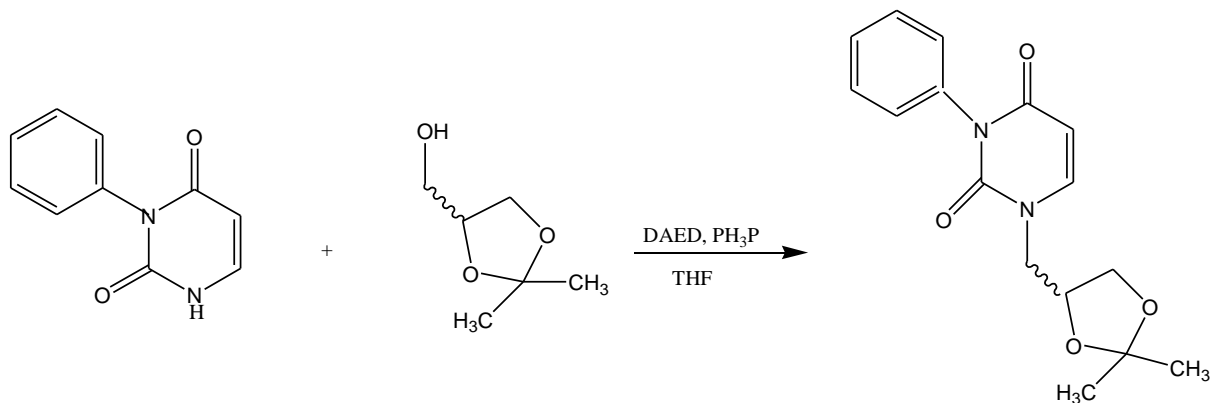
Najprimjenjivija metoda za sintezu nukleozida i njihovih analoga je Vorbüggеноva metoda u kojoj se primjenjuju trimetilsililni eteri uracila (Shema 5).³⁷ 2,2-Bis(trimetilsililoksi)-pirimidini reagiraju sa *per-O*-acetil-D-ribofuranozom u prisutnosti Lewisove kiseline dajući derivate β-uridina.



R=H, CH₃, F, Cl, Br, NO₂

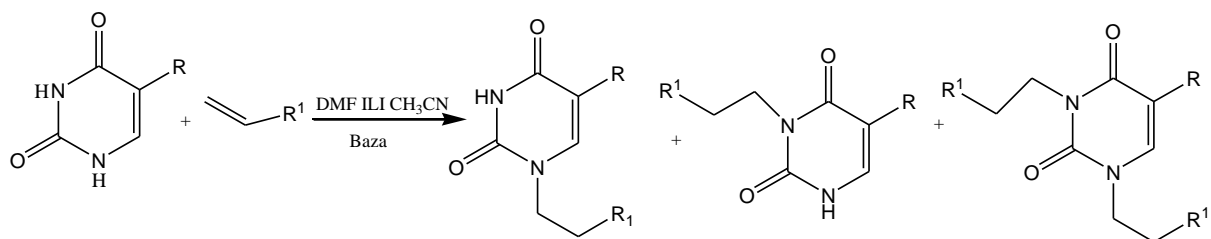
Shema 5.

Jedan od načina za *N*-alkiliranje uracila je i Mitsunobu reakcija (Shema 6).³⁸ Primarni ili sekundarni alkoholi prevode se primjerice u estere u uvjetima Mitsunobu reakcije uz trifenilfosfin i azodikarboksilat (dietilazodikarboksilat, DEAD).



Shema 6.

Uracil i njegovi derivati podliježu i tzv. Michaelovoj reakciji tj. adiciji na α,β -nezasićene sustave (Shema 7).³⁹



$\text{R}=\text{H}, \text{Br}, \text{NO}_2, 2\text{-metil-4-nitroimidazol-1-il}$

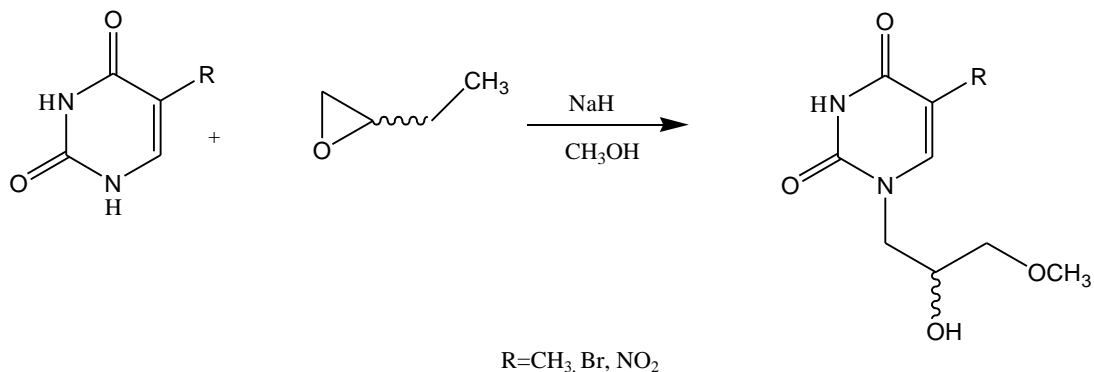
$\text{R}^1=\text{COOCH}_3, \text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

Shema 7.

Regioselektivnost ove adicije ovisi o supstituentu koji je vezan na položaju C-5 uracilnog prstena te o primijenjenom reagensu. Primjenom trietilamina dolazi isključivo do *N*-1 adicije, bez obzira na vrstu supstituenta koji je vezan na položaj C-5. U prisutnosti DBU-a ili DMF-a kao otapala, kao glavni produkt reakcije nastaje *N*-3 produkt, uz iznimku koja se

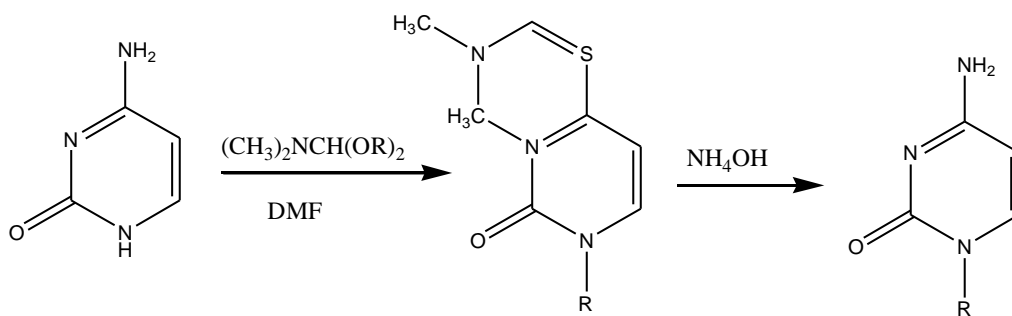
pojavljuje kod derivata 5-nitrouracila. Nitro skupina sudjeluje u delokalizaciji elektrona, a u tom je slučaju *N*-1 anion stabilniji od *N*-3 aniona, stoga nastaje samo *N*-1 produkt.

Uracil i njegovi derivati također se mogu alkilirati oksiranima (Shema 8).⁴⁰



Shema 8.

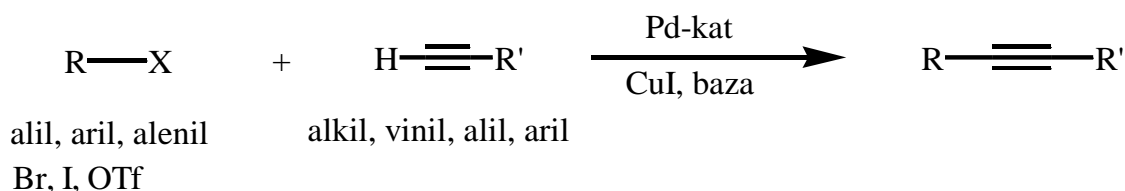
Važnost *N*-alkiliranja citozina leži u činjenici da ti spojevi imaju inhibitorno djelovanje na deoksicitidin-kinazu, sparivanje komplementarne baze sa 9-supstituiranim-gvaninom, međupirimidinsko slaganje baza i asimetrične međubazne vodikove veze. Koriste se za spektroskopsku detekciju ograničene rotacije amino skupina izvan stanične jezgre i najvažnije, služe kao prekursori mnogih visoko topljivih, brzo djelujućih antibakterijskih spojeva poput sulfacitina (1-etil-*N*⁴-sulfanilcitozin). Na shemi 9 prikazana je metoda sinteze *N*-1-metil-citozina koja uključuje reakciju citozina s *N,N*-dimetilformamidmetil-acetatom nakon koje slijedi hidroliza. U prvom koraku citozin reagira s *N,N*-dimetilformamidialkil-acetatom u bezvodnom dimetilformamidu pri čemu nastaje odgovarajući 1-supstituirani-*N*⁴-[(dimetil-amino)metilen]citozin u visokom iskorištenju. Navedeni produkt potom ulazi u reakciju hidrolize s koncentriranim amonijevim hidroksidom pri čemu nastaje odgovarajući *N*-1-supstituirani citozin.⁴¹



Shema 9. *N*-alkiliranje citozina

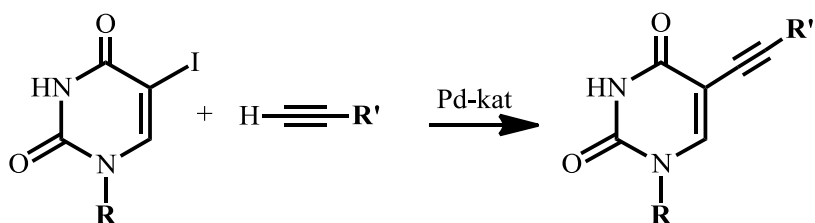
2.6. Sonogashira-ina reakcija

Sonogashira-ina reakcija je metoda za pripravu konjugiranih enina ili arilnih alkina kondenzacijom vinilnih ili arilnih halogenida s terminalnim alkinima. To je paladijem katalizirana reakcija koja se sve više koristi u sintezi navedenih spojeva s primjenom u kemiji, farmaciji ili proizvodnji materijala. 1975. godine otkrio ju je japanski kemičar Kenkichi Sonogashira te je po njemu i dobila ime. Reakcija vinilnog ili arilnog halida sa terminalnim alkinom može dati tisuće produkata pa su se dugo godina istraživali mogući reakcijski putevi, a otkrićem Sonogashira-ine reakcije razjašnjeni su mnogi reakcijski mehanizmi. Još uvijek postoje pokušaji da se promjenom reakcijskih uvjeta utječe na Sonogashira-inu reakciju, no uglavnom je zadržan izvorni oblik reakcije. Sonogashira-ina reakcija unakrsnog spajanja provodi se uz paladijev katalizator, ko-katalizator bakrov(I) jodid te višesupstituiran amin (Schema 10).



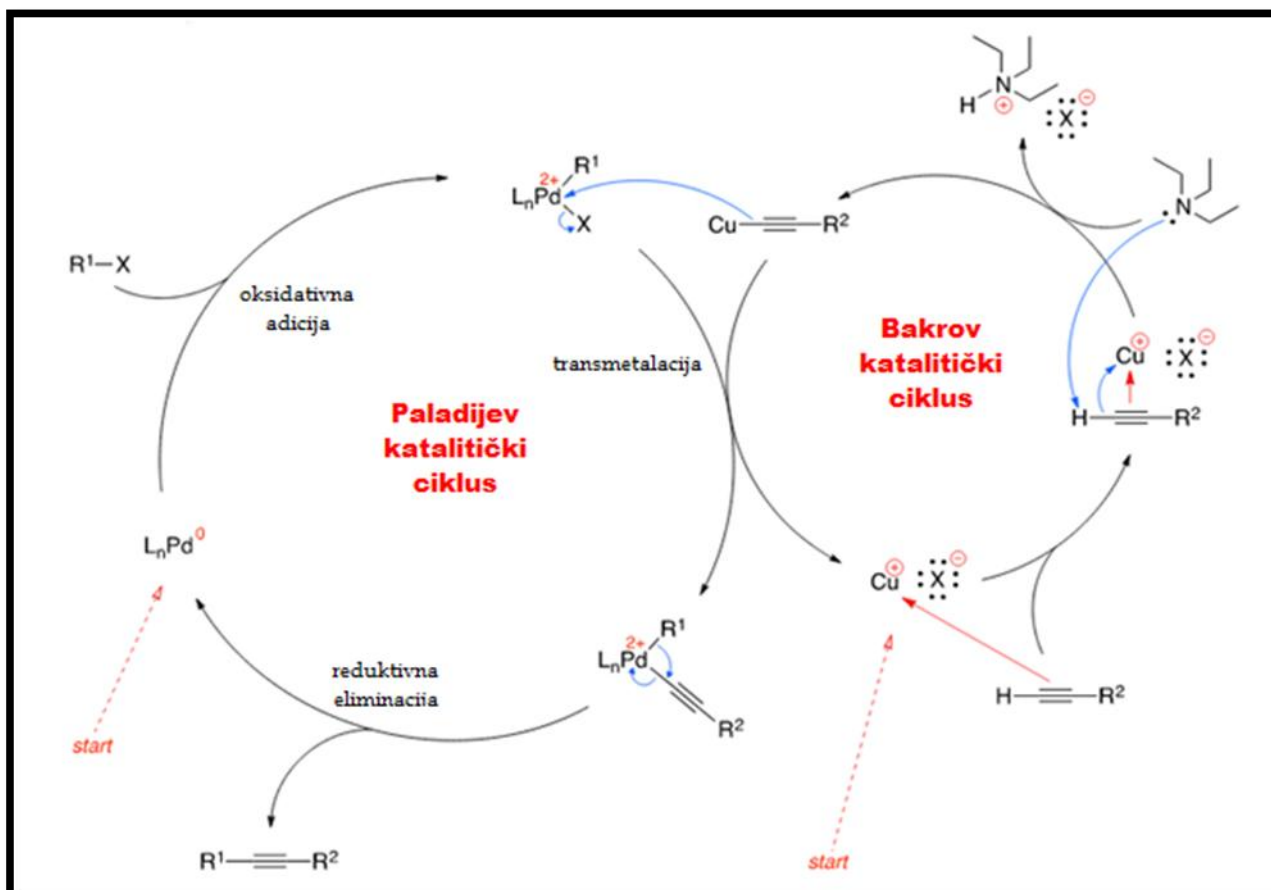
Schema 10. Sonogashira-ina reakcija

Istraživanjima sinteze antivirusnih lijekova iz reda pirimidinskih nukleozida, pokazano je da su derivati pirimidina, koji imaju vezan atom joda na C-5 atomu, dobri sintetski intermedijari za stvaranje nove C-C ili C-heteroatom veze, pri čemu se atom joda u položaju C-5 supstituira elektrofilom.⁴² Za uspješno povezivanje terminalnih alkina s 5-jodnukleozidima izuzetno je važan i odabir otapala, kao i omjer katalizatora te ko-katalizatora (Schema 11). Na primjer, omjer Cu : Pd = 2 : 1 pokazao se najboljim za povezivanje s alkinima jer je na taj način moguće izbjeći nastajanje sporednih produkata.⁴³



Schema 11. Sonogashira-ina reakcija 5-jodnukleozidnih derivata s terminalnim alkinima

Zbog otežane izolacije i analize organometalnih spojeva koji nastaju kao intermedijeri, mehanizam Sonogashira-ine reakcije nije u potpunosti poznata, a predloženi mehanizam prikazan je na shemi 12.⁴⁴



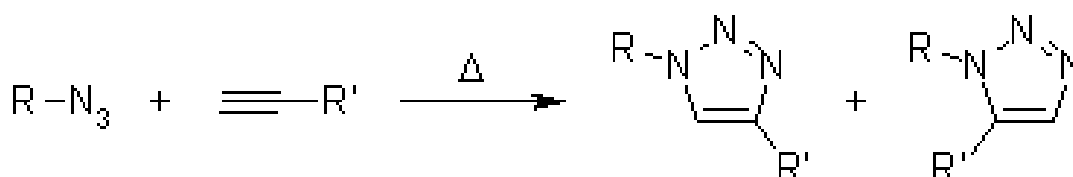
Shema 12. Mehanizam Sonogashira-ine reakcije

Arilni halid ulazi u paladijev katalitički ciklus oksidativnom adicijom pri čemu nastaje organometalni spoj kao produkt vezanja arila i halogenog elementa zasebno za atom paladija. Istovremeno u bakrovom katalitičkom ciklusu dolazi do disocijacije bakrovog halogenida i nastajanja organometalnog spoja u kojem se bakar veže na alkin supstitucijom s terminalnim atomom vodika, koji se veže na višesupstituirani amin koji sa halogenidom nastalim disocijacijom s bakrom, tvori kvaternu amonijevu sol. Ta dva organometalna spoja transmetaliranjem uzrokuju otpuštanje halogena u arilnom, te bakra u alkinilnom spoju, uz regeneraciju bakrovog halogena u bakrovom katalitičkom ciklusu. U konačnom stupnju, reduktivnom eliminacijom nastaje produkt Sonogashira-ine reakcije stvaranjem veze između arila i alkina, uz regeneraciju paladijevog katalizatora u paladijevom katalitičkom ciklusu.

Sonogashira-ina reakcija je bila odlično prihvaćena kada je po prvi put objavljena, jer je predstavljala rješenje mnogih problema s kojima su se organski kemičari tada susretali. Uvođenjem bakrovog(I) jodida kao katalizatora u kombinaciji sa paladijevim katalizatorom omogućena je konjugaciju eninskih i arilnih alkina na sobnoj temperaturi.^{42c}

2.7. „Klik“ kemija

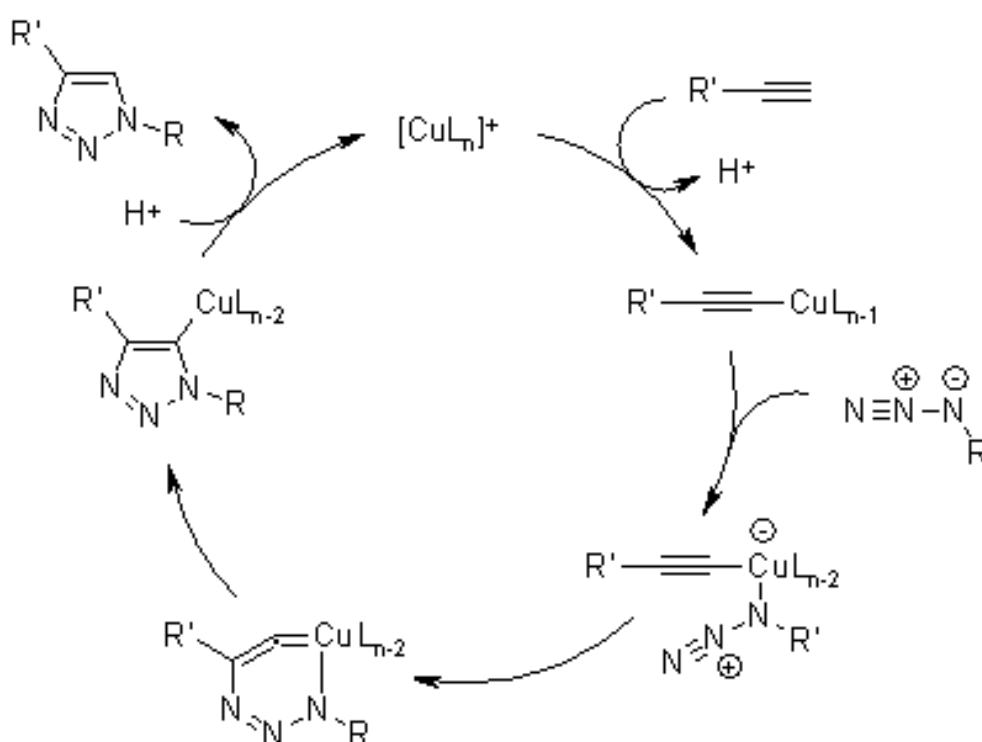
Više je mogućih načina sinteze 1,2,3-triazola, no najpoznatiji je pristup takozvana „klik“ kemija. Pojam „klik“ kemija uveo je K.B. Sharpless 2001. godine želeći opisati reakcije koje su visokog iskorištenja, širokog spektra primjene, stvaraju samo produkte koje je moguće otkloniti bez kromatografskih postupaka, reakcije koje su stereospecifične, jednostavne izvedbe te mogu biti provedene u lako uklonjivim ili bezopasnim otapalima. Nekoliko je vrsta reakcija za koje je pronađeno da odgovaraju navedenim kriterijima, termodinamički povoljne reakcije koje vode ka jednom produktu kao na primjer otvaranje nukleofilnog epoksidnog ili aziridinskog prstena, nealdolne karbonilne reakcije poput sinteze hidrazona i heterocikla, adicija na višestruke ugljik-ugljik veze kao oksidacijsko stvaranje epoksida, Michaelova adicija te cikloadicije. Uzevši za primjer cikloadiciju između azida i alkina vidljivo je da ona ispunjava mnoge od navedenih uvjeta. Brojni početni monosupstituirani alkini i organski azidi lako su dostupni na tržištu, a mnogi drugi lako se mogu sintetizirati kreiranjem molekula s širokim spektrom funkcionalnih skupina, čija cikloadicija selektivno daje za produkte 1,2,3-triazole.



Shema 13. Opća shema Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije

Spomenuta cikloadicija koja obuhvaća reakciju između acetilena i azida naziva se Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija. Nažalost klasična termička reakcija alkina i azida zahtijeva povišenu temperaturu i vrlo često ima za produkte smjesu dva regioizomera kada se koriste terminalni alkini (Shema 13). U skladu s prethodno navedenim, to joj svojstvo ograničava da bude svrstana u „klik“ reakcije. Kasnije otkrivena bakrom katalizirana varijanta koja slijedi drugačiji mehanizam, te ju je moguće provoditi u vodenom mediju, dozvoljava specifičnu sintezu 1,4-disupstituiranih izomera. Osim nje, pronađena je i druga inačica reakcije, katalizirana rutenijem, koja za razliku od one katalizirane bakrom ima suprotnu regioselektivnost i rezultira sintezom 1,5-disupstituiranih triazola. Stoga, ove katalizirane reakcije potpuno zadovoljavaju kriterije i zaslužuju nazivati se definicijom „klik“ kemije te stavljaju naglasak na azido-alkinsku cikloadiciju kao prototip svim „klik“ reakcijama.⁴⁵

Kao jedna od najboljih “klik” reakcija bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija ubrzava reakciju za golemih 10^7 do 10^8 u odnosu na nekataliziranu 1,3-dipolarnu cikloadiciju. Uspješna je pri širokom temperaturnom rasponu, neosjetljiva na vodene uvjete uz raspon pH u vrijednostima od 4 do 12 i toleranciju prema velikom broju funkcionalnih skupina. U idealnim uvjetima, čisti produkti izoliraju se filtriranjem ili ekstrakcijom bez potrebe za kromatografskim ili metodama prekrizacije. Što se samog mehanizma reakcije tiče, pronađeno je da koordinacija bakra na acetilen nije korak koji ubrzava 1,3-dipolarnu cikloadiciju. Takav proces izračunat je kao manje povoljan od nekatalizirane reakcije. Umjesto tako koordinirane specije, nastaje bakrov acetilid, nakon čega azid uzrokuje vezivanje na bakar i odbacivanje još jednog liganda pa se tada se stvara neobična šesteročlana ciklička struktura. Ukrućivanje prstena stvaranjem peteročlanog triazolilnog bakrenog derivata popraćeno je protonolizom koja dovršava konačni triazolni produkt i zatvara katalitički krug (Shema 14).⁴⁶ Ova se reakcija smatra najboljom „klik“ reakcijom i našla je primjenu u raznim granama razvoja lijekova. Gotovo je savršena uzevši u obzir njenu primijenjivost, visoku razinu pouzdanosti i potpunu regiospecifičnost. Štoviše, jedna od ključnih ideja „klik“ filozofije je korištenje kemijskih reakcija u svrhu konstruiranja kompleksnih funkcionalnih molekula iz relativno jednostavnih početnih komponenti. Sintaza lijekova je upravo zbog toga područje bioznanosti koje je najviše profitiralo razvojem “klik” koncepta.⁹



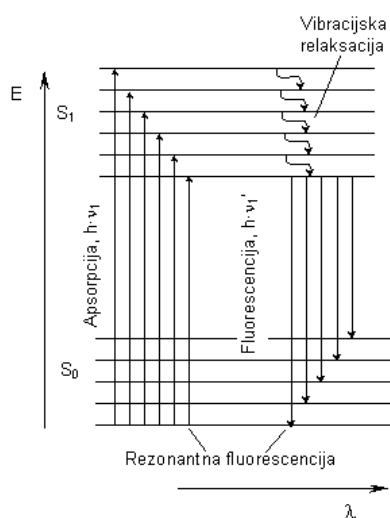
Shema 14. Katalitički krug bakrom katalizirane Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije

2.8. UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencija je uz fosforescenciju jedna od 2 vrste luminiscencije koje su česti prirodni fenomeni, ali nerijetko se mogu iskoristiti i u spektroskopske svrhe. Kada se elektron pobudi vanjskim izvorom energije (toplinskim, električnim, svjetlosnim) i prijeđe na viši energetska nivo može postojati u dvije različite vrste pobuđenih stanja, singletnom i tripletnom. Ukoliko ne dođe do vibracijske relaksacije, unutarstavnog prijelaza ili unutarnje konverzije, elektron natrag do osnovnog stanja mora doći uz emisiju energije u obliku elektromagnetskog zračenja. Ta se pojava manifestira u trenutku povratka u niže energetska stanje iz singletnog (fluorescencija) ili tripletnog (fosforescencija) pobuđenog stanja.

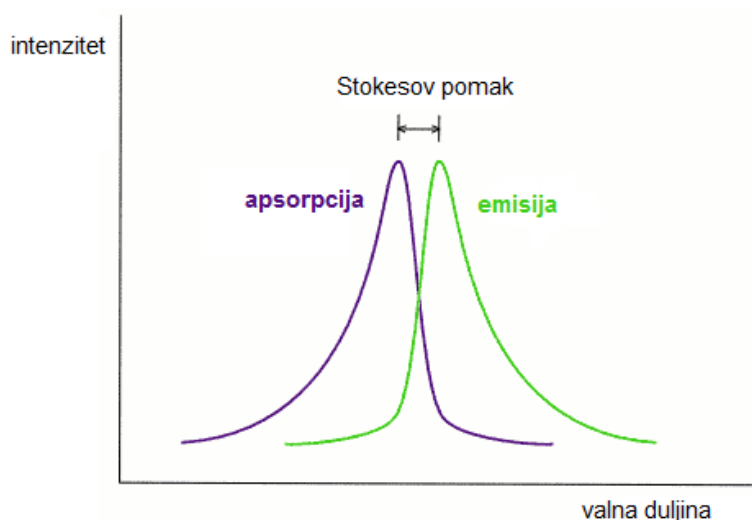
Takve su pojave najčešće u konjugiranim sustavima čiji su elektroni toliko stabilizirani da energije potrebne za njihovu pobudu u više energetska stanje ekvivalentne onima koje je moguće postići UV ili vidljivim dijelom spektra elektromagnetskog zračenja. Spojevi takvih svojstava obično su aromatske molekule, drugi polieni te oni koji sadrže karbonilnu skupinu.

Put elektrona u pobuđeno stanje te emisija svjetlosti shematski se prikazuje Jablonski dijagramom (Slika 20) U njemu su prikazana singletna pobuđena stanja te unutar njih vibracijska stanja, čijom se promjenom relaksira fluorescentna molekula do najnižeg vibracijskog stanja, jedinog iz kojeg se može događati fluorescencija (Vavilovljevo pravilo). Ona se manifestira emitirajući foton, ali i generirajući toplinu. Energija i relativni intenziteti fluorescencijskih signala daju nam informaciju o strukturi i okolini fluorofora.



Slika 20. Jablonski dijagram fluorescencije

Analiziranjem Jablonski dijagrama, moguće je utvrditi da je energija emisije, odnosno fluorescencije niža od apsorbirane energije te se ona odvija pri nižim valnim duljinama. Prateći proces apsorpcije svjetla, uočavamo pobuđivanje elektrona do višeg vibracijskog stanja S1 ili S2. U većini slučajeva, sa rijetkim iznimkama, molekule se brzo vraćaju u najniže vibracijsko stanje S1 procesom zvanim interkonverzija. Budući da je taj proces iznimno brz, obično se događa prije emisije. Iz tog se razloga emisija događa iz termički uravnoteženog najnižeg vibracijskog stanja S1, koji rezultira pomakom u valnim duljinama apsorpcije i emisije, koja se naziva Stokes-ov pomak (Slika 21).



Slika 21. Stokesov pomak

Fluorescencijska spektroskopija korištena je često u analitičke svrhe, a odličan je način usporedbe serija spojeva koje zbog malih razlika u strukturama pokazuju različite intezitete fluorescencije. Taj se intenzitet očituje količinom fotona emitiranih iz uzorka luminiscencijom iz višeg enegretskog stanja.

Sastavni dijelovi tipičnog fluorescencijskog spektrometra su: držač uzorka, izvor fotona (uglavnom ksenonska žarulja), monokromatori, koji služe za odabir točno određene valne duljine pobude, usmjeravajuće leće, detektor fotona i kontrolna softverska jedinica. Emisijski fluorescencijski spektar zabilježen je kada je valna duljina svjetlosti pobude konstantna te se emisijski snop snima kao funkcija valne duljine.⁴⁷

Ultraljubičasti i vidljivi dio spektra elektromagnetskog zračenja nalaze se u intervalu od 200 do 800 nm. Te su vrijednosti valnih duljina dovoljne energije za pobuđivanje kromofora, odnosno funkcionalnih skupina molekula koje svojom konjugiranošću postižu

niske energetske nivoe. Oni su odgovorni za boju spojeva, jer njihovom apsorpcijom vidljivog zračenja molekula emitira natrag zračenje nižih valnih duljina koje daju dojam da je supstanca „obojana“. Supstituenti koji sami ne daju boju, ali utječu na povećanje (hiperkromni efekt) ili smanjenje (hipokromni efekt) valne duljine apsorbirane svjetlosti te se nazivaju auksokromi ili antiauksokromi.

Moguće su tri vrste prijelaza elektrona:

- 1) Prijelazi koji uključuju p , s i n elektrone
- 2) Prijelazi koji uključuju elektronski prijenos naboja
- 3) Prijelazi koji uključuju d i f elektrone.

