

Sinteza heterocikličkih derivata ferocena s potencijalnim citostatskim djelovanjem

Šimek, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:149:289043>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Helena Šimek

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Helena Šimek

SINTEZA HETEROCIKLIČKIH DERIVATA FEROCENA S POTENCIJALNIM
CITOSTATSKIM DJELOVANJEM

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

Članovi povjerenstva:

1. Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
2. Dr. sc. Andrijana Meščić Macan
3. Izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

Zagreb, srpanj 2019.

Veliku zahvalnost u prvom redu dugujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić, na predloženoj temi te edukaciji i stručnom vodstvu bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća. Zahvaljujem se, također, što je svojom susretljivošću i savjetima učinila da izrada ovog rada bude prije svega zabavna, te probudila u meni želju da se nastavim baviti znanosti.

Posebnu zahvalnost želim iskazati svojoj obitelji, osobito roditeljima i bratu, koji su me tijekom čitavog školovanja podupirali, upućivali na pravi put te poticali moju težnju k ostvarenju sve viših ciljeva. Upornost, ustrajnost i strpljenje koje sam naučila od roditelja doveli su me do diplome i dugujem im veliko HVALA!

Hvala i svim kolegama i kolegicama, posebice Luciji i Lauri, koji su vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisutstvom i učinili ga najljepšim dijelom mog života.

Na kraju svog fakultetskog obrazovanja želim iskazati zahvalnost svim djelatnicima Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije koji su svojim radom pomogli u stjecanju znanja koje imam danas, te su svojim pristupom i otvorenosti ostavili snažan dojam i pomogli mi otkriti kakva želim biti u poslovnom smislu.

SAŽETAK RADA

Sinteza heterocikličkih derivata ferocena s potencijalnim citostatskim djelovanjem

Cilj ovog rada bio je sintetizirati spojeve bazirane na konjugatima ferocena i purina i purinskih izostera povezanih 1,2,3-triazolnom prenosnicom s potencijalnim citostatskim djelovanjem. Alkilirani purinski izosteri (**16-21**) dobiveni su reakcijom propargiliranja s propargil-bromidom u prisutstvu baze, dok su azidni derivati ferocena dobiveni iz derivata ferocena s natrijevim azidom. Pri alkiliranju 6-klorpurina i 2-amino-6-klorpurina dobivena je smjesa *N*-9 i *N*-7 regioizomera u kojoj prevladava *N*-9 izomer.

Ciljani konjugati purina i pseudopurina i ferocena (**22-37**) priređeni su 1,3-dipolarnom cikloadicijom ferocenskih azida (**13-15**) i terminalnih purinskih i pseudopurinskih alkina (**16-21**) kataliziranom Cu(I) (CuAAC). Strukture spojeva potvrđene su ¹H- i ¹³C- NMR spektroskopijom. Radi ispitivanja odnosa strukture i djelovanja (SAR), dušikovi heterocikli i ferocenski farmakofori su povezani preko 1,2,3-triazolnog prstena direktno ili preko metilenske, odnosno metilmetinske prenosnice. Ispitat će se također utjecaj različito supstituiranih purina i pseudopurina na antiproliferativna djelovanja.

Rezultati ispitivanja kinetičke topljivosti i lipofilnosti $\log D$ pokazali su da adeninski derivat ferocena **23** i 6-klorpurinski derivati ferocena **28** i **30-33** imaju odličnu kinetičku topljivost (> 100) i lipofilnost u rasponu od 3,09 do 4,27. Nasuprot tome, 6-klor-7-deazapurinski derivati ferocena **25**, **26** i **27** su spojevi najveće lipofilnosti ($\log D \geq 5,62$) koji imaju i vrlo nisku topljivost. Uzimajući u obzir ispitana fizikalna svojstva, spojevi **23** i **28-35** zadovoljavaju osnovne pretpostavke topljivosti i lipofilnosti za moguću daljnju biološku primjenu.

Ključne riječi: feroceni, 1,2,3-triazoli, purini, bakrom katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija.

SUMMARY

The synthesis of heterocyclic ferrocene derivatives with potential cytostatic activity

The aim of this work was to synthesize novel purine and purine isosteres and ferrocene conjugates connected by a 1,2,3-triazolyl linker as potential new cytostatic agents. Alkylated purine isosteres (**16-21**) were prepared by propargylation with propargyl bromide in the presence of base, whereas the azido ferrocene derivatives were prepared from ferrocene derivatives with sodium azide. Alkylation of 6-chloropurine and 2-amino-6-chloropurine yielded a mixture of *N*-9 and *N*-7 regioisomers with the *N*-9 isomer as the major product.

The targeted purine and pseudopurine and ferrocene conjugates (**22-37**) were prepared by 1,3-dipolar cycloaddition of ferrocene azides (**13-15**) and terminal purine and pseudopurine alkynes (**16-21**) catalyzed by Cu(I) (CuAAC). The structures of the synthesized compounds have been confirmed by ¹H- and ¹³C- NMR spectroscopy. For the examination of structure-activity relationship (SAR), nitrogen heterocycles and ferrocene pharmacophores were connected *via* a 1,2,3-triazolyl ring directly, or with a methylene or methylenemethylene linker. Antiproliferative activity of differently substituted purines and pseudopurines will also be investigated.

Kinetic solubility and lipophilicity ($\log D$) results have shown that adenine ferrocene derivative **23** and 6-chloropurine ferrocene derivatives **28** and **30-33** have great kinetic solubility (>100) and lipophilicity in the range of 3.09-4.27. On the other hand, 6-chloro-7-deazapurine ferrocene derivatives **25**, **26** and **27** have the highest lipophilicity ($\log D \geq 5.62$) and very low solubility. Keeping these results in mind, compounds **28** and **30-35** are meeting the basic requirements for further biological application.

Key words: ferrocenes, 1,2,3-triazoles, purines, copper(I) catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	4
2.1. Biološke mete u antitumorskoj terapiji	6
2.2. Biološki važni heterocikli dušika	8
2.3. Purini	11
2.3.1. Deazapurini	14
2.3.2. 7-deazapurini	14
2.4. Triazoli i klik kemija	15
2.4.1. Husigenova cikloadicija	18
2.4.2. 1,3-dipolarna cikloadicija katalizirana bakrom (I) (CuAAC)	18
2.4.3. Nedostatci reakcije CuAAC	20
2.5. Organometalni spojevi	20
2.5.1. Feroceni	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Opće napomene	26
3.2. Priprava spojeva	27
3.2.1. Sinteza azidnih derivata ferocena (13-15)	27
3.2.2. Sinteza propargiliranih purinskih izostera (16-21)	28
3.2.3. Sinteza triazolnih derivata ferocena i purinskih izostera (22-37)	29
3.3. Pregled sintetiziranih spojeva	35
4. REZULTATI I RASPRAVA	37
4.1. Priprava spojeva	38
4.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva	40
4.3. Fizikalna svojstva spojeva	42
5. ZAKLJUČAK	45
6. LITERATURA	47
7. PRILOZI	52

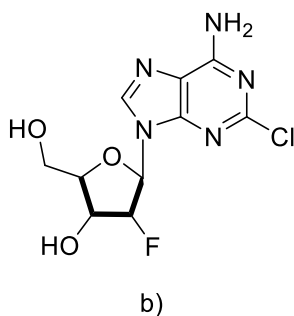
1. UVOD

Rak (karcinom) je bolest koja razara strukturu i normalno funkcioniranje tkiva te se očituje brzim i nekontroliranim umnažanjem zloćudnih tumorskih stanica.¹ Najsmrtonosnija je bolest na svijetu nakon kardiovaskularnih bolesti,^{2,3} te je veliki teret ljudskom zdravlju u razvijenim i u zemljama u razvoju.⁴ Može se reći da smo ušli u 'doba raka' sa 6,5 milijuna smrti uzrokovanih rakom 2003. godine, odnosno 12 milijuna 2013. godine.⁵ Zbog povećanja očekivane životne dobi i usvajanja loših životnih navika,⁶ predviđa se da će 2050. godine broj umrlih od raka biti 35 milijuna. Zabrinjavajuća je činjenica da ovi brojevi pokazuju povećanje koje je statistički veće od povećanja populacije planeta.⁵

Iako su zahvaljujući inovacijama i povećanom opsegu znanja postignuta brojna poboljšanja u dijagnostici i liječenju raka, trenutno dostupni kemoterapeutski spojevi pokazuju ograničenja kao što su razvoj otpornosti i neželjeno djelovanje na okolno tkivo,^{3,7,8} stoga postoji neprestana potraga za novim spojevima koji bi zadržali antitumorsku aktivnost uz istovremeno smanjenje utjecaja na normalne stanice i tkiva.⁹

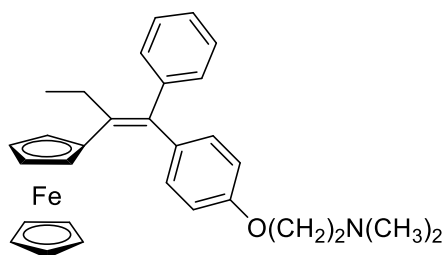
Karcinomi i brojne druge bolesti poput Alzheimerove bolesti, tuberkuloze i multiple skleroze ovise o više faktora te se mogu uspješno liječiti samo istovremenim djelovanjem na više bioloških meta. Međutim, klasične kombinirane terapije pokazuju nedostatke poput međudjelovanja lijekova,¹⁰ stoga su znanstvenici razvili strategiju koja se zasniva na upotrebi jednog kemijskog entiteta koji kao jedinstveni lijek djeluje na nekoliko bioloških meta u bolestima ovisnim o više faktora. Smatra se da je kombinacija farmakofora u molekularnoj hibridizaciji analogna kombiniranoj terapiji, uz iznimku što dva lijeka, kovalentno povezana i dostupna kao jedinstveni entitet, primjenom molekularne hibridizacije pokazuju veću djelotvornost uz manje nuspojave.¹¹ Između ostalog, opisana strategija hibridizacije pokazala se kao vrlo djelotvoran alat u dizajniranju antitumorskih spojeva.¹²

Strukturnim promjenama na dušikovim nukleobazama, purinu i pirimidinu, priređen je veliki broj analoga koji pokazuju različite biološke aktivnosti. Nukleozidni analozi poput gemcitabina, kladribina, klofarabina i kapecitabina kao racionalno dizajnirani lijekovi uspješno se koriste u kliničkoj antitumorskoj terapiji.¹³



Slika 1. Primjer purinskog antitumorskog lijeka, klofarabina.

Veliki značaj u dizajniranju i razvoju novih antitumorskih spojeva predstavljaju i derivati ferocena zahvaljujući njihovoj relativnoj stabilnosti u biološkom mediju te niskim razinama toksičnosti *in vivo*. Otkrićem ferocifena koji se pokazao izuzetno aktivnim protiv hormonski ovisnog i hormonski neovisnog raka dojke započelo je uključivanje ferocenskog farmakofora u strukture hibrida kao potencijalnih antitumorskih lijekova.¹⁴



Slika 2. Primjer ferocenskog protutumorskog lijeka, ferocifena.

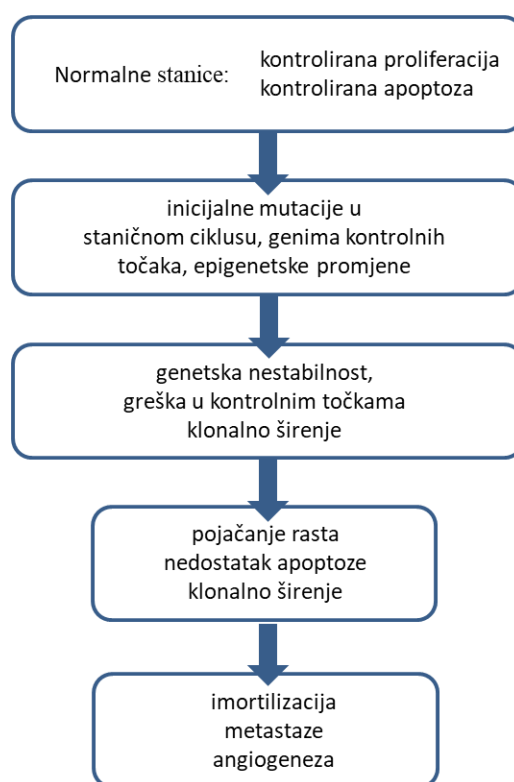
1,2,3-triazoli posjeduju svojstva idealne poveznice zbog stabilnosti prema metaboličkoj degradaciji, mogućnosti stvaranja vodikovih veza i velikog dipolnog momenta, što poboljšava njihovu topljivost i omogućuje vezanje na biološke mete.⁴ Osim toga, lako se pripremaju reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije i pokazuju antimikrobnu, antimalarijsku, antivirusnu, antitumorsku i druge biološke aktivnosti, stoga se vrlo često koriste u dizajnu molekularnih hibrida za povezivanje više farmakofora.¹⁵

Sir James Whyte Black, dobitnik Nobelove nagrade za medicinu 1988. godine, rekao je da su 'najbolja osnova za otkriće novih lijekova, već poznati lijekovi'.¹⁶ Budući da su brojni analozi purinske baze, triazola i ferocena pokazali izraženu antitumorsku aktivnost, u ovom su radu priređeni hibridi purina i purinskih izostera s ferocenom povezani preko 1,2,3-triazolne prenosnice kako bi se priredili novi spojevi s antitumorskim djelovanjem.

2. OPĆI DIO

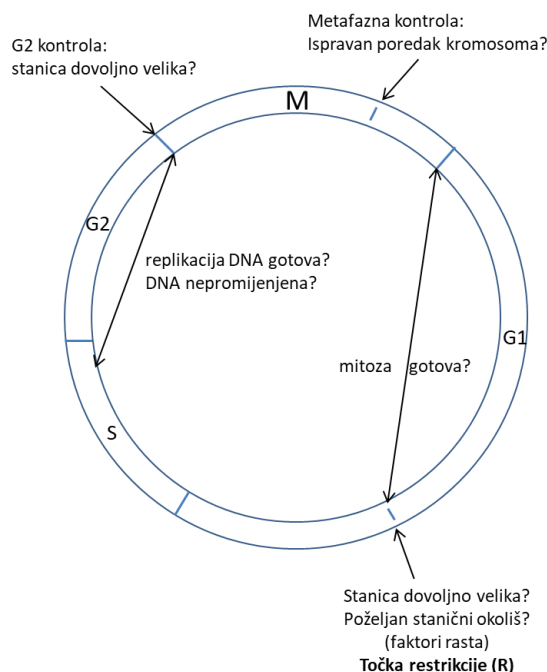
Karcinom je bolest koju karakteriziraju nekontroliran rast stanica, uništavanje okolnog tkiva i metastaze, odnosno širenje na druge lokacije u tijelu putem limfe ili krvi. Konzumacija cigareta, pretjerana tjelesna težina, mutacija gena te hormonska i imunološka stanja neki su od mogućih uzroka ove smrtonosne bolesti.² Od raka obolijevaju ljudi svih dobi, čak i fetusi, ali rizik od oboljenja najčešće raste s godinama. On uzrokuje oko 13% smrti među ljudima¹⁷ i jedna je od najtežih bolesti,¹¹ a očekuje se da će maligni tumori preći srčane bolesti kao glavni uzrok smrti tijekom sljedećih godina.⁷

Prijelaz normalnih u tumorske stanice uključuje velik broj genetskih promjena i nestabilnost staničnog ciklusa. Procjenjuje se da se u DNA sekvencama tumorskih stanica odvija nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća promjena. Procesi koji iniciraju, doprinose i propagiraju maligni fenotip prikazani su na slici 4.⁷



Slika 3. Model transformacije normalnih u tumorske stanice.

Zbog velikog broja oboljelih od raka, onkologija je postala vodeće područje farmaceutskih istraživanja s oko 650 lijekova u kliničkim testiranjima.¹⁸ Zbog centralne važnosti DNA u identifikaciji i funkcionalizaciji stanica, za dizajn i razvoj novih lijekova ključno je razumijevanje kinetike staničnog ciklusa i kontrole rasta normalnih i malignih stanica. Slika 5 prikazuje važne kontrolne točke staničnog ciklusa.⁷



Slika 4. Kontrolne točke staničnog ciklusa.

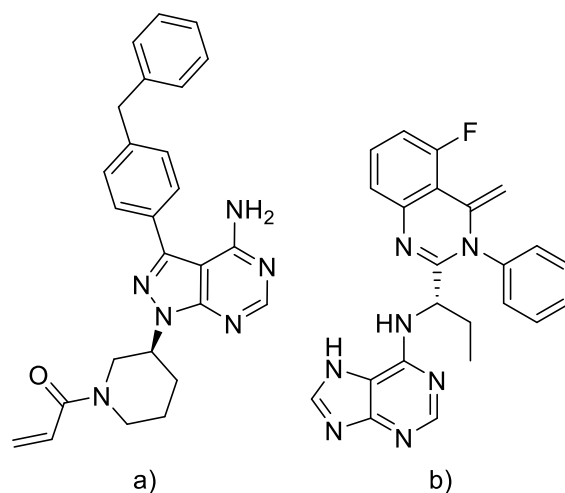
2.1. Biološke mete u antitumorskoj terapiji

Poznato je da se slobodni radikali redovito generiraju u našem tijelu i sudjeluju u širokom spektru vitalnih bioloških reakcija. Međutim, prekomjerne, odnosno kontinuirano visoke razine slobodnih radikala (oksidativni stres) povezane su s patogeneom ozbiljnih poremećaja poput raka. Visoke razine slobodnih radikala mogu oštetiti biomolekule poput enzima, lipida, proteina i DNA unutar stanica i tkiva što uzrokuje mutacije koje mogu rezultirati malignošću. Oštećenje DNA slobodnim radikalima općenito se smatra glavnim uzrokom raka, stoga je ograničavanje oksidativnog oštećenja sprječavanjem formiranja slobodnih radikala ili prekidanjem oksidativnih lančanih reakcija antioksidansima ili radikalskim 'skavenger' lijekovima dugo vremena bio osnovni terapijski pristup primarnoj prevenciji i tretmanu ove bolesti.¹⁹ Novija farmakološka i patološka istraživanja pokazuju da su proteinske kinaze važne mete u liječenju brojnih bolesti uključujući karcinom, upalne bolesti, poremećaje središnjeg živčanog sustava, kardiovaskularne bolesti i komplikacije u dijabetesu jer sudjeluju u brojnim staničnim aktivnostima, stoga su u posljednje vrijeme istraživanja usmjerena ka pronalasku inhibitora kinaza kao novih lijekova.^{20,21}

Proteinske kinaze tvore jednu od najvećih i funkcionalno najrazličitijih obitelji gena, a istraživanja pokazuju da imaju ključnu ulogu u proliferaciji tumorskih stanica kod ljudi te migraciji i preživljavanju neoplazija, stoga su onkološka farmakološka istraživanja sve više

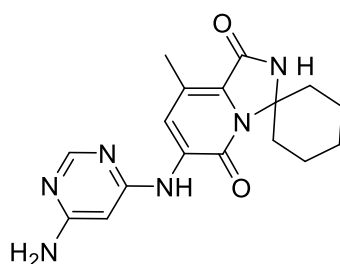
usmjerena ka pronalasku novih inhibitora kinaza za liječenje raka. Inhibitori kinaza specifično blokiraju djelovanje jedne ili više proteinskih kinaza i na taj način sprječavaju proliferaciju tumorskih stanica.²¹

Pionirska istraživanja kinaze fosforilaze 1950.-ih potaknula su brojna istraživanja na ovom području, a prekretnica je bilo odobrenje prvog inhibitora kinaza 2001. godine, imatiniba. Nakon toga je do 2015. godine FDA odobrila još 28 malih molekula kao inhibitora kinaza.²⁰



Slika 5. Strukture odobrenih inhibitora kinaza: a) inhibitor serin/treonin-kinaze ibrutinib, b) inhibitor PI3K-kinaza idelalisib.

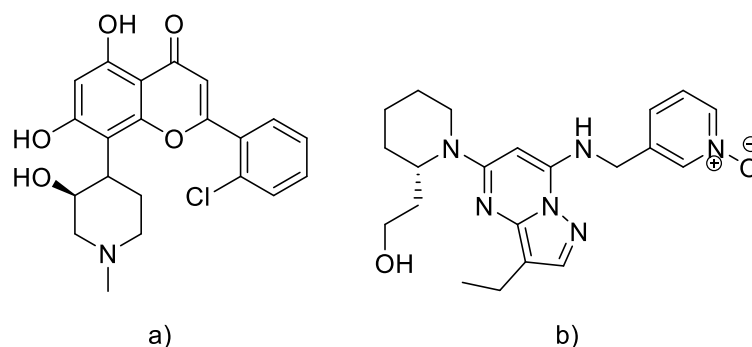
Jedna od potencijalnih meta u antitumorskoj terapiji su mitogen-aktivirane proteinske kinaze (MAPK), budući da selektivna inhibicija kinaza MAP ograničava signalizaciju vođenu onkogenima. Do danas ne postoji lijek odobren od strane FDA koji djeluje specifično na MAPK, a tomivosertib je trenutno u fazi II kliničkih ispitivanja za tu namjenu.⁶



Slika 6. Struktura tomivorsetiba, inhibitora MNK1/2 kinaza.

Kinaze ovisne o ciklinu (CDK) se formiraju u specifičnim dijelovima staničnog ciklusa i odgovorne su za fosforilaciju i regulaciju ključnih kontrolnih točaka u staničnom

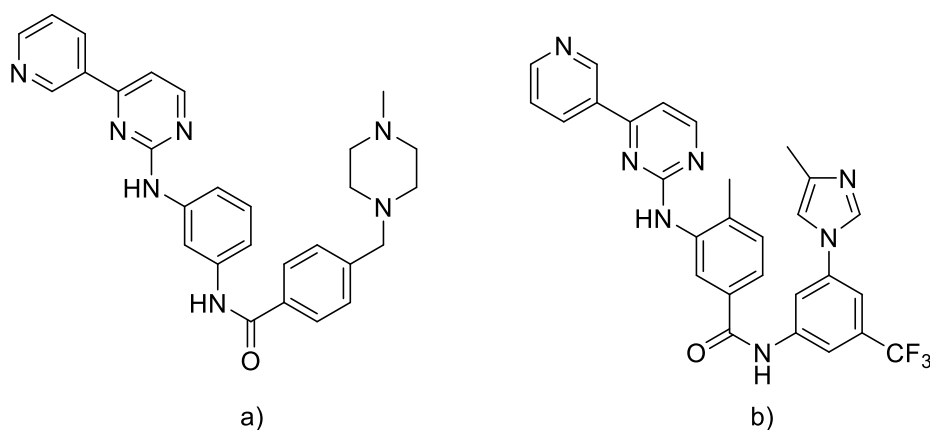
ciklusu, odnosno G1/S i G2/M prijelaza. Razvoj tumora povezuje se i s gubitkom kontrole u ovim kontrolnim točkama, pa su CDK važne mete za razvoj farmakološki značajnih spojeva.²²



Slika 7. Struktura inhibitora CDK: a) flavopiridol, b) dinaciclib.

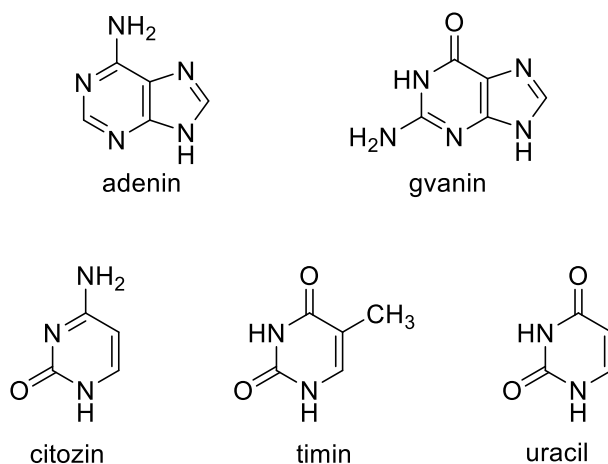
2.2. Biološki važni heterocikli dušika

Heterociklički spojevi čine najveću skupinu organskih spojeva,²³ a među njima najvažniju ulogu imaju dušikovi heterocikli koji su najznačajnije komponente farmaceutika. Naime, 59% lijekova odobrenih od strane FDA u svojoj strukturi sadrži dušikov atom.²⁴



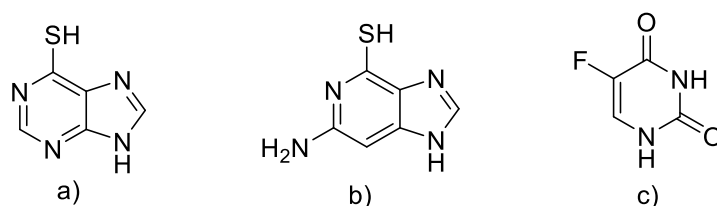
Slika 8. Onkološki lijekovi bazirani na dušikovim heterociklima: a) imatinib, b) nilotinib.

Također, sastavni su dijelovi brojnih prirodnih spojeva poput nukleobaza (slika 11), vitamina B-kompleksa, porfirina, biološki aktivnih spojeva izoliranih iz morskih organizama i mnogih drugih.²⁵

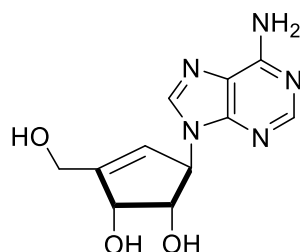


Slika 9. Purinske i pirimidinske nukleobaze.

