

# Novi derivati citozina: sinteza "klik" reakcijom, strukturna karakterizacija, in silico analiza i antitumorska ispitivanja

---

Mihovilović, Moris

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:883700>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-01**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

Moris Mihovilović

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, srpanj 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

Moris Mihovilović

**NOVI DERIVATI CITOZINA: SINTEZA „KLIK“  
REAKCIJOM, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA, *IN*  
*SILICO* ANALIZA I ANTITUMORSKA ISPITIVANJA**

**DIPLOMSKI RAD**

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

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

dr. sc. Maja Stipković Babić

doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor

**Zagreb, srpanj 2015.**

Zahvaljujem doc. dr. sc. Tatjani Gazivoda Kraljević na pruženoj prilici, predloženoj temi i izvrsnom mentorstvu kroz izradu ovoga rada i suradnju tijekom prethodne 2 godine.

Zahvaljujem dr. sc. Maji Stipković Babić na vodstvu kroz izradu eksperimentalnog dijela rada, ukazanoj dobroj volji i nastavak suradnje već treću godinu zaredom.

Kolegici Mande Miošić zahvaljujem se na svemu i nadam se nastavku kao dokazana dobitna kombinacija.

Svim članovima Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije zahvaljujem se za prijateljski pristup, mnogo savjeta, ugodnu radnu atmosferu i nezaboravna poznanstva.

Roditeljima, djevojci, cimerima te ostalim prijateljima i kolegama dugujem jedno veliko hvala na podršci i vjerovanju u mene, uljepšali ste mi sva iskustva kroz cijeli studij i bez vas ovih pet godina ne bi bilo tako lijepo i brzo razdoblje.

# Sadržaj

1. UVOD .....	7
1.1. Uvod .....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Nukleotidi i nukleozidi .....	2
2.1.1. Nukleozidni analozi.....	4
2.1.2. Citozin .....	5
2.1.3. N-alkiliranje citozina .....	8
2.2. Derivati 1,2,3-triazola .....	10
2.2.1. Derivati 1,2,3-triazola i nukleozida.....	12
2.3. „Klik“ kemija .....	15
2.4. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva in silico analizom (PASS).....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	19
3.1. Opće napomene .....	19
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva.....	20
3.3. Priprava spojeva.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	29
4.1. Sinteze spojeva.....	29
4.2. Strukturna karakterizacija novopripremljenih spojeva <sup>1</sup> H NMR spektroskopijom.....	33
4.4. <i>In silico</i> analiza novopripremljenih spojeva (1-20).....	42
5. ZAKLJUČCI .....	48
6. LITERATURA.....	50
7. ŽIVOTOPIS .....	52

## SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je pripraviti derivate *N*-4-benzoilcitozina 1,2,3-triazolnim supstituentima u položajima *N*-1 i *N*-3 radi njihovih citostatskih ispitivanja *in vitro* na staničnim linijama zloćudnih tumorskih linija porijeklom iz čovjeka: HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi). *N*-1 propargilirani i *N,N*-1,3-dipropargilirani derivati *N*-4-benzoilcitozina (**2**, **4** i **5**) pripremljeni su reakcijom alkiliranja *N*-4-benzoil-5-jodcitozina ili *N*-4-benzoilcitozina s propargil-bromidom uz K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kao bazu. Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom potpomognutom mikrovalovima *N,N*-1,3-dipropargiliranog derivata *N*-4-benzoil-citozina (**5**) s odgovarajućim azidima uz katalizator sintetizirani su *N,N*-1,3-ditriazolilni derivati citozina (**6-12**). Oksidacijom propargilnog supstituenta na položaju *N*-3 citozinskog prstena dobiveni su *N*-3-(2-oksopropil)-*N*-1-triazolilni derivati (**13-20**) kao nusprodukti. Strukturna karakterizacija novopripremljenih spojeva provedena je <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom, a moguće biološke mete i farmakološka djelovanja novopripremljenih spojeva predviđene su *in silico* analizom. Od svih analiziranih spojeva najbolje predviđene biološke aktivnosti imaju *N,N*-1,3-dipropargilirani *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**2**), derivat *N*-4-benzoil-ditriazolilcitozina koji na 1,2,3-triazolnom prstenu u položaju 1 ima *p*-trifluorometilfenilni supstituent (**6**) i derivat *N*-4-benzoil-*N*-3-(2-oksopropil)-*N*-1-triazolilcitozina koji na 1,2,3-triazolnom prstenu u položaju 1 ima benzilni supstituent (**17**).

Ključne riječi: derivati citozina, 1,2,3-triazol, „klik“ kemija, *in silico* analiza, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopija

## ABSTRACT

The aim of this research was to synthesize *N*-4-benzoyl-cytosine derivatives with 1,2,3-triazole substituents on *N*-1 and *N*-3 in order to perform cytostatic evaluations *in vitro* against malignant human tumor cell lines: HeLa (cervical adenocarcinoma), CaCo-2 (colon adenocarcinoma), Raji (Burkitt lymphoma) i K562 (chronic myeloid leukemia in blast crisis). *N*-1 propargylated and *N,N*-1,3-dipropargylated *N*-4-benzoylcytosine derivatives (**2**, **4** i **5**) were prepared by alkylation of *N*-4-benzoyl-5-iodocytosine or *N*-4-benzoylcytosine with propargyl-bromide and  $K_2CO_3$  as the base. The microwave assisted Huisgen 1,3-bipolar cycloaddition of the *N,N*-1,3-dipropargylated *N*-4-benzoylcytosine derivative (**5**) with the corresponding azides and catalyst gave *N,N*-1,3-ditriazole cytosine derivatives (**6-12**). Byproducts of this reaction, *N*-3-(2-oxopropyl)-*N*-1-triazole derivatives (**13-20**) were obtained by oxidation of the *N*-3 propargyl substituent. Structural characterization of the newly synthesized compounds was performed by  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spectroscopy and mass spectrometry, and the possible biological targets and pharmacological activity of the prepared molecules were predicted by *in silico* analysis. Of all the analysed compounds, the best results show *N,N*-1,3-dipropargylated *N*-4-benzoyl-5-iodocytosine (**2**), *N*-4-benzoyl-ditriazolecytosine derivative with a *p*-trifluoromethylphenyl substituent on the 1,2,3-triazole ring (**6**) and *N*-4-benzoyl-*N*-3-(2-oxopropyl)-*N*-1-triazolecytosine derivative with a benzyl substituent on the 1,2,3-triazole ring (**17**).

Keywords: cytosine derivatives, 1,2,3-triazole, „click“ chemistry, *in silico* analysis,  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectroscopy

## **1. UVOD**



## 1.1. Uvod

Medicina 21. stoljeća pronašla je rješenja za mnoge dosad neizlječive bolesti i olakšala život ogromnom broju pacijenata, no rak i virusne bolesti i dalje odolijevaju potrazi za učinkovitim lijekovima. Glavni način borbe protiv tih oboljenja predstavlja kemoterapija, ali uz njene nuspojave i štetnost za ostatak organizma ne može se smatrati adekvatnim tretmanom. Rezistentnost koju takve bolesti pokazuju prema kemoterapiji samo su dodatan dokaz da je potraga za novim potencijalnim antitumorskim i antivirusnim agensima ključ za zadovoljavajuću obranu organizma.

Glavni izvor novih spojeva proizlazi iz biomimetika, odnosno molekula čije strukture imitiraju one biomolekula i na taj način inhibiraju mnoge procese koji su zaslužni za replikaciju virusa i proliferaciju tumorskog tkiva. Među vodećim klasama spojeva u tom području su nukleozidni analozi pirimidina i purina. Jedan od takvih derivata, citarabin, je nukleozidni analog citozina koji se već duže vrijeme u kliničke svrhe koristi kao lijek protiv akutne leukemije. Molekule bazirane na citozinu pokazale su i antivirusno djelovanje pa je tako (*S*)-1-(3-hidroksi-2-fosfonilmetoksipropil)citozin (HPMPC) snažan i selektivan inhibitor replikacije humanog citomegalovirusa (CMV).<sup>1</sup>

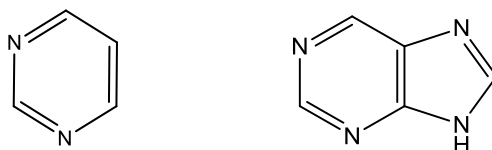
Među biološki aktivne spojeve spadaju i molekule koje sadrže triazolne prstenove, pogotovo strukture koje imaju 1,2,3-triazolni prsten. Spojevi s 1,2,3-triazolnim prstenom koriste se kao fungicidi i antigljivični lijekovi, no prisutni su i u raznim farmaceuticima kao što su antibiotici, antituberkulotici, inhibitori HIV-proteaze i antitumorski lijekovi.<sup>2</sup> Najrašireniji od njih je ujedno i prvi triazolni nukleozid koji je odobren za korištenje protiv hepatitis C virusa, a koristi se diljem svijeta i posjeduje širok spektar snažnog antivirusnog djelovanja.<sup>3</sup> Upravo zbog ribavirina i njemu sličnih specija vezanje triazolnih prstenova na pirimidinsku jezgru česta je strategija imitiranja strukture molekule ATP-a, koja je jedna od glavnih meta za zaustavljanje rasta tumora i širenje virusa kroz organizam.

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

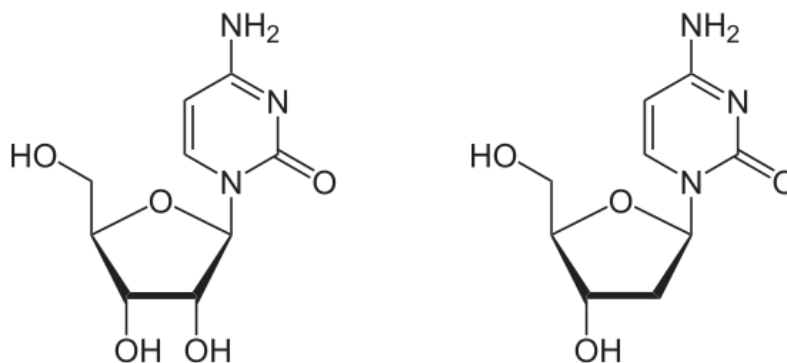
## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Nukleotidi i nukleozidi

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

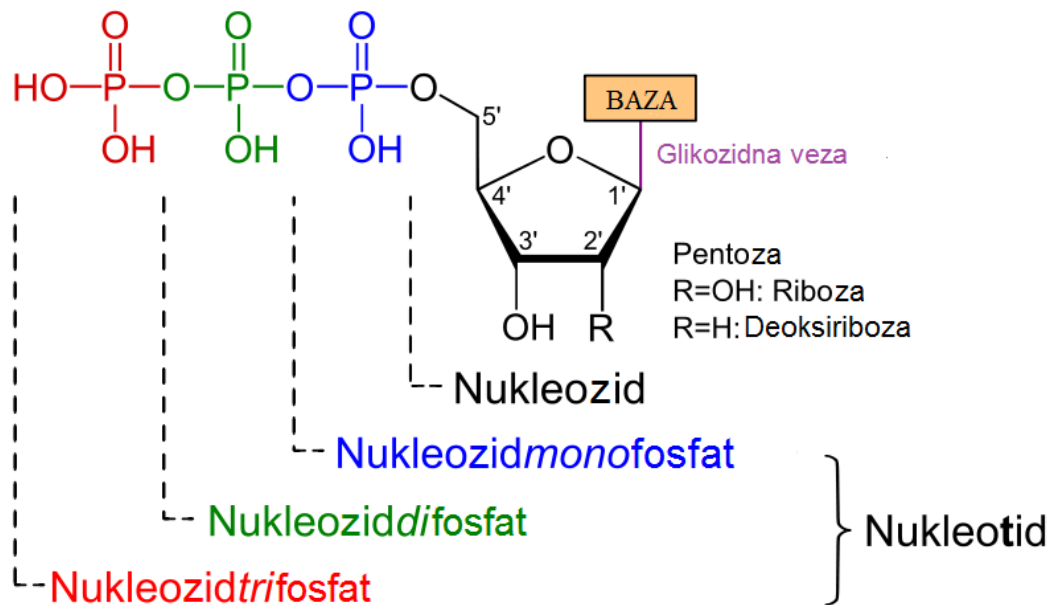


Slika 1. Strukture pirimidinskog i purinskog prstena



Slika 2. Strukture nukleozida s ribozom i deoksiribozom

Aglikonske baze koje se pojavljuju u strukturama nukleozida su adenin, gvanin (purinske) i timin, citozin te uracil (pirimidinske). Povezivanjem nukleozida sačinjenih od navedenih baza i šećernih komponenti sa fosfatnom skupinom nastaju nukleotidi (Slika 3), monomeri nukleinskih kiselina koji su odgovorni za najvažnije funkcije i preživljavanje organizma. Oni su osnovne građevne jedinice nasljednog materijala (DNK i RNK), koji omogućava rast i razmnožavanje živih bića, a imaju i ključnu ulogu u prijenosu energije do svih stanica i organa u obliku adenozin-trifosfata (ATP).



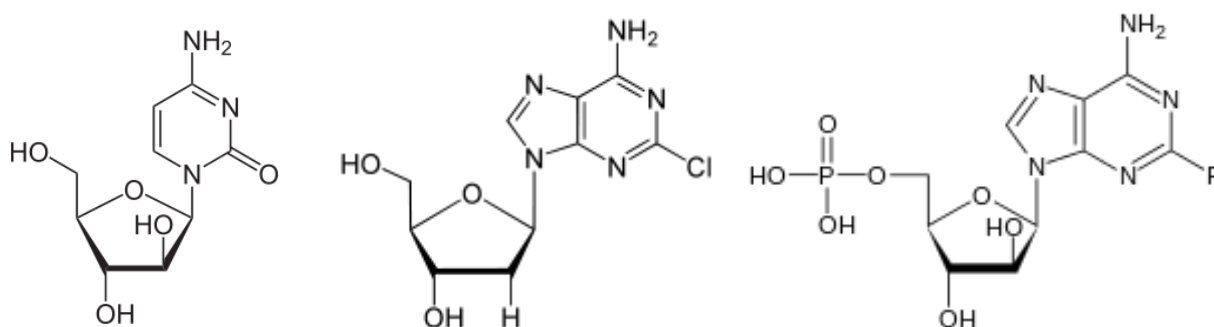
Slika 3. Strukturne razlike između nukleozida i nukleotida

Nukleozidi se mogu sintetizirati raznim metodama. Jedan od načina je supstitucija s dušikovim nukleofilom na monosaharidu katalizirana kiselinom, što je analogno nastajanju glikozida. Drugi način je *de novo* sinteza koja se jednim dijelom odvija u jetri. No, u većoj se mjeri nukleozidi dobivaju razgradnjom nukleinskih kiselina, pri čemu nukleotidaze razgrađuju nukleotide na nukleozide i fosfate. Nukleozidi se dalje razgrađuju nukleotidazama na dušične baze i šećer ribozu, odnosno deoksiribozu.<sup>4</sup> Sinteza nukleotida teče dako da se nukleozidi fosforiliraju nukleozidnim monofosfat-kinazama pa tako nadalje do trifosfata.<sup>5</sup>

### 2.1.1. Nukleozidni analozi

Nukleozidni analozi su spojevi dobiveni sintetski, koji su kreirani s namjerom da imitiraju prirodne nukleozide i zamijene njihovo mjesto u nukleinskim kiselinama. Oni se u postupku izgradnje nukleinskog lanca umeću umjesto prirodnih nukleozidnih baza te na taj način inhibiraju staničnu ili virusnu DNK i RNK polimerazu. Jedan od najvećih pomaka u medicini 20. stoljeća bio je otkriće antibiotika koji inhibiraju proliferaciju bakterija u zaraženom organizmu. Prikupljena znanja omogućavaju sličan napredak na području antitumorske i antivirusne terapije. Istraživani procesi replikacije tumorskih stanica i virusa sve više su objašnjivi i poznatiji pa je tako postalo moguće identificirati spojeve koji bi mogli selektivno interferirati njihove funkcije. Među ovakvim spojevima ključnu ulogu imaju nukleozidni analozi.<sup>6</sup>

Analozi nukleozida već duže vrijeme čine važnu klasu antimetabolita korištenih u liječenju hematoloških zloćudnih tkiva, a odnedavna i u čvstim tumorima. Oni oponašaju prirodne nukleozide, odnosno njihovu ulogu u metabolizmu te se ugrađuju u rastući lanac DNA inhibirajući njegovu sintezu i uzrokujući terminaciju lanca. Neki od analoga također inhibiraju enzime koji su od krucijalnog značenja za generiranje purinskih i pirimidinskih nukleozida i sintezu RNA te direktno aktiviraju apoptozu ili staničnu smrt. Klasa nukleozidnih analoga uključuje razne pirimidinske i purinske derivate od kojih su značajni pirimidinski analozi citozinarabinozid (citarabin) koji se rašireno koristi za liječenje akutne leukemije, dok gemicitabin pokazuje aktivnost u borbi protiv raka gušterače, pluća i dojke (Slika 4). Prva dva razvijena purinska analoga su tiopurini 6-merkaptopurin (6-MP) i tiogvanin (6-TG). Ostali purinski analozi su 2-klordeoksiadenozin (2-CdA, kladribin) i fludarabin (Slika 4), čija uporaba obuhvaća samo hematološka maligna tkiva.