Najčešći prijelazi u organskim molekulama uključuju p , s i n elektrone te se elektroni pobuđuju iz veznih i neveznih u protuvezne orbitale: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ (Slika 3.).²

Intenzitet apsorpcije proporcionalan je koncentraciji, c , i duljini puta, l , prema Bouguer-Lambert-Berr-ovom zakonu:⁴⁸

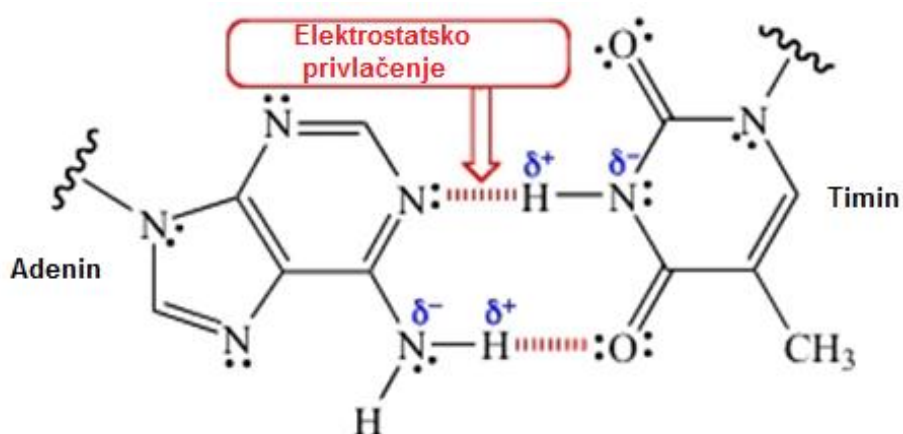
$$A \equiv \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

2.9. Vežanje malih molekula za molekulu DNK

Sekvenca i struktura DNK usko je povezana u mnogim biološkim procese - onima koji su neophodni za funkciju našeg organizma, kao i onima koji su štetni. Neke bolesti su povezane sa specifičnim poretkom parova baza ili njihovim neslaganjem, koje se ponekad dogodi tijekom replikacije DNK. Neusklađenosti unutar DNK mogu se smatrati obećavajućim metama za biomedicinsku dijagnostiku i terapiju - sa pažljivo dizajniranim malim molekulama kao aktivnim agensima.⁴⁹ Upravo to poznavanje slijeda genoma, dobro proučena 3D struktura DNK te poznavanje svojstava njenih kemijskih i funkcionalnih skupina, čini DNK vrlo atraktivnom metom za dizajn lijekova. Međutim, broj poznatih lijekova kojima je meta djelovanja DNK još uvijek je znatno manji u usporedbi s onima čija su meta proteini.⁵⁰

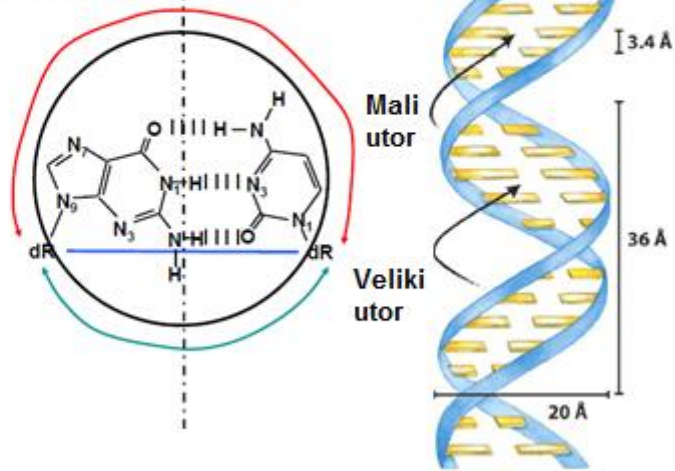
Proučavanje prirode vezivanja malih molekula za DNK izuzetno je važno jer takvi lijekovi i kemikalije mogu značajno utjecati na ekspresiju genetičke informacije te pokazati dobre rezultate u liječenju bolesti koje imaju učinak na proliferaciju i diferencijaciju stanica.⁴⁸ Osim toga, istraživanje interakcija malih molekula s DNK omogućava i razumijevanje toksičnosti lijekova i tvari koji sadrže metalne ione. Najčešće se za ispitivanje interakcija malih molekula s DNK koristi *ct*-DNK, a to je polimer slijeda fosfata s odgovarajućim šećerom te malom količinom proteina i visoko polimeriziranom okosnicom. Mogući modeli interakcije između malih molekula i DNK općenito se mogu ostvariti tri načina:

- 1) elektrostatsko povezivanje između kationskih vrsta i negativnog naboja DNK,

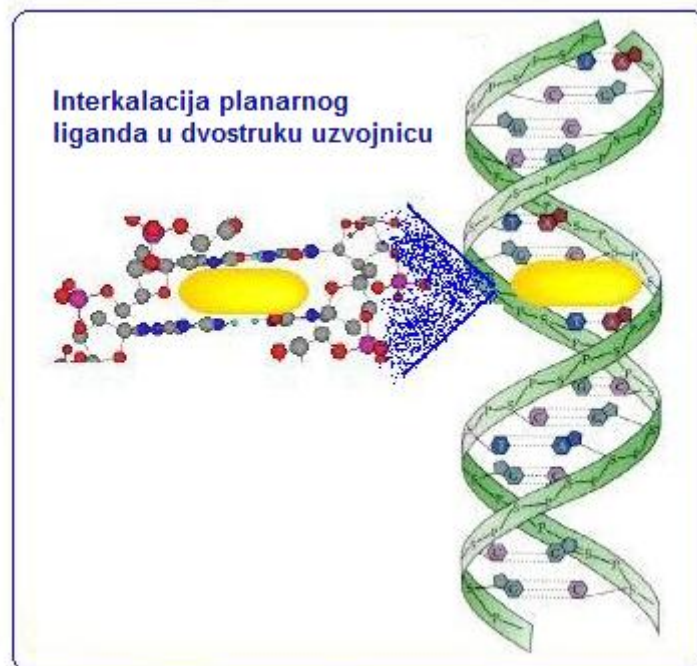


- 2) 'groove binding', odnosno vezivanje u utore DNK vodikovim vezama ili Van der Waalsovima silama

Parovi baza promatrani iznad uzvojnice (helikalna projekcija)



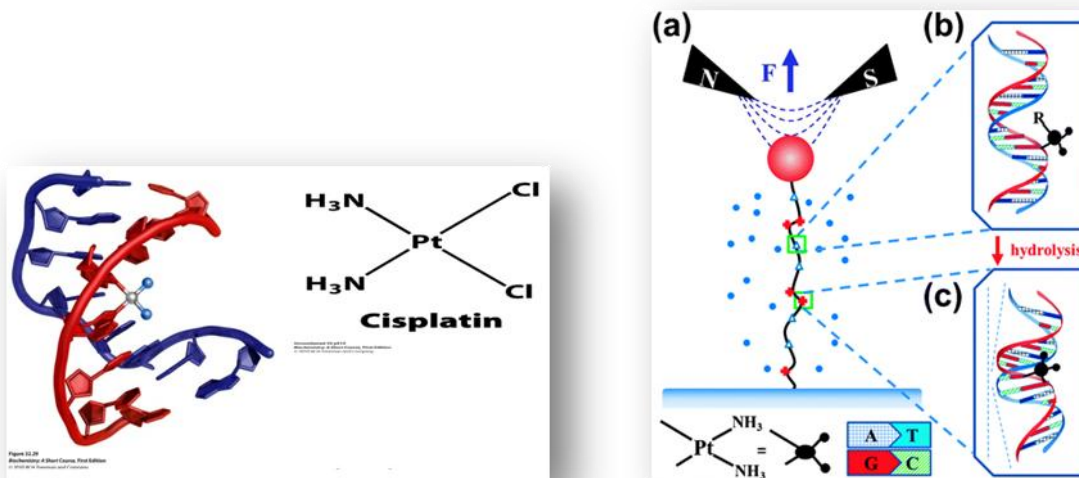
3) interkalacijsko vezivanje lijeka između parova baza.



Vezivanje za DNK je ključni korak u ispitivanju aktivnosti lijekova koji potencijalno utječu na DNK. Mogu se koristiti različite tehnike za ispitivanje interakcije malih molekula s DNK, kao što su: UV-Vis spektrometrija, fluorescencija, CD spektroskopija, rendgenska difrakcija, gel elektroforeza i dinamična viskoznost.⁵¹ Među njima se ističe UV-Vis

apsorpcijska spektroskopija jer ima izuzetno široku upotrebu za detekciju interakcije malih molekula s DNK te kompleksa koji oni tvore. Kad mala molekula reagira s DNK i čini kompleks, mogu se uočiti promjene apsorbancije i/ili položaja signala, tj. pika,. Jačina interakcije proporcionalna je promjeni magnitude ili pomaku signala. Interkalacijsko vezivanje malih molekula s DNK najčešće rezultira hipokromizmom sa crvenim pomakom. S druge strane, kod vezivanja u utore ili elektrostatske interakcije s DNK, uočava se hiperkromizam bez ili s vrlo malim crvenim pomakom, koji odražava odgovarajuće promjene u konformaciji i strukturi DNK. Fluorescencijska emisijska spektroskopija pruža dodatne informacije u razumijevanju načina vezivanja malih molekula za DNK.⁵⁰

Najpoznatija molekula koja se veže za DNK je *cis*-diamin-dikloroplatina(II), jednostavni kvadratno-planarni kompleks koji je postao međunarodno poznat pod nazivom cisplatin (slika 22). Upravo to što *cis* izomer ima izrazitu antitumorsku aktivnost, a *trans* ne pokazuje nikakvu, potvrđuje činjenicu da interakcije s DNK imaju veliku ulogu u biološkim procesima te da su izuzetno specifične.



Slika 22. Molekula cisplatina i njeno djelovanje vezivanjem za DNK

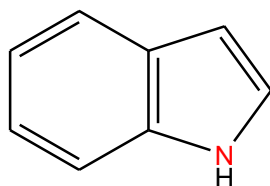
U posljednjim desetljećima pripravljeno je mnogo molekula različitih veličina i karakteristika koje se vežu za DNK. Oligonukleotidi, peptidne nukleinske kiseline i piroloimidazolni poliamidi, koji reagiraju vrlo specifično s parovima baza tvoreći trostruke uzvojnice te kao takvi prepoznaju određene nizove baza. Drugi oligomeri, koji se smještaju

između parova baza i vežu za različite položaje na DNK pripravljeni su kao strukturni analozi naftalendiimida.

Sljedeća skupina spojeva koji sadrže metale, kao i cisplatin, vrlo uočljivo se vežu za DNK jer su to poliazaaromatski kompleksi rutenija koji se ponašaju kao 'prekidači svjetla'. Luminiscencija tih kompleksa ovisi o DNK te tako ukoliko je u vodenoj otopini kompleksa prisutna i DNK, njihova emisija je vidljiva (ali ne uvijek). Ukoliko DNK ima neka neslaganja parova baza, emisija je još izraženija. Prema tome, postoji potencijalna vrlo uspješna primjena takvih kompleksa u terapiji zračenjem.

Zbog različitih mogućnosti interakcije malih molekula s DNK, vrlo je teško istraživati njihov utjecaj i točne mehanizme djelovanja. Male molekule mogu se vezati za DNK u veliki ili mali utor dvostruke uzvojnice, kovalentnim i nekovalentnim interakcijama, a mogu i prekinuti π -veze između parova baza na različite načine. No, ne postoji niti određena struktura ili veličina molekule koja uvjetuje njenu interakciju sa DNK i takvih molekula ima među različitim vrstama i derivatima spojeva, što još više otežava proces istraživanja.⁴⁹

Međutim, istraživanja su pokazala povezanost malih molekula koje imaju centar naboja s njihovim vezivanjem u mali utor DNK. To je uspješno dokazano vezivanjem molekule indole (Slika 23) i njenih derivata za DNK. Zbog prisutstva atoma dušika u položaju 1, molekula indola je potencijalni donator za vodikovu vezu, a također su vezani i različiti bočni lanci sa jakim akceptorima ($>C=O$) i donorima vodikove veze ($-OH$, $-NH_2$). Akceptori ili donori za vodikovu vezu ne samo da olakšavaju uspostavljanje intermolekularnog kontakta između malih molekula i oligomera DNK, već i određuju specifični slijed dušičnih baza DNK za koje se mogu vezati.⁵²



Slika 23. Struktura indola

2.10. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva *in silico* analizom (PASS)

Biološka aktivnost spoja se može definirati kao interakcija spoja s biološkom vrstom. U kliničkim ispitivanjima to je ljudski organizam, u predkliničkim ispitivanjima radi se o životinjskom organizmu (*in vivo*) ili eksperimentalnoj metodi (*in vitro*).⁵³

Osim toga, u novije vrijeme se rabi i *in silico* analiza koja podrazumijeva predviđanje i simulaciju biološke aktivnosti spojeva sofisticiranim kompjuterskim programima i algoritmima na temelju velike baze podataka enzima i drugih meta lijekova te drugih biološki aktivnih tvari. Izraz *in silico* izveden je iz latinskih izraza *in vitro* i *in vivo*. Iako još uvijek nije sigurno otkud potječe takav naziv, smatra se da je povezan sa silicijem, metalom koji je ključna sastavnica kompjuterskih čipova. Takav način analize može značajno skratiti eksperimentalna istraživanja u laboratoriju, a samim time je i puno ekonomičniji.⁵⁴

Biološka aktivnost ovisi o strukturi spoja, raspodjeli naboja, fizikalno-kemijskim svojstvima i dr., te o biološkoj vrsti (spol, dob, itd.) i načinu liječenja (koncentracija spoja, put biokemijske razgradnje). Svaki biološki aktivni spoj pokazuje širok spektar različitih učinaka. Neki se mogu koristiti kao lijekovi, a drugi uzrokovati različite nuspojave ili mogu biti toksični. Sve aktivnosti uzrokovane jednim spojem smatraju se spektrom biološke aktivnosti tvari.^{54a}

Većina poznatih računalnih metoda, koje se koriste za otkrivanje lijekova, proučava samo jednu ili mali broj aktivnosti neke klase spojeva. Program za istovremeno predviđanje farmakološke aktivnosti, mehanizma i specifične toksičnosti na temelju 2D strukture spoja je dobar izbor za pronalaženje novih lijekova. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva (PASS, eng. Prediction of Activity Spectra for Substances) je računalni program koji može predvidjeti više od 3750 učinaka farmakoloških supstanci i biokemijske mehanizme na temelju strukturne formule tvari, prosječnom toksičnosti od 95 %. Pronašao je primjenu u predviđanju biološke aktivnosti kod sinteze i istraživanja novih lijekova, medicinskoj kemiji, računalnoj kemiji, farmakogenomici, kemogenomici, kvalitativnom određivanju odnosa strukture i aktivnosti (SAR), translacijskom ispitivanju i medicini.⁵⁵

PASS algoritam se temelji na Bayesianovim procjenama vjerojatnosti molekula koje pripadaju klasi aktivnih i neaktivnih spojeva. Ovaj program procjenjuje predviđeni spektar aktivnosti kao moguću aktivnost (Pa) i moguću ne-aktivnost (Pi). Predviđanje se temelji na

SAR analizi *training seta*, koji sadrži više od 205 000 spojeva s više od 3750 bioloških aktivnosti. Vrijednosti P_a i P_i variraju od 0 do 1, i općenito je $P_a + P_i \neq 1$.⁵⁵

Prednosti PASS metode su u tome što su kao ulazni podatak potrebne samo 2D strukture. Parametri ove metode predstavljaju biološki prostor i svojstva molekula u biološkom prostoru, za razliku od mnogih drugih deskriptora, koji odražavaju strukturna svojstva molekula. Mogu se koristiti za grupiranje spojeva prema svojim biološkim svojstvima, a ne prema njihovoj strukturnoj sličnosti. Predviđanja su brza, proračun spektra biološke aktivnosti za 10 000 spojeva na običnom računalu može trajati 5 minuta.⁵⁵

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sva korištena otapala sušena su i pročišćavana prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3Å.

Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC), koja je provedena na pločama 60F-254 presvučenim slojem silikagela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV-svjetlost valne duljine 254 nm.

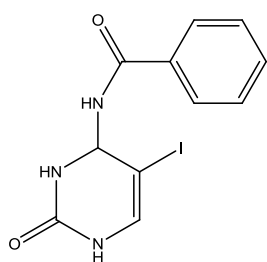
Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu *Fluka* (0.063-0.2 nm), a staklene kolone su punjene pod utjecajem gravitacije te je kao eluens korištena smjesa diklormetan : metanol u odgovarajućem omjeru.

Spektri ^1H - i ^{13}C -NMR su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 MHz. Svi su uzorci otopljeni u DMSO- d_6 i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u ^1H i ^{13}C NMR spektrima izraženi su u jedinicama ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, $\delta=0,0$ ppm), a konstante sprege (J) u hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije asignirane su na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprege H-H.

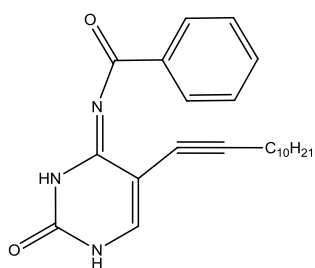
UV/Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 50 spektrofotometru. Fluorescencijski emisijski spektri snimljeni su na Cary Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 0,5 cm te volumena 3 cm³.

Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u Milestone Start S mikrovalnoj pećnici u kvarcnim posudama.

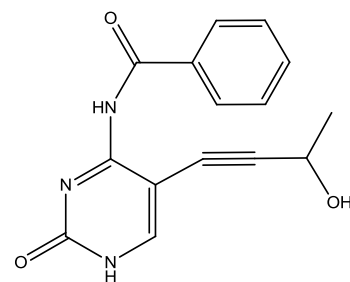
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva



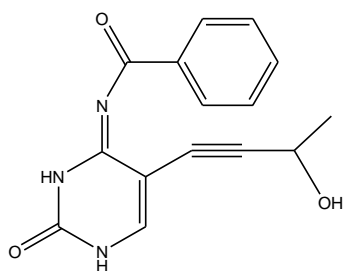
1



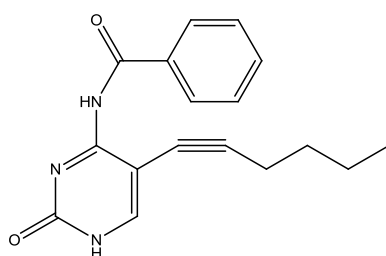
2



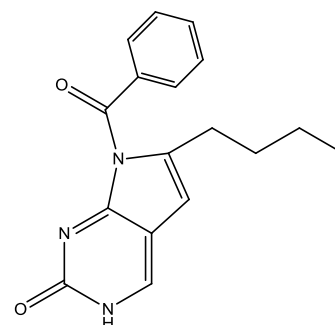
3



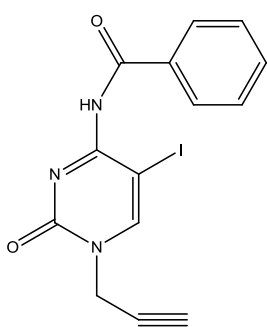
4



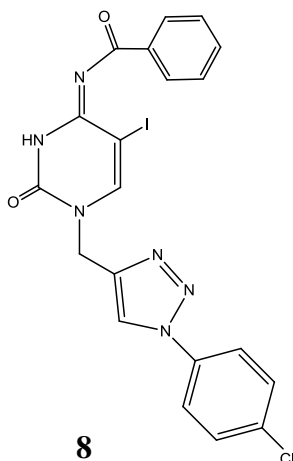
5



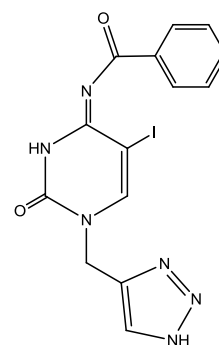
6



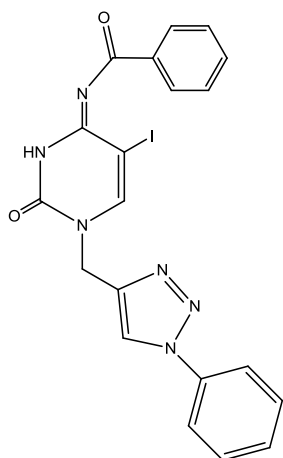
7



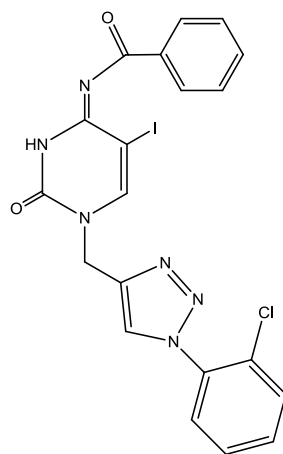
8



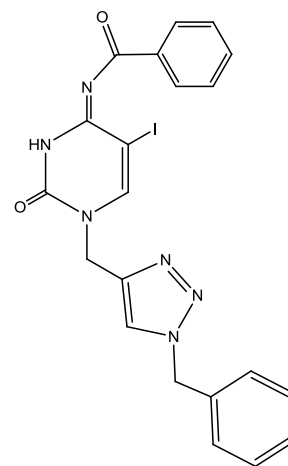
9



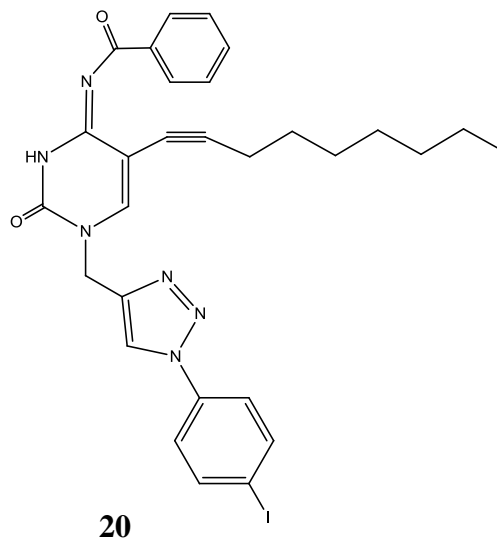
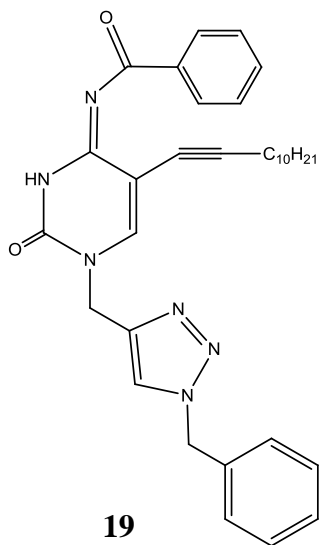
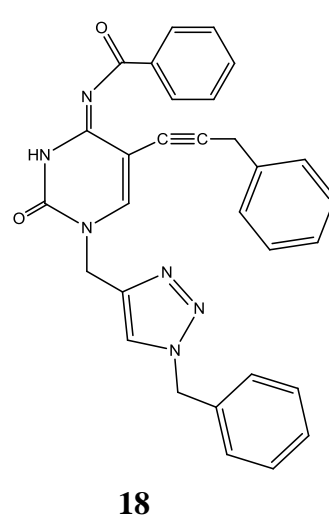
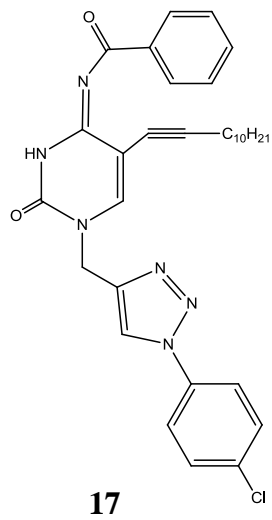
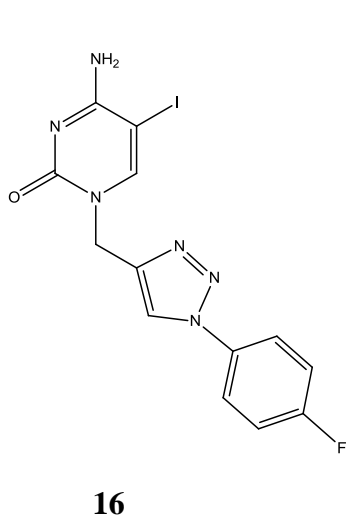
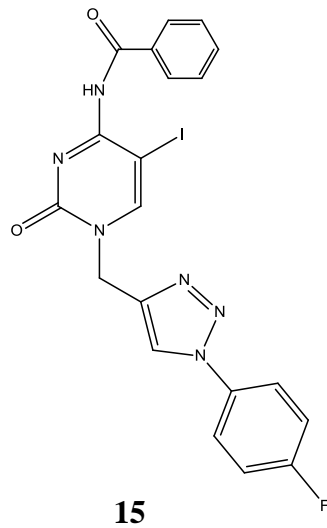
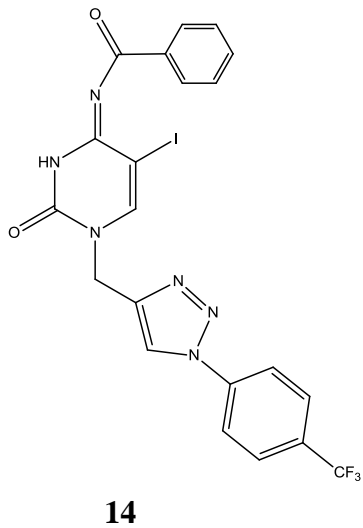
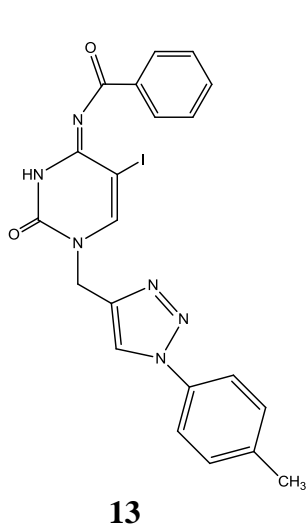
10