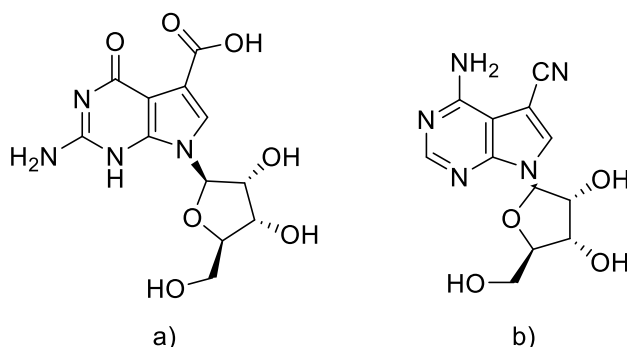
Nukleobazni analozi, koji su strukturno, metabolički i farmakodinamički slični, pokazuju različite biološke aktivnosti kao što su antitumorska, antivirusna, antifungalna i antibakterijska zahvaljujući inhibiciji enzima koji sudjeluju u proliferaciji stanica. Budući da induciraju apoptozu tijekom rasta i dijeljenja stanica te na taj način djeluju inhibitorski na stanice raka, temeljne su strukture unutar mnogih postojećih antitumorskih lijekova te su poželjni u dizajnu i razvoju novih agenasa. Primjerice, nukleobazni analog 5-fluorouracil koristi se u liječenju različitih vrsta karcinoma, a derivati purinskih nukleobaza 6-merkaptopurin i 6-tiogvanin za liječenje akutne limfoblastične leukemije²⁶ i autoimunih bolesti, te su djelotvorni i protiv kolitisa, psorijaze i reumatoidnog artritisa.²⁷

Slika 10. Strukture nukleobaznih lijekova. a) 6-merkaptopurin, b) 6-tiogvanin i c) 5-fluorouracil.²⁸

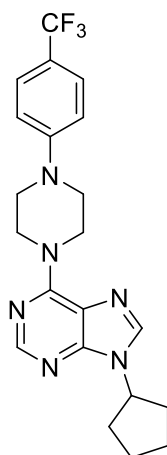
Nukleozidi su osnovne građevne jedinice DNA i RNA,²³ a građeni su upravo od dušikovih heterocikla, purinskih baza adenina i gvanina te pirimidinskih baza citozina, timina i uracila, povezanih na šećer ribozu ili deoksiribozu.²⁵ Nukleozide, kao i nukleobaze, ne nalazimo u prirodi, već oni postoje u obliku različitih derivata. Neplanocin A (slika 13) je prirodni nukleozidni analog koji pokazuje antivirusnu i antitumorsku aktivnost.²⁹

Slika 11. Struktura neplanocina A.²⁹

Bioizosterna zamjena česta je strategija u medicinskoj kemiji za promjenu strukture postojećeg spoja kako bi se poboljšala njegova farmakološka, fizikalno-kemijska i ADMET svojstva³⁰ te se pokazala djelotvornom u razvoju novih biološki aktivnih spojeva.¹⁵ Razvoj nukleinskih kiselina i nukleozidnih analoga za medicinsku upotrebu bioizosternom zamjenom imao je velik utjecaj na antivirusnu i antitumorsku kemoterapiju. Na taj su način uspješno razvijeni mnogi nukleozidni analozi za liječenje oboljenja uzrokovano virusom HIV-a, vhepatitisa B i C, herpes simpleks virusa, citomegalovirusa i varicella zoster virusa. Nadalje, nukleozidni su analozi jedni od prvih upotrijebljenih onkoloških lijekova, a do danas je razvijeno više nukleozidnih lijekova za primjenu u antitumorskoj terapiji, među kojima su kladribin, klofarabin, kapecitabin, citarabin, fludarabin, gemcitabin, decitabin, fluksoridin,³¹ tojokamicin i pemetreksed.²⁴

Slika 12. Primjeri nukleozidnih antitumorskih lijekova: a) tojokamicin b) pemetreksed.²⁴

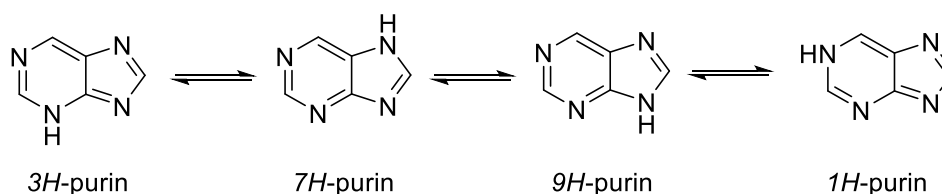
Strukturalna raznolikost nukleozidnih mimetika s antitumorskom i antivirusnom aktivnošću ukazuje da je svaki novi nukleozidni analog vrijedno istražiti.³¹ Vođeni time, Demir i suradnici sintetizirali su nove nukleozidne analoge, a spoj prikazan na slici pokazao je izvanrednu antitumorsku aktivnost protiv stanične linije raka jetre Huh7 ($IC_{50} = 0,2 \mu M$), raka debelog crijeva HCT116 ($IC_{50} < 0,1 \mu M$) i raka dojke T47D ($IC_{50} < 0,1 \mu M$) te se pokazao aktivnijim od standardnog lijeka kladribina ($IC_{50} = 1,8 \mu M$ za Huh7; $0,3 \mu M$ za HCT116 i $0,7 \mu M$ za T47D).²⁶



Slika 13. Nukleozidni analog s istaknutom antitumorskom aktivnošću.²⁶

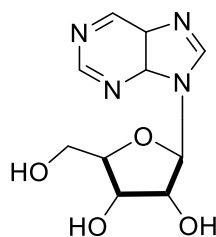
2.3. Purini

Purin (imidazo[4,5-*d*]pirimidin) je najrasprostranjeniji N-heterociklički spoj u prirodi i jedan od najraširenijih heterocikla općenito, a prvi ga je sintetizirao nobelovac Emil Fisher 1989. godine.^{32,33} Može se nalaziti u četiri tautomerna oblika: 1*H*, 3*H*, 7*H* i 9*H* (slika 17).³⁴



Slika 14. Strukturni prikaz tautomera purina.³⁵

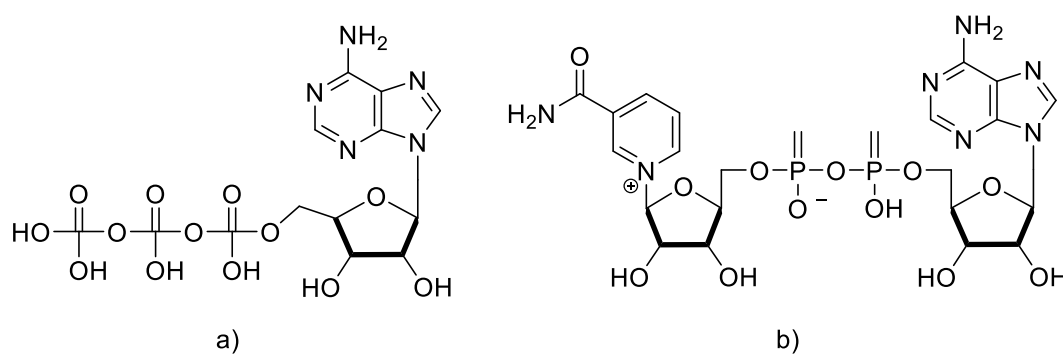
Nesubstituirani purini ne postoje u prirodi: najjednostavniji purin koji se može pronaći u prirodi je β -D-ribonukleozid nebularin, nukleozidni antibiotik izoliran iz gljivice *Agaricus nebularis*.³²



Slika 15. Struktura nebularina, najjednostavnijeg prirodnog purina.³²

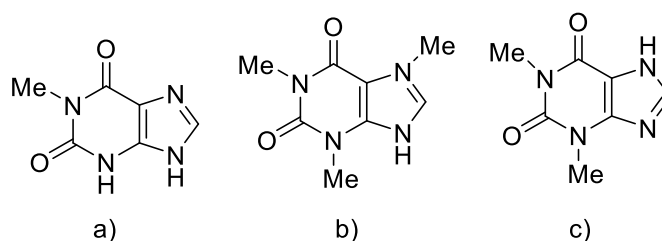
Purini su temeljne strukture brojnih biološki važnih molekula kao što su nukleozidi koji grade DNA i RNA, ATP, cAMP, NAD⁺, FAD, i acetil-koenzim A.^{7,36} Te molekule

sudjeluju u brojnim staničnim procesima zahvaljujući karakterističnoj strukturi purinske baze koja omogućava da ju specifično prepoznaju mnogi enzimi i receptori³⁷ i od iznimne su važnosti za normalno funkcioniranje živih stanica. Primjerice, adenzin-5'-trifosfat (ATP) služi za skladištenje energije u stanicama živih bića, adenzin-3',5'-ciklofosfat (cAMP) kontrolira aktivaciju proteinskih kinaza i razinu K^+ iona u stanicama te sudjeluje u transkripciji drugih metaboličkih procesa, dok su NAD^+ i FAD koenzimi koji sudjeluju u staničnim redoks procesima.^{AT} Nadalje, citokinini su prirodni spojevi koji se nalaze u biljkama. To su adeninski derivati koji na N6 položaju sadrže aromatske ili izoprenoidne bočne lance te su esencijalni za staničnu diobu i regulaciju rasta i razvoja biljaka.^{AB}



Slika 16. Strukture biološki važnih molekula baziranih na purinima: a) ATP b) NAD^+ .

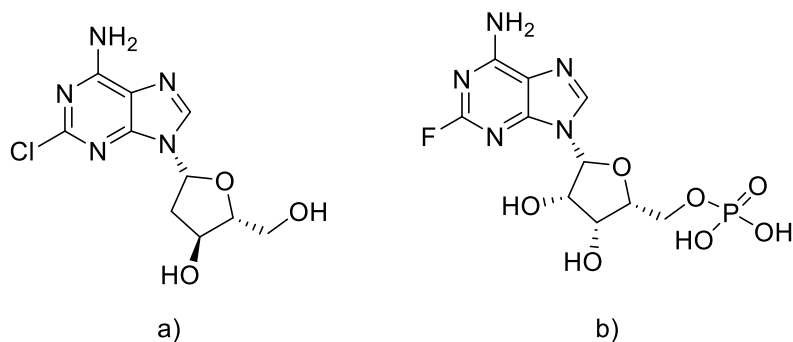
Purinski derivati se mogu pronaći i u mnoštvu drugih prirodnih spojeva. Primjerice, kofein koji je sastojak kave i listova čaja, u osnovi je purinski alkaloid. U sastavu listova čaja se, osim kofeina, nalaze i drugi purinski derivati, poput teofilina, koji je snažan diuretik. Također, jedna od glavnih komponenti ljudskog urina je 1-metilksantin, čija se struktura temelji na purinskom prstenu.³²



Slika 17. Strukture a) 1-metilksantina b) kofeina c) teofilina.

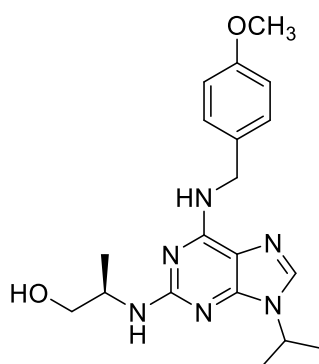
Osim presudne uloge purina u strukturama DNA i RNA te drugih važnih biomolekula, oni su konstituenti mnogih spojeva koji pokazuju antitumorsku, antivirusnu, antimikrobnu, protuupalnu, antimalarijsku i druge biološke aktivnosti, stoga je derivatizacija i

funkcionalizacija purinske jezgre važna strategija u razvoju lijekova.¹⁹ Prva istraživanja purinskih derivata koja su 1942. godine započeli Hitchings i Elion identificirala su analoge purinskih baza kao antileukemijske i imunosupresivne spojeve. Njihov je rad doveo do otkrića lijekova za maligna oboljenja, 6-merkaptopurina i 6-tiogvanina i imunosupresivnog lijeka azatioprina, ali je potaknuo i mnoga druga istraživanja na ovom području. Među važnim purinskim lijekovima su kladribin koji se koristi za liječenje leukemije i fludarabin koji je postao standardni lijek za kroničnu limfocitičnu leukemiju i folikularne limfome.⁷



Slika 18. Strukture purinskih lijekova. a) kladribin b) fludarabin.

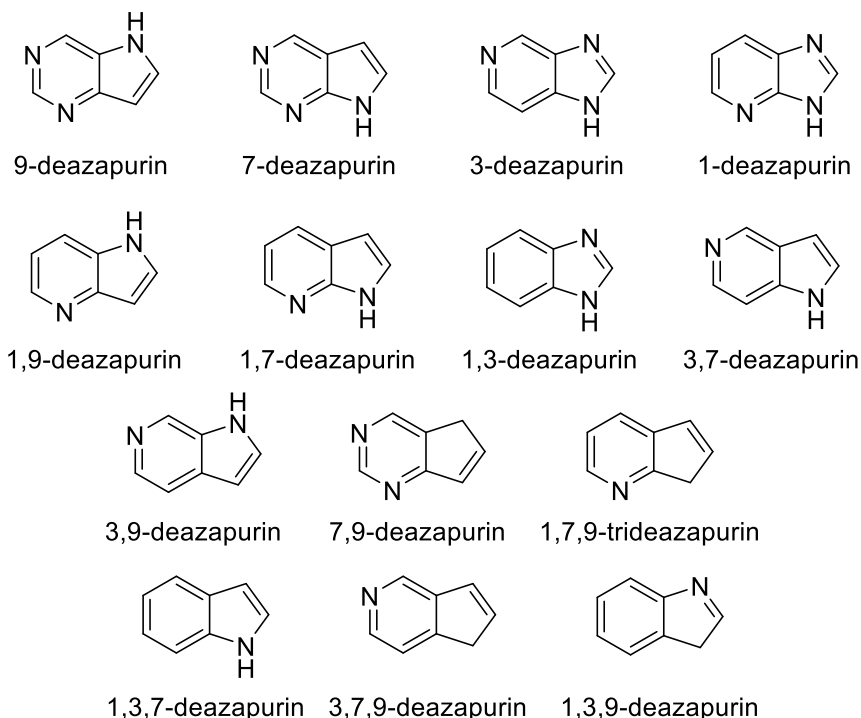
Budući da su purinski nukleozidi potencijalni inhibitori različitih kinaza, antagonisti receptora adenzina te inhibitori kolinesteraza,³⁷ ti su spojevi pokazali snažnu antitumorsku aktivnost te su odlični kandidati za dizajniranje i razvoj novih inhibitora kinaza.⁷ Roskovitin je, primjerice, inhibitor CD kinaza koji je dosegnuo klinička ispitivanja za liječenje raka nemalih stanica pluća.³⁸



Slika 19. Struktura roskovitina, kandidata za lijek protiv raka.

2.3.1. Deazapurini

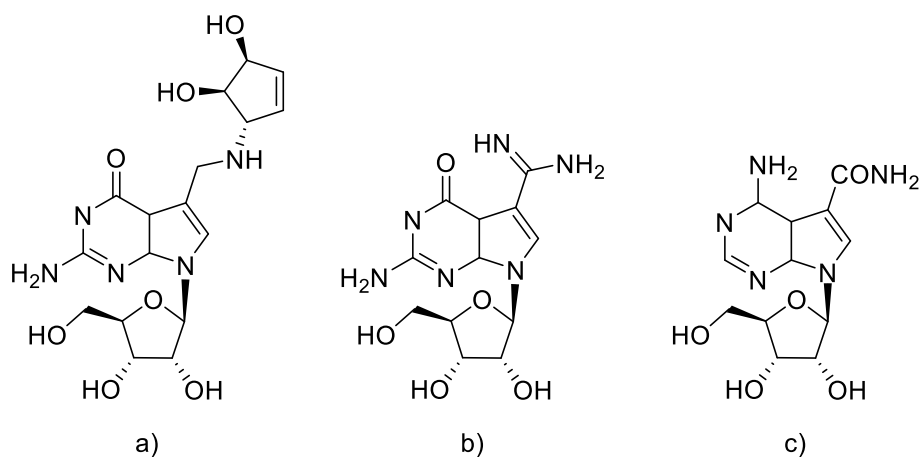
Deazapurini su purinski izosteri kojima je dušikov atom zamijenjen ugljikovim atomom (slika 24). Derivati deazapurina pokazuju širok spektar biološkog djelovanja poput antitumorskog, antivirusnog i antituberkuloznog.³⁹



Slika 20. Strukture deazapurinskih izostera.

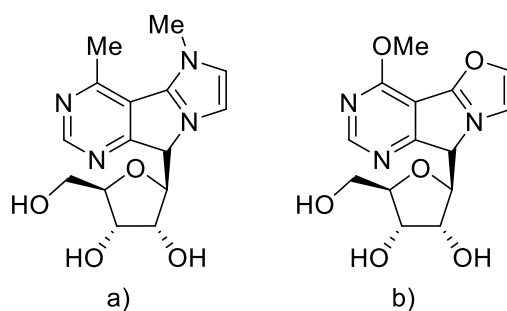
2.3.2. 7-deazapurini

7-deazapurini su važni analozi purinskih nukleobaza⁴⁰ i komponente velikog broja bioloških molekula.⁴¹ Zamjena N-7 dušikovog atoma ugljikovim čini peteročlani prsten bogatijim elektronima i donosi mogućnost vezanja dodatnih supstituenata na položaj C-7.⁴⁰ Do danas je sintetiziran velik broj deazapurina,⁴¹ a neki 7-deazapurinski nukleozidni analozi mogu se pronaći i u prirodi, kao nukleozidi i kao komponente nukleinskih kiselina. Kvenozin i arheozin primjeri su 7-deazapurinskih nukleozida izoliranih iz t-RNA prokariotskih i eukariotskih stanica te arheja (Archaeobakterija), dok su tubercidin, tojokamicin i sangivamicin sa citostatskim djelovanjem izolirani iz *Streptomyces* kultura.⁴⁰ Tojokamicin je ujedno i prvi 7-deazapurin opisan u literaturi 1956.⁴¹



Slika 21. Prirodni 7-deazapurinski derivati. a) kvenozin, b) arheozin, c) sangivamicin.⁴⁰

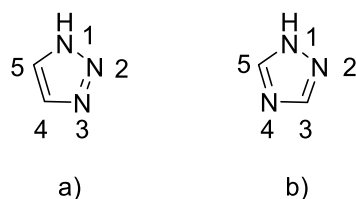
7-deazapurinski derivati pokazuju herbicidnu, antibakterijsku, antifungalnu i antineoplastičnu aktivnost, zbog čega su posebno prikladni za ugradnju u terapijske agense.⁴¹ Istraživanja su pokazala da derivatizacija deazapurinske jezgre različitim supstituentima i izmjena položaja dušikovog atoma snažno utječu na biološka svojstva spojeva.⁴² Vođeni tom spoznajom, Tokarenko i suradnici su sintetizirali nove 7-deazapurinske derivate, od kojih su neki pokazali izražena antitumorska svojstva (slika 26).⁴³



Slika 22. Novi 7-deazapurinski derivati s izraženom antitumorskom aktivnošću: a) $IC_{50} = 0,33 \mu M$ za karcinom debelog crijeva HCT116, b) $IC_{50} = 1,93 \mu M$ za karcinom pluća A549.

2.4. Triazoli i *klik* kemija

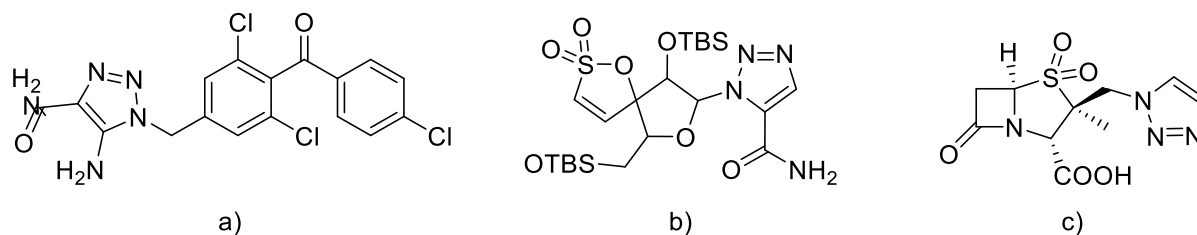
Triazol, poznat i kao pirodiazol, organski je peteročlani heterociklički spoj koji sadrži tri dušikova i dva ugljikova atoma te dvije dvostruke veze. Najjednostavniji oblik triazolnih spojeva je sam triazol koji postoji u dva izomerna oblika: 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol.^{44,45}



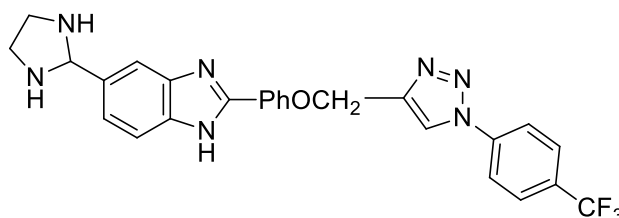
Slika 23. Izomerni oblici triazola: a) 1,2,3-triazol, b) 1,2,4-triazol.

1,2,3-triazoli su stabilni prema oksidaciji i redukciji, kao i prema hidrolizi u kiselom i lužnatom mediju, otporni su prema metaboličkoj razgradnji i imaju veliki dipolni moment (oko 5D)^{45,46} te su sastavni dio brojnih prirodnih produkata i medicinskih agenasa.⁴⁵ Jedinstvena struktura triazola kao aromatskog, elektronima bogatog dušikovog heterocikla⁸ koji može aktivno sudjelovati u formiranju vodikovih veza te u dipol-dipol i π -interakcijama^{45,46} omogućava njegovim derivatima lako vezanje s različitim enzimima i receptorima u biološkom sustavu, stoga oni pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti⁸ poput antimikrobne, protuupalne, analgetske, antiepileptičke, antivirusne, antihipertenzivne, antimalarijske, antidepresivne, antihistaminične, antituberkulozne, antioksidativne, antidijabetske, antitumorske i antiproliferativne.^{17,44} 1,2,3-triazolni derivati koriste se i za optičko izbjeljivanje, kao antioksidansi, inhibitori korozije, aditivi u bojilima i pigmentima, agrokemikalije i farmaceutici.^{44,47}

Upravo zbog brojnih aktivnosti triazolnih derivata, medicinski kemičari smatraju sintezu heterocikla temeljenih na 1,2,3-triazolima značajnom strategijom u razvoju lijekova. U prilog tome ide činjenica da se već početkom 20. stoljeća počela istraživati mogućnost upotrebe 1,2,3-triazolil(4,5-d)pirimidina (8-azapurina) za liječenje raka i malignih tumora.⁴⁵ Sve više triazolnih derivata niske toksičnosti, manje izraženih nuspojava, velike biodostupnosti, dobrih farmakokinetičkih svojstava i širokog spektra djelovanja postaju kandidati za lijekove protiv različitih vrsta bolesti.⁸

Slika 24. Lijekovi koji u strukturi sadrže 1,2,3-triazol: a) protutumorski CAI, b) antivirusni TSAO, c) antibakterijski tazobaktam.⁴⁵

Osim što je centar aktivnosti brojnih biološki aktivnih molekula, triazolni prsten može se koristiti kao poveznica za kombinaciju više farmakofora kako bi se dobile inovativne bifunkcionalne molekule.⁸ Vođeni time, Bistrović i suradnici sintetizirali su nove spojeve u kojima su koristili 1,2,3-triazolni prsten kao poveznicu između dva farmakofora te su im testirali antitumorsku aktivnost. Spoj prikazan na slici 30 pokazao je snažniju aktivnost od standardnog lijeka, 5-fluorouracila, na stanične linije adenokarcinoma A549 i raka grlića maternice HeLa.⁴⁸



Slika 25. Novosintetizirani hibrid koji je pokazao snažnu antitumorsku aktivnost protiv stanične linije A597 ($IC_{50} = 0,59 \mu M$) i HeLa ($IC_{50} = 2,69 \mu M$).

Triazolni sustav može se dobiti različitim metodologijama sinteze,⁴⁹ a danas se najčešće pripremaju *klik* reakcijom između azida i terminalnih alkina.⁴⁵

Pojam *klik* kemije kao novog pristupa organskoj sintezi uveli su 2001. godine Sharpless i suradnici,⁵⁰ a odnosi se na regioselektivne reakcije visokih iskorištenja koje su neosjetljive na kisik i vodu i provode se pri jednostavnim uvjetima bez otapala ili uz otapalo koje je bezopasno i lako se uklanja. Početni materijali i reagensi moraju biti lako dostupni, izolacija produkta, ukoliko je potrebna, trebala bi biti nekromatografskim metodama, a sam produkt mora biti stabilan u fiziološkim uvjetima.^{51,52}

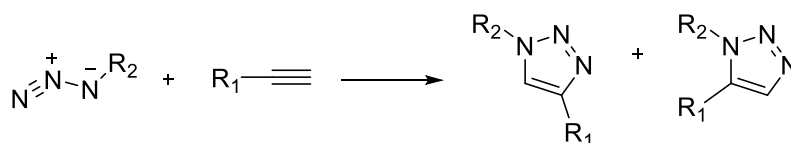
Postoje 4 skupine *klik* reakcija:

- Cikloadicije – primarno se odnose na 1,3-dipolarnu cikloadiciju, ali uključuju i hetero-Diels-Adlerove cikloadicije
- Nukleofilno otvaranje prstena – odnose se na otvaranje napetih heterocikličkih elektrofila poput aziridina, epoksida i sl.
- Karbonilna kemija ne-adolnog tipa – primjerice formiranje ureje, hidrazona, amida, aromatskih heterocikla itd.
- Adicije na višestruke ugljikove veze – epoksidiranja, aziridiniranja, dihidroksiliranja itd.⁵¹

Predvodnica među njima je reakcija cikloadicije između azida i terminalnih alkina,⁵⁰ koja se primjenjuje u različitim područjima istraživanja uključujući znanost materijala, polimernu kemiju i farmaceutske znanosti.⁵¹

2.4.1. Huisgenova cikloadicija

1,3-dipolarna cikloadicija između azida i terminalnih alkina, poznata kao Huisgenova cikloadicija, otkrivena je još početkom 20. stoljeća, ali njezin je mehanizam opisao Huisgen tek 1960.-ih godina.⁴⁵ Praktična važnost ovog procesa proizlazi iz jednostavnosti povezivanja azida i alkina u organski spoj i relativne stabilnosti nastalih produkata prema reakcijskim uvjetima.⁵³



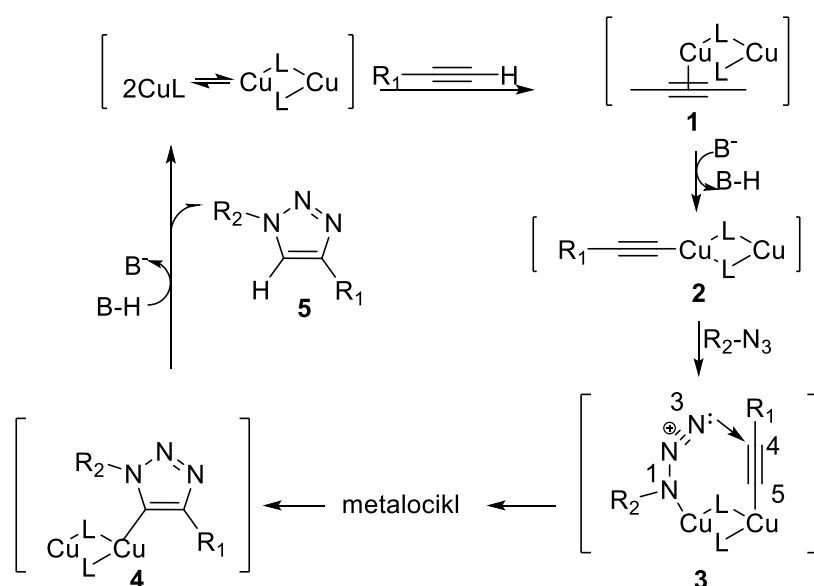
Shema 1. Reakcija Huisgenove cikloadicije.⁵⁴

Međutim, kao produkt ove reakcije nastaje smjesa 1,4- i 1,5-regioizomera, stoga ona u početku nije ulazila u definiciju *klik* kemije. Otkriće mogućnosti katalize ove reakcije bakrom (I) dovelo je do evolucije od snažnijih reakcijskih uvjeta i nastajanja smjese regioizomera do regioselektivne reakcije koja se provodi pri sobnoj temperaturi i u kraćem vremenu.⁵²

2.4.2. 1,3-dipolarna cikloadicija katalizirana bakrom (I)

