

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Livia Kurajica

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Livia Kurajica

SINTEZA C-5 SUPSTITUIRANIH CITOZINSKIH
DERIVATA PALADIJEM KATALIZIRANIM REAKCIJAMA

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. Doc.dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
2. Dr. sc. Maja Stipković Babić, poslijedoktorand, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
3. Doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Zagreb, srpanj 2015.

ZAHVALA

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

Zahvaljum dr. sc. Maji Stipković Babić na velikoj pomoći, susretljivosti, strpljivosti i korisnim savjetima koji mi je pružila pri izradi eksperimentalnog dijela i pisanju rada.

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

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

Zahvaljujem se roditeljima i bližnjima na podršci.

SAŽETAK

U ovom radu opisana je sinteza C-5 supstituiranih citozinskih derivata paladijem kataliziranim reakcijama. Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog spajanja *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**) s terminalnim alkinima dobiveni su 5-alkinilni derivati citozina (**2–4**) te C-6-alkilni derivat pirololo[2,3-*d*]pirimidina **5**. Triazolni prsten u položaj *N*-1 citozina uveden je „klik“ reakcijom potpomognutom mikrovalovima *N*-1-propagiliranog derivata citozina **6** s odgovarajućim azidima pri čemu su nastali spojevi **7–9**. 5-alkinilni derivati citozina **10–11** s triazolnim supstituentom u položaju *N*-1 pripremljeni su Sonogashira-inom reakcijom 5-jod-*N*-1-metiltriazolnog derivata citozina **7** s odgovarajućim terminalnim alkinima. Strukturna karakterizacija novih derivata citozina provedena je ¹H NMR spektroskopijom. Farmakološki učinci i moguće biološke mete predviđeni su *in silico* analizom (PASS). Citostatska ispitivanja *in vitro* novosintetiziranih spojeva **2**, **5** i **7** provedena su na staničnim linijama HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj fazi). Spoj **7** pokazao je umjereno djelovanje protiv stanične linije K562. Kako bi se odredili mogući mehanizmi bioloških djelovanja spojeva ispitana je interakcija spoja **7** s *ct*-DNA UV/Vis i fluorescencijskom spektroskopijom.

Ključne riječi: C-5 supstituirani citozinski derivati, Sonogashira-ina reakcija, „klik“ reakcija, UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija, *in silico* analiza (PASS)

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

SUMMARY

This paper describes the synthesis of C-5 substituted cytosine derivatives by palladium catalysed reaction. 5-alkyl cytosine derivatives **2–4** and C-5 alkynylpyrolo[2,3-*d*]pyrimidine derivative **6** have been synthesized by Sonogashira cross-coupling reaction of *N*-4-benzoyl-5-iodinecytosine (**1**) with terminal alkynes. *N*-1 triazole ring was introduced into *N*-1 position of cytosine derivatives **7–9** using „click“ reaction with corresponding azides under microwave irradiation. 5-alkyl cytosine derivatives **10–11** with triazole substituent in position *N*-1 have been synthesized by Sonogashira cross coupling of 5-iodo-*N*-1-methyltriazole cytosine (**7**) with corresponding terminal alkyne. Structural characterization of synthesized compounds was conducted using ¹H NMR spectroscopy. Pharmacological effects and potential biological targets of novel compounds have been predicted by *in silico* analysis (PASS). Cytostatic evaluation *in vitro* was performed against human malignant tumor cells: HeLa, CaCo-2, Raji and K562. Compound **7** showed moderate cytotoxic effect against K562 tumor cell lines. Interaction of compound **7** with *ct*-DNA was performed by UV/Vis and fluorescence spectroscopy in order to predict mechanism of cytostatic activity.

Keywords: C-5 substituted cytosine derivatives, Sonogashira cross-coupling, „click“ reaction, UV/Vis and fluorimetric spectroscopy, *in silico* analysis (PASS)

Popis kratica:

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

RNK – ribonukleinska kiselina

ATP – adenzin-trifosfat

SAR - odnos strukture i aktivnosti

UV/Vis – ultraljubičasta vidljiva spektroskopija

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

TLC – tankoslojna kromatografija

DMSO – dimetilsulfoksid

PASS – predviđanje spektra aktivnosti spojeva

λ_{em} – valna duljina emisije

λ_{exc} – valna duljina ekscitacije

ϵ – molarni ekstinkcijski koeficijent

DMF – dimetilformamid

ct-DNA – polinukleotid iz timusa teleta

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

CaCo-2 – adenokarcinom gušterače

HELA – adenokarcinom grlića maternice

Raji – Burkittov limfom

K562 – humana eritromijeloblastična leukemija

SADRŽAJ RADA

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	
2.1. Nukleozidi i nukleotidi.....	2
2.2. Citozin.....	4
2.3. C-5 supstituirani analozi citozina.....	5
2.4. Derivati 1,2,3-triazola.....	6
2.5. Sonogashira-ina reakcija.....	9
2.6. „Klik“ kemija.....	11
2.7. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva <i>in silico</i> analizom (PASS).....	13
2.8. UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	
3.1. Opće napomene.....	16
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva.....	17
3.3. Priprava spojeva.....	20
3.4. Preliminarna ispitivanja interakcija spoja 7 s ct-DNA.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	
4.1. Sinteza spojeva.....	24
4.2. Analiza ¹ H-NMR spektara.....	30
4.3. Spektroskopska karakterizacija spoja 7 UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom	35
4.4. <i>In silico</i> analiza novopripremljenih spojeva (2-12).....	36
4.5. Citostatska ispitivanja novopripremljenih spojeva.....	39
4.6. Ispitivanje interakcije spoja 7 s ct-DNA UV/Vis i fluorimetrijskim titracijama...40	
5. ZAKLJUČCI.....	42
6. LITERATURA.....	43
7. ŽIVOTOPIS.....	45

1.UVOD

Rak je po učestalosti drugi uzrok smrtnosti u razvijenim dijelovima svijeta, a pojavnost je u svakodnevnom porastu. Rak ne predstavlja jednu jedinstvenu bolest: rak je složena bolest sa preko 250 tipova stanja čiji razvoj uključuje veliku raznovrsnost promjena u pogođenim stanicama.¹ Standardni tretmani koji se koriste u borbi protiv raka su operacija, kemoterapija te radijacija.²

Vrlo učinkovitim rješenjem pri liječenju pokazala se kemoterapija, međutim osim što je štetna za stanice tumora, štetna je i za zdravi dio organizma i rezistentnost koju takve bolesti pokazuju dokaz su da je potrebno stalno razvijati nove potencijalne antitumorske i antivirusne agense. Među vodećim klasama spojeva u tom području često se spominju nukleozidni analozi pirimidina i purina. C-5 supstituirani derivati pirimidinskih nukleozida, pokazali su jaku biološku aktivnost.³⁻⁵ Mnogi izosteri purina važni su inhibitori DNK i RNK polimeraze te ometaju brojne procese koji inače omogućavaju proliferaciju odnosno širenje tumora. Tako su 7-deazapurini poznatiji i kao pirolo[2,3-*d*]pirimidini dio mnogih danas već korištenih lijekova, ali i prirodnih produkata, kao i važnih biomolekula.^{6,7} Spojevi koji sadrže 7-deazapurinsku okosnicu mogu se vezati na mnoge receptore pa je zato njihova primjena vrlo raširena. Značajni su inhibitori brojnih receptora, odnosno njihova vrijedna karakteristika je da imaju širok spektar biološkog djelovanja pa predstavljaju važnu klasu spojeva u sintezi novih biološki aktivnih agenasa.

Spojevi koji sadrže triazolne prstenove također pokazuju značajnu biološku aktivnost, pogotovo oni sa 1,2,3-triazolnom strukturom. Ovi spojevi najčešće se koriste kao fungicidi i antigljivični lijekovi, a prisutni su u raznim farmaceuticima poput antibiotika, antituberkulotika, inhibitora HIV-proteaze i antitumorskih lijekova.⁸ Najpoznatiji primjer je ribavirin, prvi triazolni nukleozid sa širokim spektrom snažnog antivirusnog djelovanja odobrenog za korištenje protiv hepatitis C virusa koji se danas koristi diljem svijeta.⁹ Značajna inhibicija mnogih procesa preživljavanja tumora postiže se vezivanjem triazolnih prstenova na purinsku okosnicu čime se imitira struktura molekule ATP-a.

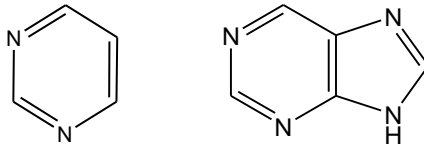
Osnovni cilj ovih istraživanja bio je sinteza novih C-5 alkinilnih derivata citozina s triazolnim supstituentom u položaju *N*-1 radi ispitivanja *in vitro* na staničnim tumorskim linijama porijeklom iz čovjeka: HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj fazi, te provesti ispitivanje vezivanja za ct-DNK kako bi se utvrdio mogući mehanizam djelovanja.

2. TEORIJSKI DIO

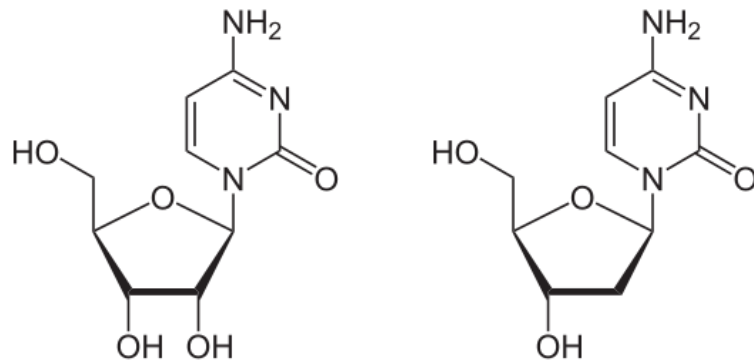
2.1. Nukleozidi i nukleotidi

Nukleozidi su biomolekule čiju strukturu čine 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 povezivanjem s aglikonskim komponentama u obliku purinskih i pirimidinskih baza nastaju njihovi β -glikozidni derivati (Slika 2).

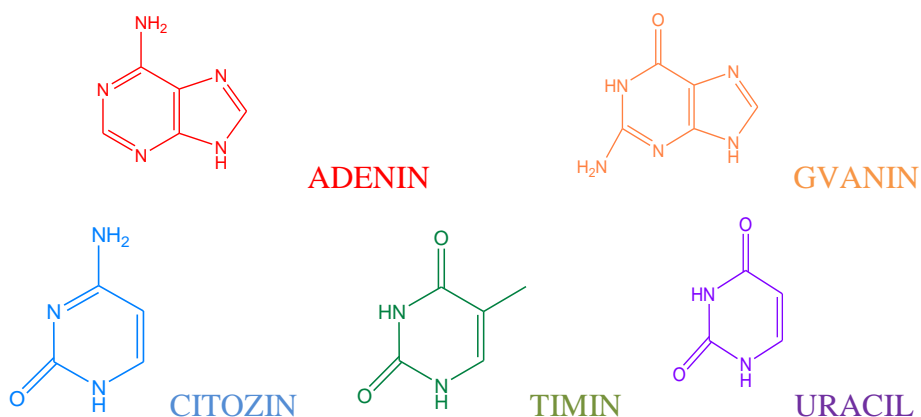
Aglikonske baze koje se pojavljuju u strukturama nukleozida su adenin, gvanin (purinske) i timin, citozin te uracil (pirimidinske) (Slika 3).



Slika 1. Strukture pirimidinskog i purinskog prstena

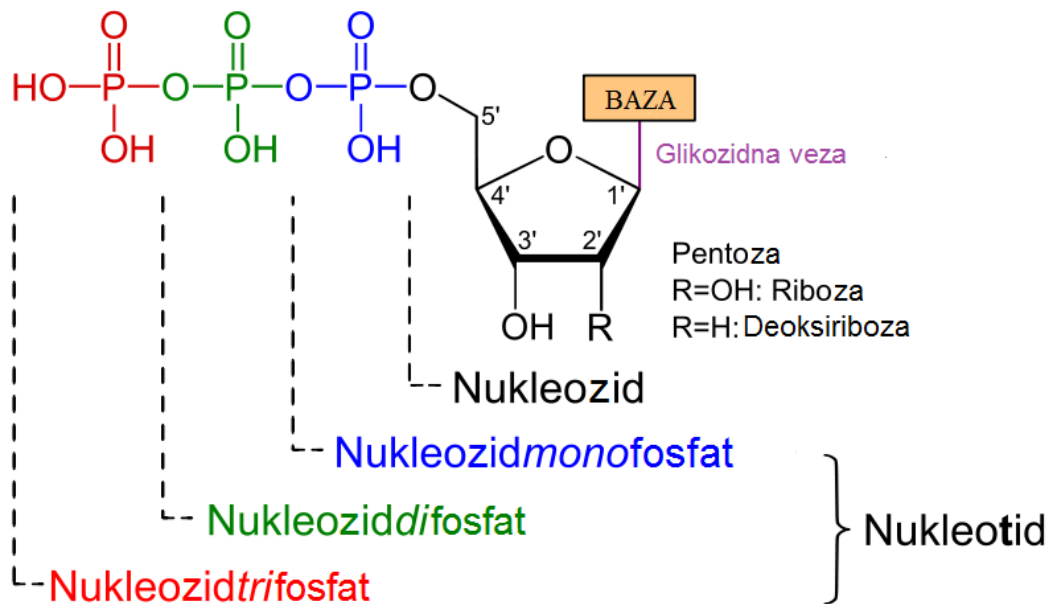


Slika 2. Strukture nukleozida s ribozom i deoksiribozom



Slika 3. Purinske i pirimidinske baze

Nukleotidi nastaju povezivanjem nukleozida sačinjenih od navedenih baza i šećernih komponenti s fosfatnom skupinom (Slika 4), oni su monomeri nukleinskih kiselina koji su odgovorni za najvažnije funkcije i preživljavanje organizma. Osnovne su 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).

