



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Dijana Saftić

**NOVI 1,4-DISUPSTITUIRANI
1,2,3-TRIAZOLNI DERIVATI PURINSKE I
PIRIMIDINSKE SERIJE:
SINTEZA I BIOLOŠKA EVALUACIJA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Dijana Saftić

**NOVEL 1,4-DISUBSTITUTED
1,2,3-TRIAZOLE DERIVATIVES OF THE
PURINE AND PYRIMIDINE SERIES:
SYNTHESIS AND BIOLOGICAL
EVALUATION**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Dijana Saftić

**NOVI 1,4-DISUPSTITUIRANI
1,2,3-TRIAZOLNI DERIVATI PURINSKE I
PIRIMIDINSKE SERIJE:
SINTEZA I BIOLOŠKA EVALUACIJA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Dr. sc. Biserka Žinić

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Dijana Saftić

**NOVEL 1,4-DISUBSTITUTED
1,2,3-TRIAZOLE DERIVATIVES OF THE
PURINE AND PYRIMIDINE SERIES:
SYNTHESIS AND BIOLOGICAL
EVALUATION**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Sc. Biserka Žinić

Zagreb, 2013.

Prvenstveno zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Biserki Žinić na neizmjerne podršci i pomoći u svakoj prilici, na korisnim savjetima i izuzetnoj pozitivnoj energiji koju je unijela u ovaj rad. Originalnim idejama i entuzijastičnim stavom uvijek je nesebično unosila istraživački zanos u svaki novi dan na čemu joj od srca zahvaljujem.

Veliko hvala prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac i svim članovima njene istraživačke grupe na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku na biološkim ispitivanjima koja su proveli s mojim spojevima. Posebno zahvaljujem dr. sc. Katarini Mišković na savjetima i pomoći kod pisanja biološkog dijela ove disertacije. Vjerujem da će naša suradnja i dalje biti plodonosna i uspješna, a na dosadašnjoj neizmjereno hvala.

Zahvaljujem i članovima povjerenstva, prof. dr. sc. Srđanki Tomić-Pisarović i dr. sc. Ivi Piantanidi na pomoći kod pisanja i oblikovanja ove disertacije. Korisnim savjetima doprinijeli su razvoju novih ideja za nastavak istraživanja iz ovog područja što ovaj rad čini još vrijednijim te im stoga neizmjereno zahvaljujem. Na pomoći i podršci zahvaljujem također i prof. dr. sc. Ines Primožič i prof. dr. sc. Miroslavu Bajiću.

Na višegodišnjoj uspješnoj suradnji posebno zahvaljujem dr. sc. Aleksandru Višnjevcu za izuzetan angažman u karakterizaciji kristalografskih struktura što je iznimno obogatilo ovaj rad. Vjerujem da će i budućnost donijeti nove izazove na obostrano zadovoljstvo.

Neizmjereno hvala svim članovima Centra za NMR na brojnim snimljenim strukturama i savjetima kod snimanja. Lidiji Brkljačić, dipl. ing. zahvaljujem za pomoć kod asignacije MS spektara i konstrukcionim savjetima za opis istih, a dr. sc. Marijani Radić Stojković i Tihomiru Pospišilu, dipl. ing. zahvaljujem za veliku pomoć kod obrade rezultata fluorescencijskih spektara.

Posebno zahvaljujem mojoj dragoj profesorici dr. sc. Jasni Vorkapić-Furač na neizmjerne podršci i ljubavi koju mi nesebično pruža sve ove godine. Svaki trenutak proveden s Vama novo je nadahnuće i poticaj za dalje. Uvijek me sjeti da svemu postoji smisao i ne nalazim prikladne riječi da njima dovoljno zahvalim za sve što sam od Vas primila. Od srca hvala.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju te Hamitu, Nataši, Luki i Josipi na nezaboravnim trenucima i poticajnoj radnoj atmosferi. Također zahvaljujem kolegama iz Laboratorija za fizikalno-organsku kemiju na susretljivosti i pomoći kod izvedbe prvih sinteza u mikrovalnom reaktoru, posebno dr. sc. Pavlu Trošelj i Anamariji Briš, dipl. ing.

Najviše zahvaljujem mojoj obitelji i Dadi na ljubavi, pomoći i potpori u svakom trenutku. Vaša prisutnost bila mi je najveći oslonac i snaga.

Cijeli rad posvećujem mom slikaru koji je neizmjereno vjerovao u svoju Dilku...HVALA TI TATA!

SADRŽAJ

SAŽETAK	X
ABSTRACT	XI
1. UVOD	1
1.1. Cilj i svrha rada	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Općenito o purinskim i pirimidinskim nukleotidima, nukleozidima i nukleobazama	3
2.2. Elektronska struktura purinskih i pirimidinskih nukleobaza	6
2.3. Reaktivnost purinskih i pirimidinskih nukleobaza	7
2.4. Paladijem katalizirane reakcije sinteze nukleozidnih analoga	9
2.4.1. Paladijevi spojevi, kompleksi i ligandi	11
2.4.1.1. Paladijevi kompleksi	11
2.4.1.2. Paladijevi ligandi	12
2.4.2. Paladijem katalizirane reakcije generiranja C-C veze u nukleozidnoj kemiji	13
2.4.2.1. Heckova reakcija	14
2.4.2.2. Stilleova reakcija	19
2.4.2.3. Suzuki-Miyaurina reakcija	24
2.4.2.4. Sonogashirina reakcija	29
2.5. Klik kemija	35
2.5.1. Cu(I) katalizirana azid-alkin 1,3-dipolarna cikloadicija (CuAAC)	37
2.5.1.1. Izvori bakra u CuAAC reakcijama	37
2.5.1.2. Mehanizam CuAAC reakcije	39
2.5.2. Trokomponentna Cu(I) katalizirana klik reakcija	41
2.5.3. CuAAC reakcije u nukleozidnoj kemiji	42
2.5.3.1. Modifikacije nukleozida u domeni nukleobaze	45
2.5.3.2. Modifikacije nukleozida u domeni šećera i nukleozidni biokonjugati	56
2.5.4. Primjena triazolnih nukleozidnih derivata	60
3. EKSPERIMENTALNI DIO	64
3.1. Materijali i metode	64
3.2. Priprava spojeva	68
3.2.1. Priprava C8 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata gvanozina	68
3.2.1.1. 2-Amino-8-bromo-9-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahydrofuran-2-il)-1H-purin-6(9H)-on (2); 8-bromgvanozin 2	68

3.2.1.2.	2-Amino-9-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-8-hidrazinil-1H-purin-6(9H)-on (3); 8-hidrazingvanozin 3.	69
3.2.1.2.1.	Metoda 1	69
3.2.1.2.2.	Metoda 2	70
3.2.1.3.	2-Amino-8-azido-9-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-1H-purin-6(9H)-on (4); 8-azidgvanozin 4.	71
3.2.1.4.	2-Amino-9-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-8-(4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-purin-6(9H)-on (5); 8-triazolilhidroksimetilgvanozin 5.	72
3.2.1.4.1.	Metoda 1	72
3.2.1.4.2.	Metoda 2	73
3.2.2.	Priprava C8 supsttuiranih 1,2,3-triazolnih derivata aciklovira	73
3.2.2.1.	2-Amino-8-bromo-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-1H-purin-6(9H)-on (7); 8-bromaciklovir 7.	73
3.2.2.2.	2-Amino-8-hidrazinil-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-1H-purin-6(9H)-on (8); 8-hidrazinaciklovir 8.	74
3.2.2.3.	2-Amino-8-azido-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-1H-purin-6(9H)-on (9); 8-azidaciklovir 9.	75
3.2.2.4.	2-Amino-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-8-[4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-1H-purin-6(9H)-on (10); 8-triazolilhidroksimetilaciklovir 10.	76
3.2.2.4.1.	Metoda 1	76
3.2.2.4.2.	Metoda 2	76
3.2.2.5.	2-Amino-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-8-[4-(3-hidroksipropil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-1H-purin-6(9H)-on (11); 8-triazolilhidroksipropilaciklovir 11.	77
3.2.2.6.	2-Amino-8-[4-(4-hidroksibutil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-1H-purin-6(9H)-on (12); 8-triazolilhidroksibutilaciklovir 12.	78
3.2.2.7.	2-(Prop-2-inil)izoindolin-1,3-dion (13); N-propargilftalimid 13.	79
3.2.2.8.	2-[[1-(2-Amino-9-((2-hidroksietoksi)metil)-6-okso-6,9-dihidro-1H-purin-8-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]izoindolin-1,3-dion (14); 8-triazolilftalimidaciklovir 14.	80
3.2.3.	Priprava C5 supsttuiranih 1,2,3-triazolnih derivata uracila	81
3.2.3.1.	5-Jodopirimidin-2,4(1H,3H)-dion (16); 5-joduracil 16.	81
3.2.3.2.	5-[2-(Trimetilsilil)etinil]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (17); 5-TMS-etiniluracil 17.	82
3.2.3.3.	5-Etinilpirimidin-2,4(1H,3H)-dion (18); 5-etiniluracil 18.	83
3.2.3.4.	[4-(2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]metil pivalat (19); 5-triazoliluracil derivat 19.	84
3.2.3.4.1.	Metoda 1	84
3.2.3.4.2.	Metoda 2	85
3.2.3.5.	5-(1H-1,2,3-Triazol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (20); 5-triazoliluracil derivat 20.	86
3.2.3.6.	Metil 2,3-O-izopropiliden-β-D-ribofuranozid (22); derivat šećera 22.	87
3.2.3.7.	Metil 2,3-O-izopropiliden-5-O-p-toluensulfonil-β-D-ribofuranozid (23); tosilni derivat šećera 23.	87

3.2.3.8.	<i>Metil 2,3-O-izopropiliden-5-azido-β-D-ribofuranozid (24); šećerni azid 24.</i>	88
3.2.3.9.	<i>5-[1-[1-(6-Metoksi-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (25); 5-triazoliluracil derivat 25.</i>	89
3.2.3.9.1.	<i>Metoda 1</i>	89
3.2.3.9.2.	<i>Metoda 2</i>	90
3.2.3.9.3.	<i>Metoda 3</i>	90
3.2.3.10.	<i>5-[1-[1-(3,4-Dihidroksi-5-metoksi-tetrahidrofuran-2-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (26); 5-triazoliluracil derivat 26.</i>	91
3.2.3.11.	<i>5-[1-[1-(3,4,5-Trihidroksi-tetrahidrofuran-2-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (27); 5-triazoliluracil derivat 27.</i>	92
3.2.3.12.	<i>Etil 2-[4-(2,4-dioksa-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]acetat (28); 5-triazoliluracil derivat 28.</i>	93
3.2.3.13.	<i>5-[1-(2-Hidroksietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (29); 5-triazoliluracil derivat 29.</i>	94
3.2.3.14.	<i>5-(1-Benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (30); 5-triazoliluracil derivat 30.</i>	95
3.2.3.15.	<i>Benzil 2-[4-(2,4-dioksa-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]acetat (31); 5-triazoliluracil derivat 31.</i>	96
3.2.3.16.	<i>5-[1-(2-Metoksietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (32); 5-triazoliluracil derivat 32.</i>	97
3.2.3.17.	<i>5-[1-(6-Ferocetil-6-oksoheksil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (33); 5-triazoliluracil derivat 33.</i>	98
3.2.4.	Priprava N-1-sulfoniluracilnih C5 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata	99
3.2.4.1.	<i>{4-[1-(5-Bromotiofen-2-ilsulfonyl)-2,4-dioksa-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1H-1,2,3-triazol-1-il}metil pivalat (34); 5-triazoliluracil derivat 34.</i>	99
3.2.4.1.1.	<i>Metoda 1</i>	99
3.2.4.1.2.	<i>Metoda 2</i>	100
3.2.4.2.	<i>1-(5-Bromotiofen-2-ilsulfonyl)-5-(1H-1,2,3-triazol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (35); 5-triazoliluracil derivat 35.</i>	101
3.2.4.3.	<i>1-Tosyl-5-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dione (36); 5-triazoliluracil derivat 36.</i>	102
3.2.4.3.1.	<i>Metoda 1</i>	102
3.2.4.3.2.	<i>Metoda 2</i>	103
3.2.4.4.	<i>Etil 2-[4-(1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioksa-1-tosilpirimidin-5-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]acetat (37); 5-triazoliluracil derivat 37.</i>	103
3.2.4.5.	<i>5-[1-(2-Hidroksietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1-tosilpirimidin-2,4(1H,3H)-dion (38); 5-triazoliluracil derivat 38.</i>	104
3.2.4.6.	<i>5-(1-Benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1-(5-bromotiofen-2-ilsulfonyl)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (39); 5-triazoliluracil derivat 39.</i>	105