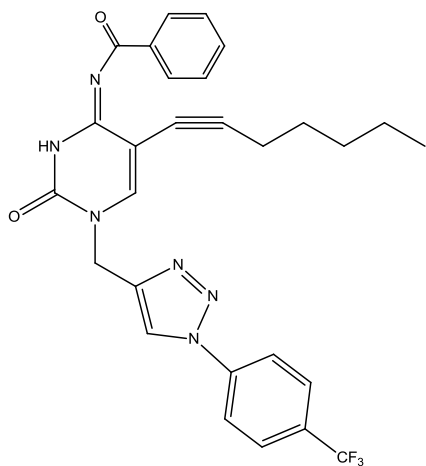


11

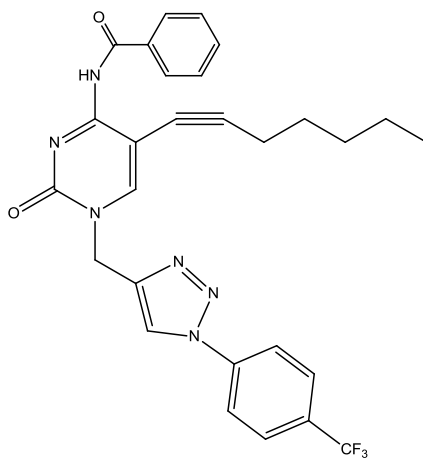


12

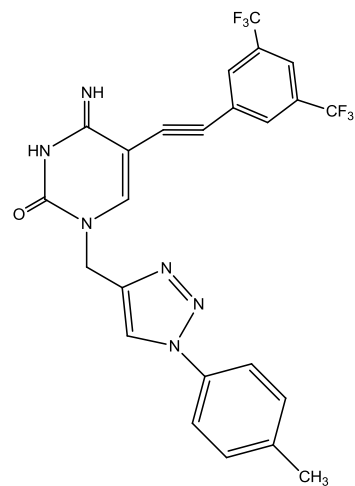




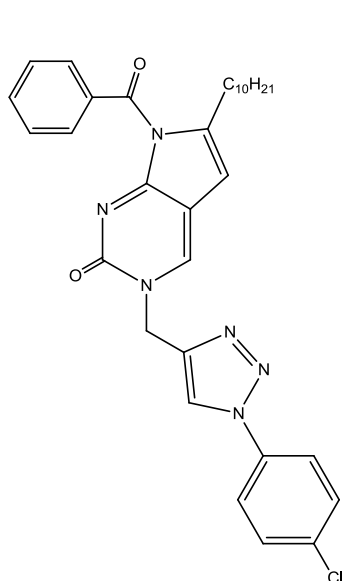
21



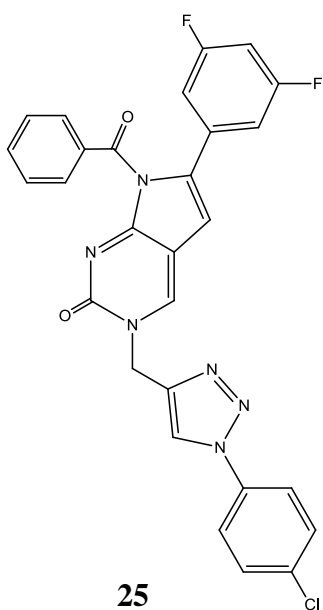
22



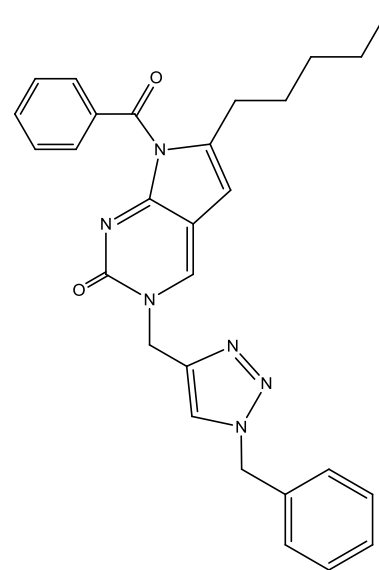
23



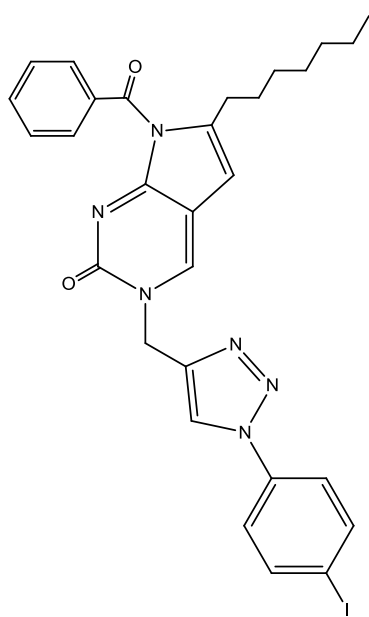
24



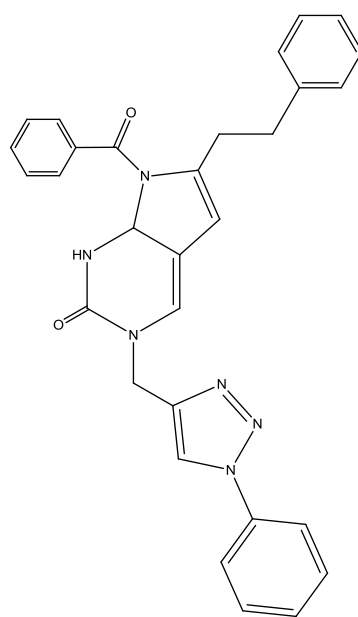
25



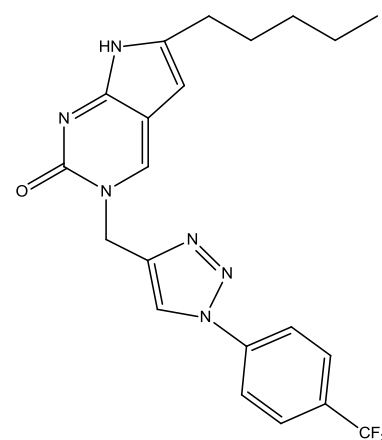
26



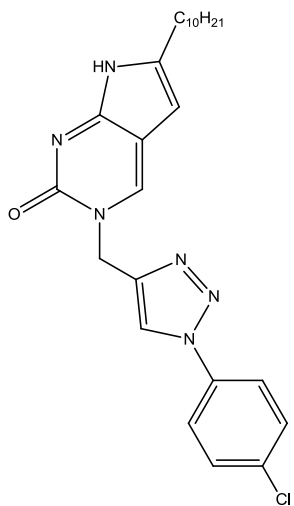
27



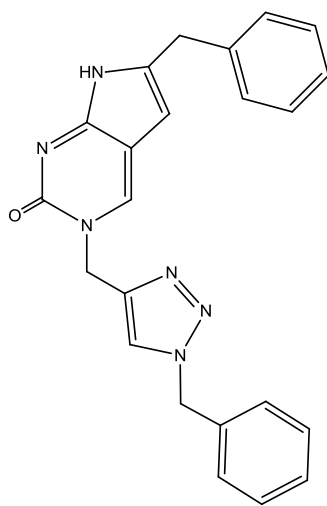
28



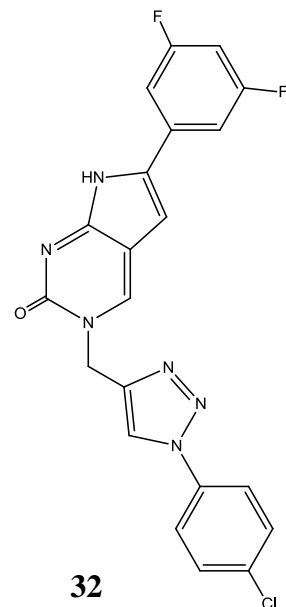
29



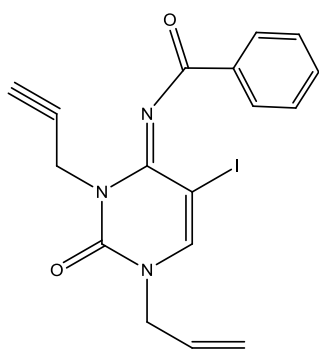
30



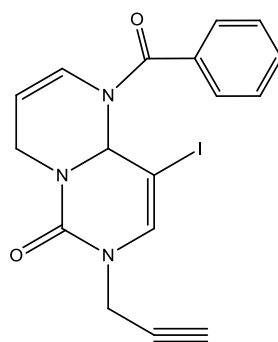
31



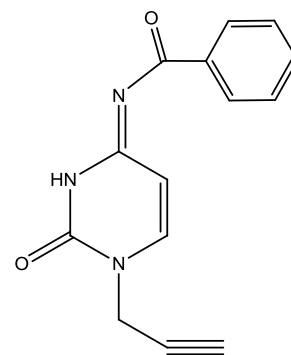
32



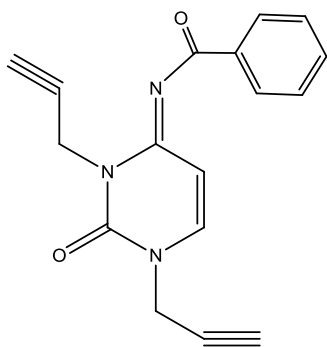
33



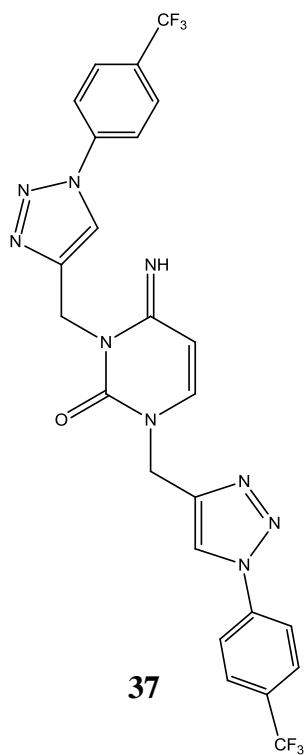
34



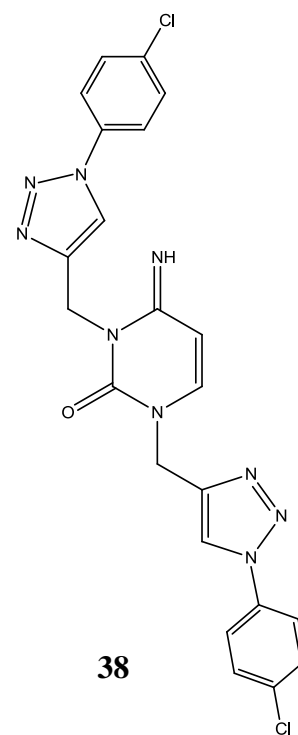
35



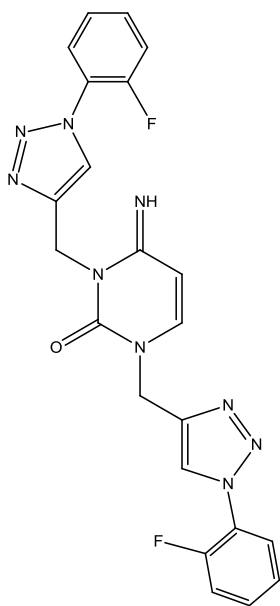
36



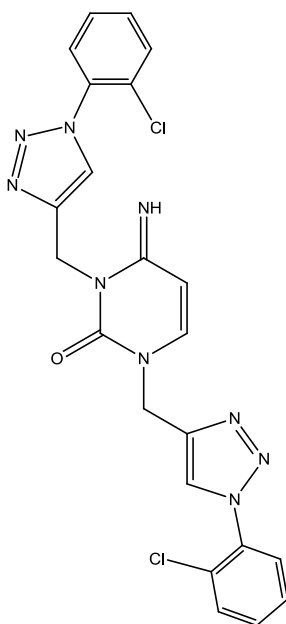
37



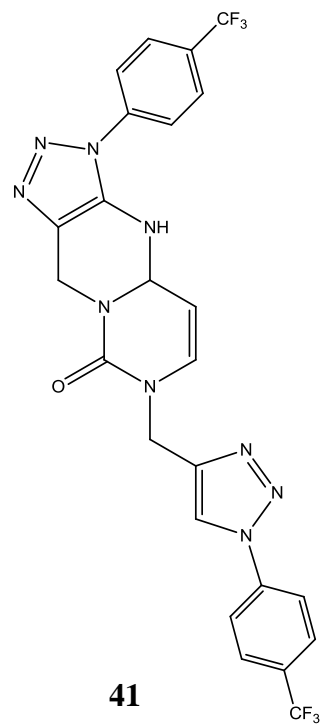
38



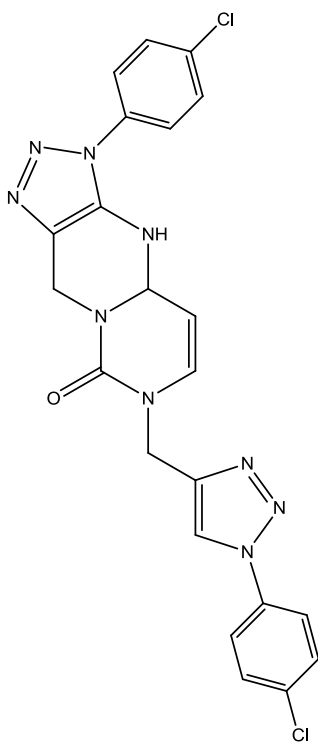
39



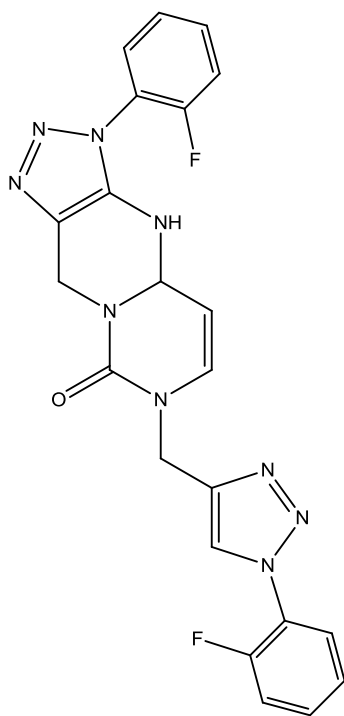
40



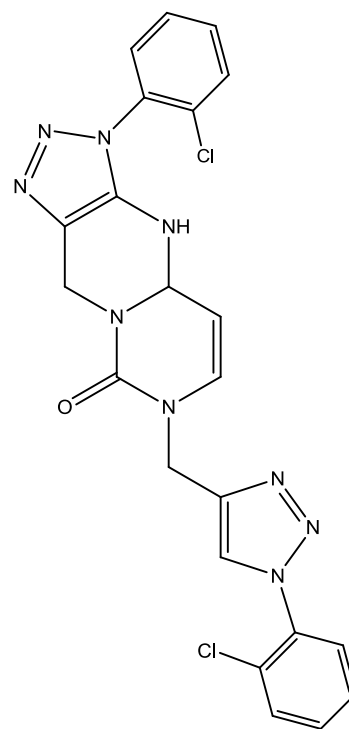
41



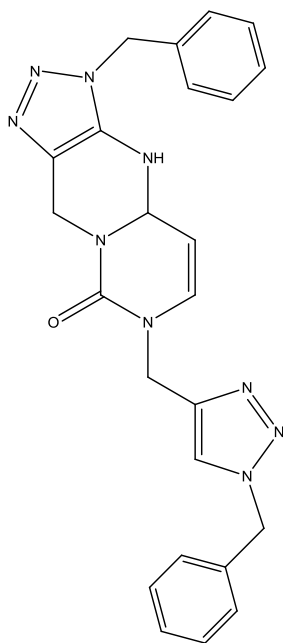
42



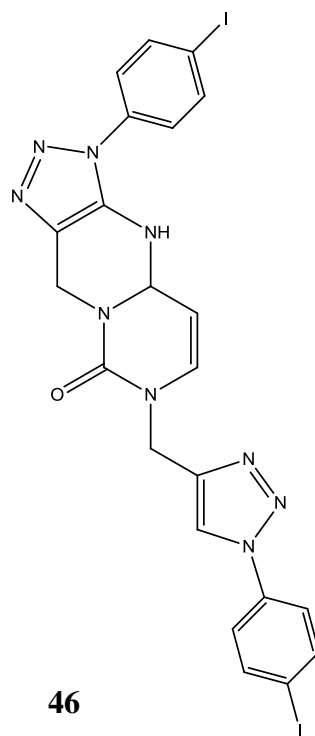
43



44



45



46

3.3. Priprava spojeva

3.3.1. *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (1)

N-4-benzoilcitozin (3 g, 19,95 mmol) otopljen je u acetonitrilu (140 mL; 13,95 mmol) te je u reakcijsku smjesu dodan I₂ (1,890g; 15 mmol) i amonijev cerijev(IV) nitrat (CAN; 8,2233g; 15 mmol). Reakcijska smjesa zagrijavana je na temperaturi refluksa 2h, a tijek reakcije praćen tankoslojnom kromatografijom (TLC). Otapalo je upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, potom CH₂Cl₂/MeOH=30/1 i 10/1). Izolirani su bijeli pahuljasti kristali spoja **1** (1,4810g; 31,27%; T_f= 106-108°C).

3.3.2. *N*-(5-(dodec-1-inil)-2-okso-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (2)

Spoj **1** (17,6 mg; 0,033 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL). Zatim mu je dodan dodecin (0,01 mL; 0,050 mmol) te katalizatori bakrov(I)jodid (1,2 mg; 0,007 mmol), (PPh₃)₄Pd (3,8 mg; 0,003 mmol) i trietilamin (0,01 mL; 0,066 mmol). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek je praćen TLC-om. Zatim je reakcijska smjesa zagrijavana na 50°C tijekom 5 sati te je miješanje nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=100:1, CH₂Cl₂/MeOH=50:1). Izoliran je spoj **2** (3 mg; 23,94%).

3.3.3. *N*-(5-(3-hidroksibut-1-inil)-2-okso-1,2-dihidropirimidin-4-il)benzamid (3) i

(*E*)-*N*-(5-(3-hidroksibut-1-inil)-2-okso-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (4)

Spoj **1** (400 mg; 1,173 mmol) otopljen je u DMF-u (30 mL) te su u reakcijsku smjesu dodani 3-butin-2-ol (0,086 mL; 1,759 mmol), CuI (44,34 mg; 0,2346 mmol), diizopropiletilamin (0,21 mL; 2,346 mmol) te katalizator (PPh₃)₄Pd (134,9 mg; 0,1173 mmol). Reakcija je provedena preko noći u struji argona pri sobnoj temperaturi, a tijek je praćen TLC-om. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH=100:1 i 50:1). Dobiveni spoj (109 mg; 27,3%) je smjesa dva tautomera **3** i **4**, što je potvrđeno ¹H NMR spektroskopijom.

3.3.4. *N*-(5-(heks-1-inil)-2-okso-1,2-dihidropirimidin-4-il)benzamid (5) i 7-benzoil-6-butil-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on (6)

Spoj **1** (400 mg; 1,173 mmol) otopljen je u DMF-u (11 mL), zatim je u reakcijsku smjesu dodan heksin (0,202 mL; 1,759 mmol), CuI (44,3 mg; 0,2346 mmol), diizopropiletilamin (0,21 mL; 2,346 mmol) te katalizator (PPh₃)₄Pd (134,9 mg; 1173 mmol). Reakcija je

provođena preko noći u struji argona pri sobnoj temperature, a tijekom je praćen TLC-om. Nakon završetka reakcije, smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH=100:1 i 50:1). Reakcijom je dobivena smjesa spojeva **5** (18,0 mg, 13,12 %) i **6** (45,2 mg, 13,85 %).

3.3.5. *N*-(5-jod-2-okso-1-(prop-2-inil)-1,2-dihidropirimidin-4-il)benzamid (7)

Spoj **1** (240,9 mg; 0,64 mmol) otopljen je DMF-u (10 mL). U reakcijsku smjesu dodan je natrijev hidrid (24,96 mg; 1,04 mmol) a nakon pola sata propagil-bromid (0,101 mL). Reakcija je miješana preko noći pri sobnoj temperaturi, a tijekom reakcije praćen je TLC-om. Otapalo je upareno, a sirova smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=30:1). Dobiveni su bijeli kristali spoja **7** (197,1 mg; 73,34 %).

3.3.6. *N*-(1-((1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jod-2-okso-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (8)

Spoj **7** (101,6 mg; 0,268 mmol) je stavljen u kvarcnu kivetu i otopljen u DMF-u (7 mL) i smjesi *tert*-butanol : voda (1:1) (3,7 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog (II) sulfata (0,04 mL) i bakar (16,9 mg; 0,268 mmol), te 1-azido-4-klorbenzen (0,65 mL; 0,322 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 45 min sa prethodnom minutom zagrijavanja te 5 minuta hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=100:1). Izoliran je spoj **8** u obliku bijelih pahuljastih kristala (40,8 mg; 28,65%).

3.3.7. *N*-(1-((1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jod-2-okso-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (9)

Spoj **7** (176,9 mg; 0,467 mmol) je stavljen u kvarcnu kivetu i otopljen u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol : voda (1:1) (6,45 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog (II) sulfata (0,07 mL) i bakar (29,4 mg; 0,467 mmol), te natrijev azid (36,4 mg; 0,560 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 45 min sa prethodnom minutom zagrijavanja te 5 minuta hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=120:1). U obliku bijelih pahuljastih kristala izoliran je spoj **9** (12,5 mg, 6,02 %).

3.3.8.N-(5-jod-2-okso-1-((1-fenil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-2,3-dihidropirimidin-4(1H)-iliden)benzamid (10)

Spoj **7** (180 mg; 0,475 mmol) je stavljen u kvarcnu kivetu i otopljen u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol : voda (1:1) (6,56 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog (II) sulfata (0,16 mL) i bakar (29,9 mg; 0,475 mmol), te fenil-azid (1,14 mL; 0,570 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 45 min sa prethodnom minutom zagrijavanja te 5 minuta hlađenja na kraju. Potom je u reakcijsku smjesu dodano još 0,4 mL otopine CuSO₄ te je reakcija nastavljena u mikrovalnom reaktoru dodatnih 45 min u prethodno navedenim uvjetima. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=200:1). Izoliran je spoj **10** u obliku bijelih pahuljastih kristala (39,9 mg; 16,90%).

3.3.9.N-(1-((1-(2-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jod-2-okso-2,3-dihidropirimidin-4(1H)-iliden)benzamid (11)

Spoj **7** (106,9 mg; 0,282 mmol) je stavljen u kvarcnu kivetu i otopljen u DMF-u (7 mL) i smjesi *tert*-butanol : voda (1:1) (3,9 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog (II) sulfata (1 mL) i bakar (17,8 mg; 0,282 mmol), te 1-azido-2-klorbenzen (0,68 mL; 0,338 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 45 min sa prethodnom minutom zagrijavanja te 5 minuta hlađenja na kraju. Zatim je reakcijska smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi i nakon toga 15 min u mikrovalnom reaktoru u prethodno navedenim uvjetima. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=200:1). Izoliran je spoj **11** u obliku bijelih pahuljastih kristala (36,6 mg; 24,45 %).

3.3.10.N-(1-((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jod-2-okso-2,3-dihidropirimidin-4(1H)-iliden)benzamid (12)

Spoj **7** podijeljen je u dvije šarže (173,4 mg; 0,458 mmol) i (141,2 mg; 0,373 mmol) od kojih je svaka otopljena u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol : voda (1:1) (6,3 mL i 5,2 mL). U otopine je dodana 1 M otopina bakrovog (II) sulfata (0,07 mL i 0,06) i bakar (28,8 mg; 0,0458 mmol te 23,5 mg; 0,373 mmol), te benzil-azid (1,1 mL; 0,549 mmol i 0,9 mL; 0,447 mmol). Kvarcne kivete su zatim stavljene u mikrovalni reaktor na 80°C u trajanju od 45 min sa prethodnom minutom zagrijavanja te 5 minuta hlađenja na kraju. Nakon toga, reakcija se

odvijala preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije reakcijske smjese su spojene i uparene te pročišćene kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=200:1). Spoj **12** izoliran je u obliku bijelih pahuljastih kristala (251,98 mg; 57,07%).

3.3.11. *N*-(5-jod-2-okso-1-((1-*p*-tolil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (13)

Spoj **7** (215,8 mg; 0,569 mmol) otopljen je u DMF-u (3 mL) te u smjesi *tert*-butanol : voda (1:1) (7,9 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog (II) sulfata (0,09 mL) i bakar (35,9 mg; 0,565 mmol), te tolil-azid (1,37 mL; 0,683 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C u trajanju od 45 min sa prethodnom minutom zagrijavanja te 5 minuta hlađenja na kraju. Nakon toga je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi preko noći. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka uparena je i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=200:1). Spoj **13** izoliran je u obliku bijelih patuljastih kristala (19,1 mg; 6,56%).

3.3.12. (E)-*N*-(5-jod-2-okso-1-((1-(4-(trifluorometil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (14)

Spoj **7** (197,1 mg; 0,5198 mmol) otopljen je u DMF-u (7 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda(1:1) (7,17 ml) te stavljen u kvarcnu kivetu. U reakcijsku smjesu dodani su 1-azido-4-trifluormetil-benzen (1,25 mL; 0,62 mmol), CuSO₄ (0,082 mL) i bakar (Cu(0); 0,033 g). Reakcija je provedena u mikrovalnom reaktoru tijekom 40 minuta, a tijekom reakcije praćen je TLC-om. Otapalo je upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=50:1). Dobiveni su bijeli kristali spoja **14**, što je potvrđeno ¹H NMR spektroskopijom (56,3 mg; 19%; T_f = 53-55°C).

3.3.13. *N*-(1-((1-(4-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jod-2-okso-1,2-dihidropirimidin-4-il)benzamid (15)

4-amino-1-((1-(4-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jodpirimidin-2(1*H*)-on (16)

Spoj **7** (216,3 mg; 0,57 mmol) otopljen je u DMF-u (6 mL) i smjesi *tert*-butanol: voda (1:1) (7,86mL), a u reakcijsku smjesu dodan je 1-azido-4-fluorbenzen (1,4 mL; 0,685 mmol), CuSO₄ (0,085 mL; 0,57 mmol) i Cu (36,2 mg). Reakcija je provedena u mikrovalnom reaktoru 30 minuta, a nakon toga miješana na sobnoj temperaturi preko noći, tijekom reakcije praćen je TLC-om. Zatim je reakcijska smjesa zagrijavana u mikrovalnom reaktoru 15

minuta, a potom uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=70:1 i 50:1). Dobiven je smjesa spojeva **15** (15,19 mg; 6,5%) i **16** (16,3 mg; 7%).

3.3.14. *N*-(1-((1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-(dodec-1-inil)-2-okso-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (17), 7-benzoil-3-((1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6-decil-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on (24) i 3-((1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6-decil-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on (30)

Spoj **8** (49,1 mg; 0,092 mmol) otopljen je u 5 mL DMF-a. Zatim mu je dodan dodecin (0,03 mL; 0,138 mmol) te katalizatori bakrov(I)jodid (3,5 mg; 0,018 mmol), (PPh₃)₄Pd (10,6 mg; 0,0092 mmol) i trietilamin (0,25 mL; 1,84 mmol). Reakcija je miješana na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek je praćen TLC-om. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=200:1, CH₂Cl₂/MeOH=100:1) pri čemu su izolirani spojevi **17** (5,2 mg; 9,92%), **24** (10,8 mg; 20,60%) i **30** (18,7 mg; 43,74%).

3.3.15. *N*-(2-okso-5-(3-fenilprop-1-inil)-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (18) i 6-benzil-3-(1-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on (31)

Spoj **12** (131,5 mg; 0,257 mmol) otopljen je u DMF-u (10 mL), zatim mu je dodan 3-fenil-1-propin (0,05 mL; 0,385 mmol) te katalizatori bakrov(I)jodid (9,7 mg; 0,051 mmol), (PPh₃)₄Pd (29,7 mg; 0,0257 mmol) i trietilamin (0,07 mL; 0,514 mmol). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek je praćen TLC-om. Zatim je reakcijska smjesa zagrijavana na 80°C oko 5 sati te je nakon toga ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=100:1, CH₂Cl₂/MeOH=70:1). Izolirani su spojevi **18** (19,8 mg; 15,40%) i **31** (16,1 mg; 15,85 %).

3.3.16. *N*-(1-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-(dodec-1-inil)-2-okso-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (19)

Spoj **12** (79,1 mg; 0,155 mmol) otopljen je u DMF-u (8 mL). Zatim mu je dodan dodecin (0,05 mL; 0,232 mmol) te katalizatori bakrov(I)jodid (5,8 mg; 0,031 mmol), (PPh₃)₄Pd (17,8 mg; 0,015 mmol) i trietilamin (0,04 mL; 0,309 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek je praćen TLC-om. Zatim je smjesa zagrijavana na 80°C 5 sati te je dodano još 0,3 mL trietilamina i ponovno miješana preko noći

na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=400:1, CH₂Cl₂/MeOH=100:1). Izoliran je spoj **19** (9,5 mg; 11,14 %).

3.3.17. *N*-(1-((4-jodfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-(okt-1-inil)-2-okso-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (20) i 7-benzoil-6-heptil-3-((1-(4-jodfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2-(7*H*)-on (27)

p-jodfeniltriazolni derivat citozina (158,5 mg; 0,255 mmol) otopljen je u DMF-u (22 mL). Zatim mu je dodan nonin (0,06 mL; 0,382 mmol) te katalizatori bakrov(I)jodid (9,6 mg; 0,051 mmol), (PPh₃)₄Pd (29,4 mg; 0,025 mmol) i trietilamin (0,35 mL; 2,545 mmol). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijekom je praćen TLC-om. Zatim je dodano još 0,3 mL trietilamina i reakcijska smjesa zagrijana 3 h na 80°C, a zatim uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=300:1, CH₂Cl₂/MeOH=200:1). Izolirani su spojevi **20** (7,3 mg; 4,62 %) i **27** (16,8 mg; 10,64 %).

3.3.18. *N*-(5-(hept-1-inil)-2-okso-((1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (21), *N*-(5-(hept-1-inil)-2-okso-((1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1,2-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (22) i 6-pentil-3-((1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on(29)

Spoj **14** (25,2 mg; 0,045 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL). U reakcijsku smjesu dodani su heptin (0,01mL; 0,068 mmol), CuI (1,701 mg; 0,009 mmol), Pd-katalizator (PPh₃)₄Pd (5,175 mg; 0,1 mmol) i diizopropiletilamin (0,0082 mL, 0,09 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći u struji argona na sobnoj temperaturi, a tijekom reakcije praćen TLC-om. Reakcijska smjesa je nakon završetka reakcije uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH=200:1 i 100:1). Izolirani su spojevi **21** (6,2 mg, 26%), **22** (6,0 mg, 25%) i **29** (6,4 mg; 26,6%).

3.3.19. 5-((3,5-bis(trifluormetil)fenil)etinil)-4-imino-1-((1-*p*-tolil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on(23)

Spoj **13** (10,3 mg; 0,020 mmol) otopljen je u DMF-u (2 mL). Zatim mu je dodan 3,5-di(trifluormetil)fenil (0,01 mL; 0,030 mmol) te katalizatori bakrov(I)jodid (0,8 mg; 0,004 mmol), (PPh₃)₄Pd (2,3 mg; 0,002 mmol) i trietilamin (0,05 mL; 0,402 mmol). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijekom je praćen TLC-om.

Sljedećeg dana reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=400:1, CH₂Cl₂/MeOH=100:1). Izoliran je spoj **23** (8,4 mg; 81,22 %).

3.3.20.7-benzoil-3-((1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6-(3,5-difluorfenil)-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on (25)

3-((1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6-(3,5-difluorfenil)-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on (32)

Spoj **8** (106,2 mg; 0,200 mmol) otopljen je u DMF-u (10 mL). Zatim mu je dodan 1-etinil-3,5-difluorbenzen (0,04 mL; 0,300 mmol) te katalizatori bakrov(I)jodid (7,6 mg; 0,040 mmol), (PPh₃)₄Pd (31,1 mg; 0,020 mmol) i trietilamin (0,06 mL; 0,400 mmol). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek je praćen TLC-om. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=150:1, CH₂Cl₂/MeOH=100:1). Izolirani su spojevi **25** (13,3mg; 10,29%) i **32** (16,7 mg; 15,42%).

3.3.21.7-benzoil-3-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6-pentil-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on (26)

Spoj **12** (102,3 mg; 0,200 mmol) otopljen je u DMF-u (10 mL). Zatim mu je dodan heptin (0,04 mL; 0,300 mmol) te katalizatori bakrov(I)jodid (7,6 mg; 0,040 mmol), (PPh₃)₄Pd (31,1 mg; 0,020 mmol) i trietilamin (0,06 mL; 0,400 mmol). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek je praćen TLC-om. Zatim je reakcijska smjesa je zagrijana na oko 80°C 5 sati i ponovno ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=200:1, CH₂Cl₂/MeOH=150:1). Izoliran je spoj **26** (16,6 mg; 17,29%).

3.3.22.7-benzoil-6-fenetil-3-((1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-7,7a-dihidro-1*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(3*H*)-on(28)

Spoj **10** (20,1 mg; 0,041 mmol) otopljen je u DMF-u (10 mL). Zatim mu je dodan 1-butin-4-fenil (0,01 mL; 0,061 mmol) te katalizatori bakrov(I)jodid (1,5 mg; 0,008 mmol), (PPh₃)₄Pd (4,7 mg; 0,004 mmol) i trietilamin (0,1 mL; 0,810 mmol). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek je praćen TLC-om. Zatim je reakcijska smjesa

uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=150:1, CH₂Cl₂/MeOH=100:1). Izoliran je spoj **28** (9,2 mg; 44,95 %).

3.3.23. *N*-4-benzoil-5-jod-*N,N*-1,3-dipropargilcitozin (33**) i 1-benzoil-9-jod-7-(prop-2-inil)-1*H*-pirimido[1,6-*a*]pirimidin-6(4*H*, 7*H*, 9*H*)-on (**34**)**

N-4 benzoil-5-jodcitozin (0,400 g; 1,173 mmol) otopljen je u DMF-u (13 mL) i u reakcijsku smjesu dodan K₂CO₃ (404,7 mg; 2,933 mol). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi sat vremena, a zatim je dodan propargil-bromid (0,22 mL; 2,933 mol) i miješanje nastavljeno na sobnoj temperaturi preko noći, nakon čega je završetak reakcije provjeren TLC-om. Otopalo je upareno i sirova smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH = 300:1 i 200:1). Izolirano je žuto ulje spoja **33** (40,0 mg; 8,78%) i spoja **34** (5,1 mg; 0,80%)

3.3.24. *N*-4-benzoil-*N*-1-propargilcitozin (35**) i *N*-4-benzoil-*N,N*-1,3-dipropargilcitozin (**36**)**

N-4-benzoil-citozin (0,500 g; 2,323 mmol) otopljen je u DMF-u (19 mL) i u reakcijsku smjesu dodan K₂CO₃ (641,7 mg; 4,650 mol). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi sat vremena, a zatim je dodan propargil-bromid (0,39 mL; 5,115 mol) i miješanje nastavljeno na sobnoj temperaturi preko noći, nakon čega je završetak reakcije provjeren TLC-om. Reakcijska smjesa ostavljena je na sobnoj temperaturi preko noći, nakon čega je završetak reakcije provjeren TLC-om. Otopalo je upareno, a produkti su profiltrirani preko Büchnerovog lijevka i sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH = 100:1). Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **35** (403,7 mg; 60,54%) i spoja **36** (34,0 mg; 5,42%)

3.3.25. *N,N*-1,3-di-(*p*-trifluormetil)-1, 2, 3-triazolilcitozin (37**) i *N*-1-(4-metil-1-*p*-trifluormetil)- 1, 2, 3-triazol-1, 2, 3-triazolo[4,5-*d*]1,2,4-trihidropirimido[1,6-*a*]pirimidin (**41**)**

Spoj **35** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL; 0,648 mmol) i trifluormetil-azid (0,39 ml; 0,778 mmol). Smjesa je postavljena u mikrovalni reaktor na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje. Otopalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa

pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH = 150:1) pri čemu su izolirani bijeli praškasti kristali spoja **37** (3,0 mg; 1,60%) i spoja **41** (5,8 mg; 3,34%; T_f=202°C-204°C)

3.3.26. *N,N*-1,3-di-(*p*-klorfenil)-1, 2, 3-triazolilcitozin (38**) i *N*-1-(1-*p*-klorfenil-4-metil)- 1, 2, 3-triazol-1, 2, 3-triazolo[4,5-*d*]1,2,4-trihidropirimido[1,6-*a*]pirimidin (**42**)**

Spoj **36** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL; 0,648 mmol) i *p*-klorfenil-azid (0,39 mL; 0,778 mmol). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa ponovno zagrijavana u mikrovalnom reaktoru dodatnih 30 minuta nakon čega je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje. Otapalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH = 200:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **38** (3,2 mg; 2,28%) i spoja **42** (5,1 mg; 3,91%; T_{talište}=153°C-155°C)

3.3.27. *N,N*-1,3-di-(*o*-fluorfenil)-1, 2, 3-triazolilcitozin (39**) i *N*-1-(1-*o*-fluorfenil-4-metil)- 1, 2, 3-triazol-1, 2, 3-triazolo[4,5-*d*]1,2,4-trihidropirimido[1,6-*a*]pirimidin (**43**)**

Spoj **36** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL; 0,648 mmol) i *o*-fluorfenil-azid (0,39 mL; 0,778 mmol). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa ponovno zagrijavana u mikrovalnom reaktoru dodatnih 30 minuta nakon čega je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje. Otapalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH = 200:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **39** (8,0 mg; 5,14%; T_f=155°C-157°C) i spoja **43** (5,1 mg; 3,39%)

3.3.28. *N,N*-1,3-di-(*o*-klorfenil)-1, 2, 3-triazolilcitozin (40**) i *N*-1-(1-*o*-klorfenil-4-metil)- 1, 2, 3-triazol-1, 2, 3-triazolo[4,5-*d*]1,2,4-trihidropirimido[1,6-*a*]pirimidin (**44**)**

Spoj **36** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL; 0,648 mmol) i *o*-klorfenil-azid (0,39 ml; 0,778 mmol).

Smjesa je postavljena u mikrovalni reaktor na temperaturi od 85°C na 30 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje. Otopalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH = 250:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali uljasti spoj **40** (4,0 mg; 2,50%) i bijeli praškasti kristali spoja **44** (6,0 mg; 3,75%; T_f=126°C-127°C)

3.3.29. N-1-(1-benzil-4-metil)-1,2,3-triazol-1,2,3-triazolo[4,5-d]1,2,4-trihidropirimido[1,6-a]pirimidin (45)

Spoj **36** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL 0,648 mmol) i benzil azid (0,39 ml; 0,778 mmol). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, otopalo nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH = 250:1) pri čemu su izolirani ružičasti praškasti kristali spoja **45** (5,4 mg; 3,68%; T_f=141°C-142°C)

3.3.30. N-1-(1-*p*-jodfenil-4-metil)- 1, 2, 3-triazol-1, 2, 3-triazolo[4,5-d]1,2,4-trihidropirimido[1,6-a]pirimidin (46)

Spoj **36** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 ml; 0,648 mmol) i *p*-jodfenil-azid (0,39 ml; 0,778 mmol). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje. Otopalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH = 250:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **46** (11,8 mg; 5,46%; T_f=203°C-205°C)

3.4. Preliminarna ispitivanja interakcija nekih pripremljenih spojeva s *ct*-DNA

ct-DNA čistoće >99% (Aldrich) otopljena je u BPE puferu (6,0 mM Na₂HPO₄; 2,0 mM NaH₂PO₄ i 1,0 mM EDTA) u koncentraciji reda veličine 10⁻² moldm⁻³ i korištena je bez daljnjeg pročišćavanja. Koncentracija fosfata polinukleotida određena je na osnovu apsorbanije u puferu pH = 7; 0,01 moldm⁻³ prema vrijednostima: *calf thymus* DNA na 260 nm, λ = 6600. Zbog održavanja konstantnog pH tijekom titracije korišten je BPE pufer.

Kod UV/Vis titracija praćene su promjene spektra ispitivanog spoja u području valnih duljina 300-450 nm gdje polinukleotid ne apsorbira UV/Vis zračenje.

Kod fluorescencijskih titracija praćene su promjene intenziteta fluorescencije ispitivanog spoja na valnim duljinama (λ_{em} = 380-600 nm) gdje niti jedan sastojak u otopini ne pokazuje apsorbaniju u UV/Vis, te su korištene valne duljine pobude kod kojih polinukleotid *ct*-DNA ne apsorbira u UV/Vis (λ_{eksc.} > 320 nm). Fluorescencijski spektri su korigirani prema baznoj liniji pufera.