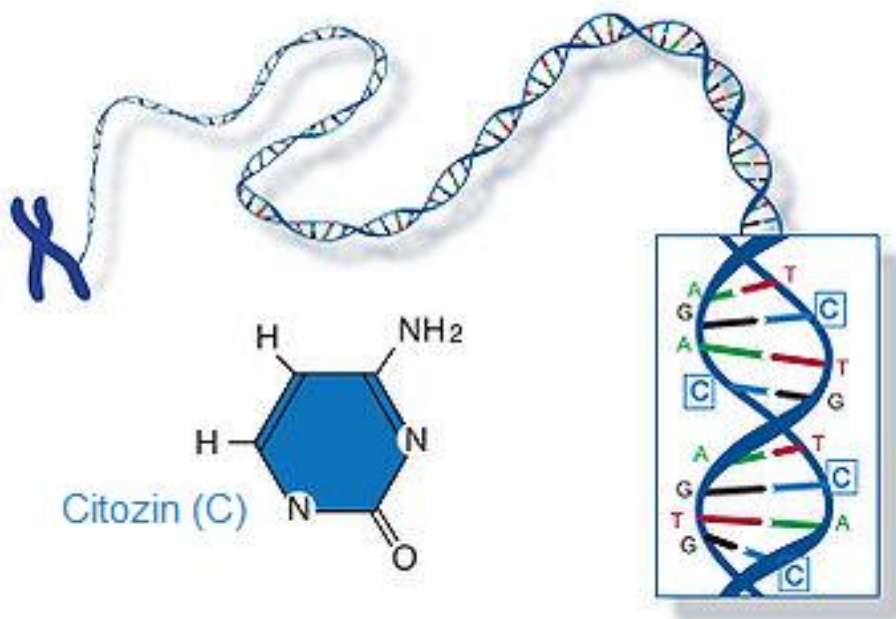


Slika 4. Strukturne razlike između nukleozida i nukleotida

Važno je spomenuti metode sinteze nukleozida. Nukleozidi se mogu sintetizirati supstitucijom s dušikovim nukleofilom na monosaharidu katalizirana kiselinom, što je analogno nastajanju glikozida. Zatim treba spomenuti *de novo* sintezu koja se jednim dijelom odvija u jetri. No, najviše se nukleozidi dobivaju razgradnjom nukleinskih kiselina, pri čemu nukleotidaze razgrađuju nukleotide na nukleozide i fosfate. Nukleozidi se dalje razgrađuju nukleotidazama na baze i šećer ribozu, odnosno deoksiribozu.¹⁰ Sinteza nukleotida teče tako da se nukleozidi fosforiliraju nukleozidnim monofosfat-kinazama pa tako nadalje do trifosfata.¹¹

2.2. Citozin

Citozin je jedan od pet glavnih nukleozidnih baza, a njihova je uloga skladištenje i transport genetske informacije u stanici unutar nukleinskih kiselina (Slika 5). Uz timin i uracil derivat je pirimidina. U molekuli DNK citozin i timin povezuju se vodikovom vezom s komplementarnim purinskim bazama adeninom i gvaninom, u RNK molekuli komplementarna baza adenina je uracil. Citozin se ne pojavljuje samo u molekulama DNK i RNK. Primjerice citidin-trifosfat, molekula koja se može ponašati kao kofaktor enzima, sudjeluje uprilenosu fosfatne skupine pri čemu iz adenin-difosfata(ADP) nastaje adenin-trifosfat(ATP). Metiliranjem citozina pomoću enzima DNK-metiltransferaze nastaje spoj 5-metilcitozin, spoj važan za regulaciju transkripcije.¹²



Slika 5. Struktura nukleozidne baze citozina

Citozinski analozi sintetski su spojevi čija je namjena imitiranje prirodnih citozina i zauzimanje njihovog mjesta u nukleinskim kiselinama, na taj način inhibiraju rast DNK i RNK. Ovo važno svojstvo citozinskih analoga koristi se pri liječenju hematoloških zloćudnih tkiva.

Citarabin je derivat citozina, a svoju kliničku primjenu nalazi u liječenju akutne leukemije. Citarabin je dokaz da su citozinski derivati potencijalni spojevi u borbi protiv nekih, dosad neizlječivih bolesti.

(S)-1-(3-hidroksi-2-fosfonilmetoksipropil)citozin (HPMPC) snažan je i selektivan inhibitor replikacije humanog citomegalovirusa (CMV). Njegova aktivnost vrlo je visoka i slična ekvivalentnom adeninskom derivatu HPMPA, a oba su pokazala vrlo niske koncentracije potrebne za inhibiciju virusa.¹³ Citozinski derivati pokazali su i značajnu antitumorsku aktivnost. Učinkovitost antitumorskog nukleozidnog derivata citozina 3'-etinilcitidina (ECyd) analizirana je *in vitro* i *in vivo*. *In vivo* antitumorski učinak uključivao je kapsuliranje u liposome, a farmakokinetičkim i farmakodinamičkim analizama dobiven je model koji kvantitativno objašnjava *in vivo* utjecaj ECyd-a. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da je raspoloživost ECyd-a u tumorskom tkivu bila vrlo važna za borbu organizma protiv malignog tkiva. Citozinski derivati su se u istraživanjima pokazali kao vrlo snažni biološki agensi, a vrlo je važno dizajnirati i nosioce antitumorskih lijekova modeliranjem njihovih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava.¹⁴

2.3. C-5 supstituirani analozi citozina

5-metilcitozin primjer je biološki aktivnog derivata citozina.. Ispitivana je fotoinducirana reakcija izmjene elektrona s *N*- α -acetil-L-lizinom, derivatom esencijalne aminokiseline L-lizina. Reakcije su provođene pri pH 7,5 i pri tome su nastali metilcitozinski derivati heksanske kiseline. Iz manjeg dijela produkata je deaminacijom nastao timinski analog, koji je potom deacitilirana hidrolizom u kiselom mediju. Fotoinducirane reakcije pri pH sličnoj fiziološkoj vrijednosti mogle bi imati biološku primjenu pogotovo u citozinskim komponentama DNA koje mogu reagirati s amino skupinama lizinskih ogranaka proteina nakon izloženosti UV ozračivanju nukleosoma i ostalih kompleksa DNA proteina u fiziološkim uvjetima.³

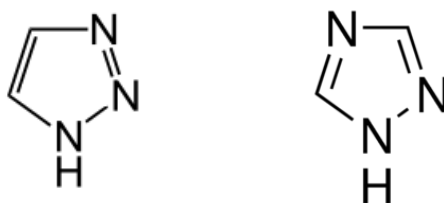
5-azacitidin pokazuje dobra antibakterijska svojstva, a njegova interakcija s citozin-metiltransferazom uzrokuje mutagenezu u bakterijskoj vrsti *Escherichia coli*, pri čemu je utvrđena korelacija mutacija i 5-azacitidina, uz veliku ovisnost o koncentraciji, odnosno dozi.⁴

DNA metiliranju, odnosno adicija metilne skupine u položaj C-5 citozina iz C-G dinukleotida, duguje za svoj nagli napredak epigenetika. Istraživanja bazirana na

karakterizaciji DNA metiliranja povezana su sa razvojem bolesti i mogućnosti njenog korištenja kao biomarkera za dijagnozu, prognozu i predviđanje odgovora na terapiju. Otkriveni su novi derivati citozina koji imaju regulatornu ulogu poput 5-hidroksimetilcitozina, 5-formilcitozina i 5-karboksilcitozina, koji dokazuju svoju važnost u interakciji nukleozidnih analoga i važnih bioloških meta u organizmu.⁵

2.4. Derivati 1,2,3-triazola

Triazoli su aromatski heterociklički spojevi koji dolaze u obliku dvaju izomera: 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol (Slika 6), 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 7 prikazani su tautomerni oblici 1,2,3-triazola.



Slika 6. Strukture 1,2,3-triazola i 1,2,4-triazola



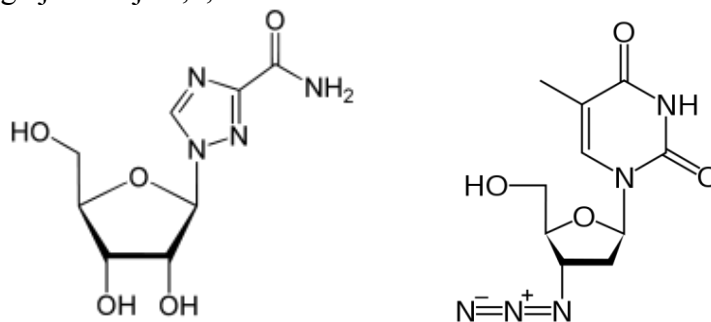
Slika 7. Strukture 1H-1,2,3-triazola i 2H-1,2,3-triazola

Derivati triazola sintetski su spojevi dobiveni „klik“ reakcijama, a posebnu primjenu su našli u farmaceutskoj industriji pa se nalaze u antibioticima, antituberkuloticima, inhibitorima HIV proteaze i antitumorskim lijekovima.⁸ Također se koriste i kao fungicidi u poljoprivredi.

Veliko zanimanje za derivate 1,2,3-triazola proizlazi iz činjenice da su stabilni (nisu podložni metaboličkoj razgradnji), stvaraju jake vodikove veze koje mogu biti ključne u vezivanju s biomolekulskim meta i dobro su topljivi. U prirodi se ne pojavljuju, iako sintetske molekule koje sadrže 1,2,3-triazolni prsten pokazuju raznoliku biološku aktivnost. Triazolni spojevi zauzimaju bitno mjesto u medicinskoj kemiji jer za razliku od ostalih azaheterocikla, 1,2,3-triazolni prsten nije protoniran pri fiziološkom pH zbog svoje slabe bazičnosti. Stoga, njihovi neprotonirani sp² hibridizirani dušikovi atomi mogu bolje imitirati djelomično pozitivni naboj anomernog ugljika u prijelaznom stanju reakcija kataliziranih

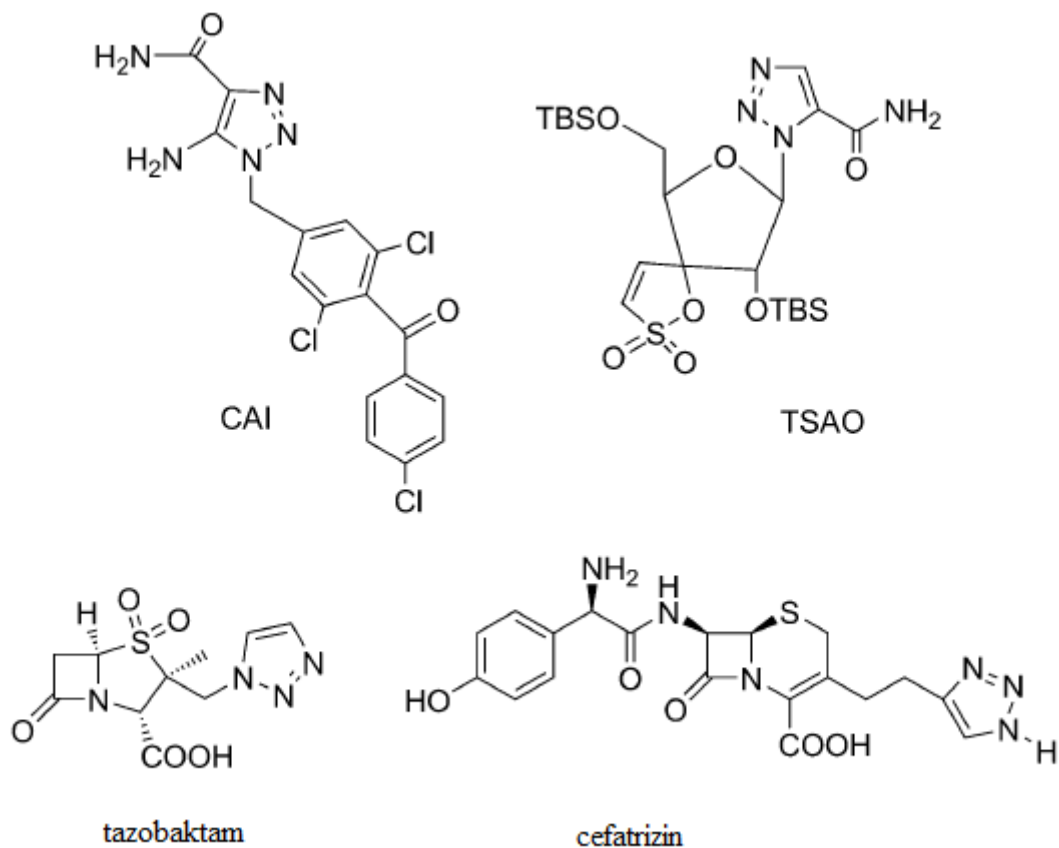
glukoza-oksidadama nego što to čine slični bazični dušikovi atomi iminošećera.³ Brojni 1,2,3-triazoli svoje biološko djelovanje duguju svojoj mogućnosti da djeluju kao rigidne poveznice kojima imitiraju zamjenu atoma i elektronska svojstva peptidne veze bez podložnosti hidrolizi.⁹

Razvoj nukleozidnih analoga korištenih u medicinske svrhe imao je velik utjecaj na antivirusnu i antitumorsku terapiju pa je tako više takvih analoga uspješno 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. Ribavirin je 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 8) kao antivirusnih lijekova bio je poticaj sintezi i ispitivanju biološkog djelovanja 1,2,3-triazolnih nukleozida.⁹



Slika 8. Strukture ribavirina i zidovudina

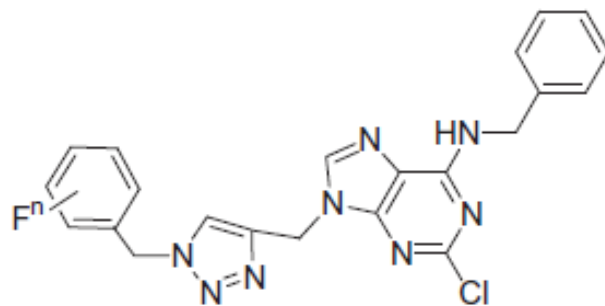
Potencijalni lijekovi koji su bazirani na 1,2,3-triazolnom prstenu su antitumorski spoj karboksiamidotriazol (CAI), nukleozidni derivat kao inhibitor nenukleozidne reverzne transkriptaze (TSAO), β -laktamski antibiotik tazobaktam, cefalosporin, cefatrizin i mnogi drugi⁸ (Slika 9).



Slika 9. Potencijalni lijekovi bazirani na strukturi 1,2,3-triazola

Vezivanje triazolnih prstena na purinsku okosnicu česta je praksa imitiranja strukture molekule ATP-a koja je odgovorna za velik broj funkcija u organizmu, između ostalog i opskrbljivanja tumorskih stanica energijom. Cilj pripravlja njenih biomimetika je 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 10). Spojevima je ispitana biološka aktivnost i neurozaštitni učinci fluorescencijskom elektronskom mikroskopijom, a pripravljeni su bakrom kataliziranom 1,3-dipolarnom cikloadicijskom reakcijom, tzv. „klik“ reakcijom.