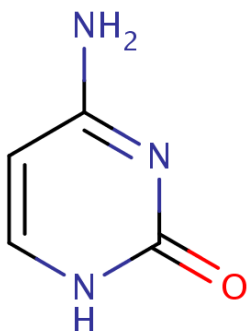


Slika 4. Strukture citarabina, kladribina i fludarabina

Važnost nukleozidnih analoga kao kemoterapeutskih agenasa porasla je kao rezultat uvođenja novih molekula u kliničku uporabu i širenje u područje čvrstih tumora. Tijekom tog razdoblja, postignut je golem napredak u razumijevanju mehanizama otpornosti lijekova na nukleozidne derivate. Jedna od metoda koja je obećavajuća u smjeru borbe protiv navedene otpornosti je korištenje kombinacija lijekova koje optimiraju efikasnost trenutno dostupnih lijekova i trudi se razviti nove, učinkovitije analoge koji su manje podložni mehanizmima razvijanja otpornosti. Vodeću ulogu u tome imaju ugrađivanje fosforiliranih nukleozidnih derivata u DNA u kombinaciji s agensima koji potiču apoptotičke odgovore u organizmu. Kao što je kombinirana kemoterapija pronašla rješenja za liječenje nekih oblika raka, tako pronalaženje novih nukleozidnih analoga s više različitih funkcija može biti osnova napretka u borbi protiv bolesti otpornih na postojeće kemoterapeutike.<sup>7</sup>

### 2.1.2. Citozin

Citozin je pirimidinska nukleozidna baza koja je jedna od osnovnih sastavnica nukleinskih kiselina (Slika 5), stoga su njeni analozi jedni od glavnih spojeva inhibitora rasta DNK i RNK.



Slika 5. Struktura nukleozidne baze citozina

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

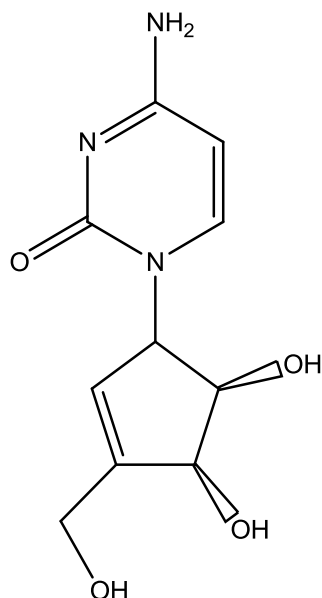
Među takvim spojevima nalazi se i (S)-1-(3-hidroksi-2-fosfonilmetoksipropil)citozin (HPMPC), snažan i selektivan inhibitor replikacije humanog citomegalovirusa (CMV). Njegova aktivnost vrlo je visoka i slična ekvivalentnom adeninskom derivatu (S)-1-(3-hidroksi-2-fosfonilmetoksipropil)adeninu (HPMPA), a oba su pokazala vrlo niske koncentracije potrebne za inhibiciju virusa. HPMPC djeluje inhibitory čak i nakon dodavanja 24 do 48 sati nakon infekcije.<sup>8</sup>

Citozinski derivati pokazali su i značajnu antitumorsku aktivnost. Učinkovitost antitumorskog nukleozidnog derivata citozina 3'-etinilcitudina (ECyd) analizirana je *in vitro* i *in vivo*. *In vivo* antitumorski učinak uključivao je kapsuliranje u liposome, a farmakokinetičkim i farmakodinamičkim analizama dobiven je model koji kvantitativno objašnjava *in vivo* utjecaj ECyd-a. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da je raspoloživost ECyd-a u tumorskom tkivu bila vrlo važna za borbu organizma protiv malignog tkiva. Sintetizirani su i fosfolipidni derivati koji su povećali antitumorsko djelovanje. Istraživanja su pokazala da su citozinski derivati vrlo snažni biološki agensi, kao i da je vrlo važno dizajnirati nosioce antitumorskih lijekova modeliranjem njihovih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava.<sup>9</sup>

Potruga za novim nukleozidnim analogima cilja na točno određene virusne reverzne transkriptaze i pokušava prilagoditi strukturu nukleozida u svrhu pripravljanja inhibitornih specija. Odnos između strukture i biološke aktivnosti procijenjen je za antivirusne spojeve sintetizirane iz postojećih citozinskih deoksiribonukleozida. Linija sintetiziranih spojeva uključivala je 2,3-dideoksicitidin (zalcitabin), 2,3-dideoksi-3-tiacitidin (lamivudin) i 2,3-dideoksi-5-fluor-3-tiacitidin (emtricitabin) i izgleda vrlo zanimljivo jer je svaki od produkata dobiven malim promjenama u kemijskoj strukturi prethodnog spoja, rezultirajući progresivnim poboljšanjima u aktivnosti, farmakokinetici, tolerantnosti i rezistentnom odgovoru tumorskih stanica.<sup>10</sup>

Cikloptenilcitozin (CPEC) (Slika 6) ističe se kao jedan od potentnijih citotoksičnih spojeva s širokim spektrom djelovanja koji pokazuje aktivnost prema nekoliko tumorskih staničnih linija. On inhibira sintezu citozin trifosfata (CTP) što za posljedicu ima pražnjenje citidilatih spremnika, jaki mehanizam inhibicije tumorskog rasta. Djelovanje CPEC-a ispitano je *in vitro* i *in vivo* protiv ljudskog raka crijeva HT-29 te je procijenjena jačina njegovog utjecaja na sintezu CTP-a. CPEC ima izraženu citotoksičnost *in vitro* prema HT-29 stanicama u mikromolarnom području tijekom samo dvosatnog izlaganja. Inkubacija stanica

CPEC-om u tom razdoblju rezultirala je pražnjenjem citidilatnih bazena koje je povezano i ovisno o dozi uzorka CPEC-a. *In vivo* antitumorska aktivnost u potkožnom tkivu atimičnih miševa ispitivana je na 3 milijuna HT-29 stanica. Miševi su tretirani s 1,5 mg/kg CPEC-a u pet navrata po četiri tretmana, s desetodnevnom pauzom između tretmana. Rezultat provedenog ispitivanja je značajno smanjenje mase tumora (72%) u tretiranoj grupi. HPLC analiza HT-29 stanica pokazala je da je tumor uklonjen iz jedinki miševa nakon tretmana CPEC-om imao značajno smanjenu koncentraciju CTP-a već nakon 8 sati. Zaključak ispitivanja je vrlo snažna antitumorska aktivnost CPEC-a protiv svježe transplantiranog ljudskog raka crijeva koja se može definirati kao potentno biokemijsko djelovanje spoja.<sup>11</sup>



Slika 6. Struktura ciklopentenilcitozina (CPEC)

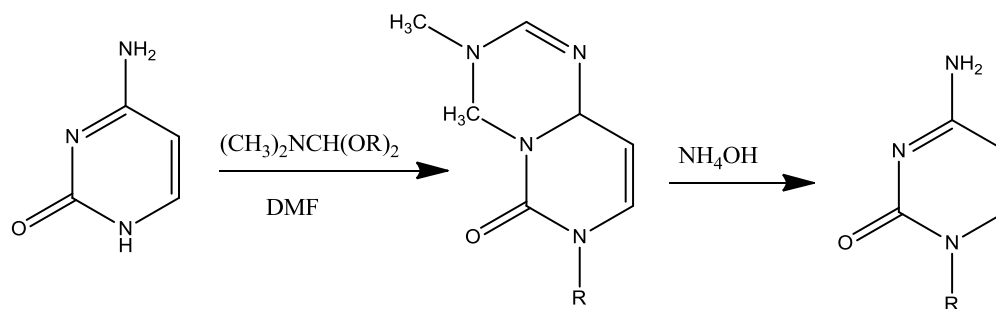


### 2.1.3. *N*-alkiliranje citozina

Povećanje biološke aktivnosti često je posljedica *N*-alkiliranja nukleozidnih prstenova pa se takve reakcije često provode u sintezama nukleozidnih analoga. Još je jedna prednost takvih spojeva što se alkenilnim ili alkinilnim supstituentima može pripremiti prekursore za mnogo kompleksnije ciljane produkte.

Važnost *N*-alkiliranja očituje se u inhibitornom djelovanju takvih spojeva na deoksicitidin-kinazu, koja je enzim zadužen za fosforiliranje uridina i citidina do monofosfata, što je jedan od ključnih koraka DNA sinteze.<sup>12</sup> Zato upravo njena inhibicija predstavlja značajno potencijalno antitumorsko i antivirusno djelovanje. Spomenuti spojevi također zaustavljaju sparivanje komplementarne baze sa 9-supstituiranim gvaninom, međusobno slaganje primidinskih baza i stvaranje asimetričnih međubaznih vodikovih veza. Sva ta djelovanja korisna su u zaustavljanju replikacije nukleinskih kiselina. Osim biološke aktivnosti samih derivata, oni služe kao prekursori mnogih visoko topljivih, brzo djelujućih antibakterijskih spojeva poput sulfacitina (1-etil-*N*-4-sulfanilcitozin), a zabilježeno je i korištenje alkiliranih derivata citozina u spektroskopskoj detekciji ograničene rotacije amino skupina izvan stanične jezgre.

Na shemi 1 prikazana je metoda sinteze *N*-1-metil-citozina koja uključuje reakciju citozina s *N,N*-dimetilformamidmetil-acetatom nakon koje slijedi hidroliza. Prvi korak uključuje reakciju citozina s *N,N*-dimetilformamidialkil-acetatom u bezvodnom dimetilformamidu pri čemu nastaje odgovarajući 1-supstituirani-*N*-4-[(dimetil-amino)metilen]citozin u visokom iskorištenju. Navedeni produkt potom ulazi u reakciju hidrolize s koncentriranim amonijevim hidroksidom pri čemu nastaje odgovarajući *N*-1-supstituirani citozin.<sup>13</sup>



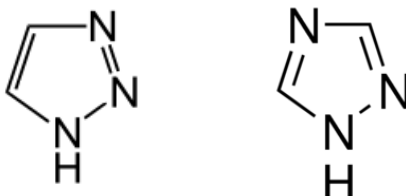
Shema 1. *N*-alkiliranje citozina

Još jedna od mogućih metoda je reakcija citozina s metansulfonatom (MMS) i *N*-metil-*N*-nitrozoureom (MNU). Navedene su metode korištene radi ispitivanja uloge alkiliranja citozina u mutagenезi i mogućnosti imunosti T-stanica na mutaciju kod korištenja drugih alkilirajućih agenasa.<sup>14</sup> *N*-alkiliranje dužim lancima moguće provesti i regioselektivno, uz katalizu 18-kruna-6 krunastim eterom uz kalijev *tert*-butoksid na 0°C.<sup>15</sup>

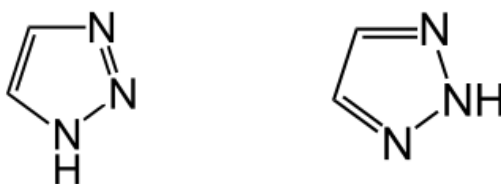
Iz svega navedenog vidljivo je kako je *N*-alkiliranje citozina moguće provesti selektivno te uz mnoge različite supstituente raznim agensima. Ono predstavlja važan korak u povećanju biološke aktivnosti i sintezi prekursora za složenije produkte pa je zbog toga jedan od ključnih koraka u sintezi nukleozidnih analoga.

## 2.2. Derivati 1,2,3-triazola

Triazoli su aromatski heterociklički spojevi koji dolaze u obliku dva izomera: 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol (Slika 7), a međusobno se razlikuju u rasporedu dušikovih atoma unutar prstena. Svaki od njih ima 2 tautomerna oblika u kojima se mijenja položaj vodika na dušikovim atomima. Na slici 8 prikazani su tautomerni oblici 1,2,3-triazola. Derivati triazola imaju široko područje primjene, od kojih je najpoznatije njihovo djelovanje protiv gljivica pa se zato koriste kao lijekovi u tu svrhu i kao fungicidi u poljoprivredi. Osim u antigljivičnim lijekovima, derivati triazola su prisutni u raznim farmaceuticima poput antibiotika, antituberkulostatika, inhibitora HIV-proteaze i antitumorskih lijekova.<sup>16</sup>



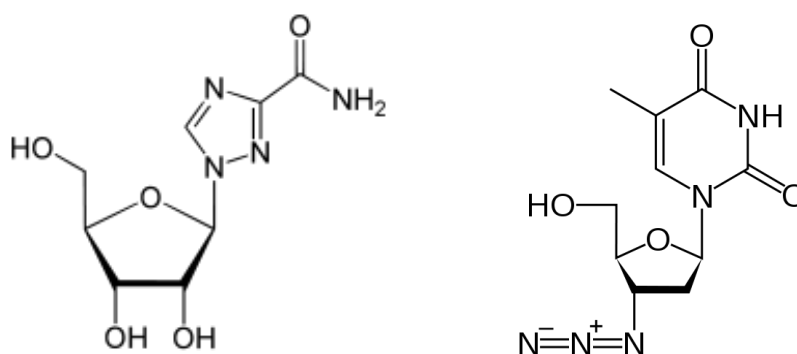
Slika 7. Strukture 1,2,3-triazola i 1,2,4-triazola



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

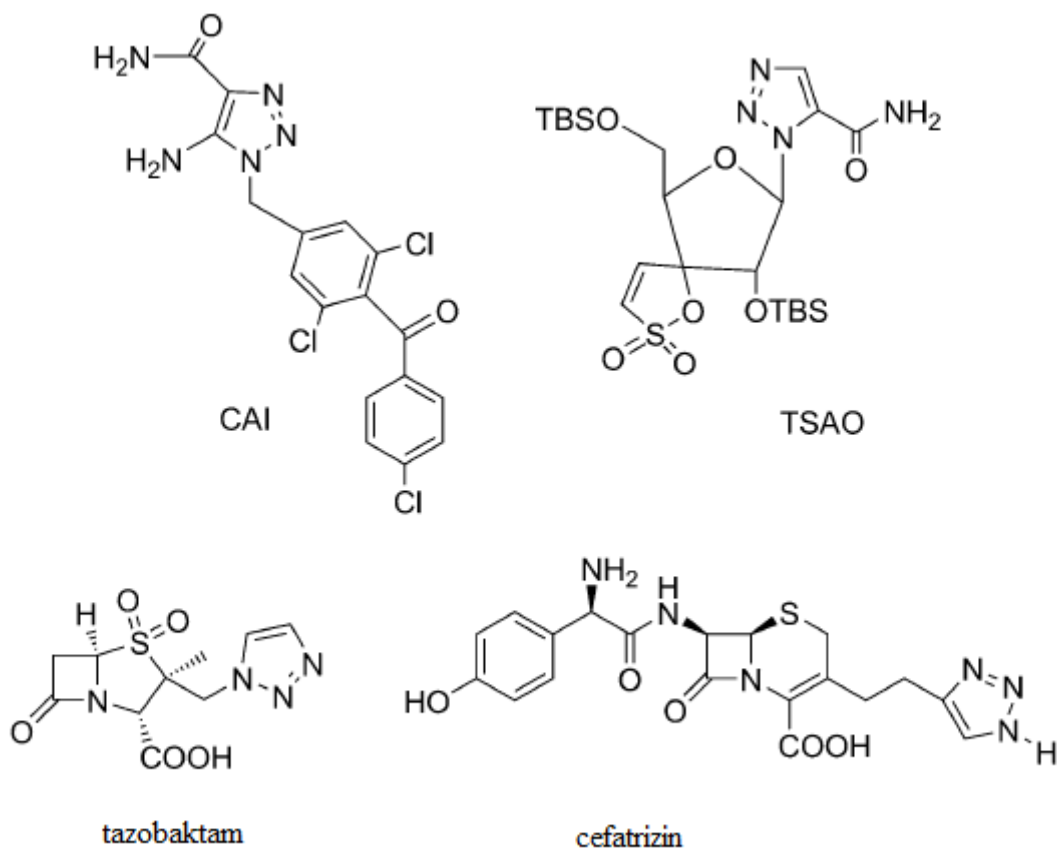
Derivati 1,2,3-triazola posebno su zanimljivi jer su stabilni, odnosno nisu podložni metaboličkoj razgradnji, stvaraju jake vodikove veze koje mogu biti ključne u vezivanju s mnogim biomolekulskim metama i dobro su topljivi. U prirodi se ne pojavljuju, iako sintetske molekule koje sadrže 1,2,3-triazolni prsten pokazuju raznoliku biološku aktivnost. Važnost triazolnih spojeva u medicinskoj kemiji je neupitan jer, za razliku od ostalih azaheterocikla, 1,2,3-triazolni prsten nije protoniran pri fiziološkom pH zbog svoje slabe bazičnosti. Stoga, njihovi neprotonirani  $sp^2$  hibridizirani dušikovi atomi mogu bolje imitirati djelomično pozitivni naboj anomernog ugljika u prijelaznom stanju reakcija kataliziranih glukoza-oksidadama nego što to čine slični bazični dušikovi atomi iminošećera.<sup>1</sup> Brojni 1,2,3-triazoli svoje biološko djelovanje duguju svojoj mogućnosti da djeluju kao rigidne poveznice kojima imitiraju zamjenu atoma i elektronska svojstva peptidne veze bez podložnosti hidrolizi.<sup>17</sup>