3.2.4.7.	5-(1-Benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1-(tiofen-2-ilsulfonyl)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (40); 5-triazoliluracil derivat 40	107
3.2.4.8.	Benzil 2-(4-(1,2,3,4-tetrahidro-2,4-diokso-1-tosilpirimidin-5-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetat (41); 5-triazoliluracil derivat 41	108
3.2.5.	Priprava C5 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata uridina	109
3.2.5.1.	1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-jodopirimidin-2,4(1H,3H)-dion (43); 5-joduridin 43	109
3.2.5.2.	1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-[2-(trimetilsilil)etnil]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (44); 5-TMS-etniluridin 44	110
3.2.5.3.	1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-etnilpirimidin-2,4(1H,3H)-dion (45); 5-etniluridin 45	111
3.2.5.4.	1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-Dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-[1-[(3aS,4R,6R,6aS)-6-metoksi-2,2-dimetil-tetrahidrofuro(3,4-d)(1,3)dioksol-4-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (46); 5-triazoliluridin derivat 46	112
3.2.5.5.	1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-Dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-[1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroksi-5-metoksi-tetrahidrofuran-2-il)metil]-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (47); 5-triazoliluridin derivat 47	113
3.2.5.6.	{4-[1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-Dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1H-1,2,3-triazol-1-il}metil pivalat (48); 5-triazoliluridin derivat 48	115
3.2.5.7.	1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-5-(1H-1,2,3-triazol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (49); 5-triazoliluridin derivat 49	116
3.2.5.8.	Etil 2-[4-[1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1H-1,2,3-triazol-1-il]acetat (50); 5-triazoliluridin derivat 50	117
3.2.5.9.	5-(1-Benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (51); 5-triazoliluridin derivat 51	119
3.2.5.10.	5-[1-(6-Ferocetil-6-oksoheksil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (52); 5-triazoliluridin derivat 52	120
3.2.5.11.	Benzil 2-[4-[1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1H-1,2,3-triazol-1-il]acetat (53); 5-triazoliluridin derivat 53	122
3.2.5.12.	Metil 2-[4-[1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1H-1,2,3-triazol-1-il]acetat (54); 5-triazoliluridin derivat 54	123
3.2.5.13.	1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-Dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-[1-(2-metoksietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (55); 5-triazoliluridin derivat 55	124
3.3.	Određivanje protutumorske aktivnosti 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata purinske i pirimidinske serije	126
4.	REZULTATI I RASPRAVA	127
4.1.	Uvod	127
4.2.	C8 supstituirani 1,2,3-triazolni derivati gvanozina i aciklovira	128
4.2.1.	Sinteza azida i 1,3-dipolarne cikloadicijske reakcije gvanozina i aciklovira	131

4.2.2.	<i>NMR spektri 1,2,3-triazolnih derivata gvanozina i aciklovira</i>	137
4.2.3.	<i>Rezultati protutumorske aktivnosti 1,2,3-triazolnih derivata aciklovira</i>	142
4.2.4.	<i>Odnos strukture i biološke aktivnosti 1,2,3-triazolnih derivata aciklovira</i>	147
4.3.	<i>C5 supstituirani 1,2,3-triazolni derivati uracila i uridina</i>	148
4.3.1.	<i>Sinteza alkinskih prekursora i 1,3-dipolarne cikloadicijske reakcije</i>	149
4.3.2.	<i>NMR spektri spojeva uracilne i uridinske serije</i>	160
4.3.3.	<i>Rezultati protutumorske aktivnosti spojeva uracilne i uridinske serije</i>	164
4.3.4.	<i>Odnos strukture i biološke aktivnosti C5 supstituiranih triazolnih derivata uracilne i uridinske serije</i> ..	171
4.4.	<i>N-1-sulfoniluracilni C5 supstituirani 1,2,3-triazolni derivati</i>	174
4.4.1.	<i>Metode sinteze C5-triazolnih N-1-sulfoniluracilnih derivata</i>	174
4.4.2.	<i>Priprava N1' slobodnih C5-triazolnih N-1-sulfoniluracilnih derivata</i>	177
4.4.3.	<i>NMR spektri C5-triazolnih N-1-sulfoniluracilnih derivata</i>	186
4.4.4.	<i>Protutumorska aktivnost C5-triazolnih N-1-sulfoniluracilnih derivata u usporedbi s uracilnom i uridinskom serijom</i>	186
5.	ZAKLJUČAK	192
6.	LITERATURNI IZVORI	197
7.	DODATAK	XII
8.	POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ	XXXVII
9.	ŽIVOTOPIS	XL



Novi 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati purinske i pirimidinske serije: sinteza i biološka evaluacija

DIJANA SAFTIĆ

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

U okviru istraživanja protutumorskih spojeva iz skupine „malih molekula” s ciljem dobivanja boljih bioloških učinaka u tretiranju tumorskih stanica sintetizirani su 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati; gvanozina i aciklovira (**5**, **10–12** i **14**), uracila (**19**, **20** i **25–33**), *N*-1-sulfoniluracila (**34–41**) i uridina (**46–55**). Pronađena je nova metoda sinteze nestabilnog 8-hidrazingvanozina **3** u mikrovalnom reaktoru (MR) koji je zatim uz NaN_3 preveden u 8-azidgvanozin **4** i na njemu su ispitani uvjeti za Cu(I) kataliziranu 1,3-dipolarnu cikloadiciju (CuAAC) s terminalnim alkinskim alkoholima. Metoda je primijenjena na sintezu 1,2,3-triazolnih derivata aciklovira (**10–12** i **14**). U svrhu pripreve triazolnih C5 modificiranih pirimidinskih derivata, Sonogashira reakcijom sintetizirani su 5-etiniluracil **18** i 5-etiniluridin **45** (MR), azidi su generirani *in situ* iz alkil-halogenida i NaN_3 ili je upotrijebljen 5-azido šećer **24**, te su CuAAC reakcijama u odličnim iskorištenjima dobiveni derivati uracila (**19**, **25–28**, **30–33**), a u mikrovalnom reaktoru derivati uridina (**46–48**, **50–53**, **55**). Kondenzacijom 1,4-disupstituiranih C5-triazolnih derivata uracila (**19**, **28–31**) uz DBU i sulfonil kloride pripremljeni su odgovarajući *N*-1-sulfoniluracilni derivati (**34**, **37–39** i **41**) u dobrim iskorištenjima, dok kondenzacijom N1' nesupstituiranog triazolnog derivata **20** nastaju **35** i **36** u tragovima. Antiproliferativno djelovanje 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata ispitano je na osam staničnih linija (MDCK, HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562, Jurkat, HuT 78 i Raji) te je detaljno analizirana korelacija strukture i biološke aktivnosti.

(210 stranica, 66 slika, 55 shema, 8 tablica, 292 literaturna izvora, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Ulica hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: uracil, uridin, *N*-sulfoniluracil, klik reakcija, 1,2,3-triazol, protutumorska aktivnost

Mentor: Dr. sc. Biserka Žinić, v. zn. sur., IRB, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović, red. prof.

Dr. sc. Biserka Žinić, v. zn. sur., IRB, izv. prof.

Dr. sc. I. Piantanida, zn. savj., IRB

Rad prihvaćen: 9. rujna 2013.



Novel 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazole Derivatives of the Purine and Pyrimidine Series: Synthesis and Biological Evaluation

DIJANA SAFTIĆ

Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

As a part of investigation aimed to identify new small molecules with improved biological properties in the *in vitro* screening for antitumor activity the 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole derivatives of guanosine, acyclovir (**5**, **10–12**, and **14**), uracil (**19**, **20**, and **25–33**), *N*-1-sulfonyl uracil (**34–41**) and uridine (**46–55**) were prepared. New synthetic method for preparation of unstable 8-hydrazine guanosine **3** by using microwave reactor (MR) was developed. Product **3** was converted into 8-azido guanosine **4** in the reaction with NaN_3 . The latter compound was used in numerous experiments directed to find optimal reaction conditions for Cu(I) catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition reaction (CuAAC) with terminal alkynols. By the latter method 1,2,3-triazole acyclovir derivatives (**10–12**, and **14**) were prepared. In order to prepare C5-triazolyl pyrimidine derivatives starting 5-etynyl uracil **18** and 5-etynyl uridine **45** (MR) derivatives were synthesized using Sonogashira coupling; the azides were generated *in situ* from alkyl halogenides and NaN_3 or 5-azido sugar **24** was used. By subsequent CuAAC reaction the C5-triazolyl uracil (**19**, **25–28**, **30–33**) and uridine (**46–48**, **50–53**, **55**) (MR) derivatives were prepared in excellent yields. Condensation reaction of 1,4-disubstituted C5 triazole uracil derivatives (**19**, **28–31**) with DBU and sulfonyl chlorides gave the respective *N*-1-sulfonyl uracil derivatives (**34**, **37–39**, and **41**) in very good yields, while condensation reaction with N1' unsubstituted triazole derivative **20** resulted with only trace amounts of **35** and **36**. All 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole derivatives were tested for the antiproliferative activity on the panel of eight cell lines (MDCK, HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562, Jurkat, HuT 78, and Raji), and detailed analysis of structure/activity relationship (SAR) was presented.

(210 pages, 66 figures, 55 schemes, 8 tables, 292 references, original in Croatian)

Thesis is deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Ulica hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: uracil, uridine, *N*-sulfonyl uracil, click reaction, 1,2,3-triazole, antitumor activity

Supervisor: Dr. sc. Biserka Žinić, Senior Research Associate, IRB, Associate Professor

Reviewers: Dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović, Professor

Dr. sc. Biserka Žinić, Senior Research Associate, IRB, Associate Professor

Dr. sc. I. Piantanida, Senior Scientist, IRB

Thesis accepted: September 09th, 2013.

1. UVOD

1.1. Cilj i svrha rada

Tijekom posljednjeg desetljeća na Institutu Ruđer Bošković, naša grupa intenzivno radi na dizajnu, sintezi i biološkoj procjeni pirimidinskih derivata koji sadrže sulfonamidne farmakofore. Dizajnirani su i sintetizirani novi *N*-sulfonilpirimidinski derivati koji su pokazali snažnu antiproliferativnu aktivnost u *in vitro* uvjetima, a istovremeno su efekti na normalne stanice bili puno manje izraženi.^{1,2} Pokazano je da *N*-sulfonilpirimidinski derivati inhibiraju sintezu DNA, RNA i proteina, a neki od njih su pokazali i mogućnost indukcije apoptoze u tretiranim tumorskim stanicama.^{3,4} *In vivo* eksperimenti su pokazali da *N*-sulfonilpirimidinski derivati imaju značajnu protutumorsku aktivnost na modelu mišjeg mamarnog karcinoma,⁵ a provedena su i dodatna ispitivanja mehanizma djelovanja ovih spojeva^{6,7} i toksikološka ispitivanja.