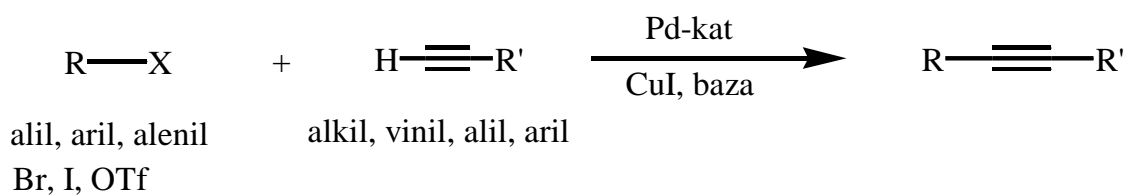


Slika 10. Triazolilni derivat purina

Biolško djelovanje derivata prirodnog spoja flavona, flavopiridola koji je također pokazao učinkovitost u širokom spektru inhibicije kinaza ovisnih o ciklinu potaklo je razvoj ove klase spojeva. Negativna strana flavona je relativno visoka citotoksičnost i nespecifičnost za određene ciljane kinaze, stoga je daljnjim istraživanjima potrebno pronaći spojeve analogne njegovoj strukturi. Kako bi se povećala selektivnosti na određene vrste kinaza, pokušano je moduliranje hidrofobnosti molekula supstituiranjem fluoroarilnim prstenovima preko 1,2,3-triazolnih poveznica, a 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, no mnogi pripravljeni produkti pokazali su zadovoljavajuću aktivnost.¹⁵

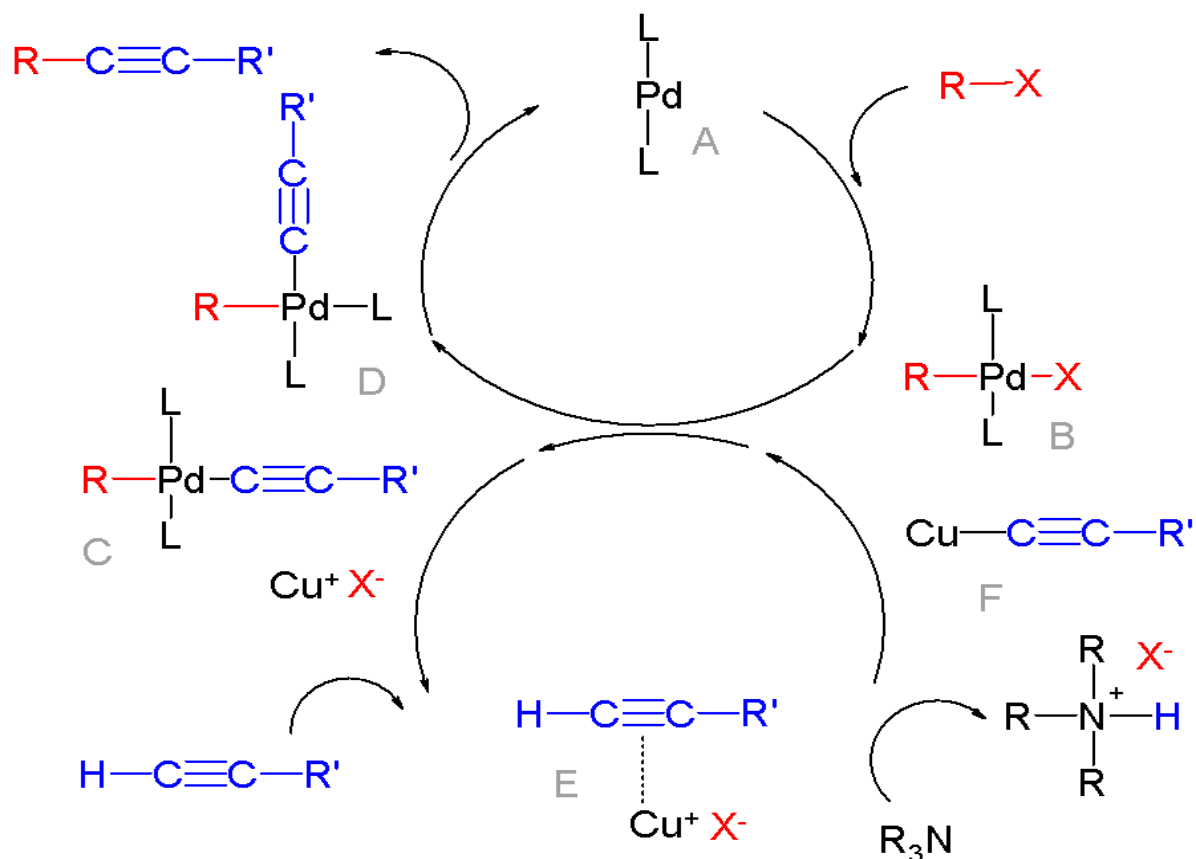
2.5. Sonogashira-ina reakcija

Sonogashira-ina reakcija je paladijem katalizirana reakcija nastajanja C-C veze u kojoj reagira terminalni sp hibridizirani ugljik alkina s sp^2 ugljikom arilnog ili vinilnog halida. 1975. godine otkrio ju je japanski kemičar Kenkichi Sonogashira te je po njemu i dobila ime. Izvorni oblik reakcije odvijao se pri sobnoj temperaturi uz paladijev katalizator, kokatalizator bakrov (I) jodid te amin kao otapalo. (Shema 1)



Shema 1. Sonogashira-ina reakcija

Tokom godina provođena su istraživanja koja su uključivala različite reakcijske uvjete s ciljem poboljšanja Sonogashira-ine reakcije unakrsnog spajanja no uglavno je zadržan izvorni oblik reakcije. Točan mehanizam Sonogashira-ine reakcije do danas nije u potpunosti razjašnjen, većinom zbog poteškoća pri analiziranju kombiniranog djelovanja dvaju metalnih katalizatora iako se pretpostavljaju dva nezavisna katalitička ciklusa (Shema 2).¹⁶

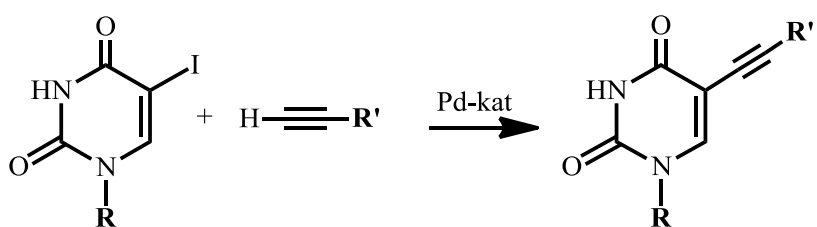


Shema 2. Mehanizam Sonogashira-ine reakcije

Paladijev katalitički ciklus počinje oksidativnom adicijom arilnog halida pri čemu kao produkt vezanja arila i halogenog elementa zasebno za atom paladija nastaje organometalni spoj. U bakrovom katalitičkom ciklusu odvija se disocijacija bakrovog halogenida i nastajanje organometalnog spoja u kojem se bakar veže na alkin supstitucijom s terminalnim atomom vodika. Ta dva organometalna spoja transmetaliranjem uzrokuju otpuštanje halogena u arilnom, te bakra u alkinilnom spoju, uz regeneraciju bakrovog halogena u bakrovom katalitičkom ciklusu. Reduktivnom eliminacijom u zadnjem stupnju nastaje produkt

Sonogashira-ine reakcije stvaranjem veze između arila i alkina, uz regeneraciju paladijevog katalizatora u paladijevom katalitičkom ciklusu.

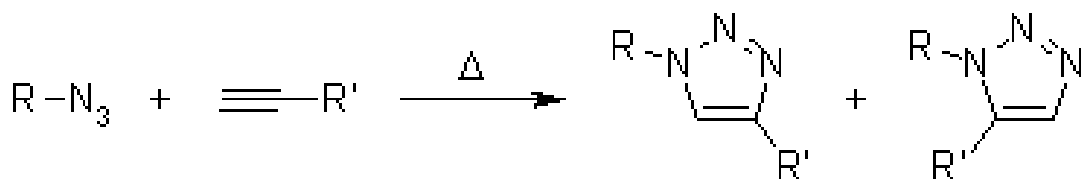
Istraživanjima sinteze antivirusnih lijekova iz reda pirimidinskih nukleozida, pokazano je da su derivati pirimidina, koji imaju vezan atom joda na C-5 atomu, dobri sintetski intermedijari za stvaranje nove C-C ili C-heteroatom veze, pri čemu se atom joda u položaju C-5 supstituira elektrofilom.¹⁷ Za uspješno povezivanje terminalnih alkina s 5-jodnukleozidima izuzetno je važan i odabir otapala, kao i omjer katalizatora te ko-katalizatora (Shema 3). Na primjer, omjer Cu : Pd = 2 : 1 pokazao se najboljim za povezivanje s alkinima jer je na taj način moguće izbjeći nastajanje sporednih produkata.¹⁸



Shema 3. Sonogashira-ina reakcija 5-jodnukleozidnih derivata s terminalnim alkinima

2.6. „Klik“ kemija

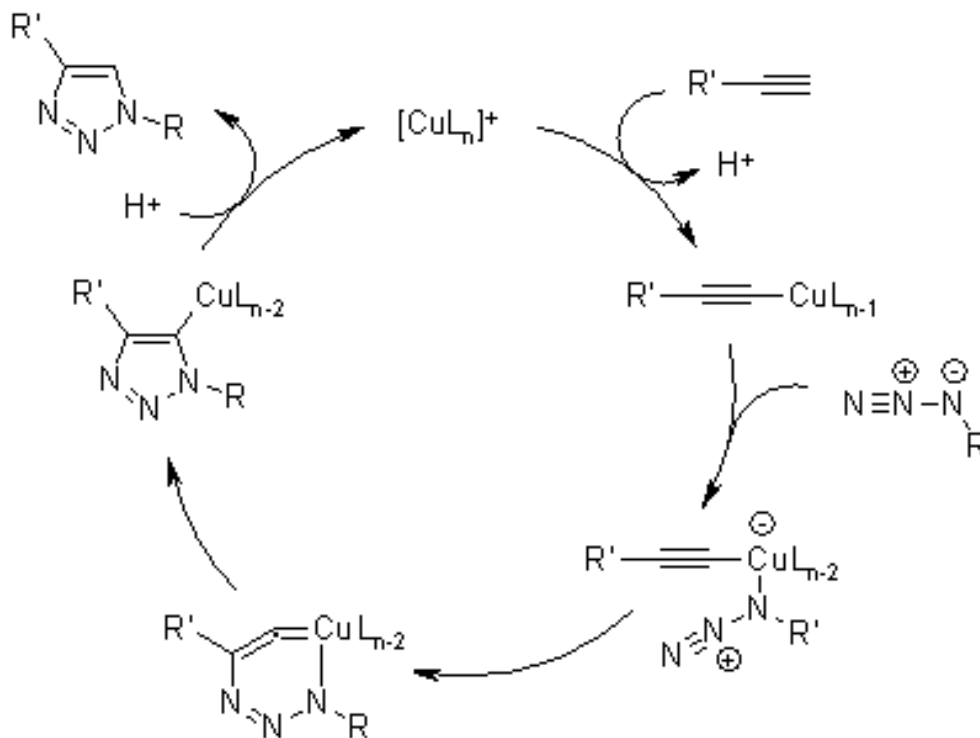
„Klik“ kemija najpoznatiji je način sinteze 1,2,3-triazola. Pojam „klik“ kemija uveo je K.B. Sharpless 2001. godine, a tim pojmom želio je obuhvatiti i opisati reakcije visokog iskorištenja, širokog spektra primjene, stvaraju samo produkte koje je moguće otkloniti bez kromatografskih postupaka, stereospecifične reakcije, jednostavne izvedbe te mogu biti provedene u lako uklonjivim ili bezopasnim otapalima. Nekoliko je vrsta reakcija za koje je pronađeno da odgovaraju navedenim kriterijima od kojih je za dobivanje 1,2,3-triazola važna cikloadicija. Proučavajući cikloadiciju između azida i alkina vidljivo je da ona ispunjava mnoge od navedenih uvjeta, a naziva se Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija.



Shema 4. Opća shema Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije

Ova reakcija nije svrstana u „klik“ reakcije jer se klasična reakcija alkina i azida provodi uz povišenu temperaturu i vrlo često su produkti smjesa dvaju regioizomera kada se koriste terminalni alkini (Shema 4). Bakrom katalizirana „klik“ reakcija slijedi drugačiji mehanizam te ju je moguće provoditi u vodenom mediju, dozvoljava specifičnu sintezu 1,4-disupstituiranih izomera. Reakcija katalizirana rutenijem rezultira sintezom 1,5-disupstituiranih triazola. Ove katalizirane reakcije potpuno zadovoljavaju kriterije i zaslužuju nazivati se definicijom „klik“ kemije te stavljaju naglasak na azid-alkin cikloadiciju kao prototip svim „klik“ reakcijama.¹⁹

Kao jedna od najboljih „klik“ reakcija, bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija ubrzava reakciju za 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 pročišćavanja kromatografijom ili prekrizacijom. Mehanizam reakcije uključuje koordinaciju bakra na acetilen pri čemu 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 pri čemu nastaje triazolni produkt i zatvara se katalitički krug (Shema 5).²⁰ Ova reakcija našla je primjenu u raznim granama razvoja lijekova zbog raznolike primijenjivosti, visoke razine pouzdanosti i potpune regiospecifičnosti. Jedna od ključnih ideja „klik“ filozofije je razvoj kompleksnih molekula iz relativno jednostavnih početnih komponenti, stoga je razvojem „klik“ kemije najviše profitirala farmaceutska industrija u sintezi lijekova.⁹



Shema 5. Katalitički krug bakrom katalizirane Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije

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

Biološka aktivnost spoja je interakcija spoja s biološkom vrstom. Ona ovisi o strukturi spoja, raspodjeli naboja, fizikalno-kemijskim svojstvima i dr., te o biološkoj vrsti (spol, dob, itd.) i načinu liječenja (koncentracija spoja, put biokemijske razgradnje). Svaki biološki aktivni spoj pokazuje širok spektar različitih učinaka. Neki se mogu koristiti kao lijekovi, a drugi uzrokovati različite nuspojave ili mogu biti toksični. Sve aktivnosti uzrokovane jednim spojem smatraju se spektrom biološke aktivnosti tvari.²¹

U novije vrijeme rabi se i *in silico* analiza koja podrazumijeva predviđanje i simulaciju biološke aktivnosti spojeva sofisticiranim kompjuterskim programima i algoritmima na temelju velike baze podataka enzima i drugih meta lijekova te drugih biološki aktivnih tvari.²²

Dobar izbor za pronalaženje novih lijekova je program koji predviđa farmakološke aktivnosti, mehanizme 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) računalni je program koji može predvidjeti više od 3750 učinaka farmakoloških supstanci i biokemijske mehanizme na temelju strukturne formule tvari, prosječnom toksičnosti od 95 %. Primjenjuje se u predviđanju biološke aktivnosti kod

sinteze i istraživanja novih lijekova, medicinskoj kemiji, računalnoj kemiji, farmakogenomici, kemogenomici, kvalitativnom određivanju odnosa strukture i aktivnosti (SAR), translacijskom ispitivanju i medicini.²³

PASS algoritam temelji se na Bayesianovim procjenama vjerojatnosti molekula koje pripadaju klasi aktivnih i neaktivnih spojeva, a procjenjuje predviđeni spektar aktivnosti kao moguću aktivnost (P_a) i moguću ne-aktivnost (P_i), vrijednosti P_a i P_i variraju od 0 do 1, i općenito je $P_a + P_i \neq 1$. Predviđanje se temelji na SAR analizi *trening seta*, koji sadrži više od 205 000 spojeva s više od 3750 bioloških aktivnosti.²³

Prednosti PASS metode su u tome što su kao ulazni podatak potrebne samo 2D strukture, a može se koristiti za grupiranje spojeva prema biološkim svojstvima, a ne prema njihovoj strukturalnoj sličnosti. Predviđanja su brza, pa tako na običnom računaru proračun spektra biološke aktivnosti za 10 000 spojeva može trajati 5 minuta.²³

2.8. UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencija i fosforescencija su vrste luminiscencije, a koriste se i u spektroskopske svrhe. Do luminiscencije dolazi kada se elektron pobudi vanjskim izvorom energije (toplinskim, električnim, svjetlosnim) i prijeđe na viši energetska nivo. Tamo može postojati u singletnom i tripletnom pobuđenom stanju. Ukoliko ne dođe do vibracijske relaksacije, unutarsustavnog prijelaza ili unutarnje konverzije, elektron u osnovno stanje prelazi uz emisiju energije u obliku elektromagnetskog zračenja.