Sva mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi, a podaci pohranjeni kao ASCII datoteke. UV/Vis i fluorescencijski spektri obrađeni su pomoću programa Origin 8.0.

Titracije su provedene u uvjetima ravnotežnog stanja između nastalog kompleksa te slobodnog spoja i *ct*-DNA. Promjene spektara ispitivanih spojeva nakon dodatka *ct*-DNA korigirane su za razrjeđenje. Ukupno razrjeđenje tijekom titracija bilo je 3-15%.

Titracije su provođene relativno kratko vrijeme (5 min) u kojem je uspostavljeno ravnotežno stanje po dodatku supstrata u otopinu ispitivanog spoja. Kod UV/Vis i fluorimetrijskih titracija u kivetu s puferiranom otopinom ispitivanog spoja dodavani su alikvoti puferirane vodene otopine supstrata *ct*-DNA. Po svakom dodatku nakon navedenog vremena uravnoteženja uz miješanje snimljen je spektar ispitivanog spoja.

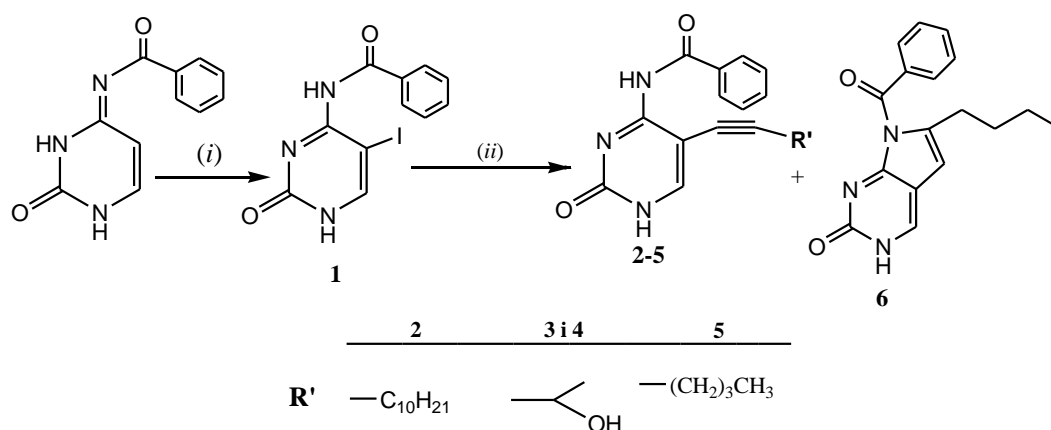
UV/Vis titracije ispitivanih spojeva (c ~ 10⁻⁵ moldm⁻³) s *ct*-DNA korištene su većinom za određivanje batokromnog, hipsokromnog, hipokromnog i hiperkromnog pomaka.

Fluorimetrijske titracije ispitivanih spojeva (c ~ 10⁻⁶ moldm⁻³) s *ct*-DNA korištene su za praćenje promjena intenziteta fluorescencije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteze spojeva

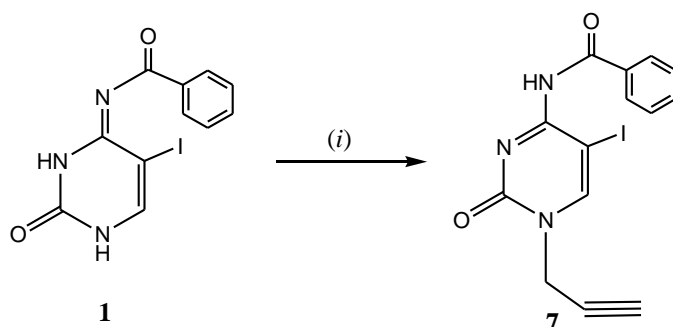
Reakcijom jodiranja *N*-4-benzoilcitozina s I₂ uz cerijev(IV)amonijev nitrat (CAN) u acetonitrilu (AcN) pripravljen je ključni prekursor *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**). Različiti supstituenti s etinskom prenosnicom u položaju C-5 pirimidinskog prstena uvedeni su paladijem kataliziranom Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja. Tako su reakcijom *N*-4-benzoil-5-jodcitozina (1 mol) s alifatskim terminalnim alkinima uz katalitičku količinu tetrakistrifenilfosfin paladija ((PPh₃)₄Pd, 0,1 mol), CuI (0,2 mol) i trietilamina (2 mol) u DMF-u sintetizirani C-5-supstituirani citozinski derivati **2–6** (Shema 1).



Shema 1: Reagensi i uvjeti: (i) I₂/ CAN/ AcN/ 2 h refluks, 24 h sobna temp.

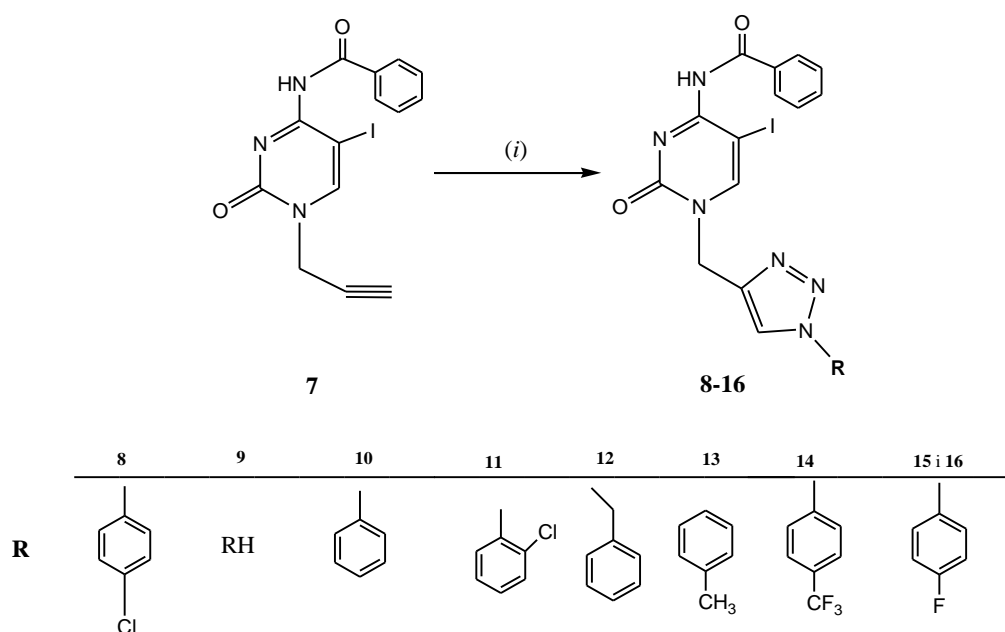
(ii) terminalni alkin/ CuI/ (PPh₃)₄Pd/ Et₃N/DMF/ 24 h/ sobna t.

Zatim je reakcijom *N*-alkiliranja *N*-4-benzoil-5-jodcitozina (**1**) uz NaH (1,2 mol) kao deprotonirajuće sredstvo te propargil-bromid (1,2 mol) u DMF-u pripravljen polazni spoj (**7**) za "klik" reakcije potpomognute mikrovalovima (Shema 2).



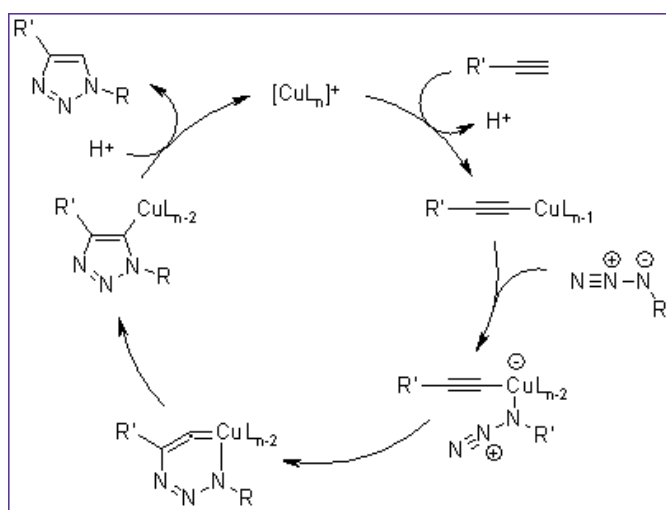
Shema 2: Reagensi i uvjeti: (i) NaH/ Br-CH₂-C≡CH/DMF/24 h sobna temp.

N-1-triazolilni derivati (**8-16**) su dobiveni "klik" reakcijom, tj. Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom propargiliranog citozinskog derivata (**2**) i odgovarajućih azida s bakrom kao katalizatorom, pri čemu su pripremljeni 1,4-disupstituirani regioizomeri koji dozvoljava specifičnu sintezu 1,4-disupstituiranih izomera (Shema 3).



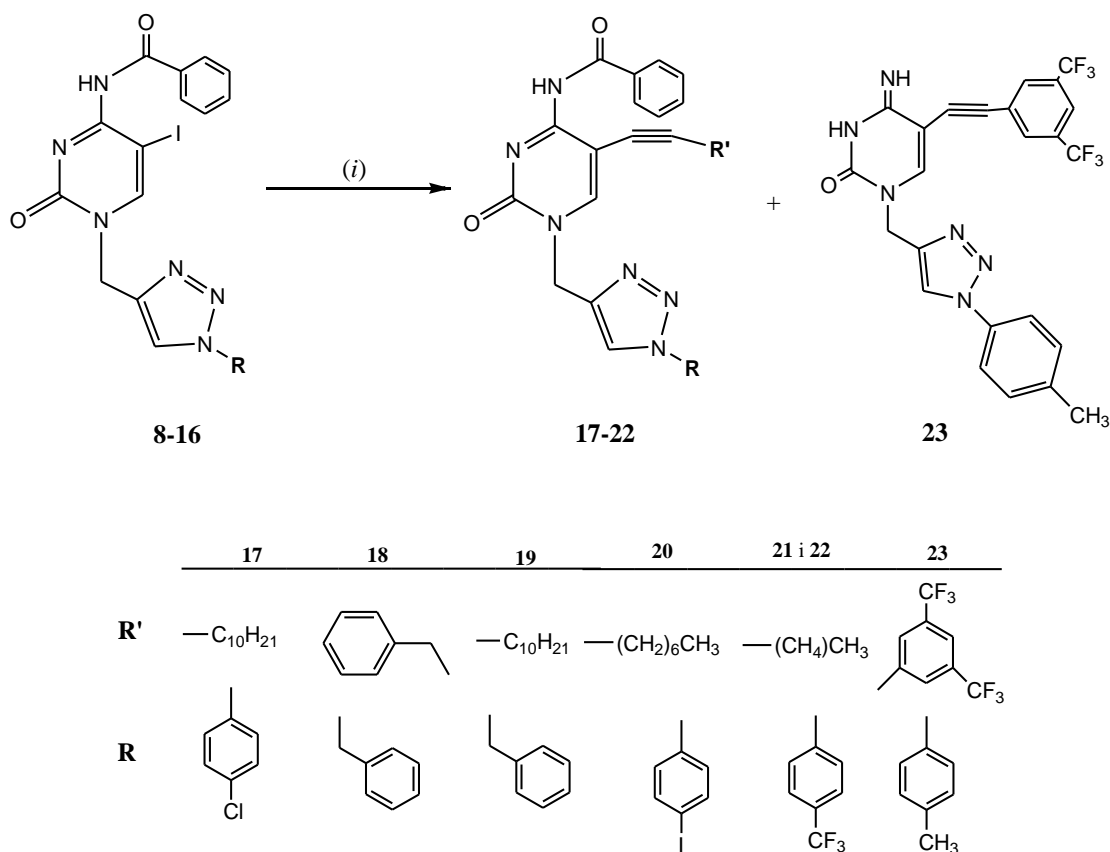
Shema 3: Reagensi i uvjeti: (i) azid/CuSO₄/ H₂O: *tert*-BuOH=1:1/DMF/Cu/45 min 80°C u mikrovalnom reaktoru

Mehanizam Huisgenove ciklizacije prikazan na Shemi 4 prikazuje specifičnost bakra kao katalizatora, koji prvo stvara kompleks s acetilenom nakon čega azid istiskuje drugi ligand koji je vezan za bakar pri čemu nastaje šesteročlani bakar (III) ciklički kompleks, čijom pregradnjom nastaje 1,2,3-triazol.



Shema 4: Mehanizam bakrom katalizirane azid-alkin Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije

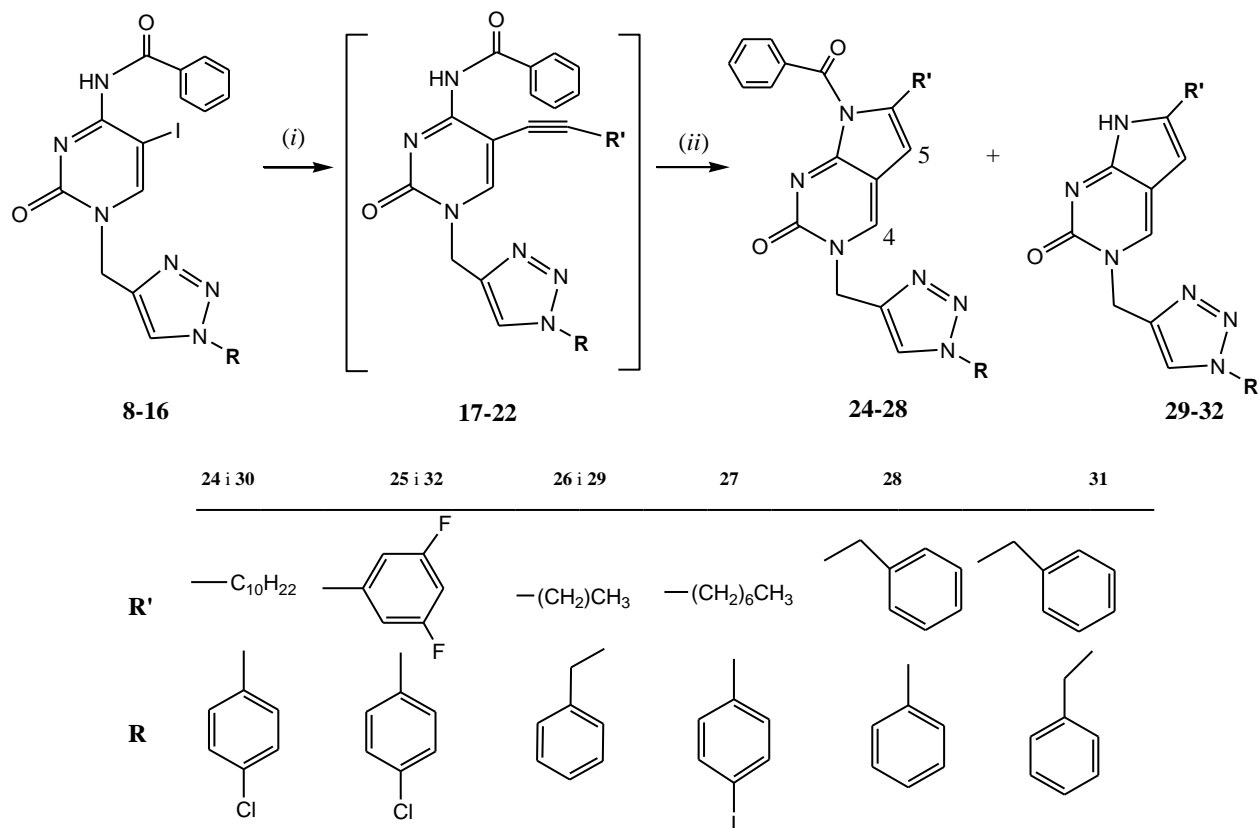
Sonogashira-inom reakcijom derivata *N*-1-triazolil-*N*-4-benzoil-5-jodcitozina (**8-16**) (1 mol) s alifatskim i aromatskim terminalnim alkinima uz katalitičku količinu tetrakstrifenilfosfin paladija ((PPh₃)₄Pd, 0,1 mol), CuI (0,2 mol) i trietilamina (2 mol) u DMF-u sintetizirani su C-5-supstituirani derivati *N*-1-triazolil-*N*-4-benzoilcitozina (**17-22**) te *N*-1-triazolilcitozina (**23**) (Shema 5)



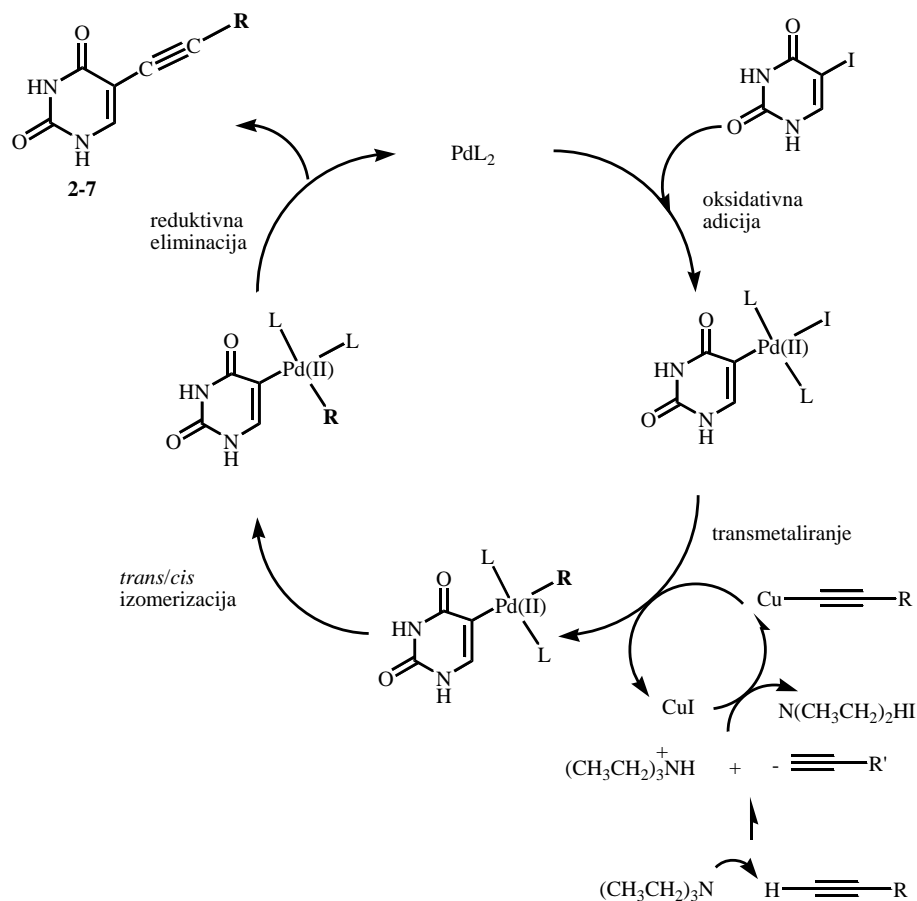
Shema 5. Reagensi i uvjeti: (i) terminalni alkin/ CuI/ (PPh₃)₄Pd/ Et₃N/DMF/ 24 h/ sobna t.

7-deazapurinski derivati (**24-32**) sintetizirani su Sonogashira-inom reakcijom, uz dodatak trietilamina i bakrovog(I)jodida *in situ* nakon provođenja reakcije pri sobnoj temperaturi (Shema 6). Mehanizam reakcije prikazan je na shemi 7. Sonogashira-ina reakcija terminalnih alkina s derivatima *N*-1-triazolil-*N*-4-benzoil-5-jodcitozina te njihova *in situ* ciklizacija pospješena bakrovim(I)jodidom daje derivate 6-alkil(aril)pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2-ona (**24-32**). Ovi su biciklički pirolpirimidinski analozi sintetizirani *N*-heteroanulacijom, odnosno *5-endo-dig* elektrofilnom ciklizacijom različitih alkinilnih derivata kataliziranom CuI u trietilaminu pri povišenoj temperaturi ili produljenjem vremena reakcije. Reakcija ciklizacije uključuje dušik u položaju C-4 pirimidinskog prstena i etinsku vezu na položaju C-

5 pirimidinskog prstena. Ovakve ciklizacije katalizirane bakrovim(I)jodidom mogu se provoditi *in situ*, ili pak izoliranjem supstituiranih 5-alkinilcitozina.

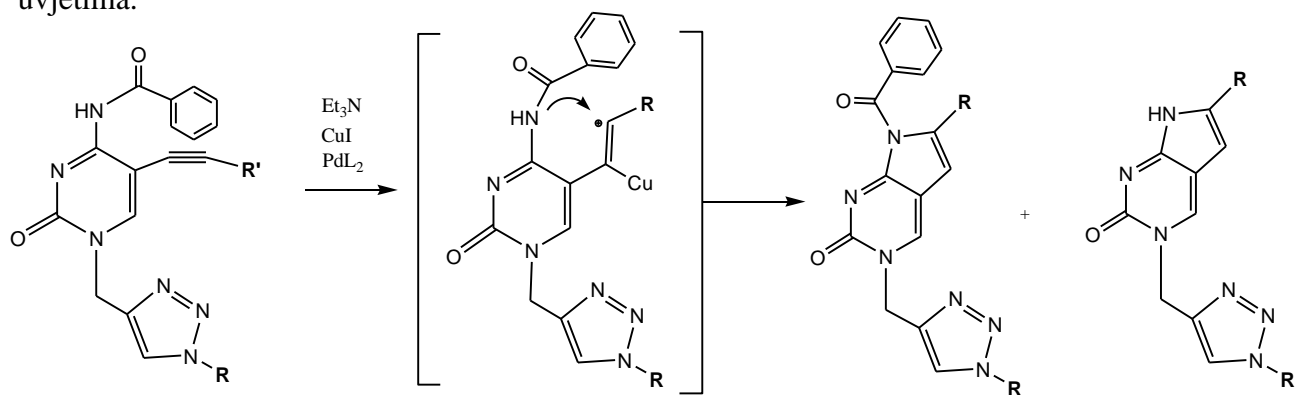


Shema 6. Reagensi i uvjeti: (i) terminalni alkin/CuI/ $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ / Et_3N / toluen/ 24 h/ s.t.; (ii) CuI, Et_3N



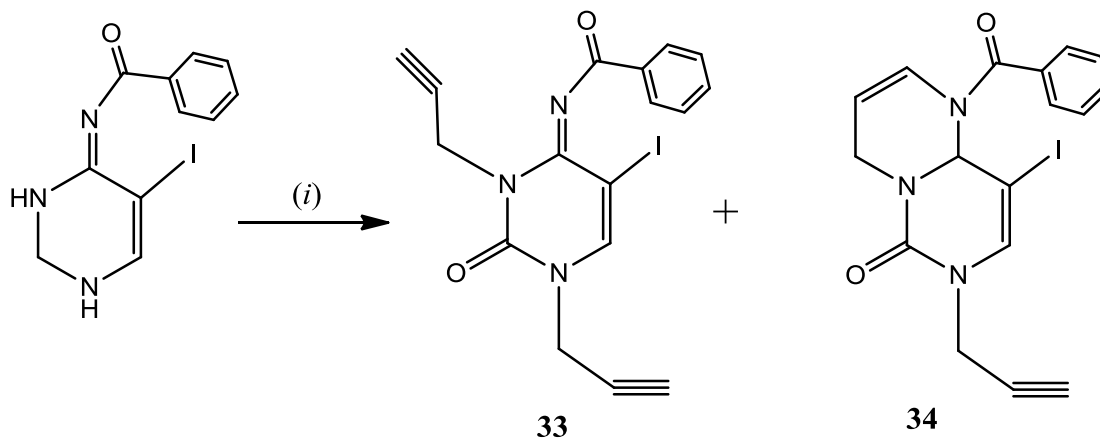
Shema 7.: Mehanizam nastajanja C-5 supstituiranih citozinskih derivata (**2-6** i **17-23**) Sonogashirinom reakcijom.

Intermolekularna *5-endo-dig* ciklizacija 5-alkilpirimidina je bitna strategija u sintezi pirolo[2,3-*d*]pirimidina i drugih heterocikla. Kao što je prikazano na Shemi 8, reakcija se odvija aktivacijom alkinilnog ostatka koordinacijom prijelaznog metala Cu(I), nakon koje dolazi do nukleofilnog napada dušika na aktivirani *sp* ugljik koji dovodi do ciklizacije produkta. U odsutnosti prijelaznog metala, *endo-dig* ciklizacija se može provoditi u bazičnim uvjetima.



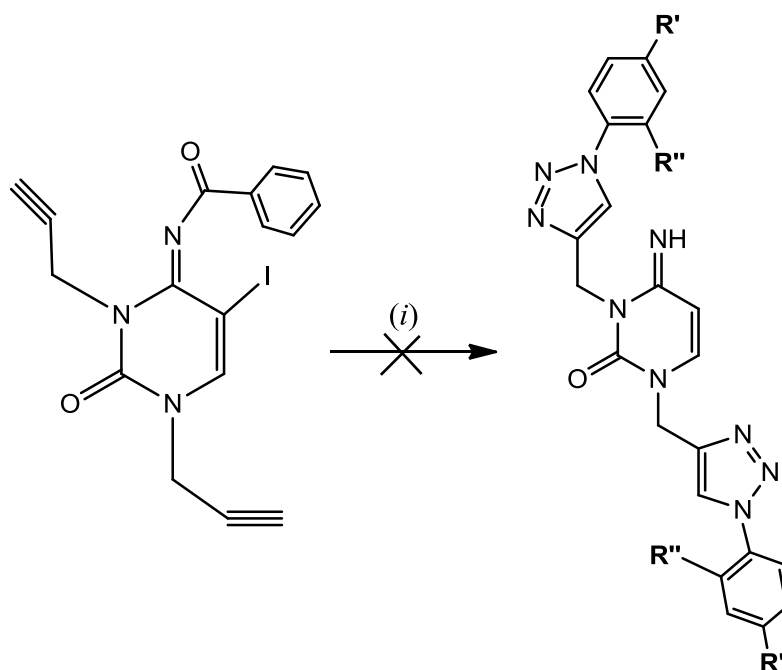
Shema 8: Mehanizam nastajanja pirolo[2,3-*d*]pirimidina (**24-32**) *5-endo-dig* ciklizacijom C-5 supstituiranih citozinskih derivata.

Reakcijom *N*-alkiliranja *N*-4-benzoil-5-jodcitozina i propargil-bromida uz deprotonirajuće sredstvo K_2CO_3 (2,5 mol) pripremljen je *N,N*-1,3-disupstituirani derivat **33** i produkt **34** nastao *in situ* ciklizacijom (Shema 9).

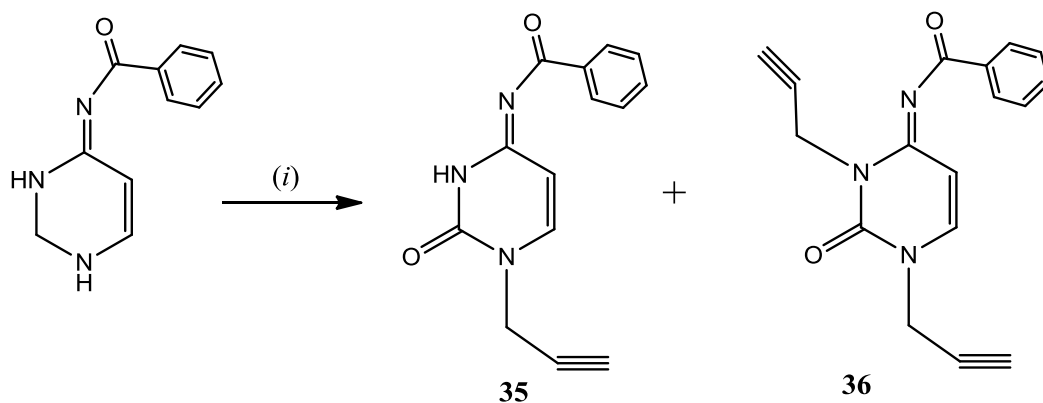


Shema 9. Reagensi i uvjeti: (i) K_2CO_3 / $Br-CH_2-C\equiv CH$ /DMF/24 h sobna temp.

Na shemi 10 prikazan je pokušaj Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije koji nije dao željene produkte. Iz tog je razloga eksperimentalni rad nastavljen dipropargiliranjem bez prethodnog jodiranja, kao što je prikazano na shemi 11.

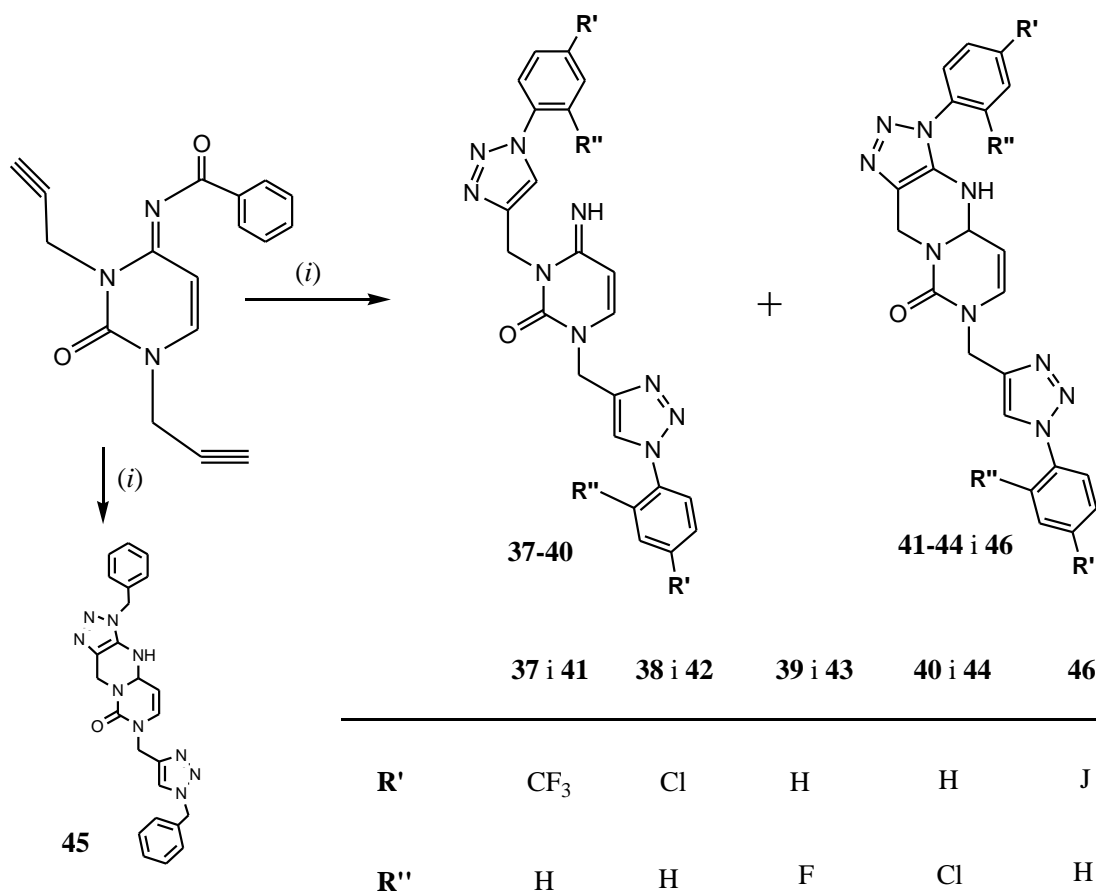


Shema 10. Reagensi i uvjeti: (i) azid/ $CuSO_4$ / Cu /45 min $80^\circ C$ u mikrovalnom reaktoru.



Shema 11. Reagensi i uvjeti: (i) K_2CO_3 / Br- CH_2 - $C\equiv CH$ /DMF/24 h sobna temp.

Reakcijom propargiliranja *N*-4-benzoilcitozina priređeni su monoalkilirani derivati **35** i dialkilirani produkt **36** (Shema 11). *N,N*-1,3-ditriazolilni derivati citozina (**37-40**) sintetizirani su “klik” reakcijom dipropargiliranog citozinskog derivata **35** i odgovarajućih azida s bakrom kao katalizatorom. Uz dobivene produkte nastale Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom, u reakciji su također dobiveni *in situ* ciklizacijom 1,2,3-triazolo[4,5-*d*]1,2,4-trihidropirimido[1,6-*a*]pirimidinski derivati (**41-46**) (Shema 12).