Dobro je poznato da su *N*-sulfonilna skupina kao i triazolni prsten strukturno prisutni u mnogim lijekovima, pa su stoga i važni farmakofori u dizajnu i razvoju novih terapeutika. Isto tako, u fokusu istraživanja novih lijekova već su nekoliko godina C5 supstituirani pirimidinski i C8 supstituirani purinski derivati. Karakterizira ih širok spektar biološke aktivnosti kako u terapiji virusnih bolesti tako i u terapiji tumora.^{8,9,10,11,12,13} Mogućnosti primjene tako modificiranih derivata nukleozida, odnosno strukturno promijenjenih oligonukleotidnih sekvenci su nebrojene, a širi pregled dan je u literaturnom dijelu ove disertacije.

Istraživanje provedeno u okviru ove doktorske disertacije predstavlja nastavak istraživanja na citostaticima iz skupinâ „malih molekula”, a osnovni cilj dokorskog rada je konstrukcija dodatnog farmakofora triazola na različitim položajima nukleobaza odnosno nukleozida i proučavanje bioloških odgovora u *in vitro* uvjetima.

Dizajnirana je sinteza novih C8-triazolnih derivata purinskih nukleobaza, C5-triazolnih derivata pirimidina i odgovarajućih *N*-1-sulfonilpirimidina, odnosno nukleozida. Za sintezu triazolnih derivata upotrijebljena su saznanja iz klik kemije (*engl. click chemistry*), kao novog pristupa u organskoj sintezi inspiriranog prirodnim procesima nastanka heteroatomskih veza kod biomolekula. U tu svrhu:

- sintetizirani su 8-azido derivati gvanozina i aciklovira za Cu(I) kataliziranu 1,3-dipolarnu cikloadiciju s različitim terminalnim alkinima i pripremu 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata gvanozina i aciklovira
- sintetizirani su 5-etinil derivati uracila i uridina te su ispitani i optimirani reakcijski uvjeti Cu(I) katalizirane 1,3-dipolarne cikloadicije:
 - a) s *in situ* pripremljenim azidima za sintezu C5 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata uracila i uridina
 - b) s 5-azido ribozom za sintezu C-nukleozida uracila/uridina kod kojih je C5 položaj pirimidina povezan triazolnom premosnicom [preko C4'(C4''), N1'(N1'')] položaja triazola] s C5 položajem riboze
- ispitane su metode kondenzacije C5 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata sa sulfonil kloridima za sintezu 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata *N*-1-sulfoniluracila

Razvijene su učinkovite metodologije za sintezu ciljanih spojeva: paladij(II) katalizirane reakcije kondenzacije, klik kemija, multi-komponentne reakcije, sinteza u mikrovalnom reaktoru.

Strukture priređenih derivata purina i pirimidina potvrđene su spektroskopskim metodama (1D i 2D NMR, FTIR, UV, HRMS), a u određenim slučajevima rendgenskom kristalografijom i ESI-MS studijom.

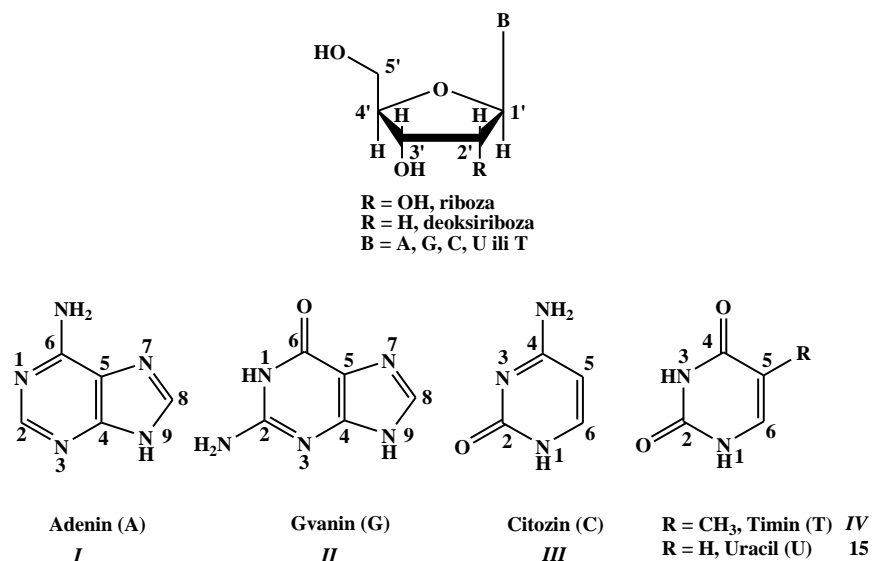
U svrhu provjere čistoće pripremljenih spojeva kako bi bili pogodni za biološka testiranja razvijene su i gradijentne HPLC metode.

Novi derivati su sustavno testirani (MTT test) na humanim normalnim stanicama, izabranim stanicama leukemija, limfoma i čvrstim tumorskim stanicama u *in vitro* pokusima i detaljno je analizirana korelacija strukture i biološke aktivnosti novih triazolnih derivata nukleobaza i nukleozida.

2. LITERATURNI PREGLED

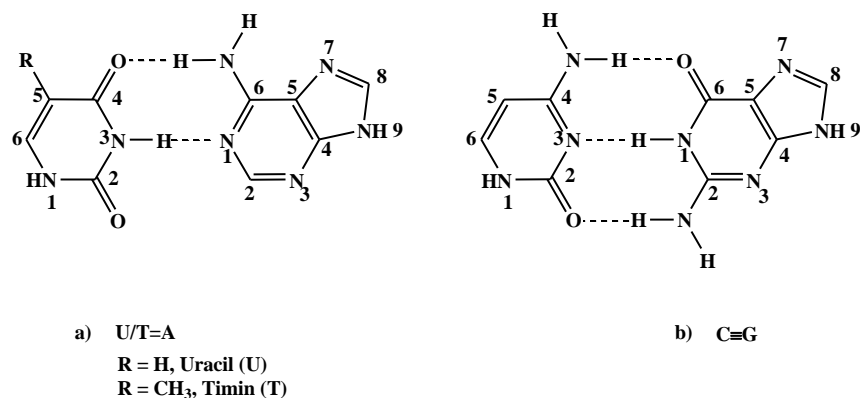
2.1. Općenito o purinskim i pirimidinskim nukleotidima, nukleozidima i nukleobazama

Nukleotidi su fosfatni esteri nukleozida koji se sastoje od šećerne podjedinice, riboze (β -D-ribofuranoze) u slučaju RNA ili deoksiriboze (2'-deoksi- β -D-ribofuranoze) u molekuli DNA te purinske odnosno pirimidinske baze. Šećerna podjedinica je vezana na purinsku odnosno pirimidinsku bazu β -N-glikozidnom vezom između anomernog C-atoma šećera (C1') i N9 atoma imidazalnog prstena purinske baze odnosno N1 atoma pirimidinske baze (Slika 1).



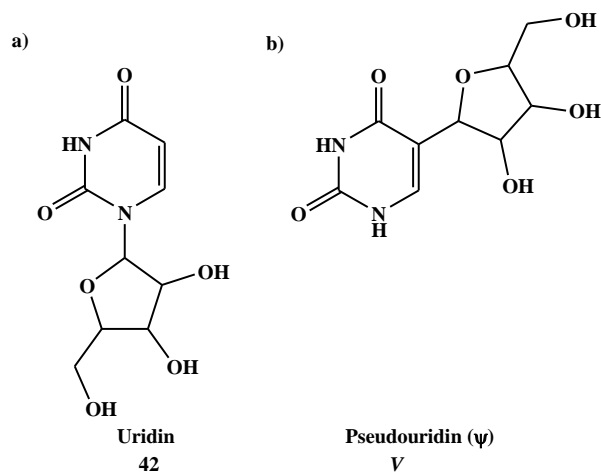
Slika 1. Strukture nukleozida.

Purinske baze koje izgrađuju molekulu DNA su adenin (A) **I** i gvanin (G) **II** te pirimidinske citozin (C) **III** i timin (T) **IV**. Molekulu RNA također izgrađuju spomenute baze, ali je timin (T) zamijenjen uracilom (U) **15**. Unutar lanca nukleinskih kiselina nukleobaze su međusobno povezane vodikovim vezama po principu komplementarnosti. Komplementarne baze kod DNA su A i T te G i C, a kod RNA A i U te G i C. Nukleobaze gvanin i citozin povezane se preko tri vodikove veze (G≡C) pa su stabilnije od para baza adenin-timin/uracil koje su povezane preko dvije vodikove veze (A=T/U) (Slika 2).



Slika 2. Sparivanje komplementarnih nukleobaza; a) uracil/timin=adenin (U/T=A) i b) citozin≡gvanin (C≡G).

Nukleozidi su podijeljeni u dvije osnovne skupine i to N-nukleozide i C-nukleozide. Prvu skupinu karakterizira veza između C1' atoma šećera (anomernog centra) i N-atoma baze (N1 pirimidina odnosno N9 purina) (npr. uridin **42**) dok je u drugoj skupini nukleozida prisutna veza između C1' atoma šećera i C-atoma purinske odnosno pirimidinske baze (npr. pseudouridin **V**) (Slika 3).

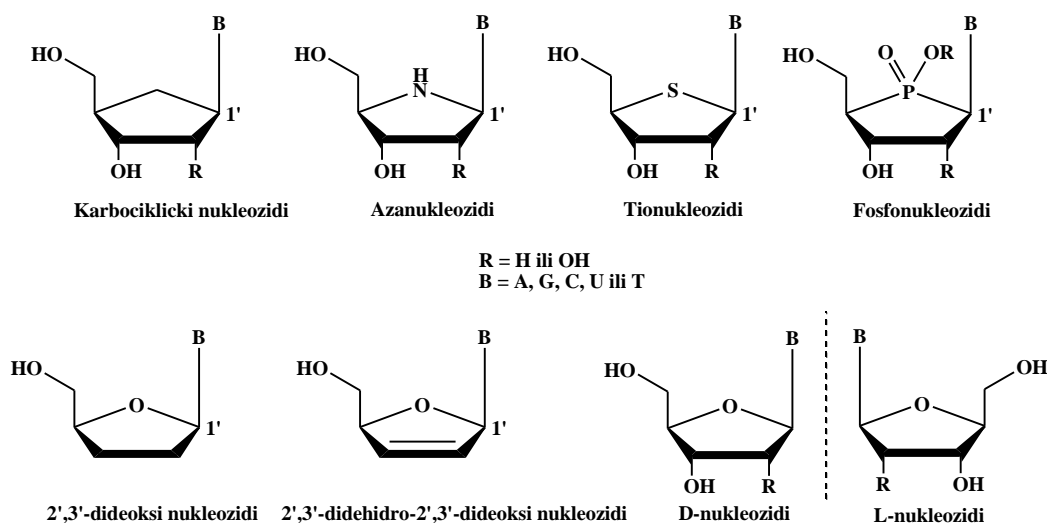


Slika 3. Primjer: a) N-nukleozida i b) C-nukleozida.