Korištenje 1,2,3-triazolnih derivata kao farmaceutika mnogo duguje razvoju nukleozidnih analoga korištenih u medicinske svrhe koji je imao značajan utjecaj na antivirusnu i antitumorsku kemoterapiju. Više takvih analoga uspješno je razvijeno za liječenje humanog virusa imunodeficijencije (HIV), hepatitis B virusa (HBV), hepatitis C virusa (HCV), herpes simpleks virusa (HSV), citomegalovirusa (CMV) i varicella zoster virusa (VZV). Uvođenje triazolnog prstena u nukleozidne derivate postalo je često u praksi dizajniranja lijekova zbog poboljšanja biološke aktivnosti u antitumorske ili antivirusne svrhe. Najpoznatiji primjer je ribavirin, prvi triazolni nukleozid sa širokim spektrom snažnog antivirusnog djelovanja odobrenog za korištenje protiv hepatitis C virusa koji je danas korišten diljem svijeta. Razvoj azidotimidina (AZT) i ribavirina (Slika 9) kao antivirusnih lijekova bio je poticaj sintezi i određivanju biološkog djelovanja 1,2,3-triazolnih nukleozida.<sup>17</sup>



Slika 9. Strukture ribavirina i zidovudina

Brojni su 1,2,3-triazolni derivati na tržištu ili u zadnjim fazama kliničkih ispitivanja. Potencijalni lijekovi koji su bazirani na 1,2,3-triazolnom prstenu su antitumorski spoj karboksiamidotriazol (CAI), nukleozidni derivat kao inhibitor nenukleozidne reverzne transkriptaze (TSAO),  $\beta$ -laktamski antibiotik tazobaktam, cefalosporin cefatrizin i mnogi drugi (Slika 10).<sup>16</sup>

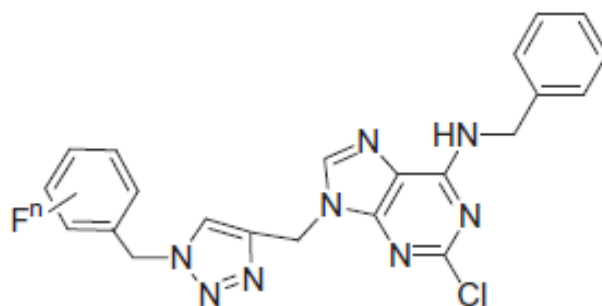


Slika 10. Potencijalni lijekovi bazirani na strukturi 1,2,3-triazola

### 2.2.1. Derivati 1,2,3-triazola i nukleozida

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

Upravo su s ciljem inhibicije mnogih bioloških meta sintetizirani fluorarilni triazolni derivati bazirani na purinskoj jezgri (Slika 11). Pripravljani su bakrom kataliziranom 1,3-dipolarnom cikloadicijskom reakcijom, tzv. „klik“ reakcijom, a spojevima je ispitana biološka aktivnost i neurozaštitni učinci fluorescencijskom elektronskom mikroskopijom.

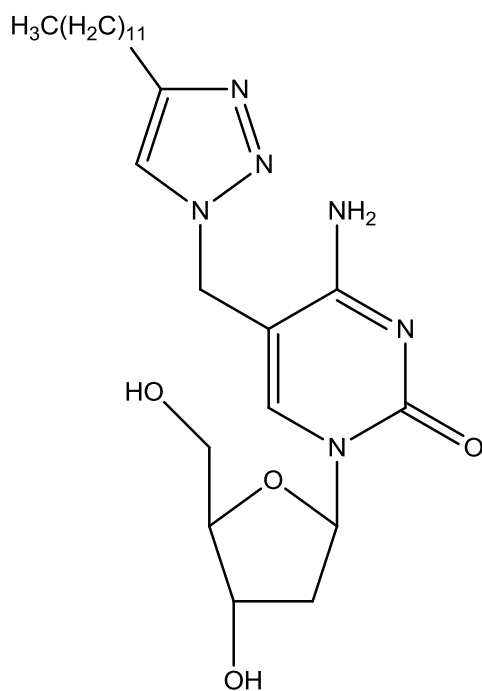


Slika 11. Triazolilni derivat purina

Razvoj ove klase spojeva potaknut je biološkim djelovanjem derivata prirodnog spoja flavona, flavopiridola koji je također pokazao učinkovitost u širokom spektru inhibicije kinaza ovisnih o ciklinu. Njegova negativna strana je relativno visoka citotoksičnost i nespecifičnost za određene ciljane kinaze, stoga je potrebno pronaći spojeve analogne njegovoj strukturi koji bi odgovarali zahtjevima i strukturno i djelovanjem. Štoviše, derivati flavopiridola trebali bi imati neurozaštitnu aktivnost bez prisutnosti štetnih posljedica. U pokušaju povećanja selektivnosti na određene vrste kinaza, pokušano je moduliranje hidrofobnosti molekula supstituiranjem fluoroarilnim prstenovima preko 1,2,3-triazolnih poveznica. Periodi inkubacije živčanih stanica i sintetiziranih spojeva od 48 sati i njihove analize koje su uslijedile imale su za posljedicu vrlo zanimljive zaključke. Naime, primijećen je trend ovisnosti broja fluorovih atoma u supstituentima molekule i neurozaštitnih učinaka. Nadalje, rezultati pokazuju da su pripravljene molekule mogući supstrati CDK5/p25 kompleksa, koji je odgovoran za ponovni ulazak u stanični ciklus, te bi u konačnici mogao dovesti do smrti živčane stanice. Povećanu neurotoksičnost moguće je objasniti pretjeranom aktivacijom spomenutog kompleksa, ali unatoč tomu, mnogi pripravljeni produkti pokazali su zadovoljavajuću aktivnost.<sup>18</sup>

Među citozinskim derivatima ističu se spojevi koji su pokazali antimikobakterijsku aktivnost čija su djelovanja ovisila o supstituentu na triazolnom prstenu. Među sintetiziranim spojevima najaktivniji bio je 4-dodeciltriazolidometil-2-deoksicitidin (Slika 12). Njegova šećerna komponenta uvelike je povećala inhibiciju koja je ostvarena prema rastu tuberkuloznih stanica *in vitro*. Mikrogramske količine bile su dovoljne za inhibiciju bakterijskih MDR MS-115 sojeva koji su otporni na pet najaktivnijih antituberkulostatkih lijekova koji su danas na tržištu. Ispitani su i analozi s uridinom, a i različiti supstituenti na

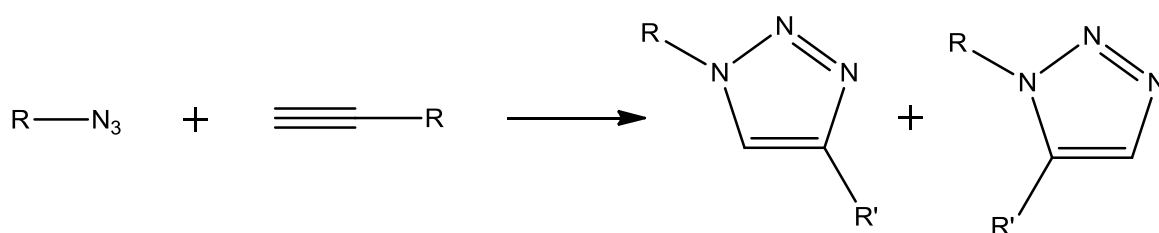
triazolnom prstenu te je konačni zaključak istraživanja da je priroda nukleozida važan faktor u učinkovitosti biološkog djelovanja, ali jednak je utjecaj i supstituenta na triazolnom prstenu. Pretpostavlja se da je uzrok selektivnog inhibitornog antituberkulostatskog djelovanja specifičnost stanične stijenke mikobakterije, čija je višeslojna struktura među složenijima u bakterijskom svijetu.<sup>17</sup>



Slika 12. Triazolilni derivat citidina

### 2.3. „Klik“ kemija

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

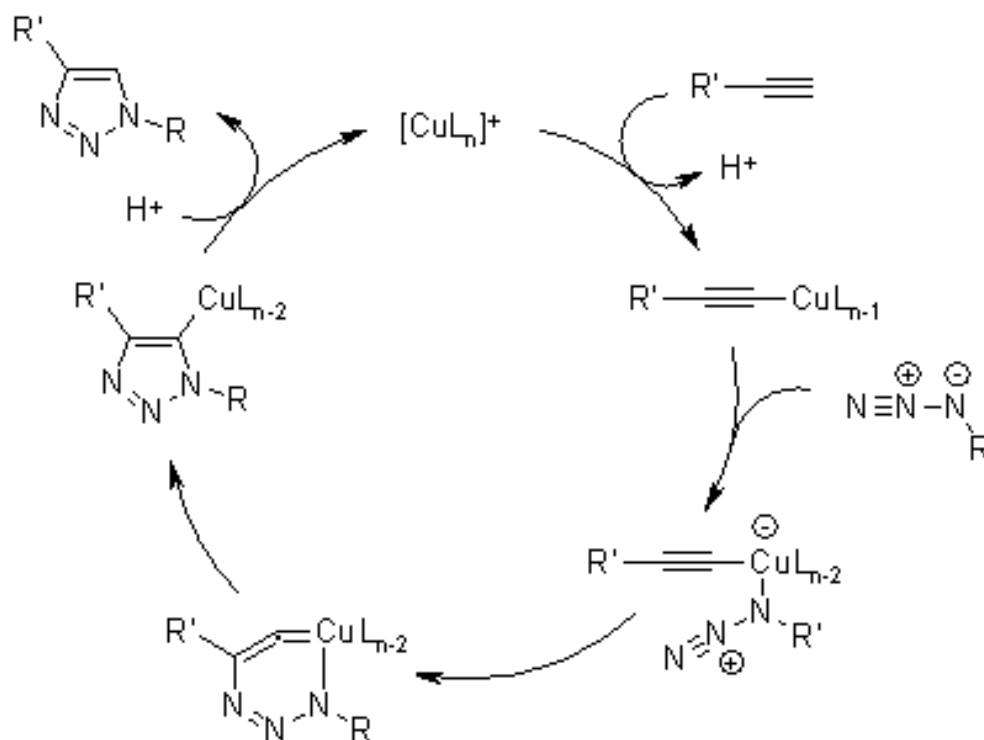


Shema 2. Opća shema Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije

Reakcija cikloadicije acetilena i azida naziva se Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija. Klasična termička reakcija alkina i azida zahtijeva povišenu temperaturu i vrlo često ima za produkte smjesu dva regioizomera kada se koriste terminalni alkini (Shema 2). U skladu s prethodno navedenim, to joj svojstvo ograničava da bude svrstana u „klik“ reakcije. Kasnije otkrivena bakrom katalizirana varijanta koja slijedi drugačiji mehanizam, te ju je moguće provoditi u vodenom mediju, dozvoljava specifičnu sintezu 1,4-disupstituiranih izomera. Osim nje, pronađena je i druga inačica reakcije, katalizirana rutenijem, koja za razliku od one katalizirane bakrom ima suprotnu regioselektivnost i rezultira sintezom 1,5-disupstituiranih triazola. Stoga, ove katalizirane reakcije potpuno zadovoljavaju kriterije i zaslužuju nazivati se definicijom „klik“ kemije te stavljaju naglasak na azido-alkinsku cikloadiciju kao prototip svim „klik“ reakcijama.<sup>19</sup>



Kao jedna od najboljih „klik“ reakcija bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija ubrzava reakciju za golemih  $10^7$  do  $10^8$  u odnosu na nekataliziranu 1,3-dipolarnu cikloadiciju. Uspješna je pri širokom temperaturnom rasponu, neosjetljiva na vodene uvjete uz raspon pH u vrijednostima od 4 do 12 i toleranciju prema velikom broju funkcionalnih skupina. U idealnim uvjetima, čisti produkti izoliraju se filtriranjem ili ekstrakcijom bez potrebe za kromatografskim ili metodama prekrizacije. Što se samog mehanizma reakcije tiče, pronađeno je da koordinacija bakra na acetilen nije korak koji ubrzava 1,3-dipolarnu cikloadiciju. Takav proces izračunat je kao manje povoljan od nekatalizirane reakcije. Umjesto tako koordinirane specije, nastaje bakrov acetilid, nakon čega azid uzrokuje vezivanje na bakar i odbacivanje još jednog liganda pa se tada stvara neobična šesteročlana ciklička struktura. Ukrućivanje prstena stvaranjem peteročlanog triazolilnog bakrenog derivata popraćeno je protoniranjem koja dovršava konačni triazolni produkt i zatvara katalitički krug (Shema 3).<sup>20</sup> Ova se reakcija smatra najboljom „klik“ reakcijom i našla je primjenu u raznim granama razvoja lijekova. Gotovo je savršena uzevši u obzir njenu primijenjivost, visoku razinu pouzdanosti i potpunu regiospecifičnost. Štoviše, jedna od ključnih ideja „klik“ filozofije je korištenje kemijskih reakcija u svrhu sinteze kompleksnih funkcionalnih molekula iz relativno jednostavnih početnih komponenti. Sintaza lijekova je upravo zbog toga područje bioznanosti koje je najviše profitiralo razvojem „klik“ koncepta.<sup>17</sup>



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

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

Biološko djelovanje definiramo kao međudjelovanje molekule s biološkom metom unutar organizma u kliničkim ispitivanjima, a u pretkliničkoj fazi, testiranja se vrše *in vivo* (životinjski organizmi) ili *in vitro* (eksperimenti u laboratoriju).<sup>21</sup>

Posljednjih godina, uzlet kompjutorske tehnologije i softverskog modeliranja dao je temelje novim metodama koje obuhvaćaju računalne simulacije bioloških djelovanja spojeva. Takva analiza, poznatija pod nazivom *in silico*, empirijska je metoda koja pretragom ogromnih baza podataka o strukturi, naboju, funkcionalnim skupinama te fizikalnim i kemijskim svojstvima bioloških meta (enzima) predviđa njihovu interakciju s molekulom čija je struktura unešena u sustav za analizu. Sam naziv *in silico* dolazi iz pojmova *in vivo* i *in vitro*, gdje riječ „*silico*“ označava silicij korišten u kompjutorskim čipovima, naglašavajući da je riječ o računalnoj analizi. Takav način analize može značajno skratiti eksperimentalna istraživanja u laboratoriju, a samim time je i puno ekonomičniji.<sup>22</sup>

Aktivnost koju procijenjuje strane program ovisi o već navedenim strukturnim parametrima, ali i o biološkim uvjetima poput spola, dobi i drugim faktorima poput koncentracije i puta biokemijske razgradnje. Spojevi koji pokazuju aktivnost prema nekoj od bioloških meta najčešće imaju djelovanje i na mnoge druge, svaku s različitim intenzitetom. Neke od tih molekula mogu biti korištene kao lijekovi, ali mogu imati i citotoksično djelovanje ili mnoge nuspojave. Sve aktivnosti uzrokovane jednim spojem smatraju se spektrom biološke aktivnosti tvari.<sup>23</sup>

Postoje mnoge računalne metode korištene za otkrivanje potencijalnih lijekova, ali one proučavaju samo nekoliko aktivnosti pojedine klase spojeva. Program za istovremeno predviđanje farmakološke aktivnosti, mehanizma i specifične toksičnosti na temelju 2D strukture spoja je dobar izbor za pronalaženje novih lijekova. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva (PASS, eng. Prediction of Activity Spectra for Substances) je računalni program koji može predvidjeti više od 3750 učinaka farmakoloških supstanci i biokemijske mehanizme na temelju strukturne formule tvari, prosječnom toksičnosti od 95 %. Pronašao je primjenu u predviđanju biološke aktivnosti kod sinteze i istraživanja novih lijekova, medicinskoj kemiji, računalnoj kemiji, farmakogenomici, kemogenomici, kvalitativnom određivanju odnosa strukture i aktivnosti (SAR), translacijskim ispitivanjima i medicini.<sup>24</sup>

PASS algoritam se temelji na Bayesianovim procjenama vjerojatnosti molekula koje pripadaju klasi aktivnih i neaktivnih spojeva. Ovaj program procjenjuje predviđeni spektar aktivnosti kao moguću aktivnost ( $P_a$ ) i moguću ne-aktivnost ( $P_i$ ). Predviđanje se temelji na SAR analizi *training seta*, koji sadrži više od 205 000 spojeva s više od 3750 bioloških aktivnosti. Vrijednosti  $P_a$  i  $P_i$  variraju od 0 do 1, i općenito je  $P_a + P_i \neq 1$ .<sup>24</sup>

Prednosti PASS metode su u tome što su kao ulazni podatak potrebne samo 2D strukture. Parametri ove metode predstavljaju biološki prostor i svojstva molekula u biološkom prostoru, za razliku od mnogih drugih deskriptora, koji odražavaju strukturna svojstva molekula. Mogu se koristiti za grupiranje spojeva prema svojim biološkim svojstvima, a ne prema njihovoj strukturnoj sličnosti. Predviđanja su brza, proračun spektra biološke aktivnosti za 10 000 spojeva na običnom računalu može trajati 5 minuta.<sup>24</sup>

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Opće napomene

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

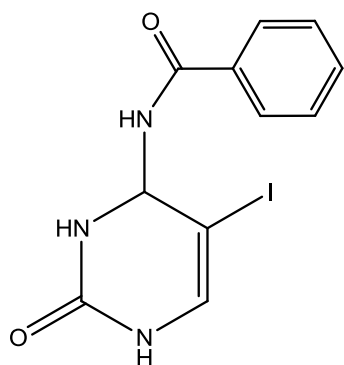
Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC), koja je provedena na pločama 60F-254 presvučenim slojem silikagela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV-svjetlost valne duljine 254 nm.