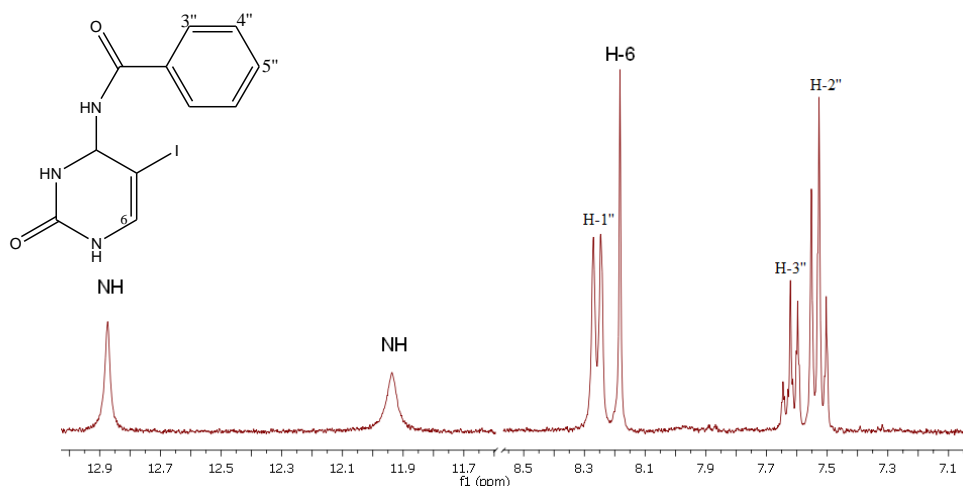


Shema 12. Reagensi i uvjeti: (i) azid/ $CuSO_4$ / Cu /45 min 80°C u mikrovalnom reaktoru

4.2. Strukturna karakterizacija novopripremljenih spojeva ^1H NMR spektroskopijom

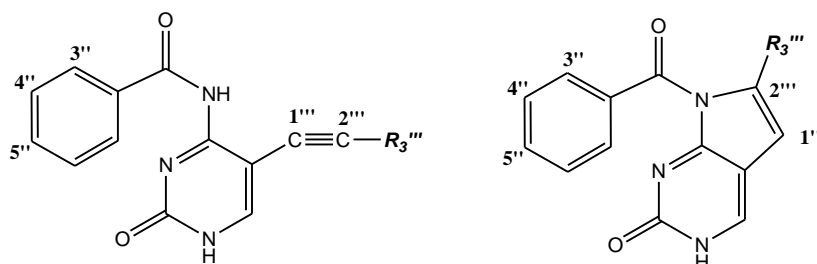
4.2.1. Analiza spektara ^1H NMR C-5 supstituiranih, N-1 i C-5 disupstituiranih citozinskih derivata i C-6 i N-1 supstituiranih derivata 7-dezapurina

Asigniranje ^1H NMR spektara provedeno je na osnovu kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta rezonancija te H-H konstanti sprega.

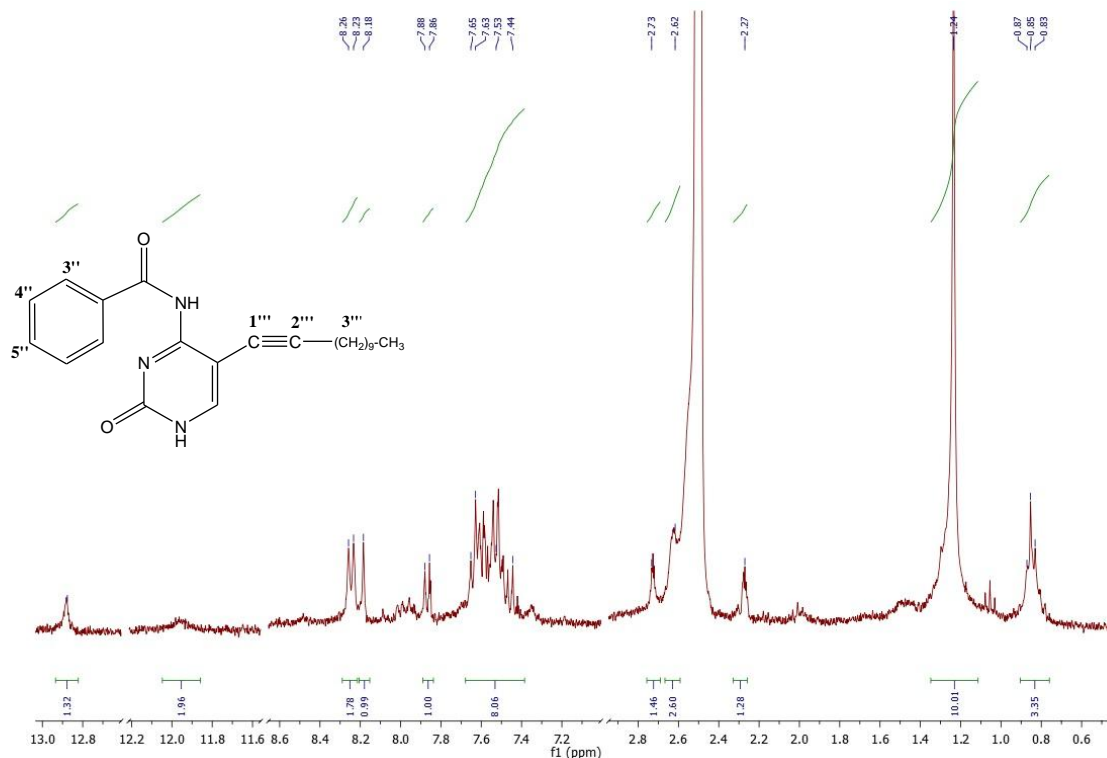


Slika 1. ^1H NMR spektar *N*-4-benzoil-5-jodcitozina (**1**)

U ^1H NMR spektru *N*-4-benzoil-5-jodcitozina (**1**) prisutni su signali za protone pirimidnskog prstena (NH-1, NH-3 i H-6) i fenilne protone benzoilne skupine, uz istovremeni izostanak signala za H-5 proton (5,58 ppm) pirimidnskog prstena što je potvrda jodiranja položaja C-5 *N*-4-benzoilcitozina (Slika 1).



Slika 2. Prikaz općih struktura C-5 alkinilnih derivata *N*-4-benzoilcitozina te C-5 alkinilnih pirolo[2,3-*d*]pirimidinskih derivata



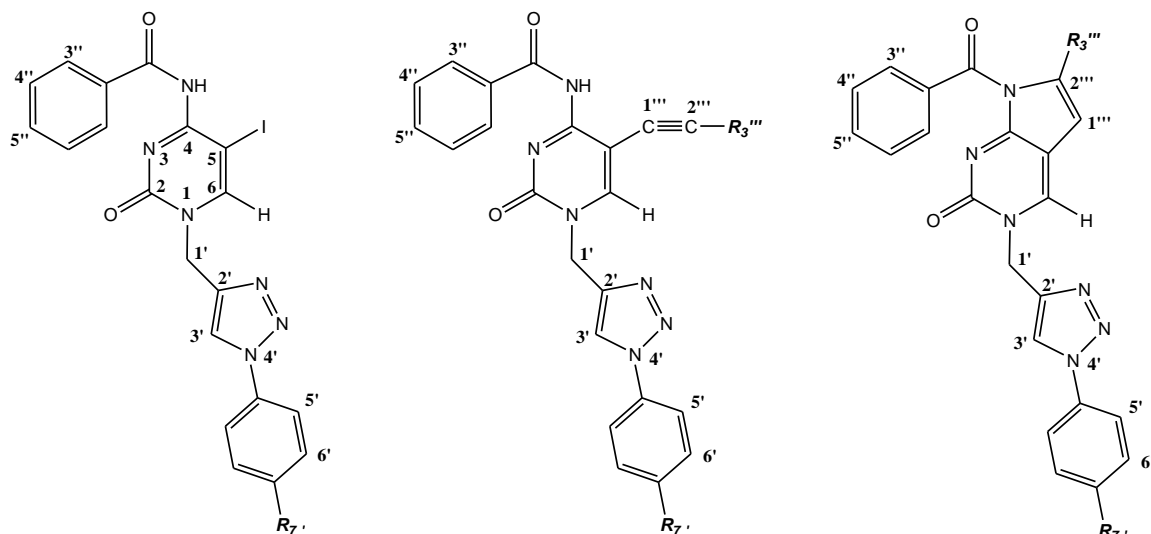
Slika 3. ^1H NMR spektar spoja **2**

U spektrima ^1H NMR spojeva **2-6** prisutni su signali za protone pirimidinskog prstena (H-6, NH-1 i NH-3) i fenilnog prstena benzoilne skupine (Ph-3'',4'',5''). Pored navedenih signala pojavljuju se i odgovarajući signali alifatskih (CH_2 , CH_3) i aromatskih (Ph-3'''-5''') protona pobočnog lanca u položaju C-5 pirimidinskog prstena.

Usporedbom ^1H NMR spektara ključnog intermedijara *N*-4-benzoil-5-jodcitozina (**1**) i spoja **2** potvrđeno je uvođenje alkinilnog pobočnog lanca Sonogashira-inom reakcijom u položaj 5 pirimidinskog prstena (Slike 1 i 3). Tako su u spektru spoja **2** pored signala pirimidinskog prstena (NH-1, NH-3 i H-6) i signala fenilnih protona (7,50-7,60 ppm), uočeni triplet intenziteta 3H za metilne protone (0,85 ppm), za metilenske protone triplet intenziteta 2H na 2,73 ppm, multiplet intenziteta 2H na 2,27 ppm i multiplet intenziteta 10H na 1,24 ppm.

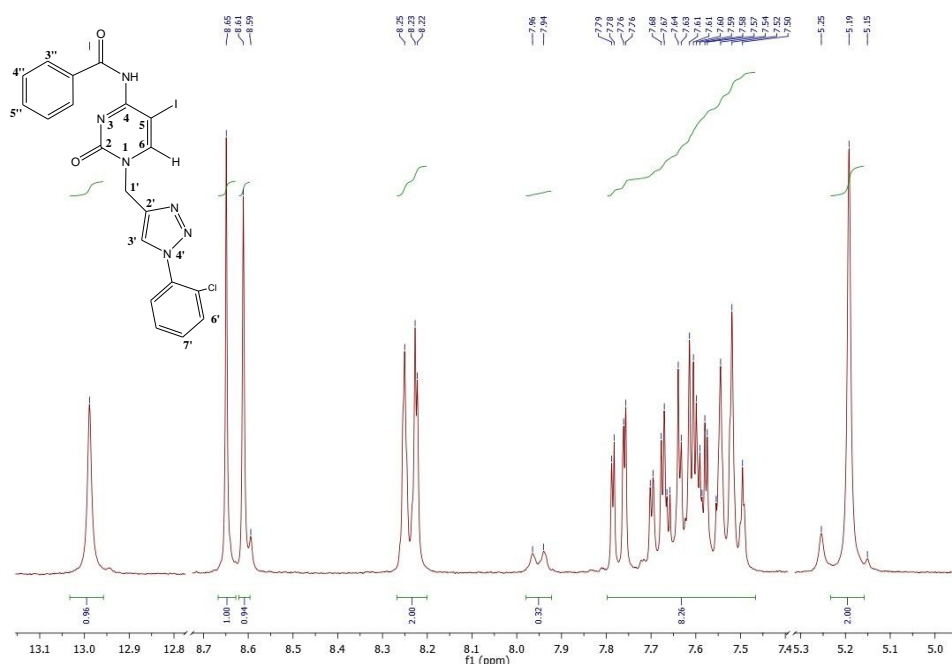
Analizom spektara ^1H NMR na temelju kemijskih pomaka, veličine signala i multipliciteta sprega spin-spin između jezgara H i H potvrđena je ciklizacija spoja **5** u pirololo[2,3-*d*]pirimidinski derivat (**6**) (Tablica 1). Spektri ^1H NMR pokazuju signale protona NH, H-4 i H-5 pirolopirimidinskog prstena, ali ne pokazuju signal za proton NH-3

pirimidinskog prstena. Također je uočen novi signal za vinilni proton ($\sim 6,2$ ppm), te odgovarajući signali protona alifatskih i aromatskih skupina.

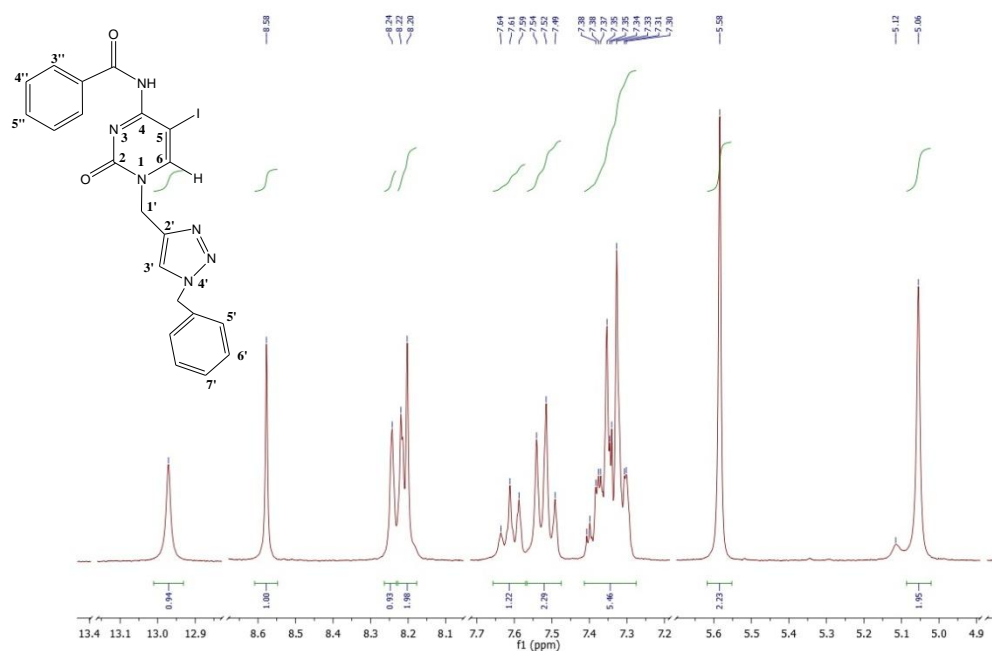


Slika 4. Prikaz općih struktura *N*-1 triazolilnih i *N*-1 triazolilnih, C-5 alkinilnih *N*⁴-benzoilcitozinskih derivata te *N*-3 triazolilnih pirolo[2,3-*d*]pirimidinskih derivata

U ¹H NMR spektrima spojeva **8-16**, pored signala pirimidinskog prstena prisutni su signali za proton triazolnog prstena na ~ 8 ppm (H-3'), te signali za fenilne protone (dubleti na 8,23 - 7,99 ppm, ovisno supstituentima na fenilnom supstituentu triazola), kao što se vidi na primjeru spojeva **11** i **12** (slike 5 i 6).

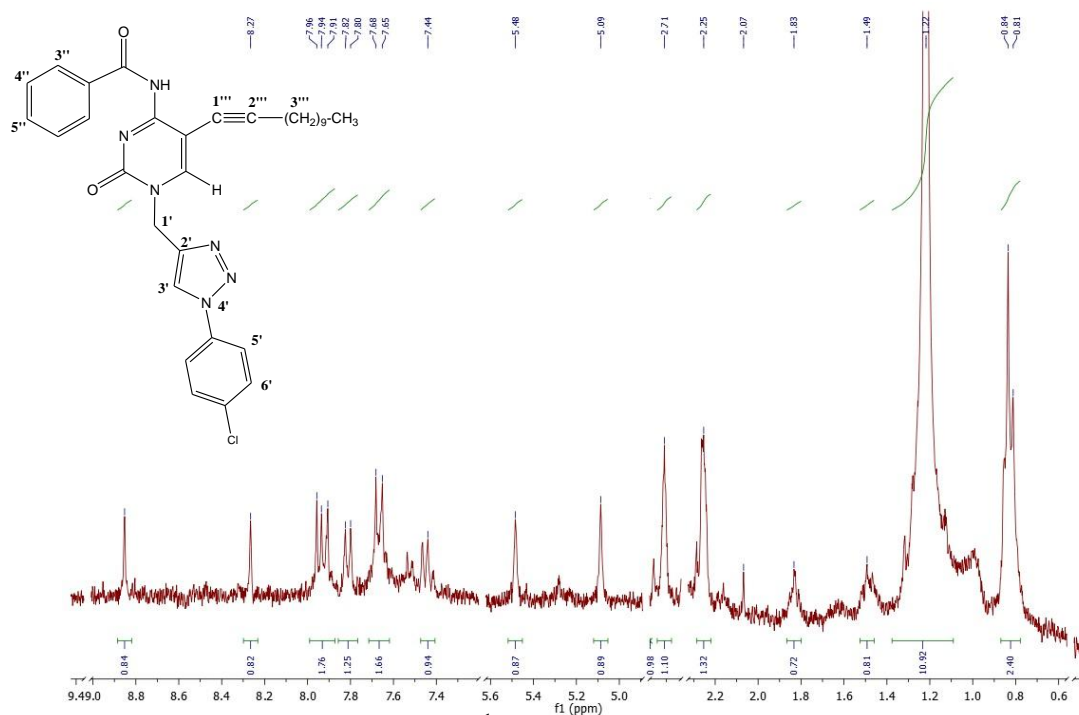


Slika 5 . ¹H NMR spektar spoja **11**



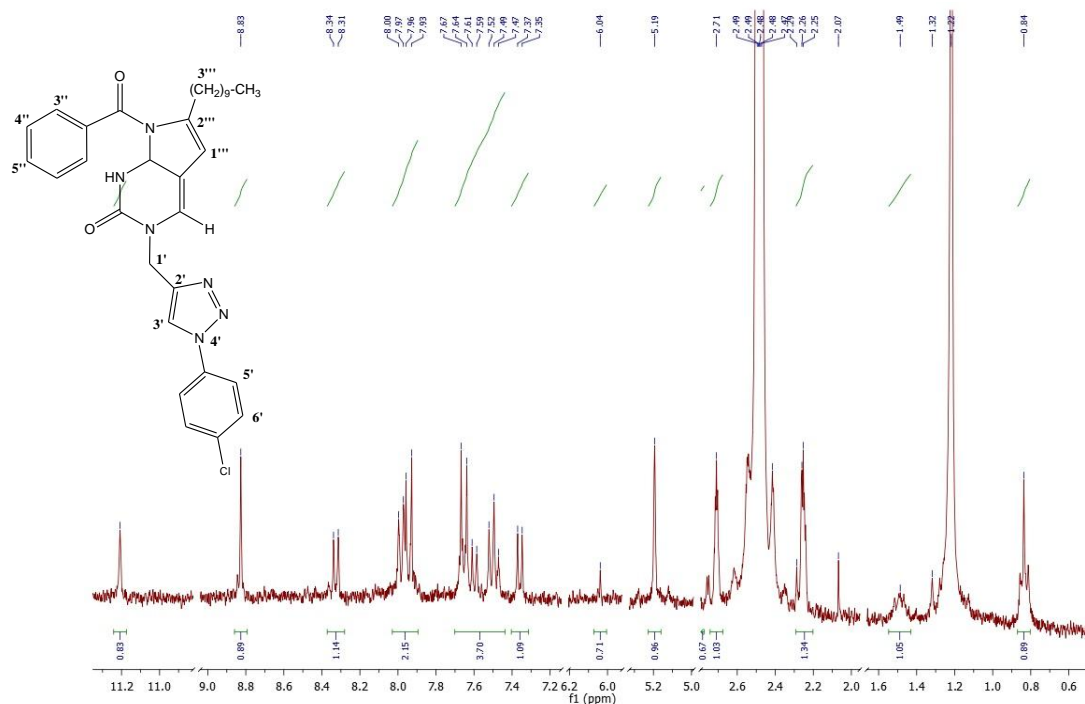
Slika 6. ¹H NMR spektra spoja 12

Iz ¹H NMR spektra spoja 17 vidljivo je da je Sonogashira-inom reakcijom uveden alkinilni supstituent u položaj C-5 uz prisustvo novih signala u alifatskom području (slika 7) u usporedbi sa spektrima spojeva 11 i 12.

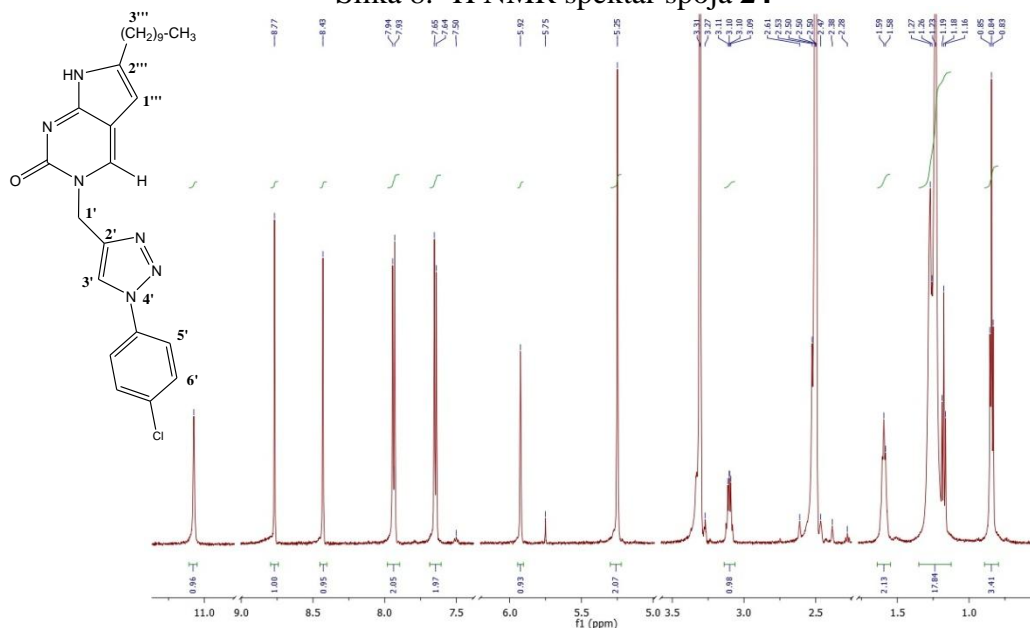


Slika 7. ¹H NMR spektar spoja 17

Analizom spektara ^1H NMR na temelju kemijskih pomaka, veličine signala i multipliciteta sprega spin-spin između jezgara H i H potvrđena je ciklizacija spoja **17** u pirolo[2,3-*d*]pirimidinski derivat (**24**). Spektri ^1H NMR pokazuju signale protona NH, H-6 i H-1''' pirolpirimidinskog prstena. Signal atoma H-1''' na 6,04 ppm dokazuje ciklizaciju u pirolpirimidinski derivat, a uočeni su i odgovarajući signali protona alifatskih i aromatskih skupina (Slika 8).



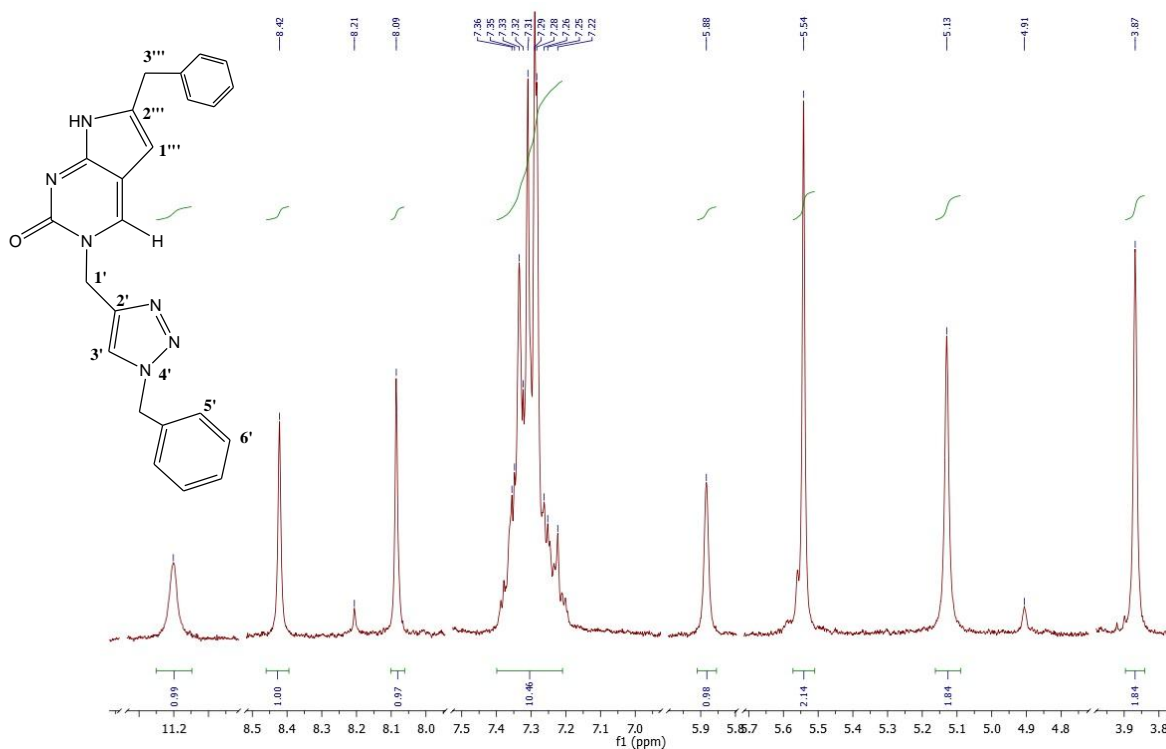
Slika 8. ^1H NMR spektar spoja **24**



Slika 9. ^1H NMR spektar spoja **30**

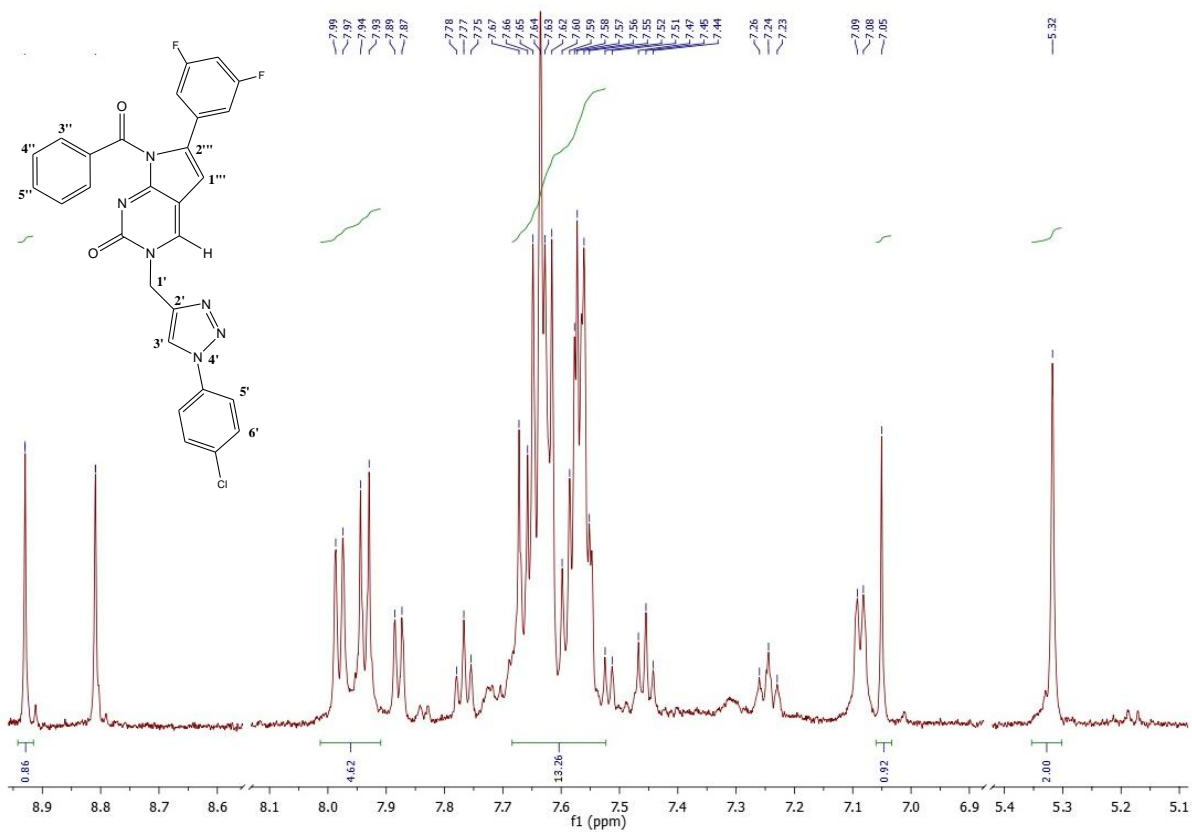
U ^1H NMR spoja **30** prisutni su svi signali kao i kod spoja **24**, osim signala protona benzoilne skupine (7,35-7,99 ppm), što je dokaz uklanjanja benzoila (Slika 9).

U ^1H NMR spektru spoja **31** prisutni su signali koji ukazuju na bicikličku strukturu, singlet intenziteta 1H na 5,88 ppm (pirolni proton, H-1'''), dok signal za fenilne protone na 7,22-7,38 ppm (m, 10H) ukazuje na odsustvo benzoilne zaštite (Slika 10).

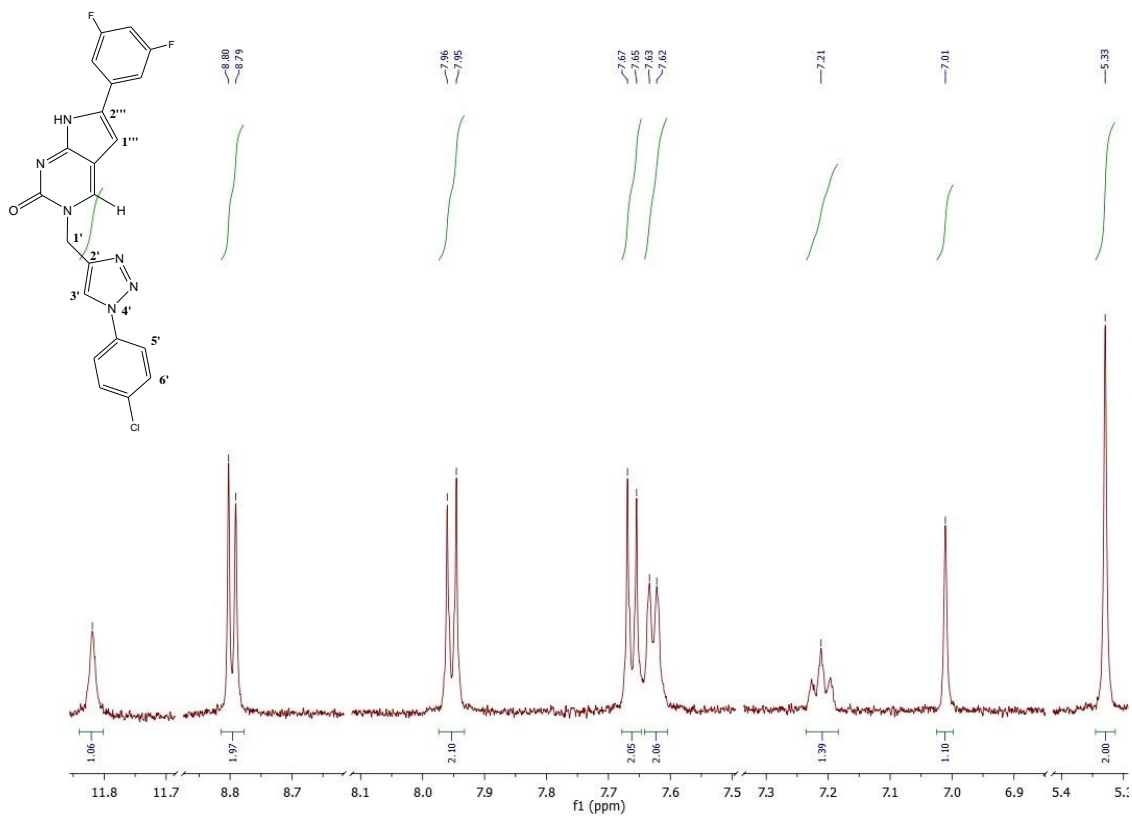


Slika 10. ^1H NMR spektar spoja **31**

Na slikama 11 i 12 prikazani su ^1H NMR spektri spojeva **25** i **32** u kojima su prisutni karakteristični kemijski pomaci, signal intenziteta 1H, koji odgovara pirolnom protonu (H-1''') na 7,05, tj. 7,11 ppm-a i ukazuje na nastajanje pirol[2,3-*d*]pirimidinskih derivata. Spektri sadrže sve karaktersitčne kemijske pomake arilnog supstituenta u položaju C-2''', dok se u spektru spoja **25** vidi izostanak fenilnih protona benzoilne skupine (Slike 11 i 12).