Energije potrebne za pobudu u konjugiranim sustavima u više energetska stanje ekvivalentne su onima koje je moguće postići UV ili vidljivim dijelom spektra elektromagnetskog zračenja. Takvi konjugirani spojevi obično su aromatske molekule, drugi polieni ili spojevi s karbonilnom skupinom.

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

Ultraljubičasti i vidljivi dio spektra elektromagnetskog zračenja nalaze se u intervalu od 200 do 800 nm. Te su vrijednosti valnih duljina dovoljne energije za pobuđivanje kromofora, odnosno funkcionalnih skupina molekula koje svojom konjugiranošću postižu niske energetske nivoe. Oni su odgovorni za boju spojeva, jer njihovom apsorpcijom vidljivog

zračenja molekula emitira natrag zračenje nižih valnih duljina koje daju dojam da je supstanca „ojojana“. Supstituenti koji sami ne daju boju, ali utječu na povećanje (hiperkromni efekt) ili smanjenje (hipokromni efekt) valne duljine apsorbirane svjetlosti se nazivaju auksokromi ili antiauksokromi.

Moguće su tri vrste prijelaza elektrona:

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

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

Intenzitet apsorpcije proporcionalan je koncentraciji, c , i duljini puta, l , prema Lambert-Berr-ovom zakonu:²⁴

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

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

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

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

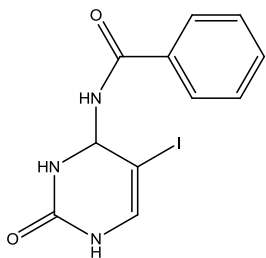
Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu *Fluka* (0.063-0.2 nm), a staklene kolone su punjene pod utjecajem gravitacije te je kao eluens korištena smjesa diklormetan : metanol u odgovarajućem omjeru.

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

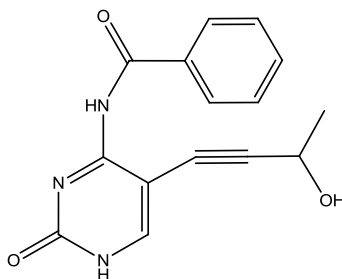
UV/Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 50 spektrofotometru, a fluorescencijski emisijski spektri snimljeni su na Cary Eclipse spektrofotometru, pri čemu su korištene kvarcne kivete promjera 0,5 cm te volumena 3 cm³.

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

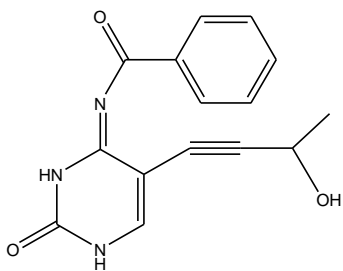
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva



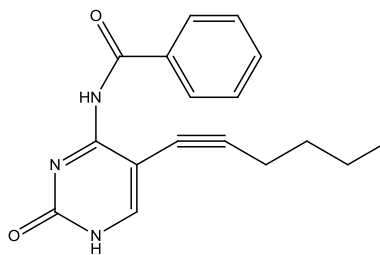
1



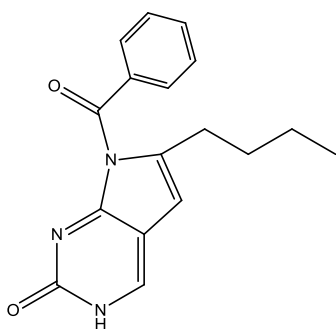
2



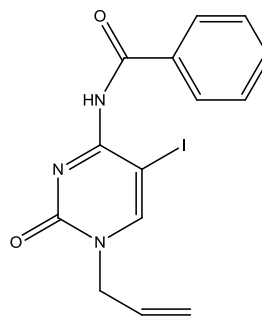
3



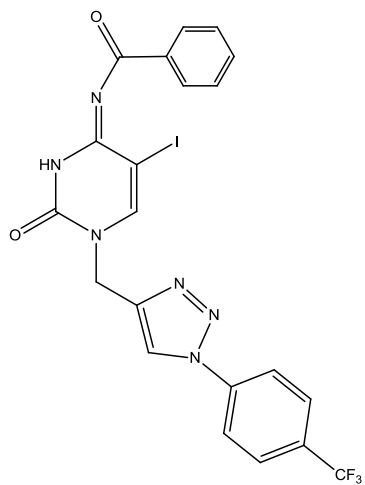
4



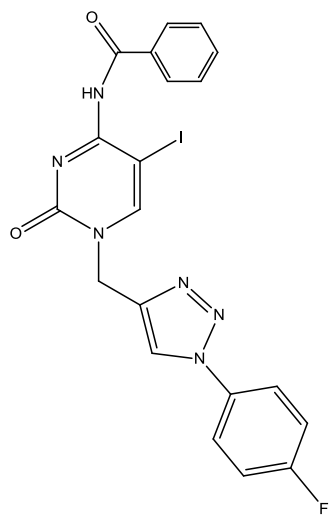
5



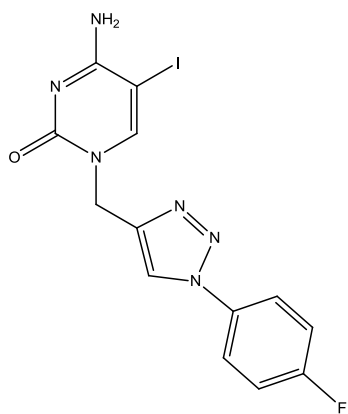
6



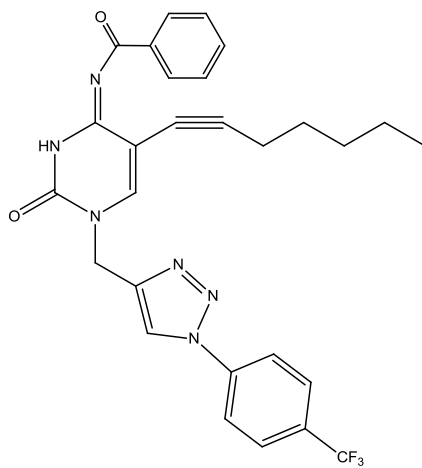
7



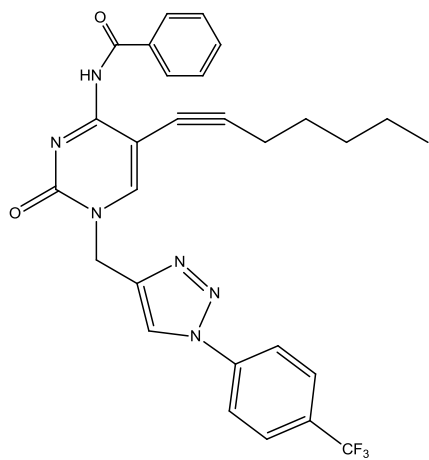
8



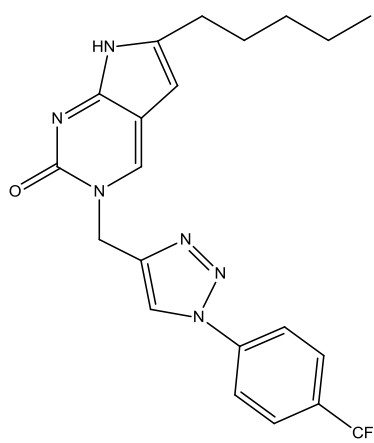
9



10



11



12

3.3 Priprava spojeva

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

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

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

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

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

Spoj **1** (400 mg; 1,173 mmol) otopljen je u DMF-u (11 mL), zatim je u reakcijsku smjesu dodan heksin (0,202 mL; 1,759 mmol), CuI (44,3 mg; 0,2346 mmol), diizopropiletilamin (0,21 mL; 2,346 mmol) te katalizator (PPh₃)₄Pd (134,9 mg; 1173 mmol). Reakcija je provedena preko noći u struji argona pri sobnoj temperaturi, a tijekom je praćen TLC-om. Nakon završetka reakcije, smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH=100:1 i 50:1). Reakcijom je dobivena smjesa spojeva **4** (18,0 mg, 13,12 %) i **5** (45,2 mg, 13,85 %).

3.3.4. *N*-(5-jod-2-okso-1-(prop-2-inil)-1,2-dihidropirimidin-4-il)benzamid (6)

Spoj **1** (240,9 mg; 0,64 mmol) otopljen je DMF-u (10 mL). U reakcijsku smjesu dodan je natrijev hidrid (24,96 mg; 1,04 mmol) a nakon pola sata propagil-bromid (0,101 mL). Reakcija je miješana preko noći pri sobnoj temperaturi, a tijek reakcije praćen je TLC-om. Otapalo je upareno, a sirova smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=30:1). Dobiveni su bijeli kristali spoja **6** (197,1 mg; 73,34 %).

3.3.5. *N*-(5-jod-2-okso-1-((1-(4-(trifluorometil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (7)

Spoj **6** (197,1 mg; 0,5198 mmol) otopljen je u DMF-u (7 mL) i smjesi *tert*-butanol:voda(1:1) (7,17 ml) te stavljen u kvarcnu kivetu. U reakcijsku smjesu dodani su 1-azido-4-trifluorometilbenzen (1,25 mL; 0,62 mmol), CuSO₄ (0,082 mL) i bakar (Cu(0); 0,033 g). Reakcija je provedena u mikrovalnom reaktoru tijekom 40 minuta, a tijek reakcije praćen je TLC-om. Otapalo je upareno, a sirova smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=50:1). Dobiveni su bijeli kristali spoja **7** (56,3 mg; 19%; T_f = 53-55°C).

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

4-amino-1-((1-(4-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-jodpirimidin-2(1*H*)-on (9)

Spoj **6** (216,3 mg; 0,57 mmol) otopljen je u DMF-u (6 mL) i smjesi *tert*-butanol: voda (1:1) (7,86 mL), a u reakcijsku smjesu dodan je 1-azido-4-fluorbenzen (1,4 mL; 0,685 mmol), CuSO₄ (0,085 mL; 0,57 mmol) i Cu (36,2 mg). Reakcija je provedena u mikrovalnom reaktoru 30 minuta, a nakon toga miješana na sobnoj temperaturi preko noći, tijek reakcije praćen je TLC-om. Zatim je reakcijska smjesa zagrijavana u mikrovalnom reaktoru 15 minuta, a potom uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH=70:1 i 50:1). Dobiven je smjesa spojeva **8** (15,19 mg; 6,5%) i **9** (16,3 mg; 7%).

3.3.7. *N*-(5-(hept-1-inil)-2-okso-((1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-2,3-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (10), *N*-(5-(hept-1-inil)-2-okso-((1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1,2-dihidropirimidin-4(1*H*)-iliden)benzamid (11) i 6-pentil-3-((1-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-2(7*H*)-on(12)

Spoj **7** (25,2 mg; 0,045 mmol) otopljen je u DMF-u (5 mL). U reakcijsku smjesu dodani su heptin (0,01mL; 0,068 mmol), CuI (1,701 mg; 0,009 mmol), (PPh₃)₄Pd (5,175 mg; 0,1 mmol) i diizopropiletilamin (0,0082 mL; 0,09 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći u struji argona na sobnoj temperaturi, a tijekom reakcije praćen TLC-om. Reakcijska smjesa je nakon završetka reakcije uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH=200:1 i 100:1). Izolirani su spojevi **10** (6,2 mg; 26%), **11** (6,0 mg; 25%) i **12** (6,4 mg; 26,6%).

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

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

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

Kod fluorescencijskih titracija praćene su promjene intenziteta fluorescencije ispitivanog spoja **7** na valnim duljinama ($\lambda_{em} = 380-600$ nm) gdje niti jedan sastojak u otopini ne pokazuje apsorbaniju u UV/Vis, te su korištene valne duljine pobude kod kojih polinukleotid *ct*-DNA ne apsorbira u UV/Vis ($\lambda_{eksc.} > 320$ nm). Fluorescencijski spektri su korigirani prema baznoj liniji pufera.