Obje strukturne podjedinice nukleozida (šećer i nukleobaza) podložne su modifikacijama. Promjene šećernog dijela molekule nukleozida uključuju modifikacije supstituenata na šećeru i/ili zamjenu atoma kisika furanskog prstena nekim drugim atomom. Pored toga što uzrokuju kemijske i fizikalne promjene svojstava molekula, takve strukturne modifikacije mogu dovesti i do konformacijskih promjena molekula te značajno utjecati na biološku aktivnost kao i

toksičnost spojeva. Supstitucijom atoma kisika furanskog prstena ugljikom ili nekim drugim heteroatomom kao što su dušik, sumpor ili fosfor nastaju tzv. karbociklički, aza-, tio- odnosno fosfo- nukleozidi (Slika 4). Karbociklički nukleozidi (karbanukleozidi) kod kojih je D-riboza zamijenjena nekim ciklopentanskim sustavom manje su podložni hidrolizi kataliziranoj fosforilazama, uglavnom imaju veću biološku stabilnost i manje su toksični.¹⁴

Uklanjanjem 2'-OH skupine nastaju 2'-deoksi, a uklanjanjem 2'- i 3'-OH skupina 2',3'-dideoksi derivati nukleozida dok dodatnom redukcijom C2'-C3' kovalentne veze nastaju 2',3'-didehidro-2',3'-dideoksi nukleozidni analozi (Slika 4).



Slika 4. Primjeri modifikacija nukleozida u domeni šećera.

Osim prirodno prisutnih D-nukleozida sintetizirani su i njihovi enantiomeri, L-nukleozidi (Slika 4). Oni nisu supstrati za prirodne enzime sisavaca, ali ih uspješno prepoznaju virusni odnosno bakterijski enzimi. Upravo je tako postignuta minimalna toksičnost uz istovremenu dobru antivirusnu/antibakterijsku aktivnost. Ova skupina nukleozida pokazala je izvrsne biološke rezultate potencijalnih anti HIV (krat. HIV, engl. *Human Immunodeficiency Virus*) spojeva.¹⁵

Posebnu skupinu modificiranih nukleozida čine izonukleozidi, a karakterizira ih to što je purinska odnosno pirimidinska baza vezana na šećer preko C2' ili C3' atoma, a ne preko anomernog centra. Takvim premještanjem heterocikličke baze tzv. „nova” glikozidna veza manje je podložna enzimskoj hidrolizi.¹⁵

Osim spomenutih, nukleozidi kod kojih šećerna podjedinica ima dva heteroatoma unutar prstena, posebno diokso-¹⁶ i oksotio-¹⁷ nukleozidi pokazali su značajan potencijal kao antivirusni agensi.¹⁸

S druge strane, aciklički nukleozidi u svojoj strukturi uopće nemaju šećernu podjedinicu odnosno ona je zamijenjena acikličkim supstituentima. Prvi aciklički nukleozidni derivat, strukturni analog gvanozina koji se pokazao kao selektivni inhibitor replikacije Herpes simplex virusa (HSV) je aciklovir **6**.^{19,20} Njegova izvanredna klinička učinkovitost kao antivirusnog agensa potaknula je veliko zanimanje općenito za acikličke nukleozide.^{15,21}

Osim transformacija šećernog dijela molekule nukleozida široko područje znanstvenog interesa zauzima i kemija nukleozidnih analoga kod kojih su provedene transformacije u domeni heterocikličkih baza. Ta kemija objedinjuje vrlo široki spektar nukleozidnih derivata koji pokrivaju iznimno veliko područje terapijske primjene.

Zahvaljujući velikom interesu za ovo područje kemije razvijene su brojne sintetske metode pripreme nukleozidnih analoga. Poseban doprinos očit je u razvoju niza novih metodologija generiranja veze ugljik-ugljik što je rezultiralo sintezama velikog broja novih derivata, kako nukleozidnih tako i općenito.

2.2. Elektronska struktura purinskih i pirimidinskih nukleobaza

Pirimidinske nukleobaze izgrađuje šesteročlani prsten s dva atoma dušika, a purinske se sastoje od dva kondenzirana prstena - pirimidinskog i imidazolnog (*Slika 1*). Nukleobaze imaju trigonalne sp^2 hibridizirane atome. Dušikovi atomi koji su povezani s tri druga atoma σ -vezama sudjeluju s dva p-elektrona u π -elektronskom sustavu prstena i nemaju nevezanih, n-orbitala. Takvi su atomi N1 i N-atom egzocikličke amino skupine citozina, N1 i N3 atomi uracila i timina te N9 i N-atom egzocikličkih amino skupina adenina i gvanina i N1 atom gvanina. Dušikov atom koji je povezan s dva druga atoma σ -vezama (N3 atom citozina, N1 adenina te N3 i N7 atomi adenina i gvanina) sudjeluje samo s jednim p-elektronom u π -elektronskom sustavu i ima dva elektrona u neveznoj orbitali. Kisikovi atomi zbog keto-enolne tautomerije mogu, kod enola, stvarati dvije σ -veze i tada sudjeluju s dva p-elektrona u aromatskom sustavu i imaju dva

elektrona u neveznoj orbitali. U slučaju keto tautomera stvara se jedna σ -veza, jedan p-elektron ulazi u aromatski sustav, a po dva elektrona nalaze se u dvije nevezne orbitale.

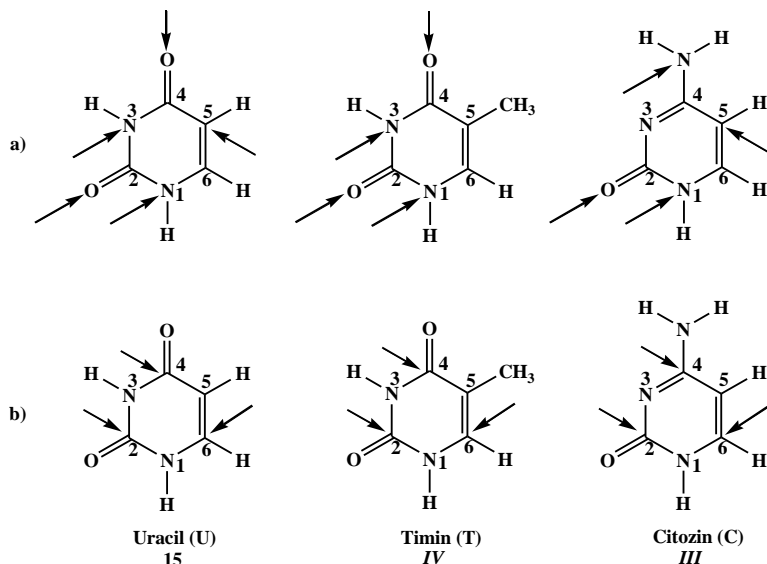
Atomi koji sudjeluju s dva elektrona u zajedničkom π -elektronskom sustavu imaju smanjenu elektronsku gustoću tj. pozitivan parcijalni naboj (δ^+) dok atomi koji sudjeluju samo s jednim p-elektronom u aromatskom sustavu imaju dva elektrona u neveznoj orbitali i time negativan parcijalni naboj (δ^-).

2.3. **Reaktivnost purinskih i pirimidinskih nukleobaza**

U reakcijama s elektrofilnim reagensima najreaktivniji su atomi s najvećom elektronskom gustoćom kao što je položaj C5 pirimidinskih baza dok u reakcijama s nukleofilnim reagensima najveću reaktivnost imaju atomi s najmanjom gustoćom elektrona (C2, C4 i C6 položaji pirimidina).

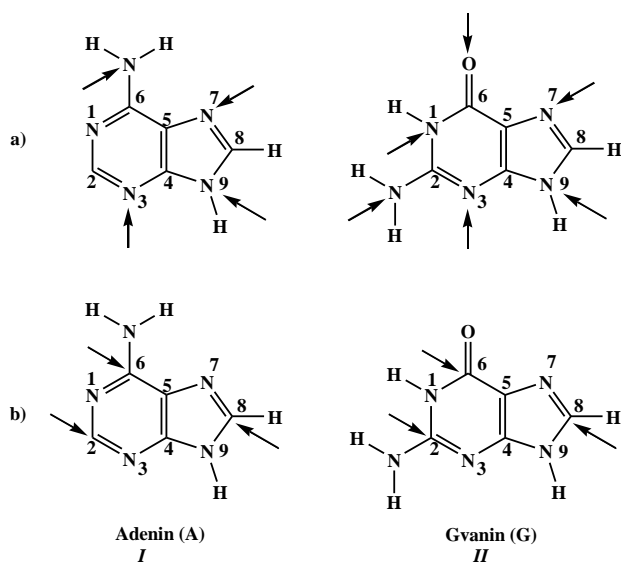
Karakteristične reakcije pirimidinskih baza su reakcije supstitucije i adicije.

Elektrofilnoj supstituciji podliježu protoni u položaju N1 i N3, proton u položaju C5 te protoni amino skupine na C4 položaju citozina. Zahvaljujući keto-enolnoj tautomeriji moguća je i elektrofilna supstitucija protona na enolnim kisikovim atomima u položaju C2 i C4 (*Slika 5*). Nukleofilnoj supstituciji podliježu položaji C2, C4 i C6 pirimidinskih baza (*Slika 5*). Reakcije adicije na C5, C6 dvostruku vezu pirimidinskog prstena mogu biti elektrofilne, nukleofilne i radikalske.²²



Slika 5. a) Reaktivnost pirimidinskih nukleobaza: a) aktivna mjesta za elektrofile; b) aktivna mjesta za nukleofile.

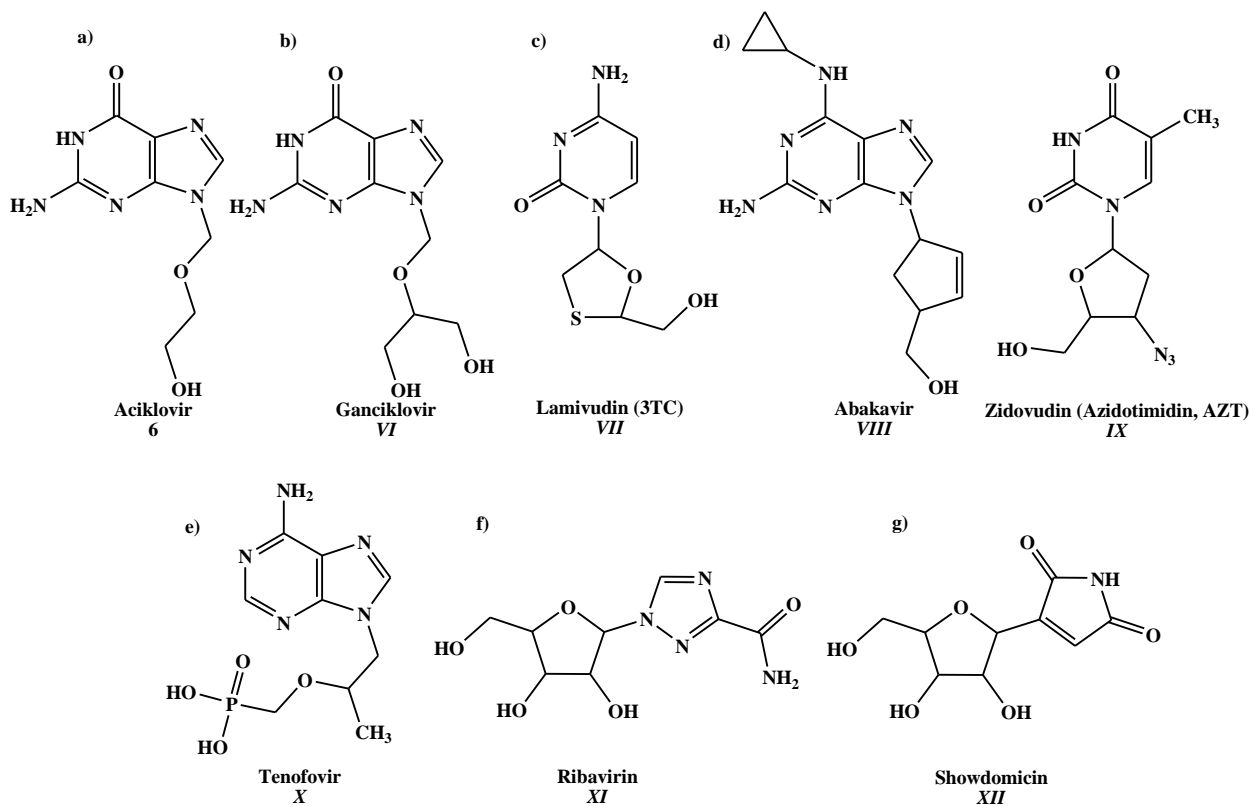
Kod purinskih baza elektrofilnoj supstituciji podložni su položaji N3 i N7, proton u položaju N1 gvanina, N9 adenina i gvanina te protoni egzocikličkih amino skupina. Elektrofilna supstitucija također je moguća i na enolnom atomu kisika na položaju C6 gvanina opet zbog keto-enolne tautomerije (Slika 6). Nukleofilnoj supstituciji podliježu atomi u položajima C2, C6 i C8, a dvostruka veza C4, C5 inertna je na adiciju (Slika 6).



