

Sinteza, strukturna karakterizacija i biološka aktivnost novih derivata citozina i 7-deazapurina

Miošić, Mande

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:693027>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mande Miošić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mande Miošić

**SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA
AKTIVNOST NOVIH DERIVATA CITOZINA I 7-DEAZAPURINA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević
2. prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
3. doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Zagreb, srpanj 2015.

ZAHVALA

Zahvaljujem doc. dr. sc. Tatjani Gazivoda Kraljević na predloženoj temi i znanju koje mi je prenijela tijekom posljednje tri godine.

Zahvaljujem dr. sc. Maji Stipković Babić na pomoći, susretljivosti i mnogobrojnim savjetima koje mi je pružila pri izradi eksperimentalnog dijela i pisanja samog rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić što mi je omogućila sudjelovanje na znanstvenom projektu posljednje tri godine.

Zahvaljujem dr. sc. Andrijani Meščić koja me je uvela u rad u laboratoriju, a i danas mi pruža vrlo korisne savjete.

Zahvaljujem se i svim ostalim članovima Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na ugodnoj atmosferi, uzajamnoj pomoći i podršci.

Zahvaljujem se kolegi Morisu Mihoviloviću na kolegijalnosti i pomoći te društvu u dosadašnjem istraživačkom i znanstvenom radu.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, bratu i sestri te dečku i prijateljima jer su mi olakšali teške trenutke i bezuvjetno me podržavali tijekom mog školovanja.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost, HRZZ-5596.

SAŽETAK

Zbog važnosti citozina i 7-deazapurina kao bioloških i kemoterapijskih agenasa, razvoj novih derivata iz okosnica njihove strukture bitan je za razvoj novih potencijalnih lijekova.

U ovom radu opisana je sinteza novih C-5 alkinilnih derivata citozina (**9-16**) i C-6 supstituiranih derivata 7-deazapurina (**17-25**). ‘Klik’ reakcijom potpomognutom mikrovalovima *N*-1-propargiliranog derivata citozina (**2**) s odgovarajućim azidima uveden je 1,2,3-triazolni prsten u položaj *N*-1 pri čemu su sintetizirani spojevi **3-8**. C-5 alkinilni derivati citozina **9-16** pripremljeni su Pd-kataliziranom Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog spajanja 5-jod-*N*-1-metiltriazolilnih derivata citozina **3-8** s odgovarajućim alkinima, koji su potom reakcijom *N*-heteroanulacije *in situ* prevedeni u derivate 7-deazapurina (**17-25**). Strukturna i spektroskopska karakterizacija derivata citozina i 7-deazapurina provedena je ¹H-NMR, te UV/Vis i fluorescencijskom spektroskopijom. Rezultati spektroskopskih istraživanja pokazuju da ciklizacija i povećanje konjugacije kod spojeva **10**, **14** i **16** poboljšavaju spektroskopske karakteristike, osobito fluorescencije. Farmakološki učinci i moguće biološke mete predviđeni su *in silico* analizom (PASS). Kako bi se odredili mogući mehanizmi bioloških djelovanja spojeva ispitana je interakcija odabranih spojeva s *ct*-DNA, a iz rezultata UV/Vis i fluorimetrijskih spektara vidljivo je da se spojevi **7** i **8** najbolje vežu za *ct*-DNA. Citostatska aktivnost *in vitro* novosintetiziranih spojeva ispitat će se 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).

Ključne riječi: C-5-alkinilni derivati citozina, derivati 7-deazapurina, Sonogashira-ina reakcija, ‘klik’ reakcija, biološka aktivnost, *ct*-DNA

SUMMARY

Due to biological and chemotherapeutic importance of cytosine and 7-deazapurine, development of novel derivatives from their backbones is important for the potential development of new drugs.

This paper describes the synthesis of C-5 alkynyl cytosine derivatives (**9-16**) and C-6 substituted 7-deazapurine derivatives (**17-25**). *N*-1 cytosine derivatives (**3-8**) were synthesized using 'click' reaction of *N*-1-propargylcytosine derivative (**2**) with corresponding azides under microwave irradiation. C-5 alkynyl cytosine derivatives (**9-16**) were synthesized by Pd-catalysed Sonogashira cross-coupling reaction of 5-iodo-*N*-1-methyltriazolylcytosine derivatives (**3-8**) with corresponding alkynes, which are then converted into 7-deazapurine derivatives (**17-25**) by *N*-heteroannulation *in situ*. Structural and spectroscopic characterization of cytosine and 7-deazapurine derivatives was conducted using ¹H-NMR, UV/Vis and fluorescence spectroscopy. Results of spectroscopic studies show that cyclization and increase of conjugation for compounds **10**, **14** and **16** have better spectroscopic characteristics, especially fluorescence. Pharmacological effects and possible biological targets were provided using *in silico* analysis (PASS). Possible mechanisms of biological activity was performed by interaction of selected compounds with the *ct*-DNA, and the results of UV/Vis and fluorescence spectroscopy show that compounds **7** and **8** have the best interaction. Cytostatic evaluation will be performed *in vitro* against human malignant tumor cells: HeLa, CaCo-2, Raji and K562.

Key words: C-5 alkynyl cytosine derivatives, 7-deazapurine derivatives, Sonogashira cross-coupling, 'click' reaction, biological activity, *ct*-DNA

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	4
2.1. Nukleozidi i nukleozidni analozi	4
2.2. C-5 supstituirani derivati citozina i njihovo biološko djelovanje	6
2.3. 1,2,3-triazolni derivati nukleozida.....	9
2.4. 7-deazapurini	12
2.4.1. 7-deazapurini kao inhibitori proteinskih kinaza	14
2.5. N-alkiliranje citozina.....	20
2.6. Sonogashira-ina reakcija	22
2.7. 'Klik' kemija	24
2.8. UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija.....	26
2.9. Vežanje malih molekula za molekulu DNK	28
2.10. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva <i>in silico</i> analizom (PASS)	32
3. EKSPERIMENTALNI DIO	35
3.1. Opće napomene	35
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva	36
3.3. Priprava spojeva.....	39
4. REZULTATI I RASPRAVA	46
4.1. Sinteze spojeva	46
4.2. Strukturna karakterizacija novopripremljenih spojeva ¹ H NMR spektroskopijom.....	50
4.3. Spektroskopska karakterizacija spojeva UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom.....	59

4.4. <i>In silico</i> analiza novopripravljenih spojeva (2-25)	64
4.5. Ispitivanje interakcije spojeva sa <i>ct</i>-DNA UV/Vis i fluorimetrijskim titracijama.....	72
5. ZAKLJUČCI	78
6. LITERATURA	81
7. ŽIVOTOPIS	85

1. UVOD

1. UVOD

Tijekom posljednja dva desetljeća, pronađeno je da većina bolesti proizlazi iz krivog prijenosa signala u organizmu. To saznanje omogućilo je znanstvenicima precizniji molekularni pristup bolestima poput leukemije, čvrstih tumora, upalnih bolesti, ateroskleroze i psorijaze. Stoga, biokemičari, farmakolozi i medicinski kemičari mogu dizajnirati lijekove kao specifične molekule, čije su mete proteini koji imaju ključnu ulogu u razvoju bolesti.¹

Budući da rak i virusne bolesti uzrokuju najveću smrtnost u svijetu, većina je istraživanja usmjerena ka pronalasku učinkovite kemoterapije. Posljednjih godina, molekularno ciljana terapija privukla je pozornost istraživača jer su lijekovi dizajnirani na molekularnoj razini mnogo učinkovitiji i sigurniji od konvencionalnih citotoksičnih kemoterapeutika zbog dobro definiranih meta i mehanizama djelovanja.²

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.^{3,4} Mnogi izosteri purina važni su inhibitori DNK i RNK polimeraze te ometaju brojne procese koji inače omogućavaju proliferaciju odnosno širenje tumora. Tako je strukturna okosnica 7-deazapurina, poznatijih i kao pirolo[2,3-*d*]pirimidina, dio mnogih danas već korištenih lijekova, ali i prirodnih aktivnih tvari te važnih biomolekula.^{5,6}

Spojevi koji sadrže 7-deazapurinsku okosnicu mogu se vezati na mnoge receptore pa je zato njihova primjena vrlo raširena. Najčešće se spominje 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.⁷ 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.⁸

Osim 7-deazapurina, i 1,2,3-triazoli sve se više koriste u dizajnu i istraživanju lijekova. Fizikalno-kemijska svojstva i prisutni dušikovi atomi omogućuju im stvaranje vodikovih veza sa biomolekulskim metama, što ih čini izuzetno biološki aktivnima. Sintetizirani su mnogi derivati 1,2,3-triazola koji pokazuju različita biološka djelovanja, kao što su antitumorska, antifungalna, antibakterijska, antituberkulostatska i antivirusna. Razvoj 1,2,3-triazolnih derivata nukleinskih kiselina i nukleozida imao je značajan utjecaj na antivirusnu i antitumorsku kemoterapiju jer su to bili jedni od prvih citotoksičnih lijekova. Mnogi antivirusni i antitumorski lijekovi su razvijeni upravo iz ove skupine spojeva, a najpoznatiji je ribavirin, prvi triazolni nukleozid sa širokim spektrom snažnog antivirusnog djelovanja odobren za korištenje protiv hepatitis C virusa koji se danas koristi diljem svijeta.⁹

1. UVOD

Osnovni cilj ovog rada bio je dizajn novih C-5 alkinilnih te N-1 triazolilnih citozinskih i 7-deazapurinskih derivata u svrhu ispitivanja novopripremljenih spojeva *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) te vezivanja za *ct*-DNA, kako bi se utvrdio mogući mehanizam citostatskog djelovanja.

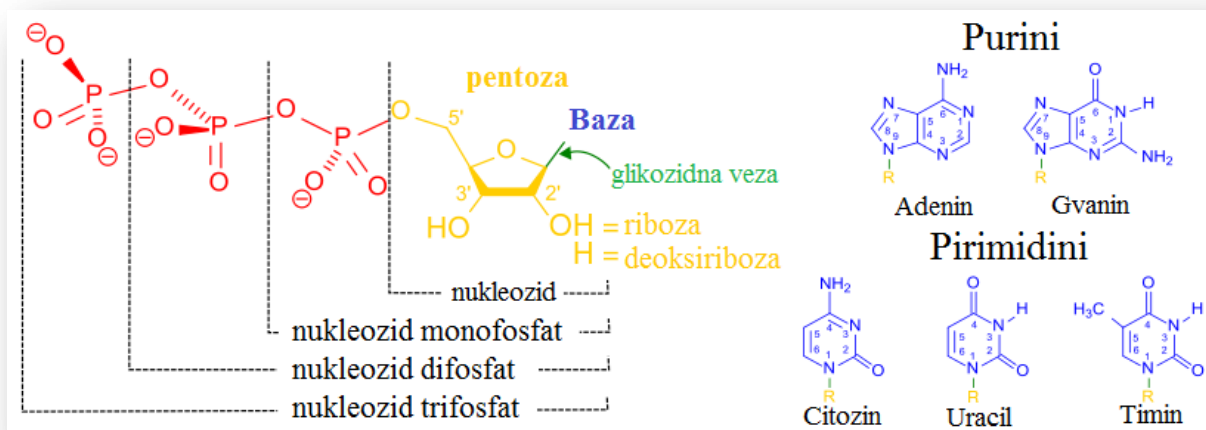
2. OPĆI DIO

2. OPĆI DIO

2.1. NUKLEOZIDI I NUKLEOZIDNI ANALOZI

Nukleozidi i nukleotidi jedne su od najvažnijih biomolekula živućih organizama. Nukleozidi su sačinjeni od purinske ili pirimidinske baze vezane na šećernu komponentu *N*-glikozidnom vezom, pri čemu šećerni dio molekule može biti građen od D-riboze ili D-2'-deoksiriboze, a svoje β -glikozidne derivate čine kad se povežu sa nešećernom odnosno aglikonskom komponentom u obliku purinskih (adenin, gvanin) ili pirimidinskih (timin, citozin, uracil) baza.

Nukleotidi, monomeri nukleinskih kiselina koji su odgovorni za najvažnije funkcije i preživljavanje organizma, nastaju povezivanjem nukleozida, sačinjenih od navedenih baza i šećernih komponenti, sa fosfatnom skupinom (Slika 1). Oni predstavljaju 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).

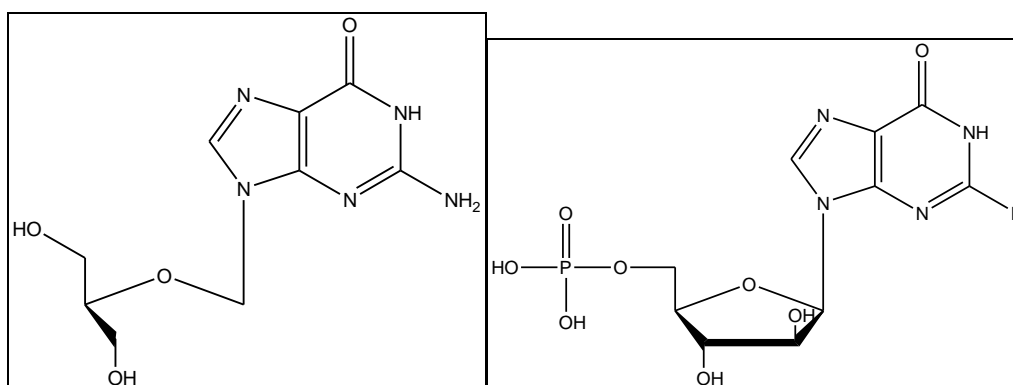


Slika 1. Struktura nukleozida i nukleotida te pripadajućih dušičnih baza

Jedan od načina sinteze nukleozida je supstitucija s dušikovim nukleofilom na monosaharidu katalizirana kiselinom, 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 deoksiribožu.^{10,11} Sinteza nukleotida teče dako da se nukleozidi fosforiliraju nukleozidnim monofosfat-kinazama do trifosfata.¹²

2. OPĆI DIO

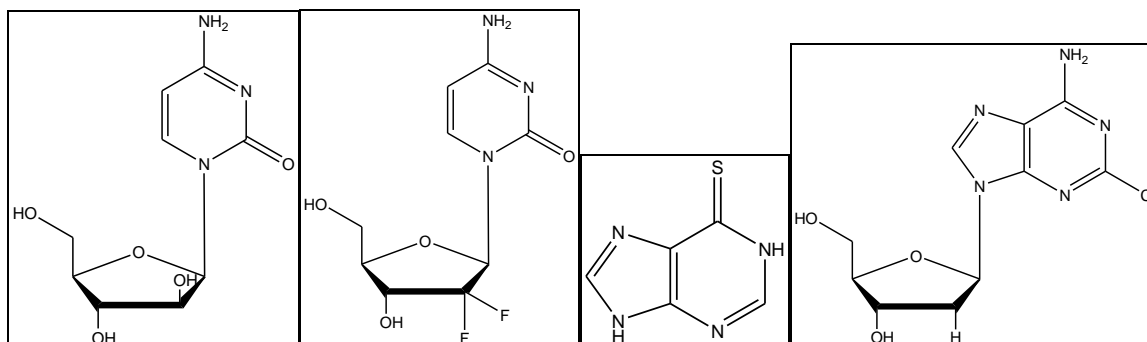
Nukleozidni analozi sintetski su spojevi, kreirani s namjerom da imitiraju prirodne nukleozide i zamjene njihovo mjesto u lancu nukleinske kiseline. Tijekom izgradnje nukleinskog lanca umeću se umjesto prirodnih nukleozida te tako inhibiraju staničnu ili virusnu DNK- i RNK-polimerazu. Jedan od najvećih pomaka u medicini tijekom 20. stoljeća bilo je otkriće antibiotika koji inhibiraju proliferaciju bakterija u zaraženom organizmu bez negativnog utjecaja na domaćina. Prikupljena znanja omogućavaju sličan napredak u istraživanju potencijalnih spojeva za antitumorsku i antivirusnu terapiju. Nukleozidni analozi izuzetno su važna skupina spojeva, a najbolji pokazatelj je to da je većina antivirusnih lijekova upravo iz te klase, a jedan od najprimjenjivanijih je aciklovir (Slika 2). Osim toga, mnogi se nukleozidni derivati koriste i kao antitumorski kemoterapeutici, primjerice fludarabin-fosfat (Slika 2).¹³ Metabolizam i biorapoloživost pokazuju dobre rezultate jer im je većina fizikalno-kemijskih svojstava jednaka kao i kod samih nukleozida.¹⁴



Slika 2. Strukture aciklovira i fludarabin-fosfata

Nukleozidni analozi čine važnu klasu antimetabolita koji se koriste u liječenju hematoloških zloćudnih tkiva i čvstih tumora. Oni oponašaju ulogu fizioloških nukleozida u metabolizmu te se ugrađuju u rastući lanac DNK inhibirajući njegovu sintezu i uzrokujući terminaciju lanca. Neki od analoga također inhibiraju ključne enzime uključene u stvaranje purinskih i pirimidinskih nukleotida i sintezu RNK te direktno aktiviraju apoptozu ili staničnu smrt. Skupina nukleozidnih analoga uključuje razne pirimidinske i purinske analoge od kojih su značajni pirimidinski analozi: citozinarabinozid (citarabin), koji se rašireno koristi za liječenje akutne leukemije i gemcitabin, koji pokazuje aktivnost u borbi protiv raka gušterače, pluća i dojke. 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, čija uporaba obuhvaća samo hematološka maligna tkiva.¹⁵

2. OPĆI DIO



Slika 3. Strukture citarabina, gemcitabina, merkaptopurina i kladribina

Važnost nukleozidnih analoga kao kemoterapeutskih agenasa porasla je kao rezultat uvođenja novih molekula u kliničku uporabu i širenje u područje čvrstih tumora. U istom razdoblju, postignut je golem napredak u razumijevanju mehanizama otpornosti lijekova na nukleozidne analoge. Jedna od metoda koja je usmjerena protiv navedene otpornosti je kombiniranje lijekova, pri čemu se optimira efikasnost trenutno dostupnih lijekova. 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.¹⁵

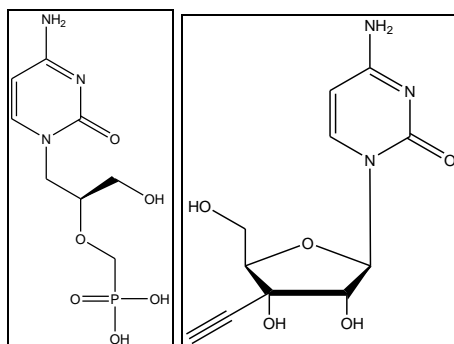
2.2. C-5 SUPSTITUIRANI DERIVATI CITOZINA I NJHOVO BIOLOŠKO DJELOVANJE

Citozin je pirimidinska nukleozidna baza koja je jedna od osnovnih sastavnica nukleinskih kiselina, stoga su njeni analozi među glavnim spojevima inhibitora rasta DNK i RNK.

Jedan od derivata citozina, citarabin (Slika 3), već je u kliničkoj uporabi za liječenje akutne leukemije. On je dokaz da su citozinski derivati obećavajuća klasa spojeva koji mogu 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 (cidofovir, HPMP) (Slika 4), snažan i selektivan inhibitor replikacije humanog citomegalovirusa (CMV). Njegova aktivnost vrlo je visoka i slična adeninskom derivatu (*S*)-9-(3-hidroksi-2-fosfonilmetoksipropil)adeninu (HPMPA), a oba su pokazala vrlo niske koncentracije potrebne za inhibiciju virusa. Cidofovir djeluje inhibitory čak i nakon dodavanja 24 do 48 sati nakon infekcije.¹⁶

2. OPĆI DIO



Slika 4. Strukture cidofovira i 3'-etinilcitidina

Citozinski derivati pokazali su i značajnu antitumorsku aktivnost. Učinkovitost antitumorskog nukleozidnog derivata citozina 3'-etinilcitidina (ECyd) (Slika 4) analizirana je *in vitro* i *in vivo*. Antitumorski učinak *in vivo* 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 derivari koji su povećali bioraspoloživost, a samim time i antitumorsku aktivnost. 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.¹⁷

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.¹¹

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.¹⁸

Epigenetika svoj nagli napredak duguje, između ostalog, DNK-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 DNK-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

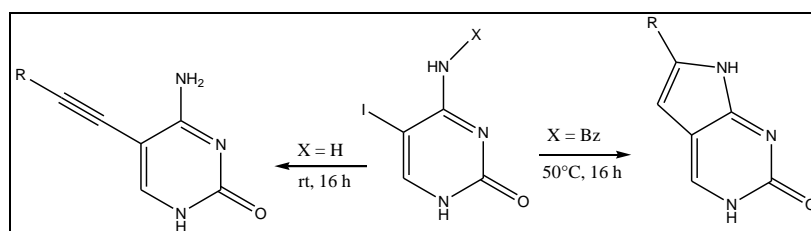
2. OPĆI DIO

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.⁴

Prema fizikalno-kemijskim svojstvima sintetiziranih alkinilnih i alkenilnih citozinskih derivata, pretpostavljeno je da bi se mogli ponašati kao interkalatori u interakciji s DNK lancem.¹⁹

Nukleozidni analozi supstituirani na C-5 položaju pirimidinskog prstena alkenilnim i alkinilnim supstituentima pokazuju izraženu biološku aktivnost. Tako, primjerice, derivati arabinofuranozilcitozina s halovinilnim ili vinilnim supstituentima pokazuju aktivnost *in vitro* prema HSV-1 i HSV-2 virusima, kao i odgovarajući 5-alkenilni uracilni 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 supstituenata. Proučavano je i uspoređivano također i djelovanje na virusom inducirane timidin-kinaze.²⁰

C-5-alkinilni citozinski derivati bez supstituenata 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



Schema 1. Sinteza alkinilnih derivata citozina²²

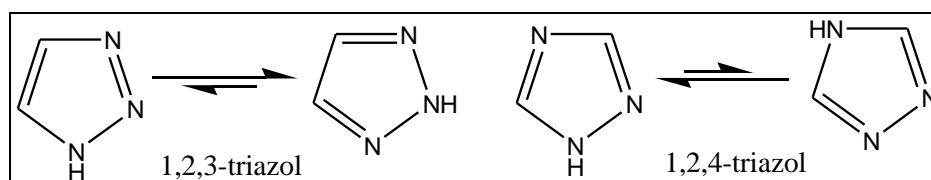
2. OPĆI DIO

2.3. 1,2,3-TRIAZOLNI DERIVATI NUKLEOZIDA

Triazoli su vrsta heterocikličkih amina koja se može pronaći u mnoštvu korisnih i bioaktivnih spojeva, od agrokemikalija i fotokemijskih produkata do fungicidnih lijekova i farmaceutskih tvari. Klasična sinteza peteročlanih triazolnih prstenova postiže se sintetskim pristupom poznatim kao 'klik kemija'.²³

Prema rasporedu dušikovih atoma u prstenu razlikujemo: 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol.²⁴

Svaki od njih ima dva tautomera (Slika 5), koji se razlikuju po položaju vodikovih atoma.²⁵

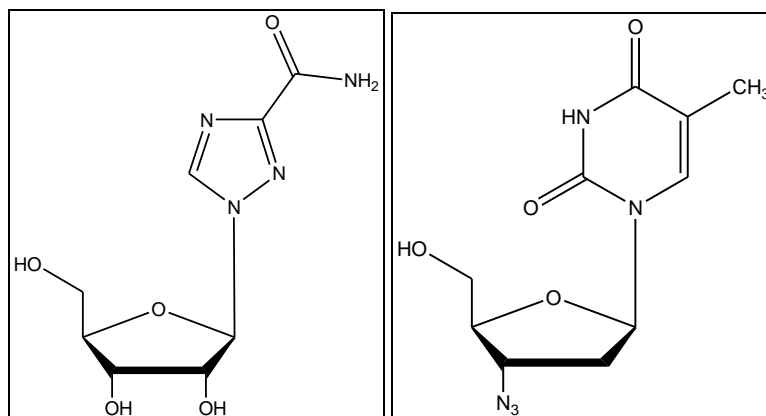


Slika 5. Tutomerni oblici 1,2,3- i 1,2,4-triazola

Derivati 1,2,3-triazola su privukli mnogo pažnje u istraživanju lijekova zbog svoje izuzetne stabilnosti te zbog uloge bioizostera amidne skupine. Budući da se 1,2,3-triazoli mogu ponašati kao rigidne povezivajuće jedinice, koje oponašaju atome i elektronska svojstva peptidne veze bez podložnosti hidrolizi, mnogi poznati 1,2,3-triazoli posjeduju biološku aktivnost. 1,2,3-triazolna okosnica može tvoriti π - π interakcije s aromatskim prstenovima, kao što je fenilni prsten, pri čemu posjeduje visoki dipolni moment. Dva dušikova atoma, *N*-2 i *N*-3 mogu tvoriti vodikove veze sa donorima vodikove veze ili koordinirati s metalnim ionima. Upravo zbog tih svojstava, triazolna okosnica može se vezati za biomolekularne mete. Nadalje, njihova stabilnost je zapanjujuća, stabilni su na metaboličku i kemijsku razgradnju, inertni su na hidrolitičke, oksidacijske i redukcijske uvjete, čak i pri visokim temperaturama.⁹