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

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

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

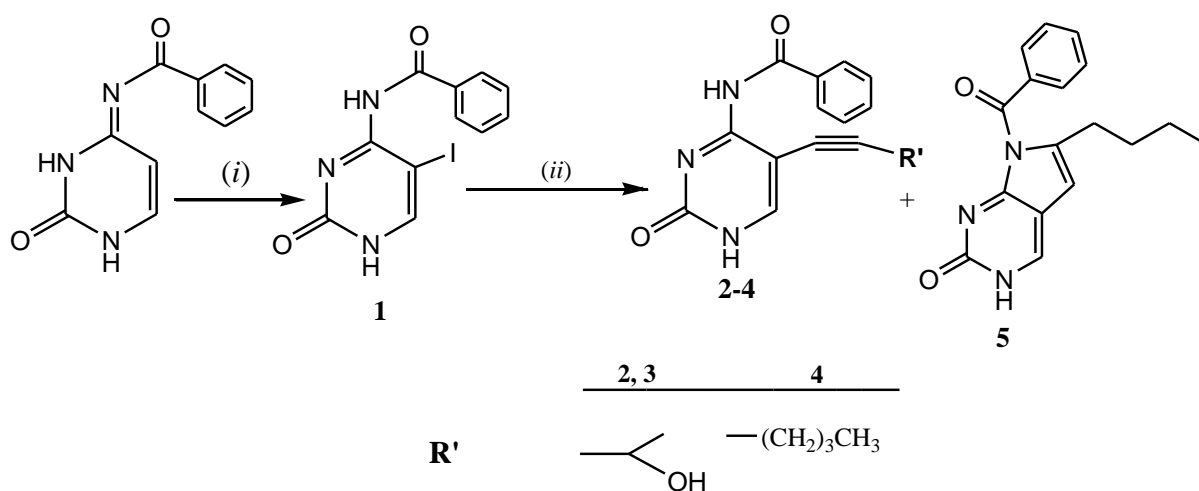
UV/Vis titracije ispitivanog spoja ($c \sim 10^{-5}$ moldm⁻³) s *ct*-DNA korištene su većinom za određivanje batokromnog, hipsokromnog, hipokromnog i hiperkromnog pomaka.

Fluorimetrijske titracije ispitivanih spojeva ($c \sim 10^{-6}$ moldm⁻³) s *ct*-DNA korištene su za praćenje promjena intenziteta fluorescencije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteze spojeva

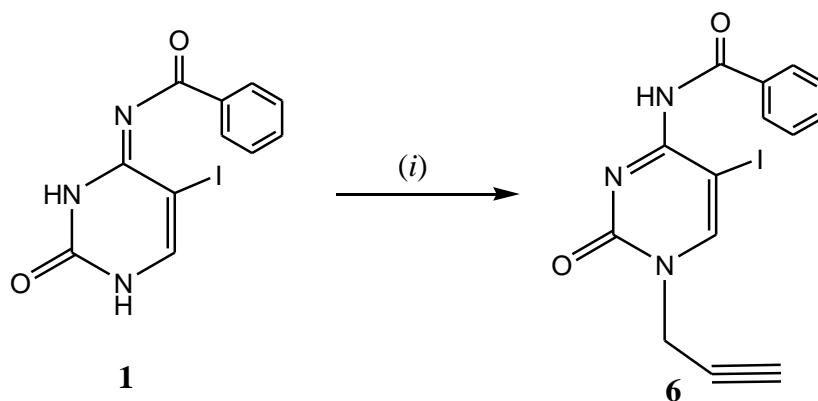
Reakcijom jodiranja *N*-4-benzoilcitozina s I₂ uz cerijev(IV)amonijev nitrat (CAN) u acetonitrilu (AcN) pripravljen je ključni prekursor *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**). Različiti supstituenti s etinskom premosnicom u položaj C-5 pirimidinskog prstena uvedeni su paladijem kataliziranom Sonogashira-inom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



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

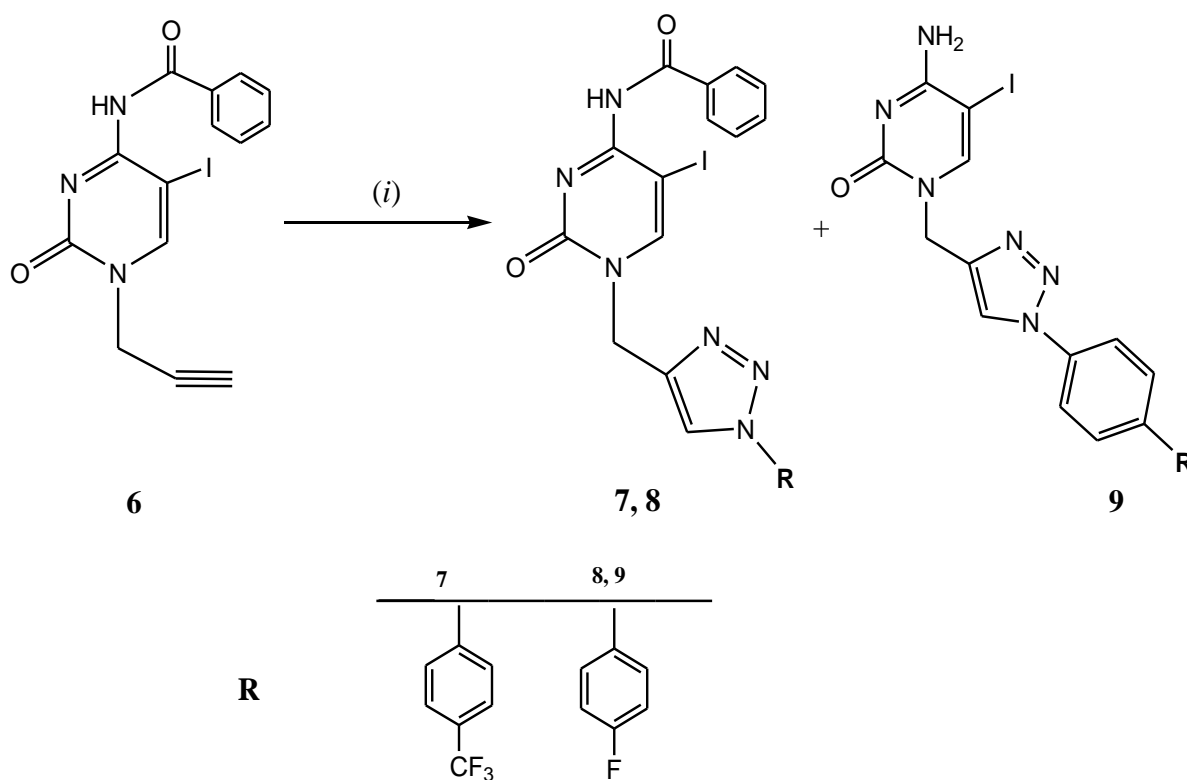
(ii) terminalni alkin/ CuI/ (PPh₃)₄Pd/ Et₃N/DMF/ 24 h/ sobna t.

6-butil-pirololo[2,3-d]pirimidinski derivat **5** dobiven je intramolekulskom *5-endo-dig* ciklizacijom spoja **4** *in situ* (Shema 1). Reakcijom *N*-alkiliranja *N*-4-benzoil-5-jodcitozina (**1**) uz NaH (1,2 mol) kao deprotonirajuće sredstvo s propargil-bromidom (1,2 mol) u DMF-u pripravljen je 5-jod-*N*-1-propagilirani derivat citozina, polazni spoj za "klik" reakcije potpomognute mikrovalovima (Shema 2).



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

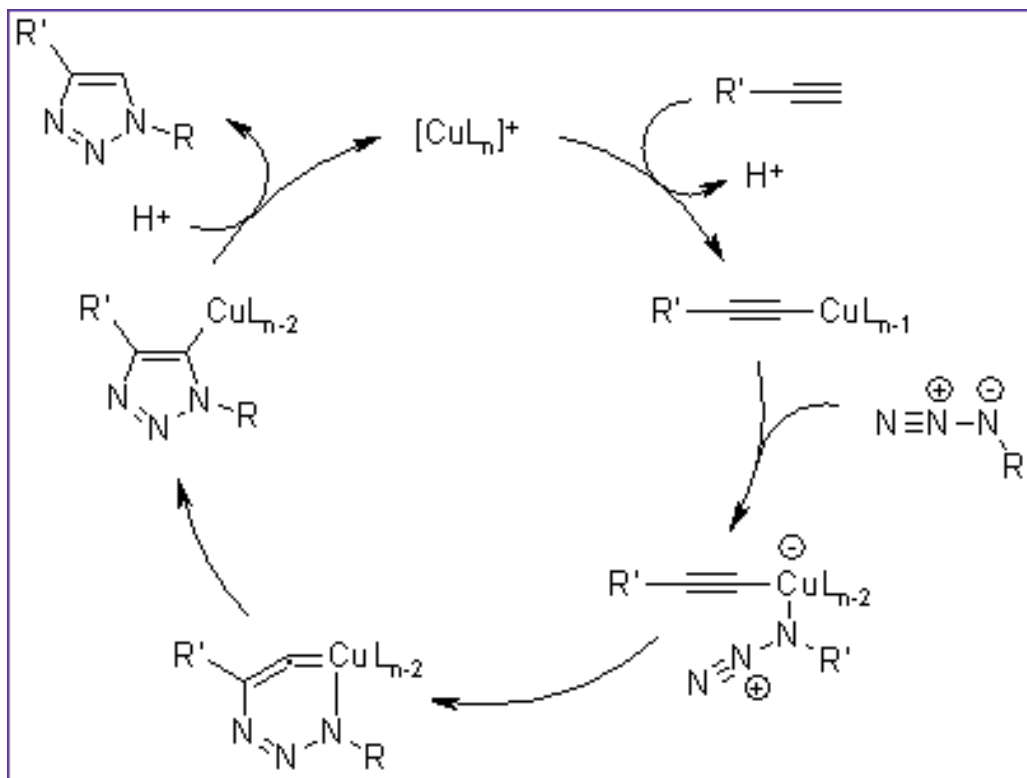
1,2,3-triazolni prsten u položaju *N*-1 citozina uveden je "klik" reakcijom, tj. Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom propargiliranog citozinskog derivata **6** i odgovarajućih azida uz bakar kao katalizator, pri čemu su pripremljeni derivati citozina **7–9** kao 1,4-disupstituirani regioizomeri 1,2,3-triazola (Shema 3).



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

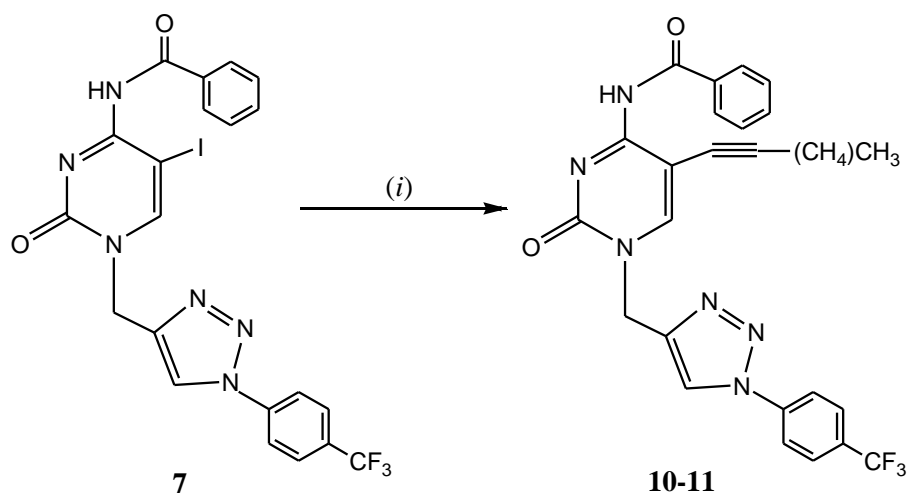
Na Shemi 4 prikazan je mehanizam Huisgenove ciklizacije uz bakar kao katalizator. U prvom stupnju Cu stvara kompleks s acetylenom nakon čega azid istiskuje drugi ligand koji

je vezan za bakar pri čemu nastaje šesteročlani bakar (III) ciklički kompleks, čijom pregradnjom nastaje 1,2,3-triazol.



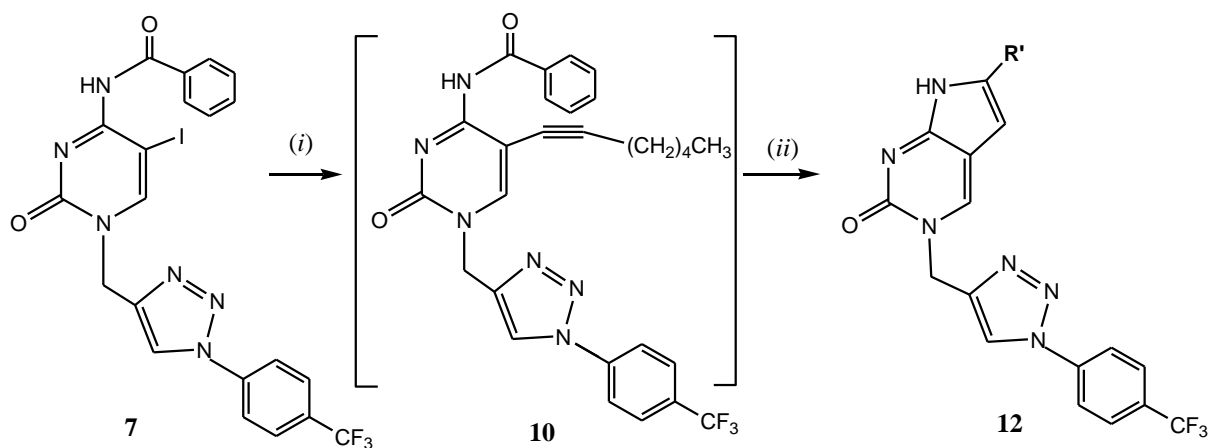
Shema 4: Mehanizam bakrom katalizirane azid-alkin Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije

Sonogashira-inom reakcijom derivata 5-jod-*N*-1-metiltriazolilcitozina (**7**) (1 mol) s terminalnim alkinima uz katalitičku količinu tetrakis(trifenilfosfin) paladija ($(PPh_3)_4Pd$, 0,1 mol), CuI (0,2 mol) i trietilamina (2 mol) u DMF-u sintetizirani su C-5 alkinilni derivati citozina s *N*-1-metil triazolnim supstituentom (**10** i **11**) (Shema 5).