Bakrom katalizirana reakcija 1,3-dipolarne cikloadicije između azida i terminalnih alkina udovoljava svim kriterijima *klik* kemije⁵¹ te je zbog specifičnosti, pouzdanosti i biokompatibilnosti postala njenim zlatnim standardom.^{4,55} Obično ne zahtijeva povišenje temperature, ali se može provoditi u širokom temperaturnom rasponu (0-160 °C) i u različitim otapalima (uključujući vodu) te pri različitim pH vrijednostima. Ne ovisi o steričkim faktorima – u reakciji mogu sudjelovati različiti supstituirani primarni, sekundarni, tercijarni i aromatski azidi, kao i različiti alkini.⁵¹ Neosjetljiva je na oksidaciju, redukciju i hidrolizu te se može odvijati u vodenom ili organskom mediju, u otopini ili u čvrstoj fazi.⁵⁶ Odvija se 10⁷ puta brže od nekatalizirane reakcije, a pročišćavanje produkata uglavnom se odvija putem filtracije. Kao produkt nastaje samo 1,4-regioizomer⁵¹ koji je inertan prema reakcijskim uvjetima te je umjerene polarnosti.⁵⁶ Mehanizam reakcije prikazan je na shemi 2. Prvi korak reakcije uključuje π -kompleksiranje Cu(I) dimera na alkin (**1**), iz čega nakon deprotoniranja

terminalnog vodika nastaje bakrov acetilid (**2**), kao međuprodukt. π -kompleksiranje Cu(I) smanjuje vrijednost pKa terminalnog alkina za čak 9,8 pH jedinica, što omogućava deprotoniranje u vodenom mediju bez baze. U sljedećem stupnju, N(1) dušik azida pomiče ligand vezan za drugi bakar dimera u bakrovom acetilidu te nastaje međuprodukt **3**. Time se aktivira azid za nukleofilni napad. Zbog neposredne blizine i elektronskih faktora, dušik N(3) lako napada ugljik C(4) alkina pri čemu nastaje metalocikl koji se steže kad slobodni par elektrona dušika N(1) napadne ugljik C(5) i nastaje kompleks triazola s bakrovim dimerom (**4**). Protoniranjem se otpušta bakrov dimer iz triazolnog produkta (**5**) te ulazi u drugi katalitički ciklus.⁵¹



Shema 2. Mehanizma reakcije CuAAC.⁵¹

Regioizomerni 1,5-disupstituirani 1,2,3-triazoli nastaju ukoliko se reakcija katalizira magnezijevim acetilidom ili rutenijem (RuAAC).⁴⁷ Osnovna je razlika u mehanizmu to što ne nastaje rutenijev acetilid kao međuprodukt. U prvom se stupnju stvara aktivirani kompleks, nakon čega slijedi oksidativno povezivanje terminalnog dušika azida i ugljika iz alkina pri čemu nastaje rutenacikl. On podliježe reduktivnoj eliminaciji, pa kao konačan produkt nastaje 1,5-disupstituirani 1,2,3-triazol te regenerirani katalizator za sljedeći ciklus.⁵⁷

Uporaba bakra (I) kao katalizatora za dobivanje 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola zahtijeva neoksidativne uvjete, pa su Hein and Fokin razvili alternativu gdje se katalizator generira *in situ* koristeći bakar (II) soli u prisutstvu blagog reducensa. Najčešće se koriste bakrov sulfat pentahidrat ili bakrov acetat uz natrijev askorbat,⁴⁵ hidrokinon ili tris(karboksietil)fosfin kao reducense. Reducensi ne samo da reduciraju Cu(II) u aktivnu

formu Cu(I) iona za reakciju, već i reduciraju prisutne dioksidi i smanjuju nastanak oksidativnih nusprodukata.⁵⁸ Bakar (I) također se može dobiti *in situ* disproporcioniranjem elementarnog bakra sa solima Cu(II).⁴⁷

Kumar i suradnici su proveli reakciju sinteze triazola u vodi kao mediju i uz upotrebu nanočestica bakrovog ferita kao katalizatora. Reakcijom su nastali samo 1,4-disupstituirani regioizomeri, a katalizator se iz reakcijske smjese izdvojio pomoću vanjskog magneta.⁴⁹ Znanstvenici su pokazali da se kao katalizatori mogu uspješno koristiti i srebro, zlato, iridij, nikel, cink, samarij, neodimij, itrij i gadolinij,⁵⁹ međutim bakar u obliku Cu(I) iona se pokazao kao najefikasniji katalizator za ovu reakciju,⁵⁷ a njegova se upotreba preferira i zbog niske cijene i jednostavne primjene.⁵²

2.4.3. Nedostatci reakcije CuAAC

Ukoliko je azid siromašan elektronima, energija njegovog temeljnog stanja bit će preniska da bi reagirao s terminalnim alkinom, te neće doći do reakcije. Do reakcije neće doći niti kada je azid previše bogat elektronima, a to zahtijeva funkcionalne skupine koje nisu uobičajene u biološkim sustavima ili administriranim lijekovima, pa se rijetko događa.

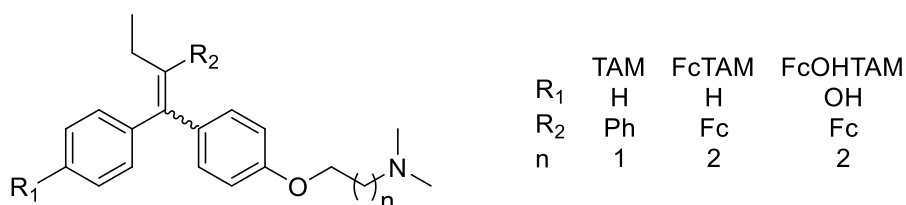
Drugi problem je samoreaktivost alkina, odnosno reakcija između dva alkina, što se uglavnom može izbjeći upotrebom sterički velikih baza. Ograničenje može biti i stabilnosti nekih azida, jer općenito vrijedi da su spojevi u kojima je broj dušikovih atoma veći od broja ugljikovih atoma vrlo nestabilni. To ne predstavlja veliki problem u farmaceutskoj industriji u kojoj se uglavnom radi s velikim molekulama s visokim sadržajem ugljika. Uzimajući u obzir zahtjeve farmaceutske industrije, jedan od najočitijih nedostataka je upotreba bakra. Iako ljudsko tijelo treba bakar kako bi funkcioniralo, pretjerani unos ovog metala može dovesti do drastičnih posljedica kao što su hepatitis, neurološki poremećaji, bolesti bubrega i Alzheimerova bolest.⁵¹

2.5. Organometalni spojevi

Jednu od mogućnosti u razvoju novih, djelotvornijih i sigurnijih kemoterapeutika predstavljaju⁵ organometalni kompleksi prijelaznih metala.⁶⁰ Područje istraživanja koje uključuje organometalne spojeve u biologiji i medicini naziva se bioorganometalna kemija,⁶¹ a privlači veliku pozornost zbog karakterističnih svojstava organometalnih kompleksa koja im omogućuju inhibiciju kinaza i drugih enzima te metalnu koordinaciju na njihova aktivna

mjesta. Osnovna je razlika između koordinacijskih i organometalnih spojeva direktna kovalentna veza Me-C u organometalima koja se povezuje s niskim stupnjem oksidacije,⁶⁰ pa ovisno o vrsti kojoj kompleks pripada spojevi pokazuju različita svojstva i mehanizam djelovanja. Primjerice, platinski lijekovi zahtijevaju aktivaciju i primarna im je meta najčešće DNA, dok organometalni spojevi, koji su lipofilniji i imaju kovalentnu vezu Me-C, djeluju drugačije na proteinske mete.⁵

Uvođenje metalnog atoma koji može imati različita oksidacijska stanja u strukturu molekula omogućava sintezu velikog broja novih spojeva sa svojstvima različitim od tipičnih organskih spojeva. Ovisno o prirodi veze metal-ligand moguće je razviti različite bioaktivne organometalne spojeve koji sadrže kovalentne veze metal-ugljik i/ili labilne ligande.⁶² U potrazi za medicinski zanimljivim organometalnim spojevima, za središnji položaj u kompleksu promatrani su mnogi metali poput Au, Ru, Os, Re, Tc, Rh, Ir, Ti.⁵ Među mogućim organometalnim kompleksima, kompleksi željeza su značajni zahvaljujući prisutnosti velike količine ovog metala u ljudskom tijelu i karakterističnog svojstava ferocena, kompaktnog i stabilnog aromatskog metalocena.⁶⁰ Prva istraživanja u polju bioorganometalne kemije proveli su Jaouen i suradnici koji su sintetizirali ferocenilne analoge tamoksifena, ferocifen i hidroksiferocifen, te su pokazali da su ti spojevi djelotvorniji od samog tamoksifena protiv hormonski ovisnog i hormonski neovisnog raka dojke. Ovo je otkriće rezultiralo ogromnim interesom za dizajniranjem i sintezom novih struktura temeljenih na ferocenima u razvoju lijekova, posebno antitumorskih.¹⁴



Slika 26. Struktura tamoksifena (TAM), ferocifena (FcTAM) i hidroksiferocifena (FcOHTAM).⁶³

2.5.1. Feroceni

Ferocen, kemijske formule $\eta^5-(C_5H_5)_2Fe$, narančasta je kristalinična krutina dimagnetske prirode, izuzetno stabilna na sobnoj temperaturi, neosjetljiva na zrak i vodu. Sastoji se od dvije ciklopentadienilne jedinice koje se mogu slobodno rotirati, a između kojih se nalazi atom željeza. Svaki ugljikov atom ciklopentadienskog prstena međudjeluje s

metalnim centrom koji je jednako udaljen od oba prstena, a sve C-C veze su jednako dugačke. Istraživanja su također dokazala da su vodikovi atomi lagano nagnuti prema željezu jer taj pomak omogućava bolje preklapanje orbitala željeza s π -orbitalama ciklopentadienskog prstena.

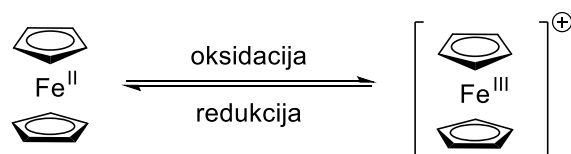


Slika 27. Struktura ferocena.⁶⁴

Ferocen ima svojstva aromatskog prstena i podliježe različitim elektrofilnim reakcijama poput Friedel-Craftsovog alkiliranja, Vilsmeierovih reakcija, reakcija merkuriranja karakterističnim za fenilni prsten i dr. Derivati ferocena koji imaju asimetrične supstituente uspješno su korišteni kao katalizatori za asimetričnu hidrogenaciju.⁶²

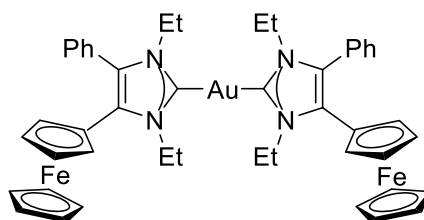
Otkrili su ga 1951. godine Pauson i Kealy. Zahvaljujući jedinstvenoj geometriji, promjenjivim redoks svojstvima i visokoj reaktivnosti, feroceni spojevi pronalaze široku primjenu u različitim područjima kao što su kataliza, kemija materijala, analitički senzori, nelinearna optika, bioorganometalna i biokemija, organska kemija i elektrokemija.¹⁴ Nadalje, zamjena arilne/heteroarilne strukture s ferocenskom jezgrom u organskim molekulama rezultira značajnim promjenama u molekulskim svojstvima poput topljivosti i hidrofilnosti/lipofilnosti, ali i povećava aktivnost biološki aktivnih spojeva.⁶² Relativna stabilnost ferocena u biološkom mediju i niska *in vivo* toksičnost njegovih derivata pridonijeli su razvoju ferocenskih derivata za antitumorsku terapiju. Robusnost ferocena u aerobnim uvjetima, lak pristup mnogim njegovim derivatima i pogodna elektrokemijska svojstva učinili su ga također povlaštenom strukturom za konjugaciju biomolekula poput aminokiselina, peptida, proteina, ugljikohidrata, DNA i RNA.⁶⁵

Iako mehanizam djelovanja ferocena još uvijek nije potpuno razjašnjen, smatra se da oksidacija ferocena u ferocenijski kation zahvaljujući redoks enzimima uzrokuje generiranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje oštećuju DNA, što rezultira staničnom smrću. Ovisno o prirodi ciklopentadienilnih supstancija, također su predloženi i drugi mehanizmi djelovanja, poput inhibicija topoizomeraze II, interakcija ferocena s p21 proteinom, fotoosjetljivost organometalnog spoja, povećano zračenje zbog prisutnosti metala i dr.⁶⁴ Općenito vrijedi da samo ferocenijske soli, u kojima željezo ima oksidacijski broj +3, pokazuju antitumorsku aktivnost.⁶²



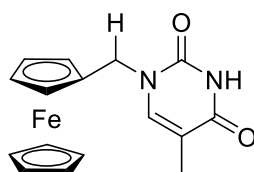
Slika 28. Prikaz oksidacijskih stana željeza u ferocenu.

U posljednje je vrijeme zbog poboljšane biološke aktivnosti u odnosu na monometalne komplekse značajnu pažnju pridobio razvoj heterobimetalnih kompleksa. Inkorporacija dvaju metalnih struktura u heterobimetalni kompleks pokazala se efikasnom strategijom u borbi protiv rezistentnosti prilikom čega jedan metalni centar djeluje protiv nekoliko meta u stanicama raka. Nadalje, sinergijski efekt dvaju metalnih centara u heterobimetalnom kompleksu ne samo da uzrokuje povećanu aktivnosti, već i poboljšava stabilnost i selektivnost protiv stanica raka. Primjerice, heterobimetalni kompleksi zlato (I) karbena s ferocenilnim derivatima prikazani na slici 35 induciraju apoptozu stanica raka proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i inhibicijom enzima tioredoksin-reduktaze (TxR).⁶⁶



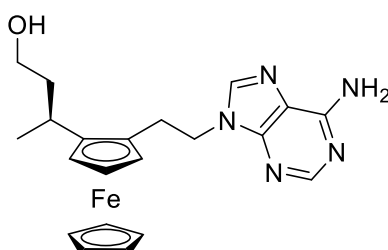
Slika 29. Heterobimetalni kompleks zlato (I) karbena i ferocena koji je pokazao antitumorsku aktivnost.

Primjeri organometalnih spojeva kao nukleozidnih analoga rijetki su u području medicinske bioorganometalne kemije,⁶⁷ stoga je važno sintetizirati iste kako bi se istražio biološki potencijal nukleozida koji sadrže metal i bolje razumjela uloga metalnog fragmenta.⁶⁸ Prve ferocenske derivate nukleobaza, *N*-9-ferocenilmetiladenina i *N*-6-ferocenilmetil adenina, sintetizirali su Chen i suradnici, a istraživanja na ovom području proveli su i Simenel i suradnici koji su sintetizirali ferocenilalkilne derivate nukleobaza (adenina, timina, citozina i 5-jodocitozina), od kojih je *N*-1-ferocenilmetiltimin pokazao snažnu aktivnost protiv adenokarcinoma (755).⁶⁹



Slika 30. Ferocenični derivat timina koji je pokazao antitumorsku aktivnost.

Nquyen i suradnici sintetizirali su bis-supstituirane ferocene, tzv. feronukleozde, koji sadrže nukleobazu i hidroksilnu skupinu, te su pokazali da su neki od njih aktivni protiv mišje leukemije (L1210), leukemije (CEM) i raka grlića maternice (HeLa).⁶⁸



Slika 31. Ferocenični analog adenina koji je pokazao snažnu antitumorsku aktivnost ($IC_{50} = 1,0 \mu\text{M}$ za L1210, $IC_{50} = 0,35 \mu\text{M}$ za CEM te $IC_{50} = 1,1 \mu\text{M}$ za HeLa).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sva korištena otapala pročišćavana su prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličina 3 Å. Za tankoslojnu kromatografiju (TLC) korištene su ploče 60F-254 presvučene slojem silikagela *Merck*, a za detekciju izoliranih komponenti korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm.

Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (*Fluka*, 0,063-0,2 mm). Staklene kolone punjene su pod utjecajem gravitacije, a kao eluens je korišten čisti diklormetan ili odgovarajuća smjesa diklormetan/metanol.

Točke tališta sintetiziranih spojeva određene su na instrumentu Kofler (*Reichert, Wien*) i nisu korigirane.

Spektri ^1H i ^{13}C NMR snimljeni su na spektrometru Bruker 300 i 600 MHz. Svi uzorci otopljeni su u DMSO-*d*6 i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u ^1H i ^{13}C NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema signalu tetrametilsilana na δ 0,0 ppm za ^1H i prema signalu DMSO δ 39,50 ppm za ^{13}C . Pojedine rezonancije su pridružene na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i H-H konstante sprege.

3.2. Priprava spojeva

3.2.1. Sinteza azidnih derivata ferocena (**13-15**)

1-Azidometilferocen (**13**)⁷⁰

Ferocen-metanol (**6**; 0,300 g; 1,4 mmol) i natrijev azid (0,555 g; 8,5 mmol) otope se u ledenoj octenoj kiselini (16 mL; 280 mmol). Reakcijska smjesa grije se 3 sata na 50°C uz upuhivanje argona, a potom se ohladi na sobnu temperaturu i razrijedi sa 115 mL diklormetana. Nakon toga se ekstrahira zasićenom vodenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (3*50 mL) i na kraju s vodom (50 mL), te se organski sloj suši na magnezijevom sulfatu. Nakon pročišćavanja ekstrakcijom i sušenja izoliran je spoj **13** kao narančasto ulje (253 mg; 74,02 %). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 4,31 – 4,28 (2H, m, CH-Fc), 4,21 – 4,19 (7H, m, CH-Fc, Cp-Fc).

1-Azidoetilferocen (**14**)⁷⁰

1-metilferocen metanol (**7**; 0,300 g; 1,3 mmol) i natrijev azid (0,520 g; 8,0 mmol) otope se u ledenoj octenoj kiselini (16 mL; 265,7 mmol). Reakcijska smjesa grije se 3 sata na 50°C uz upuhivanje argona, a potom se ohladi na sobnu temperaturu i razrijedi sa 115 mL diklormetana. Nakon toga se ekstrahira zasićenom vodenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (3*50 mL) i na kraju s vodom (50 mL), te se organski sloj suši na magnezijevom sulfatu. Nakon pročišćavanja ekstrakcijom i sušenja izoliran je spoj **14** kao narančasto ulje (287 mg; 86,60%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 4,53 (1H, q, *J* = 6,7 Hz, CH), 4,30 – 4,25 (2H, m, CH-Fc), 4,25 – 4,15 (m, 7H, CH-Fc, Cp-Fc), 1,50 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, CH₃).

1-Azidoferocen (**15**)⁷¹

1-bromferocen (**8**; 0,300 g; 1,14 mmol) 4,783 g; 18,1 mmol) i CuCl (0,090 g; 1,2 mmol) se otope u 10 mL etanola. Natrijev azid (0,148 g; 2,28 mmol) se otopi u vodi i dokapa reakcijskoj smjesi, koja se potom zakloni sa svjetla i miješa na sobnoj temperaturi 48 sati. Nakon toga, smjesa se razrijedi s 10 mL vode i miješa još 10 minuta, a zatim ekstrahira dietil-eterom, te se organski sloj suši na magnezijevom sulfatu. Nakon pročišćavanja ekstrakcijom i sušenja izoliran je spoj **15** kao narančasto ulje (253 mg; 98%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 4,55 – 4,48 (2H, m, CH-Fc), 4,25 (5H, s, Cp-Fc), 4,22 – 4,17 (2H, m, CH-Fc).

3.2.2. Sinteza propargiliranih purinskih izostera (**16-21**)

Opći postupak

Odgovarajući purinski izoster (**9-12**) otopljen je u DMF-u (5–10 mL), te je dodan NaH (1 ekv.). Nakon pola sata dodan je propargil-bromid (1,2 ekv.) i reakcijska smjesa miješana je 3 sata na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije, otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom uz sustav diklormetan-metanol kao eluens.

9-(Prop-2-in-1-il)-9H-purin-6-amin (16)⁷²

Spoj **16** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz adenina (**9**; 500,0 mg; 3,70 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 20 : 1) izoliran je bijeli praškasti spoj **16** (467,8 mg; 73,0%; T.t. = 213–214 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,18 (1H, s, H2"), 8,17 (1H, s, H8), 7,25 (2H, s, NH₂), 5,02 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,44 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156,46 (C6), 153,15 (C2), 149,55 (C4), 140,54 (C8), 118,97 (C5), 78,74 (CCH), 76,26 (CH), 32,69 (CH₂).

4-Klor-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin (17)⁷²

Spoj **17** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz 6-klor-7-deazapurina (**10**; 800 mg; 5,21 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 : 1) izoliran je bijeli kristalinični spoj **17** (810,4 mg; 92%; T.t. = 133–135 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,69 (1H, s, H2), 7,82 (1H, d, *J* = 3,7 Hz, H5), 6,71 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H6), 5,17 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,46 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 150,8 (C4), 150,5 (C2), 150,1 (C7a), 130,7 (C6), 116,8 (C4a), 99,1 (C5), 78,3 (CCH), 75,8 (CCH), 33,7 (CH₂).

6-Klor-9-(prop-2-in-1-il)-9H-purin (18) i 6-klor-7-(prop-2-in-1-il)-7H-purin (19)⁷³

Spojevi **18** i **19** priređeni su prema prethodno opisanom općem postupku iz 6-klorpurina (**11**; 800 mg; 5,18 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 : 1) izoliran je bijeli kristalinični spoj **18** (549,3 mg; 59%; T.t. = 145–148 °C) i bijeli praškasti spoj **19** (140,3 mg; 15%; T.t. = 109–111 °C).

18: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,83 (1H, s, H2), 8,76 (1H, s, H8), 5,21 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,55 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 153,2 (C2), 151,34 (C6), 149,2 (C4), 130,7 (C5), 77,3 (CCH), 76,7 (CCH), 33,3 (CH₂).

19: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8,89 (1H, s, H2), 8,85 (1H, s, H8), 5,40 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,65 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161,6 (C6), 157,5 (C2), 152,0 (C8), 142,4 (C4), 121,8 (C5), 77,9 (CCH), 77,7 (CCH), 36,4 (CH₂).

2-Amino-6-klor-9-(prop-2-in-1-il)-9H-purin (20) i 2-amino-6-klor-7-(prop-2-in-1-il)-7H-purin (21)⁷⁴

Spojevi **20** i **21** priređeni su prema prethodno opisanom općem postupku iz 2-amino-6-klorpurina (**12**; 450,0 mg; 2,65 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izolirani su bijeli praškasti spoj **20** (192,8 mg; 35,05%, T.t.=248-250 °C) i bijeli praškasti spoj **21** (36,00 mg; 6,55 %; T.t.=74-76 °C).

20: ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,18 (1H, s, H8), 7,03 (2H, s, NH₂), 4,94 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,49 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160,40 (C2), 154,04 (C6), 150,00 (C4), 142,82 (C8), 123,55 (C5), 78,37 (CCH), 76,56 (CCH), 32,88 (CH₂).

21: ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,44 (1H, s, H8), 6,73 (2H, s, NH₂), 5,20 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH₂), 3,60 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, CCH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160,59 (C2), 154,22 (C4), 153,21 (C6), 150,55 (C5), 78,29 (CCH), 77,41 (CCH), 37,23 (CH₂).

3.2.3. Sinteza triazolnih derivata ferocena i purinskih izostera (**22-37**)

Opći postupak

U otopinu odgovarajućeg alkina purinskih izostera (**16-21**) u metanolu (5 mL) dodani su pripadajući ferocenski azid (**13-15**; 1,2 eq) i bakrov acetat (0,05 eq). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi, a tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom uz sustav diklormetan-metanol kao eluens.

6-Amino-9-(1-(1-ferocenmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen)-9H-purin (22)

Spoj **22** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **16** (100 mg; 0,58 mmol) i **13** (168 mg; 0,70 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂

: CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasti praškasti spoj **22** (132 mg; 76,84%; T.t.=106-108 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,18 (1H, s, H8), 8,12 (1H, s, H2), 8,07 (1H, s, H5'), 7,21 (2H, s, NH₂), 5,41 (2H, s, CH₂), 5,26 (2H, s, CH₂), 4,30 (2H, dd, *J* = 3,4, 1,6 Hz, CH-Fc), 4,17 – 4,14 (2H, m, CH-Fc), 4,13 (5H, s, Cp-Fc). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 155,91 (C6), 152,50 (C2), 149,21 (C4), 142,54 (C4'), 140,59 (C8), 123,05 (C5'), 118,51 (C5), 82,35 (Cq-Fc), 68,57 (CH-Fc), 68,56 (Cp-Fc), 68,26 (CH-Fc), 48,85 (CH₂), 37,96 (CH₂).

6-Amino-9-[1-(1-ferocenmetilmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-9H-purin (23)

Spoj **23** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **16** (100 mg; 0,58 mmol) i **14** (177 mg; 0,70 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasti praškasti spoj **23** (53,7 mg; 31,9%, T.t.=222-224 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,18 (1H, s, H8), 8,12 (1H, s, H2), 8,10 (1H, s, H5'), 7,21 (2H, s, NH₂), 5,66 (1H, q, *J* = 7,0 Hz, CH), 5,41 (2H, s, CH₂), 4,36 – 4,26 (1H, m, CH-Fc), 4,21 – 4,13 (3H, m, CH-Fc), 4,09 (5H, s, Cp-Fc), 1,79 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, CH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 155,91 (C6), 152,49 (C2), 149,21 (C4), 142,26 (C4'), 140,59 (C8), 121,61 (C5'), 118,49 (C5), 88,55 (Cq-Fc), 68,63 (Cp-Fc), 68,09 (CH-Fc), 67,63 (CH-Fc), 67,16 (CH-Fc), 66,19 (CH-Fc), 55,60 (CH), 37,97 (CH₂), 20,86 (CH₃).

6-Amino-9-[1-(1-feroceni-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-9H-purin (24)

Spoj **24** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **16** (100 mg; 0,58 mmol) i **15** (160 mg; 0,70 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasti praškasti spoj **24** (13,5 mg; 5,84%, T.t.>270 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,57 (1H, s, H8), 8,26 (1H, s, H5'), 8,15 (1H, s, H2), 7,27 (2H, s, NH₂), 5,49 (2H, s, CH₂), 5,01 (2H, s, CH-Fc), 4,33 (2H, s, CH-Fc), 4,19 (5H, s, Cp-Fc). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156,46 (C6), 153,17 (C8), 153,01 (C2), 149,87 (C4), 143,39 (C4'), 123,94 (C5'), 119,13 (C5), 93,79 (Cq-Fc), 70,38 (Cp-Fc), 67,08 (CH-Fc), 62,38 (CH-Fc), 38,46 (CH₂).