Uvođenje triazolnog prstena u nukleozidne strukture u svrhu poboljšavanja njihove biološke aktivnosti za antitumorsku i antivirusnu primjenu postalo je učestalo u postupku dizajniranja lijekova. Ribavirin je prvi triazolni nukleozidni derivat s potencijalnim širokim spektrom antivirusne aktivnosti potvrđen od strane FDA za liječenje HCV-a i trenutno je u kliničkoj upotrebi diljem svijeta. Osim ribavirina, značajni triazolni derivat je i azidotimidin, poznatiji kao zidovudin, koji se također koristi u antivirusnoj terapiji (Slika 6). Ta dva spoja su inspirirala brojne znanstvenike u sintezi i biološkim ispitivanjima novih 1,2,3-triazolonukleozida.⁹

2. OPĆI DIO

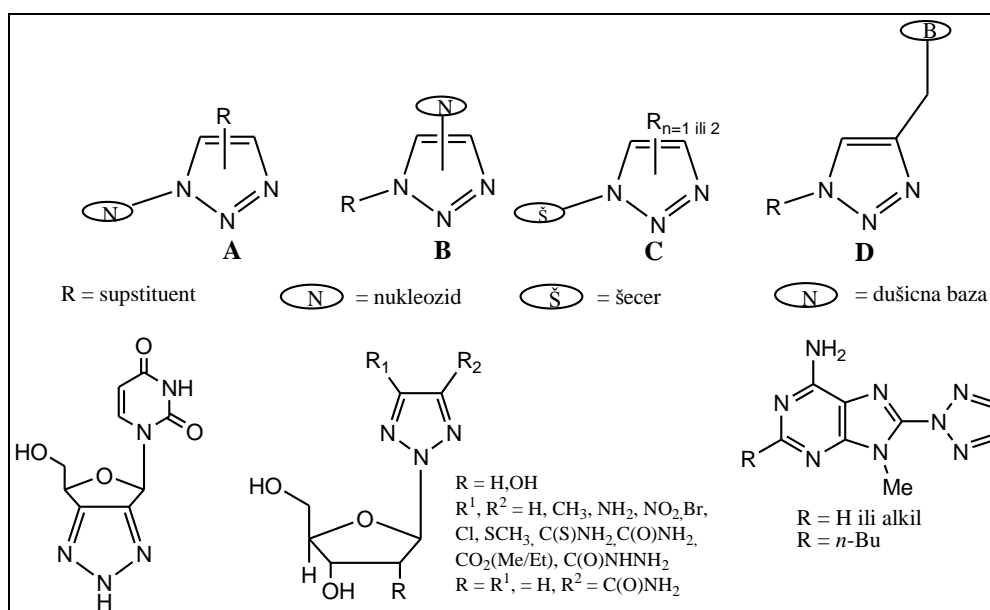


Slika 6. Strukture ribavirina i zidovudina

1,2,3-triazolna okosnica omogućuje 1*H*-, 2*H* ili 4*H* supstituciju, ovisno o položaju supstituenata na prstenu. Međutim, većina 1,2,3-triazolonukleozida posjeduju 1*H*-1,2,3-triazolnu skupinu u strukturi. Uloga triazolne skupine u strukturi nukleozidnih analoga je različita:

- supstituent na šećernom dijelu ili na dušičnoj bazi molekule nukleozida (A ili B)
- zamjena za dušičnu bazu (C)
- veza između dušične baze i šećera ili imitiranje šećera (D),

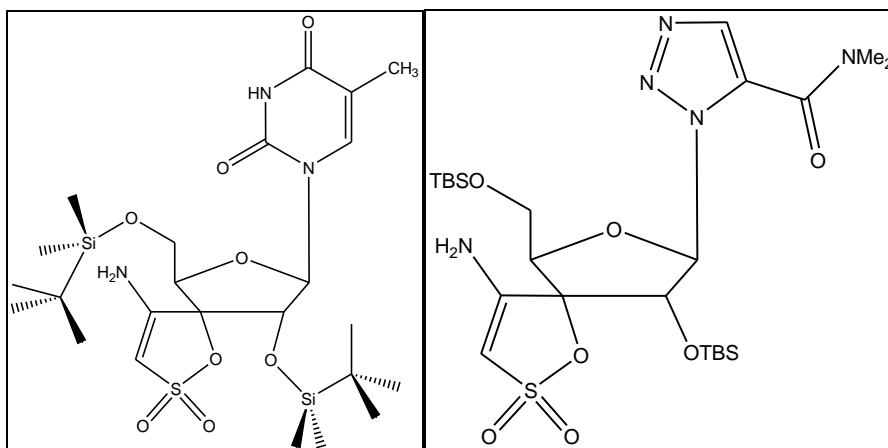
što je prikazano na Shemi 2. ²⁶



Schema 2. Mogućnosti vezivanja triazolne okosnice za nukleozid

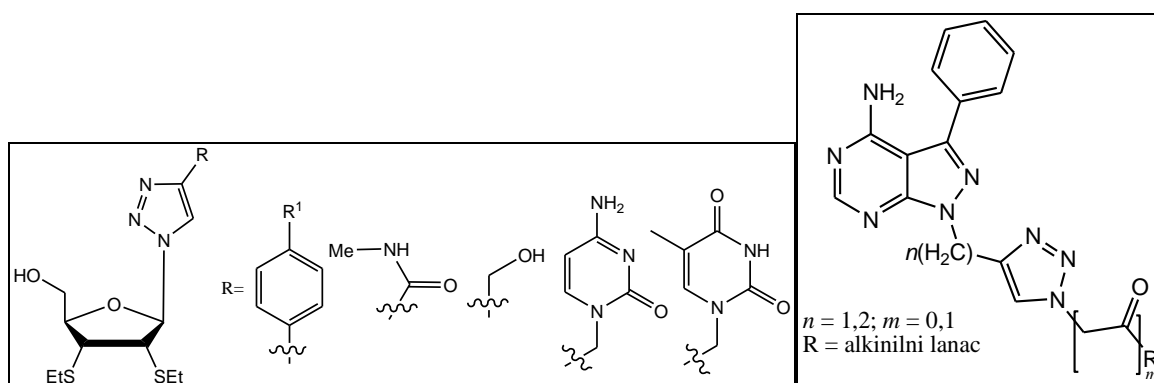
2. OPĆI DIO

Iz serija nukleozidnih analoga, u kojima su dušične baze zamijenjene sa 1,2,3-triazolnom okosnicom nastali su derivati 1,2,3-triazol- β -D-ribofuranozil-3-spiro-5-oksatioldioksida (TSAO) (Slika 7), koji su pokazali potencijalnu i selektivnu aktivnost protiv tipa 1 virusa HIV, kao nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze. Proučavanje odnosa strukture i aktivnosti (SAR) TSAO klase spojeva pokazalo je da postoje strogi uvjeti za optimalnu anti-HIV aktivnost u staničnoj kulturi s obzirom na strukturne odrednice. Ključnu ulogu u interakciji TSAO spojeva sa ciljnim enzimima ima šećerna strukturna jedinica.^{9, 27}



Slika 7. Struktura početnog spoja TSAO i njegovog triazolnog derivata

Seriya novopripravljenih pirimidinskih triazolnih nukleozida pokazala je značajnu antitumorsku aktivnost na stanične linije HepG2, A549 i Hela, dok su purinski triazolni nukleozidi pokazali inhibiciju Src-kinaze i adenokarcinoma jajnika, karcinoma dojke te adenokarcinoma debelog crijeva (Slika 8). Ti rezultati upućuju na to da konjugacijski efekt triazolnog prstena s aromatskim sustavom ima veliku ulogu u biološkoj aktivnosti.²⁸



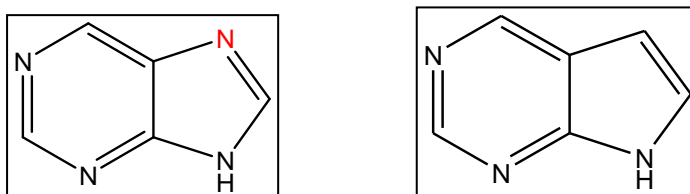
Slika 8. Strukture triazolnih pirimidinskih i purinskih nukleozidnih analoga

2. OPĆI DIO

2.4. 7-DEZAPURINI

7-Deazapurini (pirolo[2,3-*d*]pirimidini) su analozi purina u kojima je dušikov atom na položaju 7 purinskog prstena zamijenjen C-atomom (Slika 9), a zbog strukturne sličnosti s purinom njihovi derivati sintetiziraju se u razvoju lijekova najčešće radi biomimetičkih svojstava.⁵

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 adenoizina.⁶



Slika 9. Struktura purinskog prstena i 7-deazapurina

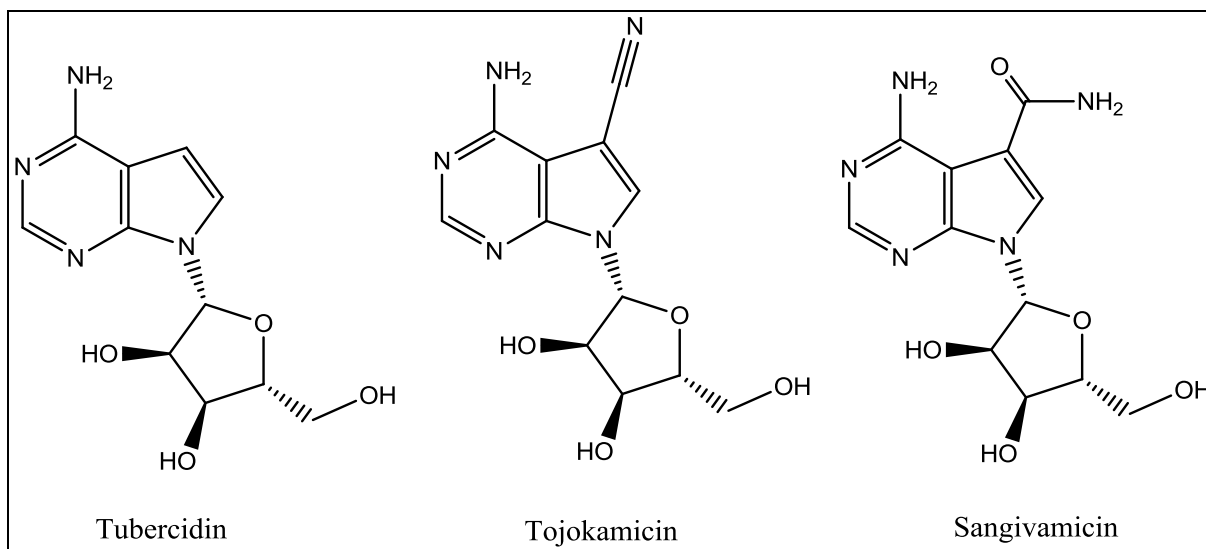
Djelovanje ovih spojeva temelji se na mehanizmu umetanja u sintetizirajući lanac DNK umjesto prirodnih dušičnih baza i prekidanje daljnje sinteze, čime se sprječava razmnožavanje tumorskih stanica, kao i onih koje su zaražene virusom. Uz djelotvornost učinka na zaražene, važno je promatrati i učinak koji molekula ima na zdrave stanice, odnosno citotoksičnost prema zdravim stanicama. 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.⁵

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'-

2. OPĆI DIO

deoksitubercidinu iz crvene alge *Hypnea valendiae*.⁵ Neki od derivata sintetiziranih po uzoru na te biološke molekule pokazali su potpunu inhibiciju diobe stanica u oplođenom jajetu morskog ježa. To istraživanje donijelo je korisna saznanja za razvoj i sintezu novih insekticida.²⁹

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 (Slika 10).³⁰



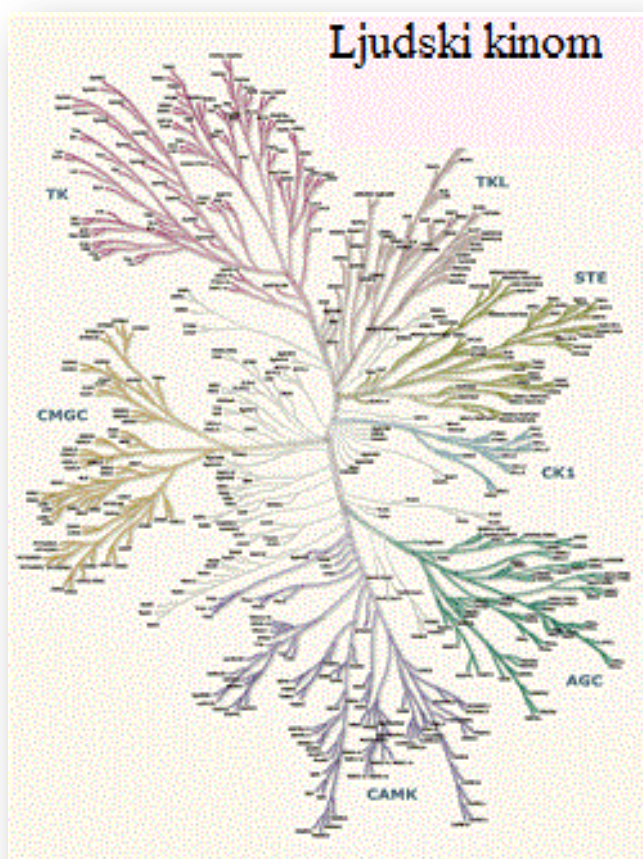
Slika 10. Strukture tubercidina, tojokamicina i sangivamicina

Iz njihovih struktura, vidljivo je da su svi spomenuti derivati adenzina, i to, 7-dezaadenozina. Tubercidin pokazuje širok spektar djelovanja kao kemoterapeutski agens protiv tumora, virusa, bakterija i gljivica, sudjelujući u procesiranju RNA i sintezi proteina kao mimetik adenzina.³¹ Njegov analog tojokamicin pokazuje slična antitumorska i antibiotska svojstva, koja proizlaze iz jakog inhibitornog djelovanja. Inhibitor je samokidanja veza u RNK molekulama unutar stanica sisavaca, inhibitor fosfatidilinozitol-kinaze, te inhibitor signaliziranja auksina u biljaka.^{32, 33} Tojokamicin je pokazao specifičnu inhibiciju transkripcije gena reguliranu auksinima, a auksini su biljni hormoni koji imaju ključnu ulogu u razvoju biljke.³⁴ 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, $IC_{50}=10\mu M$) koju inhibira kompetitivno u odnosu na ATP i nekompetitivno u odnosu na histonske i lipidne kofaktore.^{30, 35}

2. OPĆI DIO

2.4.1. 7-deazapurini kao inhibitori proteinskih kinaza

Proteinske kinaze su široka skupina evolucijskih 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 krucijalne uloge u progresiji tumora i drugih bolesti. Postoji više od 500 različitih kinaza te one čine oko 2% ukupnog ljudskog genoma (Slika 11).

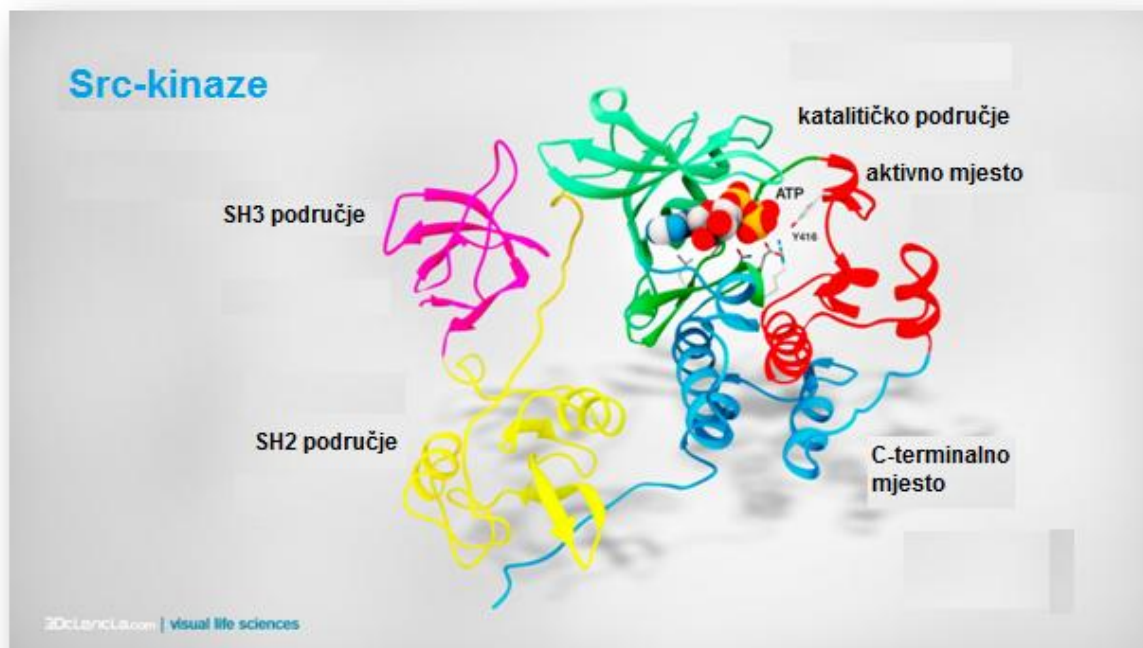


Slika 11. Prikaz svih kinaza u ljudskom tijelu-kinoma

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 (Slika 12). 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

2. OPĆI DIO

istraživanja proizašli su lijekovi koji se danas nalaze na tržištu i vrlo su učinkoviti inhibitori različitih kinaza (npr. imatinib, Gleevec®, Novartis).⁷



Slika 12. 3D prikaz Src kinaze i ATP-a vezanog u njeno aktivno mjesto

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.³⁶

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 s djelovanjem na tirozin-kinazu poznate su tri glavne skupine, a svi njihovi receptori pripadaju skupini receptorskih tirozin-kinaza.³⁶

2. OPĆI DIO

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 žila. 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 se uklanja i taj protein je „isključen“. Ukoliko dođe do mutacije, proces „uključivanje/isključivanje“ može biti ometan, zbog čega dolazi do neregularnosti 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.³⁶

Mutacije receptorske tirozin-kinaze često vode do nastajanja onkogena, 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.³⁶

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.³⁶

Ovo je područje vrlo aktualno u razvoju farmaceutika zbog velikog broja vrsta inhibitora i njihove interakcije s proteinskim tirozin-kinazama. Sve trenutno korištene tvari vežu se u aktivna mjesta predviđena za molekule ATP-a, a upravo zbog svoje strukturne sličnosti s aktivnim molekulama su derivati 7-deazapurina toliko važni predstavnici u ovom

2. OPĆI DIO

polju. 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 interreagiraju 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.¹

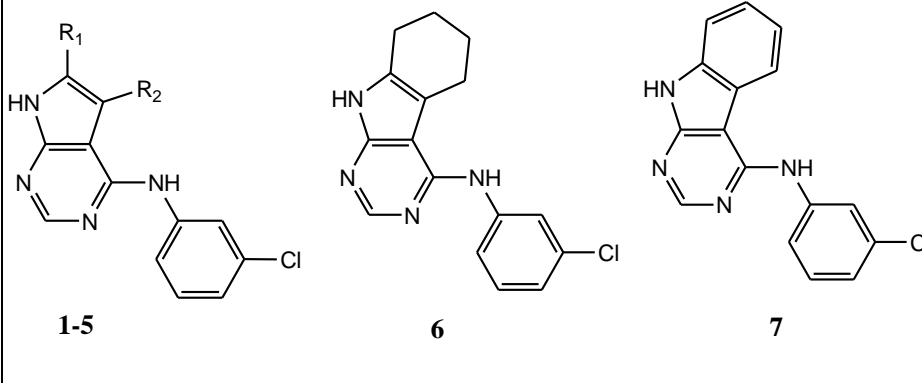
Vrlo učinkovit način otkrivanja novih inhibitora je pretraživanje bazirano na fragmentima. Prema tom konceptu, lijek može biti iskrojen od sitnih fragmenata, za razliku od skeniranja aktivnog mjesta i potrage za visoko aktivnom supstancom. Prije svega, velika baza malih fragmenata uspoređuje se s metom 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® (Roche) u 6 godina dospio iz koncepta do tržišta.¹

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, 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.¹

Prva uspješna primjena farmakofornog modela za interakciju kompetitivnih inhibitora ATP-a s aktivnim mjestom EGFR tirozin kinaze dovela je do identifikacije 4-fenilamino-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidina kao nove klase EGFR PTK inhibitora. U proučavanju odnosa strukture i aktivnosti (SAR) ispitivan je utjecaj supstituenata na anilinskoj skupini te prisutnost elektron-odvlačeće skupine na položaju 3. Daljnjim modifikacijama je utvrđeno da uvođenjem velikih supstituenata, kao što su fenilne skupine u položaje 5 i 6, dolazi do smanjenja aktivnosti, tj. inhibicije EGFR tirozin-kinaze. Spoj sa metilnim skupinama na

2. OPĆI DIO

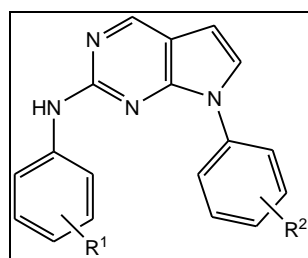
položajima 5 i 6 pokazao je selektivnu aktivnost na receptorske i nereceptorske tirozin-kinaze, kao i na serin/treonin kinaze. Na slici 13 prikazane su strukture sintetiziranih spojeva i njihova odnos strukture i aktivnosti.³⁷



Spoj	R ₁	R ₂	EGFR (IC ₅₀ μM)
CGP 59326			
1 (CGP 59326)	CH ₃	CH ₃	0.027
2	C ₆ H ₅	CH ₃	0.015
3	CH ₃	C ₆ H ₅	0.230
4	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	0.096
5	Bifenil	CH ₃	>100
6			0.029
7			0.006
PD 153035			0.006

Slika 13. Strukture derivata pirolo[2,3-*d*]pirimidina i njihov SAR

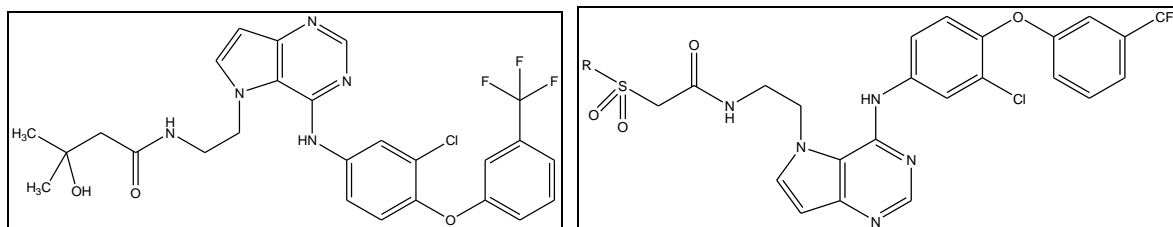
Sintetiziran je niz 2-amino-9-aryl-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidina čija je meta fokalna adhezijska kinaza (FAK). Povećanjem ekspresije FAK-kinaze dolazi do povećanja invazivnosti raka i mogućnosti metastaziranja. Veliki broj ovih 7-deazapurina pokazuje inhibirajuće djelovanje prema fokalnoj adhezijskoj 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 skupinu inhibitora kinaza.³⁸



Slika 14. Opća formula novih sintetiziranih inhibitora fokalne adhezijske kinaze

2. OPĆI DIO

Modifikacijama početnog spoja koji je pokazao izuzetnu inhibiciju aktivnosti HER2/EGFR kinaze, dobiven je niz novih derivata pirolo[2,3-*d*]pirimidina koji su pokazali veću selektivnost te bolju biološku raspoloživost u odnosu na početni spoj (Slika 15).²