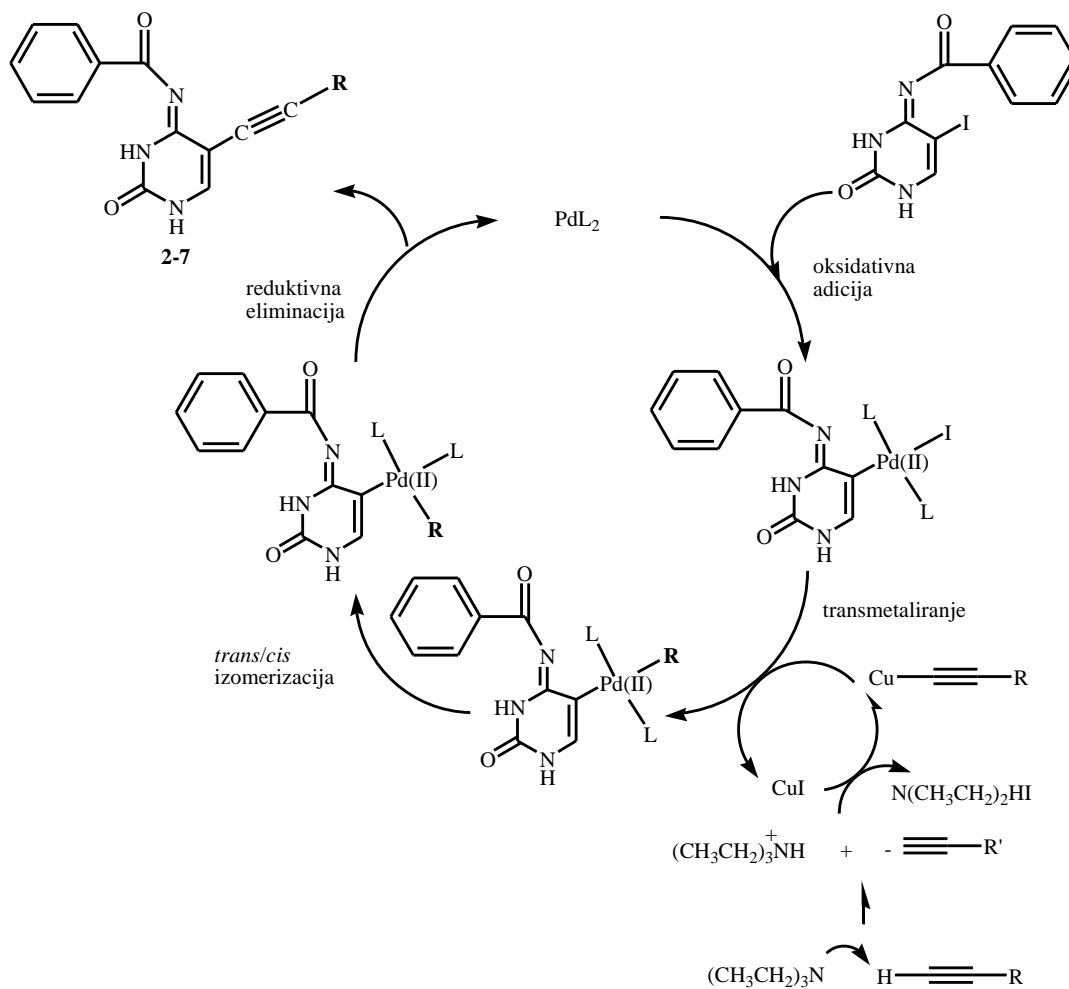


Shema 5. Reagensi i uvjeti: (i) terminalni alkin/ CuI/ (PPh₃)₄Pd/ Et₃N/DMF/ 24 h/ sobna t.

7-deazapurinski derivat **12** sintetiziran je Sonogashira-inom reakcijom, uz dodatak trietilamina i bakrovog(I)jodida *in situ* nakon provođenja reakcije pri sobnoj temperaturi (Shema 6). Mehanizam reakcije prikazan je na shemi 7. Sonogashira-ina reakcija terminalnih alkina s derivatima *N*-4-benzoil-5-jod-*N*-1-metiltriazolilcitozina te njihova *in situ* ciklizacija pospješena bakrovim(I)jodidom daje derivat 6-alkilpirolo[2,3-*d*]pirimidin-2-ona (**12**). Ovaj je biciklički pirolopirimidinski analog sintetiziran *N*-heteroanulacijom, odnosno *5-endo-dig* elektrofilnom ciklizacijom alkinilnog derivata **10** kataliziranom CuI u trietilaminu pri povišenoj temperaturi ili produljenjem vremena reakcije. Reakcija ciklizacije uključuje dušik u položaju C-4 pirimidinskog prstena i etinsku vezu na položaju C-5 pirimidinskog prstena.

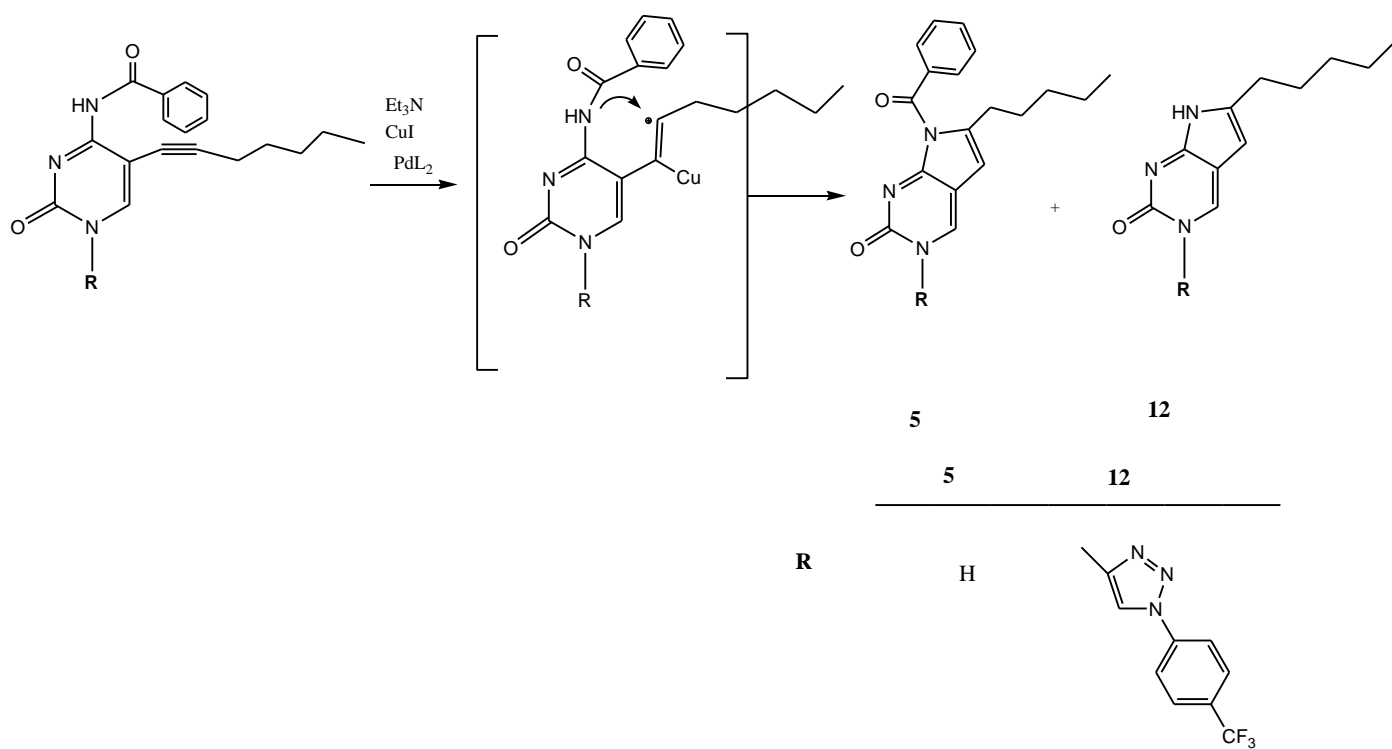


Shema 6. Reagensi i uvjeti: (i) terminalni alkin/CuI/ (PPh₃)₄Pd/ Et₃N/ toluen/ 24 h/ s.t.;
(ii) CuI, Et₃N



Shema 7. Mehanizam nastajanja C-5 supstituiranih citozinskih derivata (2-4 i 10)
Sonogashira-inom reakcijom.

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

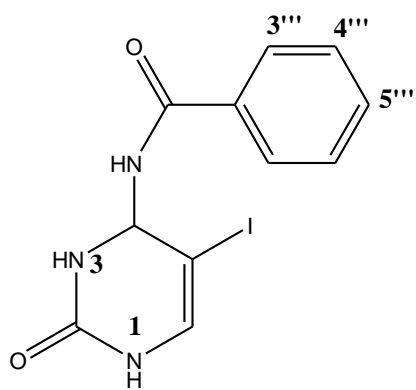


Shema 8: Mehanizam nastajanja pirolo[2,3-*d*]pirimidina (**5** i **12**) *5-endo-dig* ciklizacijom C-5 supstituiranih citozinskih derivata.

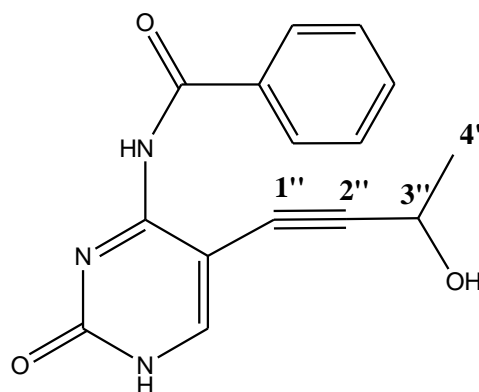
4.2. Analiza ^1H -NMR spektara

Strukture spojeva određene su na temelju kemijskih pomaka (δ/ppm), veličine signala i multipliciteta sprega spin-spin između jezgara H-H u ^1H NMR spektrima.

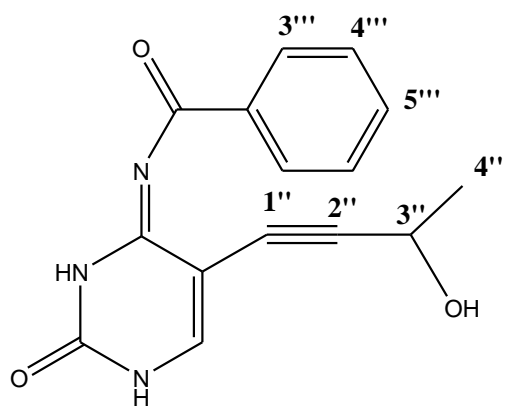
U ^1H NMR spektrima spojeva **2–4** prisutni su signali za protone pirimidinskog prstena (NH-1 i/ili NH-3, NH-4) na $\sim 11,5$ ppm i singlet za proton H-6 na ~ 8 ppm, signali za fenilne protone benzoilne skupine $\sim 7,5$ ppm te signali pobočnog lanca u položaju C-5 u alifatskom dijelu spektra. Struktura bicikličkog spoja **5** potvrđena je prisustvom pirolnog prstena H-1" na 6,24 ppm uz istovremeni izostanak signala za NH-3. u ^1H NMR spektru spoja **6** osim signala za protone pirimidinskog i fenilnog prstena prisutni su i signali N-1 propagilnog supstituenta: dublet intenziteta 2H na 5,58 ppm i triplet intenziteta 1H na 3,44 ppm. U ^1H -NMR spektrima spojeva **7–9** osim signala pirimidinskog i fenilnog prstena u položaju N-4 prisutni su i signali za protone fenilne skupine vezane u položaju C-4' triazolnog prstena te signali za CH_2 -1' protone na $\sim 5,1$ ppm i signal za proton triazolnog prstena na $\sim 8,8$ ppm. U ^1H NMR spektrima spojeva **10** i **11** osim signala za protone pirimidinskog, fenilnog i triazolnog prstena prisutni su i signali u alifatskom području spektra za protone pobočnog lanca u položaju C-5.