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

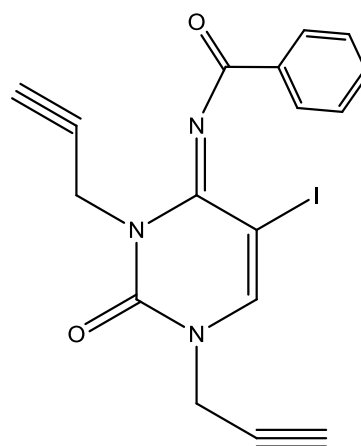
Spektri  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -NMR su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 MHz. Svi su uzorci otopljeni u DMSO- $d_6$  i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) u  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima izraženi su u jedinicama ppm u odnosu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

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

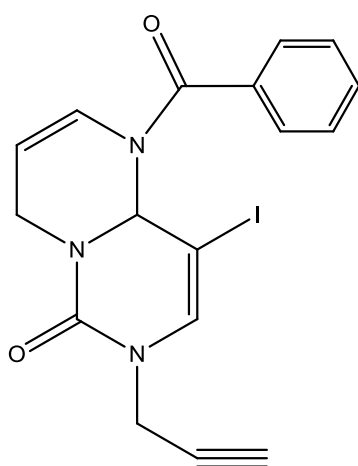
### 3.2. Pregled sintetiziranih spojeva



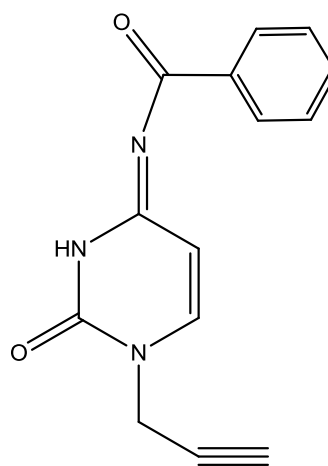
1



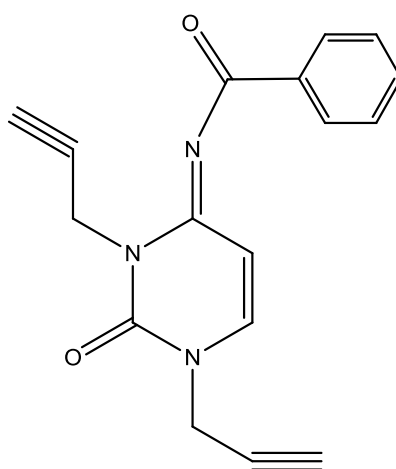
2



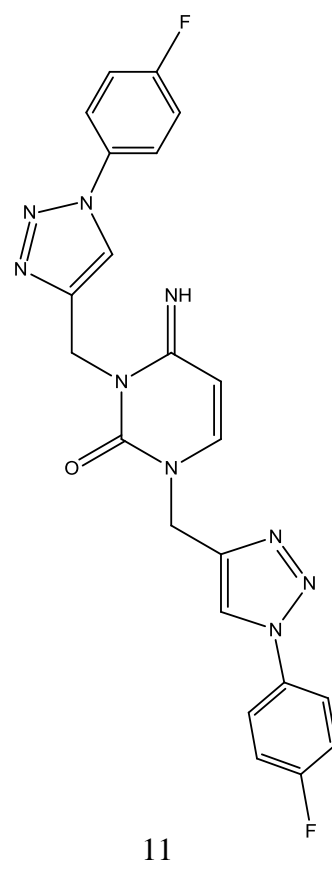
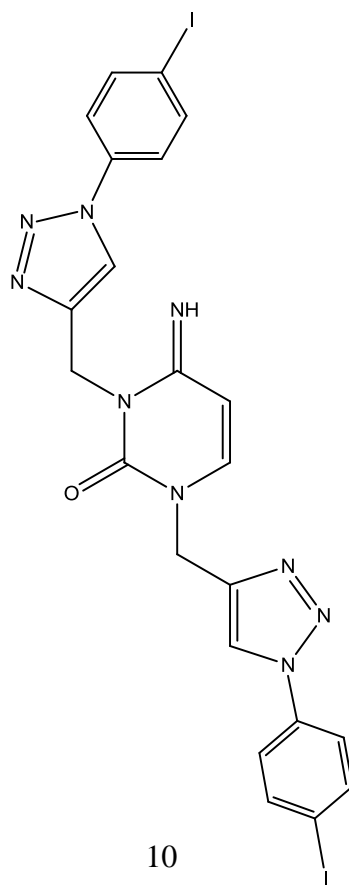
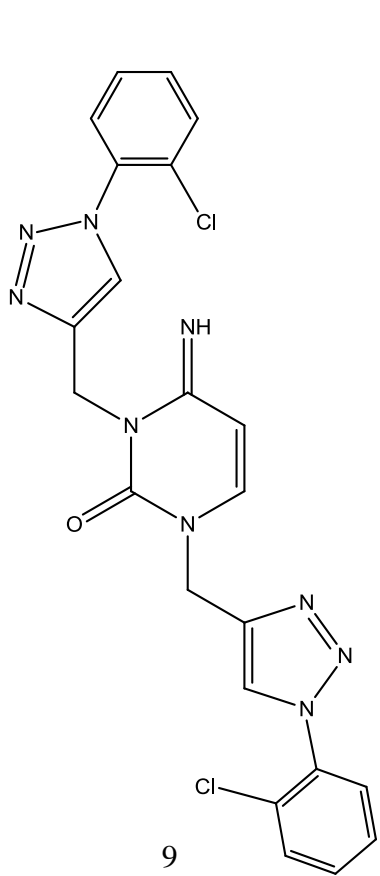
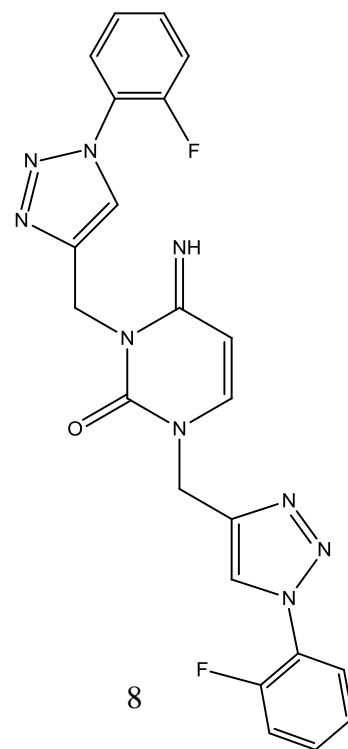
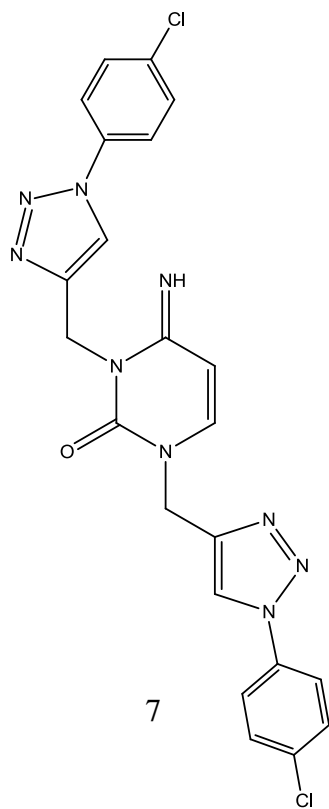
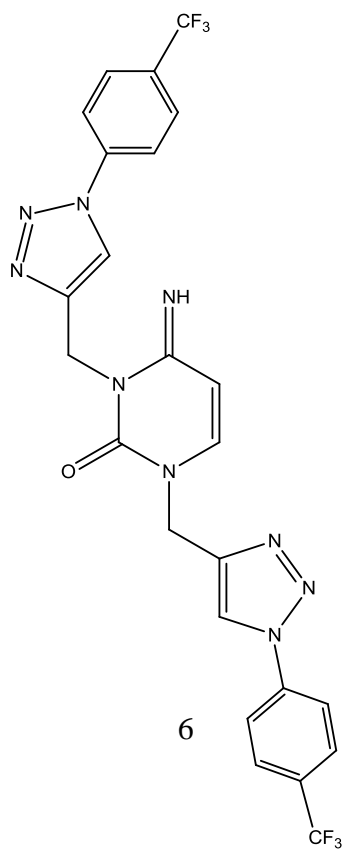
3

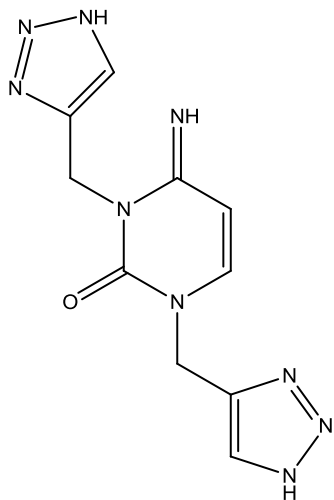


4

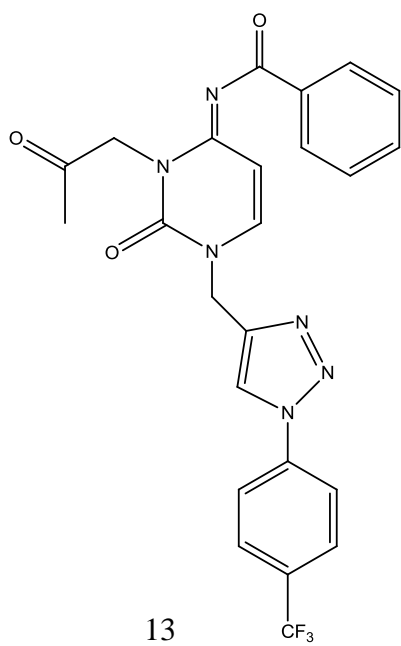


5

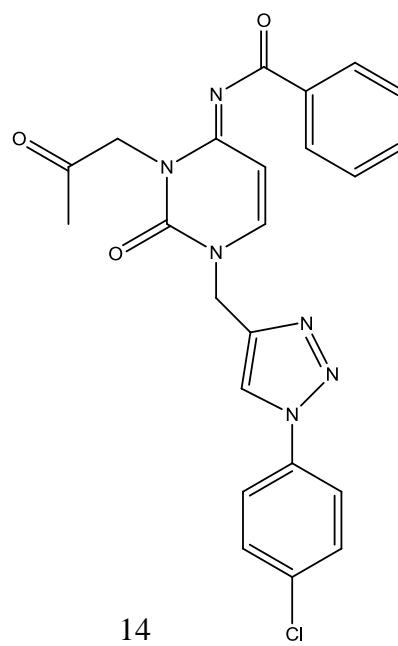




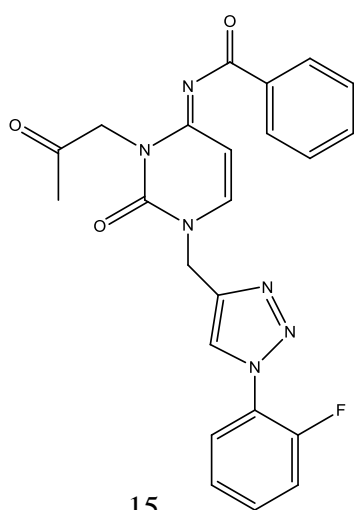
12



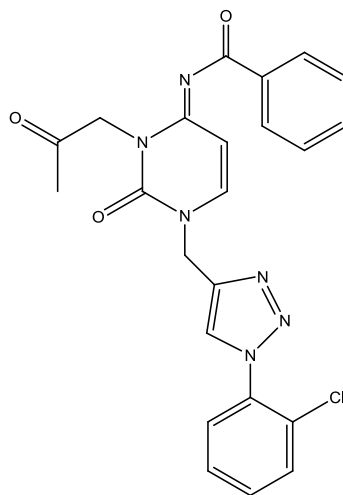
13



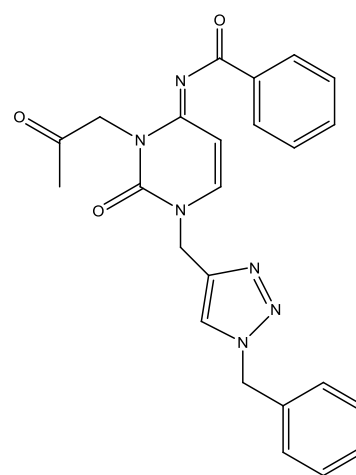
14



15

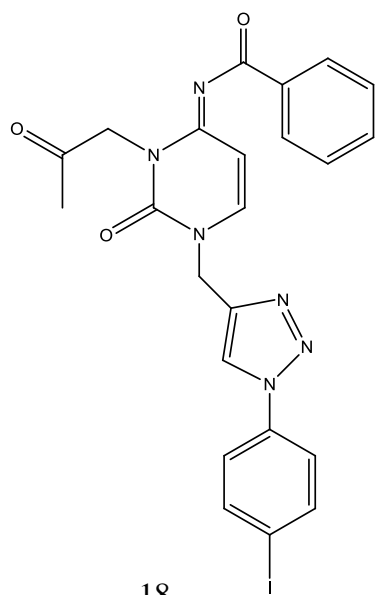


16

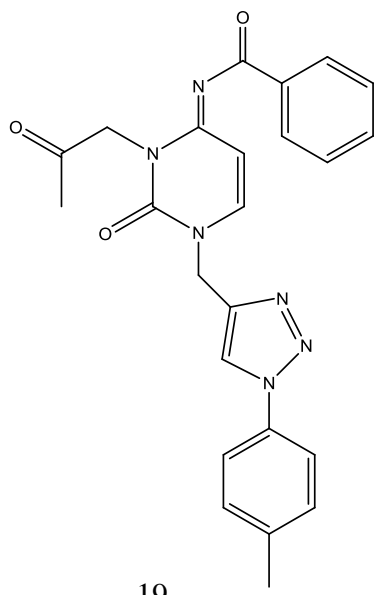


17

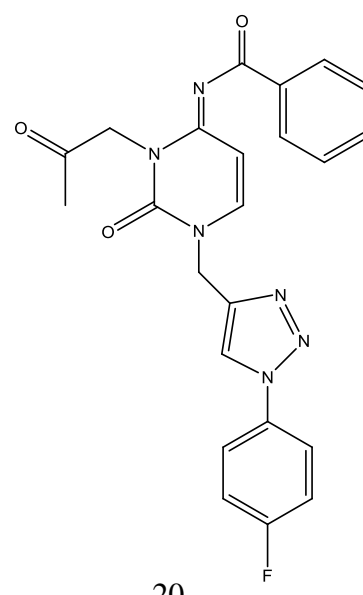




18



19



20

### 3.3. Priprava spojeva

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

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

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

*N*-4 benzoil-5-jodcitozin (**1**) (0,400 g; 1,173 mmol) otopljen je u DMF-u (13 mL) i u reakcijsku smjesu dodan K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (404,7 mg; 2,933 mol). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi sat vremena, a zatim je dodan propargil-bromid (0,22 mL; 2,933 mol) i miješanje nastavljeno na sobnoj temperaturi preko noći, nakon čega je završetak reakcije provjeren TLC-om. Otapalo je upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 300:1 i 200:1). Izolirano je žuto ulje spoja **2** (40,0 mg; 8,78%) i spoja **3** (5,1 mg; 0,80%).