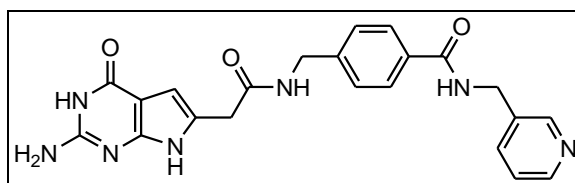


Slika 15. Struktura inhibitora HER2/EGFR kinaze i opća formula njegovih derivata

Timidilat-sintaza (TS) i dihidrofolat-reduktaza (DHFR) esencijalni su enzimi u biosintezi folne kiseline. TS katalizira reakciju deoksihidrin-monofosfata s metilen tetrahydrofolatom čiji je produkt deoksitimidin-monofosfat i dihidrofolat (H₂F). DHFR katalizira redukciju H₂F u prisutnosti nikotinamidadeninukleotid-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 amidin supstituiran derivat 7-deazapurina (Slika 16) 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.⁸



Slika 16. Struktura amidino supstituiranog derivata 7-deazapurina

2. OPĆI DIO

2.5. *N*-ALKILIRANJE CITOZINA

Protoniranje i elektrofilni napad dušičnih baza nukleinskih kiselina predstavljaju važne biološke reakcije. Posebno su bitne reakcije alkiliranih agensa zbog njihovog sudjelovanja u karcinogenezi i mutagenizi. Dosadašnja istraživanja pokazuju da se različite klase elektrofilnih agenasa razlikuju u afinitetu prema metama na bazama nukleinskih kiselina. Tako je iz mnogih dostupnih eksperimentalnih podataka o protoniranju i alkiliranju purina i pirimidina nukleinskih kiselina, njihovih nukleotida i nukleozida, slobodnih ili unutar lanca nukleinske kiseline, poznato da se protoniranje odvija uvijek na dušikovim atomima u prstenu, dok se alkiliranje događa na različitim položajima, ovisno o reagensima i uvjetima.³⁹

Citozin se alkilira većinom na *N*-3 ili *N*-1 položaju, ovisno o reagensima, ali dimetilamino analog daje obje *N*-metilne soli, kao i izocitozin. Sa trialkilnim fosfatima u DMF-u, većinski produkt je 1,3-dialkiliranicitozin, ali s etilen karbonatom ili trimetiloksonijhidroksidom 1-alkilirani citozin je glavni produkt sa više od 85% iskorištenja. Dimetilformamid dimetiletilacetal je specifični metilirajući reagens za *N*-1 citozin.⁴⁰

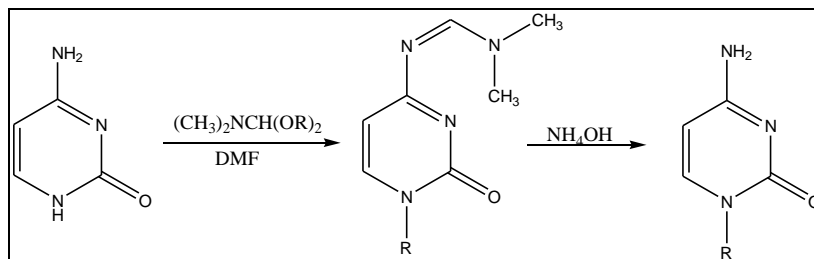
N-1 supstituirani citozinski derivati imaju vrlo zanimljiva svojstva kao što su: inhibiranje deoksicitidin-kinaze, sparivanje s 9-supstituiranim gvaninom, vezivanje s pirimidinskim bazama asimetričnim međubaznim vodikovim vezama. Koriste se za spektroskopsku detekciju ograničene rotacije amino skupina izvanstanične jezgre i prekursori su mnogih visokotopljivih, brzodjelujućih antibakterijskih spojeva, kao što je sulfacitin (1-etil-*N*-4-sulfanilicitozin). Sinteza 1-supstituiranih citozinskih derivata pokazala je mala iskorištenja, dobivanje više produkata te otežanu izolaciju izomera. Tri su načina sinteze *N*-1 supstituiranih citozina:

- a) direktno alkiliranje citozina pomoću dialkil-sulfata, trialkil-fosfata ili alkil-halida
- b) ciklizacija 1-alkil-1-(2-cijanoetil)uree ili etoksiakrilamida s alkilaminima
- c) pregrađivanje 4-amino-2-alkoksipirimidina pirolizom.

Jedna od sinteza *N*-1 supstituiranih citozina (Shema 3) je reakcija citozina s *N,N*-dimetilformamidmetilacetalom uz hidrolizu. Izoliranje produkta najjednostavnije je ukoliko se koristi DMF kao otapalo, a najbolji rezultati sinteze postižu se u suhim uvjetima. Prvi produkt koji nastaje nakon zagrijavanja 24 sata uz uvođenje dušika je 1-supstituirani *N*-4-

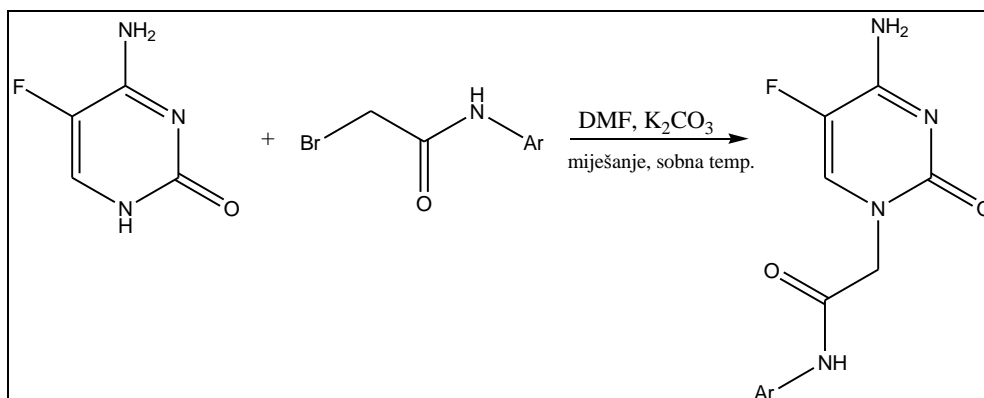
2. OPĆI DIO

[(dimetilamino)milen]citozin, koji se zatim hidrolizira s koncentriranim amonijevim hidroksidom do odgovarajućeg *N*-1 supstituiranog citozina, bez prethodnog pročišćavanja.⁴¹



Shema 3. Sinteza *N*-1 supstituiranih derivata citozina

Reakcijom 5-fluorcitozina sa različitim anilidima u DMF-u uz 1 M K_2CO_3 na sobnoj temperaturi u trajanju 8-12 sati, dobiveni su isključivo *N*-1 supstituirani produkti u visokom iskorištenju (Shema 4).⁴²

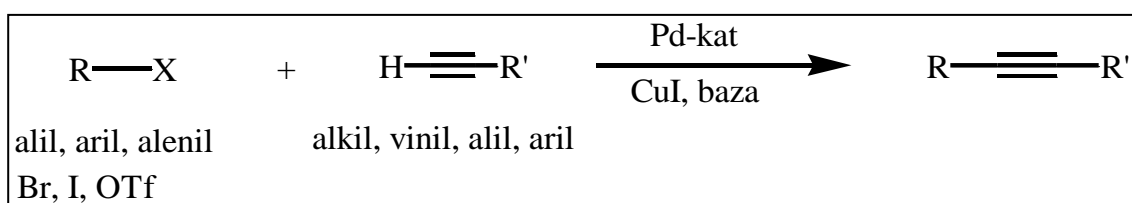


Shema 4. Reakcija 5-fluorcitozina sa različitim anilidima

2. OPĆI DIO

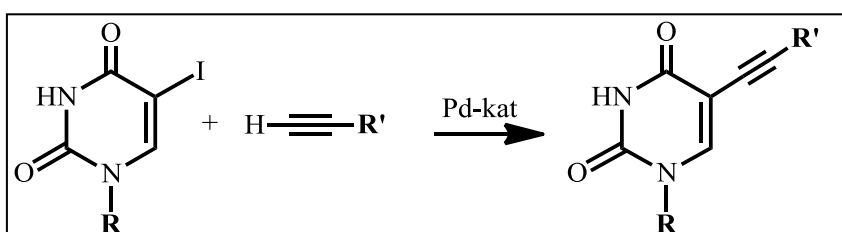
2.6. SONOGASHIRA-INA REAKCIJA

Sonogashira-ina reakcija je metoda za pripremu konjugiranih enina ili arilnih alkena 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 (Shema 5).



Shema 5. Sonogashira-ina reakcija

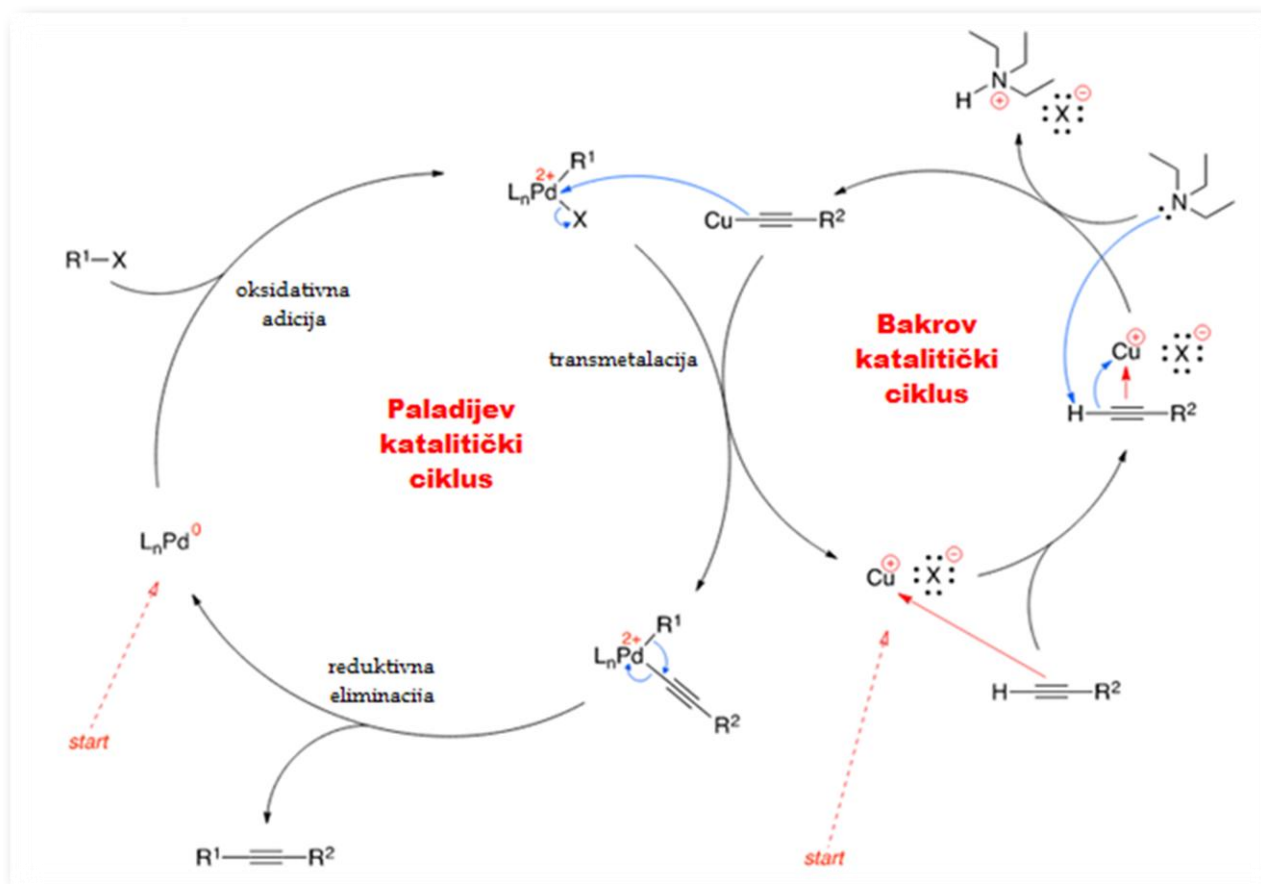
Istraživanjima sinteze antivirusnih lijekova iz reda pirimidinskih nukleozida, pokazano je da su derivati pirimidina, koji imaju vezan atom joda na C-5 atomu, dobri sintetski intermedijari za stvaranje nove C-C ili C-heteroatom veze, pri čemu se atom joda u položaju C-5 supstituira elektrofilom.^{43, 44, 45} Za uspješno povezivanje terminalnih alkena s 5-jodnukleozidima izuzetno je važan i odabir otapala, kao i omjer katalizatora te ko-katalizatora (Shema 6). Na primjer, omjer Cu : Pd = 2 : 1 pokazao se najboljim za povezivanje s alkinima jer je na taj način moguće izbjeći nastajanje sporednih produkata.⁴⁶



Shema 6. Sonogashira-ina reakcija 5-jodnukleozidnih derivata s terminalnim alkinima

2. OPĆI DIO

Zbog otežane izolacije i analize organometalnih spojeva koji nastaju kao intermedijeri, mehanizam Sonogashira-ine reakcije nije u potpunosti poznat, a predloženi mehanizam prikazan je na shemi 7.⁸



Shema 7. Mehanizam Sonogashira-ine reakcije

Arilni halid ulazi u paladijev katalitički krug oksidativnom adicijom pri čemu nastaje organometalni spoj kao produkt vezanja arila i halogenog elementa zasebno za atom paladija. Istovremeno u bakrovom katalitičkom krugu 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 s 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 krugu. U konačnom stupnju, reduktivnom eliminacijom nastaje produkt Sonogashira-ine reakcije stvaranjem veze između arila i alkina, uz regeneraciju paladijevog katalizatora u paladijevom katalitičkom krugu.

2. OPĆI DIO

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 konjugacija eninskih i arilnih alkina na sobnoj temperaturi.⁴⁵

2.7. 'KLIK' KEMIJA

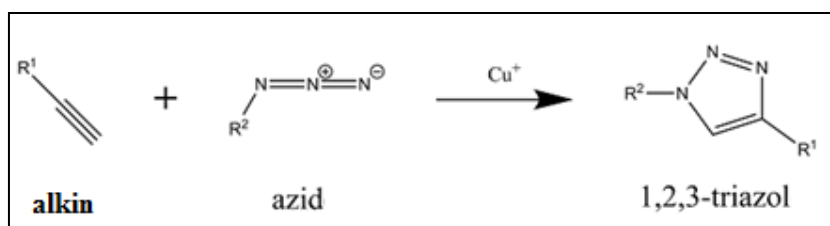
Pojam 'klik' kemija prvi put je sa svojim suradnicima uveo Sharpless 2001. godine.⁴⁷ 'Klik' kemija je opisana kao niz snažnih, visoko pouzdanih i selektivnih reakcija za brzu sintezu novih spojeva. Ona nije ograničena na specifični tip reakcije, ali se odvija po određenim zajedničkim sintetskim putevima koji obuhvaćaju niz reakcija, s različitim mehanizmima. 'Klik' reakcije pokreću se visokom termodinamičkom pokretačkom silom većom od 20 kcal mol⁻¹, koja se odnosi na stvaranje veze ugljik-heteroatom.⁴⁸

U 'klik' kemiji reakcije moraju biti modularne, širokog opsega, dati visoka iskorištenja s različitim početnim materijalima, a dobiveni produkt se mora jednostavno izolirati bez korištenja kromatografskih metoda. Navedeni zahtjevi uključuju i blage reakcijske uvjete bez osjetljivosti na vodu i kisik, lako dostupne materijale i reagense, korištenje zelenih otapala kao što je voda ili reakcije bez otapala.⁹

Prvi primjer 'klik' reakcije je bakrom katalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija azida i terminalnih alkina (CuAAC). Ta reakcija je regioselektivna jer nastaje samo 1,4-supstituirani produkt, neosjetljiva je na otapala i može se provoditi pri sobnoj temperaturi. Nadalje, omogućava visoka iskorištenja i brža je oko 10⁷ puta od nekatalizirane reakcije. Posljednjih nekoliko godina, primjena 'klik' kemije ima eksponencijalan rast te se koristi u istraživanju lijekova, novih materijala i u biotehnologiji.⁴⁸ Korištenjem rutenijevog kompleksa kao katalizatora, Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija postaje regioselektivna za 1,5-supstituirani produkt.⁴⁹

Upravo zbog uloge 1,2,3-triazola kao bioizostera amidne skupine i njihovog utjecaja na biološku aktivnost spojeva, Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija najraširenija je 'klik' reakcija pošto nastaju selektivno supstituirani 1,2,3-triazoli (Shema 8).⁴⁸

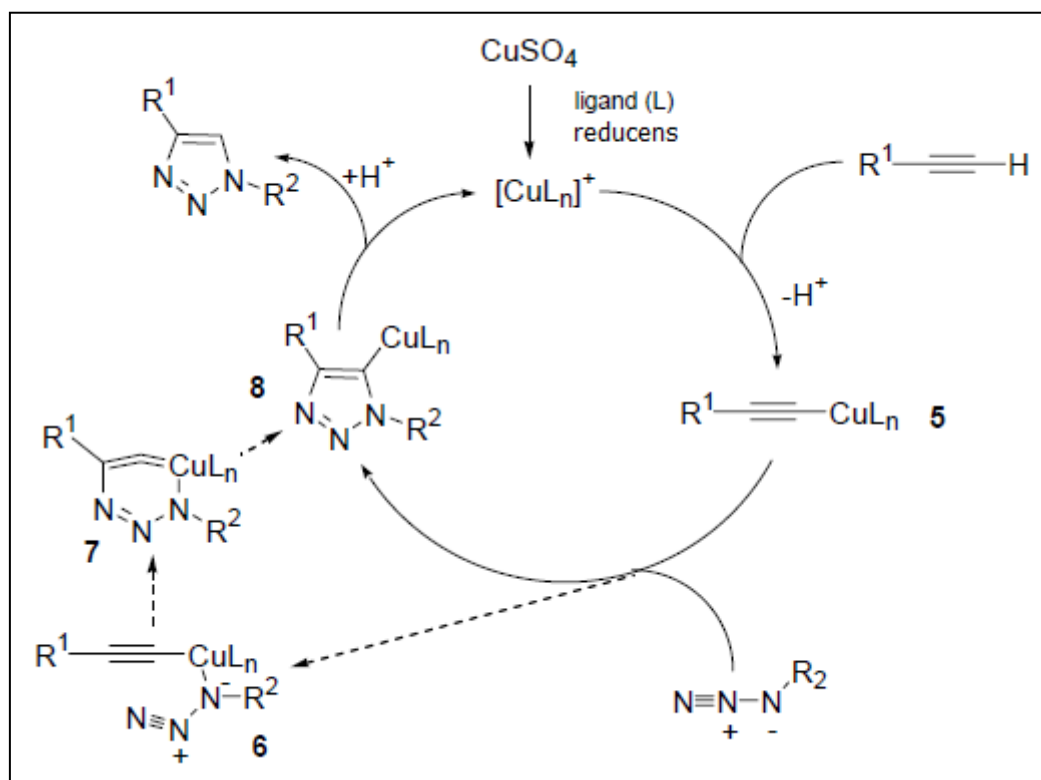
2. OPĆI DIO



Shema 8. Prikaz bakrom katalizirane Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije

Mehanizam Huisgenove 1,3-dipolarne ciklizacije katalizirane bakrom prikazan je na shemi 9. Smatra se da je početni korak reakcije nastajanje bakrovog(I) acetilida (**5**) iz Cu^{2+} vezanog za ligand i terminalnog alkina. Proračuni funkcijske teorije gustoće pokazuju da se preferirano odvija stupnjevita cikloadicija (**5** → **6** → **7** → **8**), a ne usklađena cikloadicija (**5** → **8**), što vodi do intrigantne šesteročlane metalocikličke strukture (**7**). Pregradnjom šesteročlanog prstena u peteročlani (**8**) te njegovim protoniranjem, dolazi do nastajanja konačnog 1,4-supstituiranog produkta s 91%-tnim iskorištenjem.⁵⁰

S obzirom na pouzdanost i općenitost bakrom katalizirane azid-alkin cikloadicije za dobivanje *N*-heterocikličkih farmakofora, reakcija se koristi u različitim aspektima otkrivanja lijekova.⁵⁰



Shema 9. Mehanizam Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije katalizirane bakrom

2. OPĆI DIO

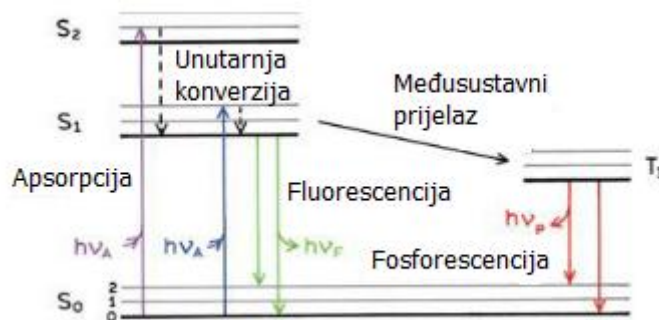
2.8. UV/VIS I FLUORESCENCIJSKA SPEKTROSKOPIJA

Tijekom proteklih 30 godina, značajno je poraslo korištenje fluorescencije u biološkim znanostima, posebno u biotehnologiji, protočnoj citometriji, medicinskoj dijagnostici, DNA sekvenciranju, forenzici te genetičkim analizama.

Luminiscencija je emisija svjetlosti iz neke tvari, a odvija se iz elektronskih pobuđenih stanja. Dijeli se na dvije kategorije: Fluorescencija i fosforescencija, ovisno o prirodi pobuđenog stanja. Elektron je u pobuđenom singletnom stanju suprotnog spina onome u osnovnom stanju te je proces njegovog povratka iz pobuđenog stanja dozvoljen, a tipično vrijeme trajanja fluorescencije je 10 ns. Povratkom elektrona iz pobuđenog stanja, emitira se foton, čija je energija jednaka razlici energija dvaju stanja. Ukoliko se elektron nalazi u tripletnom pobuđenom stanju, njegov spin ima jednaku orijentaciju kao i spin elektrona u osnovnom stanju, zbog čega je njegov povratak zabranjen. Kao posljedica toga, povratak elektrona u osnovno stanje i emisija fotona usporeni su (10^{-3} - 10^0 s) te se odvija fosforescencija.

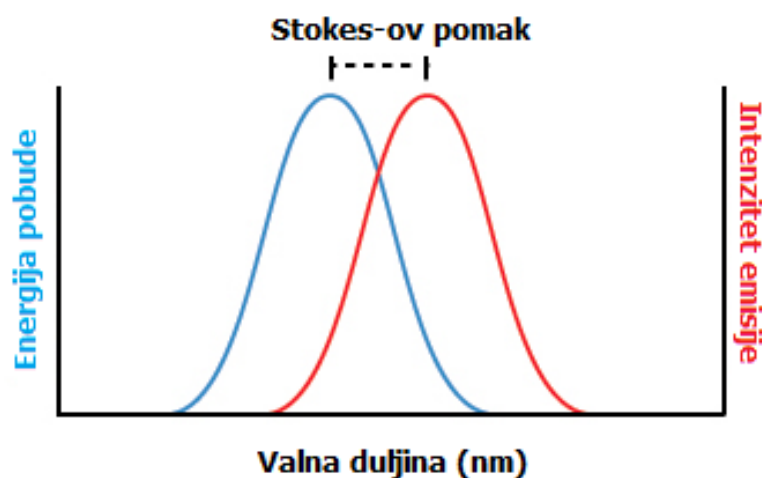
Fluorescencija se najčešće odvija iz aromatskih molekula jer su to konjugirani sustavi, čija stabilnost omogućuje pobudu elektrona sa niskim energijama UV ili vidljivog dijela spektra elektromagnetskog zračenja. Podatci dobiveni mjerenjima pomoću fluorescencijske spektroskopije prikazani su u obliku emisijskog spektra, tj. odnosa intenziteta fluorescencije te valne duljine (nm) ili valnog broja (cm^{-1}).

Procesi koji se odvijaju između apsorpcije i emisije svjetlosti obično se prikazuju Jablonski dijagramom (Slika 17). Na njemu su prikazana osnovna i pobuđena elektronska i vibracijska stanja te svi mogući procesi (vibracijska relaksacija, unutarsustavni prijelaz, unutarnja konverzija, emisija).