4-Klor-7-[1-(1-ferocenmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-7H-pirololo[2,3-*d*]pirimidin (25)

Spoj **25** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **17** (100 mg; 0,52 mmol) i **13** (150 mg; 0,62 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasto-smeđi uljasti spoj **25** (60,3 mg; 33,64%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,65 (1H, s, H2), 8,06 (1H, s, H5'), 7,80 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H6), 6,67 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5), 5,56 (2H, s, CH₂), 5,25 (2H, s, CH₂), 4,30 (2H, t, *J* = 1,8 Hz, CH-Fc),

4,18 – 4,14 2H, (m, CH-Fc), 4,12 (5H, s, Cp-Fc). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 151,12 (C4), 150,87 (C2), 150,82 (C7a), 143,04 (C4'), 131,77 (C6), 123,51 (C5'), 117,22 (C4a), 99,30 (C5), 82,83 (Cq-Fc), 69,08 (CH-Fc), 69,04 (Cp-Fc), 68,76 (CH-Fc), 49,35 (CH₂), 40,05 (CH₂).

4-Klor-7-[1-(1-ferocenmetilmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (26)

Spoj **26** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **17** (100 mg; 0,52 mmol) i **14** (159 mg; 0,62 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 40 :1) izoliran je narančasto-smeđi uljasti spoj **26** (82,64 mg; 35,58%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,65 (1H, s, H2), 8,09 (1H, s, H5'), 7,80 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 6,67 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 5,65 (1H, q, $J = 7,0$ Hz, CH), 5,56 (2H, s, CH₂), 4,33 – 4,28 (1H, m, CH-Fc), 4,17 – 4,15 (2H, m, CH-Fc), 4,08 (5H, H,s, Cp-Fc), 1,78 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 150,60 (C4), 150,36 (C2), 150,30 (C7a), 142,26 (C4'), 131,25 (C6), 121,58 (C5'), 116,70 (C4a), 98,82 (C5), 88,53 (Cq-Fc), 68,61 (Cp-Fc), 68,09 (CH-Fc), 67,62 (CH-Fc), 67,15 (CH-Fc), 66,21 (CH-Fc), 55,60 (CH), 39,54 (CH₂), 20,83 (CH₃).

4-Klor-7-[1-(1-ferocenil-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (27)

Spoj **27** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **17** (100 mg; 0,52 mmol) i **15** (142 mg; 0,62 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasto-smeđi uljasti spoj **27** (39,42 mg; 18,11%). ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,68 (1H, s, H2), 8,55 (1H, s, H5'), 7,81 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H6), 6,70 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H5), 5,64 (2H, s, CH₂), 5,00 (2H, t, $J = 1,9$ Hz, CH-Fc), 4,35 – 4,31 (2H, m, CH-Fc), 4,18 (5H, s, Cp-Fc). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 150,85 (C4), 150,39 (C2), 150,19 (C7a), 142,95 (C4'), 130,83 (C6), 123,33 (C5'), 116,83 (C4a), 99,33 (C5), 93,32 (Cq-Fc), 69,87 (Cp-Fc), 66,57 (CH-Fc), 61,86 (CH-Fc), 34,42 (CH₂).

6-Klor-9-[1-(1-ferocenmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-9H-purin (28)

Spoj **28** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **18** (55 mg; 0,28 mmol) i **13** (81 mg; 0,34 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasti praškasti spoj **28** (53,21 mg; 43,12%; T.t.=156-157 °C). ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,79 (1H, s, H8), 8,77 (1H, s, H2), 8,15 (1H, s, H5'), 5,60 (2H, s, CH₂), 5,26 (2H, s, CH₂), 4,30 (2H, t, $J = 1,8$ Hz, CH-Fc), 4,18 – 4,15 (2H, m, CH-Fc),

4,13 (5H, s, Cp-Fc). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152,15 (C6), 152,13 (C2), 149,53 (C4), 147,92 (C8), 142,18 (C4'), 131,22 (C5), 123,69 (C5'), 82,75 (Cq-Fc), 69,10 (CH-Fc), 69,05 (Cp-Fc), 68,78 (CH-Fc), 49,43 (CH₂), 39,42 (CH₂).

6-Klor-9-[1-(1-ferocenmetilmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-9H-purin (29)

Spoj **29** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **18** (100 mg; 0,52 mmol) i **14** (86 mg; 0,34 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasto-smeđi uljasti spoj **29** (55,54 mg; 23,98 %). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,79 (1H, s, H8), 8,78 (1H, s, H2), 8,16 (1H, s, H5'), 5,66 (1H, q, *J* = 7,0 Hz, CH), 5,60 (2H, s, CH₂), 4,31 (1H, s, CH-Fc), 4,17 (2H, d, *J* = 1,7 Hz, CH-Fc), 4,15 (1H, s, CH-Fc), 4,09 (5H, s, Cp-Fc), 1,78 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152,17 (C6), 152,12 (C2), 149,52 (C4), 141,95 (C4'), 131,21 (C5), 122,23 (C5'), 88,99 (Cq-Fc), 69,13 (Cp-Fc), 68,61 (CH-Fc), 68,15 (CH-Fc), 67,67 (CH-Fc), 66,70 (CH-Fc), 56,19 (CH), 39,42 (CH₂), 21,33 (CH₃).

6-Klor-9-[1-(1-feroceni-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-9H-purin (30)

Spoj **30** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **18** (100 mg; 0,52 mmol) i **15** (76 mg; 0,34 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasto-smeđi uljasti spoj **30** (43,23 mg; 19,18%). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,85 (1H, s, H8), 8,81 (1H, s, H2), 8,59 (1H, s, H5'), 5,68 (2H, s, CH₂), 4,99 (2H, s, CH-Fc), 4,33 (2H, s, CH-Fc), 4,19 (5H, s, Cp-Fc). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 151,77 (C6), 151,65 (C2), 149,05 (C4), 142,18 (C4'), 130,77 (C5), 123,45 (C5'), 93,17 (Cp-Fc), 69,91 (Cp-Fc), 66,61 (CH-Fc), 61,84 (CH-Fc).

6-Klor-7-[1-(1-ferocenmetil-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-7H-purin (31)

Spoj **31** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **19** (50 mg; 0,26 mmol) i **13** (75 mg ;0,31 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasti kristalinični spoj **31** (56,5 mg; 50,37%; T.t.=95-97 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,94 (1H, s, H8), 8,80 (1H, s, H2), 8,16 (1H, s, H5'), 5,80 (2H, s, CH₂), 5,26 (2H, s, CH₂), 4,30 (2H, t, *J* = 1,8 Hz, CH-Fc), 4,20 – 4,14 (2H, m, CH-Fc), 4,12 (5H, s, Cp-Fc). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 161,57 (C4), 151,74 (C2), 151,17 (C8), 142,54 (C4'), 142,29 (C6), 122,82 (C5'), 121,98 (C5), 82,36 (Cq-Fc), 68,53 (Cp-Fc), 68,51 (CH-Fc), 68,26 (CH-Fc), 48,93 (CH₂), 41,89 (CH₂).

6-Klor-7-[1-(1-ferocenmetilmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-7H-purin (32)

Spoj **32** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **19** (90 mg; 0,47 mmol) i **14** (80 mg; 0,31 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasti kristalinični spoj **32** (56,58 mg; 27,14%; T.t.=67-69 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,94 (1H, s, H8), 8,80 (1H, s, H2), 8,19 (1H, s, H5'), 5,80 (2H, s, CH₂), 5,66 (1H, q, *J* = 7,0 Hz, CH), 4,33 – 4,27 (1H, m, CH-Fc), 4,16 (3H, m, CH-Fc), 4,07 (5H, s, Cp-Fc), 1,78 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, CH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 161,57 (C4), 151,72 (C2), 142,34 (C4'), 142,30 (C6), 122,02 (C5), 121,37 (C5'), 88,62 (Cq-Fc), 68,59 (Cp-Fc), 68,08 (CH-Fc), 67,61 (CH-Fc), 67,01 (CH-Fc), 66,23 (CH-Fc), 55,70 (CH), 41,97 (CH₂), 20,94 (CH₃).

6-Klor-7-[1-(1-ferocenil-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-7H-purin (33)

Spoj **33** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **19** (90 mg; 0,47 mmol) i **15** (71 mg; 0,31 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasti kristalinični spoj **33** (44,7 mg; 22,88%; T.t.=75-77 °C). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9,00 (1H, s, H8), 8,83 (1H, s, H2), 8,58 (1H, s, H5'), 5,87 (2H, s, CH₂), 4,99 (2H, s, CH-Fc), 4,33 (2H, s, CH-Fc), 4,17 (5H, s, Cp-Fc). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 161,71 (C4), 151,77 (C2), 151,24 (C8), 143,23 (C6), 142,29 (C4'), 122,75 (C5'), 122,13 (C5), 93,24 (Cq-Fc), 69,89 (Cp-Fc), 66,61 (CH-Fc), 61,74 (CH-Fc), 42,00 (CH₂).

2-Amino-6-klor-9-[1-(1-ferocenmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-9H-purin (34)

Spoj **34** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **20** (100 mg; 0,48 mmol) i **13** (139 mg; 0,58 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasti praškasti spoj **34** (123 mg; 57,11%; T.t.=221-223 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,17 (1H, s, H8), 8,05 (1H, s, H5'), 6,93 (2H, s, NH₂), 5,33 (2H, s, CH₂), 5,27 (2H, s, CH₂), 4,31 (2H, t, *J* = 1,8 Hz, CH-Fc), 4,18 – 4,15 (2H, m, CH-Fc), 4,14 (5H, s, Cp-Fc). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160,32 (C2), 154,33 (C6), 149,85 (C4), 143,46 (H8), 142,74 (C4'), 123,64 (C5), 123,40 (C5'), 82,75 (Cq-Fc), 69,12 (CH-Fc), 69,06 (Cp-Fc), 68,80 (CH-Fc), 49,45 (CH₂), 38,71 (CH₂).

2-Amino-6-klor-9-[1-(1-ferocenmetilmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-9H-purin (35)

Spoj **35** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **20** (100 mg; 0,48 mmol) i **14** (147 mg; 0,58 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 60 :1) izoliran je narančasti praškasti spoj **35** (55 mg; 24,76%; T.t.=213-215 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,17 (1H, s, H8), 8,07 (1H, s, H5'), 6,93 (2H, s, NH₂), 5,66 (1H, q, *J* = 7,0 Hz, CH), 5,33 (2H, s, CH₂), 4,32 (2H, d, *J* = 2,1 Hz, CH-Fc), 4,23 – 4,13 (3H, m, CH-Fc), 4,10 (5H, s, Cp-Fc), 1,80 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, CH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 159,82 (C2), 153,84 (C6), 149,34 (C4), 142,96 (H8), 141,95 (C4'), 123,15 (C5), 121,47 (C5'), 88,49 (Cq-Fc), 68,64 (Cp-Fc), 68,12 (CH-Fc), 67,66 (CH-Fc), 67,23 (CH-Fc), 66,17 (CH-Fc), 55,70 (CH), 38,24 (CH₂), 20,77 (CH₃).

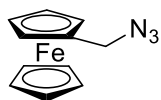
2-Amino-6-klor-9-[1-(1-feroceni-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-9H-purin (36)

Spoj **36** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **20** (100 mg; 0,48 mmol) i **15** (131 mg; 0,58 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 40 :1) izoliran je narančasti praškasti spoj **36** (44,04 mg; 21,11%; T.t.>270 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,50 (1H, s, H8), 8,24 (1H, s, H5'), 6,96 (2H, s, NH₂), 5,41 (2H, s, CH₂), 4,99 (2H, t, *J* = 1,9 Hz, CH-Fc), 4,38 – 4,30 (2H, m, CH-Fc), 4,19 (5H, s, Cp-Fc). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 159,83 (C2), 153,93 (C6), 149,38 (C4), 142,63 (C4'), 123,28 (C5'), 123,23 (C5), 93,34 (Cq-Fc), 69,89 (Cp-Fc), 66,58 (CH-Fc), 61,86 (CH-Fc), 38,24 (CH₂).

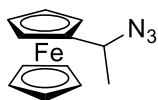
2-Amino-6-klor-7-[1-(1-ferocenmetilen-1,2,3-triazol-4-il)metilen]-7H-purin (37)

Spoj **37** priređen je prema prethodno opisanom općem postupku iz spojeva **21** (70 mg; 0,34 mmol) i **13** (98 mg; 0,41 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 30 :1) izoliran je narančasti praškasti spoj **37** (76 mg; 50,41%; T.t.>270 °C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,49 (1H, s, H8), 8,09 (1H, s, H5'), 6,64 (2H, s, NH₂), 5,60 (2H, s, CH₂), 5,26 (2H, s, CH₂), 4,29 (2H, t, *J* = 1,8 Hz, CH-Fc), 4,17 – 4,14 (2H, m, CH-Fc), 4,12 (5H, s, Cp-Fc). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 164,27 (C4), 159,98 (C2), 142,82 (C6), 142,33 (C4'), 122,74 (C5'), 82,48 (Cq-Fc), 68,54 (CH-Fc), 68,46 (CH-Fc), 68,22 (CH-Fc), 48,89 (CH₂), 41,56 (CH₂).

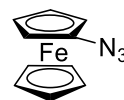
Pregled sintetiziranih spojeva



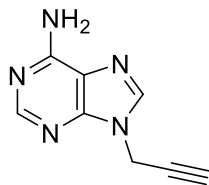
13



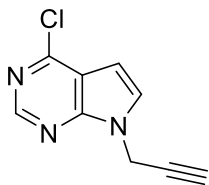
14



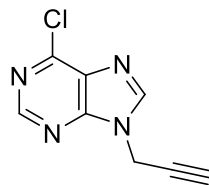
15



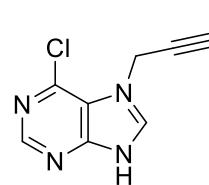
16



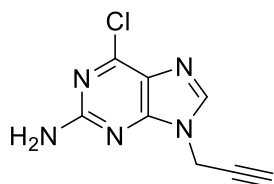
17



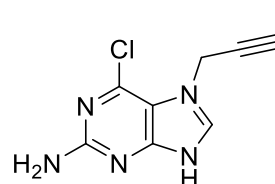
18



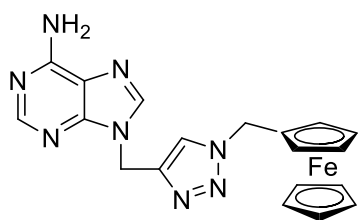
19



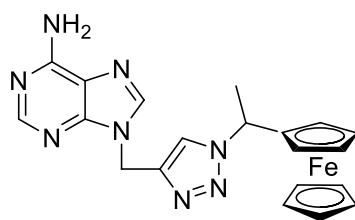
20



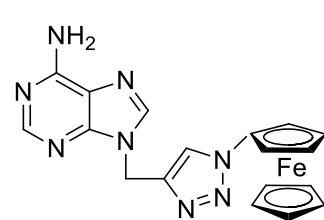
21



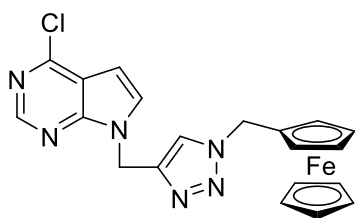
22



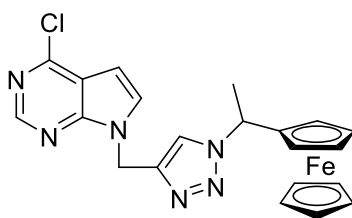
23



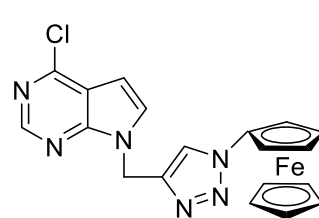
24



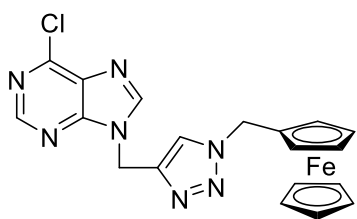
25



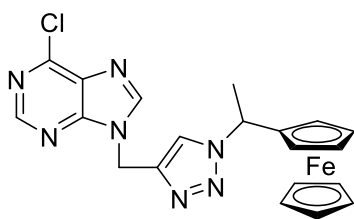
26



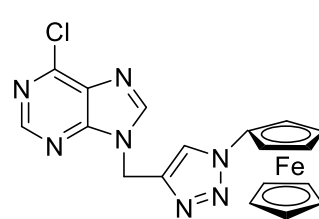
27



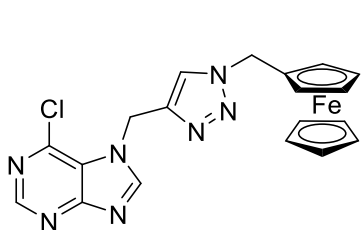
28



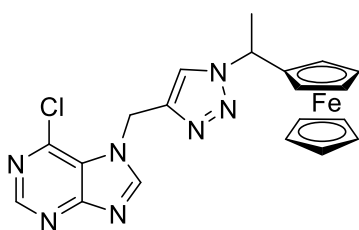
29



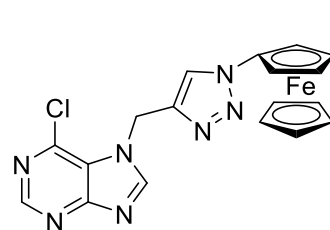
30



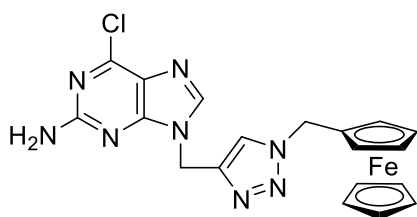
31



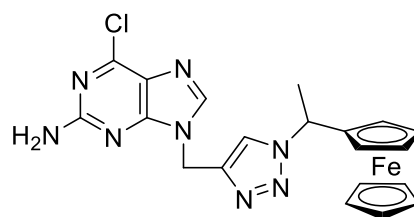
32



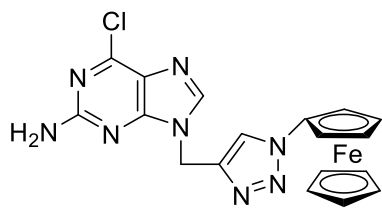
33



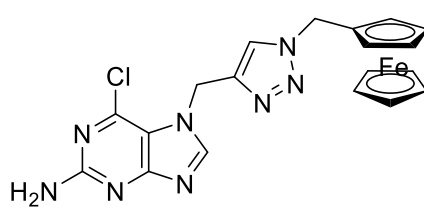
34



35



36



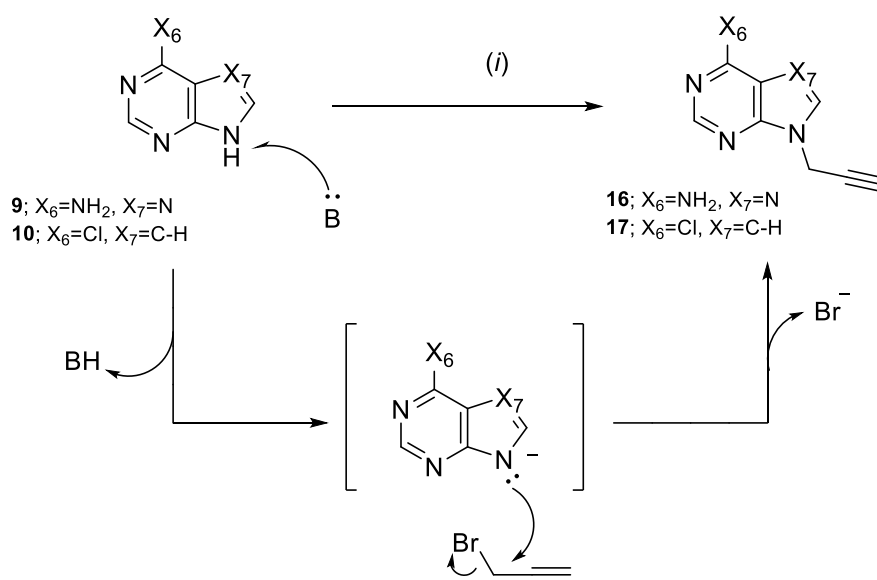
37

4. REZULTATI I RASPRAVA

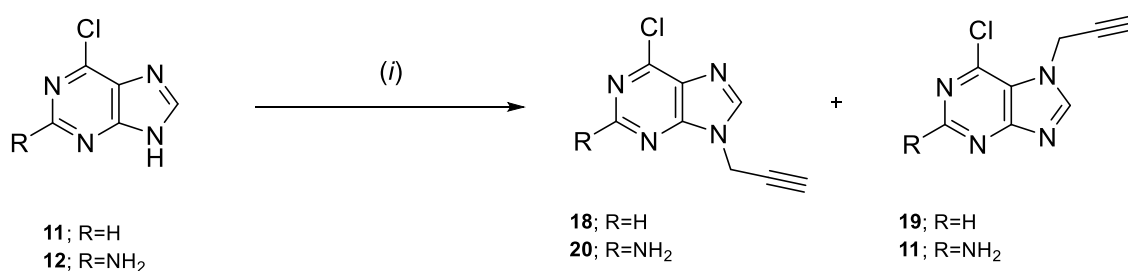
4.1. Sinteza spojeva

U ovom radu pripremljeni su potencijalno biološki aktivni hibridi purina i purinskih izostera s ferocenima povezani preko 1,2,3-triazolne prenosnice. Pripremljeni su regioselektivnom bakrom(I)-kataliziranom cikloadicijom ferocenskih azida (**13-15**) i purinskih i pseudopurinskih terminalnih alkina (**16-21**).

Prvo je provedena reakcija *N*-alkiliranja odgovarajućih purina i pseudopurina (**9-12**) s propargil-bromidom u DMF-u uz natrijev hidrid kao bazu, čime su dobiveni *N*-propargilni purinski izosteri (**16-21**). Propargiliranjem adenina (**9**) i 6-klor-7-deazapurina (**10**) dobiveni su *N*-9 propargilirani produkti **16** i **17** (shema 3), dok je propargiliranjem 6-klorpurina (**11**) i 2-amino-6-klorpurina (**12**) dobivena smjesa *N*-7 i *N*-9 regioizomera (shema 4). *N*-7 propargilirani izomeri dobiveni su u znatno manjim iskorištenjima (6-15 %) u odnosu na *N*-9 izomere (35-92 %) istih spojeva.

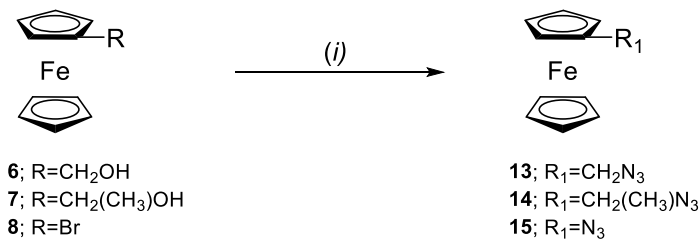


Shema 3. *Reagensi i uvjeti: (i) natrijev hidrid, propargil-bromid, DMF, s.t., 3 h.*



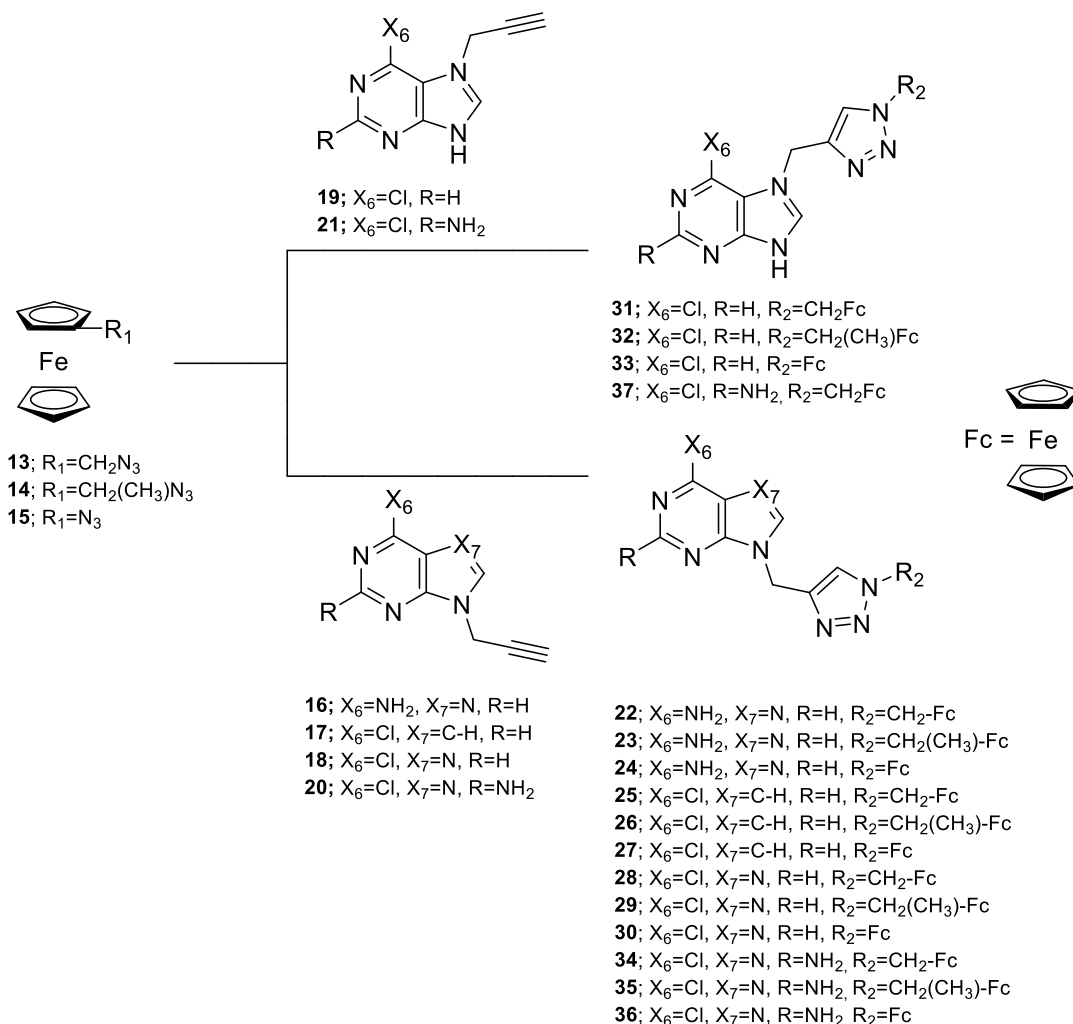
Shema 4. *Reagensi i uvjeti: (i) natrijev hidrid, propargil-bromid, DMF, s.t., 3 h.*

Ferocenski azidi (**13-15**) pripremljeni su reakcijom odgovarajućeg derivata ferocena (**6-8**) s natrijevim azidom u ledenoj octenoj kiselini u iskorištenju 74-98 % (shema 5).