Slika 6. a) Reaktivnost purinskih nukleobaza: a) aktivna mjesta za elektrofile; b) aktivna mjesta za nukleofile.

2.4. Paladijem katalizirane reakcije sinteze nukleozidnih analoga

Kada je 1953. objavljen model DNA kao dvostruke uzvojnice te objašnjen princip genetskog koda i uloga nukleinskih kiselina u stanicama, ispitivanje biološke aktivnosti nukleozida i njihovih fosforiliranih derivata postalo je fundamentalno i neiscrpno područje znanstvenog interesa. Poseban poticaj razvoju istraživanja omogućilo je i razumijevanje metaboličkih procesa nukleozidnih derivata u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Uz rast zanimanja za ovu skupinu spojeva rođena je i ideja o mogućoj metaboličkoj interferenciji s drugim biokemijskim procesima te je tada postalo jasno da će ovi spojevi naći primjenu i kao lijekovi. Prvi radovi iz ovog područja bili su usredotočeni na transformaciju ili nukleobaze vezane na neki prirodno prisutan šećer ili je transformacija provedena samo na šećernoj komponenti prirodnog nukleozida. Tek 1974. godine otkrićem prvog primjenjivog antivirusnog lijeka aciklovira **6**^{19,20} interes se proširio i na spojeve u kojima se nukleobaza i šećerna komponenta značajno razlikuju od prirodnih struktura te je otkriveno da neki od njih imaju antitumorsku, antivirusnu i/ili antibakterijsku aktivnost (Slika 7).



Slika 7. Primjeri biološki aktivnih nukleozidnih derivata.

Na Slici 7 prikazani su različiti biološki aktivni derivati nukleozida u terapijskoj primjeni: a) aciklovir **6**, inhibitor HSV-a i Varicella zoster virusa (VZV);^{19,20} b) ganciklovir **VI**, inhibitor citomegalovirusa (CMV);²⁰ c) lamivudin (3TC) **VII**, derivat u terapiji kroničnog hepatitisa B (anti HBV);²⁰ d) abakavir **VIII** i zidovudin (ATZ) **IX**, anti HIV spojevi, nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze;²⁰ e) tenofovir **X**, anti HIV spoj, nukleotidni inhibitor reverzne transkriptaze;²⁰ f) ribavirin **XI**, derivat u antivirusnoj terapiji DNA i RNA virusa;^{23,24,25,26} g) showdomicin **XII**, nukleozidni antibiotik u terapiji oboljenja uzrokovanih nekim Gram-pozitivnim bakterijama.^{27,28}

U potrazi za novim nukleozidnim derivatima koji bi također bili u kliničkoj primjeni razvijene su brojne metode njihove sinteze. Tako je posljednjih godina intenzivno razvijeno područje primjene paladijem kataliziranih reakcija adicija i supstitucija. Još šezdesetih godina prošlog stoljeća otkrivena je Heckova reakcija^{29,30,31} generiranja veze ugljik-ugljik, ali je njena primjena intenzivirana tek osamdesetih godina kada su Bergstrom i sur. objavili nekoliko radova u kojima opisuju reakcije povezivanja nukleozida s alilnim halidima,³² olefinskim spojevima³³ i alilnim kloridima, alkoholima i acetatima.³⁴ Od tada se Heckova reakcija intenzivno upotrebljava u sintezama nukleozidnih analoga, posebno u reakcijama modifikacija C5 položaja pirimidinskog prstena odnosno C2, C6 ili C8 položaja purinskog prstena. Devedesetih godina Heckova se reakcija počela primjenjivati i u sintezi ranije spomenutih C-nukleozida.³⁵ Druga metoda Pd(0) katalizirane reakcije aliliranja, tzv. Tsuji-Trostova reakcija također je pokazala veliki potencijal zbog široke primjene i relativno jednostavnih reakcijskih uvjeta.³⁰ Već su 1988. godine Trost i sur.³⁶ objavili prvi primjer direktne supstitucije heterocikličke baze na karbociklu kataliziranu paladijem gdje je prikazana sinteza prirodnog karbocikličkog nukleozida aristeromicina.

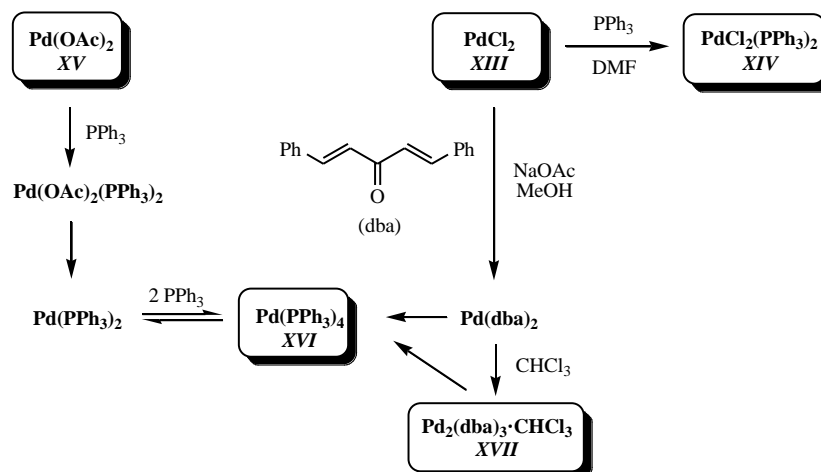
Paladijem katalizirane reakcije mogu se provoditi i s različitim organometalnim spojevima kao što su organokositreni (Stille),^{30,37} organocinkovi (Negishi),³⁸ organosilicijevi (Hiyama)³⁹ ili organoborovi (Suzuki).³⁰

2.4.1. Paladijevi spojevi, kompleksi i ligandi

Paladij odnosno njegovi spojevi koji se primjenjuju u organskoj sintezi postoje u tri oksidacijska stanja; Pd(0), Pd(II) i Pd(IV), a njihovoj interkonverziji možemo zahvaliti široki spektar primjene paladija u organskoj kemiji. Pd(0) kompleksi su vrlo nestabilni nukleofili koji se lako oksidiraju do Pd(II). Najveća sintetska primjena Pd(0) očituje se u oksidativnoj adiciji arilnih, vinilnih ili alilnih halogenida ili triflata na Pd(0) što se koristi kod pripreve heterocikla. Pd(II) kompleksi iznimno su značajni u području organopaladijeve kemije. Oni su tipični elektrofilni topljivi u većini organskih otapala i stabilni na zraku zbog čega se njima lako rukuje i ne zahtijevaju posebne uvjete čuvanja. Najčešći organski supstrati za Pd(II) su elektronima bogate specije kao što su olefini, alkini i areni.

2.4.1.1. Paladijevi kompleksi

Brojni Pd(II) kompleksi opće formule PdCl_2L_2 relativno se jednostavno priređuju iz PdCl_2 **XIII** i odgovarajućeg liganda L. Za potrebe izrade ove disertacije također je priređen Pd(II) kompleks s PPh_3 kao ligandom otapanjem u dimetilformamidu (DMF) uz zagrijavanje i dodatkom PdCl_2 pri čemu hlađenjem kristalizira željeni kompleks, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, bis(trifenilfosfin)paladij(II) diklorid (**XIV**).^{40,41} Oligomerna struktura $[\text{PdCl}_2]_n$, inače slabo topljiva u vodi i organskim otapalima, može se razoriti te se upravo tako formira kompleks PdCl_2L_2 . Osim PdCl_2 široku primjenu u sintezi ima također i paladijev spoj $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ **XV**, koji jednostavnom redukcijom s reducirajućim agensima (npr. metalni halogenidi NaBH_4 , LiAlH_4 , alkeni, alkoholi ili terciarni amini) uz prisutnost fosfinskog liganda *in situ* daje $\text{Pd}(0)(\text{R}_3\text{P})_n$ (R = Me, Ph). Fosfin također i sam može biti reducirajući agens te tako tretiranjem $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ odgovarajućim ekvivalentom PPh_3 nastaje Pd(0) specija i fosfin-oksid. U Pd(II) kataliziranim reakcijama često se primjenjuju i kompleksi s organskim nitrilima kao što su $\text{PdCl}_2(\text{RCN})_2$ (R = Me, Ph).⁴² Komercijalno su dostupna dva Pd(0) kompleksa; $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, tetrakis(trifenilfosfin)paladij(0) (**XVI**) i $\text{Pd}_2\text{dba}_3 \cdot \text{CHCl}_3$, tris(dibenzilidenacetone)dipaladij (**XVII**) (*Shema 1*).



Shema 1. Sintetski putevi priprave Pd(0) kompleksa **XVI** i **XVII** te Pd(II) kompleksa **XIV**.

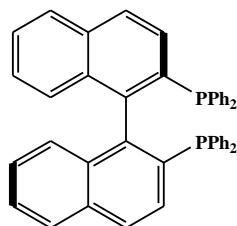
Na Shemi 1 prikazana je i mogućnost prevođenja jednog Pd(0) kompleksa u drugi. Kompleks **XVII** gdje je atom paladija koordiniran na olefinску vezu dibenzilidenacetona (*dba*) može se prevesti u PdL_n (L je obično fosfinski ligand) reakcijom izmjene liganada u otopini.

Što se tiče Pd(IV) kompleksa oni su vrlo rijetki (poznato je nekoliko primjera)⁴³ i slabo istraženi. Iako postoje primjeri prisutnosti prijelaznih Pd(IV) specija kao intermedijera u paladijem kataliziranim reakcijama čini se kako je uloga Pd(IV) u π -olefinskoj i π -alkinskoj kemiji sinteze heterocikla vrlo mala.

2.4.1.2. Paladijevi ligandi

Kao ligandi u paladijevima kompleksima često se upotrebljavaju fosfini. Najviše se koristi PPh_3 , ali i AsPh_3 i tri(2-furil)fosfin koji također mogu ubrzati transmetalacijski stupanj primjerice Sonogashirine reakcije. Pogodan ligand u katalitičkim reakcijama povezivanja je i tri(4-metilfenil)fosfin [$\text{P}(o\text{-tol})_3$]. Važnu ulogu u nekim reakcijama imaju i kelatni bidentatni fosfinski ligandi kao što su 1,2-bis(difenilfosfin-etan) (*dppe*), 1,3-bis(difenilfosfin-propan) (*dppp*) i 1,4-bis(difenilfosfin-butan) (*dppb*). Vrsta difosfinskog liganda može značajno utjecati na reakciju no još uvijek nije razjašnjeno na koji način. Značajni ligandi paladijevih kompleksa u asimetričnoj sintezi su kiralni fosfini, a posebice oni s binaftilnom okosnicom. Najzastupljeniji organofosforni kiralni ligand u asimetričnoj sintezi je 2,2'-bis(difenilfosfin)-1,1'-binaftil (BINAP) (Slika 8).^{44,45} Ligandi BINAP-tipa, unatoč velikoj zastupljenosti u asimetričnoj sintezi, nisu dali

zadovoljavajuće rezultate u Pd(0) kataliziranim reakcijama alilne supstitucije, a posebno desimetrizacije mezo-spojeva.