2. OPĆI DIO

Analizom Jablonski dijagrama, moguće je utvrditi da je energija emisije, odnosno fluorescencije niža od apsorbirane energije, te se ona odvija pri višim valnim duljinama. Prateći proces apsorpcije svjetla, uočava se 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. Pošto 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 18).⁵¹



Slika 18. Stokes-ov pomak

Apsorpcijom fotona u UV-VIS području (200nm-800nm) pobuđuju se specifični valentni elektroni u određenoj skupini, koja se naziva kromofor i odgovorna je za boju dotičnog spoja. 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.⁵²

Intenzitet apsorpcije proporcionalan je koncentraciji, c , i duljini puta, l , prema Bouguer-Lambert-Berr-ovom zakonu:⁵²

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

2. OPĆI DIO

2.9. VEZANJE MALIH MOLEKULA ZA MOLEKULU DNK

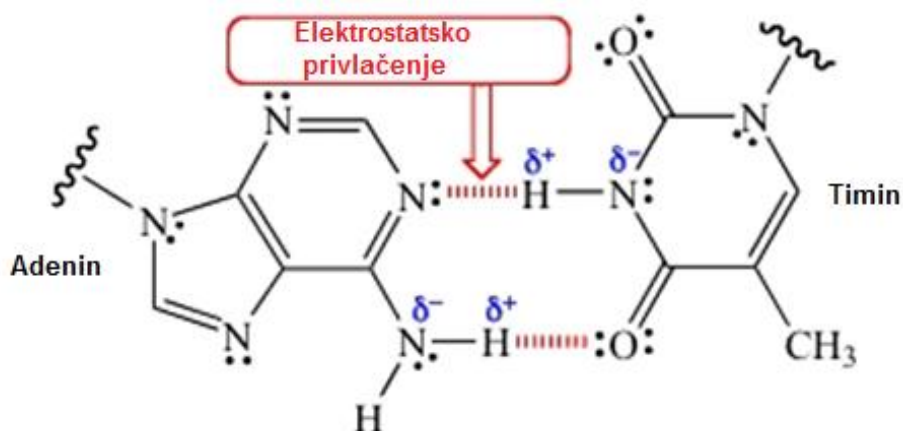
Sekvenca i struktura DNK usko je povezana s mnogim biološkim procesima - onima koji su neophodni za funkciju našeg organizma, kao i onima koji su štetni. Neke bolesti su povezane sa specifičnim poretkom parova baza ili njihovim neslaganjem, koje se ponekad dogodi tijekom replikacije DNK. Neusklađenosti unutar DNK mogu se smatrati obećavajućim metama za biomedicinsku dijagnostiku i terapiju - sa pažljivo dizajniranim malim molekulama kao aktivnim agensima.⁵³

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.⁵⁴

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.⁵²

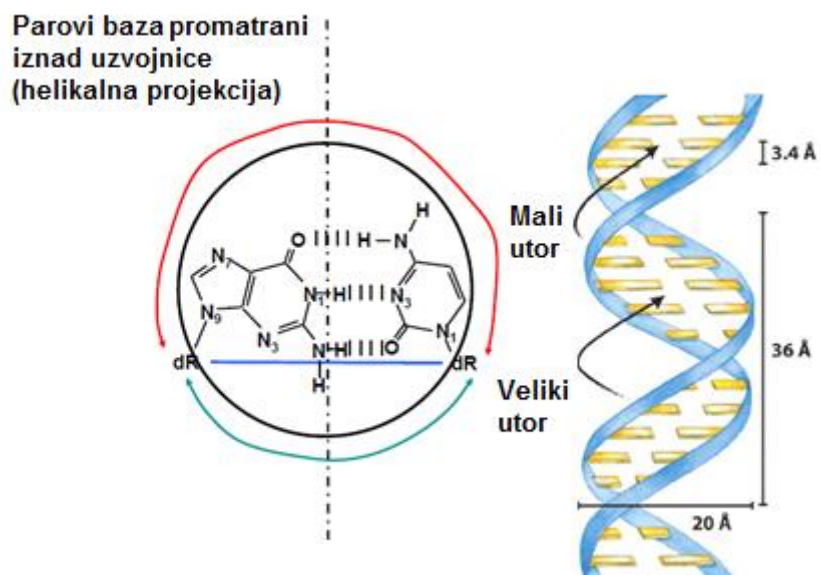
Osim toga, istraživanje interakcija malih molekula s DNK omogućava i razumijevanje toksičnosti lijekova i tvari koji sadrže metalne ione. Najčešće se za ispitivanje interakcija malih molekula s DNK koristi *ct*-DNK, a to je polimer slijeda fosfata s odgovarajućim šećerom te malom količinom proteina i 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,

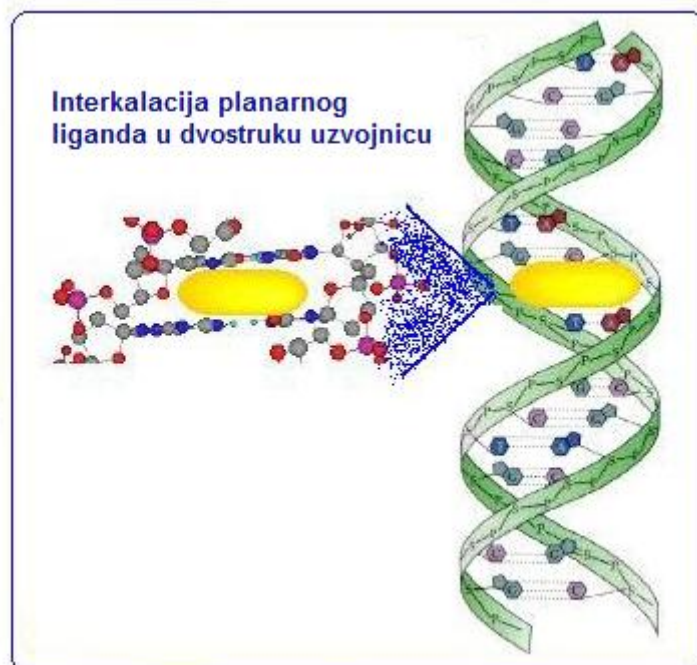


2. OPĆI DIO

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



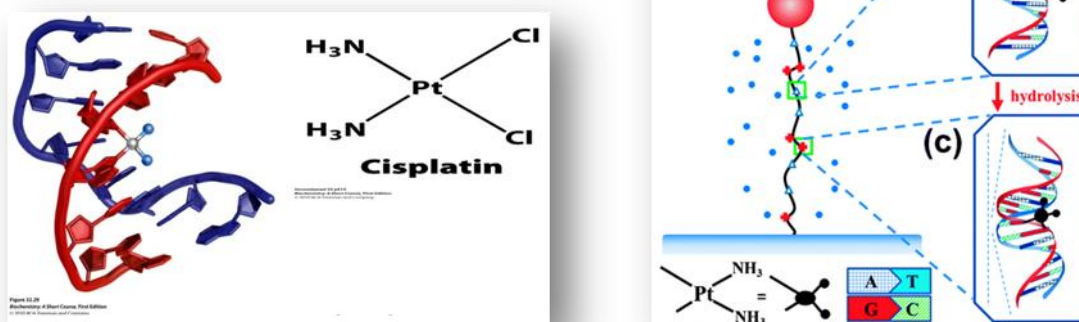
3) interkalacijsko vezivanje lijeka između parova baza.



2. OPĆI DIO

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 dinamička viskoznost.⁵⁵ 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.⁵⁴

Najpoznatija molekula koja se veže za DNK je *cis*-diamin-diklorplatina(II), jednostavni kvadratno-planarni kompleks koji je postao međunarodno poznat pod nazivom cisplatin (Slika 19). 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 19. Molekula cisplatina i njeno djelovanje vezivanjem za DNK

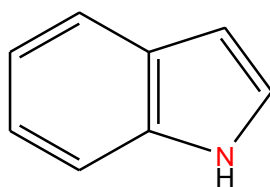
2. OPĆI DIO

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 pripremljeni 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.⁵³

Međutim, istraživanja su pokazala povezanost malih molekula koje imaju centar naboja s njihovim vezivanjem u mali utor DNK. To je uspješno dokazano vezivanjem molekule indola (Slika 20) 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 ($-OH$, $-NH_2$). Akseptori 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.⁵⁶



Slika 20. Struktura indola

2. OPĆI DIO

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*).⁵⁷

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.^{58, 59}

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.⁵⁸

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.⁶⁰

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

2. OPĆI DIO

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 $P_a + P_i \neq 1$.⁶⁰

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.⁶⁰

3. EKSPERIMENTALNI DIO

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 3 Å.

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.

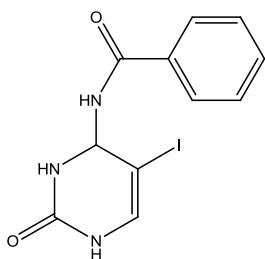
Spektri $^1\text{H-NMR}$ su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 MHz. Svi su uzorci otopljeni u DMSO- d_6 i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u $^1\text{H-NMR}$ spektrima izraženi su u jedinicama ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, $\delta=0,0$ ppm), a konstante 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.

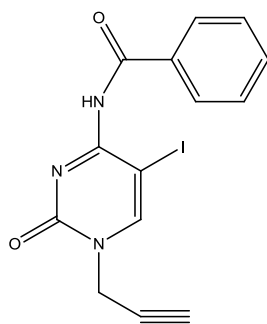
Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u Milestone Start S mikrovalnoj pećnici u kvarcnim posudama.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

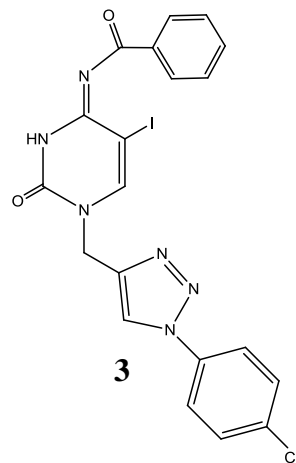
3.2. PREGLED SINTETIZIRANIH SPOJEVA



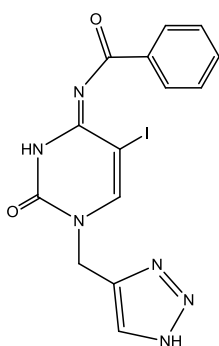
1



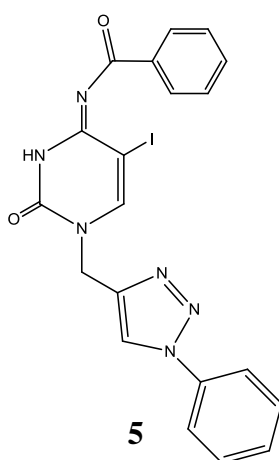
2



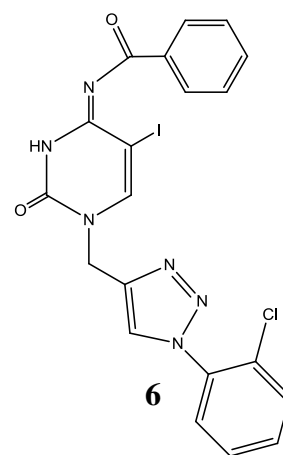
3



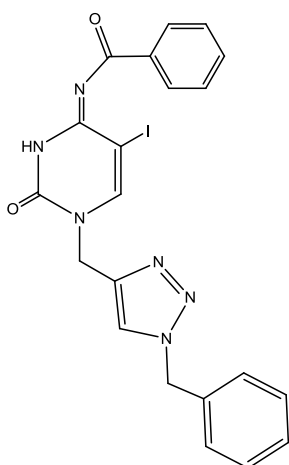
4



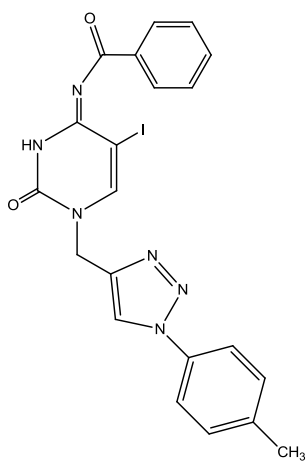
5



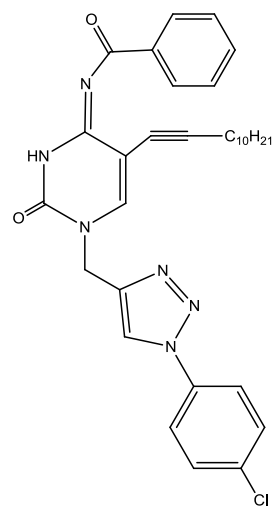
6



7

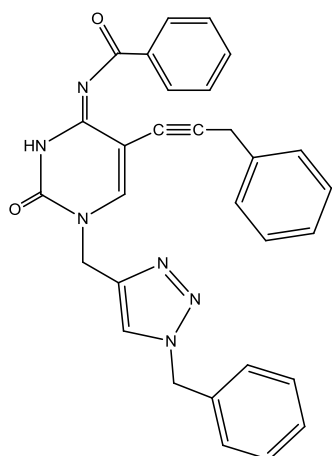


8

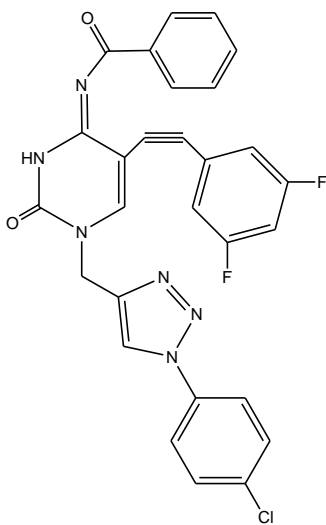


9

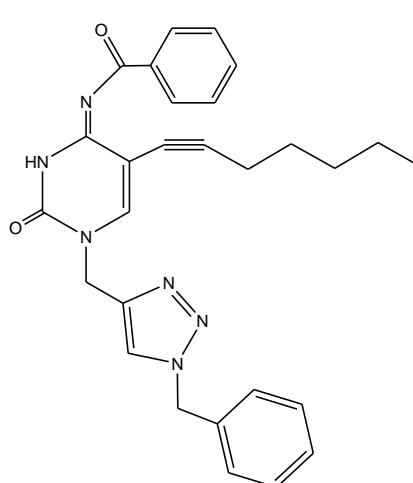
3. EKSPERIMENTALNI DIO



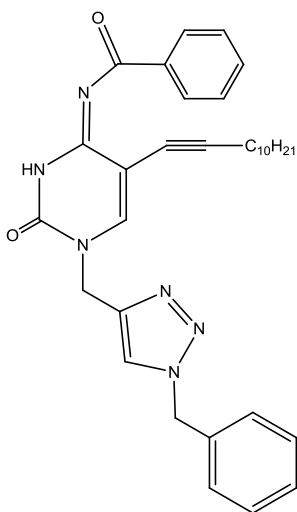
10



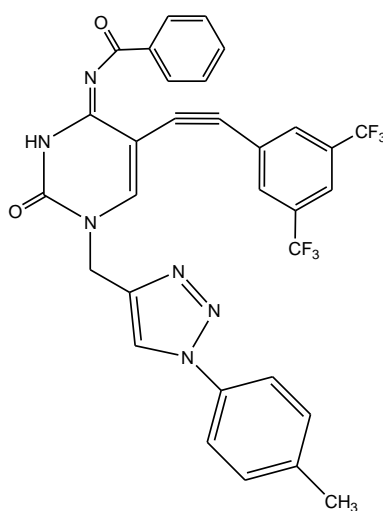
11



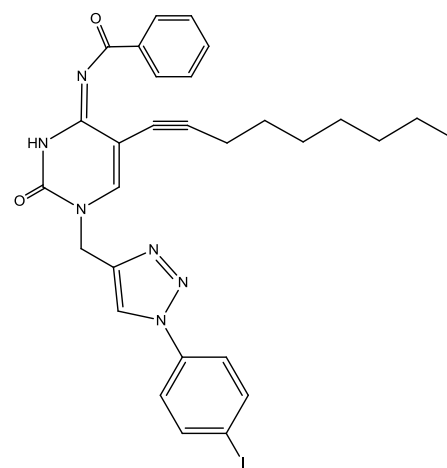
12



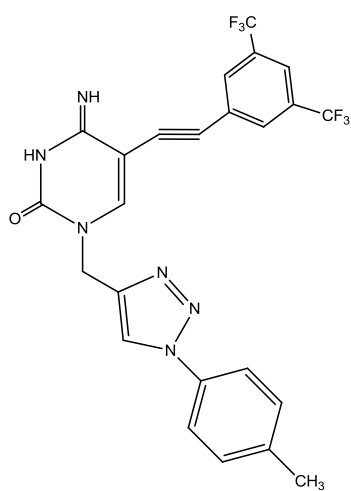
13



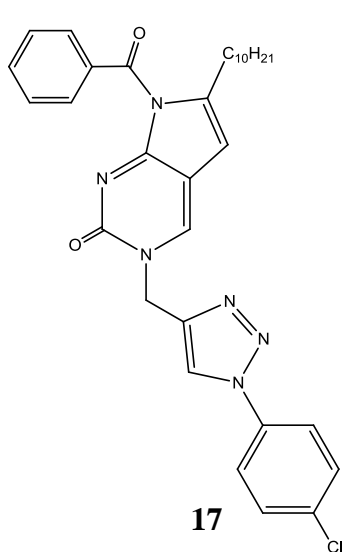
14



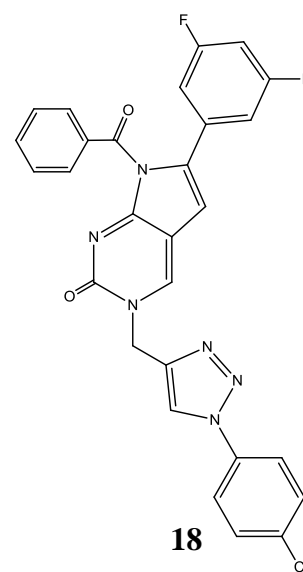
15



16

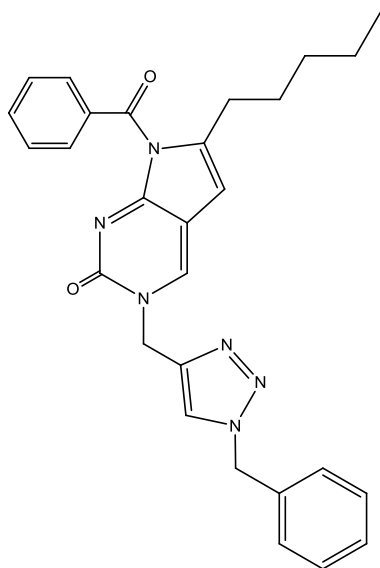


17

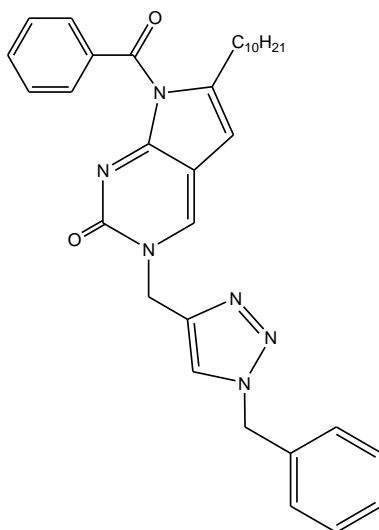


18

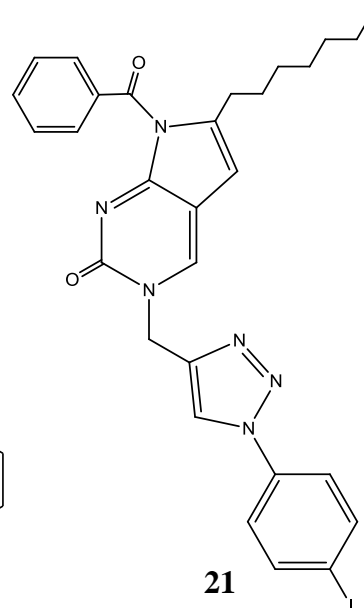
3. EKSPERIMENTALNI DIO



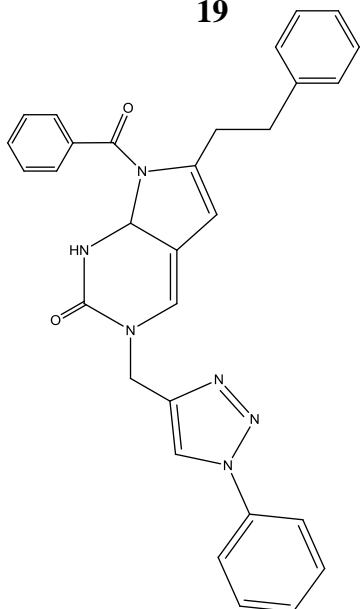
19



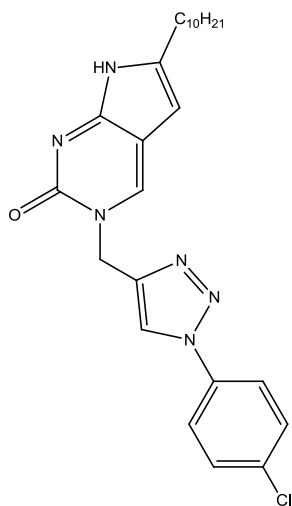
20



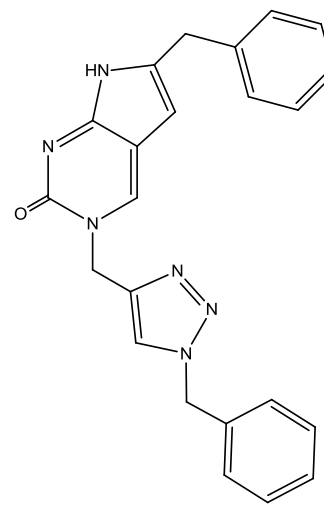
21



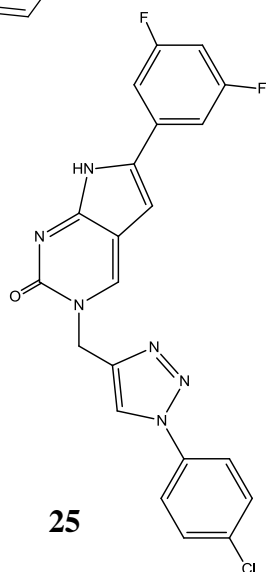
22



23



24



25

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.3. PRIPRAVA SPOJEVA

3.3.1. 4-*N*-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 (1,890 g; 15 mmol) i amonijev cerijev(IV)nitrat (CAN; 8,2233 g; 15 mmol). Reakcijska smjesa zagrijava se na temperaturi refluksa 2h, a tijekom 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** (1,4810 g; 31,27%; T_i= 106-108°C).

3.3.2. 4-*N*-benzoil-5-jod-1-*N*-(prop-2-inil)pirimidin-2-on (2)

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 **2** (197,1 mg; 73,34 %).

3.3.3. 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1-(4-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jodpirimidin-2-on (3)

Spoj **2** (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. Tijekom 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 **3** u obliku bijelih pahuljastih kristala (40,8 mg; 28,65%; T_i= 250-253°C).

3.3.4. 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jodpirimidin-2-on (4)

Spoj **2** (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. Tijekom reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom

3. EKSPERIMENTALNI DIO

(CH₂Cl₂/MeOH=120/1). U obliku bijelih pahuljastih kristala izoliran je spoj **4** (12,5 mg; 6,02 %; 197-200°C).

3.3.5. . 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jodpirimidin-2-on (**5**)

Spoj **2** (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 **5** u obliku bijelih pahuljastih kristala (39,9 mg; 16,90%; T_t = 217-218°C).

3.3.6. 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1-(2-klorfenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jodpirimidin-2-on (**6**)

Spoj **2** (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 **6** u obliku bijelih pahuljastih kristala (36,6 mg; 24,45 %; T_t = 217-220°C).

3.3.7. 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jodpirimidin-2-on (**7**)

Spoj **2** (314,6 mg; 0,830 mmol) je stavljen u kvarcnu kivetu i otopljen u DMF-u (10 ml) i smjesi *tert*-butanol : voda (1:1) (11,5 ml). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (1,3 ml) i bakar (52,3 mg; 0,823 mmol), te benzil-azid (2 ml; 0,991 mmol). Kvarcna kiveta je zatim stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C u trajanju od 45 min sa prethodnom minutom zagrijavanja te 5 minuta hlađenja na kraju. Nakon toga, reakcija je provedena preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa je

3. EKSPERIMENTALNI DIO

uparena te pročišćena kolonskom kromatografijom ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=200/1$). Spoj **7** izoliran je u obliku bijelih pahuljastih kristala (251,98 mg; 57,07%; $T_f = 197-200^\circ\text{C}$).