Shema 5. *Reagensi i uvjeti: (i) natrijev azid, ledena octena kiselina, 50 °C, 3 h.*

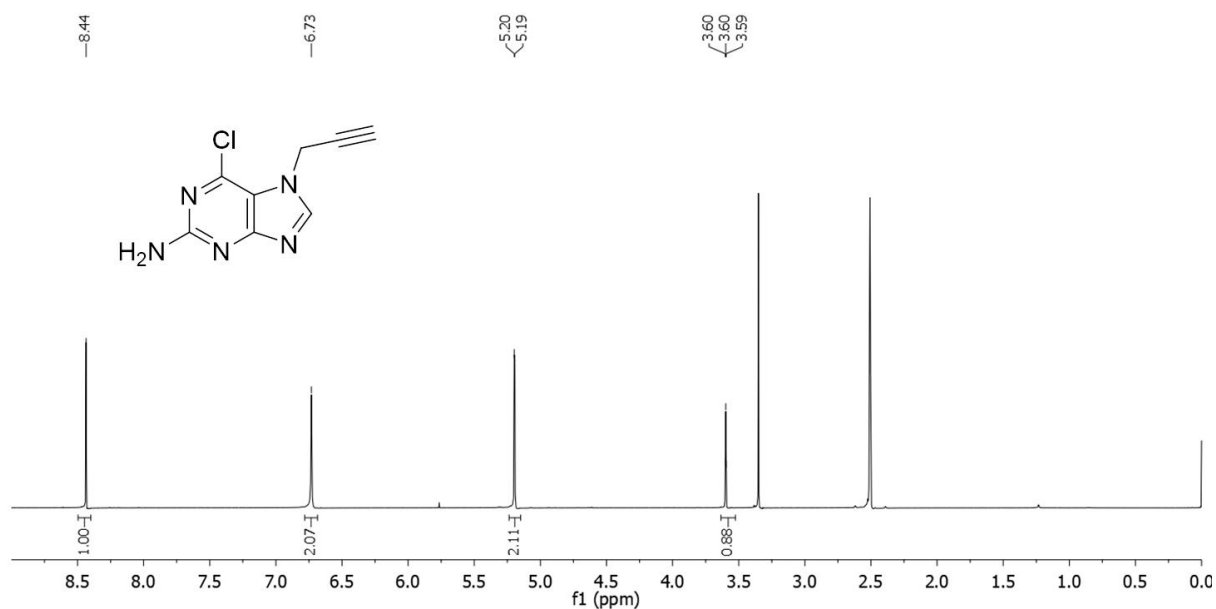
Ciljani konjugati purina i pseudopurina i ferocena (**22-37**) priređeni su *click* reakcijom prethodno sintetiziranih azidnih derivat ferocena (**13-15**) i terminalnih purinskih i pseudopurinskih alkina (**16-21**) uz Cu(I) kao katalizator. Kao izvor bakra poslužio je bakrov acetat u metanolu.



Shema 6. *Reagensi i uvjeti: (i) Cu(OAc)₂, CH₃OH, s.t., 24 h.*

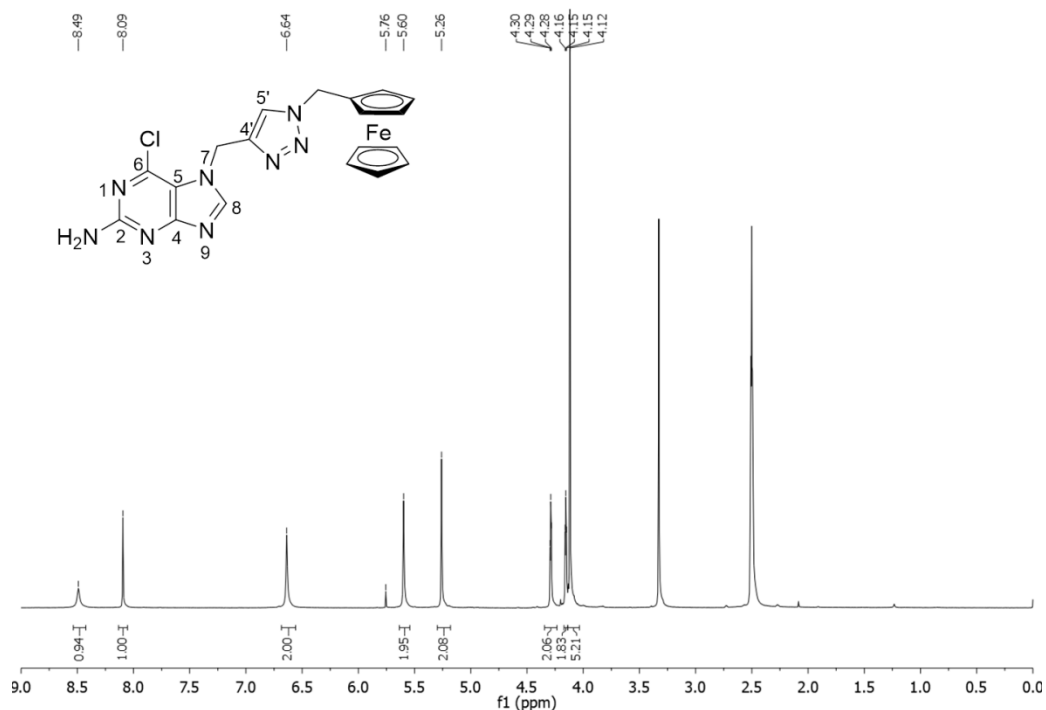
4.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva

Strukture svih priređenih spojeva određene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom na temelju kemijskih pomaka, veličine signala, veličine i multipliciteta rezonancija te H-H konstanti sprega. Uvođenje propargilne skupine na dušikov atom purinske baze potvrđeno je karakterističnim signalima protona terminalnog alkina na $\sim 3,6$ ppm i metilenske skupine vezane za dušikov atom purinske baze u području $\sim 5,2$ ppm (slika 39).



Slika 32. ^1H NMR spektar spoja 21.

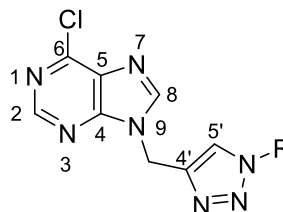
Osnovna karakteristika ^1H NMR spektara ciljanih spojeva **22-37** su signali metilenske skupine (δ_{H} 5,27-5,87 ppm) te protona ferocenske jezgre ($\sim 4,1$ ppm), a prisutnost triazolnog prstena potvrđena je karakterističnim signalom protona H5' između 8,05 i 8,59 ppm. Nadalje, purinski derivati **22-24** i **28-30** pokazuju odgovarajuće signale protona H2 (δ_{H} 8,12-8,83 ppm) i H8 (δ_{H} 8,17-9,00 ppm) purinskog prstena, dok derivati purinske baze **34-36** pokazuju signal karakterističan za proton H8 (δ_{H} 8,2-8,49 ppm). 7-deazapurinski analozi **25-27** posjeduju signale pirolpirimidinskog prstena H2 ($\sim 8,6$ ppm), H5 ($\sim 6,6$ ppm) i H7 ($\sim 7,8$ ppm).

Slika 33. ^1H NMR spektar spoja 37.

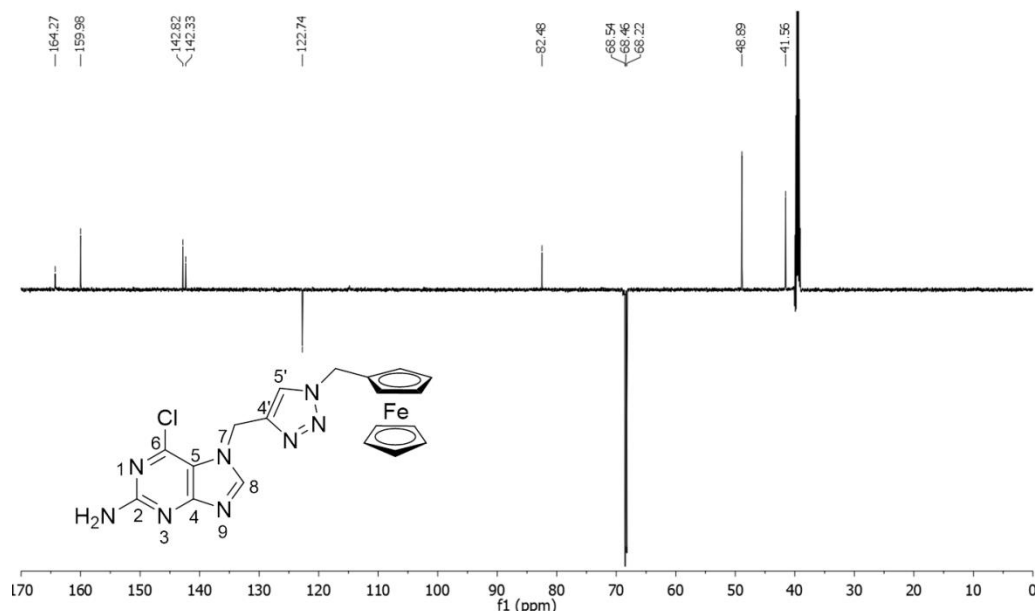
H2 i H8 protoni purinske baze u regioizomerima **28-33** pokazuju karakteristične kemijske pomake u ^1H NMR spektru između 8,77 i 9,00 ppm (tablica 1). N-7 regioizomeri **31-33** pokazuju otklonjeniji kemijski pomak za atom H2 (δ_H 8,80-8,83 ppm) u usporedbi s N-9 regioizomerima **28-30** (δ_H 8,77-8,81 ppm). Kemijski pomaci atoma H8 u N-7 regioizomerima također su otklonjeniji (δ_H 8,94-9,00 ppm) u usporedbi s kemijskim pomacima u N-9 izomerima (δ_H 8,79-8,85 ppm), a isti je slučaj i s protonima metilenske skupine te s H5' protonom.

Tablica 1. Pomaci purinske baze N-7 i N-9 regioizomera u ^1H NMR spektrima.

Spoj	^1H NMR (δ/ppm)			
	H2	H8	CH ₂	H5'
28	8,77	8,79	5,60	8,15
31	8,80	8,94	5,80	8,16
29	8,78	8,79	5,60	8,16
32	8,80	8,94	5,80	8,19
30	8,81	8,85	5,68	8,59
33	8,83	9,00	5,87	8,58



Struktura novosintetiziranih spojeva potvrđena je i ^{13}C NMR spektrima koji pokazuju karakteristične signale metilenske skupine (δ_{C} 38-41 ppm) te C5' (δ_{C} 122-153 ppm) i C4' (~142 ppm) atoma ugljika koji potvrđuju prisutnost triazolnog prstena. U spektrima su vidljivi i signali ugljikovih atoma ferocena (82-93 ppm i 61-68 ppm), a 7-deazapurinski derivati **25-27** pokazuju dodatan signal karakterističan za 7a ugljikov atom (~150 ppm).



Slika 34. ^{13}C NMR spektrar spoja 37.

4.3. Ispitivanje fizikalnih svojstva konjugata purina i purinskih izostera i ferocena **22–37**

Fizikalna svojstva spojeva poput topljivosti te $\log P$, $\log D$ i pK_a vrijednosti važna su za razumijevanje njihova ponašanja u biološkom okruženju.⁷⁵ Naime, lijekovi moraju biti dovoljno lipofilni kako bi mogli proći kroz biološke membrane,^{76,77} ali i dovoljno hidrofilni kako bi zadržali sposobnost vezanja na terapeutske mete.⁷⁸

Lipofilnost spojeva opisuje se vrijednostima $\log P$ i $\log D$ te se koristi za predviđanje *in vivo* permeabilnosti biološki aktivnih spojeva. Koeficijent P (eng. *partition coefficient*) predstavlja razliku topljivosti spoja u dva međusobno nemješljiva otapala. On opisuje lipofilnost neutralnih spojeva, odnosno spojeva koji postoje samo u jednom, neutralnom obliku. Međutim, većina biološki važnih spojeva često se može nalaziti u različitim ionskim oblicima. Koeficijent D (eng. *distribution coefficient*) uzima u obzir sve ionske oblike spoja pri određenom pH prilikom određivanja lipofilnosti, a najčešće se izražava u obliku $\log D$.⁷⁵

Lipofilnost spojeva određena je pri $pH = 7,4$ za $1,25 \mu M$ otopine, a rezultati su prikazani u tablici 2 u obliku krom $\log D$ vrijednosti.

Mjerenje kinetičke topljivosti spojeva provedeno je pri $37 \text{ }^\circ C$ tijekom 2 sata uz blago miješanje za otopine 5 različitih koncentracija ($100 \mu M$, $30 \mu M$, $10 \mu M$, $3 \mu M$ i $1 \mu M$ u DMSO). Apsorbancija suspenzije izmjerena je nakon 2 sata pri 620 nm , a rezultati su dobiveni u obliku raspona topljivosti (s donjom i gornjom granicom). Za usporedbu je izmjerena i kinetička topljivost standardnih spojeva, α -naftoflavona (niske topljivosti) i sulfafenazola (visoke topljivosti). Iznosi kinetičke topljivosti prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Rezultati ispitivanja fizikalnih svojstava spojeva.

spoj	kinetička topljivost (μM) (nakon 2 sata)	CHI prosjek	krom $\log D$
22	30-100	56,54	2,85
23	>100	59,39	3,09
24	3-10	54,16	2,64
25	<1	88,86	5,62
26	3-10	92,66	5,94
27	3-10	88,86	5,62
28	>100	73,18	4,27
29	30-100	77,45	4,64
30	>100	72,22	4,19
31	>100	67,95	3,82
32	>100	71,75	4,15
33	>100	66,28	3,68
34	30-100	65,57	3,62
35	30-100	68,90	3,90
36	<1	64,14	3,50
37	<1	62,72	3,37
α -naftoflavon	3-10	-	-
sulfafenazol	>100	-	-

Rezultati pokazuju da su derivati 6-klor-7-deazapurina **25**, **26** i **27** spojevi najveće lipofilnosti ($\log D \geq 5,62$) te imaju i vrlo nisku topljivost, što je nepovoljno za primjenu u ljudskom organizmu. Nisku topljivost također pokazuju i adeninski derivat **24** i 2-amino-6-klorpurinski derivati **36** i **37**, među kojima je najnepovoljniji za primjenu spoj **24** koji uz relativno nisku topljivost od 3-10 μM pokazuje i relativno nisku lipofilnost ($\log D = 2,64$). Svi spojevi odlične topljivosti (**23**, **28**, **30**, **31**, **32**, i **33**) pokazuju i srednju do relativno visoku razinu lipofilnosti u rasponu od 3,09 do 4,27, što ih čini obećavajućim kandidatima za moguću daljnju biološku

primjenu. Osim adeninskog derivata **23**, ostali spojevi sadrže 6-klorpurinski prsten. Uzimajući u obzir navedene rezultate kinetičke topljivosti i lipofilnosti, moguću primjenu mogli bi imati i spojevi **29**, **34** i **35** koji pokazuju dobru topljivosti i prosječnu lipofilnost.

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu uspješno su sintetizirani hibridi purina i purinskih izostera s ferocenima (**22-37**) povezivanjem preko 1,2,3-triazolnog prstena direktno ili preko metilenske, odnosno metilmetinske prenosnice.
- Sintetizirani su odgovarajući azidni derivati ferocena (**13-15**) iz derivata ferocena s natrijevim azidom te *N*-propargilirani prekursori adenina, 6-klorpurina, 2-amino-6-klorpurina i 6-klor-7-deazapurinarina (**16-21**). Pri alkiliranju 6-klorpurina i 2-amino-6-klorpurina dobivena je smjesa *N*-9 i *N*-7 regioizomera, u kojoj je prevladavao *N*-9 izomer. Ciljani konjugati purina i pseudopurina i ferocena (**22-37**) priređeni su 1,3-dipolarnom cikloadicijom ferocenskih azida (**13-15**) i terminalnih purinskih i pseudopurinskih alkina (**16-21**) kataliziranom Cu(I) (CuAAC).
- Novopripravljenim spojevima struktura je potvrđena primjenom spektroskopije ¹H i ¹³C nuklearne magnetske rezonancije (NMR).
- Rezultati ispitivanja kinetičke topljivosti i lipofilnosti $\log D$ pokazali su da adeninski derivat **23** i 6-klorpurinski derivati ferocena **28** i **30-33** imaju odličnu kinetičku topljivost (> 100) i lipofilnost u rasponu od 3,09 do 4,27. Nasuprot tome,
- 6-klor-7-deazapurinski derivati ferocena **25**, **26** i **27** su spojevi najveće lipofilnosti ($\log D \geq 5,62$) koji imaju i vrlo nisku topljivost.
- Uzimajući u obzir ispitana fizikalna svojstva, adeninski derivat **23**, 6-klorpurinski derivati **28-33** i 2-amino-6-klorpurinski derivati ferocena **34** i **35** zadovoljavaju osnovne pretpostavke topljivosti i lipofilnosti za moguću daljnju biološku primjenu. U tijeku je ispitivanje antiproliferativnog djelovanja hibrida purina i purinskih izostera s ferocenima (**22-37**) na zloćudne tumorske stanice porijeklom iz čovjeka.

6. POPIS LITERATURE

1. Mintas, M., *Medicinska kemija protutumorskih lijekova*, Medicinska naklada, Zagreb, 2013.
2. Singh, A., Saha, S.T., Perumal, S., Kaur, M., Kumar, V., *ACS Omega*, **3** (2018) 1263–1268
3. Mandalapu, D., Saini, K.S., Gupta, S., Sharma, V., Malik, M.Y., Chaturvedi, S., Bala, V., Hamidullah, Thakur, S., Maikhuri, J.P., Wahajuddin, M., Konwar, R., Gupta, G., Sharma, V.L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** (2016) 4223–4232
4. Agalave, S.G., Maujan, S.R., Pore, V.S., *Chem. Asian J.*, **6** (2011) 2696–2718
5. Jaouen, G., Vessieres, A., Top, S., *Chem. Soc. Rev.*, **44** (2015) 8802–8817
6. Sansook, S., Lineham, E., Hassel-Hart, S., Tizzard, G.J., Coles, S.J., Spencer, J., Morley, S.J., *Molecules*, **23** (2018) 2126
7. Mohamed, A.R., *Synthesis and antitumor evaluation of some xanthine derivatives*, CU Theses, 2016
8. Zhou, C.H., Wang, Y., *Curr. Med. Chem.*, **19** (2012) 239–280
9. Wiczorek, A., Blauz, A., Zakrewski, J., Rychlik, B, Plazuk, D., *ACS Med. Chem. Lett.*, **7** (2016) 612–617
10. Berube, G., *Expert Opin. Drug Discov.*, **11** (2016), 281–305
11. Nepali, K., Sharma, S., Sharma, M., Bedi, P.M.S., Dhar, K.L., *Eur. J. Med. Chem.*, **77** (2014) 422–487
12. Gregorić, S., Sedić, M., Grbčić, P, Tomljenović Pavić, A., Kraljević Pavelić, S., Cetina, M., Vianello, R., Raić-Malić, S., *Eur. J. Med. Chem.*, **125** (2017) 1247–1267
13. Yu, J.L., Wu, Q.P., Zhang, Q.S., Liu, Y.H., Li, Y.Z., Zhou, L.M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20** (2010) 240–243
14. Jadhav, J., Juvekar, A., Kurane, R., Khanapure, S., Salunkhe, R., Rashinkar, G., *Eur. J. Med. Chem.*, **65** (2013) 232–239
15. Piotrowska, D.G., Balzarini, J., Gowacka, I.W., *Eur. J. Med. Chem.*, **47** (2012) 501–509
16. Flick, A.C., Ding, H.X., Leverett, C.A., Kyne Jr., R.E., Liu, K.K.C., Fink, S.J., O'Donnell, C.J., *Bioorg. Med. Chem.*, **24** (2016) 1937–1980
17. Kharb, R., Sharma, P.C., Yar, M.S., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **26** (2011) 1–21
18. Helguera, A.M., Rodriguez-Borges, J.E., CaamaCo, O., Garcia-Mera, X., Perez Gonzalez, M., Cordeiro, N.D.S., *Molecular Informatics*, **29** (2010) 213–231
19. Helguera, A.M., Rodriguez-Borges, J.E., Garcia-Mera, X., Fernandez, F., Cordeiro, M.N., *J. Med. Chem.*, **50** (2007) 1537

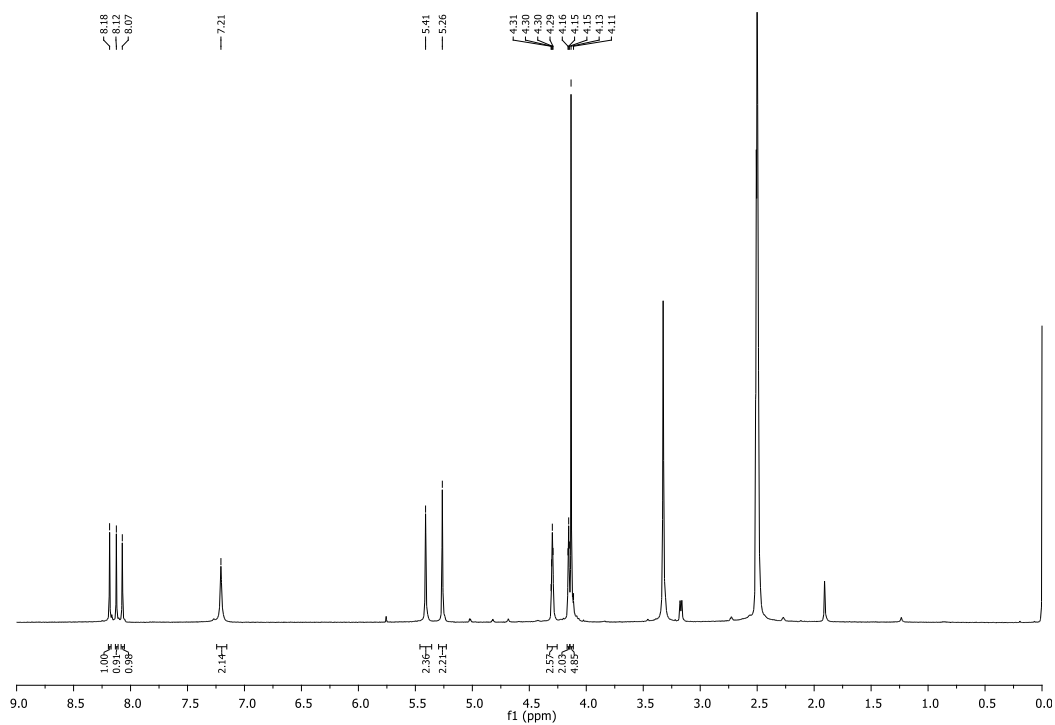
20. Wu, P., Nielsen, T.E., Clausen, M.H., *Trends Pharmacol. Sci.*, **36** (2015) 422–439
21. Sharma, S., Singh, J., Ojha, R., Singh, H., Kaur, M., Bedi, P.M.S., Nepali, K., *Eur. J. Med. Chem.*, **112** (2016) 298–346
22. Tutone, M., Almerico, A.M., *Eur. J. Med. Chem.*, **142** (2017) 300–315
23. Hart, D.J., Hadad, C.M., Craine, L.E., Hart, H., *Organic chemistry: A short course*, Brooks/Cole, Belmont, 2007, str.528-529
24. Vitaku, E., Smith, D.T., Njardarson, J.T., *J. Med. Chem.*, **57** (2014) 10257–10274
25. Inoue, K., *Biol. Pharm. Bull.*, **40** (2017) 1130–1138
26. Demir, Z., Guven, E.B., Ozbey, S., Kazak, K., Atalay, R.C., Tuncbilek, M., *Eur. J. Med. Chem.*, **89** (2015) 701–720
27. Dimopoulou, A., Manta, S., Parmenopoulou, V., Gkizis, P., Coutouli-Argyropoulou, E., Schols, D., Komiotis, D., *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, **34** (2015) 289–308
28. Kucukdumlu, A., Tuncbilek, M., Guven, E.B., Atalay, R.C., *Acta Chim. Slov.*, **64** (2017) 621–632
29. Yoon, J.-S., Jarhad, D.B., Kim, G., Nayak, A., Zhao, L.X., Yu, J., Kim, H.R., Lee, J.Y., Mulamootil, V.A., Chandra, G., Byun, W.S., Lee, S.K., Kim, Y.C., Jeong, L.S., *Eur. J. Med. Chem.*, **155** (2018) 406–417
30. Desaphy, J., Rognan, D., *J. Chem. Inform. Model.*, **54** (2014) 1908–1918
31. Raić-Malić, S., Meščić, A., *Curr. Med. Chem.*, **22** (2015) 1462–1499
32. Rosemeyer, H., *Chem. Biodivers.*, **1** (2004) 361–401
33. Legraverend, M., Grierson, D.S., *Bioorg. Med. Chem.*, **14** (2006) 3987–4006
34. Luo, L., He, X.P., Shen, Q., Li, J.-Y., Shi, X.-X., Xie, J., Li, J., Chen, G.-R., *Chem. Biodivers.*, **8** (2011) 2035–2044
35. Joule, J. A., Milles, K., *Heterocyclic Chemistry*, JohnWiley and Sons, UK, 2010, str 515.
36. De Coen, L.M., Heugebaert, T.S.A., Garcia, D., Stevens, C.V., *Chem. Rev.*, **116** (2016) 80–139
37. Luo, L., He, X.P., Shen, Q., Li, J.-Y., Shi, X.-X., Xie, J., Li, J., Chen, G.-R., *Chem. Biodivers.*, **8** (2011) 2035–2044
38. Calderon-Arancibia, J., Espinosa-Bustos, C., Canete-Molina, A., Tapia, R.A., Faundet, M., Torres, M.J., Aguirre, A., Paulino, M., Salas, C.O., *Molecules*, **20** (2015) 6808–6826
39. Desaphy, J., Rognan, D., sc-PDB-Frag: a database of protein-ligand interaction patterns for Bioisosteric replacements, *J. Chem. Inf. Model.*, **54** (2014), 1908–1918