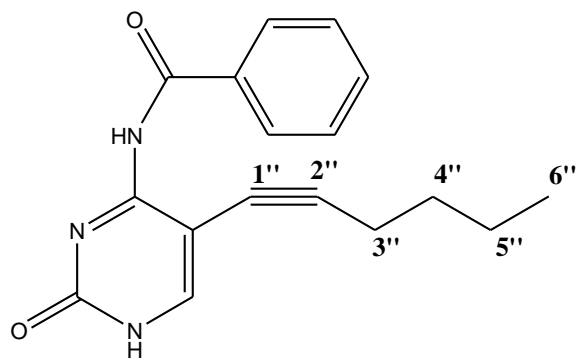
1



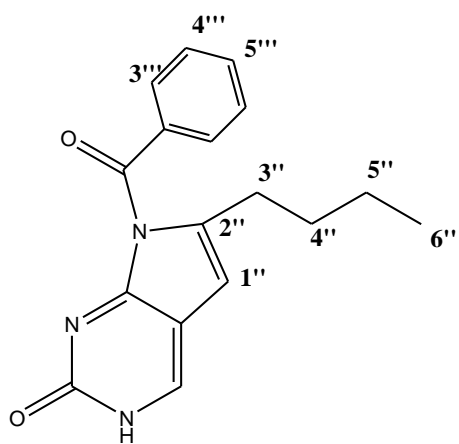
2



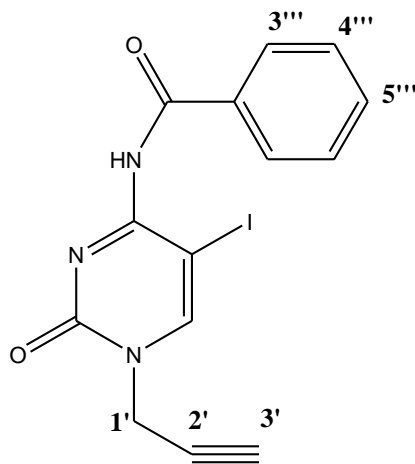
3



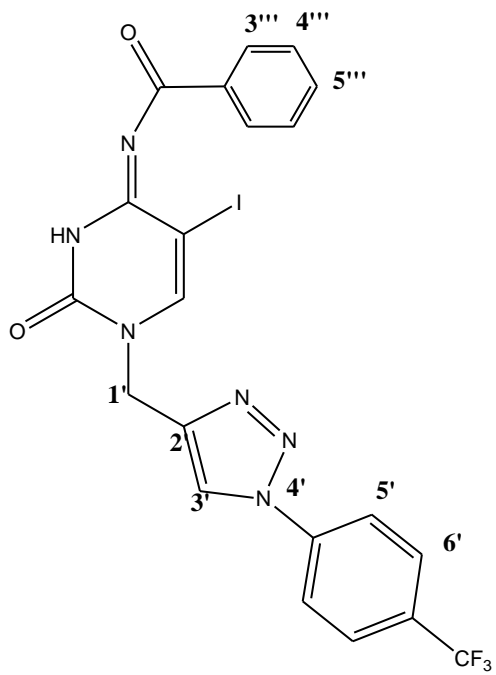
4



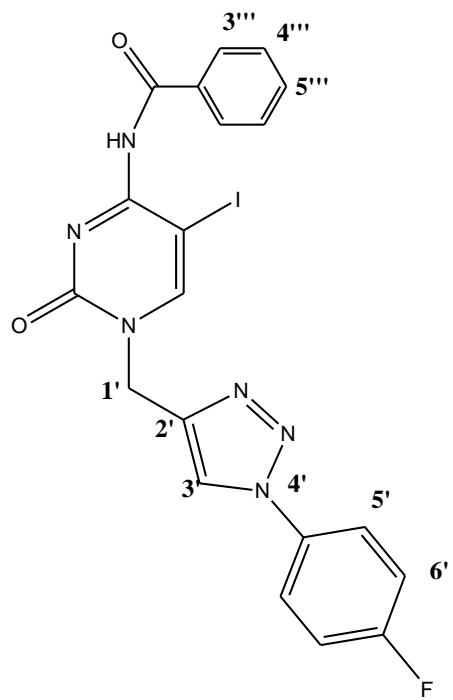
5



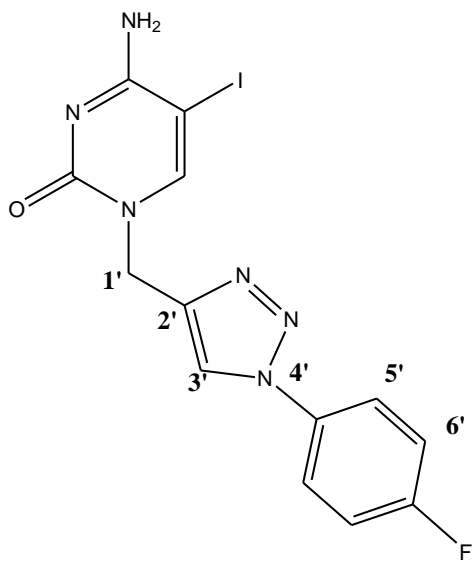
6



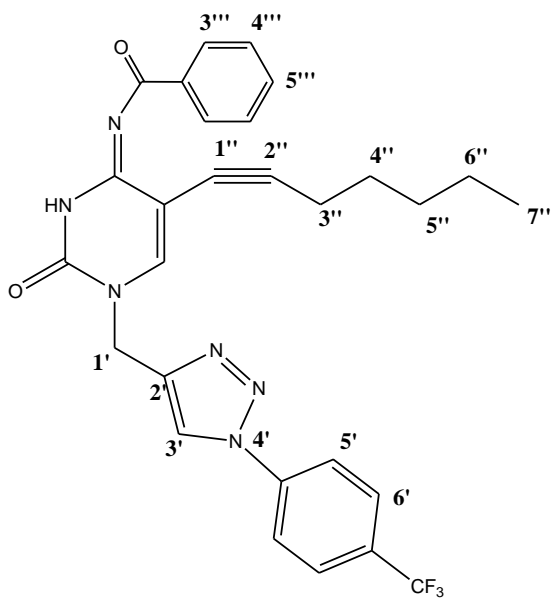
7



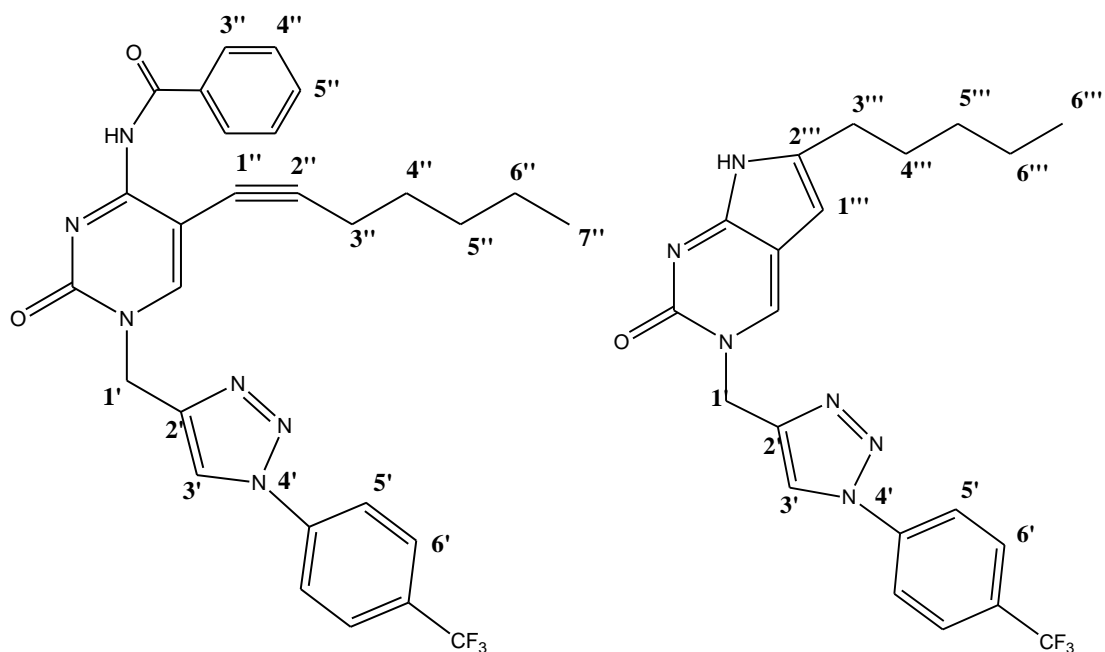
8



9



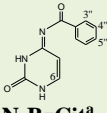
10



11

12

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

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

Spojevi su otopljeni u deuteriranom otapalu DMSO- d_6

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

Tablica 2. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima ¹H-NMR za spoj **6**.

	NH-3 /NH-4	H-6	H-1'	H-3'	H-5', H-6'(Ph, Tr)	H-3'''- H5'''(Ph,Bz)
6	11,75 (s, 1H)	8,23 (s, 1H)	4,50 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz)	3,44 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz)	/	7,53 (2H, t, $J = 7,5$) 7,62 (1H, t, $J = 7,2$) 8,22 (2H, d, $J = 7,2$)

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

^b 5,58 (2H, s, CH₂-benziltriazolil)

Tablica 3. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima ¹H-NMR za spojeve **7-9**.

	NH-3 /NH-4	H-6	H-1'	H-3'	H-5', H-6'(Ph, Tr)	H-3'''- H5'''(Ph,Bz)
7	13,03 (s,1H)	8,65 (s,1H)	5,19 (s, 2H)	8,99 (s,1H)	8,16 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz) 8,25 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz)	7,49-7,68 (m, 3H) 7,99 (d, 2H, $J = 7,1$ Hz)
8	12,89 (s, H)	8,62 (s, 1H)	5,15 (s, 2H)	8,79 (s, 1H)	7,43-7,60 (m, 5H) 7,91-7,94 (m, 4H)	
9	11,68 (s, 2H)	8,33 (s, 1H)	5,03 (s, 2H)	8,74 (s, 1H)	7,40-7,46 (m, 2H) 7,89-7,94 (m, 2H)	/

Tablica 4. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima ¹H-NMR za spojeve **10-11**.

	NH-3 /NH-6	H-6	H-1'	H-3'	H-5', H-6'(Ph, Tr)	H-3'''- H5'''(Ph,Bz)	CH ₃	CH ₂ -3'''- 11''
10	/	8,70 (s, 1H)	5,25 (s, 2H)	8,99 (s, 1H)	7,53-7,74 (m, 5H) 7,99 (m, 2H) 8,18 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz)		0,84 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz)	1,24 (s,6H) 1,51 (m,2H)
11	11,23 (s, 1H)	8,48 (s, 1H)	5,20 (s, 2H)	8,97 (s,1H)	7,53 (d, 2H) 7,73-7,82 (m, 3H) 8,00 (m, 2H) 8,17 (m, 2H)		0,85 (m, 3H)	1,24 (s, 6H) 1, 51 (m,2H)

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

Tablica 5. Kemijski pomaci (δ /ppm), intenziteti signala, multipliciteti i konstante sprega J_{HH} (J/Hz) u spektrima $^1\text{H-NMR}$ za spoj **12**.

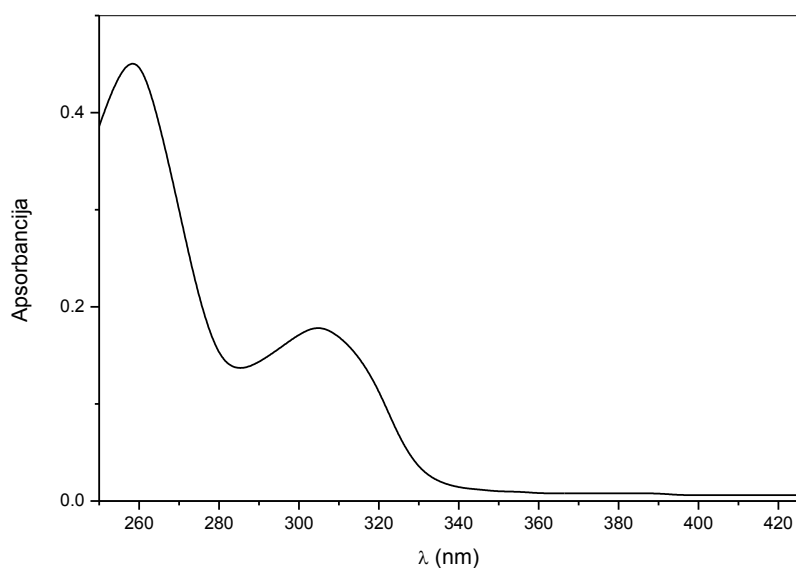
	NH-3 /NH-4	H-6	H-1'	H-3'	H-1''	H-5', H-6'(Ph, Tr)	H-3'''- H5'''(Ph,Bz)	CH ₃	CH ₂ -3'''- 11''
12	11,40 (s, 1H)	8,51 (s, 1H)	5,27 (s, 2H)	8,90 (s, 1H)	5,83 (s, 1H)	7,97 (d, 2H, $J=8,3$ Hz) 8,13 (m,2H)	/	0,88 (t, 3H, $J=7,0$ Hz)	1,24 (s, 6H) 1,52 (m,2H)

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

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

4.3. Spektroskopska karakterizacija spoja **7** UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom

Spoj **7** je okarakteriziran UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom te mu je određen maksimumi apsorbancije, molarni ekstinkcijski koeficijent, valna duljina emisije i Stokesovi pomaci. Matične otopine ispitivanog spoja priređene su u metanolu. UV/Vis spektar ispitivanog spoja snimljen je kod koncentracije $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ u metanolu (Slika 20). Spoj pokazuje batokromni pomak apsorpcijskih maksimuma u području 340-370 nm.



Slika 1. UV/Vis spektri spoja **7** ($c=2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$)

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja provedena su zbog visoke osjetljivosti metode pri koncentraciji $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ u metanolu. Otopina pripravljenog spoja pobuđena je svjetlošću valne duljine ekscitacije (λ_{ex}) koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorbancije (λ_{max}).

Tablica 6. UV/Vis i fluorimetrijski podaci ispitivanih spojeva

Spoj	λ_{max} (nm)	Abs	ϵ_{max} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Stokesov pomak (nm)
7	340	0,0155870206	779	340	/	/

4.4. *In silico* analiza novopripravljenih spojeva (2-12)

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

Spektar bioloških djelovanja sintetiziranih spojeva (2-12) predviđen PASS-om prikazan je u tablicama 10-17 kao aktivnost s vjerojatnošću "da su aktivni" (Pa) i "da su neaktivni" (Pi). Najvjerojatnija predviđena aktivnost treba imati što veću vrijednost Pa i što manju vrijednost Pi. Aktivnosti su prikazane po redosljedu Pa-Pi te su vjerojatnije aktivnosti u tablici pri vrhu.

Tablica 7. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-benzoilcitozin (1) i njegove 5-alkinilne derivate (2–3)

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

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

Aktivnost spoja 4	Pa_4	Pi_4	Aktivnost spoja 5	Pa_5	Pi_5	Aktivnost spoja 6	Pa_6	Pi_6
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor CDP-glicerol glicerofosfotransferaze	0,717	0,049	Inhibitor bilirubin oksidaze	0,484	0,026	Inhibitor CDP-glicerol glicerofosfotransferaze	0,679	0,059
Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,623	0,001	Inhibitor taurin dehidrogenaze	0,528	0,078	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,420	0,005
Inhibitor receptora platelet derivirane kinaze čimbenika rasta	0,500	0,031	Inhibitor cikličke AMP fosfodiesteraze	0,477	0,032	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,399	0,004
Inhibitor ribonukleaze u gušterači	0,427	0,017	Inhibitor aldolaze trimetilaminoksida	0,468	0,050	Antagonist receptora fibrinogena	0,455	0,060
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Antiekcematik	0,814	0,016	Stimulant funkcije bubrega	0,791	0,020	Pojačivač antineoplastika	0,891	0,003
Stimulant eritropoeze	0,534	0,028	Antagonist B2 tromboksana	0,453	0,058	Antineoplastik	0,780	0,014
Protector mukomembrane	0,534	0,123	Antiekcematik	0,488	0,105	Antiekcematik	0,662	0,059

Tablica 9. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-4-benzoil-*N*-1-triazolilne derivate citozina (**7, 8**) i *N*-1-triazolilni derivat citozina (**9**)

Aktivnost spoja 7	Pa_7	Pi_7	Aktivnost spoja 8	Pa_8	Pi_8	Aktivnost spoja 9	Pa_9	Pi_9
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,230	0,046	Glutamate receptor antagonist	0,262	0,010	Inhibitor CDP-glicerol glicerofosfotransferaze	0,583	0,089
Inducira CYP2C19	0,308	0,129	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,271	0,025	Inhibitor Blastocidin-S deaminaze	0,397	0,006
Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,191	0,022	Inhibitor MAP kinaze	0,207	0,004	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,277	0,009
Inhibitor MAP kinaze	0,171	0,006	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,211	0,017			
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Analgetik, neopoidni	0,475	0,032	Antivirusno (Hepatitis B)	0,343	0,024	Antivirusno (Hepatitis B)	0,563	0,003
Analgetik	0,364	0,089	Pojačivač antineoplastika	0,288	0,032	Inhibitor sinteze DNA	0,433	0,024
Antivirusno (Hepatitis B)	0,280	0,039	Inhibitor sinteze DNA	0,263	0,073	Antineoplastik	0,413	0,100

Tablica 10. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za *N*-4-benzoil-5-alkinilne-*N*-1-triazolilne derivate citozina (**10, 11**).