3.3.8. 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1-*p*-tolil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jodpirimidin-2-on (**8**)

Spoj **2** (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 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=200/1$). Spoj **8** izoliran je u obliku bijelih patuljastih kristala (19,1 mg; 6,56%; $T_f = 212-214^\circ\text{C}$).

3.3.9. 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1-(4-*klorfenil*)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-(dodec-1-*inil*)pirimidin-2-on (**9**), 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 (**17**) 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 (**23**)

Spoj **3** (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 bakrov(I)jodid (3,5 mg; 0,018 mmol), $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ (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 (CH_2Cl_2 , zatim $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=200/1$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=100/1$) pri čemu su izolirani spojevi **9** (5,2 mg; 9,92%; $T_f = 98-100^\circ\text{C}$), **17** (10,8 mg; 20,60%; $T_f = 241-244^\circ\text{C}$) i **23** (18,7 mg; 43,74%; $T_f = 232-234^\circ\text{C}$).

3.3.10. 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-(3-fenilprop-1-*inil*)pirimidin-2-on (**10**) i 6-benzil-3-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on (**24**)

Spoj **7** (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 bakrov(I)jodid (9,7 mg; 0,051 mmol), $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ (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 miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom

3. EKSPERIMENTALNI DIO

(CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=100/1, CH₂Cl₂/MeOH=70/1). Izolirani su spojevi **10** (19,8 mg; 15,40%; T_t = 241-244°C) i **24** (16,1 mg; 15,85 %; T_t > 260°C).

3.3.11. 4-N-benzoil-1-N-((1-(4-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-((3,5-difluorfenil)etinil)pirimidin-2-on (11), 7-benzoil-3-((1-(4-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6-(3,5-difluorfenil)-3H-pirololo[2,3-d]pirimidin-2(7H)-on (18) i 3-((1-(4-klorfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6-(3,5-difluorfenil)-3H-pirololo[2,3-d]pirimidin-2(7H)-on (25)

Spoj **3** (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 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 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=150/1, CH₂Cl₂/MeOH=100/1). Izolirani su spojevi **11** (7 mg; 5,41%; T_t = 228-230°C), **18** (13,3mg; 10,29%; T_t = 87°C) i **25** (16,7 mg; 15,42%; T_t > 260°C).

3.3.12. 4-N-benzoil-1-N-((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-(hept-1-inil)pirimidin-2-on (12) i 7-benzoil-3-((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6-pentil-3H-pirololo[2,3-d]pirimidin-2(7H)-on (19)

Spoj **7** (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 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 miješana na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek je praćen TLC-om. Zatim je reakcijska smjesa je zagrijavana na 80°C tijekom 5 sati i ponovno miješana 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). Izolirani su spojevi **12** (6,8 mg; 7,8%; T_t = 203-205°C) i **19** (16,6 mg; 17,29%; T_t = 200°C).

3.3.13. 4-N-benzoil-1-N-((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-(dodec-1-inil)pirimidin-2-on (13) i 7-benzoil-3-((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6-decil-3H-pirololo[2,3-d]pirimidin-2(7H)-on (20)

Spoj **7** (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 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

3. EKSPERIMENTALNI DIO

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 **13** (9,5 mg; 11,14%; T_t = 245-247°C), a spoj **20** dokazan je ¹H-NMR spektroskopijom, ali nije izoliran.

3.3.14. 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1-*p*-tolil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-(3,5-bis(trifluormetil)fenil)etinil)pirimidin-2-on (**14**) i

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 (**16**)

Spoj **8** (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 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 miješana na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek je praćen TLC-om. Reakcijska smjesa je potom uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, zatim CH₂Cl₂/MeOH=400/1, CH₂Cl₂/MeOH=100/1). Izolirani su spojevi **14** (7,8 mg; 63,69 %; T_t = 227-230°C) i **16** (8,4 mg; 81,22 %; T_t = 192-195°C).

3.3.15. 4-*N*-benzoil-1-*N*-((1-(4-jodfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5--(non-1-inil)pirimidin-2-on (**15**) 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 (**21**)

IFTC (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 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 miješana na sobnoj temperaturi uz struju argona preko noći, a tijek 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 **15** (7,3 mg; 4,62 %; T_t = 85-87°C) i **21** (16,8 mg; 10,64 %; T_t = 223-230°C).

3.3.16. 7-benzoil-6-fenil-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 (**22**)

Spoj **5** (20,1 mg; 0,041 mmol) otopljen je u DMF-u (10 ml). Zatim mu je dodan 1-butinifenil (0,01 ml; 0,061 mmol) te 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 miješana na sobnoj temperaturi uz

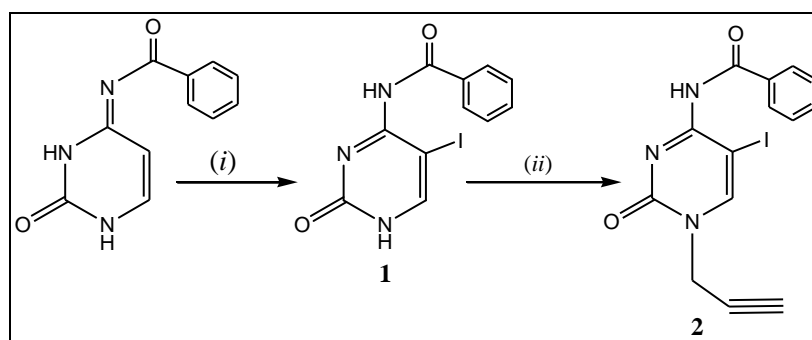
3. EKSPERIMENTALNI DIO

struju argona preko noći, a tijekom je praćen TLC-om. Zatim je reakcijska smjesa uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 , zatim $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=150:1$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=100:1$). Izoliran je spoj **22** (9,2 mg; 44,95 %; $T_t = 230-234^\circ\text{C}$).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. SINTEZE SPOJEVA

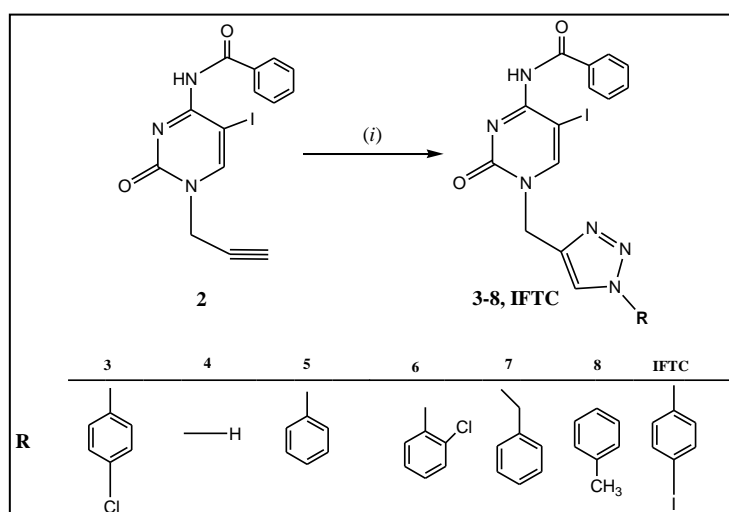
Reakcijom jodiranja *N*-4-benzoilcitozina s I₂ uz cerijev(IV)amonijev nitrat (CAN) u acetonitrilu (AcN) pripremljen je ključni prekursor *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**). Zatim je reakcijom *N*-alkiliranja *N*-4-benzoil-5-jodcitozina (**1**) uz NaH (1,2 mol) kao deprotonirajuće sredstvo te propargil-bromid (1,2 mol) u DMF-u pripremljen *N*-1 propargilirani derivat 5-jodcitozina (**2**), polazni spoj za 'klik' reakcije potpomognute mikrovalovima (Shema 1).



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

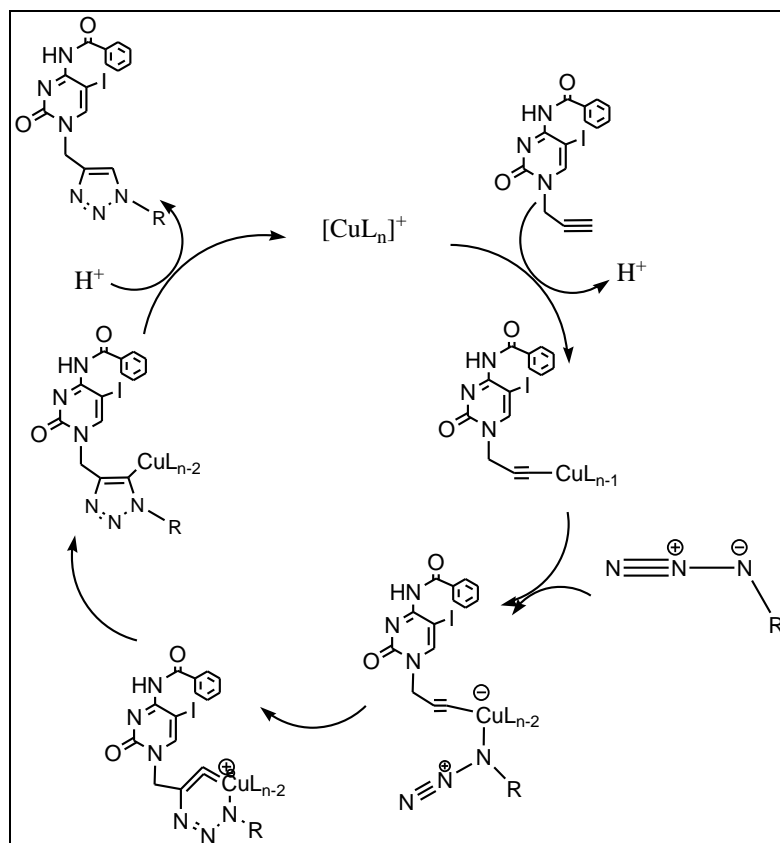
(ii) NaH/ Br-CH₂-C≡CH/DMF/24 h sobna temp.

N-1-triazolilni derivati (**3-8**) su dobiveni 'klik' reakcijom, tj. Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom, potpomognutom mikrovalnim zračenjem, propargiliranog citozinskog derivata (**2**) i odgovarajućih azida s bakrom kao katalizatorom, pri čemu su pripremljeni 1,4-disupstituirani regioizomeri 1,2,3-triazola (Shema 2).



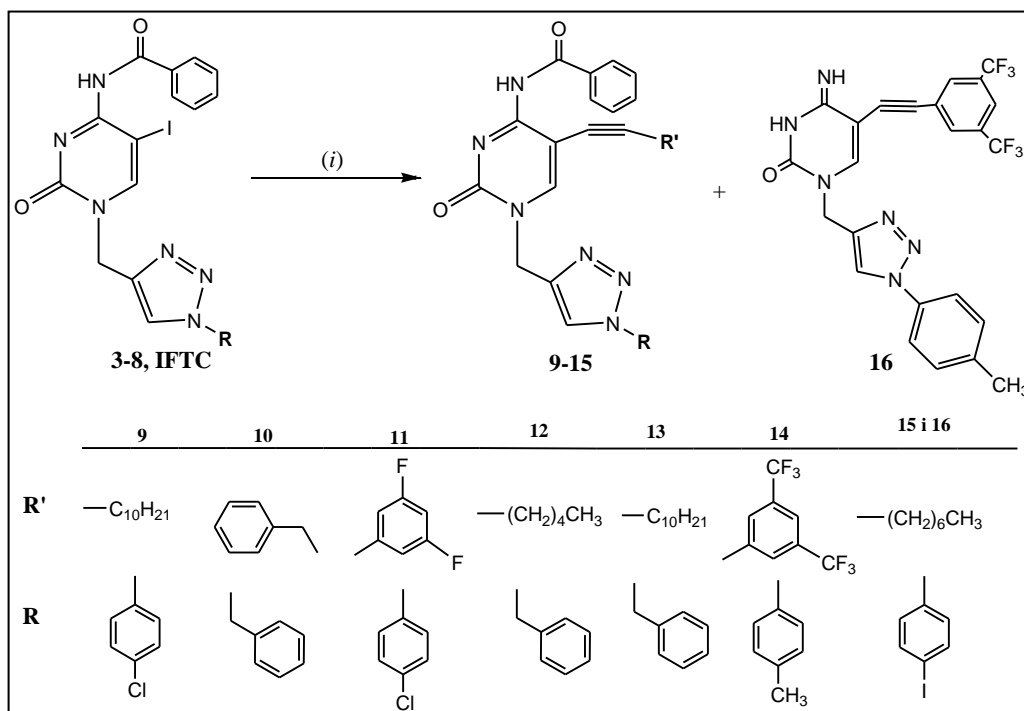
Shema 2: Reagensi i uvjeti: (i) azid/CuSO₄/ H₂O: *tert*-BuOH=1:1/DMF/Cu/45 min 80°C u mikrovalnom reaktoru

Mehanizam Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije prikazan na shemi 3 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.

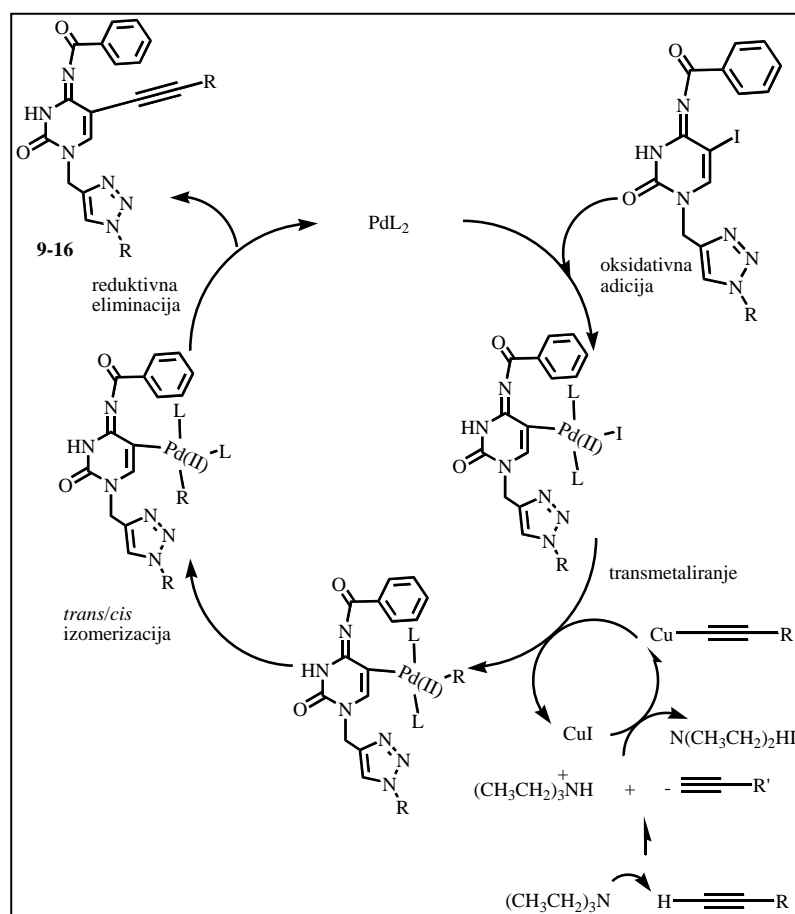


Shema 3: Mehanizam bakrom katalizirane azid-alkin Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije

Sonogashira-inom reakcijom derivata *N*-4-benzoil-5-jod-*N*-1-metiltriazolilcitozina (**3-8**, **IFTC**) (1 mol) s alifatskim i aromatskim terminalnim alkinima uz katalitičku količinu tetrakstrifenilfosfin paladija ($(PPh_3)_4Pd$, 0,1 mol), CuI (0,2 mol) i trietilamina (2 mol) u DMF-u sintetizirani su C-5-supstituirani derivati *N*-4-benzoil-*N*-1-metiltriazolilcitozina (**9-15**) (Shema 4). Derivat *N*-1-metiltriazolilcitozina (**16**) bez benzoilne zaštitne skupine na položaju *N*-4 u toj je reakciji dobiven kao nusprodukt. Mehanizam reakcije prikazan je na shemi 5.

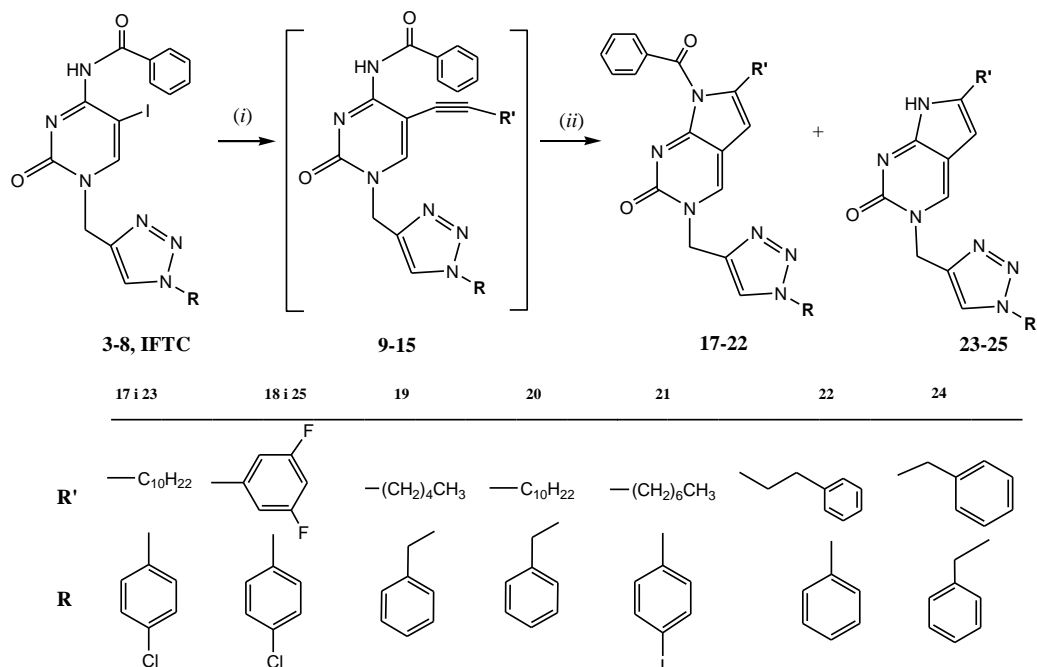


Shema 4. Reagens i uvjeti: (i) terminalni alkin/ CuI/ $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ / Et_3N /DMF/ 24 h/ sobna t.



Shema 5. Mehanizam nastajanja C-5 supstituiranih citozinskih derivata (9-16) Sonogashira-inom reakcijom.

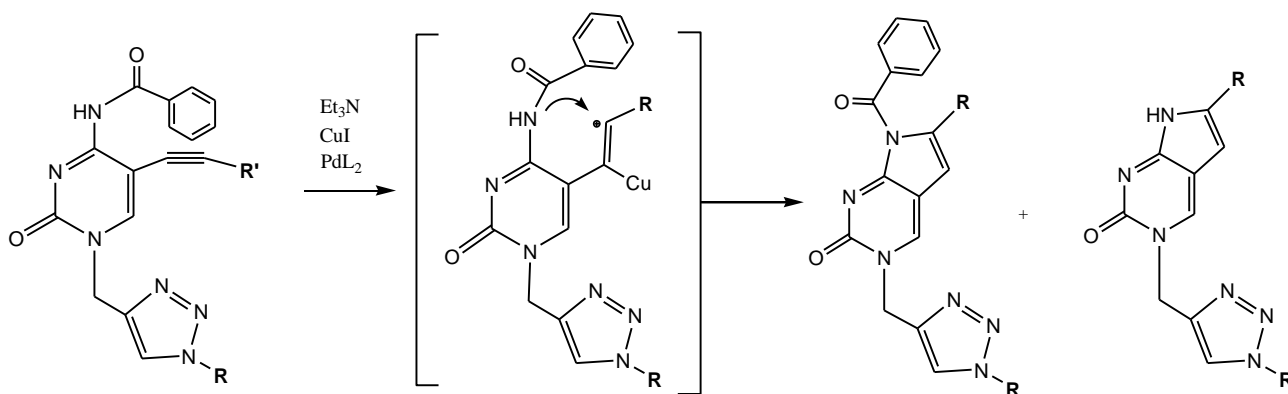
Derivati 6-alkil(aril)pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2-ona (**17-25**) sintetizirani su *5-endo-dig* elektrofilnom ciklizacijom (*N*-heteroanulacijom) C-5 alkinilnih derivata citozina (**9-15**), uz dodatak trietilamina i bakrovog(I)jodida (Shema 6.)



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

Ovi su biciklički pirolopirimidinski analozi sintetizirani, odnosno različitih alkinilnih derivata kataliziranom bakrovim(I)jodidom i trietilaminom 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 i *in situ*, ili pak izoliranjem supstituiranih 5-alkinilcitozina.

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 7, reakcija se odvija aktiviranjem 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.

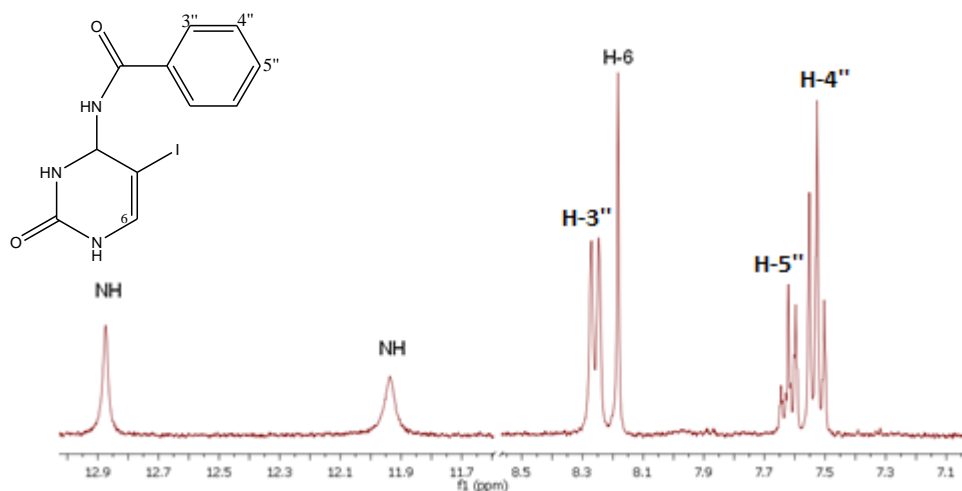


Shema 7: Mehanizam nastajanja pirolo[2,3-*d*]pirimidina (**17-25**) 5-*endo-dig* ciklizacijom C-5 supstituiranih citozinskih derivata.