Slika 8. Strukturna formula BINAP liganda.

2.4.2. Paladijem katalizirane reakcije generiranja C-C veze u nukleozidnoj kemiji

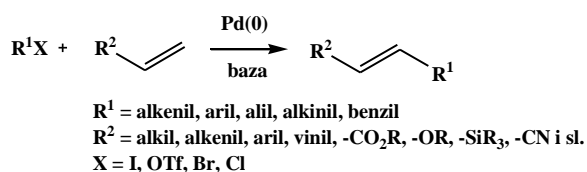
Osnovni razlog za veliku upotrebu paladija u sintezi je širok spektar strukturnih transformacija generiranjem nove veze ugljik-ugljik kao i to što se paladijevi kompleksi koriste u katalitičkim količinama što je važno kako s ekonomskog tako i s ekološkog stajališta. Također, za razliku od većine kompleksa prijelaznih metala (rutenij, rodij, molibden), kompleksi na bazi paladija nisu ekstremno osjetljivi na vlagu, kisik i kiseline pa su eksperimentalni uvjeti za izvođenje ovih reakcija relativno jednostavni. Kao što je u prethodnom poglavlju navedeno, u paladijem kataliziranim reakcijama povezivanja mogu se koristiti paladijevi kompleksi sa širokom paletom liganada, a u Tablici 1 prikazane su najčešće reakcije povezivanja primijenjene u kemiji nukleozida.

Tablica 1. Pregled najvažnijih reakcija povezivanja u nukleozidnoj kemiji.

Reakcijska shema	Vrsta transformacije	Naziv reakcije
$\text{RPdX} + \text{C}\equiv\text{C} \longrightarrow \text{R}-\text{C}(\text{C}\equiv\text{C})-\text{PdX}$	umetanje (karbopaladiranje)	Heckova
$\text{RPdX} + \text{CO} \longrightarrow \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{PdX}$	umetanje	Karboniliranje
$\text{RPdX} + \text{R}'\text{M} \longrightarrow \text{R}-\text{R}'$ <p>(X = I, Br, Cl, OTf, F, CN, OTs, OMs,...)</p>	transmetaliranje	M = -SnR ₃ → Stilleova M = -BX ₂ → Suzuki-Miyaurina M = -ZnX → Negishijeva M = -SiR ₃ → Hiyamina
	π-alilni kompleks	Tsuji-Trostova
$\text{RPdX} + \text{R}'-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H} \xrightarrow{\text{CuI}} \text{R}'-\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$	transmetaliranje Cu → Pd	Sonogashirina

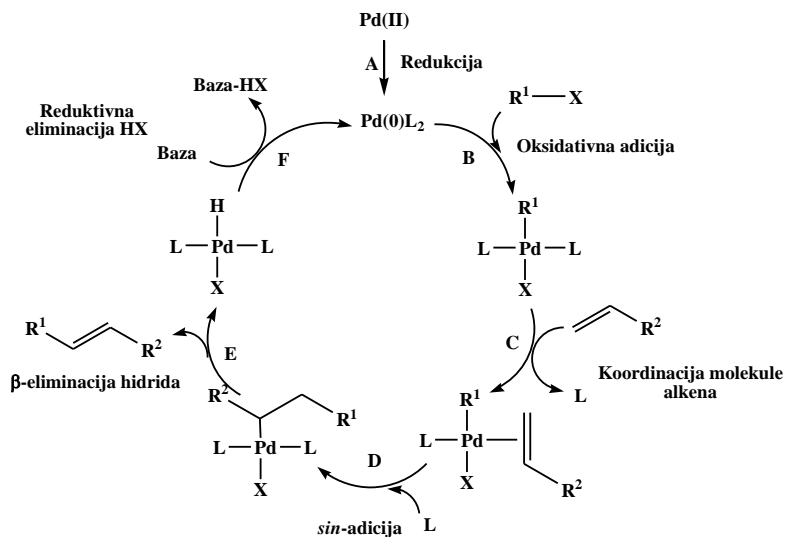
2.4.2.1. Heckova reakcija

Paladijem katalizirana reakcija generiranja veze ugljik-ugljik između arilnih/vinilnih halogenida i aktiviranih alkena uz prisutnost baze naziva se Heckova reakcija (sprezanje), a poznata je i pod nazivom Mizoroki-Heckova reakcija (*Shema 2*).^{30,31}



Shema 2. Opća shema Heckove reakcije.

Visoka kemoselektivnost i blagi reakcijski uvjeti čine ovu reakciju izuzetno korisnom i često primjenjivanom metodom u organskoj sintezi.⁴⁶ Osim toga, velika prednost Heckove reakcije je i tolerancija na niz funkcionalnih skupina; karboksilnih, esterskih, amidnih, karbonilnih, cijano, hidroksilnih, eterskih i amino koje tijekom reakcije ostaju očuvane. Opći mehanizam Heckove reakcije prikazan je Shemom 3.



Shema 3. Katalitički ciklus Heckove reakcije.

Prvi stupanj (A) je **redukcija** Pd(II) kompleksa do Pd(0) potrebnog za katalitički ciklus. Kao katalizatori se češće koriste Pd(II) soli [PdCl_2 *XIII* ili $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ *XV*] ili Pd(II) prekursori [$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ kompleks *XIV*] zbog nestabilnosti Pd(0) kompleksa. Iz tih soli se katalitički

aktivne vrste mogu generirati *in situ* u reakcijskoj smjesi djelovanjem otapala ili odgovarajućih liganada (npr. fosfina). Sljedeći stupanj u nizu je **oksidativna adicija (B)** halogenalkena ili halogenarena pri čemu nastaje σ -alkenilni ili σ -arilni paladijev(II) kompleks. Elektrofilitnost tog kompleksa je povećana te stoga **koordinira molekulu alkena (C)** u zamjenu za jedan svoj ligand. Ako su alkenilni (arilni) paladijev(II) kompleks i alken u *cis*-orijentaciji, rotacijom alkena postiže se koordinacija u ravnini, nakon čega slijedi ***sin*-adicija (D)** σ -alkenil- ili σ -aril-paladijeve veze na dvostruku C-C vezu, čime nastaje σ -[(β -aril)alkil]-paladijev kompleks. Zatim dolazi do **β -eliminacije hidrida (E)**, koja se događa nakon završetka interne rotacije oko novonastale veze. Naime, da bi došlo do eliminacije hidrida potreban je *sin*-periplanaran položaj vodika u odnosu na halogenopaladijev ostatak. **Reduktivna eliminacija HX (F)** iz halogenopaladijevog hidrida potpomaže se dodatkom baze te se tako regenerira aktivni katalizator za idući katalitički ciklus.

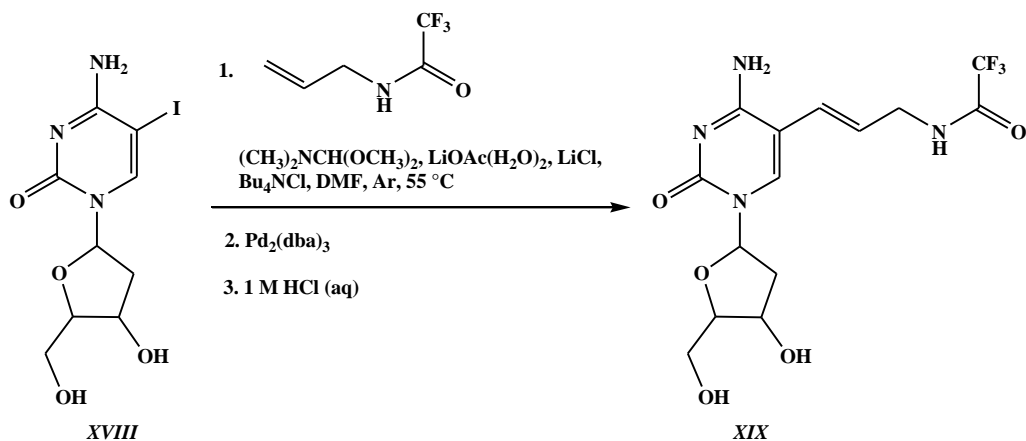
Stupanj koji uvjetuje brzinu Heckove reakcije je oksidativna adicija halogenalkena ili halogenarena na paladijev kompleks koja ovisi o prirodi odlazeće skupine (ArI > ArOTf > ArBr >> ArCl). Heckova se reakcija odvija u temperaturnom intervalu između 70 °C i 120 °C, a najčešća otapala su aprotična kao što su heksametilfosforamid (HMPA), DMF, CH₃CN i *N*-metil-2-pirolidon (NMP). Ulogu otapala može imati i alken ili organska baza koji se dodaju u suvišku, a ponekad se reakcije mogu provoditi i u alkoholima ili čak vodi.^{47,48}

Što se tiče baza, upotrebljavaju se tercijarni amini (najčešće Et₃N), a također i *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA) i *N,N*-dicikloheksilmetilamin (Cy₂NMe) te anorganske baze (NaHCO₃, NaOAc, Na₂CO₃).

Bergstrom i sur. još su 1982. godine⁴⁹ objavili opsežnu reviju o primjeni organometalnih intermedijera u sintezi C5 supstituiranih pirimidinskih nukleozida, a prvu reakciju povezivanja olefina i nukleozida objavili su davnih 70-ih godina.^{32,33,50} Ta metoda kasnije je primijenjena u nizu reakcija pripreme C5 pirimidinskih tioeterskih nukleozida,⁵¹ biotinom označenih DNA-proba,⁵² u reakcijama vezanja kompleksa željezo-EDTA s oligonukleotidom,⁵³ u reakcijama sinteze oligomera s tris(2,2'-bipiridin)rutenij(II),⁵⁴ reakcijama pripreme nukleozid-peptid konjugata⁵⁵ i u sintezi oligodeoksiribonukleotidnih metil-tioeterskih proba.⁵⁶

Shaughnessy i Cho⁵⁷ u svom su radu prikazali mogućnost primjene Heckove metode u reakcijama povezivanja 5-joduridina s alkenima u vodenom mediju i bez prisutnosti fosfina. Jedan od najnovijih primjera primjene Heckove reakcije je i sinteza 5-(*E*)-(3-

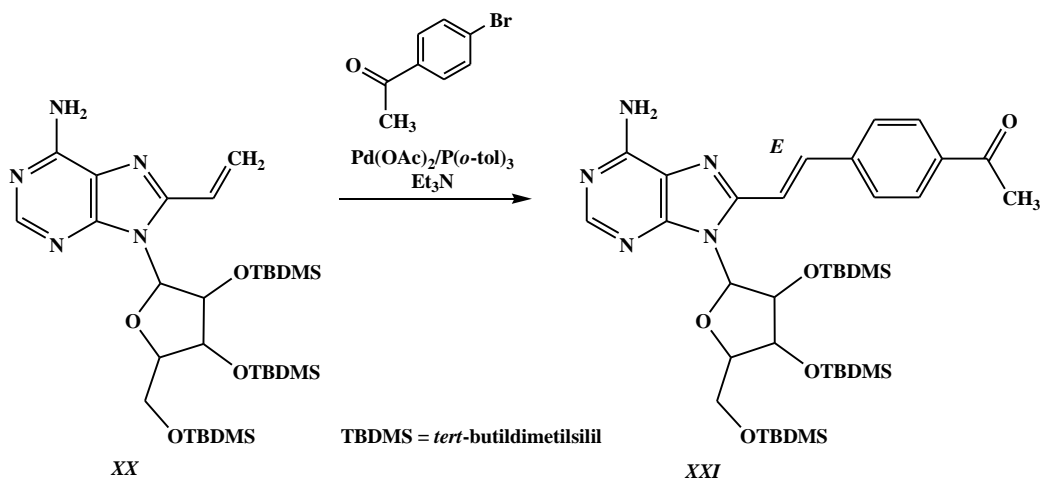
trifluoroacetamidoalil)-2'-deoksicitidina (**XIX**) u reakciji 5-jodo-2'-deoksicitidina (**XVIII**) i *N*-alil-2,2,2-trifluoro-acetamida (*Shema 4*).⁵⁸



Shema 4. Sinteza 2'-deoksicitidinskog derivata **XIX** u jednom reakcijskom stupnju (*engl. one-pot* reakcija).