Aktivnost spoja 10	Pa_10	Pi_10	Aktivnost spoja 11	Pa_11	Pi_11
<i>Biološka meta</i>			<i>Biološka meta</i>		
Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,232	0,014	Inhibitor CDP-glicerol glicerofosfotransferaze	0,494	0,128
Agonist receptora nikotina alfa 6	0,177	0,034	Inhibitor receptora platelet derivirane kinaze čimbenika rasta	0,411	0,066
Inhibitor dihidroorotaze	0,197	0,065	Inhibitor dihidropirimidin dehidrogenaze	0,300	0,007
Inducira CYP2C19	0,286	0,171	Inhibitor MAP3K5	0,311	0,089
<i>Farmakološko djelovanje</i>			<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Antiekcematik	0,438	0,173	Antimikobakterijsko	0,369	0,048
Antimikobakterijsko	0,267	0,104	Protivupalno	0,400	0,095
Analgetik, neopoidni	0,254	0,135	Liječenje reumatskog artritisa	0,283	0,063

Tablica 11. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za pirolo[2,3-*d*]pirimidinski derivat (**12**)

Aktivnost spoja 12	Pa_12	Pi_12
<i>Biološka meta</i>		
ATPase stimulant	0,285	0,033
Inhibitor ciklične GMP fosfodiesteraze	0,250	0,038
Inhibitor CYP3A4	0,248	0,069
Agonist receptora nikotina alfa 6	0,187	0,029
<i>Farmakološko djelovanje</i>		
Liječenje reumatskog artritisa	0,280	0,064
Liječenje ateroskleroze	0,239	0,124
Liječenje bolesti trbušne šupljine	0,119	0,006

4.5. Citostatska ispitivanja novopripremljenih spojeva

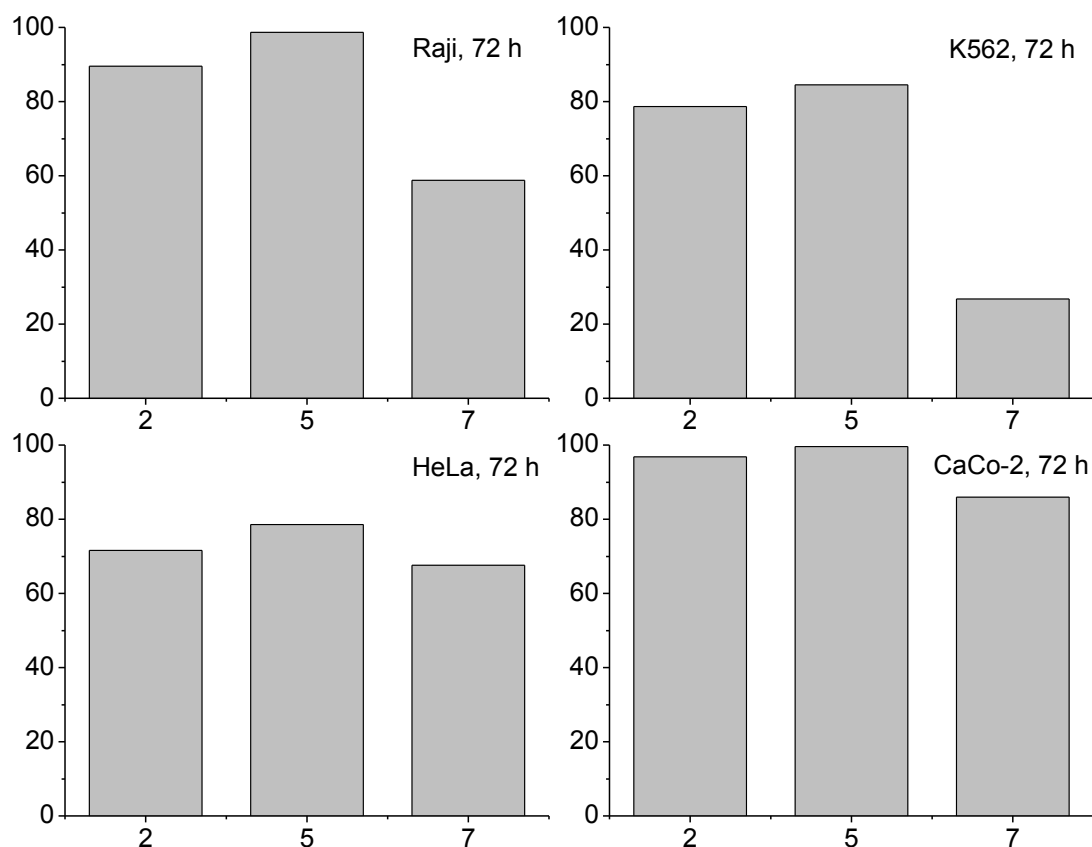
Citostatska ispitivanja *in vitro* novosintetiziranih spojeva **2**, **5** i **7** provedena su na staničnim tumoskim linijama porijeklom iz čovjeka: HeLa (adenokarcinom vrata maternice), CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva), Raji (Burkittov limfom) i K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi) (Tablica 18). Citotoksičnost 10^{-4} M spojeva određena je MTT testom nakon 72 sata izlaganja stanica.

Spoj **7** pokazao je umjerenu aktivnost prema svim staničnim linijama (Slika 22).

Tablica 12. Citotoksičan učinak novosintetiziranih spojeva **2**, **5** i **7** (10^{-4} M) *in vitro*

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

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



Slika 2. Citotoksičan učinak novosintetiziranih spojeva **2**, **5** i **7** na stanične tumorske linije porijeklom iz čovjeka

4.6. Ispitivanje interakcije spoja **7** s *ct*-DNA UV/Vis i fluorimetrijskim titracijama

Spoju **7** spektroskopski je ispitana interakcija s *ct*-DNA kako bi se dobili preliminarni rezultati o mogućim mehanizmima njegovog antitumorskog djelovanja. Matična otopina spoja priređena je u DMSO, a njegove spektroskopske karakteristike ispitane pri pH=7 u puferskoj otopini BPE (6,0 mM Na₂HPO₄; 2,0 mM NaH₂PO₄ i 1,0 mM EDTA).

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

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

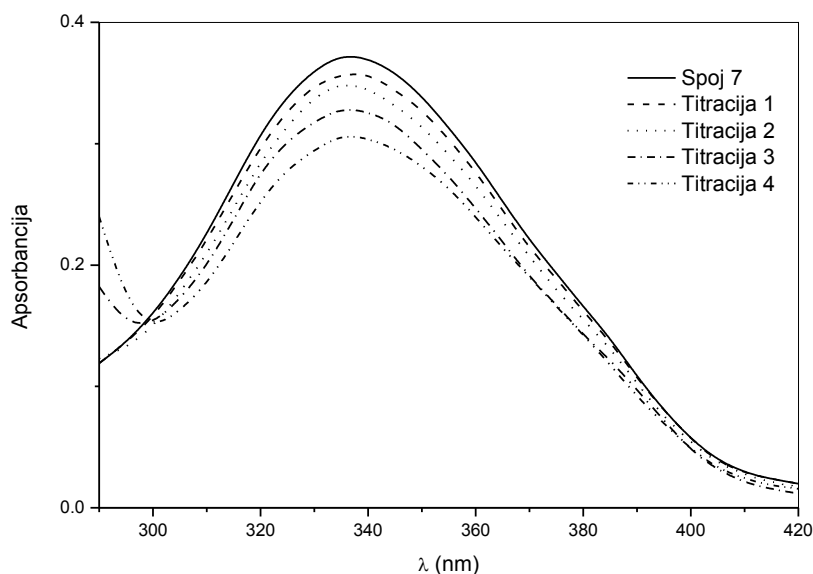
U tablici 13. prikazane su specifične UV promjene nastale prilikom titracije spoja **7** s *ct*-DNA.

	7
$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	336
H (%) ^a	18
$\Delta\lambda$ ^b	2

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

Tablica 13. Specifične UV promjene nastale prilikom titracije spoja **7** s *ct*-DNA

Iz titracijske krivulje spoja **7** te krivulja ovisnosti apsorbancije o dodanoj količini *ct*-DNA (Slika 3), vidljivo je da tijekom titracije s *ct*-DNA dolazi do smanjenja apsorbancije (hipokromni pomak) te do pomaka maksimuma prema većim valnim duljinama (batokromni pomak). Iz dobivenih titracijskih krivulja vidljiv je hipokromni pomak apsorpcijskih maksimuma, iz čega slijedi da se spoj **7** veže za *ct*-DNA kao interkalator.



Slika 3. UV/Vis spektar titracije spoja **7** ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s *ct*-DNA

Spoj **7** pokazao je citotoksičan učinak protiv K562 tumorskih staničnih linija pa se može pretpostaviti da je jedan od mehanizama njegovog biološkog djelovanja interkalativno vezanje za DNA.

5. ZAKLJUČCI

- Ključni prekursor za sintezu, *N*-4-benzoil-5-jodcitozin (**1**) pripremljen je jodiranjem *N*-4-benzoilcitozina.
- Derivati citozina s alkinilnim supstituentima u položaju C-5 (**2-4**) priređeni su Sonogashira-inom reakcijom, a *N*-heteroanulacijom *in situ* spoja **2** pripremljen je i pirola [2,3-d]pirimidinski derivat (**5**).
- *N*-4-benzoilcitozinski derivati s 1,2,3- triazolnim supstituentom u položaju *N*-1 (**7-9**) pripremljeni su Cu-kataliziranom "klik" reakcijom potpomognutom mikrovalovima *N*-1-propargilcitozina (**6**) i odgovarajućih azida.
- Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja derivata 5-jod-*N*-1-triazolilcitozina (**7**) s terminalnim alkil- i ariletinima uz Pd-katalizator i CuI sintetizirani su C-5 alkinilni derivati citozina (**10-11**).
- *N*-heteroanulacijom *in situ* C-5 alkinilnog citozinskog derivata (**10**) uz CuI i trietilamin pripremljen je C-6 supstituirani derivat 7-deazapurina (**12**).
- Strukturna karakterizacija novopripremljenih spojeva provedena je ¹H NMR spektroskopijom.
- Farmakološka djelovanja i moguće biološke mete predviđene su *in silico* analizom novopripremljenih spojeva.
- Citostatska ispitivanja *in vitro* novosintetiziranih spojeva **2**, **5** i **7** provedena su na tumorskim staničnim linijama porijeklom iz čovjeka HeLa, CaCo-2, Raji i K562. Spoj **7** pokazao je umjereno djelovanje protiv K562.
- UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom provedeno je ispitivanje vezivanja spoja **7** za *ct*-DNA, kako bi se utvrdio mogući mehanizam citostatskog djelovanja. Iz dobivenih titracijskih krivulja vidljivo je da se spoj **7** veže za *ct*-DNA.
- Kako je spoj **7** pokazao citotoksičan učinak protiv K562 tumorskih staničnih linija može se pretpostaviti da je jedan od mehanizama njegovog biološkog djelovanja interkalativno vezanje za DNA.

6. LITERATURA

1. <http://www.onkologija.hr/pocetna/>; pristupljeno 4.7.2015.(19:05)
2. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/>; pristupljeno 4.7.2015. (19:10)
3. Dorwin <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1011134488800095> - FN1 E.L.; Shaw A.A.; Hom K.; Bethel P.; Shetlart M.D. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1988 (2) 265.
4. K.M.J.; Lavigne-Nicolas J.; Cupples C.G. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1999 (429) 37.
5. Yuan B. *Advances in Clinical Chemistry* 2014 (67) 151.
6. http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/catalog/2076_7deaza_purines.html; pristupljeno: 15.04.2015., (20:44).
7. Dalal A.; Ella A.E.; Ghorab M.M.; Noaman E.; Helmy I. H.; Khalil I. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter* 2008 (16) 2391.
8. Sandip G. Agalave; Suleman R. Maujan; Vandana S. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem. Asian J*, 2011. (6) 2696 .
9. Raić-Malić S.; Meščić A. Recent Trends in 1,2,3-Triazolo-Nucleosides as Promising Anti-Infective and Anticancer Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 2015.
10. a) Pine, S.H. *Organic chemistry*. 1994., 796; b) S. Blewett, C. McGuigan, H. Barucki, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001 (20) 1063.
11. Van Rompay A.R.; Johansson M.; Karlsson A. *Pharmacol Ther.* 2000 (87) 189.
12. <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Cytosine>; pristupljeno 2.7.2015.(15:20)
13. Snoeck R.; Sakuma T; De Clercq E.; Rosenberg I.; Holy A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988, 1839.
14. Takada A.; Kamiya H.; Shuto S.; Matsuda A., Harashima H. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, 52.
15. Nanditha N.; Wataru K.; Smith M.A.; Abrol R.; Goddard III. W.A.; Reddy V.P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011 (21) 3957.
16. Chinchilla R.; Nájera C. *Chemical Reviews*. 2007 (107) 874.
17. a) Kosugi M.; Fugami K. *J. Organometall. Chem.* 2002 (653) 50; b) Hassan M. E. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1991 (56) 1944; c) Sonogashira K.; Tohda Y.; Hagihara N. *Tetrahedron Letters*. 1975 (50) 4467.

18. Batchu V. R.; Subramanian V.; Parasuraman K.; Swamy N. K.; Kumar S.; Pal M. *Tetrahedron*. 2005 (**61**) 9869.
19. Rostovtsev V. V.; Green L. G.; Fokin V. V.; Sharpless K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 2596.
20. Himo F.; Lovell T.; Hilgraf R.; Rostovtsev V. V.; Noodleman L.; Sharpless K. B.; Fokin V. V. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005 (**127**) 210.
21. Noori H. R.; Spanagel R. *In Silico Pharmacology*. 2013 (**1**) 1.
22. Murray D.; Doran P.; MacMathuna P.; Moss A. C.; *Molecular Cancer*. 2007 (**6**) 50.
23. <http://genexplain.com/pass>; pristupljeno: 25.4.2015. (11:22)
24. Karge H. G.; Weitkamp J. *Molecular sieves, Science and Technology, vol. 4, Springer* 1999, 340.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 21. listopada 1993. u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole Alojzija Stepinca u Zagrebu, upisala sam X. gimnaziju „Ivan Supek“, opći smjer. Maturirala sam 2012. godine s odličnim uspjehom i iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, preddiplomski studij Ekoinženjerstvo. Akademske godine 2014./2015., zajedno s Mande Miošić i Morisom Mihovilovićem dobila sam Rektorovu nagradu za rad pod naslovom Sinteza, strukturna karakterizacija i citostatska ispitivanja derivata citozina i 7-deazapurina.

Kao koautor posterske prezentacije sudjelovala sam na 24. Hrvatskom skupu kemičara kemijskih inženjera.