4.2. Strukturna karakterizacija novopripravljenih spojeva ^1H NMR spektroskopijom

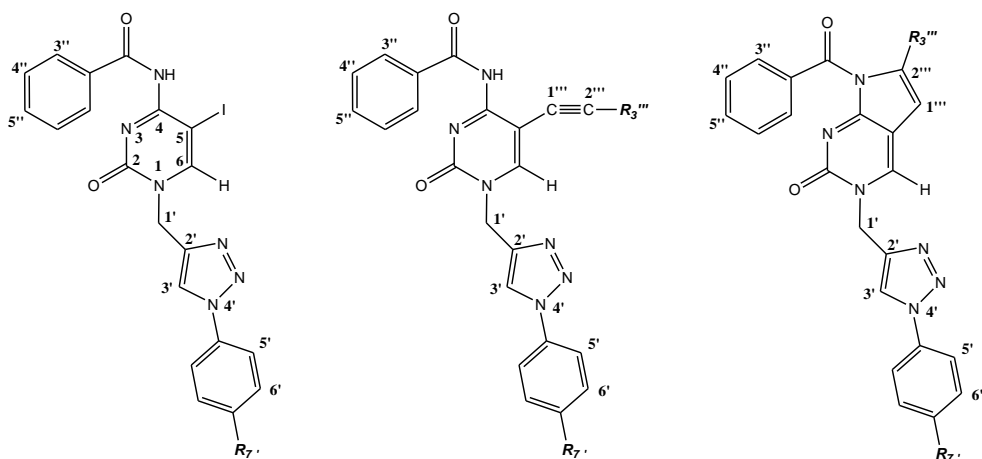
4.2.1. Analiza spektara ^1H NMR C-5 supstituiranih, N-1 i C-5 disupstituiranih citozinskih derivata i C-6 i N-1 supstituiranih derivata 7-deazapurina

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



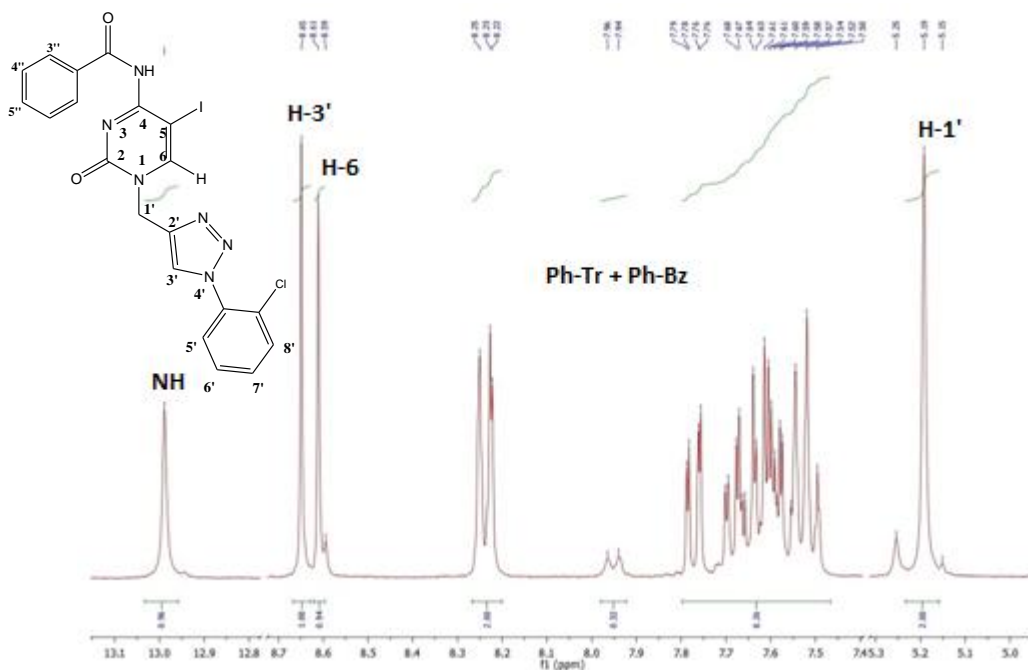
Slika 1. ^1H NMR spektar *N*-4-benzoil-5-jodcitozina (**1**)

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

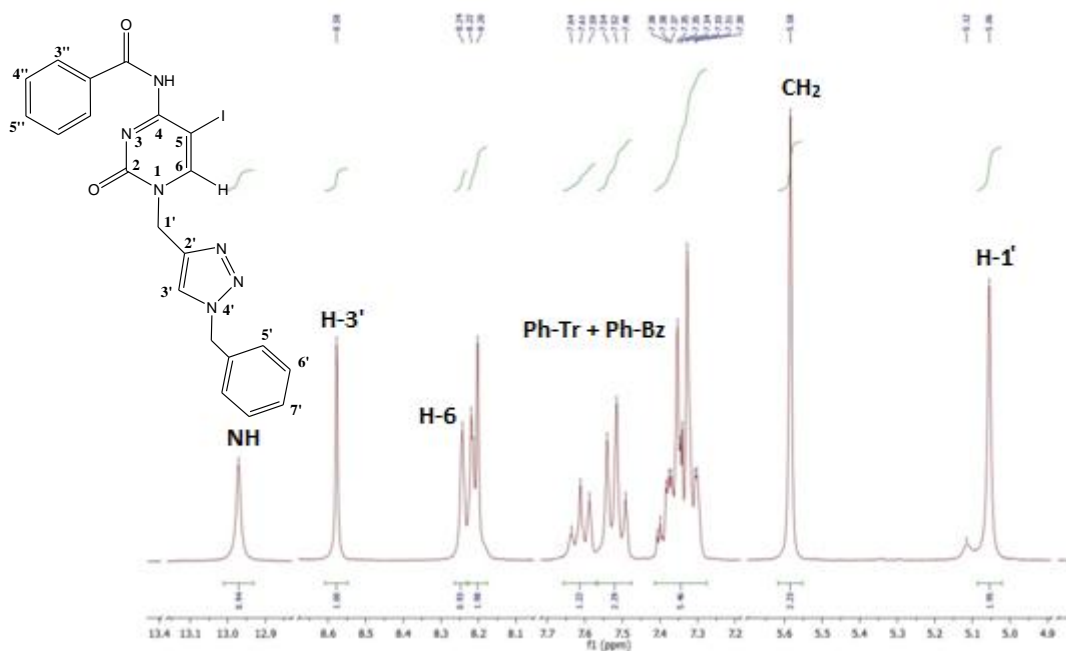


Slika 2. Prikaz općih struktura *N*-1 triazolilnih i *N*-3 triazolilnih, C-5 alkinilnih *N*⁴-benzoilcitozinskih derivata te *N*-3 triazolilnih pirolo[2,3-*d*]pirimidinskih derivata

U ¹H NMR spektrima spojeva **3-8**, pored signala pirimidinskog prstena prisutni su signali za proton triazolnog prstena na ~8 ppm (H-3'), signali za fenilne protone vezane za položaj 4 triazola (dubleti na 8,23 - 7,99 ppm intenziteta 4H) i signal za metilenske protone H-1' ~ 5,1 ppm (slike 3 i 4). Signali za fenilne protone benzoilne skupine intenziteta 5H prisutni su na 7,3 - 7,99 ppm.



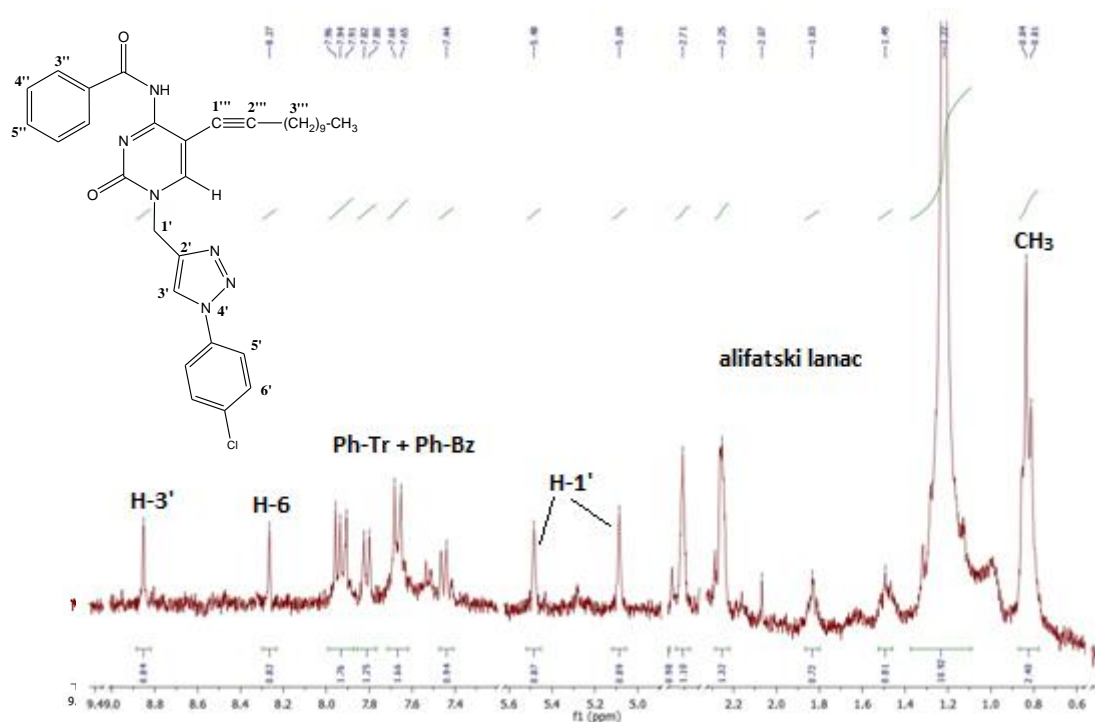
Slika 3. ¹H NMR spektar spoja **6**



Slika 4. ¹H NMR spektra spoja **7**

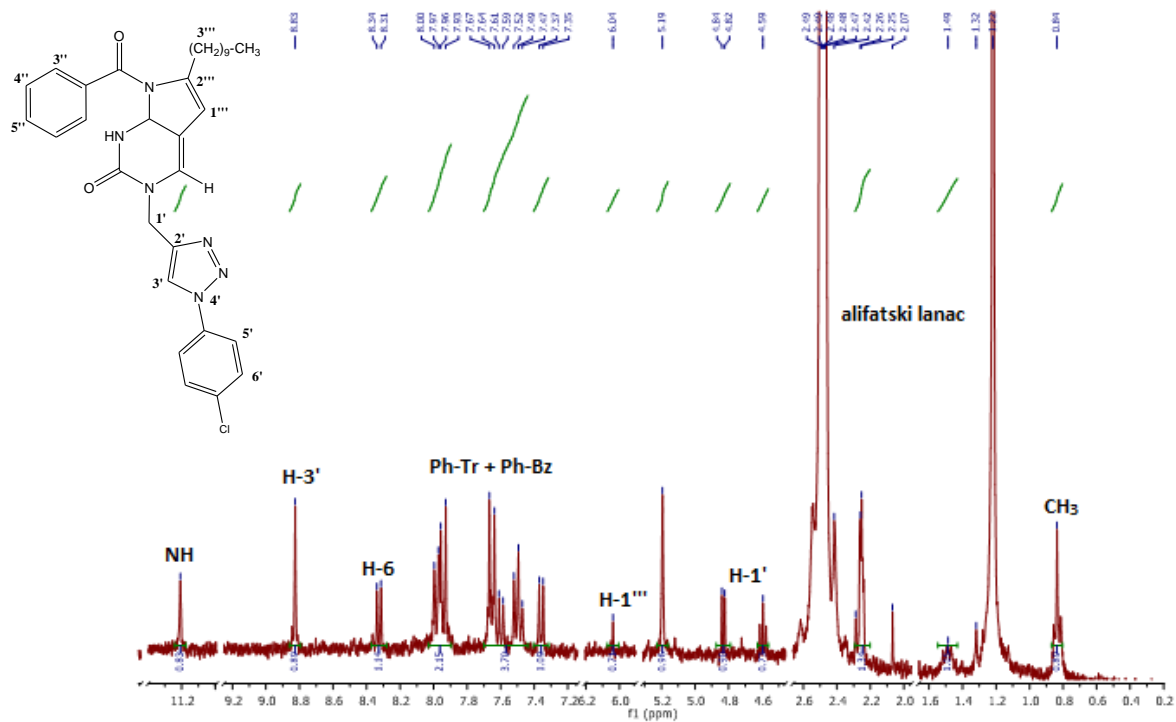
Protoni metilenske skupine vezane na položaj 4 triazola spoja **7** (slika 4) prisutni su kao singlet intenziteta 2H na 5,58 ppm.

Iz ¹H NMR spektra spoja **9** vidljivo je da je Sonogashira-inom reakcijom uveden alkinilni supstituent u položaj C-5 uz prisustvo novih signala u alifatskom području (slika 5) u usporedbi sa spektrima spojeva **6** i **7**.

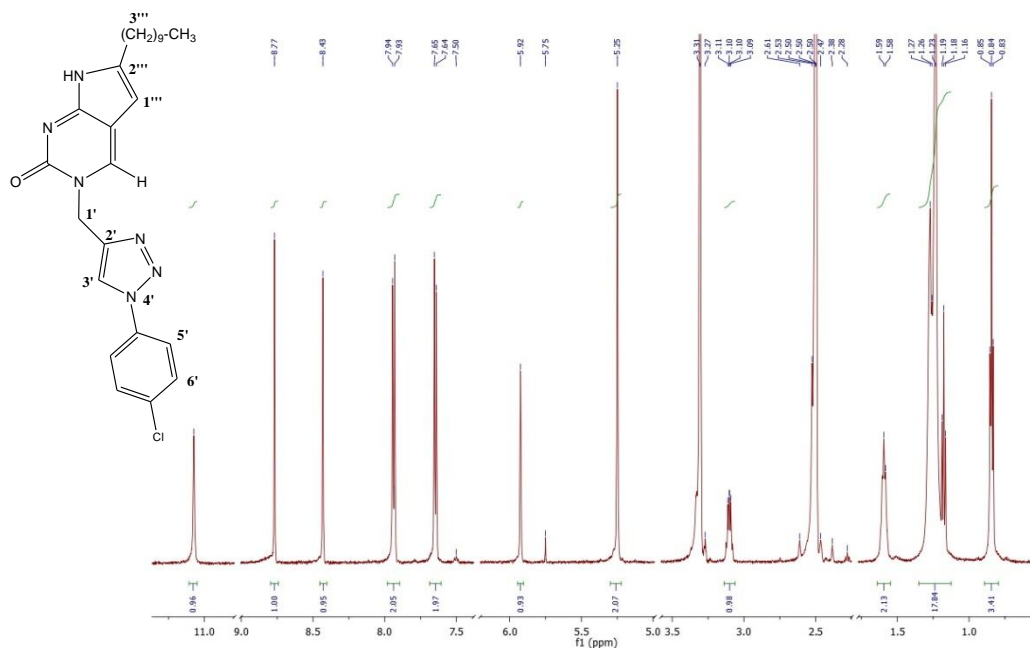


Slika 5. ^1H NMR spektar spoja **9**

Analizom spektara ^1H NMR na temelju kemijskih pomaka, veličine signala i multipliciteta sprega spin-spin između jezgara H i H potvrđena je ciklizacija spoja **9** u pirolo[2,3-*d*]pirimidinski derivat (**17**). Spektar ^1H NMR pokazuje 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 6).



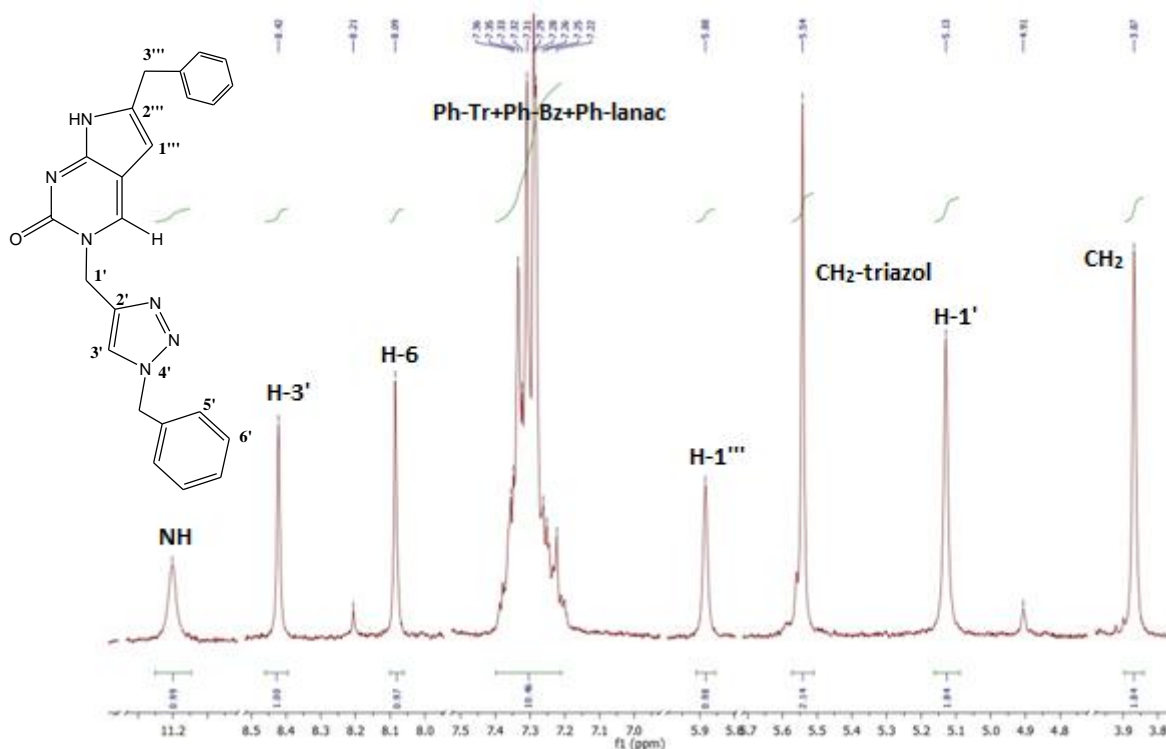
Slika 6. ¹H NMR spektar spoja **17**



Slika 7. ¹H NMR spektar spoja **23**

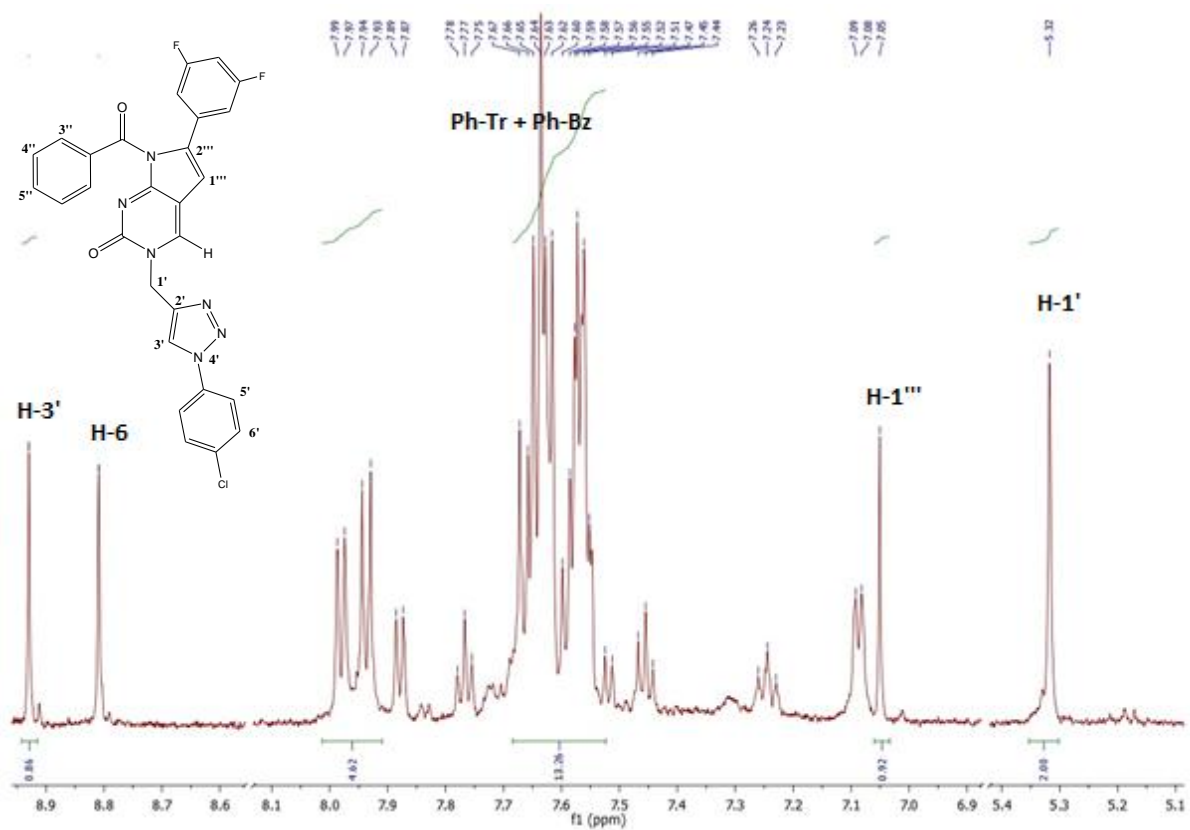
U ¹H NMR spoja **23** prisutni su svi signali kao i kod spoja **17**, osim signala protona benzoilne skupine (7,35-7,99 ppm), što je dokaz da je benzoilna skupina uklonjena (Slika 7).

U ^1H NMR spektru spoja **24** 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 zaštitne skupine (Slika 8).

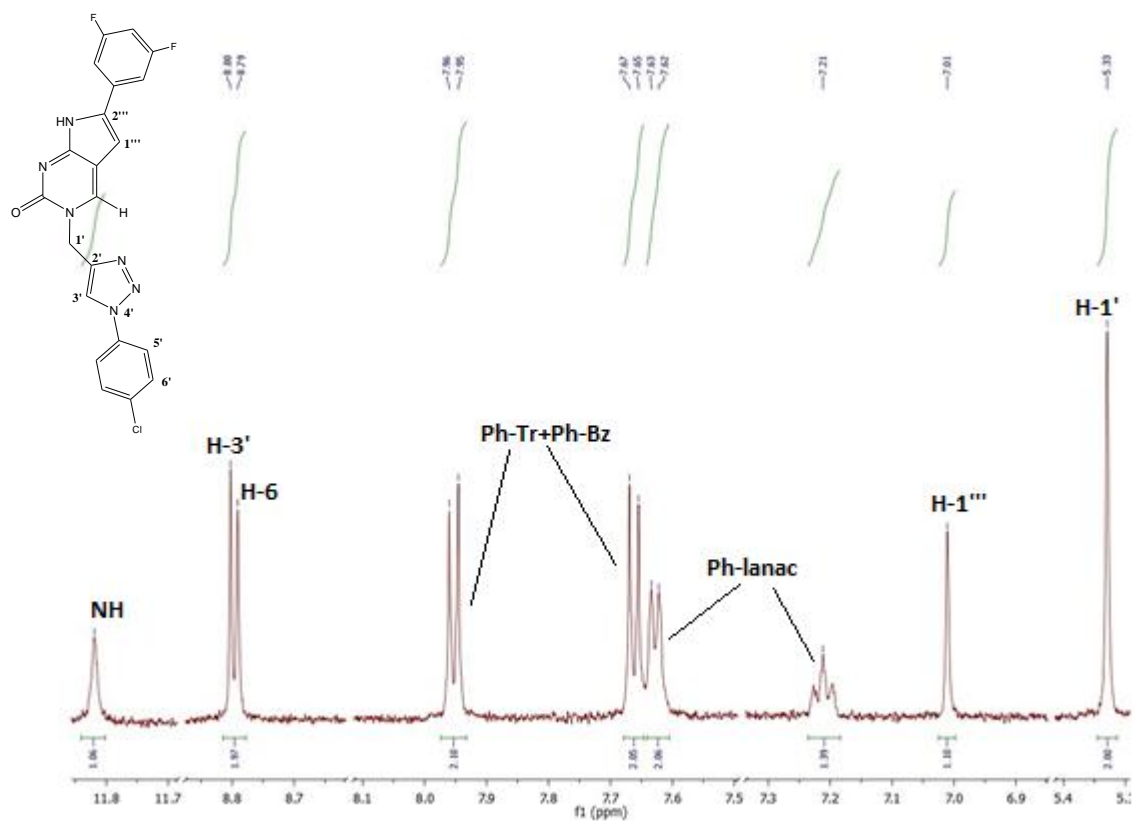


Slika 8. ^1H NMR spektar spoja **24**

Na slikama 9 i 10 prikazani su ^1H NMR spektri spojeva **18** i **25** u kojima je prisutan karakteristični signal intenziteta 1H pirolnog protona (H-1''') na 7,05 ili 7,11 ppm-a i ukazuje na nastajanje pirolo[2,3-*d*]pirimidinskih derivata. Spektri sadrže sve karakteristične signale za arilni supstituent u položaju C-2'', dok se u spektru spoja **18** može uočiti izostanak signala za fenilne protone benzoilne skupine (Slike 9 i 10).




Slika 9. ^1H NMR spektar spoja **18**



Slika 10. ^1H NMR spektar spoja **25**

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

	NH-1 /NH-3	H-6	H-1'	H-3'	H-3''-H5''(Ph,Bz)	H-5', H-6'(Ph, Tr)
 N-BzCit^a	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)
2	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, $J=7,2$)	/
3	12,99 (s, 1H)	8,85 (s, 1H)	5,16 (s, 2H)	8,61 (s, 1H)	7,52 (2H, t,) 7,62 (1H, t,) 8,20 (2H, s)	7,67 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz)
4^b	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)	/
5	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)	
6	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)	
7^c	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)	
8	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)	

^a 5,58 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-5)

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

^c 5,58 (2H, s, CH₂-4')

Tablica 2. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J /Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **9-16**.