40. Perlikova, P., Hocek, M., *Med. Res. Rev.*, **37** (2017) 1429–1460
41. Bandarian, V., Drennan, C.L., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **35** (2015) 116–124
42. Lemrova, B., Smyslova, P., Popa, I., Ozdian, T., Zajdel, P., Sural, M., *ACS Comb. Sci.*, **16** (2014) 558–565
43. Tokarenko, A., Liškova, B., Smolen, S., Taborska, N., Tichy, M., Gurska, S., Perlikova, P., Frydrych, I., Tlousova, E., Znojek, P., Merlikova-Kaiserova, H., Poštova Slavtinska, L., Pohl, R., Klepetanova, B., Khalid, N.U.A., Wenren, Y., Laposa, R.R., Džubak, P., Hajduch, M., Hocek, M., *J. Med. Chem.*, **61** (2018) 9347–9359
44. Kumar, R., Yar, M.S., Chaturvedi, S., Srivastava, A., *Int. J. Pharmtech. Res.*, **5** (2013) 1844–1869
45. Haider, S., Alam, M.S., Hamid, H., *Inflamm. Cell Signal.*, **1** (2014) 95
46. Tron, G.C., Pirali, T., Billington, R.A., Canonico, P.L., Sorba, G., Genazzani, A.A., *Med. Res. Rev.*, **28** (2008) 278–308
47. Sarmiento-Sanchez, J.I., Ochoa-Teran, A., Rivero, I.A., *Arkivoc*, **9** (2011) 177–188
48. Bistrovčić, A., Krstulović, L., Harej, A., Grbčić, P., Sedić, M., Koštrun, S., Kraljević Pavelić, S., Bajić, M., Raić-Malić, S., *Eur. J. Med. Chem.*, **143** (2018) 1616–1634
49. Khan, I.A., Ahmad, M., Aslam, S., Saif, M.J., Zahoor, A.F., Naqvi, S.A.R., Mansha, A., *Afinidad*, **72** (2015) 569
50. L., J.F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46.7** (2007) 1018–1025
51. Hein, C.D., Liu, X.M., Wang, D., *Pharm. Res.*, **25** (2008) 2216–2230
52. Amblard, F., Cho, J.H., Schinazi, R.F., *Chem. Rev.*, **109** (2009) 4207–4220
53. Diaz, D.D., Rajagopal, K., Strable, E., Schneider, J., Finn, M.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006) 6056–6057
54. Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., Sharpless, B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41** (2002) 2596–2599
55. Kolb, H.C., Sharpless, K.B., *Drug Discov. Today*, **8** (2003) 1128–1137
56. Meldal, M., Tornøe, C.W., *Chem. Rev.*, **108** (2008) 2952–3015
57. Singh, M.S., Showdhury, S., Koley, S., *Tetrahedron*, **72** (2016) 5257–5283
58. Meghani, N.M., Amin, H.H., Lee, B.J., *Drug Discov. Today*, **22** (2017) 1604–1619
59. Wang, C., Ikhlef, D., Kahlal, S., Saillard, J.Y., Astruca, D., *Coord. Chem. Rev.*, **316** (2016) 1–20
60. Citta, A., Folda, A., Bindoli, Al., Pigeon, P., Top, S., Vessieres, A., Salmain, M., Jaouen, G., Rigobello, M.P., *J. Med. Chem.*, **57** (2014) 8849–8859

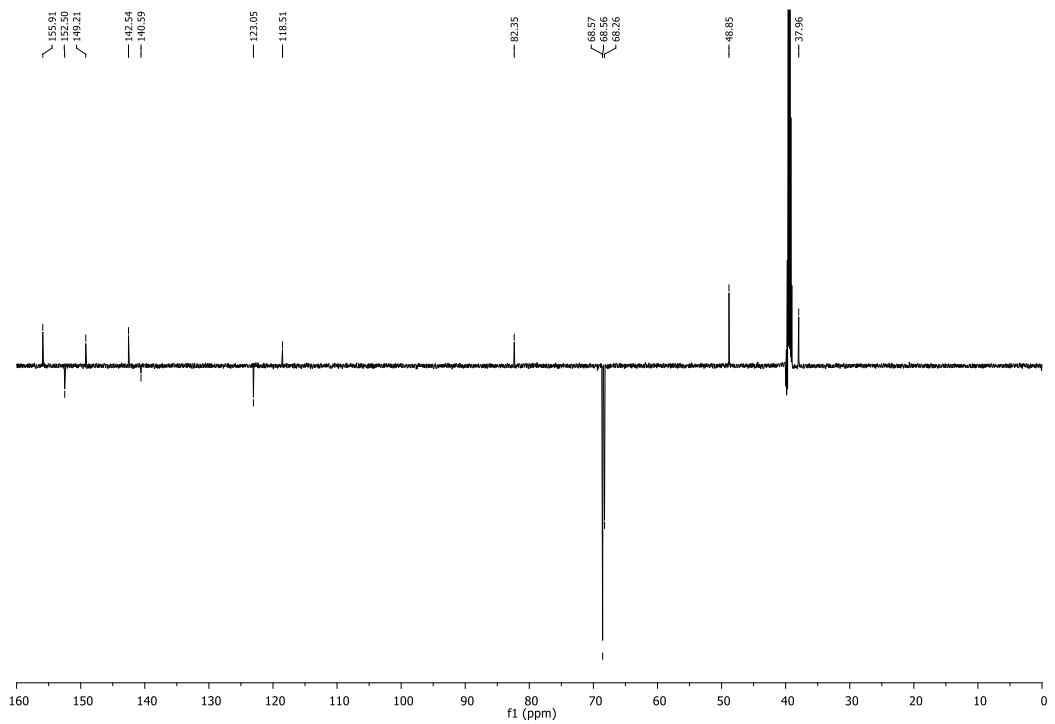
61. Richard, M.A., Hamels, D., Pigeon, P., Top, S., Dansette, P.M., Lee, H.Z.S., VessiRres, A., Mansuy, D., Jaouen, G., *Chem. Med. Chem.*, **10** (2015) 981–990
62. Singh, A., Lumb, I., Mehra, V., Kumar, V., *Dalton Trans.*, 2019
63. Cazares-Marinero, J.de J., Top, S., Vessieres, A., Jaouen, G., *Dalton Trans.*, **43** (2014) 817–830
64. Bartošik, M., Koubkova, L., Karban, J., Štastna, L.Č., Hodik, T., Lamač, M., Pinkas, J., Hrstka, R., *Analyst*, **140** (2015) 5864
65. Sudhir, V.S., Venkateswarlu, C., Musthafa, O.T.M., Sampath, S., Chandrasekaran, S., *Eur. J. Org. Chem.*, **13** (2009) 2120–2129
66. Aucamp, D., Kumar, S.V., Liles, D.C., Fernandes, M., Harmse, L., Bezuidenhout, D.I., *Dalton Trans.*, **47** (2018) 16072–16081
67. Nguyen, H.V., Sallustrau, A., Balzarini, J., Bedford, M.R., Eden, J.C., Georhousi, N., Hodges, N.J., Kedge, J., Mehellou, Y., Tselepis, C., Tucker, J.H.R., *J. Med. Chem.*, **57** (2014) 5817–5822
68. James, P., Neudo, J., Eissmann, M., Jesse, P., Prokop, A., Schmalz, H.G., *Org. Lett.*, **8** (2006) 2763–2766
69. Simenel, A.A., Morozova, E.A., Snegur, L.V., Zykova, S.I., Kachala, V.V., Ostrovskaya, L.A., Bluchterova, N.V., Fomina, M.M., *Appl. Organomet. Chem.*, **23** (2009) 219–224
70. Hardy, C.G., Ren, L., Tamboue, T.C., Tang, C., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **49** (2011) 1409–1420
71. Plazuk, D., Rychlik, B., Blauz, A., Domagala, S., *J. Organomet. Chem.*, **715** (2012) 102–112
72. Lindsell, W.E., Murray, C., Preston, P.N., Woodman, T.A.J., *Tetrahedron*, **56** (2000) 1233–1245
73. E. Galante, B. W. Schoultz, M. Koepp, E. Årstad, *Molecules*, **18** (2013) 5335–5347.
74. Lindsell., W.E., Murray, C., Preston, P.N., Woodman, T.A.J., *Tetrahedron*, **56**(2000) 1233-1245
75. Bhal, S.K., *ACD/Labs PhysChem Software Application Notes*, 2007
76. Kubinyi, H., *II Farmaco: edizione scientifica*, **34** (1979) 248–276
77. Kubinyi, H., *Arzneimittel Forschung*, **29** (1979) 1067–1080
78. Pliska, V., Testa, B., Van der Waterbeemd, H., Manhold, E., Kubinyi, H., Timmerman, H., *Weinheim, CVH*, 1996

7. PRILOZI

a)

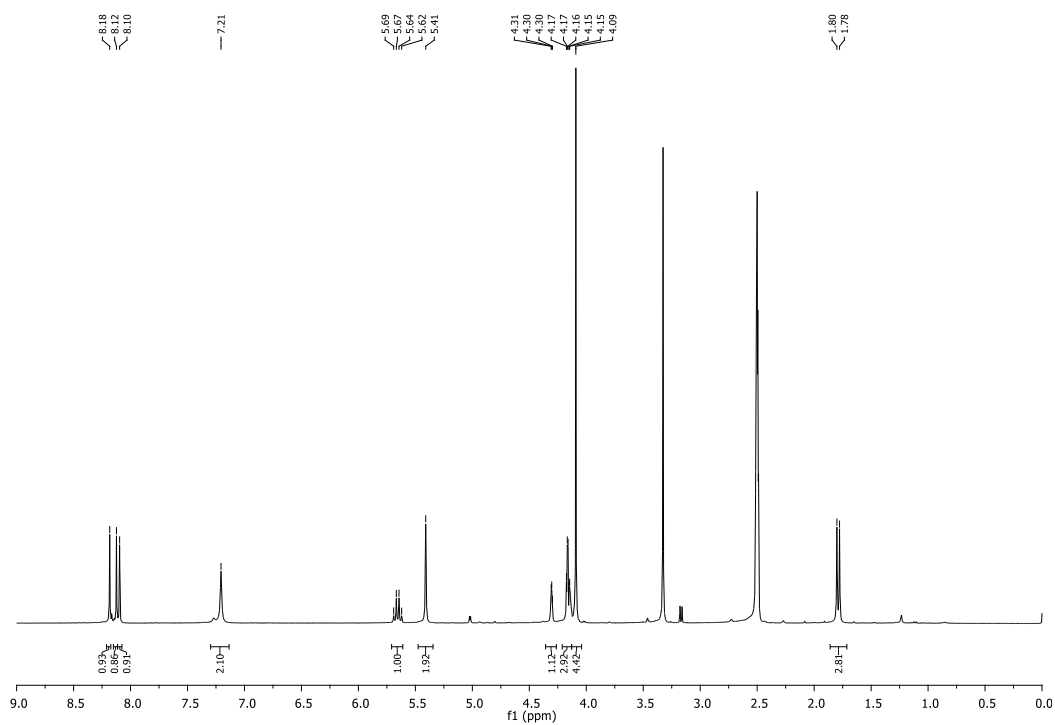


b)

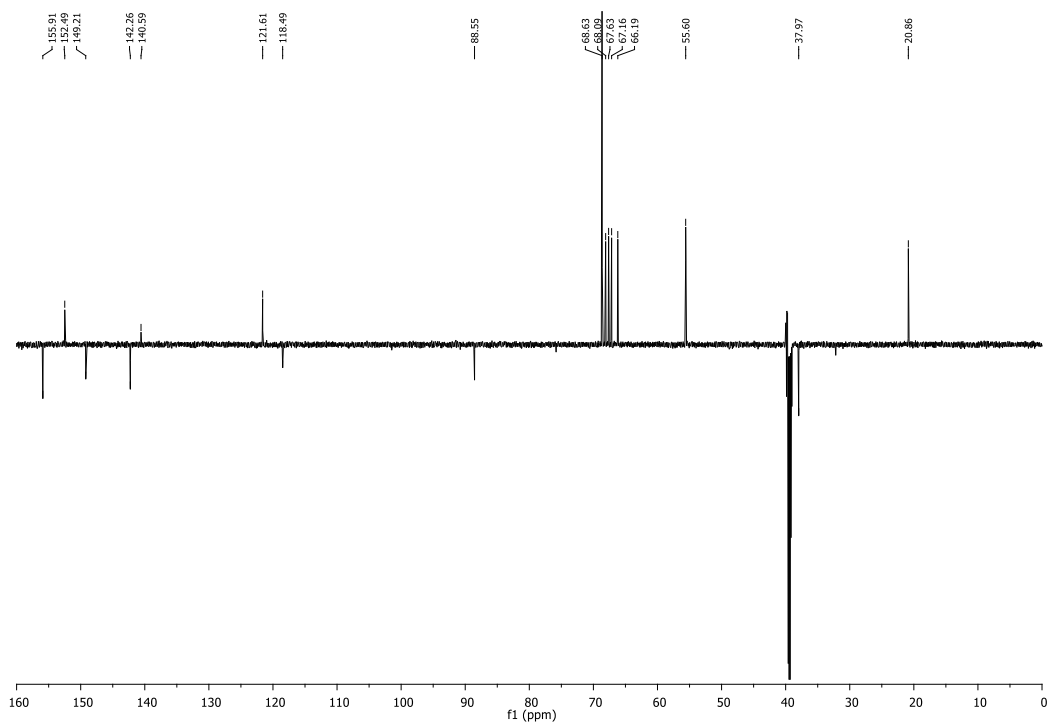


Slika 35. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **22**.

a)

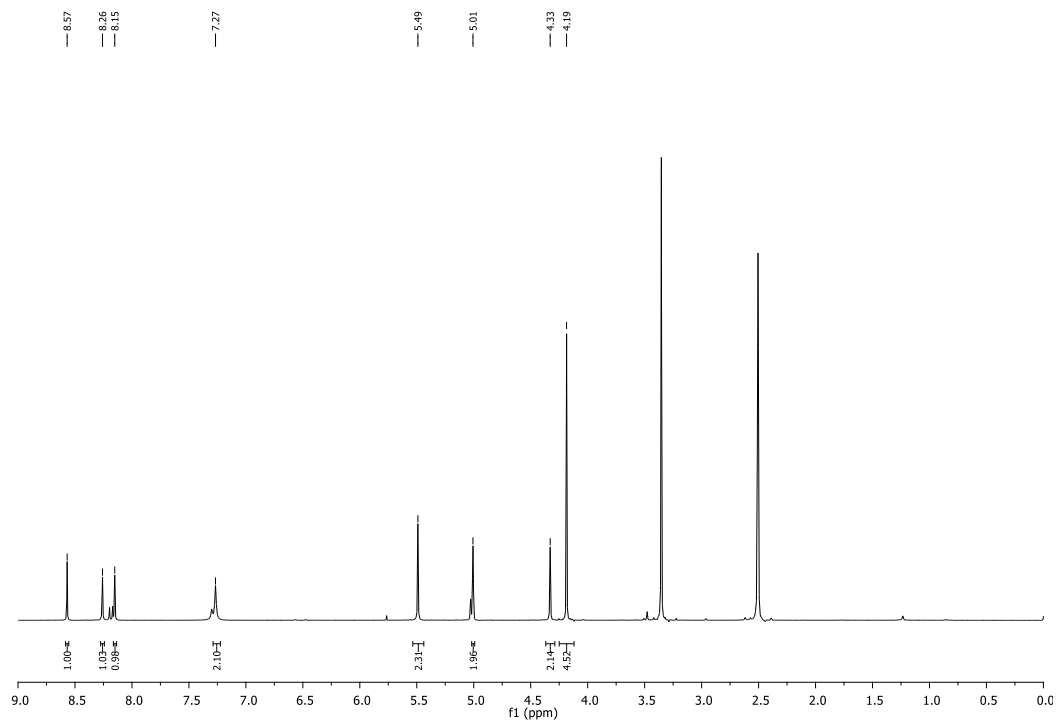


b)

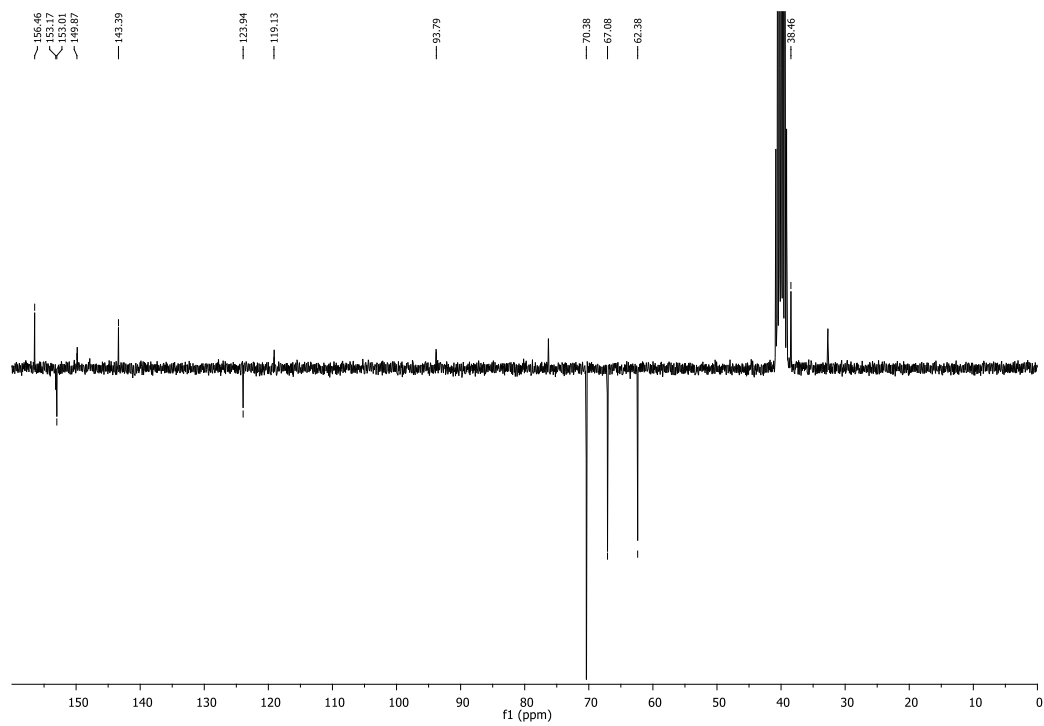


Slika 36. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **23**.

a)

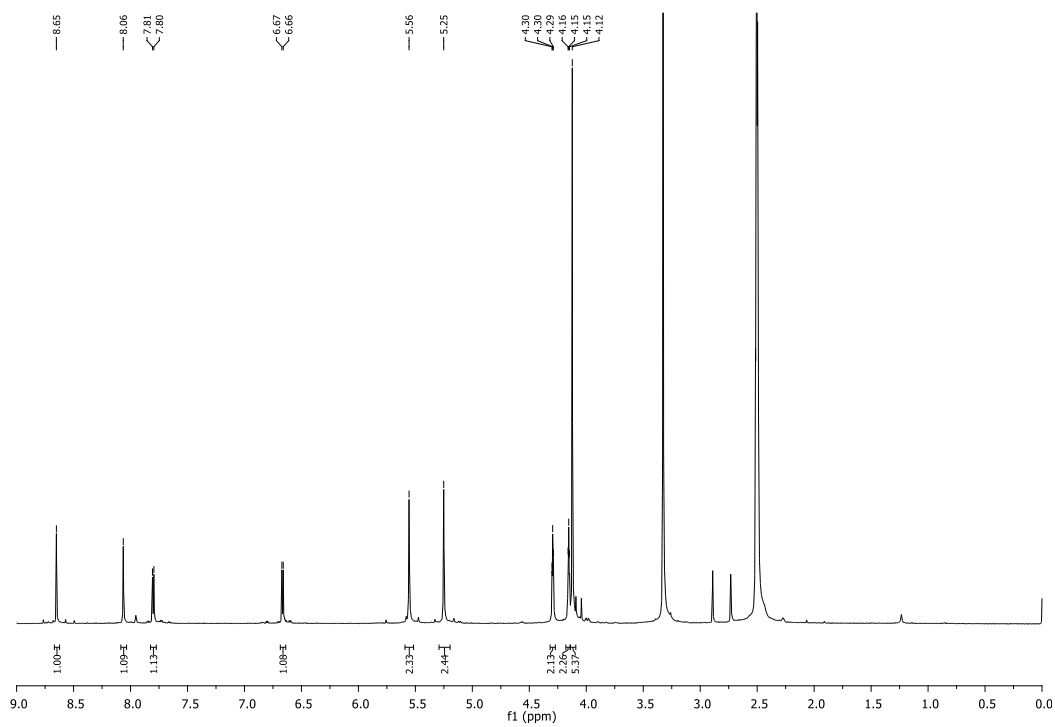


b)

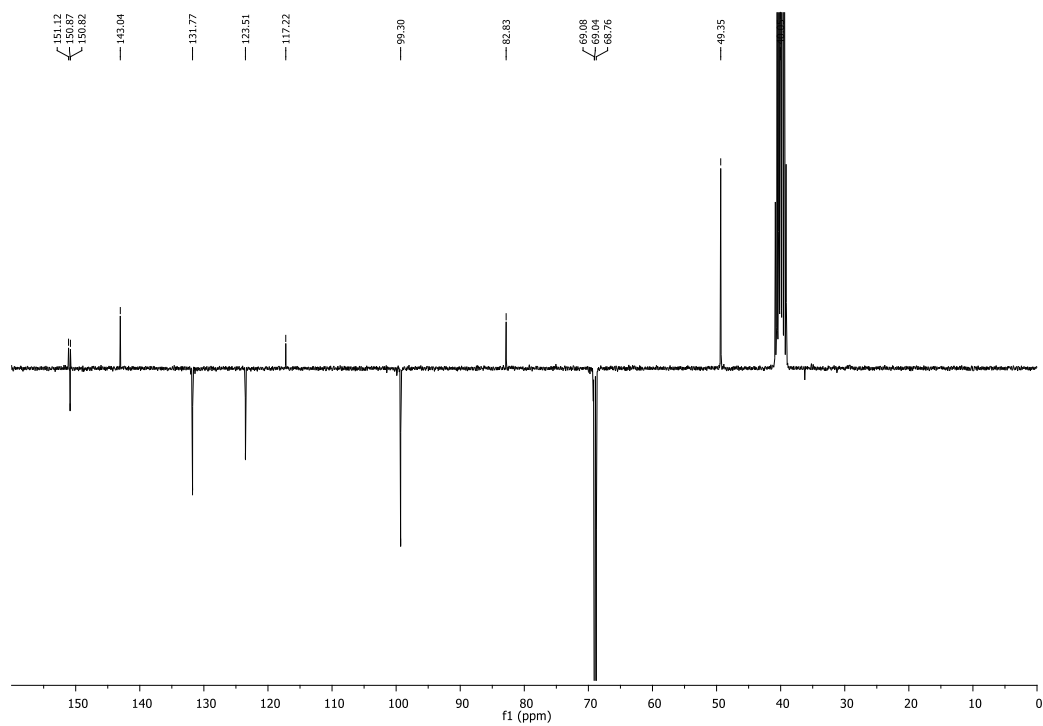


Slika 37. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **24**.

a)

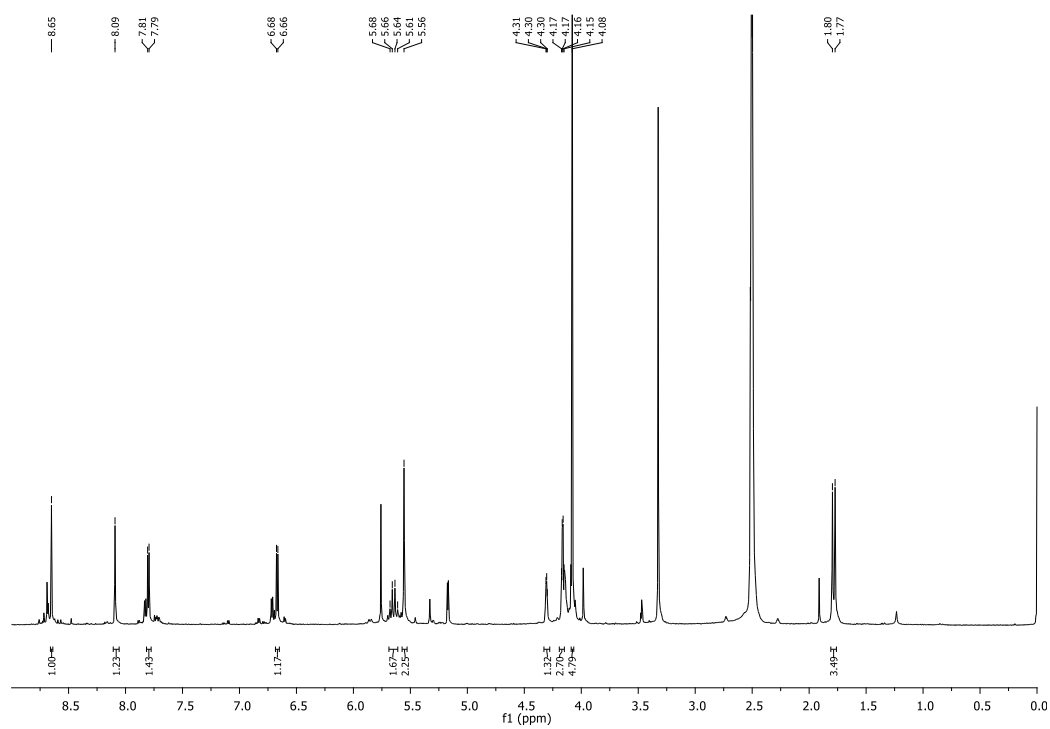


b)

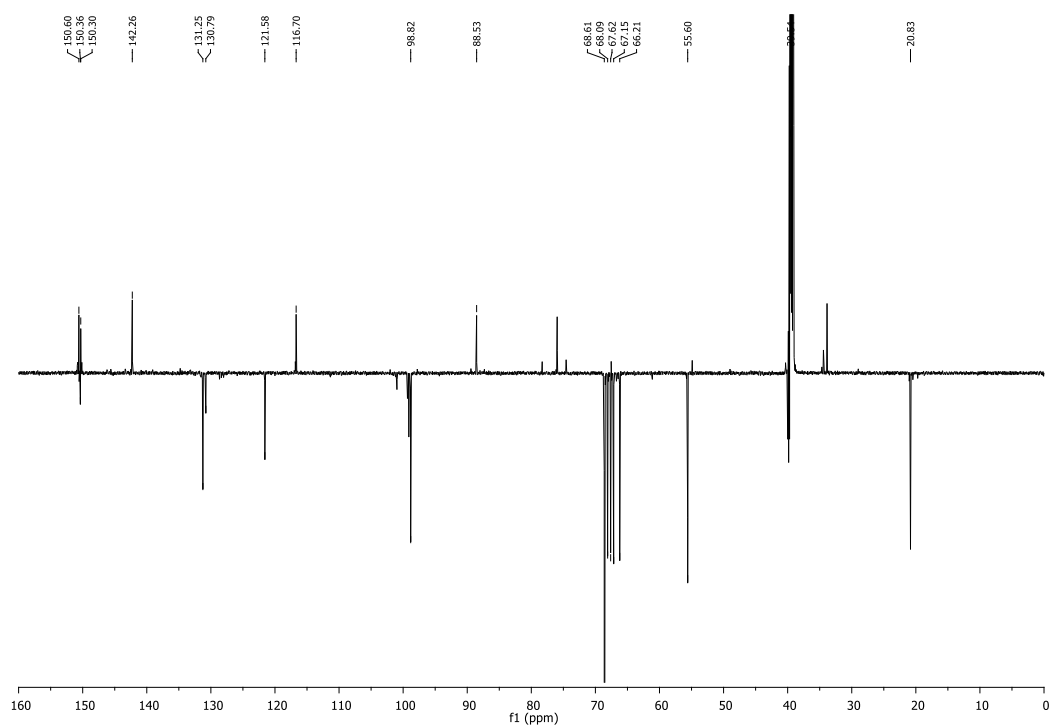


Slika 38. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **25**.

a)