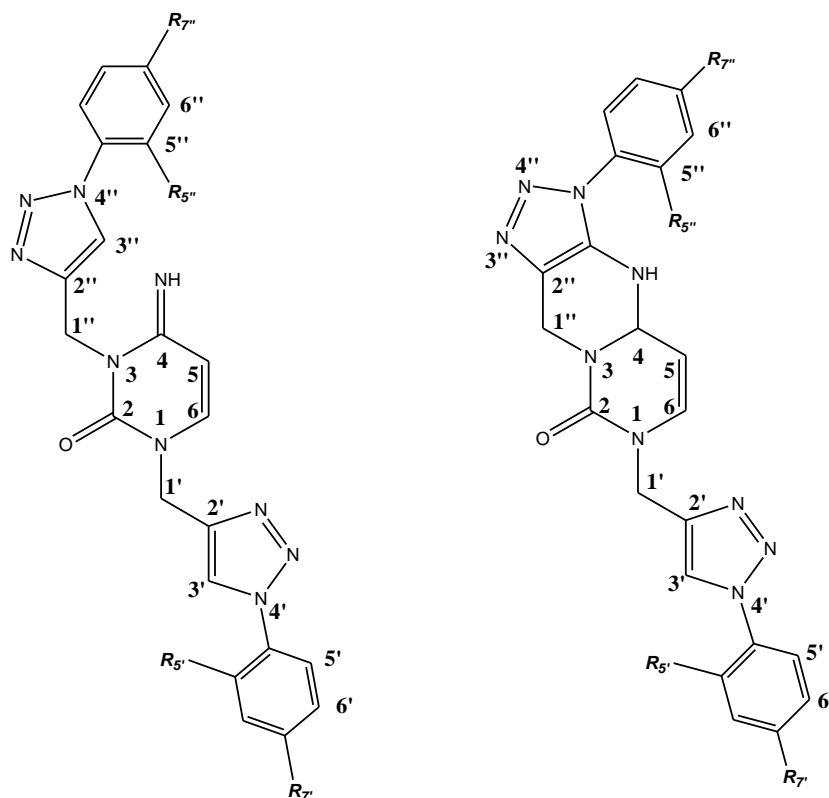


Slika 11. ^1H NMR spektar spoja **25**



Slika 12. ^1H NMR spektar spoja **32**

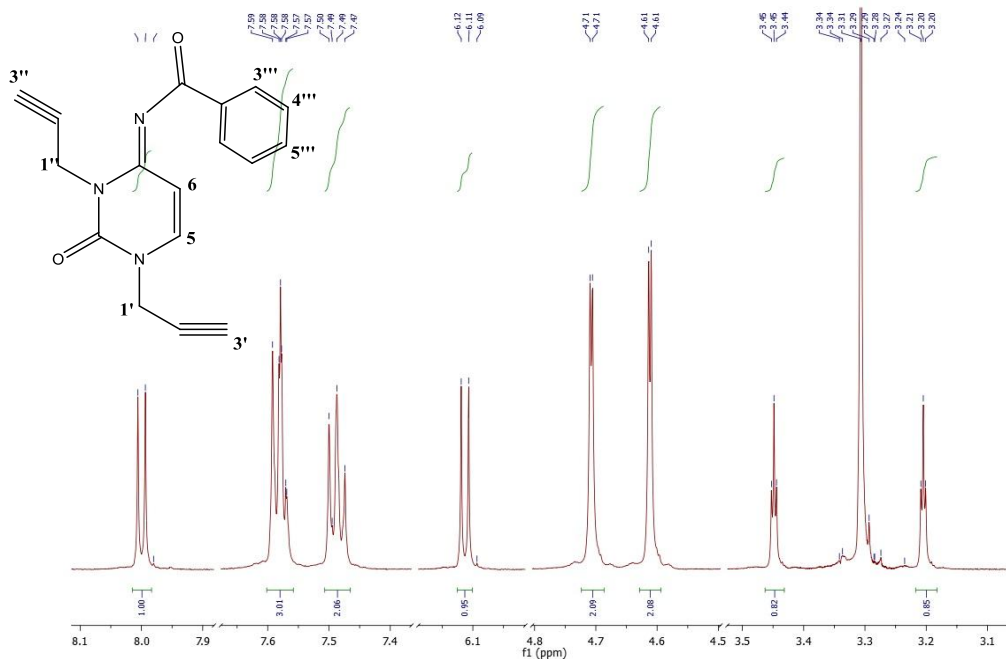
4.2.2. Analiza spektara ^1H NMR N,N -1,3-ditriazolilnih citozinskih derivata i 1,2,3-triazolo[4,5- d]1,2,3-trihidropirimido[1,6- a]pirimidinskih derivata



Slika 13. Prikaz općih struktura N, N -1,3 disupstituiranih citozinskih derivata (-) i triazolilnih 1,2,3-triazolo[4,5- d]pirimido[1,6- a]pirimidinskih derivata (-)

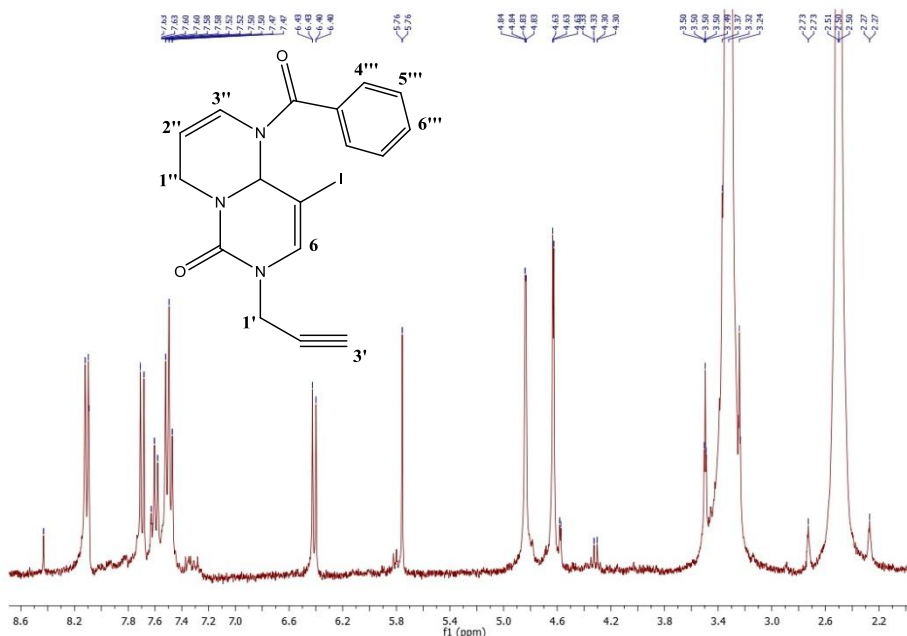
Asigniranje ^1H NMR spektara provedeno je na osnovu kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta rezonancija te H-H konstanti sprega. Na slici 13 prikazane su opće strukture spojeva N,N -1,3 disupstituiranih citozinskih derivata (-) i triazolilnih 1,2,3-triazolo[4,5- d]pirimido[1,6- a]pirimidinskih derivata (-).

U ^1H NMR spektru spoja **36** prisutni su signali za H-6 i H-5 protone citozinskog prstena, fenilni protoni benzoilne zaštite na položaju N -4 citozina, te protoni propargilnih supstituenata u položajima N -1 i N -3 N -4-benzoilcitozina, CH_2 -1' i 1'' na 4,71 i 4,61 ppm-a, te metinski (CH -3' i 3'') protoni na 3,45 i 3,20 ppm-a (Slika 14).



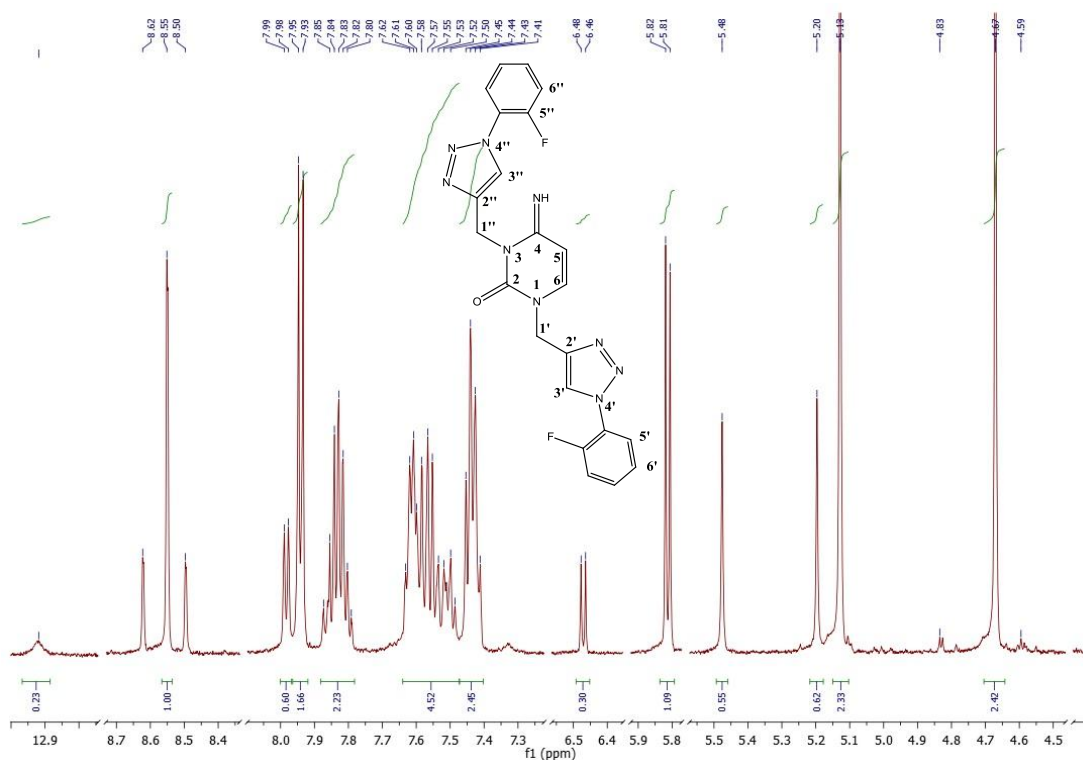
Slika 14. ^1H NMR spektar spoja **36**

U ^1H NMR spektru spoja **34** prisutni su signali za metilenske protone (CH-2'' i 3'') na ~3,21 i ~3,39 ppm-a te signal za H-4 proton na 6,42 ppm-a koji dokazuje pretpostavljenu cikliziranu strukturu, uz ostale protone *N*-1 propargilnog i C-6 i C-5 protone citozinskog prstena te benzoilne skupine (Slika 15).

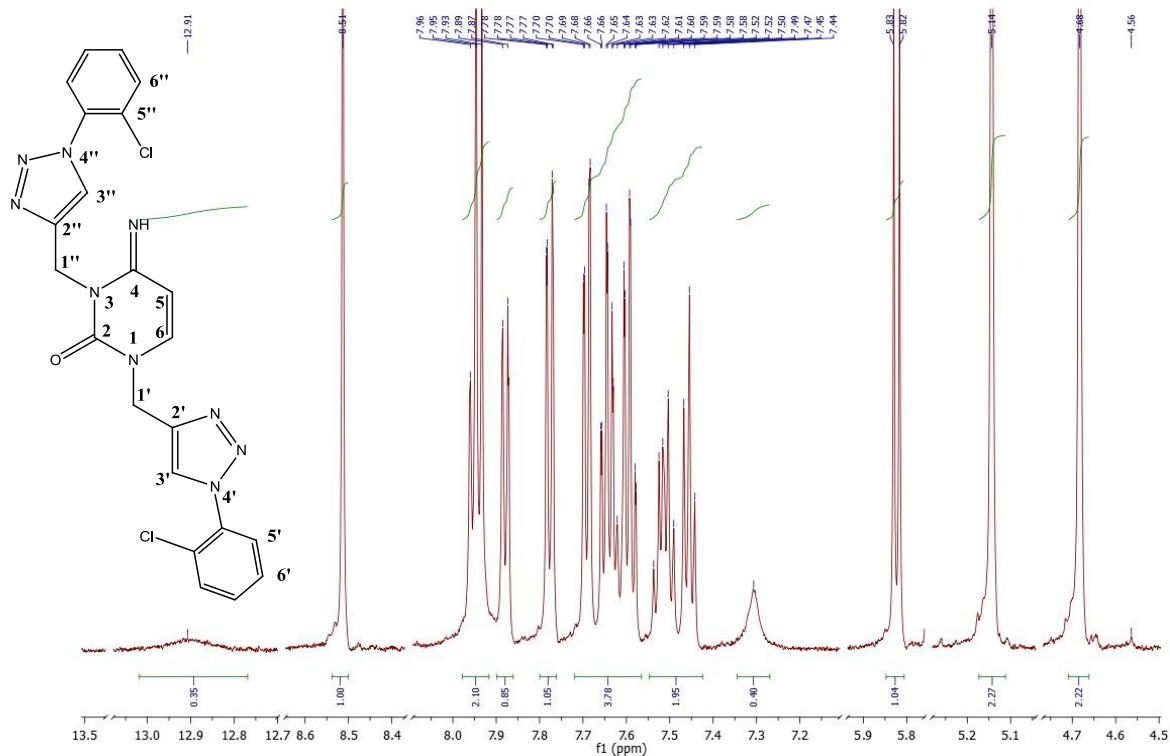


Slika 15. ^1H NMR spektar spoja **34**

U ^1H NMR spektrima N,N -1,3 ditriazolilnih derivata citozina (**39** i **40**) prisutni su signali za protone pirimidinskog prstena, triazolnog i fenilnog prstena (Slike 16 i 17). Karakteristični kemijski pomaci koji pokazuju signale za H-3' i H-3'' protone triazolilnog prstena 8,70 i 7,95 ppm-a, a koji su u dipropragiliranom citozinskom derivatu (**36**) bili tripleti na 3,45 i 3,20 ppm-a. Osim toga nisu prisutni signali za fenilne protone benzoilne zaštite u položaju N -4, pa ukupan broj fenilnih protona iznosi 8H, što proizlazi iz prisustva 2 triazolilne jezgre, različito supstituirane fenilnim lacima u položaju C-4', odnosno C-4'' triazola. Na slikama 18 i 19 prikazani su ^1H NMR spektri ditriazolilnih derivata citozina 1,2,3-triazolo[4,5- d]pirimido[1,6- a]pirimidina (**43** i **44**) nastalih intermolekulskom ciklizacijom spojeva **39** i **40**.

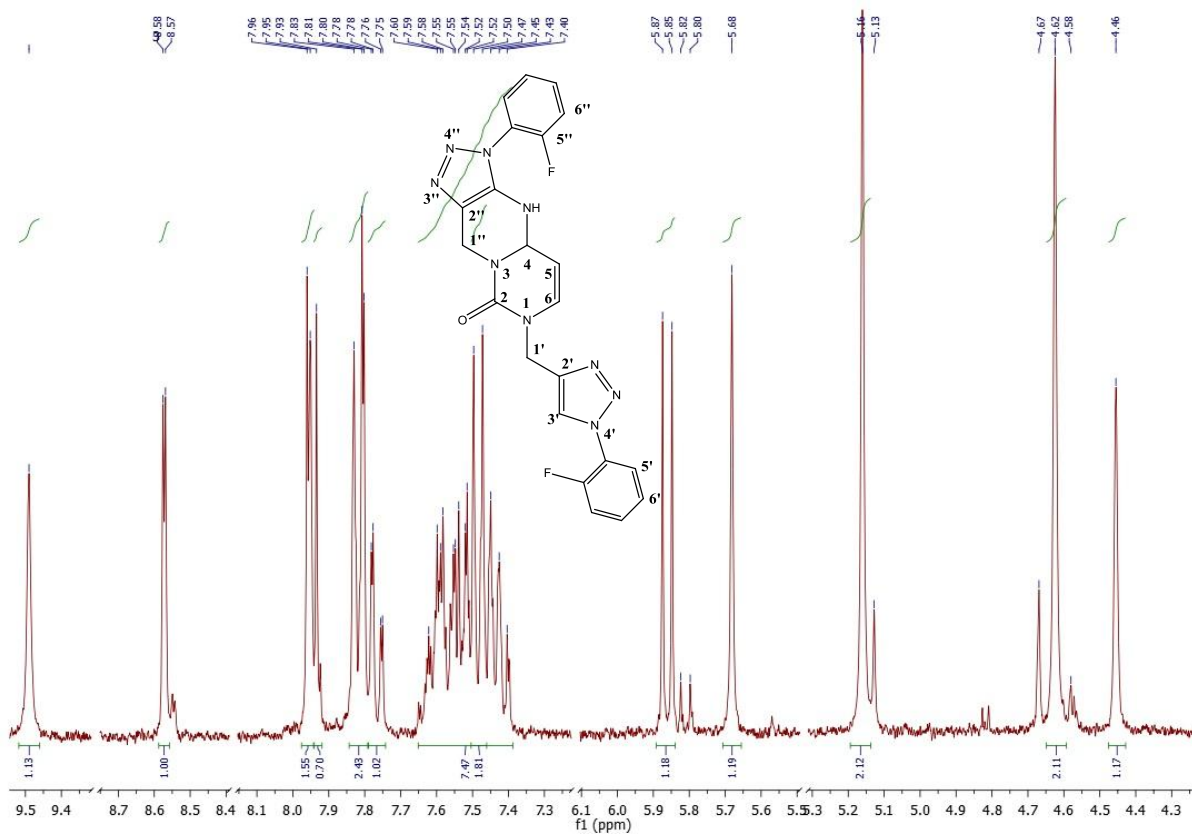


Slika 16. ^1H NMR spektar spoja **39**

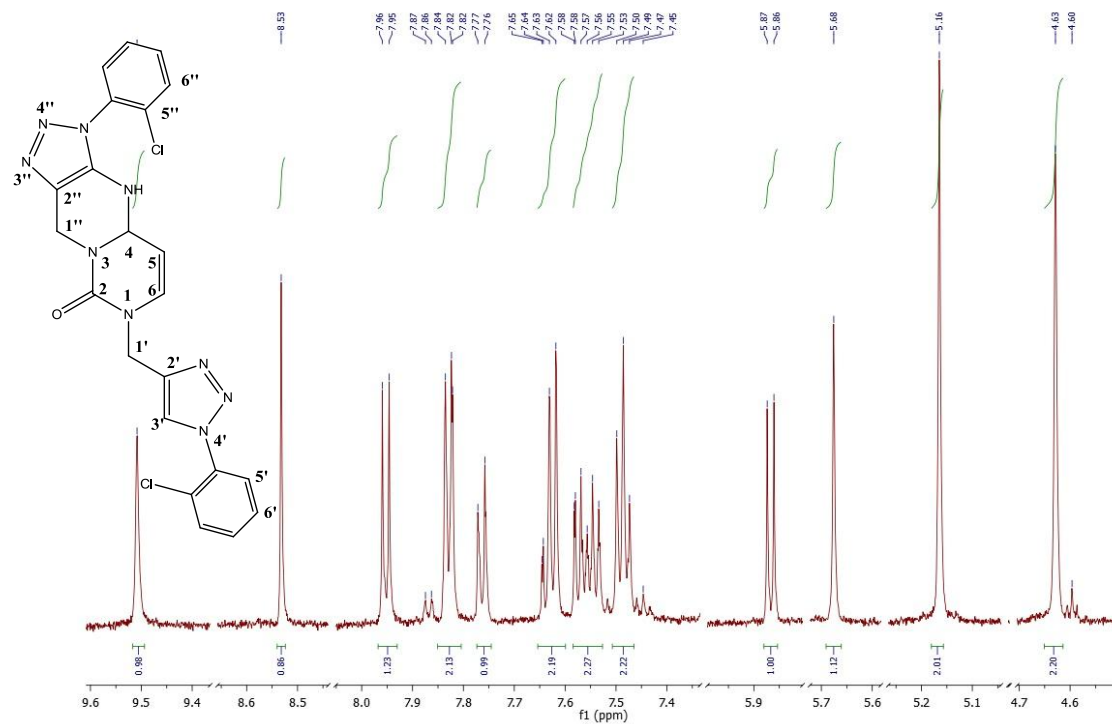


Slika 17. ^1H NMR spektar spoja **40**

Signali karakterističnih protona ovih struktura su singlet za H-4 proton na 4,46 ppm-a kod spoja **43** i na 4,43 ppm-a kod spoja **44**, te signal za NH-4 proton citozinskog prstena na ~9,5 ppm-a u odnosu na istovrsni proton *N,N*-1,3 ditriazolilnih derivata (**39** i **40**) koji se nalaze na ~12,9 ppm-a (Slike 18 i 19).

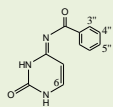


Slika 18. ^1H NMR spektar spoja 43



Slika 19. ^1H NMR spektar spoja 44

Tablica 1. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **1-6**

	NH-3 /NH-6	H-6	H-1'''	H-3'''-H5'''(Ph,Bz)	CH ₃	CH ₂ -3'''-11'''
 <p>N-BzCit^a</p>	11,53 (1H, s) 11,07 (1H, s)	7,86 (1H, d, $J=6,93$ Hz)	/	8,01 (2H, d, $J=6,9$ Hz) 7,50 (2H, t, $J=7,5$ Hz) 7,61 (1H, t, $J=7,2$ Hz)	/	/
1	12,87 (1H, s) 11,94 (1H, s)	8,18 (1H, s)	/	8,26 (2H, d, $J=7,2$ Hz) 7,53 (2H, t, $J=7,5$ Hz) 7,61 (1H, t, $J=7,2$ Hz)	/	/
2^b	12,94 (s, 1H)	8,24 (d, 1H) $J=9,0$ Hz	/	7,44-7,65 (5H, m)	0,85 (t, 3H, $J=7,2$ Hz)	1,24 (s, 10H) 2,27 (m, 2H) 2,73 (m, 2H)
(3+4)^c	12,88 (s, 1H)	8,20 (s, 1H)	/	/	7,61-7,69 (m, 2H) 7,77 (t, 1H, $J=7,2$ Hz) 7,87 (d, 2H, $J=7,2$ Hz)	0,83 (t, 3H, $J=7,2$ Hz)
5	11,08 (s, 1H)	8,83 (s, 1H)	/	/	7,30-7,75 (m, 3H) 7,74 (d,1H, $J=7,2$ Hz) 7,98 (d,1H, $J=7,1$ Hz)	0,84 (t, 3H, $J=7,0$ Hz)
6	/	8,32 (s, 1H)	6,24 (s, 1H)	7,48-7,68 (m, 3H) 7,92 (d, 2H, $J=7,1$ Hz)	0,84 (t, 3H, $J=7,0$ Hz)	1,28-1,51 (m, 4H) 2,31 (m, 2H)

Spojevi su otopljeni u deuteriranom otapalu DMSO- d_6

^a 5,58 (1H, d, $J=7,0$ Hz, H-5); ^b11,87 (1H, s, NH-1); ^c 11,39 (1H, s, NH-1), 10,48 (1H, s, OH-3'''), 2,92-2,99 (1H, m, CH₃-3''')

Tablica 2. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **7-12**

	NH-3 /NH-6	H-6	H-1'	H-3'	H-5', H-6'(Ph, Tr)	H-3''-H5''(Ph,Bz)
7	11,75 (s, 1H)	8,23 (s, 1H)	4,50 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz)	3,44 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz)	/	7,53 (2H, t, $J = 7,5$) 7,62 (1H, t, $J = 7,2$) 8,22 (2H, d, $J = 7,2$)
8	12,99 (s, 1H)	8,85 (s, 1H)	5,16 (s, 2H)	8,61 (s, 1H)	7,67 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz)	7,52 (2H, t,) 7,62 (1H, t,) 8,20 (2H, s)
9^a	11,77 (s, 1H)	8,24 (s, 1H)	4,50 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz)	8,71 (s, 1H)	/	7,44-7,62 (m, 3H) 7,95 (2H, d, $J = 6,8$ Hz)
10	12,88 (s, 1H)	8,45 (s, 1H)	4,75 (s, 2H)	8,81 (s, 1H)	7,48-7,62(m, 6H) 7,85-7,93(m, 2H) 8,19-8,24 (m, 2H)	
11	12,99 (s,1H)	8,61 (s, 1H)	5,19 (s, 2H)	8,65 (s, 1H)	7,47-7,80 (m, 8H) 8,23 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz)	
12^b	12,97 (s, 1H)	8,24 (s, 1H)	5,06 (s, 2H)	8,58 (s, 2H)	7,28-7,41 (m, 6H) 7,52-7,61 (m, 2H) 8,21 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz)	

^a 5,21 (1H, s, NH-4')

^b 5,58 (2H, s, CH₂-benziltriazolil)

Tablica 3. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **13-16**.

	NH-3 /NH-6	H-6	H-1'	H-3'	H-5', H-6'(Ph, Tr)	H-3''-H5''(Ph,Bz)
13	13,04 (s, 1H)	8,64 (s, 1H)	5,22 (s, 2H)	8,78 (s, 1H)	7,33-7,65 (m, 5H) 7,66 (d, 2H, $J=8,4$ Hz) 8,23 (t, 2H, $J=7,6$ Hz)	
14	13,03 (s,1H)	8,65 (s,1H)	5,19 (s, 2H)	8,99 (s,1H)	8,16 (d, 2H, $J=8,0$ Hz) 8,25 (d, 2H, $J=7,9$ Hz)	7,49-7,68 (m, 3H) 7,99 (d, 2H, $J=7,1$ Hz)
15	12,89 (s, H)	8,62 (s, 1H)	5,15 (s, 2H)	8,79 (s, 1H)	7,43-7,60 (m, 5H) 7,91-7,94 (m, 4H)	
16	11,68 (s, 2H)	8,33 (s, 1H)	5,03 (s, 2H)	8,74 (s, 1H)	7,40-7,46 (m, 2H) 7,89-7,94 (m, 2H)	/

Tablica 3. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **17-23**.

	NH-3 /NH-6	H-6	H-1'	H-3'	H-5', H-6'(Ph, Tr)	H-3''- H5''(Ph,Bz)	CH ₃	CH ₂ -3'''- 11'''
17	/	8,27 (s, 1H)	5,09 (s, 1H) 5,48 (s, 1H)	8,85 (s, 1H)	7,44-7,96 (m, 9H)		0,82 (t, 1H, $J = 7,1$ Hz)	1,22(s, 12H) 1,49(m, 2H) 2,35(m, 2H) 2,71 (m, 2H)
18^a	11,17 (s, 1H)	8,16 (s, 1H)	5,10 (s, 2H)	8,28 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz)	7,31-7,38 (m, 7H) 7,50-7,63 (m, 6H) 7,99 (d, 2H, $J=7,6$ Hz)		/	/
19	11,15 (s, 1H)	8,15 (s, 1H)	5,09 (s, 2H)	8,27 (d, 1H, $J=7,7$ Hz)	7,28-7,39 (m, 4H) 7,51(t, 2H, $J = 7,2$ Hz) 7,62 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz) 7,99 (d, 2H, $J = 7,7$ Hz)		0,85 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz)	1,24 (s, 10 H) 1,51 (m, 2H) 2,27 (m, 2H) 2,39 (m, 2H) 2,72 (m, 2H)
20	/	8,64 (s, 1H)	5, 25 (s, 2H)	8,78 (s, 1H)	7,45-7,96 (m, 9H)		0,84 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz)	1,13 (s, 6H) 1,49 (m, 2H) 2,28 (m, 2H) 2,74 (m, 2H)
21	/	8,70 (s, 1H)	5,25 (s, 2H)	8,99 (s, 1H)	7,53-7,74 (m, 5H) 7,99 (m, 2H) 8,18 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz)		0,84 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz)	1,24 (s,6H) 1,51 (m,2H)
22	11,23 (s, 1H)	8,48 (s, 1H)	5,20 (s, 2H)	8,97 (s,1H)	7,53 (d, 2H) 7,73-7,82 (m, 3H) 8,00 (m, 2H) 8,17 (m, 2H)		0,85 (m, 3H)	1,24 (s, 6H) 1, 51 (m,2H)
23	12,04 (s, 1H)	8,86 (s, 1H)	5,32 (s, 2H)	8,72 (s, 1H)	7,38 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz) 7,77 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz)	/	0,85 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz)	7,38 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz) 7,77 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz)

^a Signali H-atoma iz alkinilnog lanca nalaze se unutar signala od fenilnih triazolinskih i benzoilnih protona.

Tablica 4. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **24-30**.

	NH-3/NH-6	H-6	H-1'	H-3'	H-1'''	H-5', H-6'(Ph, Tr)	H-3'''- H5''(Ph,Bz)	CH ₃	CH ₂ -3'''- 11'''
24	11,21 (s, 1H)	8,32 (d, 1H, $J=7,5$ Hz)	4,59 (t, 1H, $J=5,1$ Hz) 4,83 (d, 1H, $J=5,2$ Hz)	8,85 (s, 1H)	6,04 (s, 1H)	7,66 (d, 2H, J =8,9 Hz) 7,94 (d, 2H, J =8,2 Hz)	7,35 (d, 1H, $J=7,1$ Hz) 7,50 (t, 1H, $J=7,0$ Hz) 7,58 (d, 1H, $J=7,1$ Hz) 7,99(d, 2H, $J=7,5$ Hz)	0,84 (t, 3H, $J=7,2$ Hz)	1,22 (s,12H) 1,49 (m,2H) 2,25 (m,2H) 2,71 (m,2H)
25	/	8,81 (s, 1H)	5,32 (s, 1H)	8,93 (s, 1H)	7,05 (s, 1H)	7,43-7,99 (m, 13H)		/	/
26^a	/	8,06 (s, 1H)	5,13 (s, 2H)	7,92 (s, 2H)	5,81 (s, 1H)	7,24-7,64 (m, 10H)		/	/
27	11,06 (s, 1H)	8,42 (s, 1H)	5,24 (s, 2H)	8,75 (s, 1H)	5,92 (s, 1H)	7,71 (d, 2H, $J=8,6$ Hz) 7,93 (d, 2H, $J=8,7$ Hz)	7,43-7,66 (m, 5H)	0,84 (t, 3H, $J=6,9$ Hz)	1,25 (s, 10H) 1,60 (m, 2H)
28^b	11,14 (s, 1H)	8,40 (s, 1H)	5,20 (s, 2H)	8,70 (s, 1H)	5,89 (s, 1H)	7,15-7,24 (m, 5H) 7,51-7,60 (m, 5H) 7,68 (m, 1H, $J=7,8$ Hz) 7,74 (d, 1H, $J=7,9$ Hz) 7,84 (t, 2H, $J=7,8$ Hz) 7,91 (d, 1H, $J=7,6$ Hz)		/	1,20 (s, 4H)
29	11,40 (s, 1H)	8,51 (s, 1H)	5,27 (s, 2H)	8,90 (s, 1H)	5,83 (s, 1H)	7,97 (d, 2H, $J=8,3$ Hz) 8,13 (m,2H)	/	0,88 (t, 3H, $J=7,0$ Hz)	1,24 (s, 6H) 1,52 (m,2H)
30	11,07 (s, 1H)	8,43 (s,1H)	5,25 (s, 2H)	8,77 (s, 1H)	5,92 (s, 1H)	7,65 (d, 2H, $J=8,8$ Hz) 7,94 (d, 2H, $J=8,9$ Hz)	/	0,84 (t, 3H, $J=6,9$ Hz)	1,13-1,35 (m, 14H) 1,49 (t, 2H, $J=7,0$ Hz)

^a 5,55 (2H, s, CH₂-benzilni triazolilni)

^b Signali H-atoma iz alkinilnog lanca nalaze se unutar signala od fenilnih triazolilnih i benzoilnih protona.

Tablica 5. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **21-32**.

	NH-3 /NH-6	H-6	H-1'	H-3'	H-1'''	H-5', H-6'(Ph, Tr)	CH ₂ -3''''- 11'''
31^a	11,20 (s, 1H)	8,09 (s, 1H)	5,13 (s, 2H)	8,42 (s, 1H)	5,88 (s, 1H)	7,22-7,38 (m, 10H)	3,87 (s, 2H)
32	11,82 (s, 1H)	8,79 (s, 1H)	5,33 (s, 1H)	8,80 (s, 1H)	7,01 (s, 1H)	7,65 (d,2H, $J=8,8$ Hz) 7,95 (d, 2H, $J=8,9$ Hz)	7,21 (t,1H, $J=9,1$ Hz) 7,62 (d, 2H, $J=7,1$ Hz)

^a Signali H-atoma iz alkinilnog lanca nalaze se unutar signala od fenilnih triazolinskih i benzoinskih protona.