	NH-1 /NH-3	H-6	H-1'	H-3'	H-5', H-6'(Ph, Tr)	H-3''- H5''(Ph,Bz)	CH ₃	CH ₂ -3'''- 11'''
9	/	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)
10^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)		/	/
11	11,19 (s, 1H)	8,82 (s, 1H)	5,20 (s, 1H)	8,33 (d, 1H, $J = 12,8$ Hz)	7,36 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz) 7,51 (m, 2H) 7,60 (m, 2H) 7,66 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz) 7,95 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz) 7,99 (m, 2H)		/	/
12^b	11,15 (s, 1H)	8,14 (s, 1H)	5,08 (s, 2H)	8,27 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz)	7,31 (m, 3H) 7,36 (m, 2H) 7,50 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz) 7,61 (t, 1H, $J = 7,0$ Hz) 7,98 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz)		0,85 (m, 3H)	1,23 (2H,s) 2,38 (2H,m) 2,45 (2H,m) 2,60 (2H,m)
13	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)
14	11,18 (s, 1H)	8,73 (s, 1H)	5,19 (s, 2H)	8,32 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz)	7,37 (m, 4H) 7,50 (m, 2H) 7,61 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz) 7,77 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz) 7,99 (d, 2H, $J = 7,7$ Hz)		0,84 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz)	/
15	/	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)
16	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 5,58 (2H, s, CH₂-4'); Signali H-atoma iz alkinilnog lanca nalaze se unutar signala fenilnih triazolinskih i benzoilnih protona.

^b 5,57 (2H, s, CH₂-4')

Tablica 3. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J /Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **17-25**.

	NH-1 /NH-3	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'''
17	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)
18	/	8,81 (s, 1H)	5,32 (s, 1H)	8,93 (s, 1H)	7,05 (s, 1H)	7,43-7,99 (m, 13H)		/	/
19^a	/	8,06 (s, 1H)	5,13 (s, 2H)	7,92 (s, 2H)	5,81 (s, 1H)	7,24-7,64 (m, 10H)		/	/
20^b	11,02 (s, 1H)	8,36 (s, 1H)	5,12 (s, 2H)	8,07 (s, 1H)	5,88 (s, 1H)	7,29-7,36 (m, 10H)		0,84 (dt, 3H, $J=11,2$; 5,6 Hz)	1,24 (s,12H) 1,50 (s,2H) 2,27 (m,2H) 2,60 (m,2H)
21	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)
22^c	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)
23	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)
24^d	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)
25	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 5,55 (2H, s, CH₂-4')

^b 5,54 (2H, s, CH₂-4')

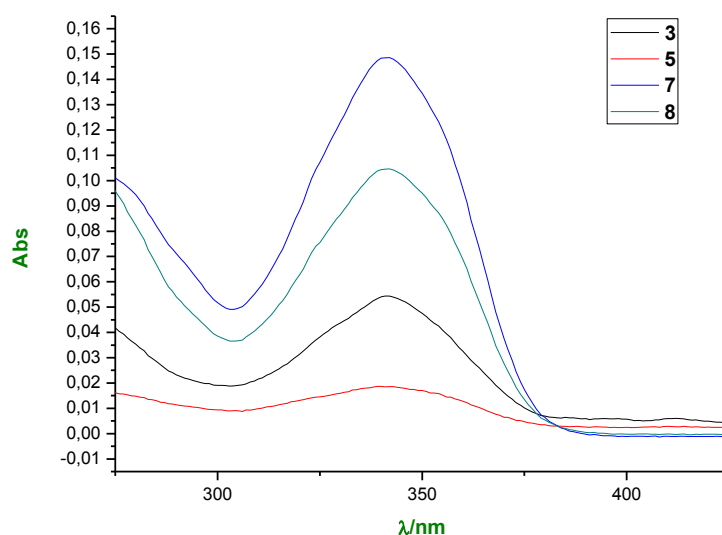
^c Signali H-atoma iz alkinilnog lanca nalaze se unutar signala od fenilnih triazolinskih i benzoilnih protona.

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

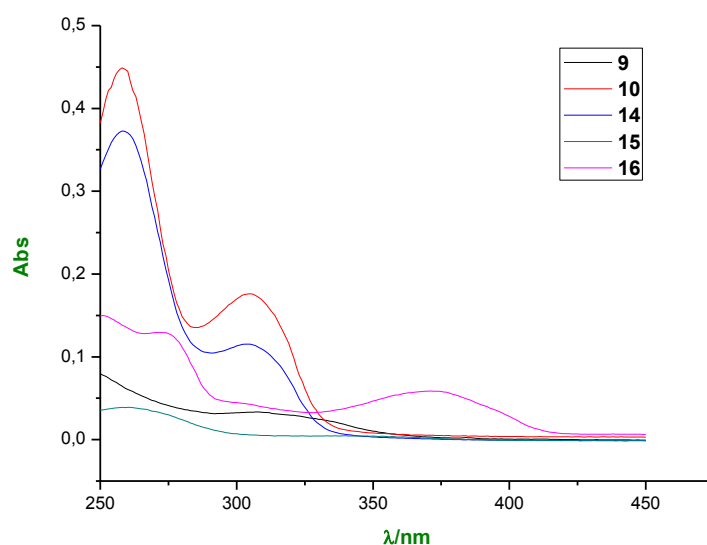
5,54 (2H, s, CH₂-4')

4.3. Spektroskopska karakterizacija spojeva UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom

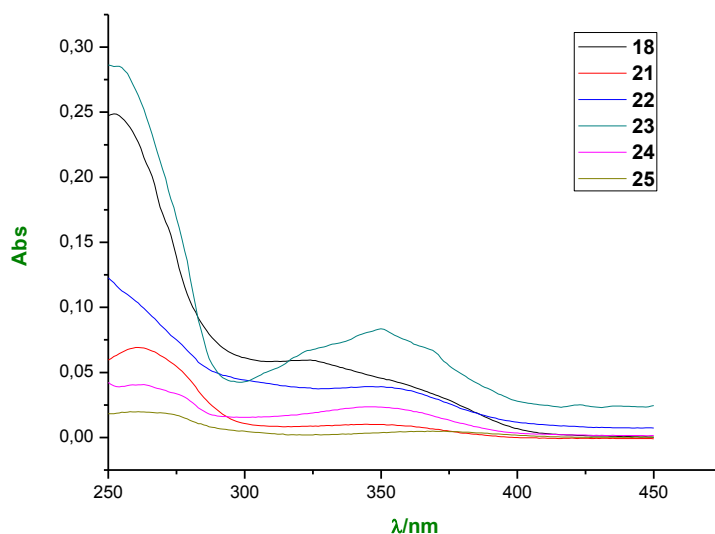
Derivati citozina s 1,2,3-triazolnim supstituentima u položaju *N*-1 (**3**, **5**, **7-10** i **14-16**) te pirolo[2,3-*d*]pirimidinski derivati citozina (**18**, **21-25**) su okarakterizirani UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom, te su im određeni maksimumi apsorbancije, molarni ekstinkcijski koeficijenti, valne duljine emisije i Stokes-ovi 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 (Slike 11-13). Spojevi **10** i **14** pokazuju najviše apsorpcijske maksimume na 258 i 305 nm dok ostali spojevi pokazuju batokromni pomak apsorpcijskih maksimuma u području 340-370 nm. Triazolilni derivati citozina **3**, **5**, **7** i **8** imaju očekivano najniže vrijednosti apsorbancije.



Slika 11. UV/Vis spektri triazolilnih derivata citozina **3**, **5**, **7** i **8** ($c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$)



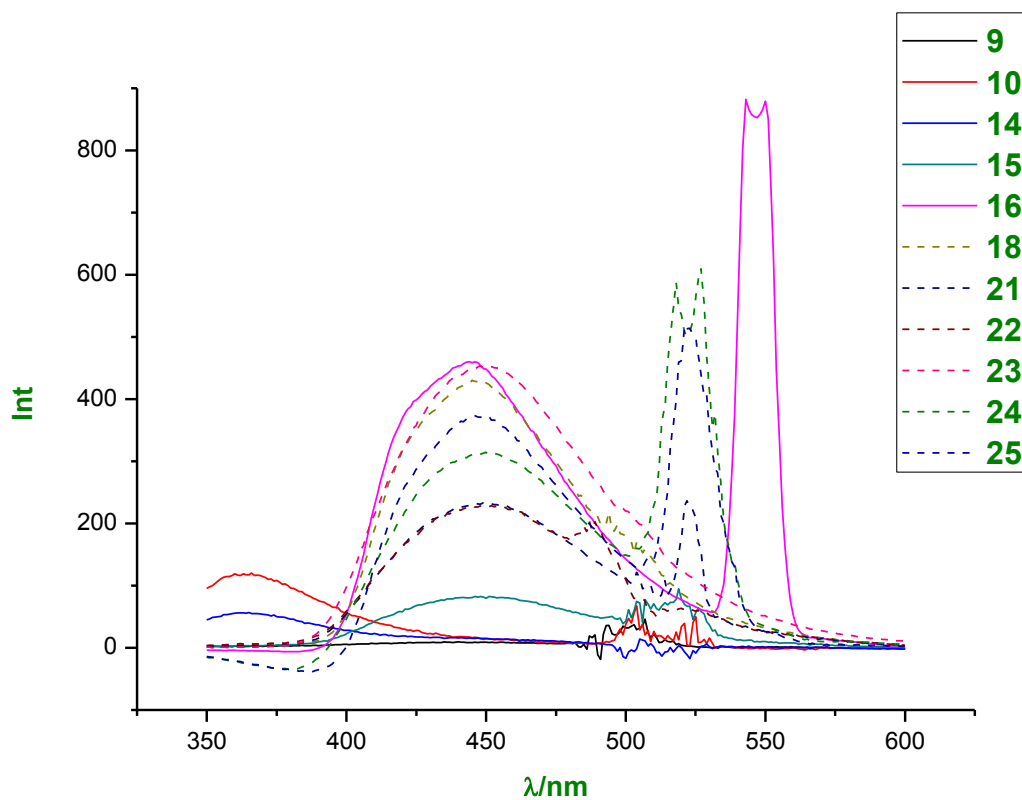
Slika 12. UV/Vis spektri 5-alkinilnih triazolilnih derivata citozina **9, 10, 14-16** ($c = 2,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3})



Slika 13. UV/Vis spektri pirolo[2,3-*d*]pirimidinskih derivata citozina **18, 21-25** ($c = 2,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3})

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja provedena su zbog visoke osjetljivosti metode pri koncentraciji 1×10^{-6} mol dm^{-3} u metanolu. Otopine pripremljenih spojeva su pobuđene svjetlošću valne duljine ekscitacije (λ_{ex}) koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorbancije (λ_{max}). Na slici 14 su prikazani emisijski fluorimetrijski spektri spojeva snimani

pri danoj koncentraciji u metanolu. Triazolilni derivati citozina **3**, **5**, **7** i **8** ne pokazuju značajnu fluorescenciju. Spoj **16** pokazuje najveći intenzitet emisije pri valnoj duljini 274 nm (Slika 14, Tablica 4). Svi spojevi pokazuju izrazito veliki Stokes-ov pomak maksimuma apsorbancije (> 100 nm), dok spojevi **21** i **24** pokazuju Stokes-ov pomak veći od 250 nm.



Slika 14. Emisijski spektri spojeva **9**, **10**, **14-16**, **18**, **21-25** ($c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)

Tablica 4. UV/Vis i fluorimetrijski podatci ispitivanih spojeva

Spoj	λ_{\max} (nm)	Abs	ϵ_{\max} ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Stokes-ov pomak (nm)
3	342	0,0543328971	2717	342	/	/
5	341	0,018496057	925	346	/	/
7	342	0,148630947	7432	341	/	/
8	342	0,104599215	5230	345	/	/
9	253	0,0743725002	3719	251	447	196
10	258	0,447532117	22377	259	362	103
	304	0,176298648	8815			
14	258	0,3724532117	18623	258	362	104
	304	0,115205877	5760			
15	260	0,0389520973	1948	258	447	189
16	252	0,148106098	7405	274	545	175
	368	0,0583427772	2917			
18	252	0,248583451	12429	251	447	196
	322	0,0593377352	2967			
21	261	0,06899748	3450	260	522	262
22	250	0,120929681	6046	250	448	198
	348	0,0389687754	1948			
23	250	0,285814792	14291	252	449	197
	349	0,0835347027	4177			
24	258	0,0404718407	2024	262	521	259
	347	0,0235726591	1179			
25	260	0,019609116	980	263	448	185

4.4. *In silico* analiza novopripremljenih spojeva (2-25)

Predviđanja vjerojatnih bioloških meta i farmakoloških djelovanja (Tablice 5-11) 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 (2-25) predviđen PASS-om prikazan je u tablicama 5-11 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.

Početni spoj 4-*N*-benzoil-5-jodcitozin (**1**) pokazao je najveću vjerojatnost aktivnosti na neku biološku metu, i to kao inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze, sa faktorom Pa = 0,981. 4-*N*-benzoil-5-jod-1-*N*-(prop-2-inil)citozin (**2**) pokazao je najveću vjerojatnost aktivnosti kao pojačivač antineoplastika (Pa = 0,891).

Od svih novopripremljenih spojeva, najveću vjerojatnost aktivnosti na neku biološku metu pokazao je spoj **4** kao vjerojatni inhibitor pterin-deaminaze s faktorima Pa = 0,564 i Pi = 0,033. Najveća vjerojatnost farmakološke aktivnosti uočena je kod spoja **16**, s faktorom vjerojatne aktivnosti Pa = 0,732, kao antiekcematika.

Tablica 5. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za 5-jod-*N*-benzoilcitozin (1) i njegove triazolilne 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 CDP-glicerol-glicerofosfotransferaze	0,679	0,059	Inducira CYP2C19	0,308	0,129	Inhibitor pterin-deaminaze	0,564	0,033
Inhibitor testosteron-17beta-dehidrogenaze (NADP+)	0,726	0,047	Inhibitor Blastocidin-S-deaminaze	0,420	0,005	Inhibitor 5-O-(4-kumaril)-D-kinat-3'-monooksigenaze	0,314	0,217	Inducira CYP2C19	0,314	0,238
Inhibitor pterin-deaminaze	0,670	0,016	Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,399	0,004	Inhibitor blastocidin-S-deaminaze	0,261	0,028	Inhibitor Blastocidin-S-deaminaze	0,272	0,024
Inhibitor (S)-3-amino-2-metilpropionat-transaminaze	0,577	0,003	Antagonist receptora fibrinogena	0,455	0,060						
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Keratolitik	0,754	0,002	Pojačivač antineoplastika	0,891	0,003	Analgetik, neopoidni	0,424	0,045	Liječenje kroničnih opstruktivnih plućnih bolesti	0,391	0,012
Antiekcematik	0,760	0,028	Antineoplastik	0,780	0,014	Analgetik	0,330	0,108	Antivirusno	0,340	0,024
Stimulant eritropoeze	0,640	0,008	Antiekcematik	0,662	0,059	Pojačivač ekspresije HMGCS2	0,290	0,123	Stimulant funkcije bubrega	0,314	0,238

Tablica 6. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-4-benzoil-*N*-1-triazolilne derivate citozina (5-8)

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>		
Inducira CYP2C19	0,359	0,068	Inhibitor Blastocidin-S-deaminaze	0,261	0,028	Inhibitor Transglutaminaze 2	0,438	0,002	Inducira CYP2C19	0,358	0,069
Inhibitor Blastocidin-S-deaminaze	0,265	0,027	Inhibitor MAP-kinaze	0,196	0,005	Inhibitor sinteze leukotriena	0,423	0,005	Antagonist proteina toplinskog šoka 27	0,346	0,131
Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,213	0,017	Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,204	0,019	Agonist Interleukina 2	0,369	0,073	Inhibitor Blastocidin-S-deaminaze	0,236	0,042
						Inducira CYP2C19	0,344	0,082	Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,199	0,020
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Analgetik, neopoidni	0,396	0,055	Analgetik, neopoidni	0,380	0,061	Liječenje alergijskog rinitisa	0,431	0,005	Analgetik, neopoidni	0,375	0,062
Antivirusno (Hepatitis B)	0,327	0,027	Antivirusno (Hepatitis B)	0,280	0,039	Antivirusno (Hepatitis B)	0,341	0,024	Antivirusno (Hepatitis B)	0,302	0,033
Pojačivač antineoplastika	0,248	0,049				Liječenje poremećaja žučnog trakta	0,328	0,038	Pojačivač antineoplastika	0,233	0,060

Tablica 7. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-4-benzoil-5-alkinilne-*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 dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,243	0,012	Inhibitor Transglutaminaze 2	0,417	0,002	Antagonist proteina toplinskog šoka 27	0,373	0,094	Inhibitor sinteze leukotriena	0,436	0,004
Inducira CYP2C19	0,286	0,171	Inhibitor sinteze leukotriena	0,408	0,005	Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,241	0,012	Inhibitor Transglutaminaze 2	0,398	0,002
			Agonist Interleukina 2	0,356	0,082	Inhibitor beta katenina	0,222	0,057	Interleukin 2 agonist	0,377	0,067
			Inducira CYP2C19	0,344	0,083	Inhibitor MAP kinaze	0,147	0,009	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	0,592	0,090	Antiekcematik	0,518	0,127
Antimikobakterijsko	0,319	0,069				Analgetik, neopoidni	0,406	0,051	Liječenje alergijskog rinitisa	0,370	0,005
Antiprotozoik (Toksoplazma)	0,192	0,071				Analgetik	0,301	0,126	Protiv neplodnosti kod žena	0,275	0,061

Tablica 8. 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>		
Inhibitor sinteze leukotriena	0,436	0,004	Antagonist proteina toplinskog šoka 27	0,407	0,059	Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,302	0,007	Antagonist proteina toplinskog šoka 27	0,370	0,097
Inhibitor Transglutaminaze 2	0,398	0,002	Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,226	0,014	Inhibitor Blastocidin-S-deaminaze	0,210	0,062	Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,232	0,014
Agonist Interleukina 2	0,377	0,067	Inhibitor proto-onkogeno tirozinske-proteinske kinaze Fgr	0,257	0,075	Inhibitor MAP-kinaze	0,137	0,019	Inhibitor beta katenina	0,221	0,059
Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,254	0,011	Inhibitor beta katenina	0,225	0,049				Inhibitor MAP-kinaze	0,141	0,010
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Antiekcematik	0,518	0,127	Antiekcematik	0,703	0,045	Antiekcematik	0,438	0,173	Antiekcematik	0,732	0,035
Liječenje alergijskog rinitisa	0,370	0,005	Analgetik, neopoidni	0,369	0,064	Antimikobakterijsko	0,327	0,065	Liječenje septičkog šoka	0,247	0,040
Protiv neplodnosti kod žena	0,275	0,061	Liječenje makularne degeneracije	0,230	0,026	Komplementarni inhibitor	0,195	0,042	Liječenje makularne degeneracije	0,223	0,029

Tablica 9. 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 lizil- oksidaze	0,263	0,118	Inhibitor CYP3A4	0,291	0,037	Inhibitor sinteze leukotriena	0,474	0,004	Inhibitor sinteze leukotriena	0,474	0,004
			Stimulant Glikogen-sintaze	0,316	0,062	Agonist Interleukina 2	0,447	0,033	Agonist Interleukina 2	0,447	0,033
						Inhibitor Transglutaminaze 2	0,411	0,002	Inhibitor Transglutaminaze 2	0,411	0,002
<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	Antialergijsko	0,510	0,026
Liječenje gastrointestinalnih bolesti	0,177	0,023	Liječenje upalnih bolesti crijeva	0,317	0,051	Liječenje alergijskog rinitisa	0,395	0,005	Liječenje alergijskog rinitisa	0,395	0,005
			Liječenje reumatskog artritisa	0,297	0,055	Antiastmatično	0,400	0,048	Antiastmatično	0,400	0,048

Tablica 10. 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 Blastocidin-S-deaminaze	0,215	0,057	Inducira CYP2C19	0,362	0,066	CYP3A4 inhibitor	0,261	0,056
Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,167	0,031	Inhibitor MAP-kinaze	0,135	0,011	Inhibitor ciklične GMP-fosfodiesteraze	0,235	0,055
Inhibitor MAP-kinaze	0,139	0,010	Inhibitor Transglutaminaze 2	0,126	0,029			
Antagonist receptora adenzina	0,116	0,024	Antagonist VEGF	0,109	0,033			
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Liječenje reumatskog artritisa	0,263	0,075	Antineoplastik (tumor na mozgu)	0,349	0,014	Stimulant ATPaze	0,307	0,023
Protuupalno	0,317	0,146	Antineoplastik (rak štitnjače)	0,300	0,015	Liječenje reumatskog artritisa	0,239	0,095
Komplementarni inhibitor	0,200	0,037	Pojačivač antineoplastika	0,249	0,048			

Tablica 11. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za pirolo[2,3-*d*]pirimidinske derivate (**24** i **25**)

Aktivnost spoja 24	Pa_24	Pi_24	Aktivnost spoja 25	Pa_25	Pi_25
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor sinteze leukotriena	0,454	0,004	Inhibitor CYP3A4	0,359	0,017
Inhibitor Transglutaminaze 2	0,444	0,002	Aktivator kalijevih kanala	0,257	0,008
Inhibitor CYP3A4	0,340	0,020	Inhibitor proizvodnje citokina	0,258	0,017
			Inhibitor proteinske kinaze	0,271	0,048
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Liječenje alergijskog rinitisa	0,511	0,004	Liječenje reumatskog artritisa	0,376	0,028
Antialergijsko	0,530	0,023	Liječenje upalnih bolesti crijeva	0,344	0,041
Liječenje rinitisa	0,505	0,018	Liječenje autoimunih bolesti	0,335	0,081

4.5. Ispitivanje interakcije spojeva sa *ct*-DNA UV/Vis i fluorimetrijskim titracijama

Spojevima **3, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 18** i **21-25** spektroskopski je ispitana interakcija sa *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 (λ_{emis} =380-600 nm) gdje niti jedan sastojak u otopini nema UV/Vis spektar.

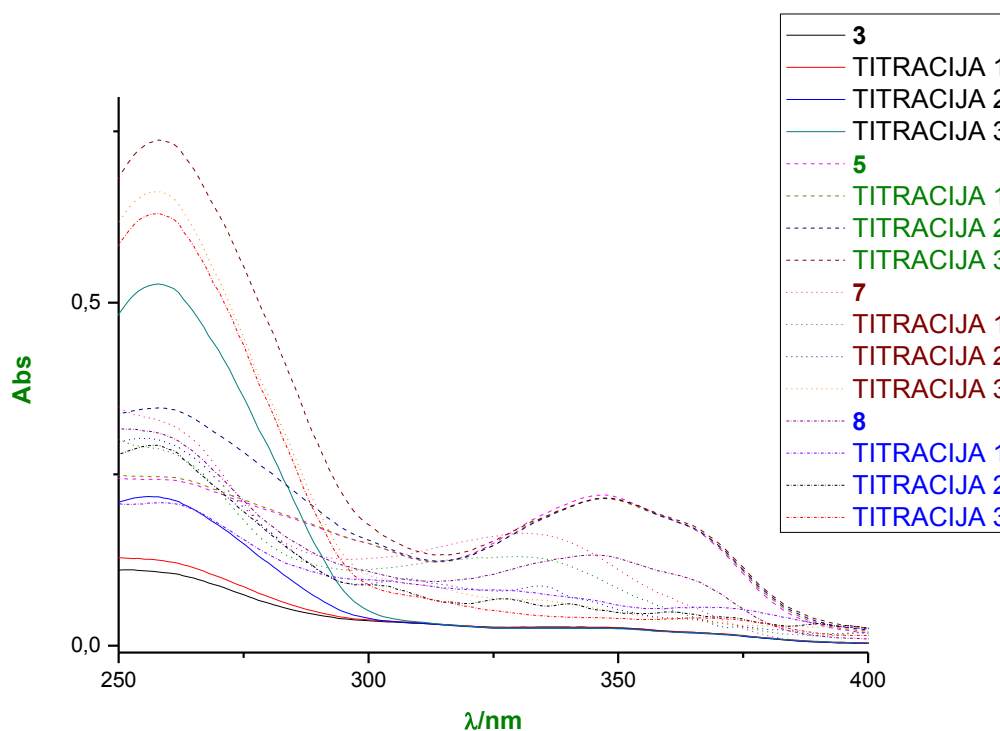
U tablici 12 prikazane su specifične UV promjene nastale prilikom titracije spojeva **5, 7, 8, 10, 16** i **23-25** sa *ct*-DNA.