#### 3.3.3. *N*-4-benzoil-*N*-1-propargilcitozin (4) i *N*-4-benzoil-*N,N*-1,3-dipropargilcitozin (5)

*N*-4-benzoil-citozin (0,500 g; 2,323 mmol) otopljen je u DMF-u (19 mL) i u reakcijsku smjesu dodan K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (641,7 mg; 4,650 mol). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi sat vremena, a zatim je dodan propargil-bromid (0,39 mL; 5,115 mol) i miješanje nastavljeno na sobnoj temperaturi preko noći, nakon čega je završetak reakcije provjeren TLC-om. Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi preko noći, nakon čega je završetak reakcije provjeren TLC-om. Otapalo je upareno, a produkti su profiltrirani preko Büchnerovog lijevka i sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 100:1). Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **4** (403,7 mg; 60,54%) i spoja **5** (34,0 mg; 5,42%, T<sub>t</sub> = 204°C-206°C).

**3.3.4. 4-imino-1,3-bis[(1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (6) i 4-iminobenzoil-3-(2-oksopropil)-1-[(1-(4-trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (13)**

Spoj **5** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL; 0,648 mmol) i trifluormetilfenil-azid (0,39 ml; 0,778 mmol). Reakcijska smjesa je zagijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje. Otapalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 150:1) pri čemu su izolirani praškasti kristali spoja **6** (3,0 mg; 1,60%) i bijeli praškasti kristali spoja **13** (5,8 mg; 3,61%; T<sub>t</sub> = 202°C-204°C).

**3.3.5. 4-imino-1,3-bis[(1-(*p*-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (7) i 4-iminobenzoil-3-(2-oksopropil)-1-[1-(*p*-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (14)**

Spoj **5** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL; 0,648 mmol) i *p*-klorfenil-azid (0,39 mL; 0,778 mmol). Smjesa je zagijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa ponovno zagijavana u mikrovalnom reaktoru dodatnih 30 minuta nakon čega je miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 200:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **7** (3,2 mg; 2,28%). i spoja **14** (5,1 mg; 3,41%; T<sub>t</sub> = 153°C-155°C).

**3.3.6. 4-imino-1,3-bis[(1-(*o*-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (8) i 4-iminobenzoil-3-(2-oksopropil)-1-[1-(*o*-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (15)**

Spoj **5** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL; 0,648 mmol) i *o*-fluorfenil-azid (0,39 mL; 0,778 mmol). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa ponovno zagrijavana u mikrovalno reaktoru dodatnih 30 minuta nakon čega je miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 200:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **8** (8,0 mg; 5,14%; T<sub>t</sub> = 155°C-157°C) i spoja **15** (5,1 mg; 3,52%).

**3.3.7. 4-imino-1,3-bis[(1-(*o*-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (9) i 4-iminobenzoil-3-(2-oksopropil)-1-[1-(*o*-klorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (16)**

Spoj **5** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL; 0,648 mmol) i *o*-klorfenil-azid (0,39 ml; 0,778 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 30 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 250:1) Izolirani su uljasti spoj **9** (4,0 mg; 2,50%) i bijeli praškasti kristali spoja **16** (6,0 mg; 4,01%; T<sub>t</sub> = 126°C-127°C).

### **3.3.8. 4-iminobenzoil-3-(2-oksopropil)-1-[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (17)**

Spoj **5** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 mL 0,648 mmol) i benzil-azid (0,39 ml; 0,778 mmol). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, otapalo nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 250:1) pri čemu su izolirani ružičasti praškasti kristali spoja **17** (5,4 mg; 3,77%; T<sub>i</sub> = 141°C-142°C).

### **3.3.9. 4-imino-1,3-bis[(1-(*p*-jodfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (10) i 4-iminobenzoil-3-(2-oksopropil)-1-[1-(*p*-jodfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (18)**

Spoj **5** (94 mg; 0,324 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (40,78 mg; 0,648 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,10 ml; 0,648 mmol) i *p*-jodfenil-azid (0,39 ml; 0,778 mmol). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 250:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **10** (11,6 mg; 5,29%; T<sub>i</sub> = 155°C-156°C) i spoja **18** (11,8 mg; 6,57%; T<sub>i</sub> = 203°C-205°C).

### **3.3.10. 4-imino-1,3-bis[(1-tolil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (19)**

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

kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 250:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **19** (4,0 mg; 1,77%; T<sub>i</sub> = 166°C-168°C)

**3.3.11. 4-imino-1,3-bis[(1-(*p*-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (11) i 4-iminobenzoil-3-(2-oksopropil)-1-[1-(*p*-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (20)**

Spoj **5** (150 mg; 0,509 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (7,0 mL) nakon čega je dodan bakar (63,0 mg; 1,017 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,16 ml; 1,017 mmol) i *p*-fluorfenil-azid (0,61 ml; 1,222 mmol). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 250:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **11** (2,0 mg; 0,85%;) i spoja **20** (7,0 mg; 3,08%; T<sub>i</sub> = 137°C-141°C).

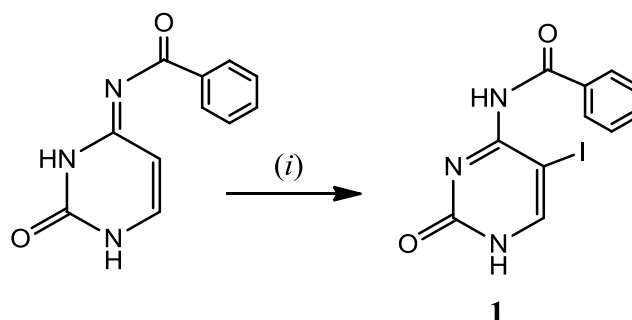
**3.3.10. 4-imino-1,3-bis[(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3,4-dihidropirimidin-2-on (12)**

Spoj **5** (150 mg; 0,509 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4,47 mL) nakon čega je dodan bakar (63,0 mg; 1,017 mmol), 1M otopina bakrovog(II)sulfata (0,16 ml; 1,017 mmol) i natrijev azid (0,61 ml; 1,222 mmol). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnom reaktoru na temperaturi od 85°C tijekom 45 minuta, uz prethodni period grijanja do željene temperature od 5 minuta, te hlađenja nakon reakcije u trajanju od 5 minuta. Tijek reakcije provjeren je TLC-om, a zatim je smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je nakon toga upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 250:1) Izolirani su bijeli praškasti kristali spoja **12** (5,6 mg; 4,03%; T<sub>i</sub> = 128°C-131°C).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

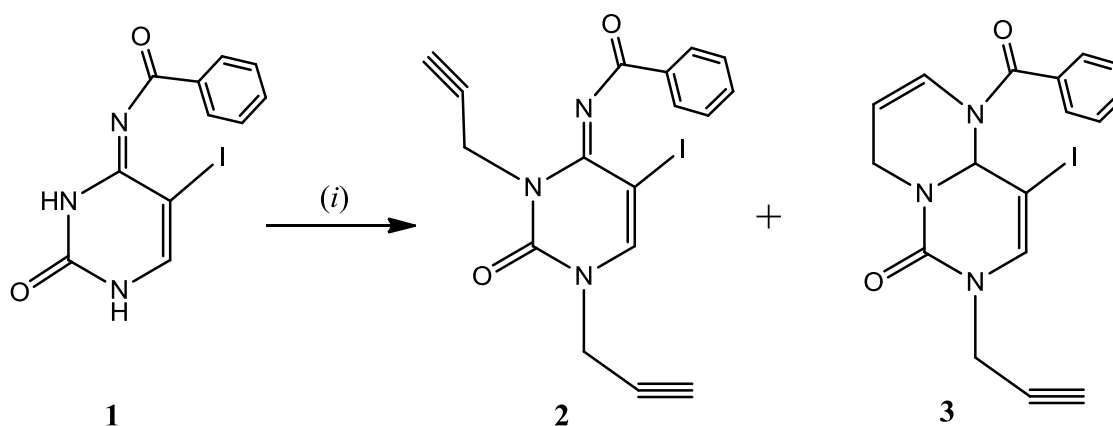
#### 4.1. Sinteze spojeva

*N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**) pripravljen je reakcijom jodiranja *N*-4-benzoilcitozina s  $I_2$  uz cerijev(IV)amonijev nitrat (CAN) u acetonitrilu (AcN) (Shema 1).



Shema 1. Reagensi i uvjeti: (i)  $I_2$ / CAN/ AcN/ 2 h refluks, 24 h sobna temp.

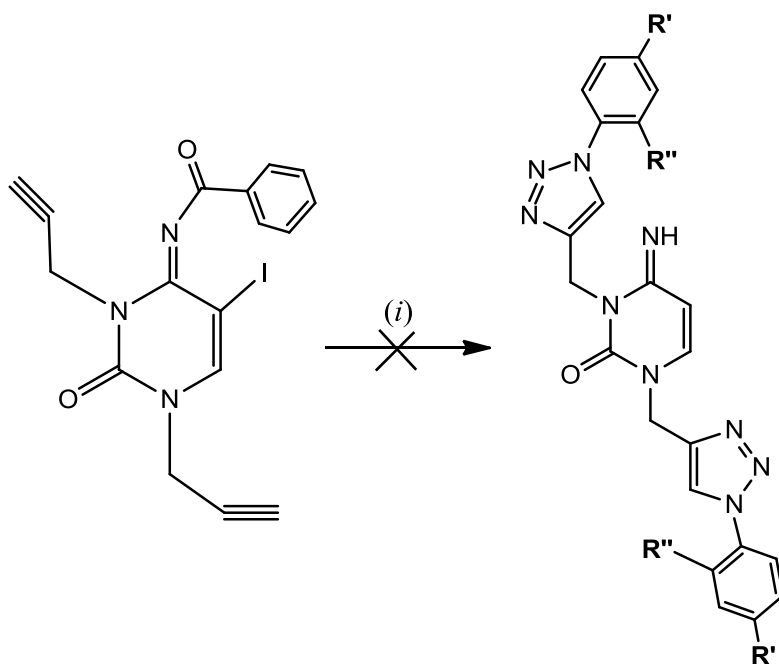
Reakcijom *N*-alkiliranja *N*-4-benzoil-5-jodcitozina s propargil-bromidom uz deprotonirajuće sredstvo  $K_2CO_3$  (2,5 mol) pripravljen je *N,N*-1,3-disupstituirani derivat **2** i produkt **3** nastao *in situ* ciklizacijom (Shema 2).



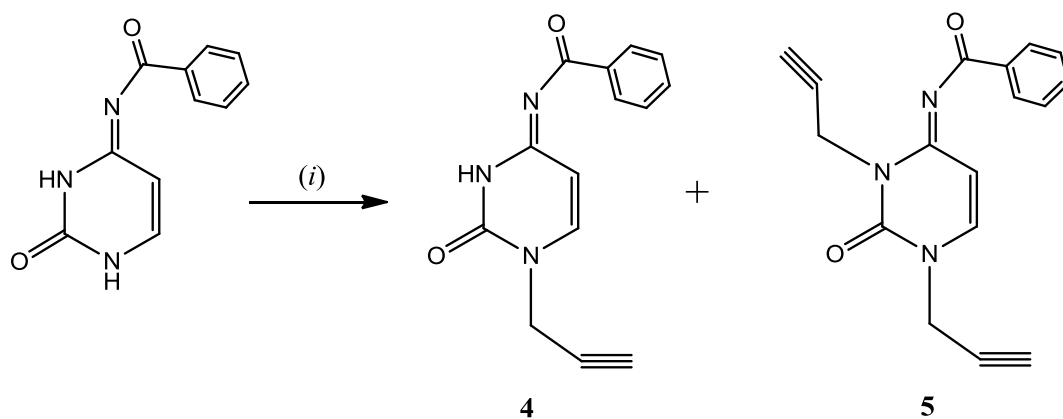
Shema 2. Reagensi i uvjeti: (i)  $K_2CO_3$ / Br- $CH_2$ - $C\equiv CH$ /DMF/24 h sobna temp.

Reakcijom *N,N*-1,3-dipropargiliranog derivata citozina **2** s odgovarajućim azidom u uvjetima bakrom katalizirane Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije potpomognute mikrovalovima nije pripravljen željeni produkt s 1,2,3-triazolnim prstenom u položaju *N*-1 i *N*-3 (Shema 3).





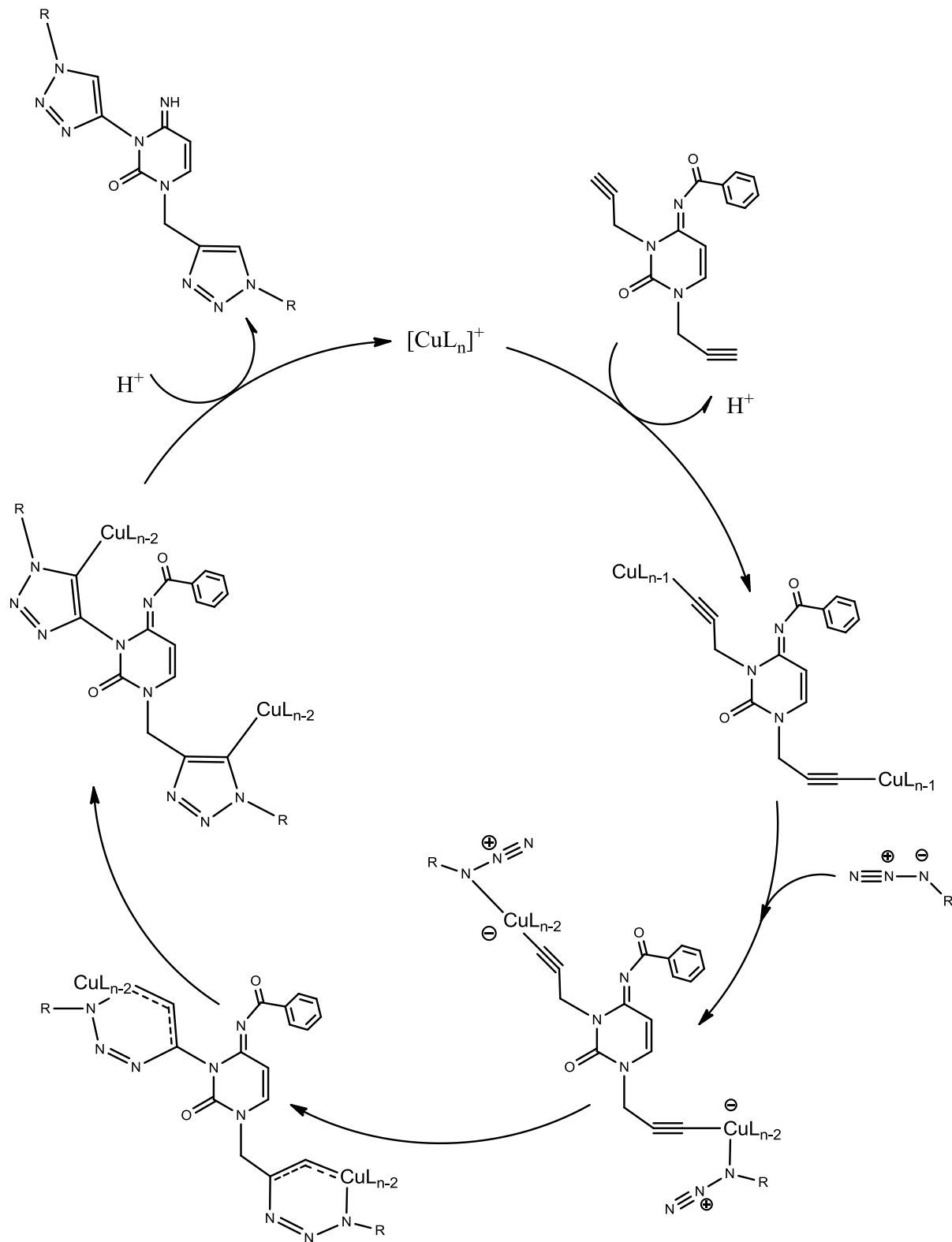
Shema 3. Reagensi i uvjeti: (i) azid/ $\text{CuSO}_4/\text{Cu}/45 \text{ min } 80^\circ\text{C}$  u mikrovalnom reaktoru.