Uklanjanjem trifluoroacetatne skupine nekonvencionalnom metodom metilaminom u etanolu iz derivata **XIX** dobiven je C5-alilamino modificirani nukleozidni analog kao važan intermedijer u sintezi amino-modificiranih nukleinskih kiselina.⁵⁹

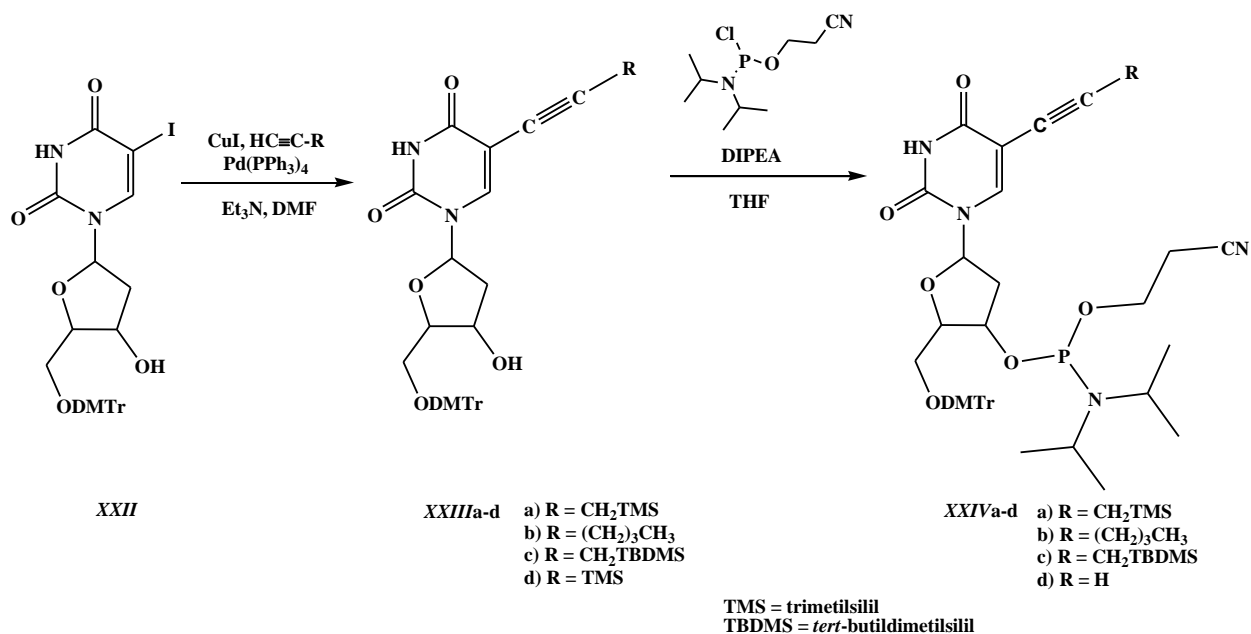
Osim primjera Heckove reakcije na pirimidinskim analogima metoda je primijenjena i u sintezi purinskih derivata. Jednostavan primjer arilacije C8-viniladeninskog nukleozida **XX** objavili su Lakshmana i sur. (*Shema 5*).⁶⁰ Koristili su široki spektar aril jodida i bromida, a katalizator reakcija generiran je *in situ* iz smjese $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{P}(o\text{-tol})_3/\text{Et}_3\text{N}$. Važno je istaknuti kako je u većini reakcija kao jedini produkt izoliran *trans* izomer dok je samo u nekim slučajevima opaženo i nastajanje *cis* izomera za što je predložen i odgovarajući mehanizam.



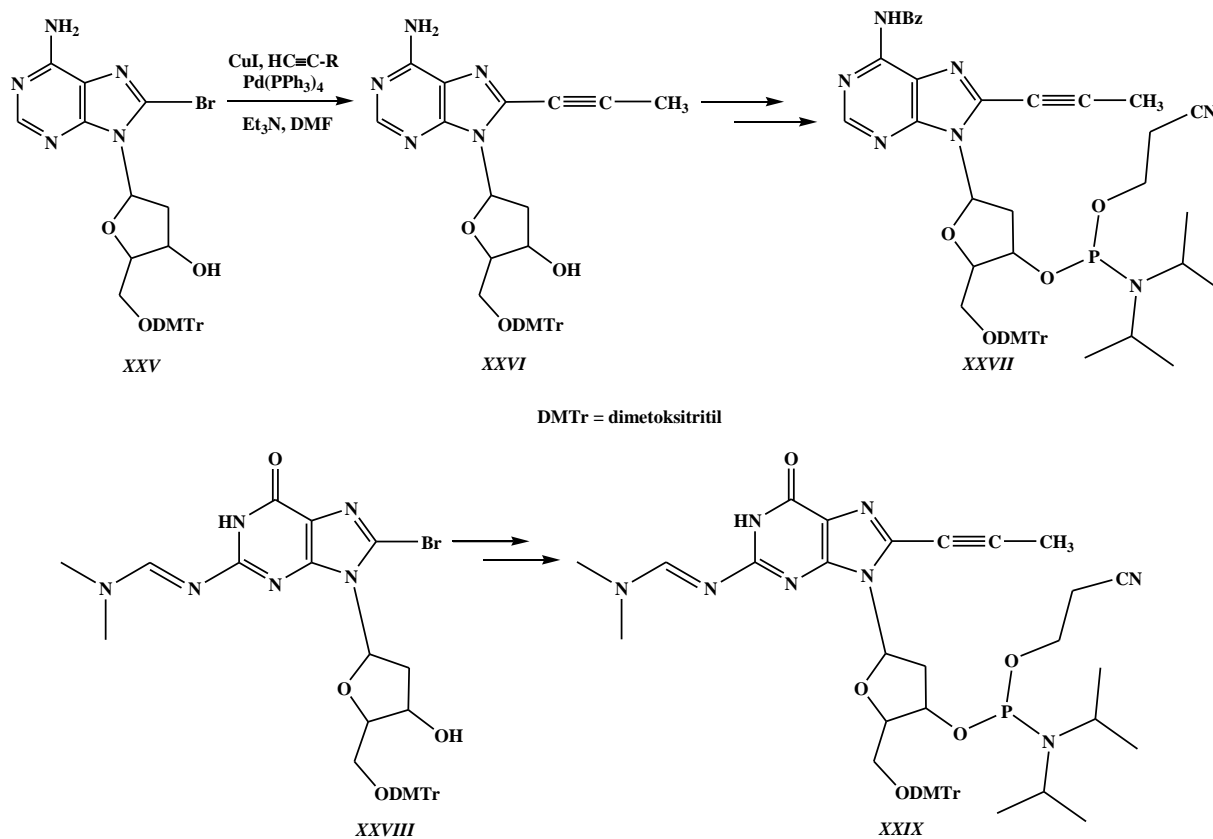
Shema 5. Primjer arilacije C8-viniladeninskog nukleozida **XX** i nastanak *trans* izomera **XXI**.

C8-viniladeninski nukleozid **XX** kao i njegov 2'-deoksi analog pripremljeni su Stilleovom metodom s tetravinilstananom ili tributil(vinil)stananom uz $\text{Pd(PPh}_3)_4$ **XVI** u DMF-u, NMP-u ili bezvodnom THF-u odnosno Suzuki-Miyaurinom metodom s kalijevim viniltrifluoroboratom uz PdCl_2 **XIII** i PPh_3 u smjesi THF/ H_2O .

Modifikacije C5 položaja pirimidina i C8 purina posebno su značajne i zbog mogućnosti ugradnje tako transformiranih struktura u ciljane sekvence oligonukleotidnog lanca DNA/RNA, a u svrhu povećanja stabilnosti uzvojnice. Primjena tako modificiranih oligonukleotidnih lanaca mogla bi biti korisna u terapiji baziranoj na tzv. „antisense” i antigenskoj strategiji. Primjenom Heckove metodologije Graham i sur.⁶¹ objavili su tako sintetske puteve pripreve serije C5 modificiranih 2'-deoksiuridinskih monomera **XXIVa-d** (Shema 6), 8-propinil-2'-deoksiadenozinskog **XXVII** i 2'-deoksigvanozinskog monomera **XXIX** (Shema 7) pogodnih za izgradnju modificiranih oligonukleotidnih sekvenci.



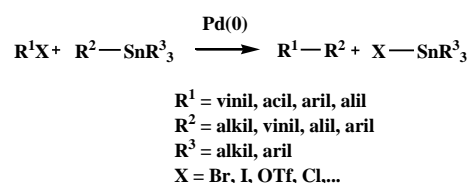
Shema 6. Opći sintetski put priprave 2'-deoksiuridinskih derivata **XXIVa-d**.



Shema 7. Opći sintetski put priprave 8-propinil-2'-deoksiadenozinskog monomera **XXVII** i analognog 2'-deoksigvanozinskog monomera **XXIX**.

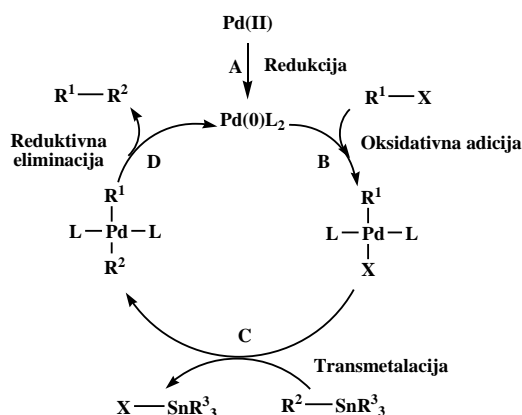
2.4.2.2. Stilleova reakcija

Migita-Kosugi-Stilleova reakcija sprežanja ili poznatija pod nazivom Stilleova reakcija³⁷ (Shema 8) je reakcija generiranja veze ugljik-ugljik u kojoj sudjeluju aril-, alkenil- ili alkilstanani i aril-/alkenil- halogenidi ili arendijazonijeve soli.



Shema 8. Opća shema Stilleove reakcije.

Opći mehanizam Stilleove reakcije prikazan je Shemom 9.