Tablica 12. Specifične UV promjene prilikom titracije spojeva **5, 7, 8, 10, 16** i **23-25** sa *ct*-DNA

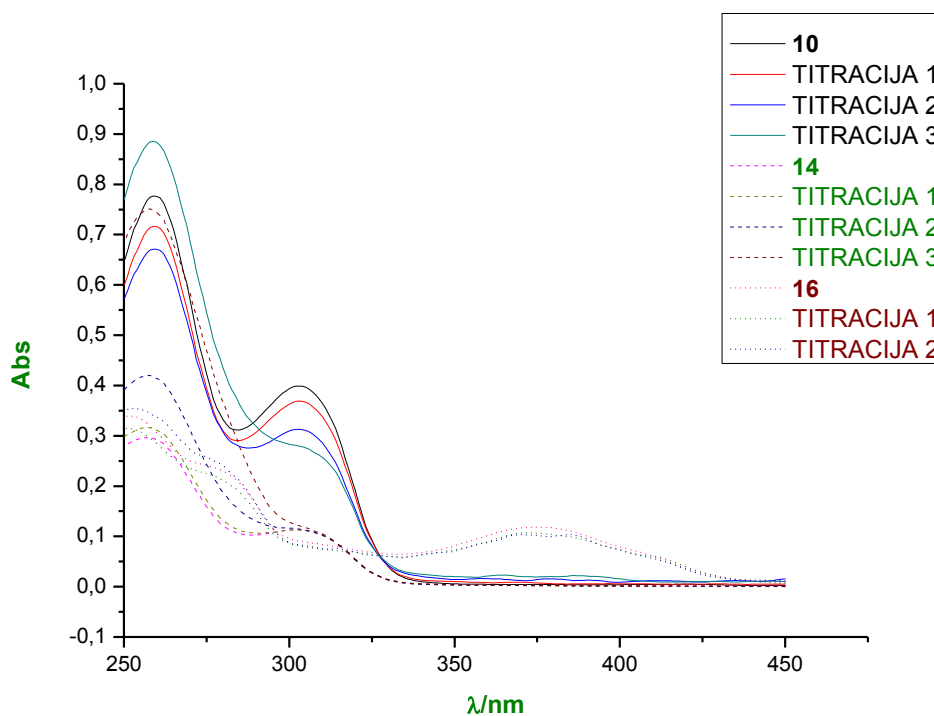
Spoj	λ_{max} / nm	H (%) ^a	$\Delta\lambda$ ^b
5	347	2,3	1
7	331	58,4	3
8	345	69,3	20
10	303	29,6	2
16	372	2,4	3
23	350	1	0
24	342	1,7	0
25	341	2,3	1

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

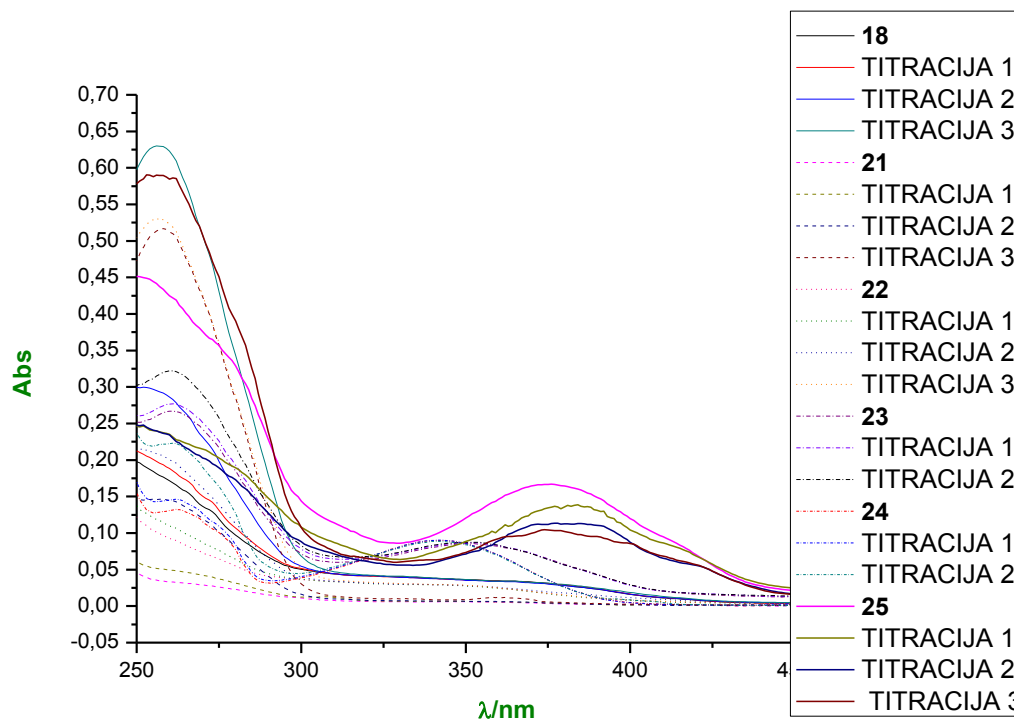
Iz titracijskih krivulja spojeva **5**, **7**, **8**, **10**, **14**, **16** i **23-25**, te krivulja ovisnosti apsorpcije o dodanoj količini *ct*-DNA (Slike 15-17), vidljivo je da tijekom titracije s *ct*-DNA dolazi do smanjenja apsorpcije (hipokromni pomak) te do pomaka maksimuma prema većim valnim duljinama (batokromni pomak). Iz dobivenih titracijskih krivulja vidljiv je hipokromni pomak apsorpcijskih maksimuma, iz čega slijedi da se spojevi **7** i **8** najbolje vežu za *ct*-DNA kao interkalatori.



Slika 15. UV/Vis spektri titracije triazolilnih derivata citozina **3**, **5**, **7** i **8** ($c = 2,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) sa *ct*-DNA

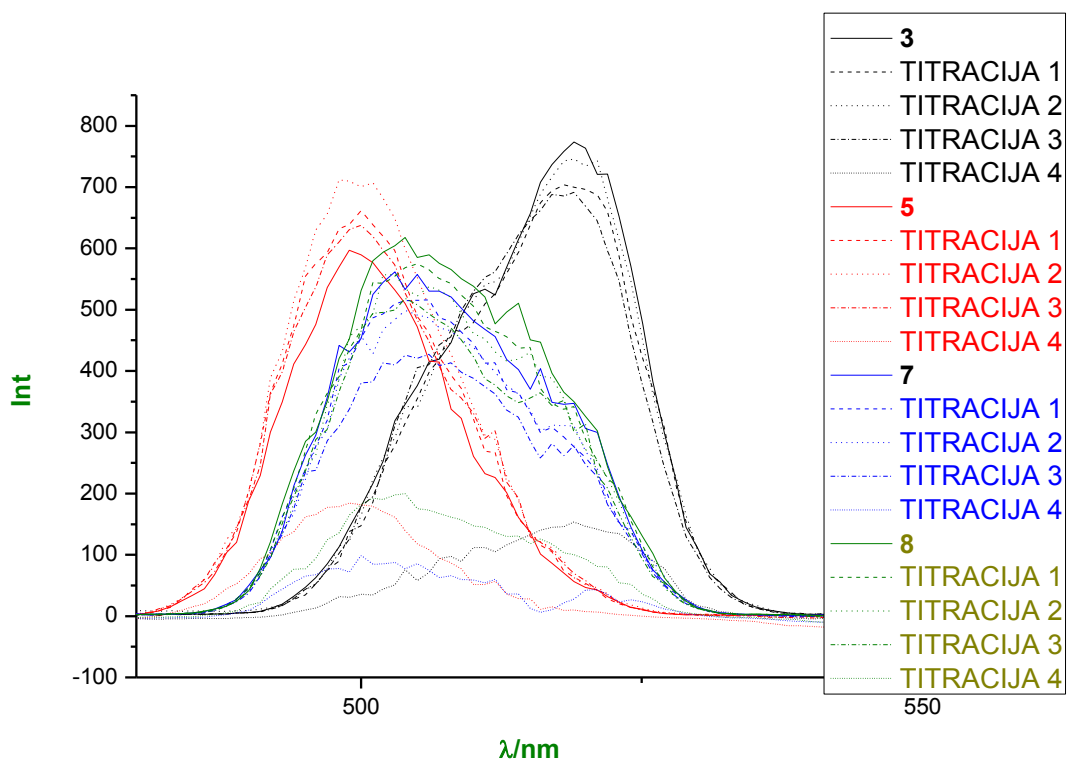


Slika 16. UV/Vis spektri 5-alkinilnih triazolilnih derivata citozina **10**, **14** i **16** ($c = 2,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) sa *ct*-DNA



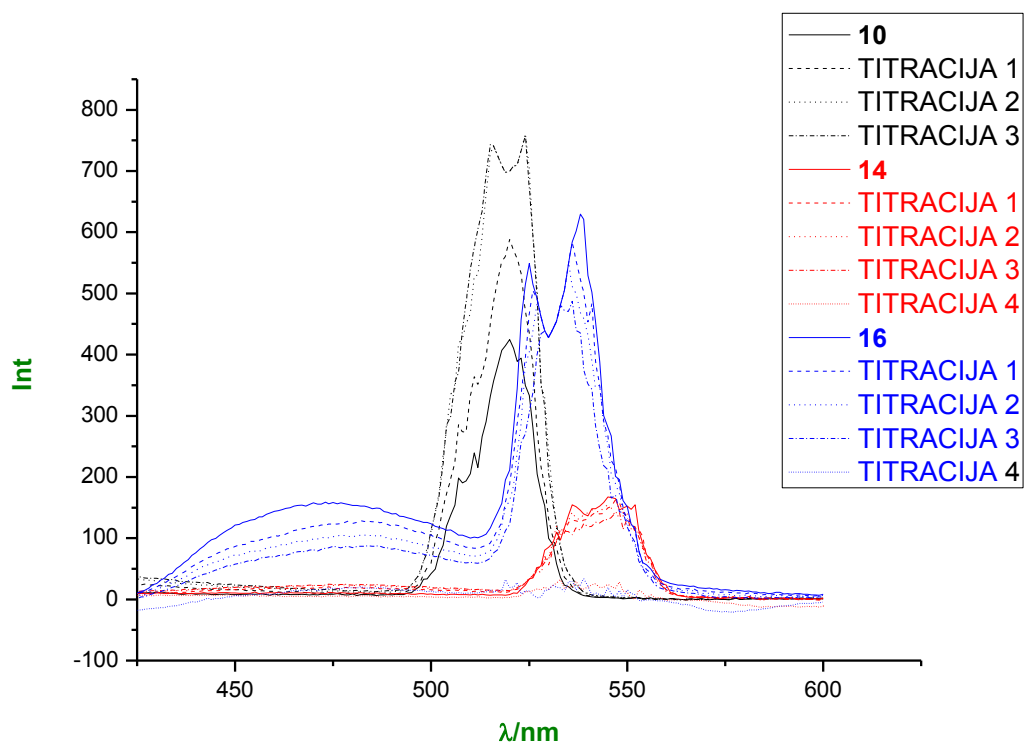
Slika 17. UV/Vis spektri titracije pirolo[2,3-*d*]pirimidinskih derivata citozina **18**, **21-25** ($c = 2,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) sa *ct*-DNA

Iz dobivenih krivulja titracije ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji *ct*-DNA (Slike 18-20) vidljivo je da dodatkom *ct*-DNA u otopinu spoja dolazi do povećanja ili smanjenja intenziteta fluorescencije, a najizraženiji pomak (hiperkromni) uočen je za spoj **10** (Slika 19).

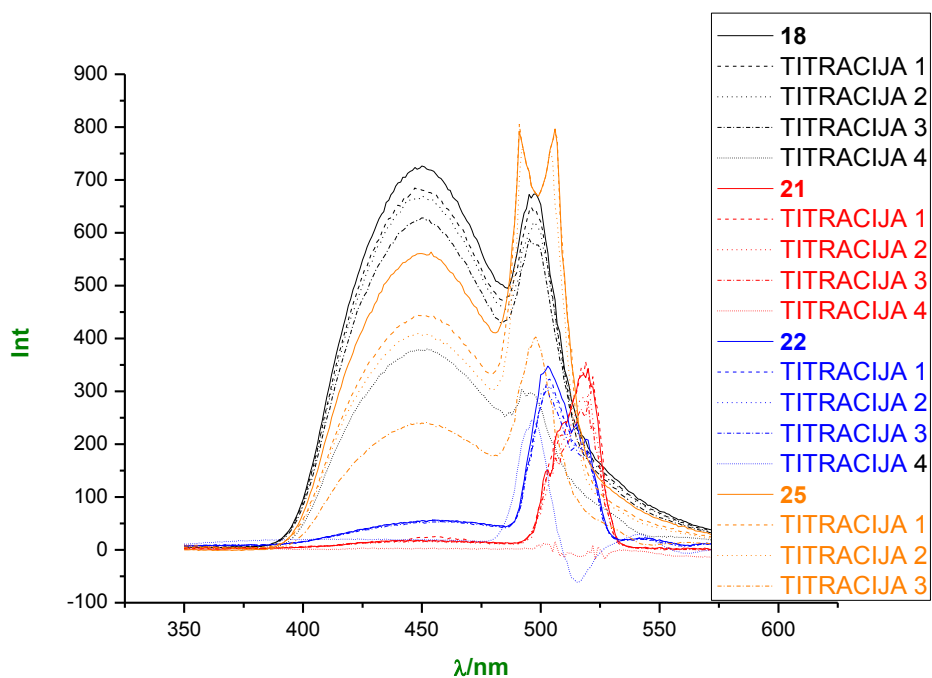


Slika 18. Fluorimetrijski spektri titracije spoja triazolilnih derivata citozina **3**, **5**, **7** i **8**

($c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) sa *ct*-DNA



Slika 19. Fluorimetrijski spektri titracije 5-alkinilnih triazolilnih derivata citozina **10**, **14** i **16** ($c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) sa *ct*-DNA



Slika 20. Fluorimetrijski spektri titracije pirolo[2,3-*d*]pirimidinskih derivata citozina **18**, **21**, **22** i **25** ($c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) sa *ct*-DNA

5. ZAKLJUČCI

5. ZAKLJUČCI

- Ključni prekursor za sintezu, *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**) pripremljen je jodiranjem *N*-4-benzoilcitozina.
- *N*-4-benzoil citozinski derivati s 1,2,3-triazolnim prstenom vezanim za položaj *N*-1 (**3-8**) pripremljeni su Cu-kataliziranom 'klik' reakcijom potpomognutom mikrovalovima *N*-1-propargilcitozina (**2**) i odgovarajućih azida.
- Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja derivata 5-jod-*N*-1-triazolilcitozina (**3-8**) s terminalnim alkil- i ariletinima uz Pd-katalizator i CuI sintetizirani su C-5 alkinilni derivati citozina (**9-16**).
- *N*-heteroanulacijom *in situ* C-5 alkinilnih citozinskih derivata (**9-15**) uz CuI i trietilamin pripremljeni su C-6 supstituirani derivati 7-deazapurina (**17-25**).
- Strukturna karakterizacija novopripremljenih spojeva provedena je ¹H-NMR, UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom.
- Spektroskopska karakterizacija priređenih spojeva provedena je UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom.
- Rezultati spektroskopskih istraživanja pokazuju da ciklizacija i povećanje konjugacije kod spojeva **10**, **14** i **16** poboljšavaju spektroskopske karakteristike, osobito fluorescencije.
- Farmakološka djelovanja i moguće biološke mete predviđene su *in silico* analizom novopripremljenih spojeva te se može zaključiti da najveću vjerojatnost aktivnosti na neku biološku metu ima spoj **4** kao vjerojatni inhibitor pterin-deaminaze s faktorima Pa = 0,564 i Pi = 0,033, dok je najveća vjerojatnost farmakološke aktivnosti uočena kod spoja **16**, s faktorom vjerojatne aktivnosti Pa = 0,732 kao antičekematika.
- UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom provedena su preliminarna ispitivanja vezivanja 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 **7** i **8** najbolje vežu za *ct*-DNA.

5. ZAKLJUČCI

- Citostatska ispitivanja *in vitro* novosintetiziranih spojeva provest će se na tumorskim staničnim linijama porijeklom iz čovjeka: HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi).

6. LITERATURA

6. LITERATURA

1. A. Levitzki *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2013 (**53**) 9.1.
2. Y. Kawakita, K. Miwa, M. Seto, H. Banno, Y. Ohta, T. Tamura, T. Yusa, H. Miki, H. Kamiguchi, Y. Ikeda, T. Tanaka, K. Kamiyama, T. Ishikawa *Bioorg. Med. Chem.* 2012 (**20**) 6171.
3. K. M. J. Doiron, J. Lavigne-Nicolas, C.G. Cupples *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1999 (**429**) 37.
4. B. Yuan *Advances in Clinical Chemistry*. 2014 (**67**) 151.
5. http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/catalog/2076_7deaza_purines.html, pristupljeno: 27.5.2015., 10:49
6. A. Dalal, A.E. Ella, M. M. Ghorab, E. Noaman, I. H. Helmy, I. A. Khalil *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008 (**16**) 2391.
7. B. Klebl, G. Muller, M. Hamacher *Protein Kinases as Drug Targets*, John Wiley & Sons, 2011, 1.
8. R. Chinchilla, C. Nájera *Chemical Reviews*. 2007 (**107**) 874.
9. S. Raić-Malić, A. Mešćić *Current Medicinal Chemistry*, 2015. (**22**) 1.
10. S. H. Pine *Organic chemistry*. 1994, 796.
11. S. Blewett, C. McGuigan, H. Barucki, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001 (**20**) 1063.
12. A. R. Van Rompay, M. Johansson, A. Karlsson *Pharmacol Ther.* 2000 (**87**) 189.
13. C. Périgaud, G. Gosselin, J. L. Imbach *Nucleosides and Nucleotides*. 1992 (**11**) 903.
14. M. Pastor-Anglada, A. Felipe, F. J. Casado *Trends in Pharm. Sci.* 1998 (**19**) 424.
15. C. M. Galmarini, J. R. Mackey, C. Dumontet *Leukemia*. 2001 (**15**) 875.
16. R. Snoeck, T. Sakuma, E. De Clercq, I. Rosenberg, A. Holly *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988 (**32**) 1839.
17. A. Takada, H. Kamiya, S. Shuto, A. Matsuda, H. Harashima *International Journal of Pharmaceutics*. 2009 (**377**) 53.
18. J. Balzarini, K.W. Morin, E. E. Knaus, L. I. Wiebe, E. De Clercq *Gene Ther.* 1995 (**2**) 317.
19. A. Moser, R. Guza, N. Tretyakova, D. M. York *Theor Chem Account* 2009 (**122**) 179.
20. M. E. Perlman, K. A. Watanabe, R. F. Schinazi, J. J. Fox *J Med Chem.* 1985 (**28**) 748.
21. R. H. E. Hudson *Heterocycles*. 2006 (**68**) 1328.
22. A. Dimopoulou, S. Manta, C. Kiritsis, D. N. Gkaragkouni, I. Papatiriou, J. Balzarini, D. Komiotis *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 (**23**) 1330.

6. LITERATURA

23. C. Roush *Uncatalyzed Microwave Synthesis of Simple and Bis 1,2,3-triazole*, 2011., California State University, 1.
24. J. C. Salamone *Polymeric Materials Encyclopedia* 2000 (9) 6931.
25. J. A. Joule, K. Mills *Heterocyclic Chemistry* 2010, John Wiley & Sons, 557.
26. M. K. Stawinska, E. M. Puchalska, T. Rowicki *Tetrahedron* 2012 (68) 214.
27. Y. L. Angell, K. Burgess *Chem. Soc. Rev.* 2007 (36) 1674.
28. S. G. Agalave, S. R. Maujan, V. S. Pore *Chem. Asian J.* 2011 (6) 2696.
29. J. Sun, Y. Dou, H. Ding, R. Yang, Q. Sun, Q. Xiao *Mar. Drugs.* 2012 (10) 881.
30. S. R. Turk, Jr. C. Shipman, R. Nassiri, G. Genzlinger, S. H. Krawczyk, L. B. Townsend, J. C. Drach *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987 (31) 544.
31. K. J. Isono *Antibiot.* 1988 (42) 1711.
32. L. Yen, M. Magnier, R. Weissleder, B. R. Stockwell, R. C. Mulligan *RNA*, 2006 (12) 797.
33. H. Nishioka et. al, *Journal of Antibiotics.* 1990 (43) 1586.
34. K. Hayashi et. al, *Phytochemistry.* 2009 (70) 190.
35. C. R. Loomis et al, *The Journal of biological chemistry.* 1988 (263) 1682.
36. <http://chemoth.com/types/kinaseinhibitors>; pristupljeno: 17.4.2015., 18:24.
37. P. Traxler, P. Furet *Pharmacol. Ther.* 1999 (82) 195.
38. H. Choi, Z. Wang, W. Richmond, X. He, K. Yang, T. Jiang, T. Sim, D. Karanewsky, X. Gu, V. Zhou, Y. Liu, O. Ohmori, J. Caldwell, N. Gray, Y. He, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2006 (16) 2173.
39. A. Pullman, A. M. Armbruster *Theoret. Chem. Acta* 1977 (45) 249.
40. A. R. Katritzky *Advances in heterocyclic chemistry* 1988, Elsevier, 140.
41. D. L. Helfer, R. S. Hosmane, N. J. Leonard *J. Org. Chem* 1981 (46) 4803.
42. D. R. Birari, M. G. Ghagare, M. A. Kazi, S. M. Bagul, B. K. Ghotekar, R. B. Toche, M. N. Jachak *Organic Preparations and Procedures International: The New Journal for Organic Synthesis*, 2009 (41) 515.
43. M. Kosugi, K. Fugami *J. Organometall. Chem.* 2002 (653) 50.
44. M. E. Hassan *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1991 (56) 1944.
45. K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara *Tetrahedron Letters.* 1975 (50) 4467.
46. V. R. Batchu, V. Subramanian, K. Parasuraman, N. K. Swamy, S. Kumar, M. Pal *Tetrahedron.* 2005 (61) 9869.
47. S. D. Gonzalez *Catal. Sci. Technol.* 2011 (1) 166.

6. LITERATURA

48. J. Lahann *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*, 2009, John Wiley & Sons, 1-9.
49. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002 (41) 2596.
50. G. C. Patton *Development and Applications of Click Chemistry*, 2004, 60.
51. J. R. Lakowicz *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edition, Springer 2006, 1-6.
52. H. G. Karge, J. Weitkamp, *Molecular sieves, Science and Technology*, Springer 1999, 340-346.
53. *Double-helix disruption*, Nature Chemistry, 2012 (4).
54. T. Sarwar, M. A. Husain, S. U. Rehman, H. M. Ishqi, M. Tabish *Mol. BioSyst.* 2015 (11) 522.
55. D. Khare, R. Pande *Der Pharma Chemica*, 2012 (4) 66.
56. P. Pandya, M. M. Islam, G. S. Kumar, B. J. Jayaram, S. Kumar *J. Chem. Sci.* 2010 (122) 247.
57. A. Lagunin, D. Filimonov, V. Poroikov *Current Pharmaceutical Design.* 2010 (16) 1703.
58. H. R. Noori, R. Spanagel *In Silico Pharmacology.* 2013 (1) 1.
59. D. Murray, P. Doran, P. MacMathuna, A. C. Moss *Molecular Cancer.* 2007 (6) 50.
60. <http://genexplain.com/pass>; pristupljeno: 25.4.2015. (11:22)

7. ŽIVOTOPIS

7. ŽIVOTOPIS

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 i tehnologije u Zagrebu, studij 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 docentice Tatjane Gazivoda Kraljević, a u rujnu iste godine upisala sam diplomski studij Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, modul Primijenjena organska kemija. 2013. godine dobila sam Dekanovu nagradu za najbolju studenticu preddiplomskog studija Primijenjena kemija s prosjekom ocjena 4,623, a 2014. godine Dekanovu nagradu za znanstveni rad. Akademske godine 2013./2014. uključila sam se u znanstveni rad na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Tatjane Gazivoda Kraljević. Na X. susretu mladih kemijskih inženjera, 20. i 21. veljače 2014. godine, sudjelovala sam s posterskim priopćenjem, kao i na 24. Hrvatskom susretu kemičara i kemijskih inženjera, 21. - 24. travnja 2015. godine. 2015. godine dobitnica sam Rektorove nagrade.