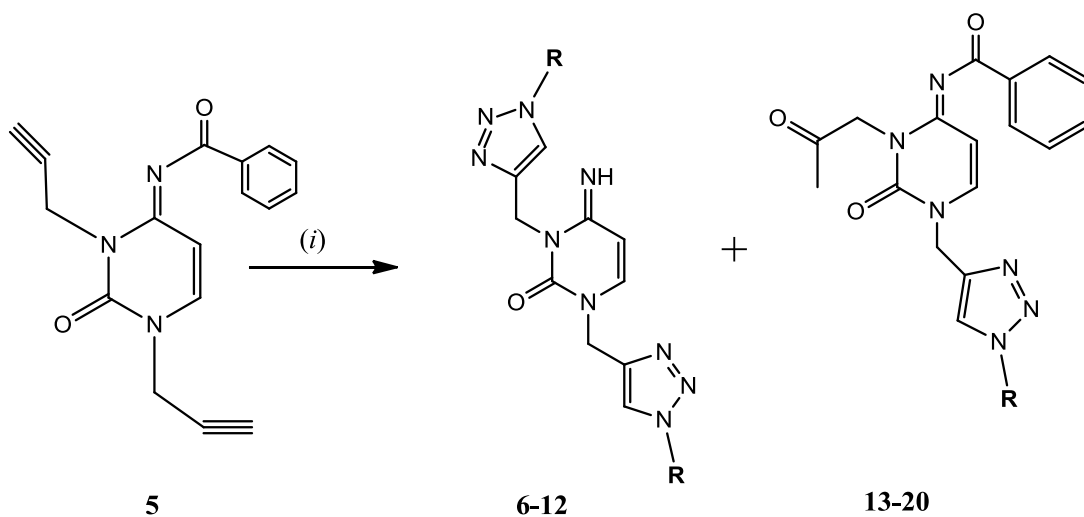
Shema 4. Reagensi i uvjeti: (i)  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{Br-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}/\text{DMF}/24 \text{ h}$  sobna temp.

Reakcijom propargiliranja *N*-4-benzoilcitozina uz kalijev karbonat u DMF-u priređeni su monoalkilirani derivat **4** i *N,N*-1,3-dipropargilirani derivat citozina **5** (Shema 4). Derivati citozina supstituirani u *N*-1 i *N*-3 položaju 1,2,3-triazolnim prstenom (**6-12**) sintetizirani su „klik” reakcijom dipropargiliranog citozinskog derivata **5** i odgovarajućih azida s bakrom kao katalizatorom. U uvjetima Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije osim uvođenja 1,2,3-triazolnog prstena istovremeno je uklonjena i benzoilna zaštita s položaja *N*-4. Uz dobivene produkte nastale Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom, u reakciji su također dobiveni *N*-3-(2-oksopropil)-*N*-1-1,2,3-triazolilcitozinski derivati (**13-20**) (Shema 6) oksidacijom propargilnog supstituenta na položaju *N*-3.

Mehanizam Huisgenove ciklizacije prikazan na Shemi 5 prikazuje specifičnost bakra kao katalizatora, koji prvo stvara kompleks s acetilenom nakon čega azid istiskuje drugi ligand koji je vezan za bakar pri čemu nastaje šesteročlani bakar (III) ciklički kompleks, čijom pregradnjom nastaje 1,2,3-triazol.



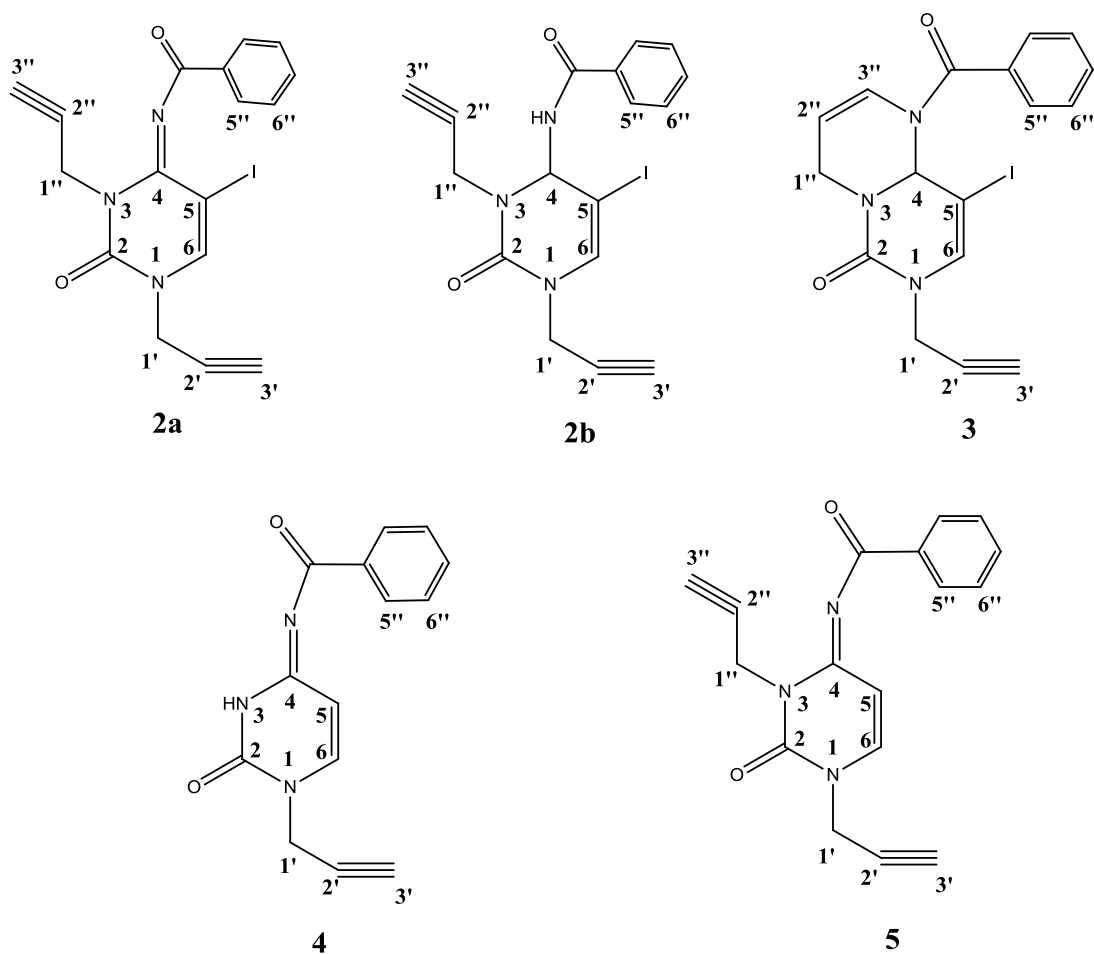
Shema 5. Mehanizam bakrom katalizirane azid-alkin Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije



	6 i 13	7 i 14	8 i 15	9 i 16	17	10 i 18	19	11 i 20	12
R									H

Shema 6. Reagens i uvjeti: (i) azid/CuSO<sub>4</sub>/Cu/45 min 80°C, MW

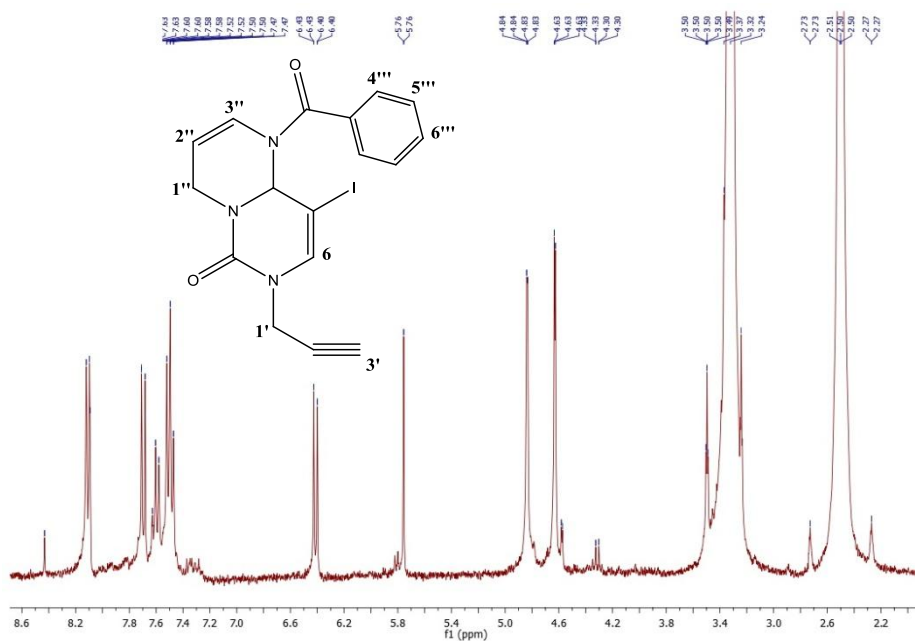
## 4.2. Strukturna karakterizacija novopripravljenih spojeva $^1\text{H}$ NMR spektroskopijom



Slika 1. Prikaz propargiliranih citozinskih derivata (2-5)

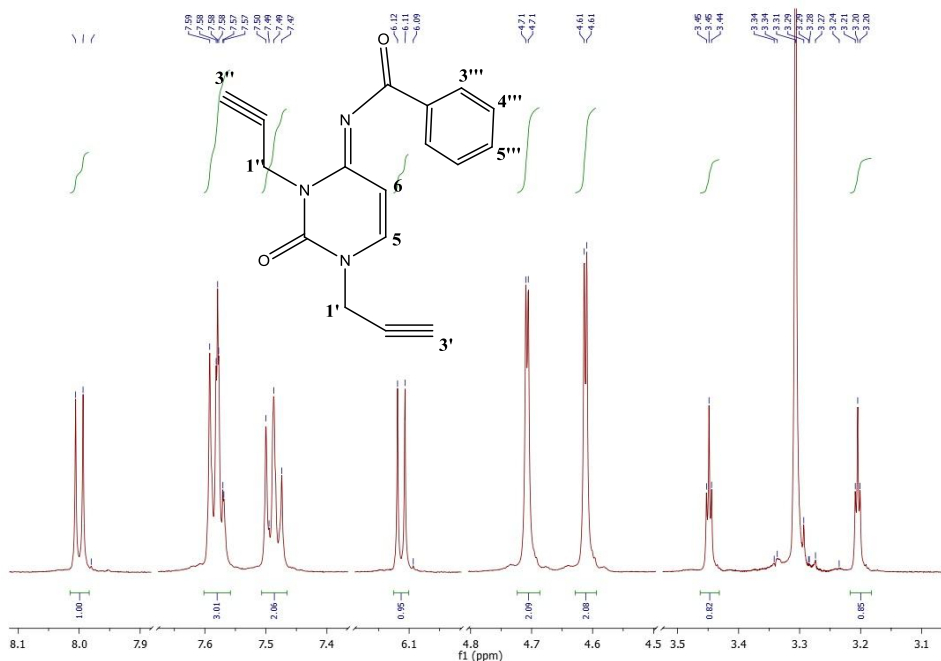
Asigniranje  $^1\text{H}$  NMR spektara provedeno je na osnovu kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta rezonancija te H-H konstanti sprega (Tablica 1).

U  $^1\text{H}$  NMR spektru spoja **2** (Tablica 1) prisutni su signali protona H-6 citozinskog prstena (8,43 ppm), signali fenilnih protona benzoilne skupine (7,28-7,72 ppm), te signali za protone propargilnog supstituenta H-1' (4,79 ppm) i H-3' (3,43 ppm). U spektru su također prisutni i signali protona H-4 (7,83 ppm) i NH-4 (9,25 ppm) za tautomerni oblik 2b. Biciklička struktura spoja **3** potvrđena je izostankom tripleta intenziteta 1H za H-1'' na 3,32 ppm, uz istovremeno prisustvo signala za metilenske protone (CH-2'' i 3'') na ~3,21 i ~3,39 ppm-a te signal za H-4 proton na 6,42 ppm-a. U spektru su prisutni signali za protone N-1 propargilnog supstituenta i C-6 i C-5 protone citozinskog prstena te benzoilne skupine (Slika 2)(Tablica 1).

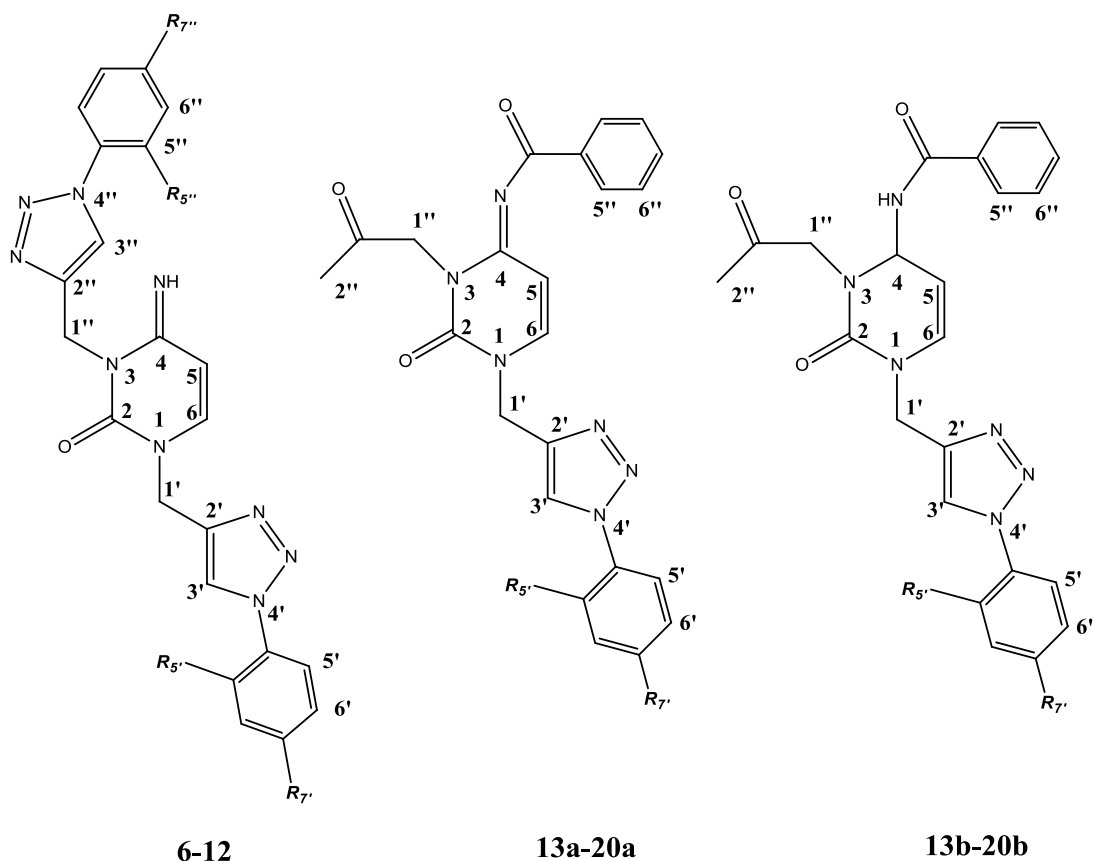


Slika 2.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 3

U  $^1\text{H}$  NMR spektrima spojeva 4 i 5 prisutni su signali za H-6 (~8 ppm) i H-5 (~6,2 ppm) protone citozinskog prstena, fenilni protoni benzoilne skupine na položaju *N*-4 citozina, te protoni propargilnih supstituenata u položajima *N*-1 i *N*-3 *N*-4-benzoilcitozina. Dubleti intenziteta 2H za  $\text{CH}_2$ -1' i 1'' na 4,71 i 4,61 ppm-a, te triplet za metinske ( $\text{CH}$ -3' i 3'') protone na 3,45 i 3,20 ppm-a (Slika 3)(Tablica 1).