5,54 (2H, s, CH₂-benziltriazolil)

Tablica 6. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **33-36**.

	NH-4	H-6	H-5	H-1'	H-1''	H-3'	H-3''	Ph-3'''-5''	H-4
33	9,25 (s, 1H)	8,43 (s, 1H)	/	4,79 (d, 2H, $J=2,2$ Hz)	4,65 (d, 2H, $J=2,3$ Hz)	3,43 (t, 1H, $J=2,3$ Hz)	3,32 (t, 1H, $J=2,3$ Hz)	7,28-7,50 (m, 3H) 7,72 (d, 2H, $J=7,2$ Hz)	7,83 (s, 1H)
34^a	/	8,10 (d, 2H, $J=7,1$ Hz)	/	4,63 (d, 2H, $J=2,3$)	4,83 (d, 1H, $J=2,3$)	3,50 (t, 1H, $J=2,3$)	3,21(d, 1H, $J=2,4$)	7,47-7,71 (m, 5H)	6,41 (d, 1H, $J=2,5$)
35	11,24 (s, 1H)	8,24 (d, 1H, $J=7,3$ Hz)	6,36 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)	4,68 (d, 2H, $J=2,4$ Hz)	/	3,49 (t, 1H, $J=2,2$ Hz)	/	7,52 (t, 2H, $J=7,1$ Hz) 7,63 (t, 1H, $J=7,2$ Hz) 8,01 (d, 2H, $J=7,0$ Hz)	/
36	/	8,00 (d, 1H, $J=7,3$ Hz)	6,11 (d, 1H, $J=8,1$ Hz)	4,71 (d, 2H, $J=2,5$ Hz)	4,61(d, 2H, $J=2,5$ Hz)	3,45 (t, 1H, $J=2,4$ Hz)	3,20 (t, 1H, $J=2,4$ Hz)	7,49 (t, 2H, $J=7,1$ Hz) 7,58(m, 3H)	/

^aH-2''-3,39 (m, 1H)

Tablica 7. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **37-40**.

	NH-4	H-6	H-5	H-1'	H-1''	H-3'	H-3''	Ph-5',6' Ph-5'',6''
37	12,91 (s, 1H)	7,92-8,00 (m, 4H)	5,82 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,13 (s,2H)	4,67 (s 2H)	8,91 (s,1H)	7,92-8,00 (m, 4H)	7,92-8,00 (m, 4H) 8,16 (d, 2H, $J=7,1$ Hz)
38	12,93 (s, 1H)	7,86 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,82 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)	5,11 (s,2H)	4,60 (s 2H)	8,78 (s,1H)	7,87 (s, 1H)	7,44-7,68 (m, 4H) 7,91-7,94 (m, 4H)
39	12,92 (s, 1H)	7,95 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)	5,82 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,17 (s,2H)	4,64 (s,2H)	8,55 (s,1H)	7,93 (s, 1H)	7,43-7,62 (m, 6H) 7,78-7,84 (m, 2H)
40	12,91 (s, 1H)	7,95 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)	5,83 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,14 (s, 2H)	4,68 (s,2H)	8,51 (s,1H)	7,93 (s, 1H)	7,45-7,87 (m, 8H)

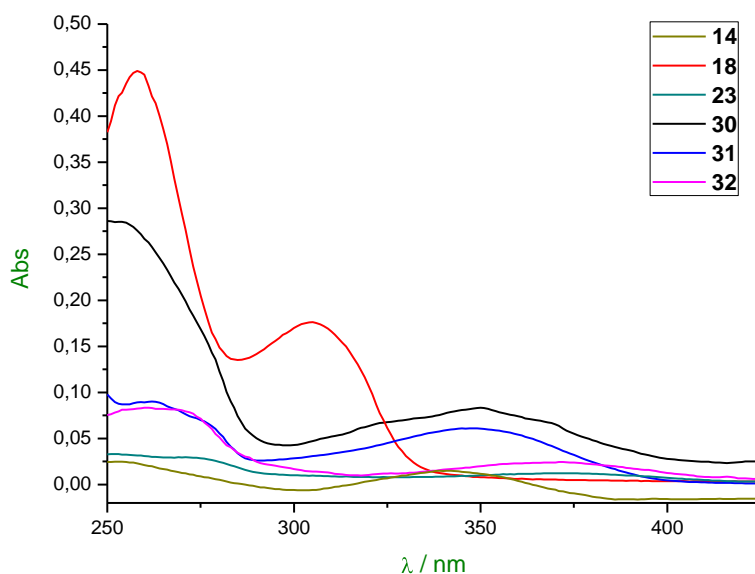
Tablica 8. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **40-46**.

	NH-4	H-6	H-5	H-1'	H-1''	H-3'	Ph-5',6' Ph-5'',6''	H-4
41	9,48 (s, 1H)	7,94 (d, 1H, $J=8,2$ Hz)	5,88 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,16 (s, 2H)	4,63 (s, 2H)	8,93 (s, 1H)	8,12(d, 2H, $J=8,5$ Hz) 7,98(d, 2H, $J=8,4$ Hz) 7,44-7,52(m, 2H) 7,79(d, 2H, $J=8,5$ Hz)	4,48 (s, 1H)
42	9,48 (s, 1H)	7,94 (d, 1H, $J=8,1$ Hz)	5,87 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,14 (s, 2H)	4,63 (s, 2H)	8,80 (s, 1H)	7,44-7,55(m, 4H) 7,64(d, 2H, $J=8,5$ Hz) 7,79(d, 2H, $J=8,5$ Hz)	4,47 (s, 1H)
43	9,49 (s, 1H)	7,93 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)	5,86 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)	5,15 (s, 2H)	4,63 (s, 2H)	8,58 (s, 1H)	7,45-7,58(m, 6H) 7,78-7,83(m, 2H)	4,46 (s, 1H)
44	9,51 (s, 1H)	7,96 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,87 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,16 (s, 2H)	4,62 (s, 2H)	8,53 (s, 1H)	7,47-7,53(t, 2H, $J=8,1$ Hz) 7,55-7,58(m, 2H) 7,62-7,65(m, 2H) 7,82(d, 2H, $J=8,0$ Hz)	4,43 (s, 1H)
45^a	9,48 (s, 1H)	7,88 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,83 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,02 (s, 2H)	4,60 (s, 2H)	8,14 (s, 1H)	7,29-7,38(m, 4H) 7,51(t, 2H, $J=7,9$ Hz) 7,57(t, 2H, $J=7,9$ Hz)	4,40 (s, 1H)
46	9,47 (s, 1H)	7,94 (d, 1H, $J=8,3$ Hz)	5,87 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,15 (s, 2H)	4,64 (s, 2H)	8,80 (s, 1H)	7,46-7,55(m, H) 7,68(d, 2H, $J=8,2$ Hz) 7,81(d, 2H, $J=8,2$ Hz)	4,49 (s, 1H)

^aCH₂(Bn_{TR})-5,56(s, 2H)

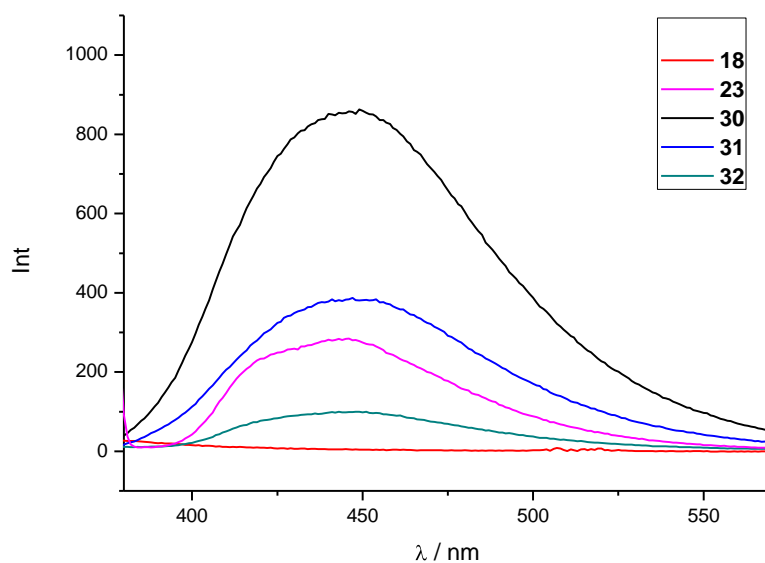
4.3. Spektroskopska karakterizacija spojeva UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom

Spojevi **14**, **18**, **23** i **30-31** su okarakterizirani UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom, te su im određeni maksimumi apsorpcije, molarni ekstinkcijski koeficijenti, valne duljine emisije i Stokesovi pomaci. Matične otopine ispitivanih spojeva priređene su u metanolu. UV/Vis spektri svih ispitivanih spojeva snimljeni su kod koncentracije $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ u metanolu (Slika 20). Spoj **18** ima izražene maksimume na 258 i 305 nm, dok ostali spojevi pokazuju batokromni pomak apsorpcijskih maksimuma u području 340-370 nm.



Slika 20. UV/Vis spektri spojeva **14**, **18**, **23** i **30-31** ($c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$)

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja provedena su zbog visoke osjetljivosti metode pri koncentraciji $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ u metanolu. Otopine pripremljenih spojeva su pobuđene svjetlošću valne duljine ekscitacije (λ_{ex}) koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorpcije (λ_{max}). Na slici...su prikazani emisijski fluorimetrijski spektri spojeva **18**, **23** i **30-31** snimani pri danoj koncentraciji u metanolu. Spoj **30** pokazuje najveći intenzitet emisije pri valnoj duljini 350 nm (Slika 21, Tablica 9). Spojevi **30-32** pokazuju veliki Stokesov pomak ($\sim 90 \text{ nm}$) maksimuma apsorpcije



Slika 21. Emisijski spektri spojeva **18**, **23** i **30-31** ($c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)

Tablica 9. UV/Vis i fluorimetrijski podatci ispitivanih spojeva

Spoj	λ_{max} (nm)	Abs	ϵ_{max} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Stokeov pomak (nm)
14	340	0,0155870206	779	340	/	/
18	305	0,176495575	8825	305	/	/
	258	0,449073746	22454			
23	372	0,0146666667	733	370	444	74
	268	0,0293923304	1470			
30	350	0,0833864307	4169	350	447	97
	252	0,284483776	14224			
31	346	0,0619115044	3096	350	447	97
	260	0,0887551622	4438			
32	372	0,0240235988	1201	350	442	92
	262	0,082159292	4108			

4.4. In silico analiza novopripremljenih spojeva (2-31)

Predviđanja vjerojatnih bioloških meta i farmakoloških djelovanja (Tablice 10-17) izrađene su web-servisom PASS (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php> [23.4.2015.]) koji se temelji na identifikaciji substrukturnih značajki tipičnih za aktivne molekule.

Spektar bioloških djelovanja sintetiziranih spojeva (2-31) predviđen PASS-om prikazan je u tablicama 10-17 kao aktivnost s vjerojatnošću "da su aktivni" (Pa) i "da su neaktivni" (Pi). Najvjerojatnija predviđena aktivnost treba imati što veću vrijednost Pa i što manju vrijednost Pi. Aktivnosti su prikazane po redosljedu Pa-Pi te su vjerojatnije aktivnosti u tablici pri vrhu.

Tablica 10. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-benzoilcitozin (1) i njegove 5-alkinilne derivate (2-4)

Aktivnost spoja 1	Pa_1	Pi_1	Aktivnost spoja 2	Pa_2	Pi_2	Aktivnost spoja 3	Pa_3	Pi_3	Aktivnost spoja 4	Pa_4	Pi_4
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,981	0,000	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,609	0,001	Inhibitor pterin deaminaze	0,611	0,025	Inhibitor CDP-glicerol glicerosfosfotransferaze	0,725	0,048
Inhibitor testosteron 17beta dehidrogenaze (NADP+)	0,726	0,047	Inhibitor testosteron 17beta dehidrogenaze (NADP+)	0,584	0,096	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,579	0,002	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,593	0,002
Inhibitor pterin deaminaze	0,670	0,016	Inducira CYP2C19	0,475	0,016	Inhibitor 2-Dehidropantoat 2-reduktaze	0,605	0,030	Inhibitor biotinidaze	0,507	0,039
Inhibitor (S)-3-amino-2-metilpropionat transaminaze	0,577	0,003	Inhibitor pterin deaminaze	0,481	0,053	Inhibitor biotinidaze	0,594	0,022	Inhibitor bilirubin oksidaze	0,488	0,025
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Keratolitik	0,754	0,002	Antiekcematik	0,824	0,014	Antiekcematik	0,769	0,025	Antiekcematik	0,756	0,029
Antiekcematik	0,760	0,028	Stimulant eritropoeze	0,582	0,016	Stimulant eritropoeze	0,613	0,012	Stimulant eritropoeze	0,566	0,020
Stimulant eritropoeze	0,640	0,008	Stimulant funkcije bubrega	0,524	0,082	Stimulant leukopoeze	0,501	0,045	Inhibitor gastrina	0,499	0,068

Tablica 11. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za 5-alkinilne derivate (**5** i **6**) *N*-benzoilcitozina (**1**), *N*-4-benzoil-*N*-1-propargilcitozina (**7**) te *N*-4-benzoil-*N*-1-triazolilnog derivata citozina (**8**)

Aktivnost spoja 5	Pa_5	Pi_5	Aktivnost spoja 6	Pa_6	Pi_6	Aktivnost spoja 7	Pa_7	Pi_7	Aktivnost spoja 8	Pa_8	Pi_8
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor CDP-glicerol glicerofosfotransferaze	0,717	0,049	Inhibitor bilirubin oksidaze	0,484	0,026	Inhibitor CDP-glicerol glicerofosfotransferaze	0,679	0,059	Inducira CYP2C19	0,308	0,129
Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,623	0,001	Inhibitor taurin dehidrogenaze	0,528	0,078	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,420	0,005	Inhibitor 5-O-(4-kumaril)-D-kinat-3'-monooksigenaze	0,314	0,217
Inhibitor receptora platelet derivirane kinaze čimbenika rasta	0,500	0,031	Inhibitor cikličke AMP fosfodiesteraze	0,477	0,032	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,399	0,004	Inhibitor blastocidin-S deaminaze	0,261	0,028
Inhibitor ribonukleaze u gušterači	0,427	0,017	Inhibitor aldolaze trimetilaminoksida	0,468	0,050	Antagonist receptora fibrinogena	0,455	0,060		0,308	0,129
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Antiekcematik	0,814	0,016	Stimulant funkcije bubrega	0,791	0,020	Pojačivač antineoplastika	0,891	0,003	Analgetik, neopoidni	0,424	0,045
Stimulant eritropoeze	0,534	0,028	Antagonist B2 tromboksana	0,453	0,058	Antineoplastik	0,780	0,014	Analgetik	0,330	0,108
Protector mukomembrane	0,534	0,123	Antiekcematik	0,488	0,105	Antiekcematik	0,662	0,059	Pojačivač ekspresije HMGCS2	0,290	0,123

Tablica 12. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za N-4-benzoil-N-1-triazolilne derivate citozina (9-12)

Aktivnost spoja 9	Pa_9	Pi_9	Aktivnost spoja 10	Pa_10	Pi_10	Aktivnost spoja 11	Pa_11	Pi_11	Aktivnost spoja 12	Pa_12	Pi_12
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor pterin deaminaze	0,564	0,033	Inducira CYP2C19	0,359	0,068	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,261	0,028	Inhibitor Transglutaminaze 2	0,438	0,002
Inducira CYP2C19	0,314	0,238	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,265	0,027	Inhibitor MAP kinaze	0,196	0,005	Inhibitor sinteze leukotriena	0,423	0,005
Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,272	0,024	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,213	0,017	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,204	0,019	Agonist Interleukina 2	0,369	0,073
									Inducira CYP2C19	0,344	0,082
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Liječenje kroničnih opstruktivnih plućnih bolesti	0,391	0,012	Analgetik, neopoidni	0,396	0,055	Analgetik, neopoidni	0,380	0,061	Liječenje alergijskog rinitisa	0,431	0,005
Antivirusno (Hepatitis B)	0,340	0,024	Antivirusno (Hepatitis B)	0,327	0,027	Antivirusno (Hepatitis B)	0,280	0,039	Antivirusno (Hepatitis B)	0,341	0,024
Stimulant funkcije bubrega	0,314	0,238	Pojačivač antineoplastika	0,248	0,049				Liječenje poremećaja žučnog trakta	0,328	0,038

Tablica13. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-4-benzoil-*N*-1-triazolilne derivate citozina (13-15) i *N*-1-triazolilni derivat citozina (16)

Aktivnost spoja 13	Pa_13	Pi_13	Aktivnost spoja 14	Pa_14	Pi_14	Aktivnost spoja 15	Pa_15	Pi_15	Aktivnost spoja 16	Pa_16	Pi_16
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inducira CYP2C19	0,358	0,069	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,230	0,046	Glutamate receptor antagonist	0,262	0,010	Inhibitor CDP-glicerol glicerofosfotransferaze	0,583	0,089
Antagonist proteina toplinskog šoka 27	0,346	0,131	Inducira CYP2C19	0,308	0,129	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,271	0,025	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,397	0,006
Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,236	0,042	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,191	0,022	Inhibitor MAP kinaze	0,207	0,004	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,277	0,009
Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,199	0,020	Inhibitor MAP kinaze	0,171	0,006	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,211	0,017			
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Analgetik, neopoidni	0,375	0,062	Analgetik, neopoidni	0,475	0,032	Antivirusno (Hepatitis B)	0,343	0,024	Antivirusno (Hepatitis B)	0,563	0,003
Antivirusno (Hepatitis B)	0,302	0,033	Analgetik	0,364	0,089	Pojačivač antineoplastika	0,288	0,032	Inhibitor sinteze DNA	0,433	0,024
Pojačivač antineoplastika	0,233	0,060	Antivirusno (Hepatitis B)	0,280	0,039	Inhibitor sinteze DNA	0,263	0,073	Antineoplastik	0,413	0,100

Tablica 14. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-4-benzoil-5-alkinilne-*N*-1-triazolilne derivate citozina (17-20)

Aktivnost spoja 17	Pa_17	Pi_17	Aktivnost spoja 18	Pa_18	Pi_18	Aktivnost spoja 19	Pa_19	Pi_19	Aktivnost spoja 20	Pa_20	Pi_20
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,243	0,012	Inhibitor Transglutaminaze 2	0,417	0,002	Inhibitor sinteze leukotriena	0,436	0,004	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,302	0,007
Inducira CYP2C19	0,286	0,171	Inhibitor sinteze leukotriena	0,408	0,005	Inhibitor Transglutaminaze 2	0,398	0,002	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,210	0,062
			Agonist Interleukina 2	0,356	0,082	Agonist Interleukina 2	0,377	0,067	Inhibitor MAP kinaze	0,137	0,019
			Inducira CYP2C19	0,344	0,083	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,254	0,011			
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Antiekcematik	0,438	0,173	Liječenje alergijskog rinitisa	0,388	0,005	Antiekcematik	0,518	0,127	Antiekcematik	0,438	0,173
Antimikobakterijsko	0,319	0,069				Liječenje alergijskog rinitisa	0,370	0,005	Antimikobakterijsko	0,327	0,065
Antiprotozoik (Toksoplazma)	0,192	0,071				Protiv neplodnosti kod žena	0,275	0,061	Komplementarni inhibitor	0,195	0,042

Tablica 15. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-4-benzoil-5-alkinilne-*N*-1-triazolilne derivate citozina (**21** i **22**) te 5-alkinilni-*N*-1-triazolilni derivat citozina (**23**)

Aktivnost spoja 21	Pa_21	Pi_21	Aktivnost spoja 22	Pa_22	Pi_22	Aktivnost spoja 23	Pa_23	Pi_23
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,232	0,014	Inhibitor CDP-glicerol glicerofosfotransferaze	0,494	0,128	Antagonist proteina toplinskog šoka 27	0,370	0,097
Agonist receptora nikotina alfa 6	0,177	0,034	Inhibitor receptora platelet derivirane kinaze čimbenika rasta	0,411	0,066	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,232	0,014
Inhibitor dihidroorotaze	0,197	0,065	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,300	0,007	Inhibitor beta katenina	0,221	0,059
Inducira CYP2C19	0,286	0,171	Inhibitor MAP3K5	0,311	0,089	Inhibitor MAP kinaze	0,141	0,010
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Antiekcematik	0,438	0,173	Antimikobakterijsko	0,369	0,048	Antiekcematik	0,732	0,035
Antimikobakterijsko	0,267	0,104	Protiupalno	0,400	0,095	Liječenje septičkog šoka	0,247	0,040
Analgetik, neopoidni	0,254	0,135	Liječenje reumatskog artritisa	0,283	0,063	Liječenje makularne degeneracije	0,223	0,029

Tablica 16. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za pirolo[2,3-*d*]pirimidinske derivate (24-27)

Aktivnost spoja 24	Pa_24	Pi_24	Aktivnost spoja 25	Pa_25	Pi_25	Aktivnost spoja 26	Pa_26	Pi_26	Aktivnost spoja 27	Pa_27	Pi_27
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor lizil oksidaze	0,263	0,118	Inhibitor CYP3A4	0,291	0,037	Inhibitor sinteze leukotriena	0,474	0,004	Inhibitor Blasticidin-S deaminaze	0,215	0,057
			Stimulant Glikogen sintaze	0,316	0,062	Agonist Interleukina 2	0,447	0,033	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,167	0,031
						Inhibitor Transglutaminaze 2	0,411	0,002	Inhibitor MAP kinaze	0,139	0,010
									Antagonist receptora adenoizina	0,116	0,024
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Protuupalno	0,396	0,055	Antialergijsko	0,485	0,031	Antialergijsko	0,510	0,026	Liječenje reumatskog artritisa	0,263	0,075
Liječenje gastrointestinalnih bolesti	0,177	0,023	Liječenje upalnih bolesti crijeva	0,317	0,051	Liječenje alergijskog rinitisa	0,395	0,005	Protuupalno	0,317	0,146
			Liječenje reumatskog artritisa	0,297	0,055	Antiasthmatic	0,400	0,048	Komplementarni inhibitor	0,200	0,037

Tablica 17. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za pirolo[2,3-*d*]pirimidinske derivate (28-31)

Aktivnost spoja 28	Pa_28	Pi_28	Aktivnost spoja 29	Pa_29	Pi_29	Aktivnost spoja 30	Pa_30	Pi_30	Aktivnost spoja 31	Pa_31	Pi_31
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inducira CYP2C19	0,362	0,066	ATPase stimulant	0,285	0,033	CYP3A4 inhibitor	0,261	0,056	Inhibitor sinteze leukotriena	0,454	0,004
Inhibitor MAP kinaze	0,135	0,011	Inhibitor ciklične GMP fosfodiesteraze	0,250	0,038	Inhibitor ciklične GMP fosfodiesteraze	0,235	0,055	Inhibitor Transglutaminaze 2	0,444	0,002
Inhibitor Transglutaminaze 2	0,126	0,029	Inhibitor CYP3A4	0,248	0,069				Inhibitor CYP3A4	0,340	0,020
Antagonist VEGF	0,109	0,033	Agonist receptora nikotina alfa 6	0,187	0,029						
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Antineoplastik (tumor na mozgu)	0,349	0,014	Liječenje reumatskog artritisa	0,280	0,064	Stimulant ATPaze	0,307	0,023	Liječenje alergijskog rinitisa	0,511	0,004
Antineoplastik (rak štitnjače)	0,300	0,015	Liječenje ateroskleroze	0,239	0,124	Liječenje reumatskog artritisa	0,239	0,095	Antialergijsko	0,530	0,023
Pojačivač antineoplastika	0,249	0,048	Liječenje bolesti trbušne šupljine	0,119	0,006				Liječenje rinitisa	0,505	0,018

4.5. Citostatska ispitivanja novopripravljenih spojeva

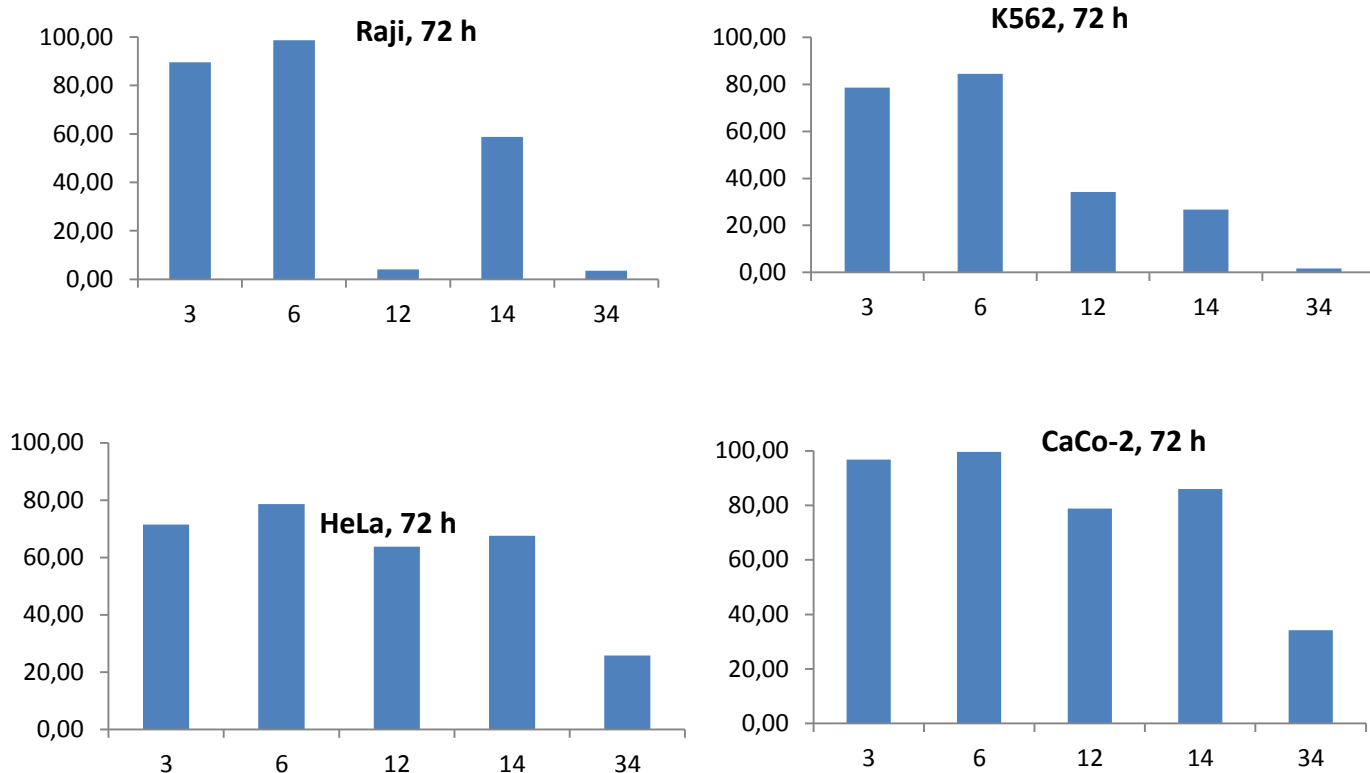
Citotoksičan učinak nosintetiziranih spojeva **3**, **6**, **12**, **14** i **34** *in vitro* je istražen na staničnim linijama HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi) (Tablica 18). Citotoksičnost 10^{-4} M spojeva određena je MTT testom nakon 72 sata izlaganja stanica.

Spojevi **12** i **34** pokazali su izraženi inhibitorni učinak na rast tumorskih stanica Raji i K562, dok umjerenu aktivnost pokazuju prema HeLa i CaCo-2 staničnim linijama. Spoj **14** pokazao je umjerenu aktivnost prema svim staničnim linijama (Slika 22).

Tablica 18. Citotoksičan učinak nosintetiziranih spojeva **3**, **6**, **12**, **14** i **34** (10^{-4} M) *in vitro*

Raji, 72 h			K562, 72 h			HeLa, 72 h			CaCo-2, 72 h		
spoj	Δ^a	SD ^b	spoj	Δ	SD	spoj	Δ	SD	spoj	Δ	SD
3	89,49	4,3	3	78,62	5,3	3	71,54	12,5	3	96,80	15,1
6	98,65	8,2	6	84,53	1,5	6	78,60	8,5	6	99,59	8,7
12	4,08	2,8	12	34,30	4,9	12	63,84	12,8	12	78,87	7,2
14	58,80	1,0	14	26,73	2,3	14	67,54	17,9	14	86,00	6,7
34	3,58	1,1	34	1,69	1,4	34	25,79	5,3	34	34,21	9,2

^a postotak rasta (%); ^b standardna devijacija



Slika 22. Citotoksičan učinak novosintetiziranih spojeva **3**, **6**, **12**, **14** i **34** na stanične tumorske linije

4.6. Ispitivanje interakcije spojeva **14**, **18**, **23** i **30-31** s *ct*-DNA UV/Vis i fluorimetrijskim titracijama

Spojevima **14**, **18**, **23** i **30-31** spektroskopski je ispitana interakcija s *ct*-DNA kako bi se dobili preliminarni rezultati o mogućim mehanizmima njihovog antitumorskog djelovanja. Matične otopine spojeva priređene su u DMSO, a njihove spektroskopske karakteristike ispitane pri pH=7 u puferskoj otopini BPE (6,0 mM Na₂HPO₄; 2,0 mM NaH₂PO₄ i 1,0 mM EDTA).

Kod UV/Vis titracija praćene su promjene spektra ispitivanih spojeva na valnim duljinama 300-450 nm gdje korišteni polinukleotid ne apsorbira UV/Vis zračenje.

Kod fluorescencijskih titracija praćene su promjene intenziteta fluorescencije ispitivanih spojeva na valnim duljinama ($\lambda_{emis}=380-600$ nm) gdje niti jedan sastojak u otopini nema UV/Vis spektar.

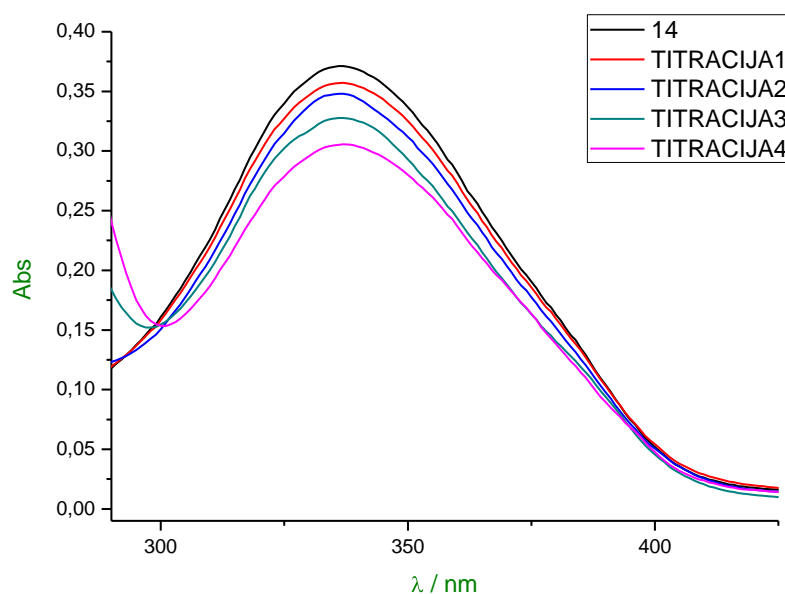
U tablici 19 prikazane su specifične UV promjene nastale prilikom titracije spojeva **14**, **18**, **23** i **30-31** s *ct*-DNA.