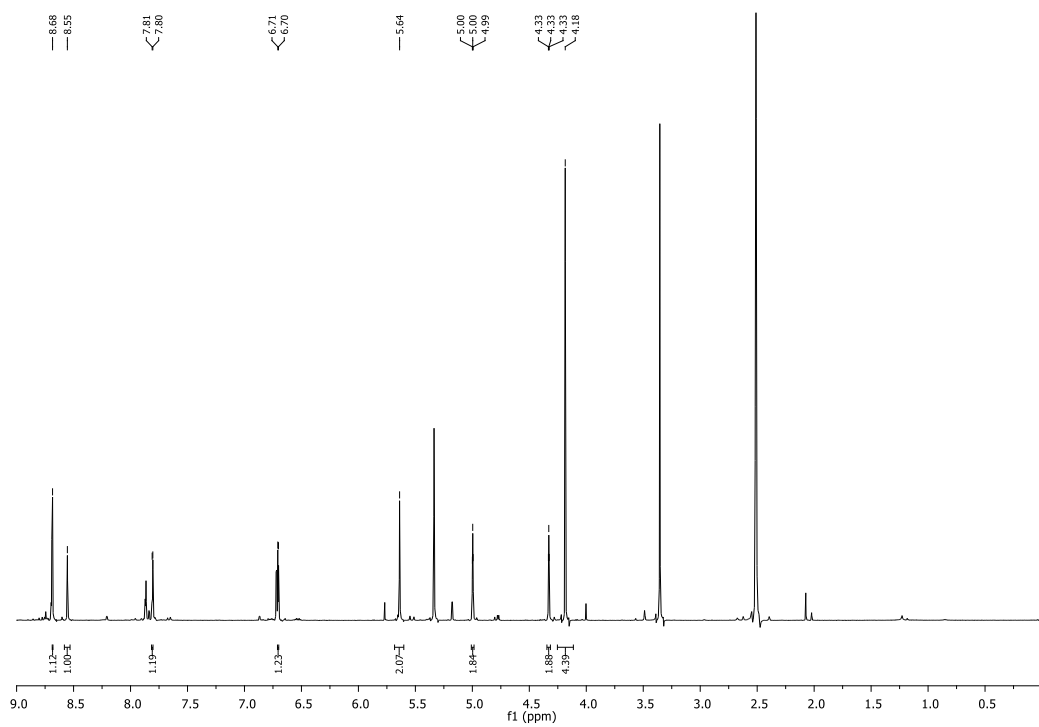


b)

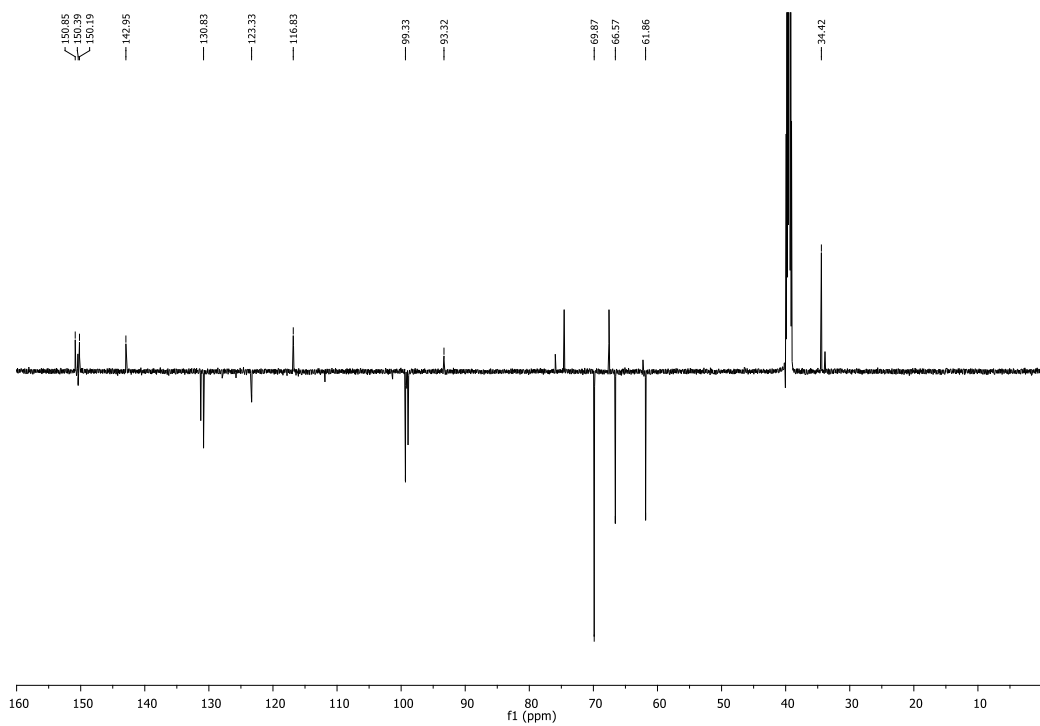


Slika 39. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **26**.

a)

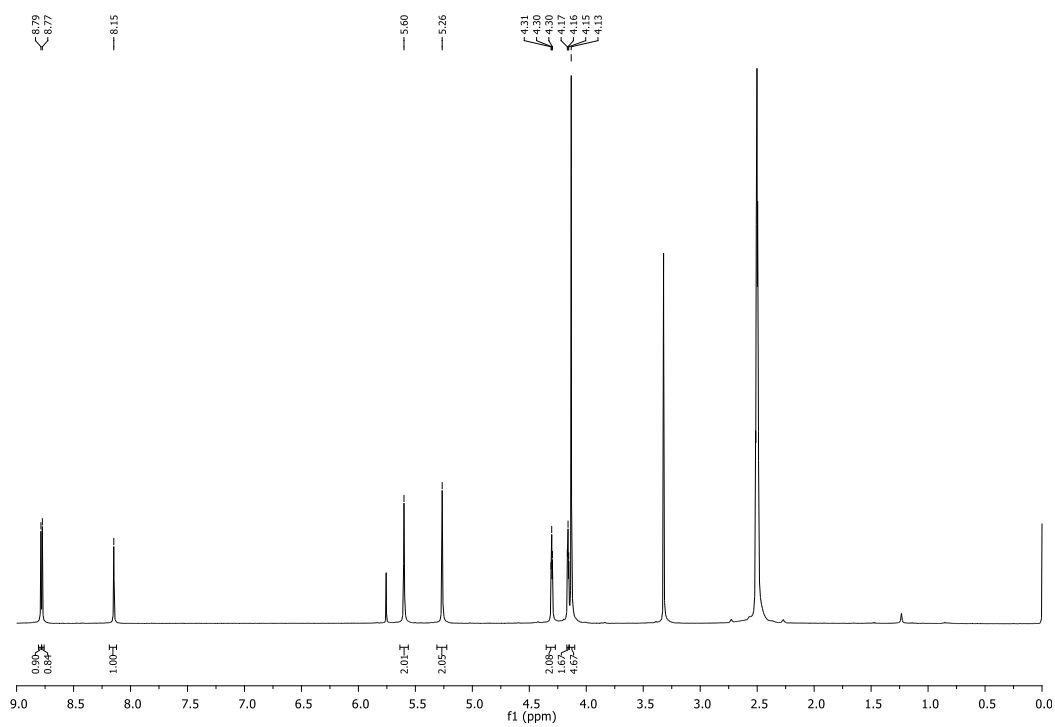


b)

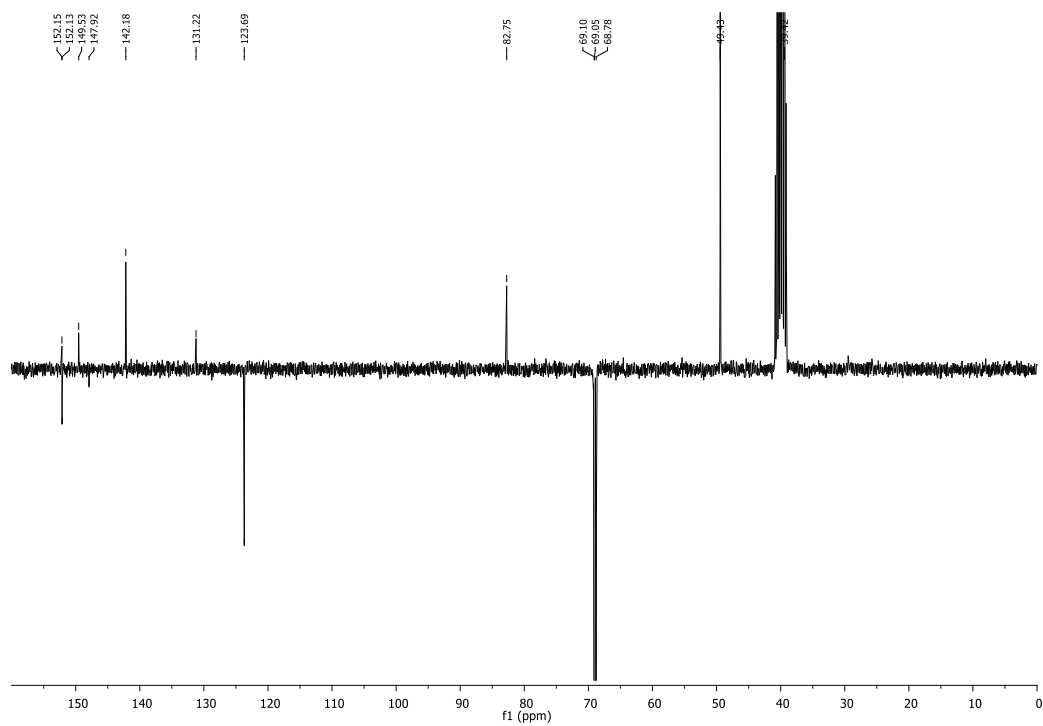


Slika 40. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **27**.

a)

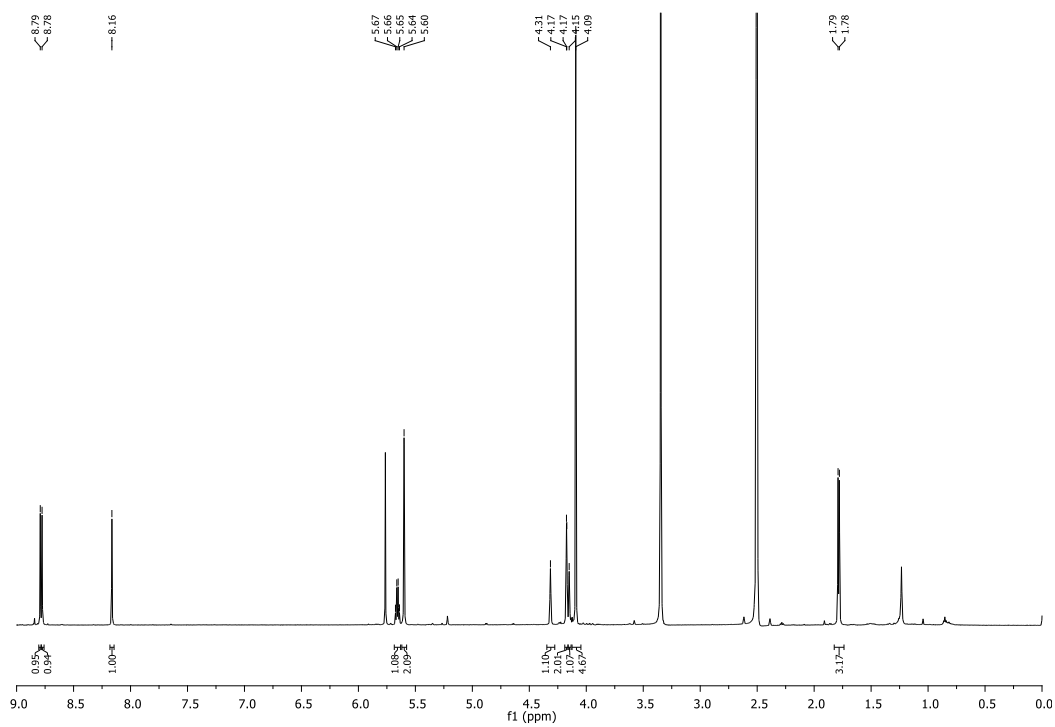


b)

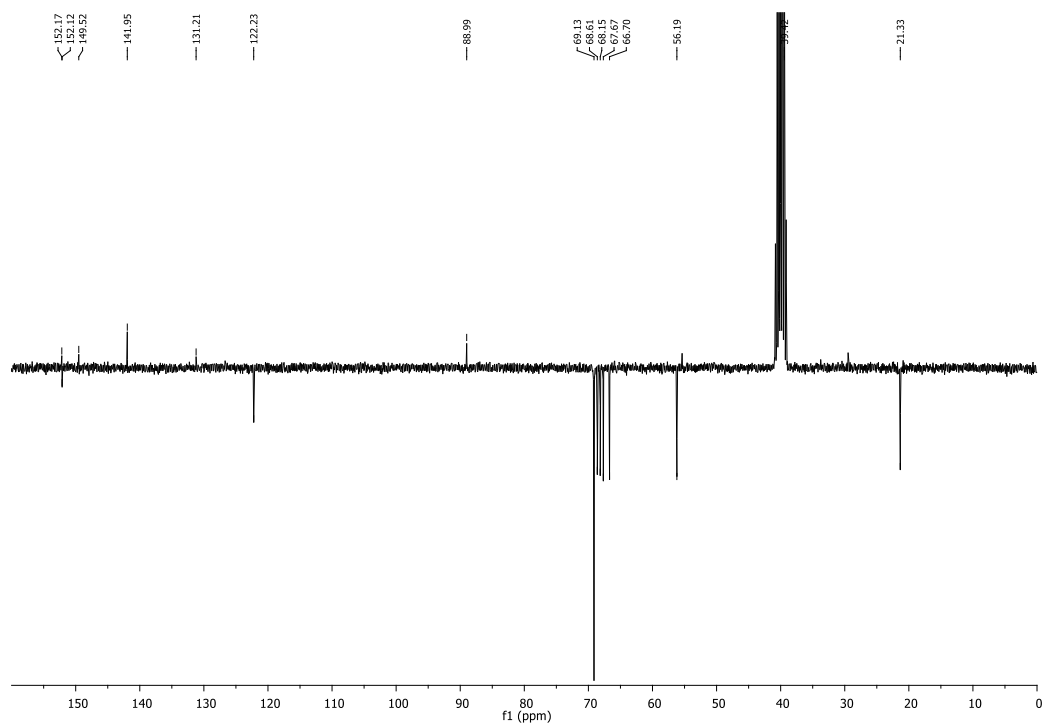


Slika 41. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spoja 28.

a)

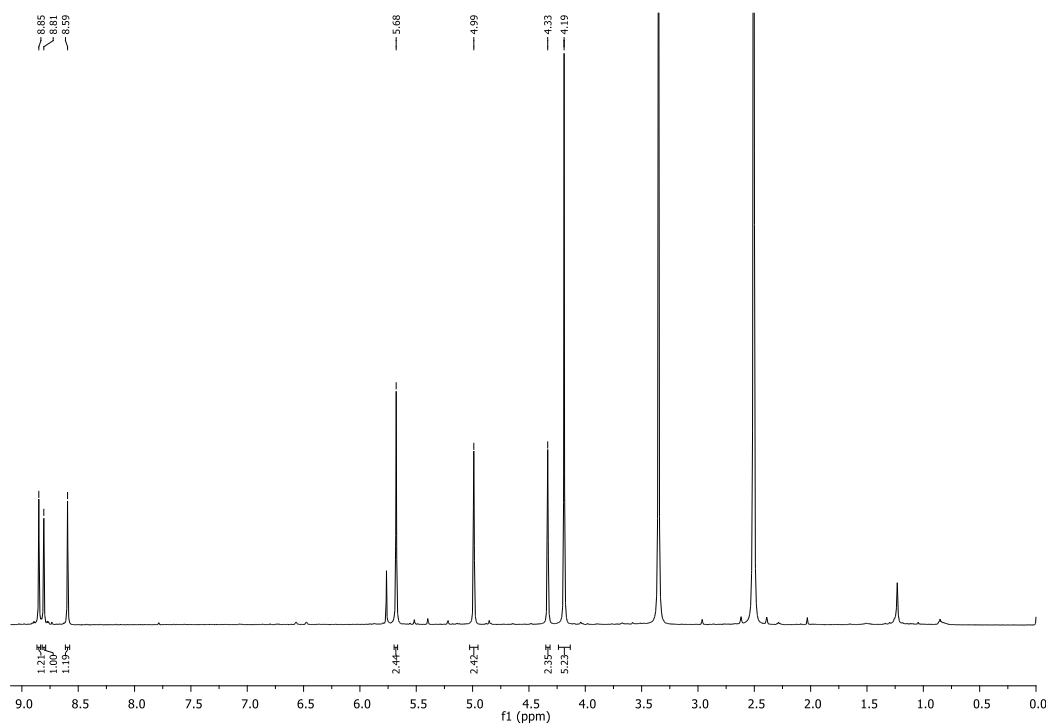


b)

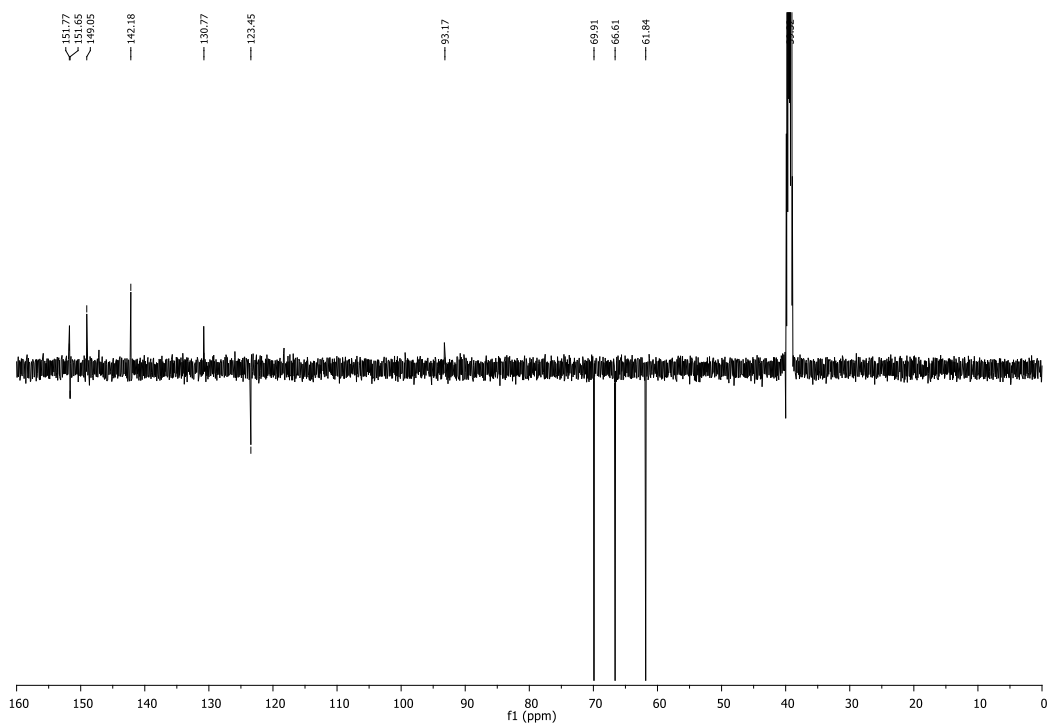


Slika 42. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **29**.

a)

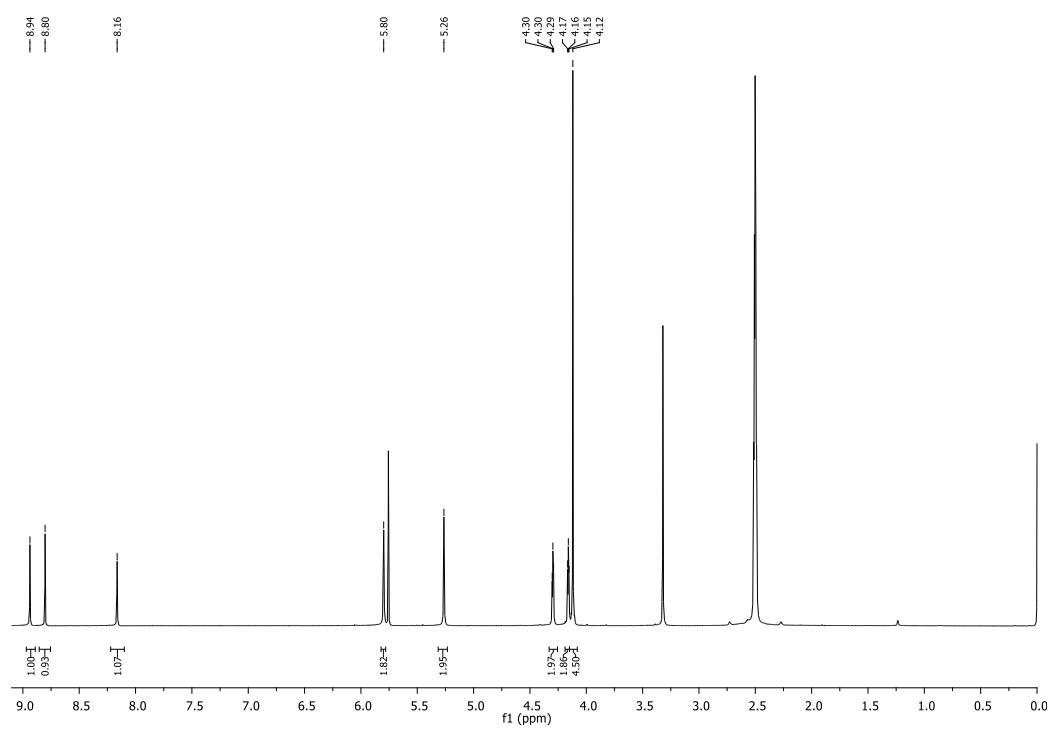


b)

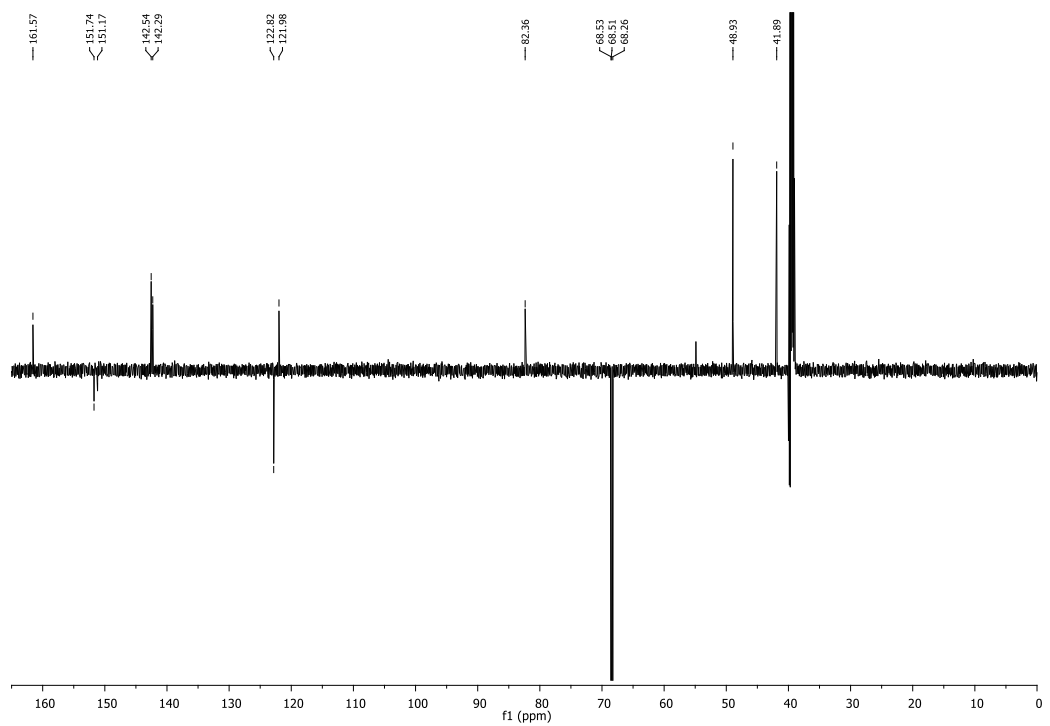


Slika 43. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **30**.

a)

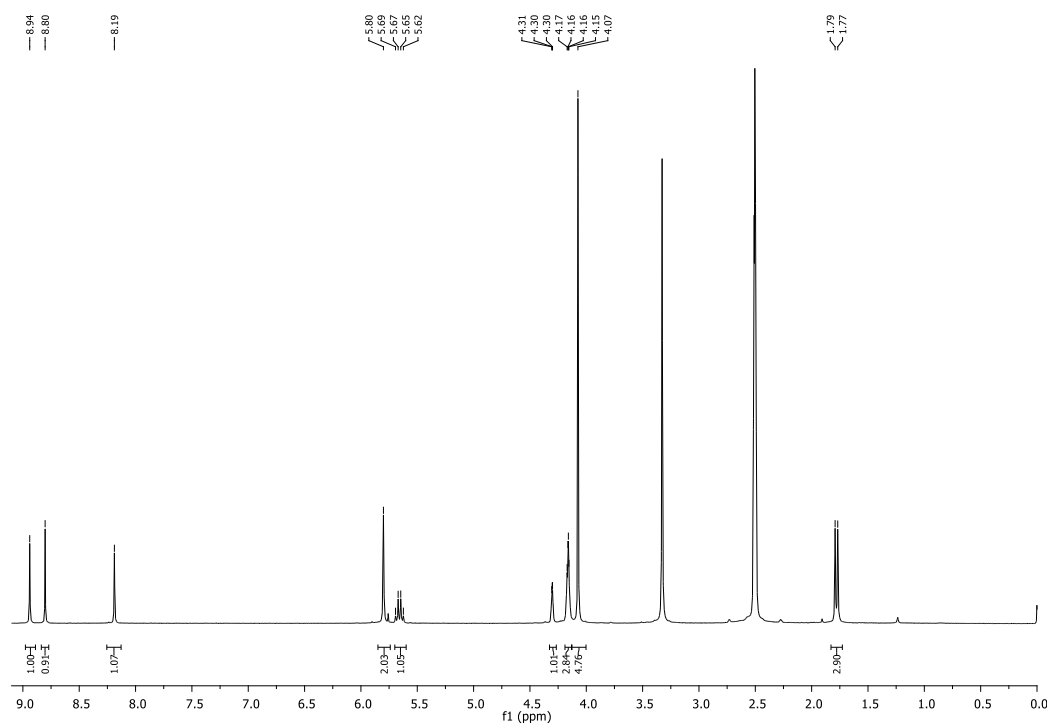


b)