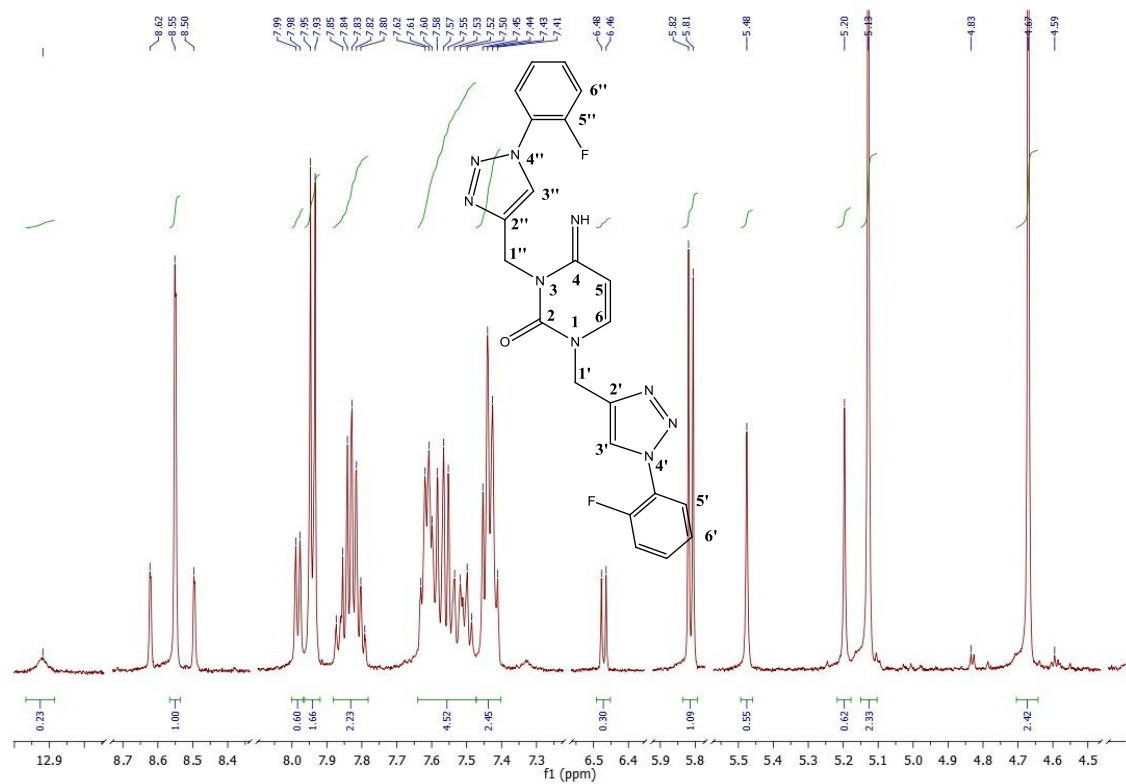


Slika 3.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 5

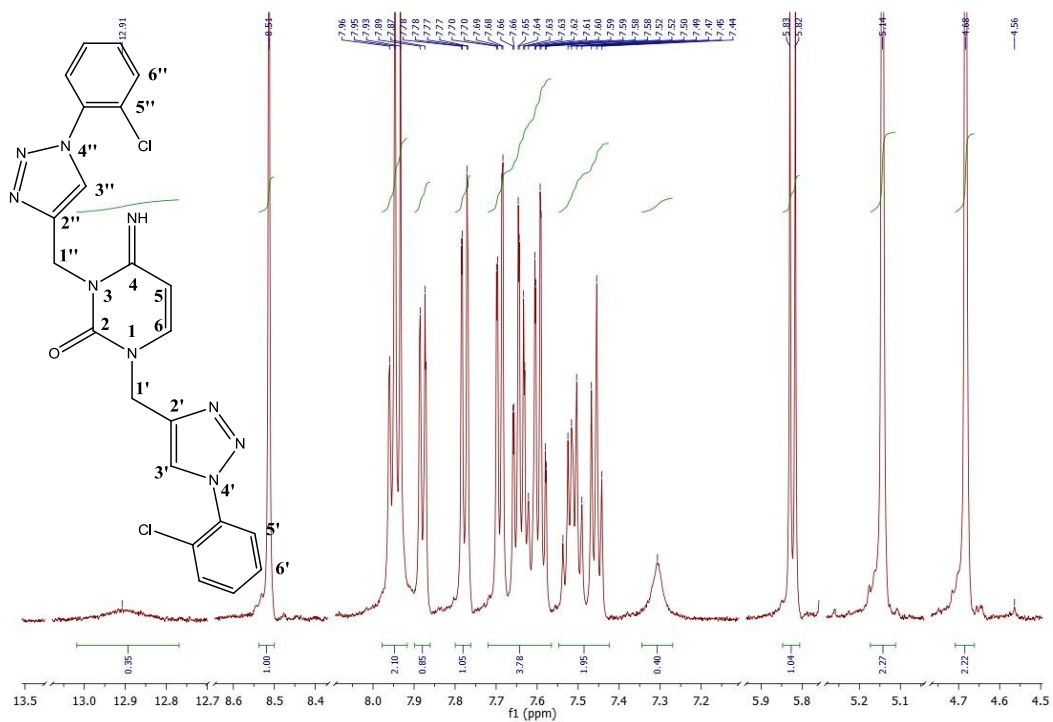


Slika 4. Prikaz općih struktura *N, N*-1,3 disupstituiranih citozinskih derivata (-) i triazolilnih 1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pirimido[1,6-*a*]pirimidinskih derivata (-)

U  $^1\text{H}$  NMR spektrima spojeva **6-12** (Tablica 2.) uvođenje 1,2,3-triazolnog prstena u položaj *N*-1 i *N*-3 citozinskog prstena potvrđeno je na temelju signala za proton triazolnog prstena H-3' i H-3'' na ~8 ppm intenziteta 1H uz istovremeni izostanak tripleta za H-3' i H-3'' polaznog spoja **5** na ~3,5 ppm. Signali za metilenske protone H-1' i H-1'' u  $^1\text{H}$  NMR spektrima spojeva **6-12** pomaknuti su u niža polja u usporedbi sa signalima za protone H-1' polaznog spoja **5**. Osim toga nisu prisutni signali za fenilne protone benzoilne skupine u položaju *N*-4 što proizlazi iz intenziteta 8H za fenilne protone koji se nalaze na dvije triazolilne jezgre, različito supstituirane fenilnim supstituentima u položaju C-4' odnosno C-4'' triazola. U  $^1\text{H}$  NMR spektrima *N,N*-1,3-ditriazolilnih derivata citozina (**8** i **9**) prisutni su signali za protone pirimidinskog prstena, triazolnog i fenilnog prstena (Slike 5 i 6)(Tablica 2). Karakteristični kemijski pomaci za H-3' i H-3'' protone triazolilnog prstena prisutni su na 8,70 i 7,95 ppm-a, a koji su u dipropagiliranom citozinskom derivatu (**5**) bili prisutni kao tripleti na 3,45 i 3,20 ppm-a.

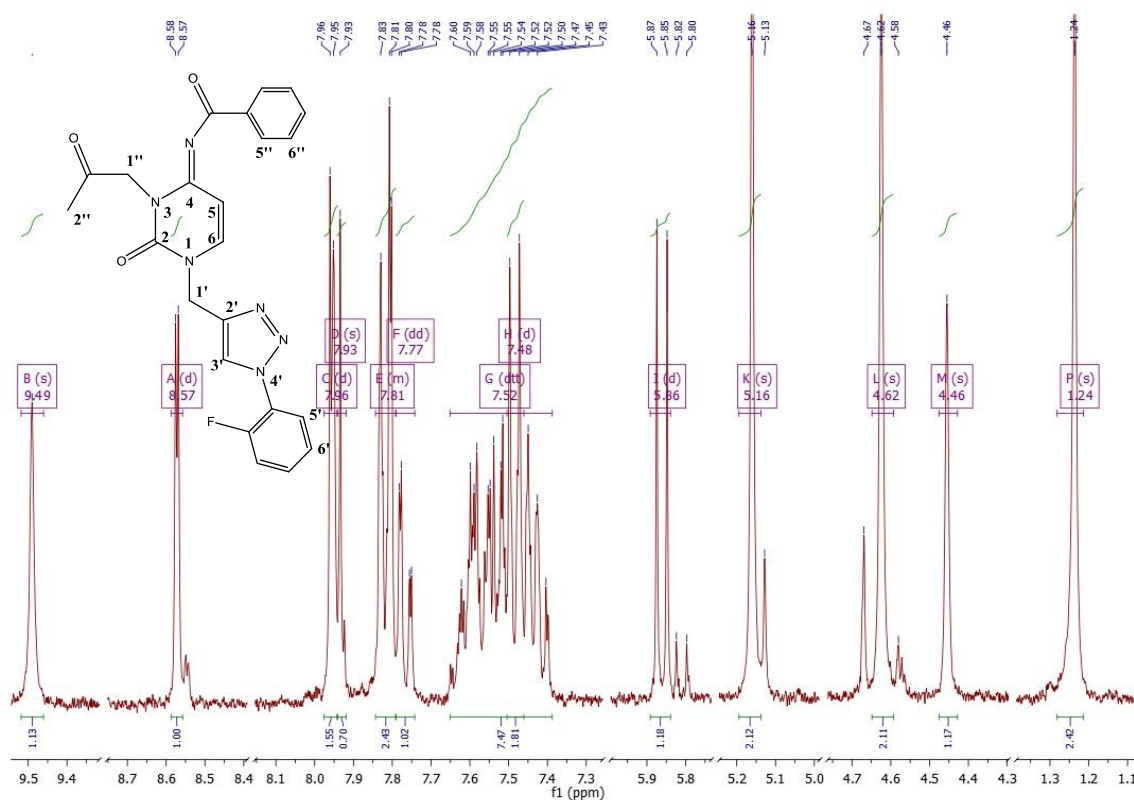


Slika 5. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 8



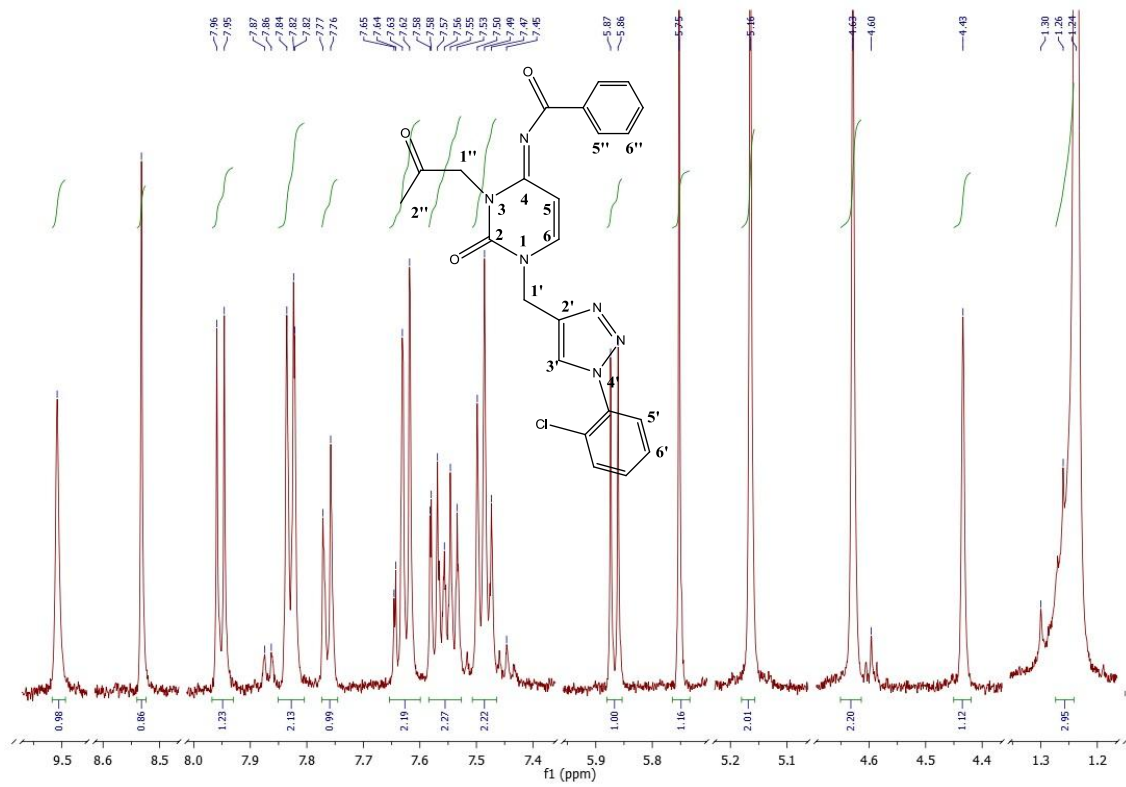
Slika 6. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 9

Na slikama 7 i 8 prikazani su  $^1\text{H}$  NMR spektri derivata *N*-4-benzoil-*N*-3-(2-oksopropil)-*N*-1-triazolilcitozina (**15** i **16**) (Tablica 3.) nastalih oksidacijom propargilnog supstituenta na položaju *N*-3 citozinskog prstena spojeva **8** i **9**. U spektrima spojeva **15** i **16** su pored signala za citozinski prsten, benzilnu skupinu i *N*-1 propargilni supstituent prisutni i signali karakterističnih protona i singlet metilnih protona H-2'' na 1,24 ppm-a, te singlet H-1'' protona na 4,62 ppm-a kod spoja **15** i na 4,63 ppm-a kod spoja **16**. Svi se spojevi od **13-20** pojavljuju u dva tautomerna oblika, imino ili amino ovisno o vezi između C-4 i *N*-4 atoma citozinskog prstena. Dokaz takvih tautomernih struktura proizlazi iz pojavljivanja NH-4 i H-4 protona (Tablica 3).



Slika 7.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **15**





Slika 8.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **16**

Tablica 1. Kemijski pomaci ( $\delta$ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega  $J_{\text{HH}}$  (J/Hz) u spektrima  $^1\text{H-NMR}$  za spojeve **2-5**.

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

<sup>a</sup>H-2''-3,39 (m, 1H)

Tablica 2. Kemijski pomaci ( $\delta$ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega  $J_{\text{HH}}$  (J/Hz) u spektrima  $^1\text{H-NMR}$  za spojeve **6-12**.

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

Tablica 3. Kemijski pomaci ( $\delta$ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega  $J_{\text{HH}}$  (J/Hz) u spektrima  $^1\text{H-NMR}$  za spojeve **13-20**.

	NH-4	H-6	H-5	H-1'	H-1''	H-2''	Ph-5',6' Ph-5'',6''	H-4
<b>13</b>	9,48 (s, 1H)	7,94 (d, 1H, $J=8,2$ Hz)	5,88 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,16 (s, 2H)	4,63 (s, 2H)	1,24 (s, 3H)	8,12(d, 2H, $J=8,5$ Hz) 7,98(d, 2H, $J=8,4$ Hz) 7,44-7,52 (m, 3H) 7,79(d, 2H, $J=8,5$ Hz)	4,48 (s, 1H)
<b>14</b>	9,48 (s, 1H)	7,94 (d, 1H, $J=8,1$ Hz)	5,87 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,14 (s, 2H)	4,63 (s, 2H)	1,25 (s, 3H)	7,44-7,55(m, 5H) 7,64(d, 2H, $J=8,5$ Hz) 7,79(d, 2H, $J=8,5$ Hz)	4,47 (s, 1H)
<b>15</b>	9,49 (s, 1H)	7,93 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)	5,86 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)	5,15 (s, 2H)	4,63 (s,2H)	1,24 (s,3H)	7,45-7,58(m, 6H) 7,78-7,83(m, 3H)	4,46 (s, 1H)
<b>16</b>	9,51 (s, 1H)	7,96 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,87 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,16 (s, 2H)	4,62 (s,2H)	1,24 (s,3H)	7,47-7,53(t, 2H, $J=8,1$ Hz) 7,55-7,58(m, 2H) 7,62-7,65(m, 3H) 7,82(d, 2H, $J=8,0$ Hz)	4,43 (s,1H)
<b>17<sup>a</sup></b>	9,48 (s, 1H)	7,88 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,83 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,02 (s, 2H)	4,60 (s, 2H)	1,23 (s,3H)	7,29-7,38(m, 5H) 7,51(t, 2H, $J=7,9$ Hz) 7,57(t, 2H, $J=7,9$ Hz)	4,40 (s,1H)
<b>18</b>	9,47 (s, 1H)	7,94 (d, 1H, $J=8,3$ Hz)	5,87 (d, 1H, $J=7,9$ Hz)	5,15 (s, 2H)	4,64 (s, 2H)	1,24 (s, 3H)	7,46-7,55(m, 5H) 7,68(d, 2H, $J=8,2$ Hz) 7,81(d, 2H, $J=8,2$ Hz)	4,49 (s, 1H)

<sup>a</sup>CH<sub>2</sub>(Bn<sub>TR</sub>)-5,56 (s,2H)

#### 4.4. *In silico* analiza novopripremljenih spojeva (1-20)

Predviđanja vjerojatnih bioloških meta i farmakoloških djelovanja (Tablice 10-17) izrađene su web-servisom PASS (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php> [22.6.2015.]) koji se temelji na identifikaciji substrukturnih značajki tipičnih za aktivne molekule.

Spektar bioloških djelovanja sintetiziranih spojeva (1-20) predviđen PASS-om prikazan je u tablicama 10-17 kao aktivnost s vjerojatnošću "da su aktivni" (Pa) i "da su neaktivni" (Pi). Najvjerojatnija predviđena aktivnost treba imati što veću vrijednost Pa i što manju vrijednost Pi. Aktivnosti su prikazane po redoslijedu Pa-Pi te su vjerojatnije aktivnosti u tablici pri vrhu.

Među mono- i dipropargiliranim derivatima *N*-4-benzoil-5-jodcitozina i *N*-4-benzoilcitozina najbolje simulirano djelovanje pokazuje dipropargilirani *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**2**). Od svih sintetiziranih derivata *N*-4-benzoil-ditriazolilcitozina, najveću procijenjenu biološku aktivnost ima spoj **6**, koji na triazolnom prstenu ima *p*-trifluormetilfenilni supstituent. Najznačajnije rezultate iz skupine derivata *N*-4-benzoil-*N*-3-(2-oksopropil)-*N*-1-triazolilcitozina pokazao je spoj **17** s benzilnim supstituentom na triazolnom prstenu.