Tablica 19. Specifične UV promjene prilikom titracije spojeva **14**, **18**, **23** i **30-32** s *ct*-DNA

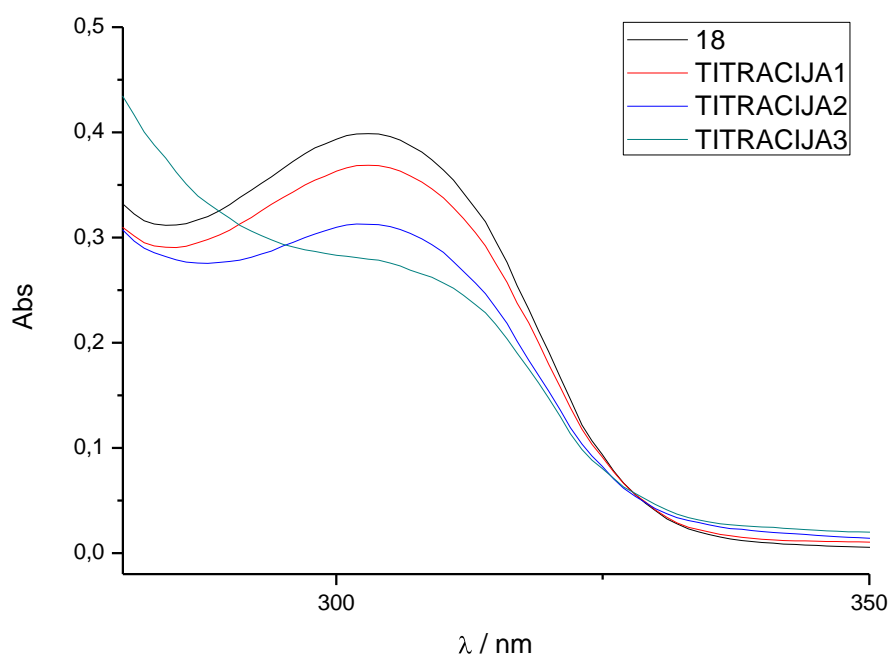
	14	18	23	30	31	32
λ_{\max} / nm	336	303	372	351	342	341
H (%) ^a	18	29	2,4	1	1,4	2,3
$\Delta\lambda$ ^b	2	2	3	0	0	1

^a Hipokromni efekt, $H = \frac{\text{Abs}_{\text{maks}}(\text{početni spoj}) - \text{Abs}_{\text{maks}}(\text{kompleks})}{\text{Abs}_{\text{maks}}(\text{početni spoj})} \times 100\%$; ^b Pomak maksimuma apsorpcije $\Delta\lambda = \lambda(\text{kompleks}) - \lambda(\text{početni spoj})$

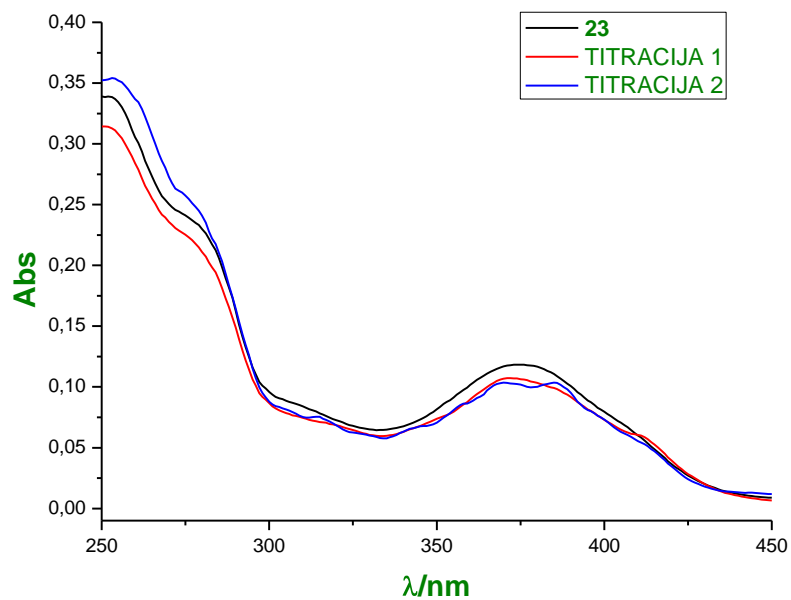
Iz titracijskih krivulja spojeva **14**, **18**, **23** i **30-31**, te krivulja ovisnosti apsorpcije o dodanoj količini *ct*-DNA (Slike 23-28), vidljivo je da tijekom titracije s *ct*-DNA dolazi do smanjenja apsorpcije (hipokromni pomak) te do pomaka maksimuma prema većim valnim duljinama (batokromni pomak). Iz dobivenih titracijskih krivulja vidljiv je hipokromni pomak apsorpcijskih maksimuma, iz čega slijedi da se spojevi **14** i **18** najbolje vežu za *ct*-DNA kao interkalatori.



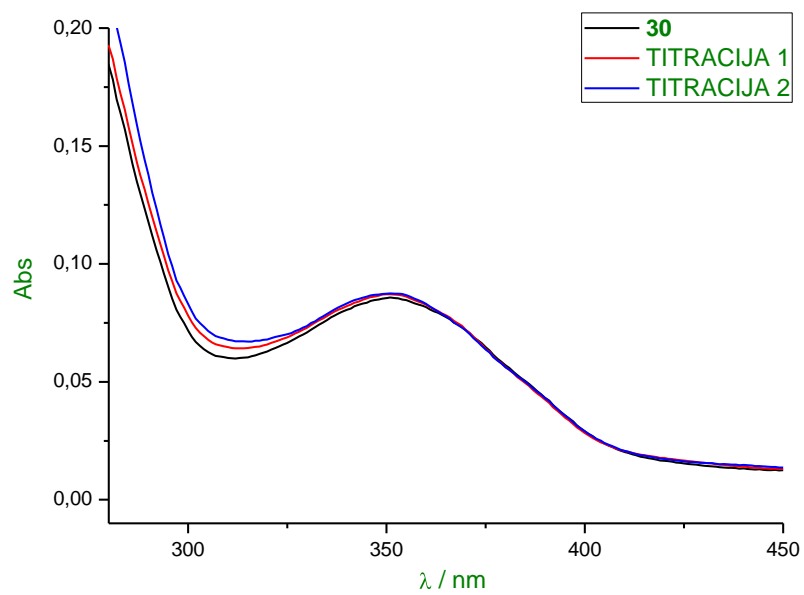
Slika 23. UV/Vis spektar titracije spoja **14** ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA



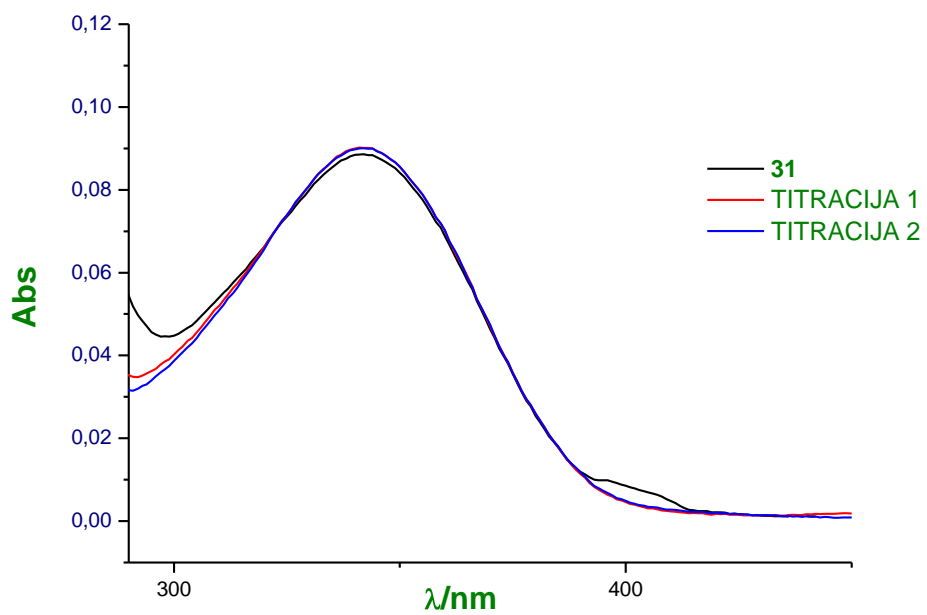
Slika 24. UV/Vis spektar titracije spoja **18** ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA



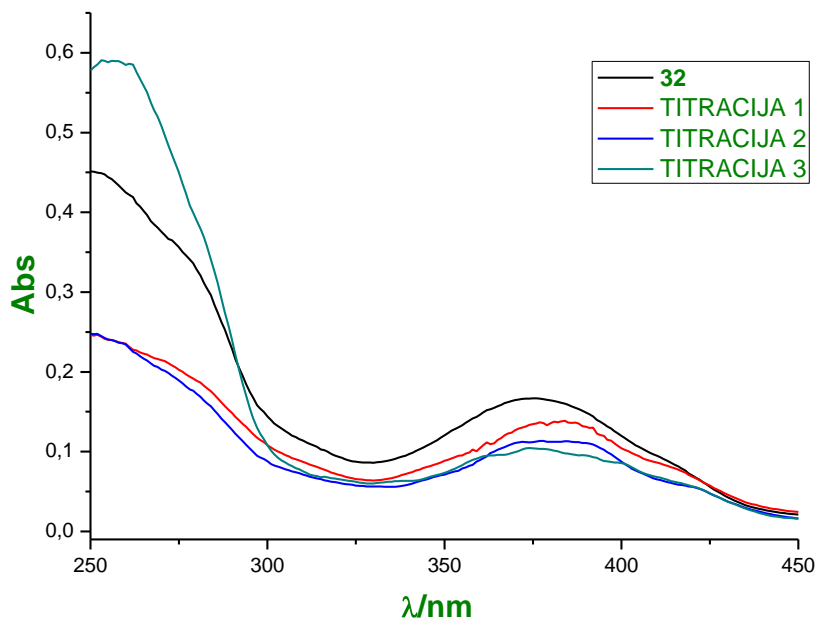
Slika 25. UV/Vis spektar titracije spoja **23** ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA



Slika 26. UV/Vis spektar titracije spoja **30** ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA

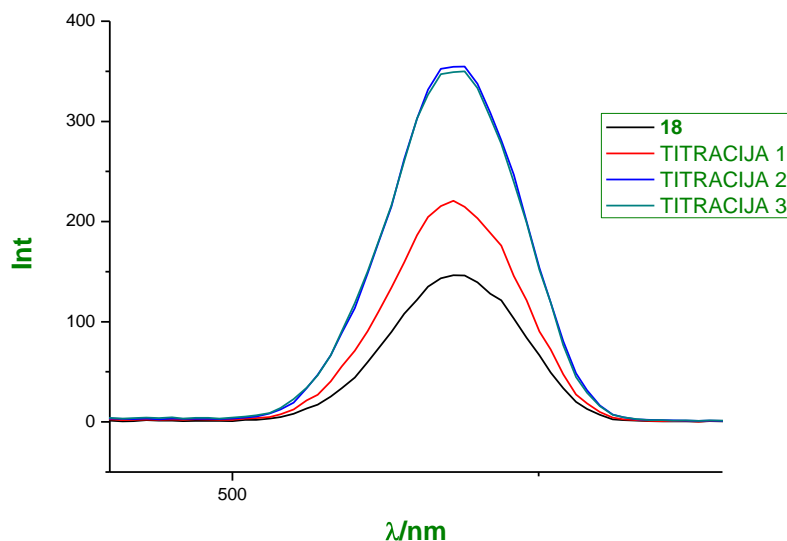


Slika 27. UV/Vis spektar titracije spoja **31** ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA

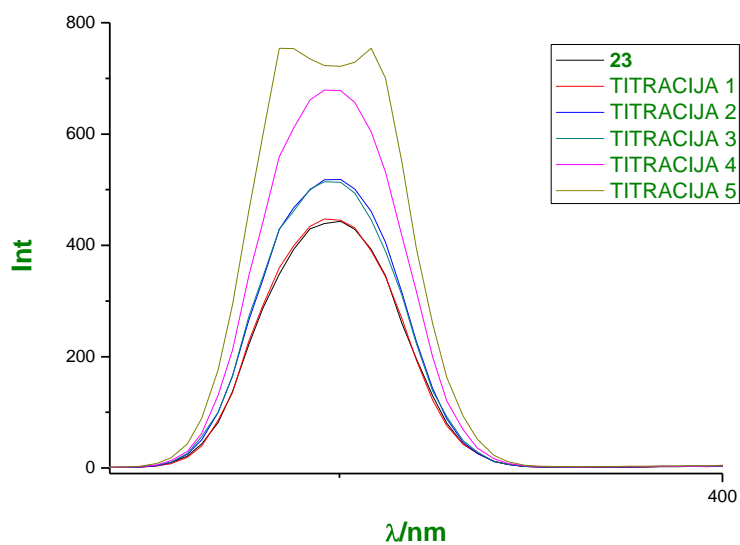


Slika 28. UV/Vis spektar titracije spoja **32** ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA

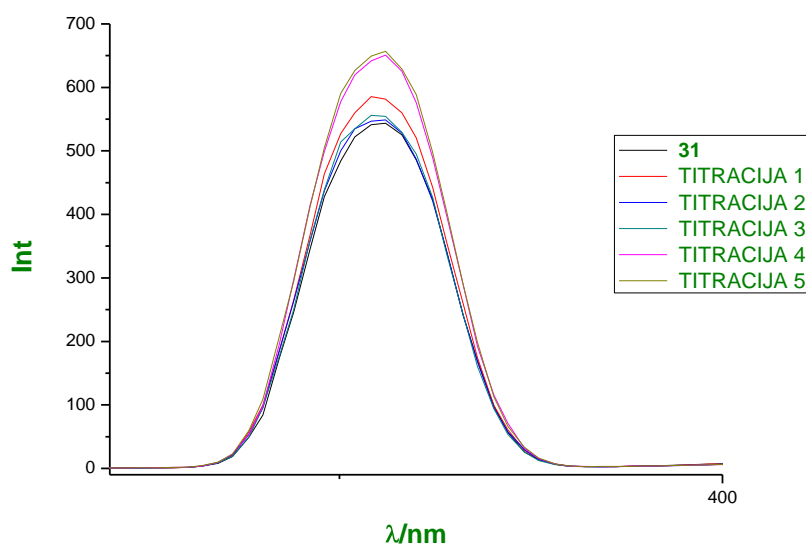
Iz dobivenih krivulja titracije ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji *ct*-DNA (Slike 29-31) vidljivo je da dodatkom *ct*-DNA u otopinu spoja dolazi do povećanja intenziteta fluorescencije, a najizraženiji hiperkromni pomak uočen je za spoj **18** (Slika 29).



Slika 29. Fluorimetrijski spektar titracije spoja **18** ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA



Slika 30. Fluorimetrijski spektar titracije spoja **23** ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA



Slika 31. Fluorimetrijski spektar titracije spoja **31** ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA

Na temelju analize UV/Vis i fluorimetrijskih spektara titracije spojeva s *ct*-DNA vidljivo je da se najbolje vežu spojevi **14** i **18**. Kako je spoj **14** pokazao citotoksičan učinak protiv K562 tumorskih staničnih linija može se pretpostaviti da je jedan od mehanizama njegovog biološkog djelovanja interkalativno vezanje za DNA.

5. ZAKLJUČCI

- Ključni prekursor za sintezu, *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**) pripremljen je jodiranjem *N*-4-benzoilcitozina
- Derivati citozina s alkinilnim supstituentima u položaju C-5 (**2-6**) priređeni su Sonogashira-inom reakcijom
- *N*-4-benzoil citozinski derivati (**8-16**) pripremljeni su Cu-kataliziranom "klik" reakcijom potpomognutom mikrovalovima *N*-1-propargilcitozina (**7**) i odgovarajućih azida
- Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja derivata *N*-1-triazolil-5-jodcitozina (**8-16**) s terminalnim alkil- i ariletinima uz Pd-katalizator i CuI sintetizirani su C-5 alkinilni derivati citozina (**17-23**)
- *N*-heteroanulacijom *in situ* C-5 alkinilnih citozinskih derivata (**17-22**) uz CuI i trietilamin pripremljeni su C-6 supstituirani derivati 7-deazapurina (**24-32**)
- *N*-1 i/ili 1,3-dipropargilni derivati citozina (**33-36**) priređeni su reakcijom *N*-4-benzoil citozina i *N*-4-benzoil-5-jodcitozina s propargil-bromidom uz K₂CO₃ kao bazu
- *N,N*-1,3-disupstituirani triazolilni citozinski derivati (**37-40**) pripremljeni su Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom s terminalnim azidima
- Intramolekulskom ciklizacijom *in situ* spojeva **37-40** sintetizirani su triciklički produkti **41-46**
- Strukturna karakterizacija novopripremljenih spojeva provedena je ¹H i ¹³C NMR, UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom
- Spektroskopska karakterizacija priređenih spojeva provedena je UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom
- Spektroskopski rezultati pokazuju da ciklizacija i povećanje konjugacije poboljšavaju spektroskopske karakteristike, osobito fluorescencije
- Farmakološka djelovanja i moguće biološke mete predviđene su *in silico* analizom novopripremljenih spojeva

- Citostatska ispitivanja *in vitro* novosintetiziranih spojeva provedena su na staničnim linijama HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi). Najizraženiji citotoksičan učinak pokazali su spojevi **12** i **34** protiv Raji i K562 staničnih tumorskih linija. Spoj **14** pokazao je umjereno djelovanje protiv K562.
- UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom provedeno je vezivanje derivata citozina i 7-deazapurina za *ct*-DNA, kako bi se utvrdio mogući mehanizam citostatskog djelovanja. Iz dobivenih titracijskih krivulja vidljivo je da se spojevi **14** i **18** najbolje vežu za *ct*-DNA.
- Kako je spoj **14** pokazao citotoksičan učinak protiv K562 tumorskih staničnih linija može se pretpostaviti da je jedan od mehanizama njegovog biološkog djelovanja interkalativno vezanje za DNA.

6. LITERATURA

Literatura

1. Dorwin E.L.; Shaw A.A.; Hom K.; Bethel P.; Shetlart M.D. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **1988**, Volume 2, Issue 2, 265–278.
2. Doiron K.M.J.; Lavigne-Nicolas J.; Cupples C.G. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **1999**, Volume 429, Issue 1, 11, 37–44.
3. Yuan B. *Advances in Clinical Chemistry*. **2014**, Volume 67, , Pages 151–187.
4. http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/catalog/2076_7deaza_purines.html; pristupljeno: 15.04.2015., 20:44.
5. Dalal A.; Ella A.E.; Ghorab M.M.; Noaman E.; Helmy I. H.; Khalil I. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter 16*. **2008**, 2391-2402.
6. Klebl B.; Muller G.; Hamacher M. *Protein Kinases as Drug Targets*, John Wiley & Sons, **2011**, 1.
7. Chinchilla R.; Nájera C. *Chemical Reviews*. **2007**, (107) 874 – 922.
8. Sandip G. Agalave; Suleman R. Maujan; Vandana S. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem. Asian J.* **2011**, 6, 2696 – 2718.
9. Raić-Malić S.; Mešćić A. Recent Trends in 1,2,3-Triazolo-Nucleosides as Promising Anti-Infective and Anticancer Agents. *Current Medicinal Chemistry*, **2015**.
10. a) Pine, S.H. *Organic chemistry*. **1994**, 796; b) S. Blewett, C. McGuigan, H. Barucki, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, (20) 1063.
11. Van Rompay A.R.; Johansson M.; Karlsson A. *Pharmacol Ther.* **2000**, Aug-Sep; 87(2-3): 189-98.
12. Périgauda C.; Gosselina G.; Imbacha J. L. *Nucleosides and Nucleotides*. **1992**, Volume 11, Issue 2-4.
13. Galmarini C.M.; Mackey J.R.; Dumontet C. *Leukemia*. **2001**, 15, 875–890.
14. Snoeck R.; Sakuma T; De Clercq E.; Rosenberg I.; Holy A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, vol. 32 no. 12 1839-1844.
15. Takada A.; Kamiya H.; Shuto S.; Matsuda A., Harashima H. *International Journal of Pharmaceutics*. **2009**, Volume 377, Issues 1–2, Pages 52–59.
16. Blewett S.; McGuigan C.; Barucki H.; Andrei G.; Snoeck R.; De Clercq E.; Balzarini J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, (20) 1063.

17. Heidelberg C. *Cancer Treatment Rep.* **1981**, (65) 3.
18. Wigerinck P.; Pannecouque C.; Snoeck R.; Claes P.; De Clercq E.; Herdewijn P.; *J.Med. Chem.* **1991**, (34) 2383.
19. Balzarini J.; Morin K.W.; Knaus E.E.; Wiebe L.I.; De Clercq E. *Gene Ther.* **1995**, (2) 317.
20. Perlman M.E.; Watanabe K.A.; Schinazi R.F.; Fox J.J. *J Med Chem.* **1985**, 28(6):741-8.
21. Hudson R.H.E.; *Heterocycles.* **2006**, 68:1325-1328.
22. Dimopoulou A.; Manta S.; Kiritsis C.; Gkaragkouni D.N.; Papatotiriou I.; Balzarini J.; Komiotis D. *Bioorg Med Chem Lett.* **2013**, 23(5):1330-3.
23. Nanditha N.; Wataru K.; Smith M.A.; Abrol R.; Goddard III. W.A.; Reddy V.P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2011**, 21, 3957–3961.
24. Sun J.; Dou Y.; Ding H.; Yang R.; Sun Q.; Xiao Q. *Mar. Drugs.* **2012**, (10) 881-889.
25. Turk S. R.; Shipman Jr. C.; Nassiri R.; Genzlinger G.; Krawczyk S.H.; Townsend L.B.; Drach J.C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, 31(4) 544.
26. Isono K.J.; *Antibiot.* **1988**, (42) 1711.
27. a) Yen L.; Magnier M.; Weissleder R.; Stockwell B. R.; Mulligan R. C. *RNA*, **2006** 12(5) 797-806; b) Nishioka H. et. al, *Journal of Antibiotics.* **1990**, 43(12) 1586-1589.
28. Hayashi K. et. al, *Phytochemistry.* **2009**, 70(2) 190-197.
29. a) Turk, S. R., et al, *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **1987**, 31(4) 544-50; b) Loomis, C. R., et al, *The Journal of biological chemistry.* **1988**, 263(4) 1682-92.
30. <http://chemoth.com/types/kinaseinhibitors>; pristupljeno: 17.4.2015., 18:24.
31. Levitzki A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, 53, 9.1–9.25.
32. Choi H.; Wang Z.; Richmond W.; He X.; Yang K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2006**, (16), 2173-2176.
33. Heidelberger C. *Pyrimidine and Pyrimidine Antimetabolites In Cancer Med.* **1984**, 801.
34. Suwinski J.; Walczak, *Synthesis.* **2001**, 225.
35. Hilbert G.E.; Johnson T.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 4489.
36. Larsen E.; Danel K.; Pedersen E.B. *Nucleosides, Nucleosides & Nucleic Acids.* **1995**, 1097.

37. Chun M.W.; Shim D.H.; Moon H.R.; Lee J.; Hookoon P.; Jeong L.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 1475.
38. Cadet K.; Chan C.; Daniel R.Y.; Davis C.P.; Guiadeen D.; Rodriguez G.; Thomas T.; Walcott S. *Y. Org. Chem.* **1998**, 4574.
39. Hyrup B.; Egholm M.; Nielsen P.E.; Wittung P.; Norde B.; Buchardt O. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 7964.
40. Acevedo O.L.; Andrews R.S. *Tetrahedron Letters.* **1996**, 3931.
41. Lee Helfer D.; Hosmane R.S.; Nelson J.L. *J. Org. Chem.* **1981**, 4803-4804.
42. a) Kosugi M.; Fugami K. *J. Organometall. Chem.* **2002**, (653) 50; b) Hassan M. E. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1991**, (56) 1944; c) Sonogashira K.; Tohda Y.; Hagihara N. *Tetrahedron Letters.* **1975**, (50) 4467 – 4470.
43. Batchu V. R.; Subramanian V.; Parasuraman K.; Swamy N. K.; Kumar S.; Pal M. *Tetrahedron.* **2005**, (61) 9869.
44. Chinchilla R.; Nájera C. *Chemical Reviews.* **2007**, (107) 874 – 922.
45. Rostovtsev V. V.; Green L. G.; Fokin V. V.; Sharpless K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.
46. Himo F.; Lovell T.; Hilgraf R.; Rostovtsev V. V.; Noodleman L.; Sharpless K. B.; Fokin V. V. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 210-216.
47. Lakowicz J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition, Springer* **2006**, 1., 5., 28.
48. Karge H. G.; Weitkamp J. *Molecular sieves, Science and Technology, vol. 4, Springer* **1999**, 340-346.
49. *Double-helix disruption, Nature Chemistry, 4, 2012.*
50. Sarwar T.; Husain M. A.; Rehman S. U.; Ishqi H. M.; Tabish M. *Mol. BioSyst.*, **2015**, 11, 522.
51. Khare D.; Pande R. *Der Pharma Chemica*, **2012**, 4, 66-67.
52. Pandya P.; Islam M. M.; Kumar G. S.; Jayaram B. J.; Kumar S. *J. Chem. Sci.*, Vol. 122, 2, **2010**, 247-248.
53. Lagunin A.; Filimonov D.; Poroikov V.; *Current Pharmaceutical Design.* **2010**, (16) 1703.
54. a) Noori H. R.; Spanagel R. *In Silico Pharmacology.* **2013**, (1) 1; b) Murray D.; Doran P.; MacMathuna P.; Moss A. C.; *Molecuar Cancer.* **2007**, (6) 50.
55. <http://genexplain.com/pass>; pristupljeno: 25.4.2015. (11:22)

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo doc. dr. sc. Tatjani Gazivoda Kraljević na predloženoj temi, pomoći, te na dragocjenim savjetima i neiscrpnom znanju koje nam je prenijela.

Zahvaljujemo se prof. dr. sc. Silvani Raić Malić što nam je omogućila sudjelovanje u znanstvenom projektu.

Zahvaljujemo i svim članovima Zavoda za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije zbog ugodne radne atmosfere i kolegijalnosti.

Zahvaljujemo prof.dr.sc. Janezu Plavec i dr.sc. Damjanu Makuc s Kemijskomg institute u Ljubljani, slovenskog NMR centra na snimanju ^1H i ^{13}C NMR spektara.

Zahvaljujemo prof.dr.sc. Ljubici Glavaš-Obrovac i Marijani Jukić sa Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku na provedenim citostatskim ispitivanjima.

Naravno, zahvaljujemo i našim roditeljima i bližnjima na velikoj podršci.

8. SAŽETAK

Derivati citozina i 7-deazapurina predstavljaju važne strukture za daljnje razvijanje potencijalnih lijekova zbog njihove važnosti kao bioloških i kemoterapijskih agenasa.

U ovom radu opisana je sinteza novih C-5 alkinilnih derivata citozina (**2-6** i **17-23**) Pd-kataliziranom Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog spajanja, koji su potom reakcijom *N*-heteroanulacije *in situ* prevedeni u derivate 7-deazapurina (**24-32**). Triazolni prsten u položaj *N*-1 i/ili *N*-3 citozina (**8-16** i **37-40**) uveden je „klik“ reakcijom s odgovarajućim azidima potpomognutom mikrovalovima. Intramolekulskom ciklizacijom *N,N*-1,3-ditriazolilnih derivata citozina (**37-40**) priređeni su *N*-1 triazolilni derivati 1,2,3-triazolo[4,5-*d*]1,2,4-trihidropirimido[1,6-*a*]pirimidina. Strukturna i spektroskopska karakterizacija derivata citozina i 7-deazapurina provedena je ¹H NMR, te UV/Vis i fluorescencijskom spektroskopijom. Farmakološki učinci i moguće biološke mete predviđeni su *in silico* analizom. Citostatska ispitivanja *in vitro* nosintetiziranih spojeva na staničnim linijama HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi) pokazala su da najizraženiji citotoksičan učinak imaju spojevi **12** i **34** protiv Raji i K562 staničnih tumorskih linija. Spoj **14** pokazao je umjereno djelovanje protiv K562. Kako bi se odredili mogući mehanizmi bioloških djelovanja spojeva ispitana je interakcija nekih spojeva s *ct*-DNA.

Cytosine and 7-deazapurine derivatives represent important structures for the further development due to their biological and chemotherapeutic importance. potential biological activities.

We have synthesized C-5 alkynyl cytosine derivatives (2-6 and 17-23) Pd-catalysed Sonogashira coupling, which are then by *N*-alkylation reaction *in situ* converted into 7-deazapurine derivatives (24-32). *N*-1 triazolyl ring was introduced into *N*-1 and/or *N*-3 cytosine derivatives (8-16 i 37-40) using „click“ reaction with corresponding azides with microwave irradiation. Intramolecular cyclisation of *N,N*-1,3-ditriazolyl derivatives of cytosine (37-40) gave *N*-1 triazolyl 1,2,3-triazolo[4,5-*d*]1,2,4-trihydropyrimido[1,6-*a*]pyrimidine derivatives (41-46). Structural characterization of synthesized compounds was conducted using ¹H NMR and mass spectrometry. Spectroscopic characterization using UV/Vis and fluorimetric spectroscopy, and biological activity was measured *in silico* using PASS. Cytostatic evaluation was performed *in vitro* against malignant tumor cells: HeLa, CaCo-2, Raji and K562. Compound 14 showed moderate cytotoxic effect against K562 tumor cell lines and compounds 12 and 34 the most pronounced activity against Raji and K562 cells.

9. ŽIVOTOPISI

Livia Kurajica

Rođena sam 21. listopada 1991. u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole Alojzija Stepinca u Zagrebu, upisala sam X. gimnaziju „Ivan Supek“, opći smjer. Maturirala sam 2012. godine s odličnim uspjehom i iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu te sam trenutačno treća godina preddiplomskog studija Ekoinženjerstvo. Akademske godine 2014./2015. uključila sam se u znanstveni projekt na Zavodu za organsku kemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Tatjane Gazivoda Kraljević na istraživačkom projektu razvoja novih molekula kao antitumorskih agenasa (voditelj red. prof. dr. sc. Raić-Malić). Kao koautor posterske prezentacije sudjelovala sam na 24. hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera.

Mande Miošić

Zovem se Mande Miošić, rođena sam u Makarskoj 21.11.1991. Prva tri razreda osnovne škole završila sam u zavičajnom mjestu Brist, a osnovnoškolsko obrazovanje dovršila sam u susjednom mjestu Gradac, u istoimenoj školi. Srednju školu sam pohađala u SŠ fra Andrije Kačića Miošića u Pločama, gdje sam nakon četiri godine opće gimnazije maturirala 2010. godine s odličnim uspjehom. Iste godine upisala sam Fakultet kemijskog inženjerstva u Zagrebu, smjer Primijenjena kemija. Akademske godine 2011./2012. i 2012./2013. bila sam demonstrator na vježbama iz Opće kemije na Zavodu za opću i anorgansku kemiju. U srpnju 2013. obranila sam završni rad pod mentorstvom profesorice Tatjane Gazivoda Kraljević, a u rujnu iste godine nastavila sam na diplomski studij fakulteta, modul Primijenjena organska kemija. 2013. godine dobila sam Dekanovu nagradu za najbolju studenticu preddiplomskog studija Primijenjena kemija s prosjekom 4,623, a 2014. godine Dekanovu nagradu za znanstveni rad. Akademske godine 2013./2014. uključila sam se u znanstveni projekt na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Tatjane Gazivoda Kraljević. U sklopu projekta sudjelovala sam na X. Susretu mladih kemijskih inženjera i 24. Hrvatskom susretu kemičara i kemijskih inženjera, oba puta uz postersko priloženje.

Moris Mihovilović

Zovem se Moris Mihovilović, rođen sam u Puli 1.2.1992. Osnovnu školu pohađao sam u OŠ Veli Vrh Pula, a srednjoškolsko obrazovanje završio sam 2010. godine kada sam maturirao u jezičnoj gimnaziji Gimnazije Pula, s odličnim uspjehom. Te sam godine upisao

smjer Primijenjena kemija na preddiplomskom studiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Akademske godine 2011./2012. i 2012./2013. bio sam demonstrator na vježbama iz Opće kemije na Zavodu za opću i anorgansku kemiju. Studij sam završio obranom završnog rada pod mentorstvom profesora Mladena Mintasa u srpnju 2013. godine. Studij sam nastavio na fakultetu, upisom diplomskog studija u rujnu 2013. godine na istom smjeru, modul Primijenjena organska kemija. Iste sam se godine uključio u znanstveni projekt na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Tatjane Gazivoda Kraljević. U sklopu projekta sudjelovao sam na X. Susretu mladih kemijskih inženjera i 24. Hrvatskom susretu kemičara i kemijskih inženjera, oba puta uz postersko prioćenje. Dobitnik sam Dekanove nagrade za znanstveni rad 2014. godine.