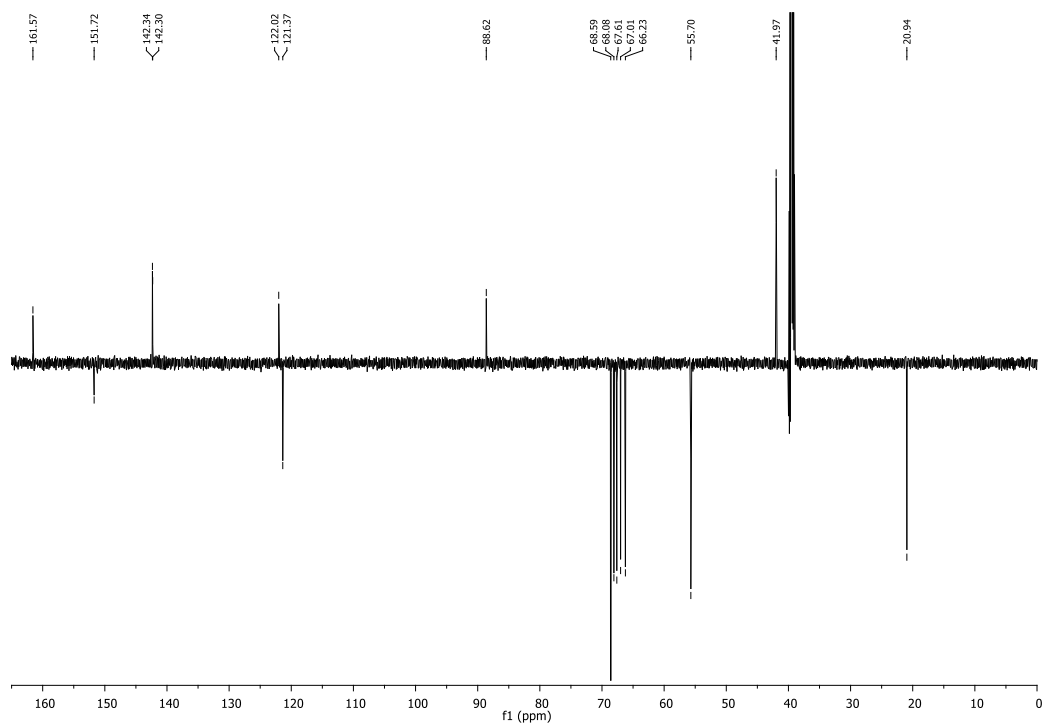


Slika 44. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **31**.

a)

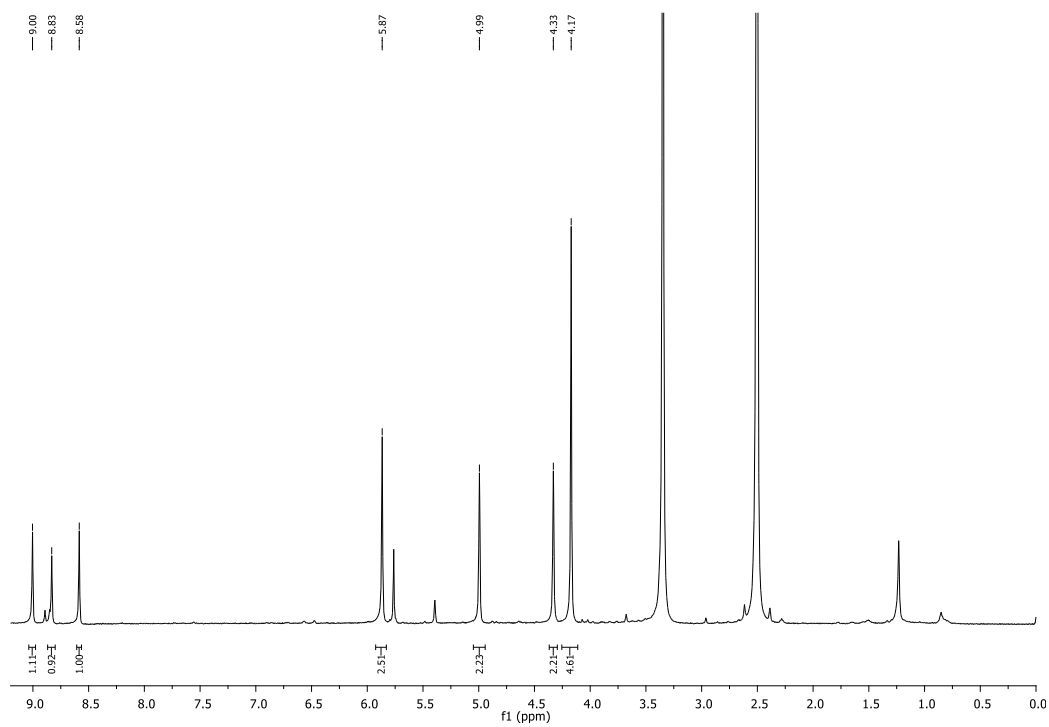


b)

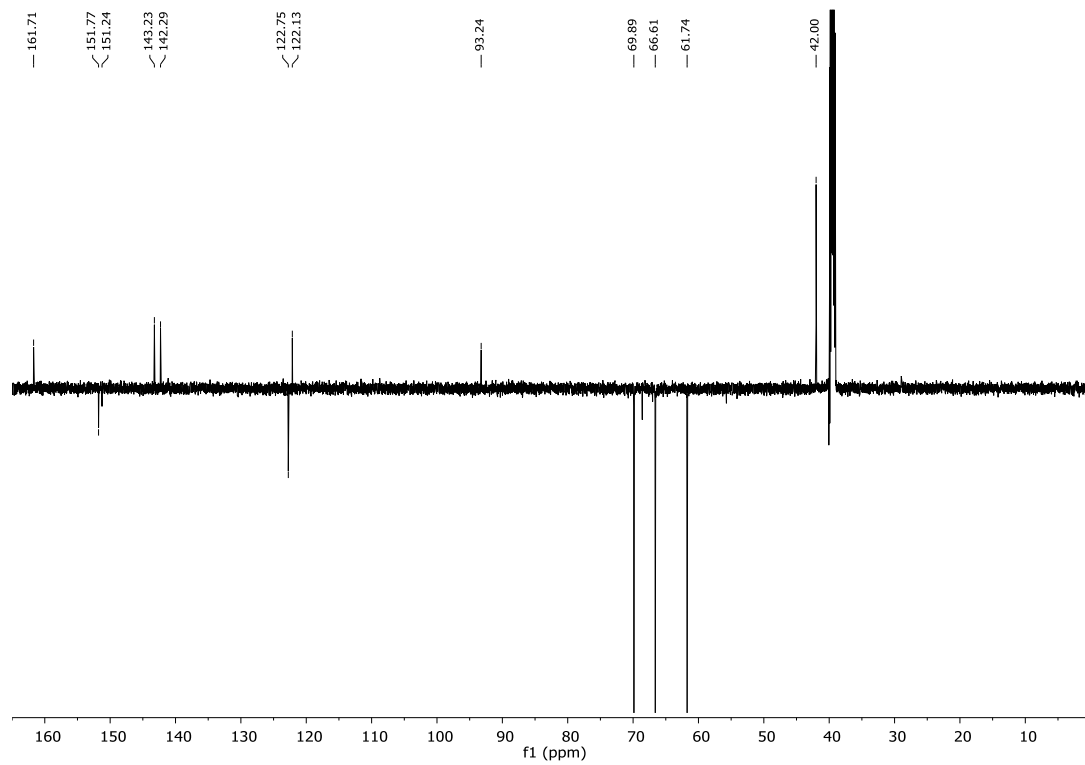


Slika 45. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **32**.

a)

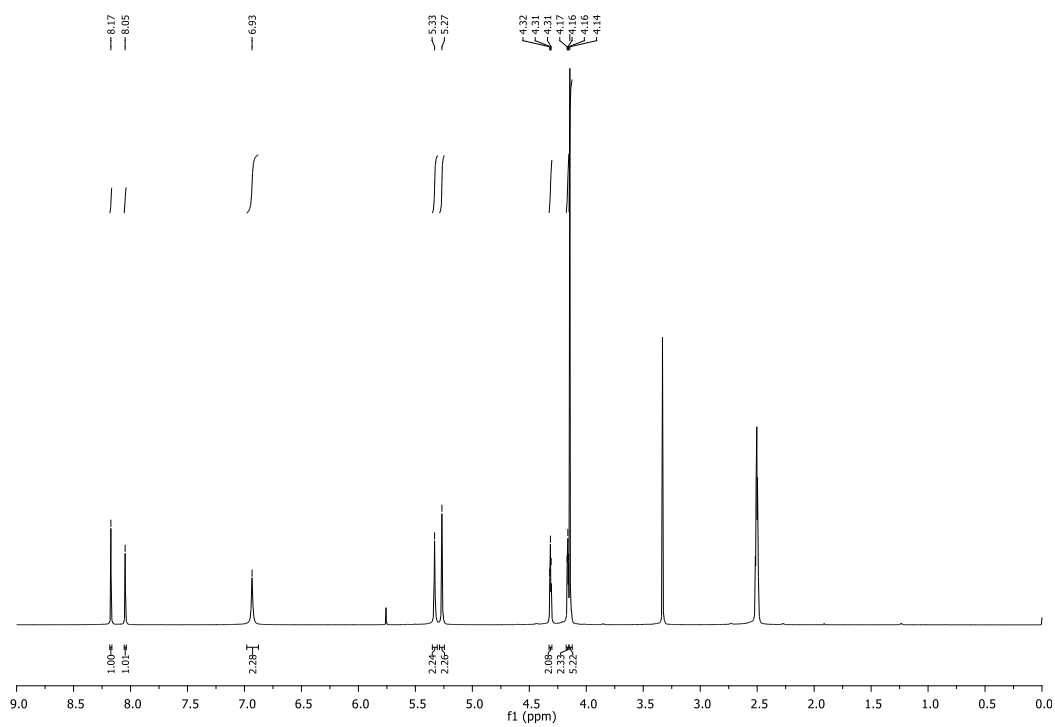


b)

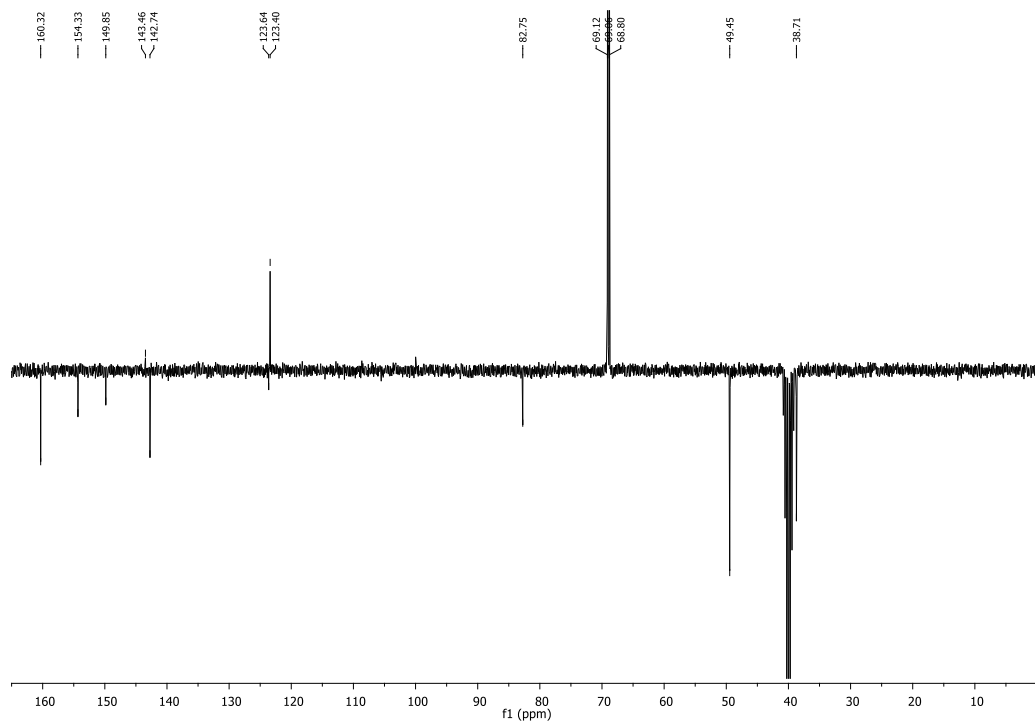


Slika 46. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **33**.

a)

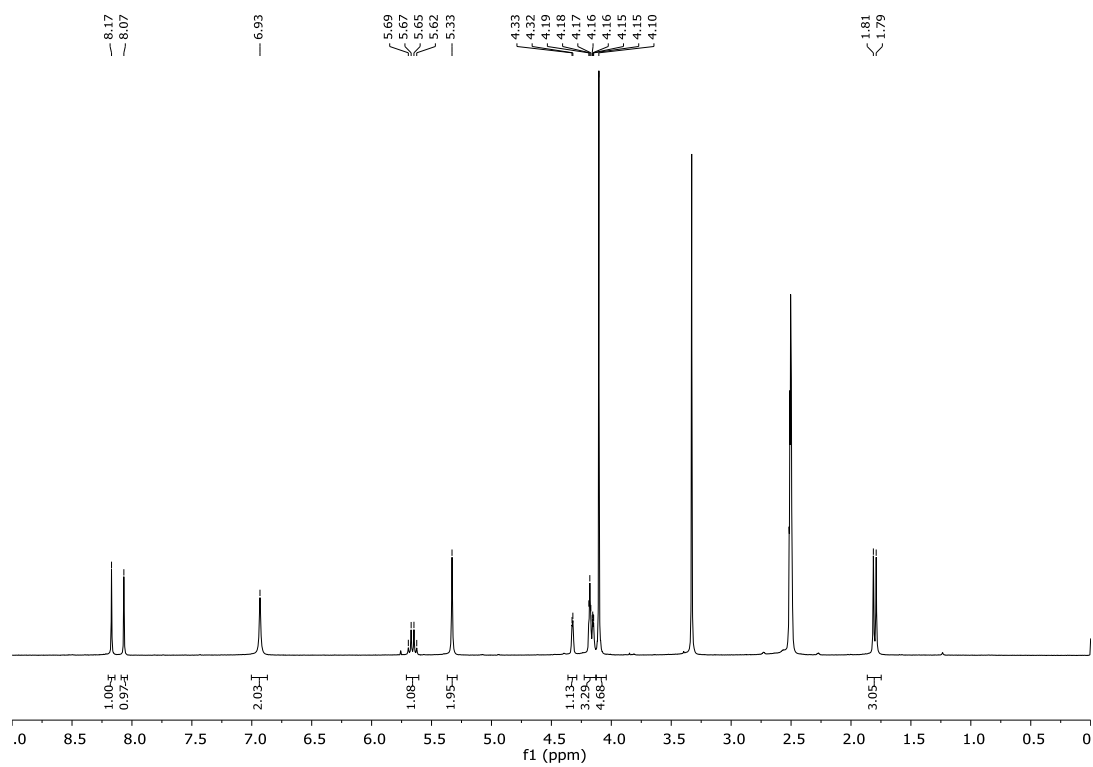


b)

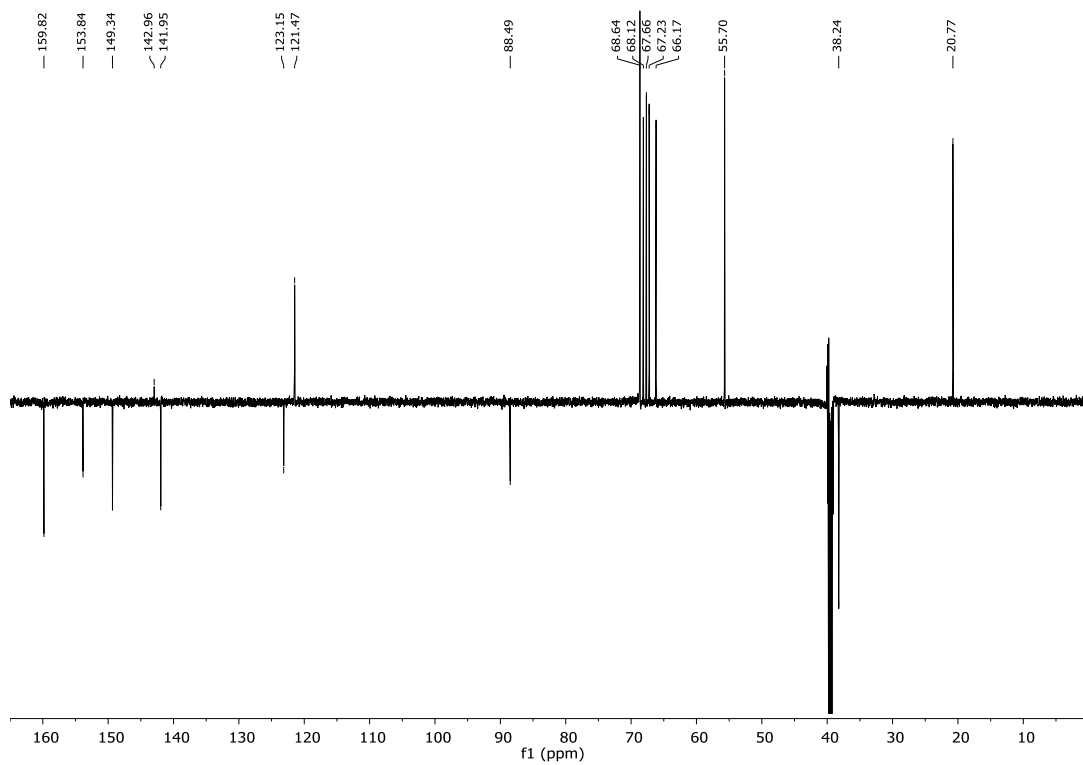


Slika 47. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **34**.

a)

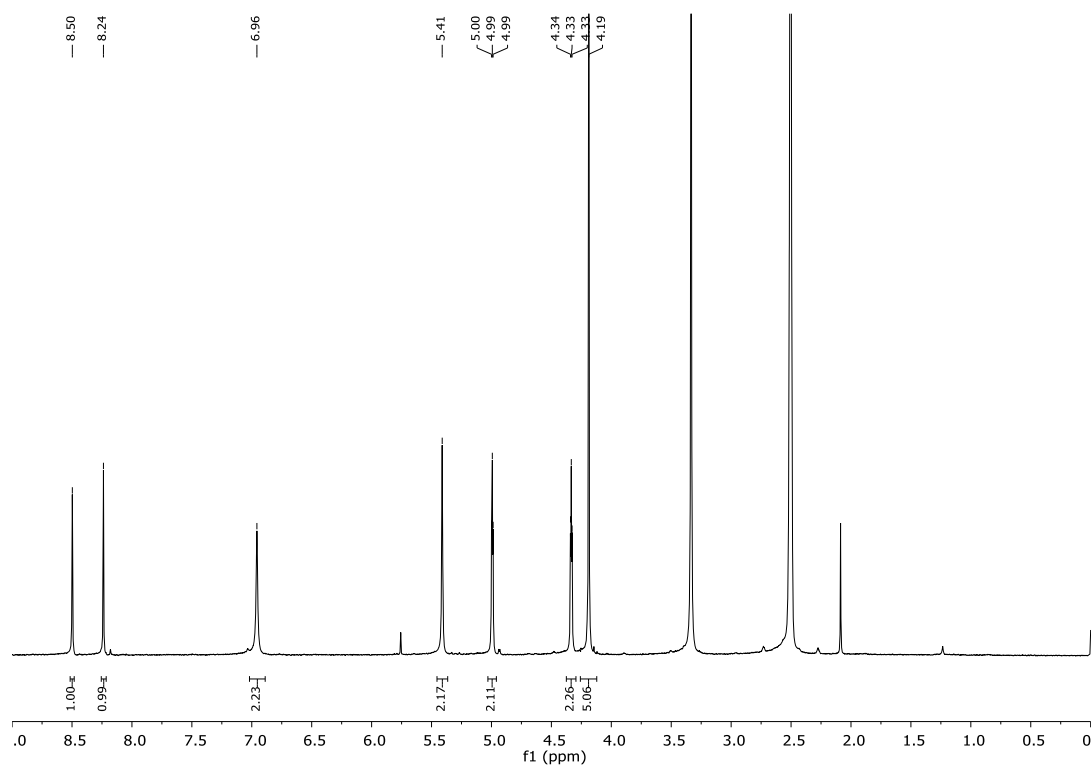


b)

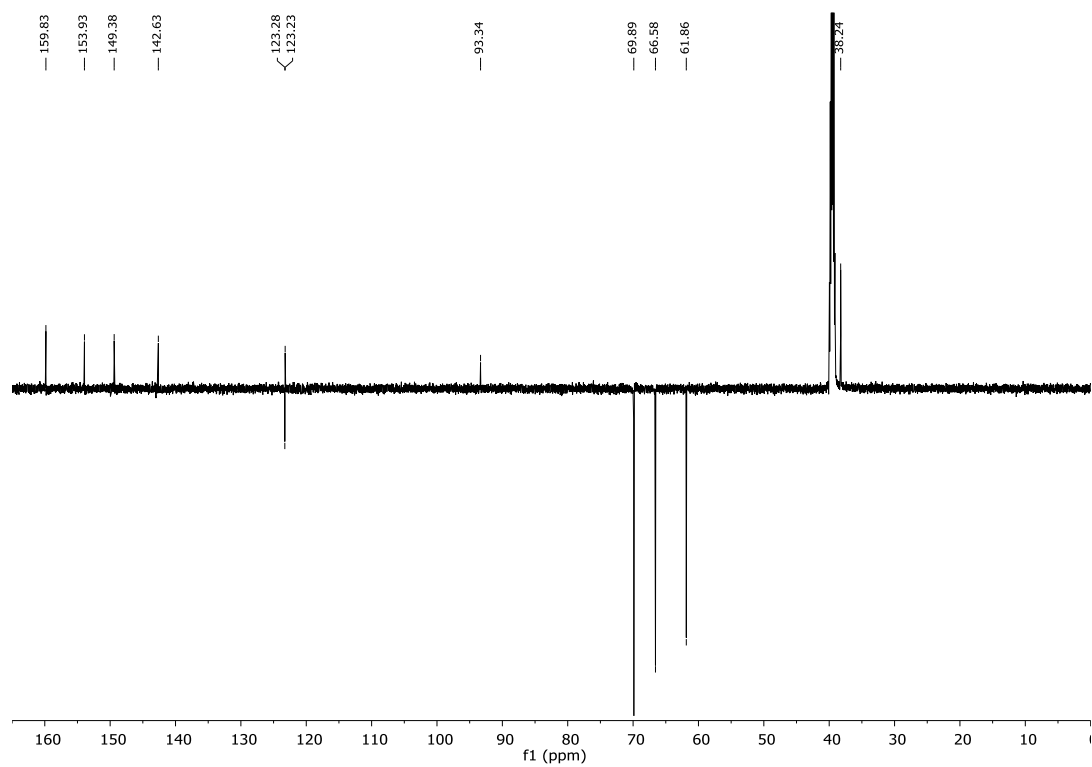


Slika 48. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **35**.

a)

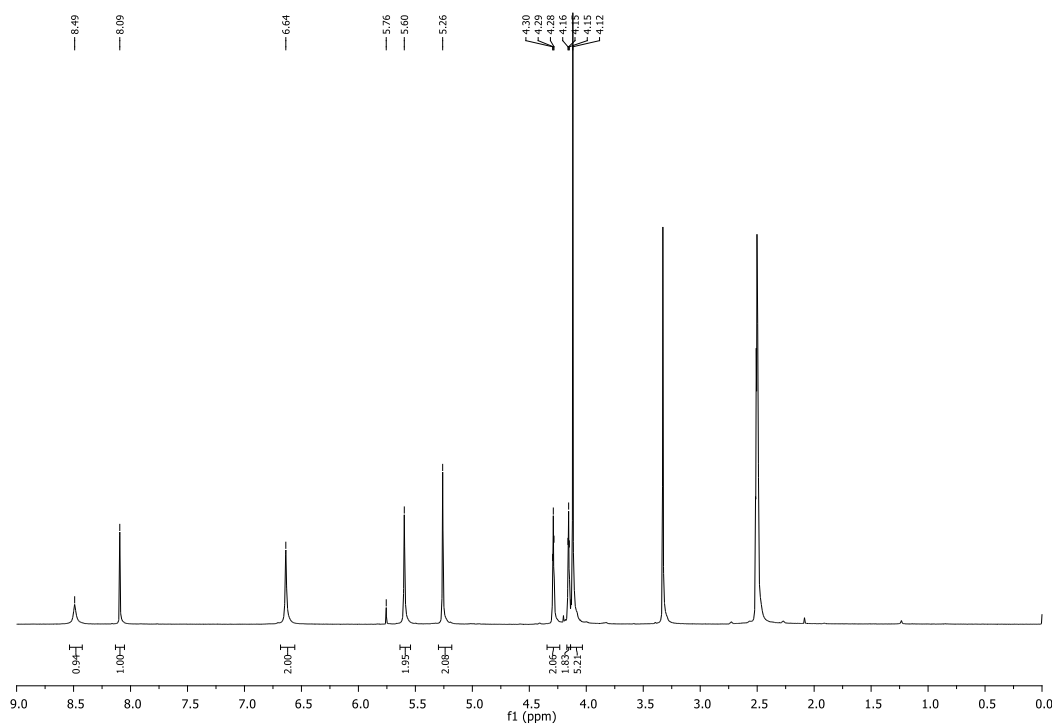


b)

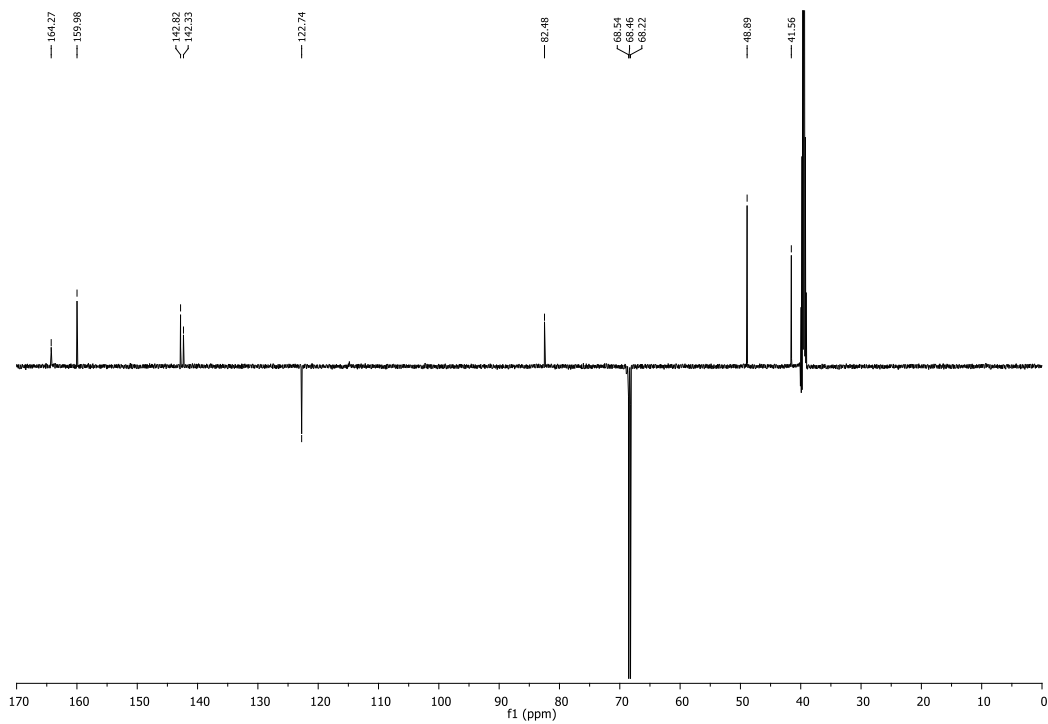


Slika 49. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **36**.

a)



b)



Slika 50. a) ^1H i b) ^{13}C NMR spektar spoja **37**.