Tablica 4. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**) i njegove dipropargilirane i ciklizirane derivate (**2-3**) i monosupstituirani derivat *N*-4-benzoilcitozina (**4**).

Aktivnost spoja 1	Pa_1	Pi_1	Aktivnost spoja 2	Pa_2	Pi_2	Aktivnost spoja 3	Pa_3	Pi_3	Aktivnost spoja 4	Pa_4	Pi_4
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,981	0,000	Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,981	0,000	Inhibitor dihidropirimidin-dehidrogenaze	0,341	0,005	Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfotransferaze	0,625	0,074
Inhibitor testosteron 17beta-dehidrogenaze (NADP+)	0,726	0,047	Inhibitor testosteron 17beta-dehidrogenaze (NADP+)	0,726	0,047	Inhibitor NADPH-citokrom-c- reduktaze	0,407	0,108	Inhibitor pterin-deaminaze	0,420	0,073
Inhibitor pterin-deaminaze	0,670	0,016	Inhibitor pterin-deaminaze	0,670	0,016	Inhibitor blasticidin-S-deaminaze	0,300	0,017	Inhibitor ATP-hidrolizirajuće N-metilhidantoinaze	0,352	0,048
Inhibitor (S)-3-amino-2-metilpropionat-transaminaze	0,577	0,003	Inhibitor (S)-3-amino-2-metilpropionat-transaminaze	0,577	0,003	Inhibitor tiroksin-5-dejodinaze	0,299	0,041	Inhibitor dihidrouracil-dehidrogenaze (NAD+)	0,274	0,005
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Keratolitik	0,754	0,002	Keratolitik	0,754	0,002	Antiekcematik	0,692	0,048	Antiekcematik	0,821	0,014
Antiekcematik	0,760	0,028	Antiekcematik	0,760	0,028	Liječenje kognitivnih poremećaja	0,584	0,009	Antiparkinsonik	0,652	0,005
Stimulant eritropoeze	0,640	0,008	Stimulant eritropoeze	0,640	0,008	Antiparkinsonik	0,488	0,014	Liječenje neurodegenerativnih bolesti	0,584	0,018

Tablica 5. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za dipropargilirani derivat *N*-benzoilcitozina (5) i *N*-4-benzoil-ditriazolilnih derivata citozina (6-8).

Aktivnost spoja 5	Pa_5	Pi_5	Aktivnost spoja 6	Pa_6	Pi_6	Aktivnost spoja 7	Pa_7	Pi_7	Aktivnost spoja 8	Pa_8	Pi_8
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfottransferaze	0,614	0,078	Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfottransferaze	0,463	0,146	Inhibitor 5-O-(4-kumaryl)-D-kvinat 3'-monooksigenaze	0,679	0,059	Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfottransferaze	0,452	0,153
Inhibitor electron-prijenosne flavoprotein-dehidrogenaze	0,495	0,067	Inhibitor MAP-kinaze	0,180	0,005	Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfottransferaze	0,420	0,005	Inhibitor MAP-kinaze	0,198	0,005
Inhibitor kenodeoksikoloiltaurin-hidrolaze	0,430	0,042	Inhibitor blasticidin-S-deaminaze	0,217	0,055	Inhibitor PfA-M1-aminopeptidaze	0,399	0,004	Inhibitor transglutaminaze 2	0,173	0,011
Inhibitor glutation-tiolesteraze	0,384	0,083				Inhibitor biosinteze stanične stijenje	0,455	0,060	Inhibitor blasticidin-S-deaminaze	0,205	0,066
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Analgetik, neopijatni	0,790	0,005	Antimigrenik	0,254	0,022	Antimikobakterik	0,308	0,076	Antimikobakterik	0,344	0,057
Antiekcematik	0,741	0,033	Liječenje upalne bolesti crijeva	0,269	0,080	Liječenje upalne bolesti crijeva	0,293	0,065	Liječenje poremećaja u ponašanju	0,299	0,060
Stimulans funkcije bubrega	0,546	0,068	Pojačivač ekspresije HMGCS2	0,293	0,121	Antimigrenik	0,231	0,028	Antidepresiv	0,297	0,059

Tablica 6. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za derivate *N*-4-benzoil-ditriazolilcitozina (**9-12**).

Aktivnost spoja 9	Pa_9	Pi_9	Aktivnost spoja 10	Pa_10	Pi_10	Aktivnost spoja 11	Pa_11	Pi_11	Aktivnost spoja 12	Pa_12	Pi_12
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfottransferaze	0,452	0,153	Inhibitor blasticidin-S deaminaze	0,388	0,006	Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfottransferaze	0,472	0,141	Inhibitor pterin-deaminaze	0,654	0,018
Inhibitor 5-O-(4-kumaril)-D-kvinat 3'-monooksigenaze	0,417	0,130	Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfottransferaze	0,472	0,141	Inhibitor MAP-kinaze	0,213	0,004	Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfottransferaze	0,599	0,083
Antagonist receptora glutamata	0,242	0,013	Inhibitor MAP-kinaze	0,240	0,004	Inhibitor PfA-M1-aminopeptidaze	0,243	0,074	Inhibitor MAP-kinaze	0,308	0,003
Inhibitor lizil-oksidge	0,289	0,073	Inhibitor komplemeta	0,246	0,013	Inhibitor transglutaminaze 2	0,167	0,012	Inhibitor blasticidin-S deaminaze	0,266	0,027
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Liječenje upalne bolesti crijeva	0,281	0,073	Antimikobakterik	0,317	0,071	Antimigrenik	0,278	0,017	Antiastrmatik	0,605	0,015
Antimigrenik	0,217	0,032	Antimigrenik	0,219	0,031	Liječenje upalne bolesti crijeva	0,301	0,060	Liječenje kronične obstruktivne plućne bolesti	0,586	0,005
			Liječenje poremećaja gastrickog pražnjenja	0,150	0,004	Liječenje poremećaja u ponašanju	0,257	0,077	Antimigrenik	0,338	0,010



Tablica 7. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za derivate *N*-4-benzoil-*N*-3-(2-oksopropil)-*N*-1-triazolilcitozina (13-16).

Aktivnost spoja 13	Pa_13	Pi_13	Aktivnost spoja 14	Pa_14	Pi_14	Aktivnost spoja 15	Pa_15	Pi_15	Aktivnost spoja 16	Pa_16	Pi_16
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze	0,707	0,053	Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze	0,781	0,021	Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze	0,707	0,053	Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze	0,766	0,026
Inhibitor receptorske kinaze porijeklom iz trombocita	0,356	0,104	Blokator kalijeveg kanala aktiviranog kalcijem	0,175	0,005	Blokator kalijeveg kanala aktiviranog kalcijem	0,172	0,005	Blokator kalijeveg kanala aktiviranog kalcijem	0,166	0,005
Antagonist kortikosteroida	0,174	0,033	Antagonist kortikosteroida	0,174	0,033	Antagonist kortikosteroida	0,174	0,033	Inhibitor MAP-kinaze	0,157	0,008
Blokator kalijeveg kanala aktiviranog kalcijem	0,194	0,005	Inhibitor MAP-kinaze	0,145	0,009	Inhibitor MAP-kinaze	0,145	0,009	Antagonist kortikosteroida	0,174	0,033
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Analgetik, neopijatni	0,375	0,062	Analgetik, neopijatni	0,621	0,011	Analgetik, neopijatni	0,661	0,009	Analgetik, neopijatni	0,588	0,014
Cerebralni antiishemik	0,302	0,033	Cerebralni antiishemik	0,415	0,173	Liječenje poremećaja gastričkog pražnjenja	0,158	0,004	Cerebralni antiishemik	0,372	0,211
Liječenje ateroskleroze	0,233	0,060	Liječenje poremećaja gastričkog pražnjenja	0,156	0,004	Liječenje kognitivnih poremećaja	0,230	0,119	Liječenje gastrointestinalnih poremećaja	0,179	0,022

Tablica 8. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za derivate *N*-4-benzoil-*N*-3-(2-oksopropil)-*N*-1-triazolilcitozina (17-20).

Aktivnost spoja 17	Pa_17	Pi_17	Aktivnost spoja 18	Pa_18	Pi_18	Aktivnost spoja 19	Pa_19	Pi_19	Aktivnost spoja 20	Pa_20	Pi_20
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze	0,747	0,033	Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze	0,707	0,053	Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze	0,730	0,041	Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze	0,707	0,053
Inhibitor transglutaminaze 2	0,422	0,002	Inhibitor blastocidin-S-deaminaze	0,286	0,020	Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfotransferaze	0,431	0,168	Blokator kalijevog kanala aktiviranog kalcijem	0,184	0,005
Inhibitor sinteze leukotriena	0,425	0,005	Inhibitor komplementa	0,201	0,036	Blokator kalijevog kanala aktiviranog kalcijem	0,171	0,005	Inhibitor MAP-kinaze	0,151	0,008
Agonist interleukina 2	0,358	0,080	Inhibitor MAP-kinaze	0,167	0,006	Antagonist kortikosteroida	0,186	0,026			
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Liječenje alergijskog rinitisa	0,467	0,004	Analgetik, neopijatni	0,577	0,015	Analgetik, neopijatni	0,596	0,014	Analgetik, neopijatni	0,641	0,010
Analgetik	0,499	0,038	Liječenje poremećaja gastričkog pražnjenja	0,148	0,004	Liječenje poremećaja gastričkog pražnjenja	0,161	0,004	Cerebralni antiishemik	0,400	0,185
Liječenje ateroskleroze	0,451	0,026	Antitreponematik	0,149	0,026	Cerebralni antiishemik	0,354	0,231	Liječenje poremećaja gastričkog pražnjenja	0,156	0,004

## **5. ZAKLJUČCI**

- *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**) pripremljen je jodiranjem *N*-4-benzoilcitozina, a njegovim propargiliranjem sintetizirani su *N,N*-1,3-dipropargilni derivat citozina (**2**) i ciklizirani produkt (**3**) uz  $K_2CO_3$  kao bazu.
- Bakrom kataliziranom „klik“ reakcijom *N*-4-benzoil-*N,N*-1,3-dipropargil-5-jodcitozina (**2**) i odgovarajućih azida potpomognutom mikrovalovima nisu dobiveni željeni triazolni derivati citozina.
- *N*-alkiliranjem *N*-4-benzoilcitozina s propargil-bromidom uz  $K_2CO_3$  kao bazu pripremljeni su *N*-1-propargilirani i *N,N*-1,3-dipropargilirani derivati *N*-4-benzoil-citozina (**4** i **5**).
- *N,N*-1,3-ditriazolilni derivati citozina (**6-12**) pripremljeni su Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom potpomognutom mikrovalovima *N,N*-1,3-dipropargiliranog derivata *N*-4-benzoil-citozina (**5**) s odgovarajućim azidima uz katalizator.
- *N*-3-(2-oksopropil)-*N*-1-triazolilni derivati (**13-20**) dobiveni su kao nusprodukti „klik“ reakcije, oksidacijom propargilnog supstituenta na položaju *N*-3 citozinskog prstena.
- Strukturna karakterizacija novopripremljenih spojeva provedena je  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom.
- *In silico* analizom predviđene su moguće biološke mete i farmakološka djelovanja novopripremljenih spojeva.
- Od svih analiziranih spojeva najbolje predviđene biološke aktivnosti imaju *N,N*-1,3-dipropargilirani *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**2**), derivat *N*-4-benzoil-ditriazolilcitozina koji na 1,2,3-triazolnom prstenu u položaju 1 ima *p*-trifluorometilfenilni supstituent (**6**) i derivat *N*-4-benzoil-*N*-3-(2-oksopropil)-*N*-1-triazolilcitozina koji na 1,2,3-triazolnom prstenu u položaju 1 ima benzilni supstituent (**17**).

- Citostatska ispitivanja *in vitro* novosintetiziranih spojeva biti će provedena na staničnim linijama HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi).

## **6. LITERATURA**

1. Snoeck R.; Sakuma T; De Clercq E.; Rosenberg I.; Holy A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988 **(32)** 1844.
2. Sandip G. Agalave; Suleman R. Maujan; Vandana S. *Chem. Asian J.* 2011 **(6)** 2696.
3. Raić-Malić S.; Meščić A.. *Current Medicinal Chemistry*, 2015. **(2)** 34.
4. S. Blewett, C. McGuigan, H. Barucki, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001 **(20)** 1063.
5. Van Rompay A.R.; Johansson M.; Karlsson A. *Pharmacol Ther.* 2000 **(2)** 189.
6. Périgauda C.; Gosselina G.; Imbach J. L. *Nucleosides and Nucleotides.* 1992 **(11)** 53.
7. Galmarini C.M.; Mackey J.R.; Dumontet C. *Leukemia.* 2001 **(15)** 875.
8. Snoeck R.; Sakuma T; De Clercq E.; Rosenberg I.; Holy A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988 **(32)** 1844.
9. Takada A.; Kamiya H.; Shuto S.; Matsuda A., Harashima H. *International Journal of Pharmaceutics.* 2009 **(337)** 59.
10. Scaglione F.; Berrino L. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2012 **(39)** 463.
11. Gharehbaghi K.; Zhen W.; Fritzer-Szekeres M.; Szekeres T.; Jayaram H.N. *Life Sciences.* 1998 **(64)** 112.
12. Satlin A.; Kucherlapati R.; Ruddle F.H. *Cytogenet Cell Genet.* 1975 **(15)** 52.
13. Lee Helfer D.; Hosmane R.S.; Nelson J.L. *J. Org. Chem.* 1981 **(7)** 4804.
14. Smith B.J. *Chem Biol Interact.* 1977 **(3)** 80.
15. Lazreka H. B.; Taourirtea M.; Barascutb J.L.; Imbach J.L. *Nucleosides and Nucleotides.* 1991 **(10)** 543.
16. Sandip G. Agalave; Suleman R. Maujan; Vandana S. *Chem. Asian J.* 2011 **(6)** 2718.
17. Raić-Malić S.; Meščić A. *Current Medicinal Chemistry.* 2015 **(22)** 17.
18. Nanditha N.; Wataru K.; Smith M.A.; Abrol R.; Goddard III. W.A.; Reddy V.P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2011 **(21)** 3961.

19. Rostovtsev V. V.; Green L. G.; Fokin V. V.; Sharpless K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002 (41) 2599.
20. Himo F.; Lovell T.; Hilgraf R.; Rostovtsev V. V.; Noodleman L.; Sharpless K. B.; Fokin V. V. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005 (127) 216.
21. Lagunin A.; Filimonov D.; Poroikov V.; *Current Pharmaceutical Design*. 2010 (16) 1703.
22. Noori H. R.; Spanagel R. *In Silico Pharmacology*. 2013 (1) 65
23. Murray D.; Doran P.; MacMathuna P.; Moss A. C.; *Molecular Cancer*. 2007 (6) 50.
24. <http://genexplain.com/pass>; pristupljeno: 22.6.2015. (12:50)



## **7. ŽIVOTOPIS**

Zovem se Moris Mihovilović, rođen sam 1.2.1992. u Puli. U rodnom sam gradu završio osnovnoškolsko (OŠ Veli Vrh) i srednjoškolsko obrazovanje (Gimnazija Pula; smjer jezična gimnazija), oba s odličnim uspjehom. Nakon polaganja državne mature 2010. godine upisao sam sveučilišni preddiplomski studij Primijenjena kemija Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Isti sam studij završio 15.7.2013. obranom završnog rada pod naslovom „Sinteza novih derivata halogeniranih 7-deazapurina i L-askorbinske kiseline“ pod mentorstvom prof. dc. sc. Mladena Mintasa. Tijekom preddiplomskog studija proveo sam dva semestra kao demonstrator na laboratorijskim vježbama iz kolegija Opća i anorganska kemija. Po završetku preddiplomskog upisao sam diplomski studij na Fakultetu, modul Primijenjena organska kemija. Nastavio sam rad u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju uključivanjem u istraživanje pod mentorstvom doc. dr. sc. Tatjane Gazivoda Kraljević te zajedno s kolegicom Mande Miošić izradio rad za natječaj za rektorovu nagradu 2013./2014. godine. Za spomenuti rad dobio sam Dekanovu nagradu za znanstveni rad. Slijedeće godine nastavio sam rad na Zavodu za organsku kemiju i dobitnik sam Rektorove nagrade 2014./2015. godine u suradnji s kolegicama Mande Miošić i Livijom Kurajica. Sudionik sam X. Susreta mladih kemijskih inženjera i 16. Hrvatskog susreta kemičara i kemijskih inženjera s posterskim priopćenjem.