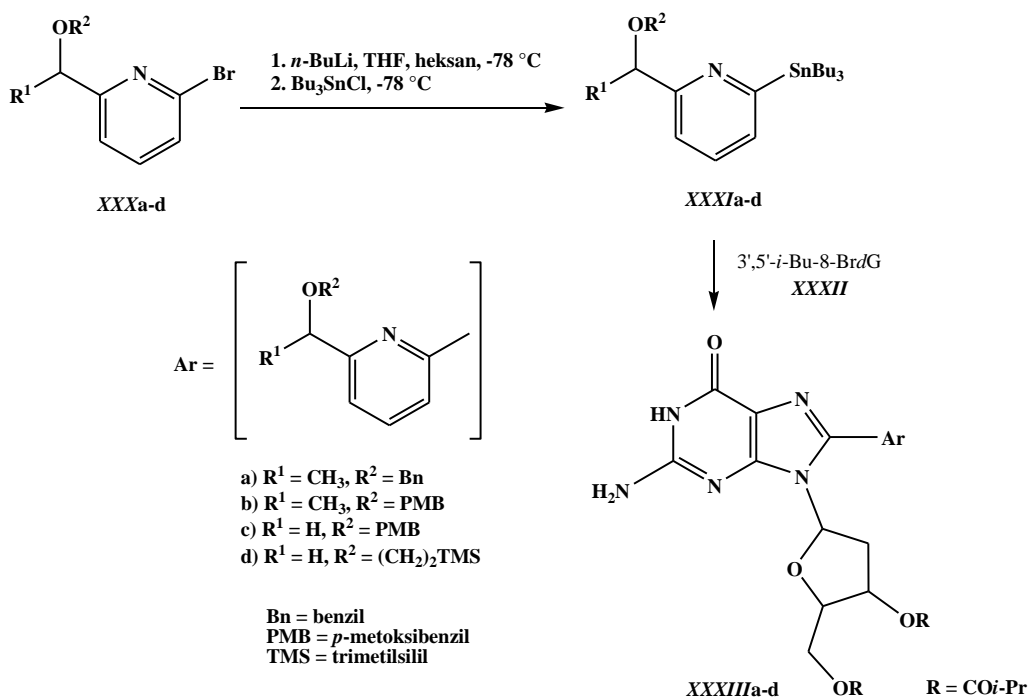


Shema 9. Katalitički ciklus Stilleove reakcije.

Prva dva stupnja katalitičkog ciklusa identična su ciklusu Heckove reakcije. Prvi stupanj (A) je **redukcija** Pd(II) kompleksa do Pd(0) kao katalitički aktivne specije, a drugi stupanj je **oksidativna adicija** (B) organohalogenida pri čemu nastaje *cis*-intermedijer. Nakon izomerizacije u *trans*-izomer slijedi stupanj **transmetalacije** (C) tj. organometalne reakcije koja uključuje transfer liganda s kositra na paladij i pri tom nastaje Pd(II) intermedijer. U zadnjem stupnju tj. **reduktivnom eliminacijom** (D) oslobađa se željeni produkt i aktivna Pd(0) specija za idući katalitički ciklus.

Odlazeća skupina uglavnom je halogen ili triflat, a općenito je u paladijem kataliziranim reakcijama aliliranja s alil-Bu₃Sn preferiran aril-bromid u odnosu na aril-jodid. Kositar, kao što

je vidljivo iz *Sheme 9*, povezan je s četiri supstituenta od kojih samo jedan sudjeluje u reakciji povezivanja. Kod nesimetričnih organostanana, kositar obično veže tri iste skupine [-CH₃, -(CH₂)₃CH₃], a četvrta je ona koja sudjeluje u reakciji. Najčešći katalizatori koji se koriste u Stilleovoj reakciji su Pd(PPh₃)₄ **XVI** kao Pd(0) i benzilbis(trifenilfosfin)paladij(II) klorid (BnPdCl(PPh₃)₂) kao Pd(II). Najčešće korišteni ligand je PPh₃, ali se upotrebljavaju i drugi ligandi (AsPh₃, tri(2-furil)fosfin, i dr.). Jedan noviji primjer primjene Stilleove reakcije arilacije C8 položaja derivata 8-bromgvanozina **XXXII** objavili su Hopley i sur.⁶² Katalizator Stilleove reakcije generiran je *in situ* iz Pd(OAc)₂ **XV** i *dppp* odnosno AsPh₃ kao liganda, a kao otapalo je poslužio NMP ili DMF (*Shema 10*).



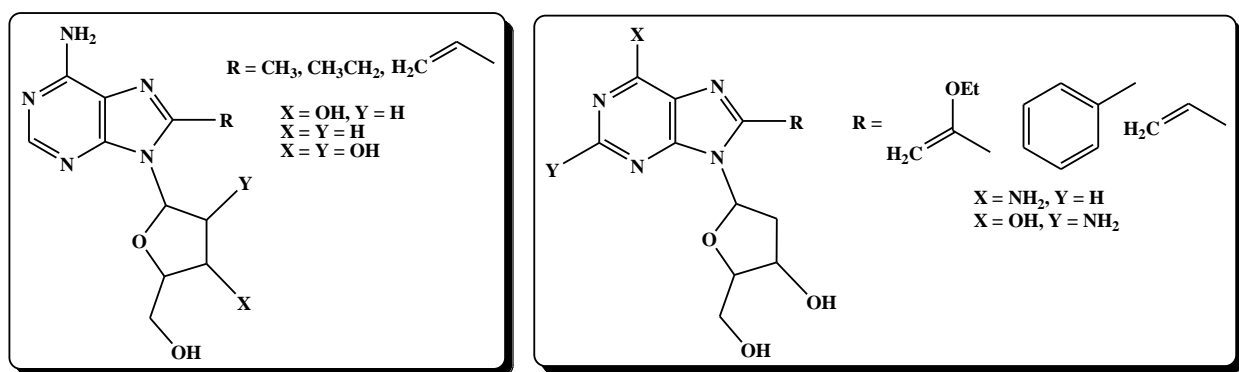
Shema 10. Sintetski put priprave 8-arilgvanozinskih derivata **XXXIIIa-d**.

Ovaj primjer je zanimljiv jer je poznato da se gvanin i njegovi derivati mogu samoorganizirati u makrocikličke sustave, planarne tetramere tzv. G-tetrade, a koje potom π -interakcijama tvore tzv. G-kvadruplekse. Dodatnom funkcionalizacijom tj. uvođenjem heteroaromatskih sustava u C8 položaj gvanina omogućeno je stvaranje dodatnih međumolekulskih vodikovih veza, a poznato je da funkcionalne skupine fenilnog prstena u C8 položaju omogućuju stvaranje supramolekularnog kompleksa znatno veće stabilnosti.⁶³ Modifikacije C8 položaja purinskih nukleozida (posebice

alkilacije) od posebnog su značaja i zato jer omogućuju promjenu *sin/anti* konformacije nukleozida.⁶⁴

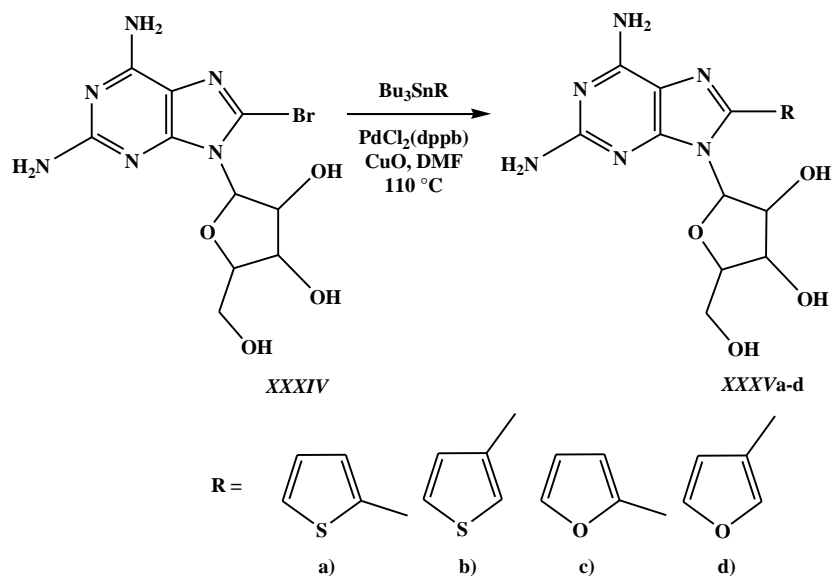
Osim NMP-a i DMF-a kao otapalo u Stilleovim reakcijama koristi se i DMSO, a reakcije se obično provode na temperaturi refluksa. Dodatak CuI odnosno CuO ili Cu₂O kao kokatalizatora pomaže transmetalaciji i to je zapravo stupanj koji određuje brzinu reakcije, a posebno je važan u reakciji gdje se koriste vrlo razgranati derivati organostanana. Jedna od prednosti Stilleove reakcije je tolerancija niza funkcionalnih skupina, a također i stabilnost i dostupnost organostatana.

Primjeri paladijem kataliziranih C8 alkilacija,⁶⁵ arilacija ili uvođenja alilnog⁶⁶ odnosno vinilnog^{65,66} supstituenta Stilleovom metodom sa simetričnim (R₄Sn) odnosno nesimetričnim (YSnR₃, Y= alil, vinil) organostananimi u kemiji adenzina i gvanozina poznati su još iz 90-ih godina (*Slika 9*).



Slika 9. Primjeri C8 supstituiranih purinskih derivata dobivenih Stilleovom metodom.

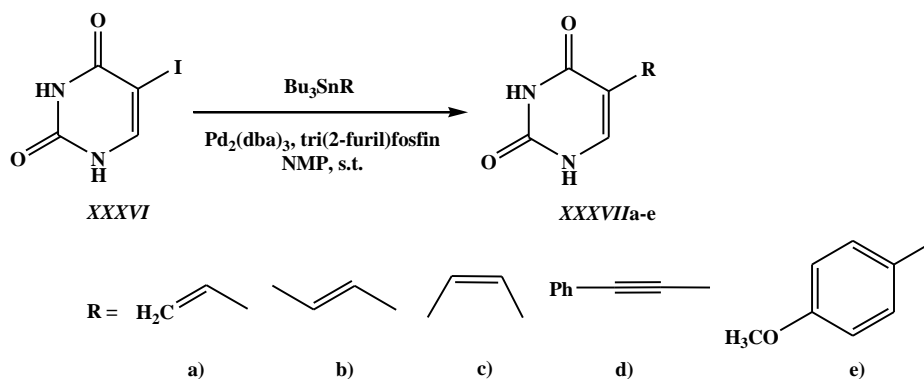
Ozola i sur.⁶⁷ objavili su sintezu nekoliko 2,6-diaminopurinskih derivata **XXXVa-d** supstituiranih s furanom i tiofenom u C8 položaju purina (*Shema 11*).



Shema 11. Sintetski put priprave purinskih derivata **XXXVa-d** supstituiranih s furanom i tiofenom u C8 položaju purina.

Reakcije su provedene Stilleovom metodom u DMF-u, a kao katalizator je upotrijebljen dikloro(difenilfosfin-butan)paladij(II) [$\text{PdCl}_2(\text{dppb})$] uz dodatak kokatalizatora CuO koji je ubrzao reakciju i povećao iskorištenje produkata.

Primjer C5 supstituiranih pirimidinskih analoga je rad koji su objavili Farina i Hauck.⁶⁸ U svom radu prikazali su reakcije povezivanja 5-joduracila i 5-jod supstituiranih uridinskih derivata s različitim nezasićenim organostananimi (*Shema 12*).

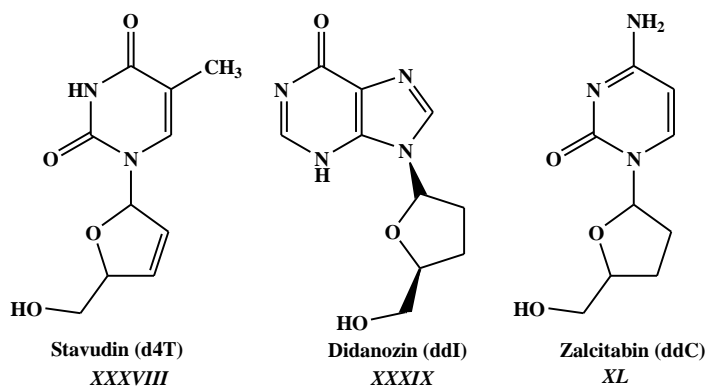


Shema 12. Sintetski put priprave C5 supstituiranih uracilnih derivata **XXXVIIa-e**.

Specifičnost je prikazanih reakcija njihova ovisnost o tipu i količini primijenjenog paladijevog katalizatora. Tako je od upotrijebljenih $(\text{MeCN})_2\text{PdCl}_2$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ **XVI** i $\text{Pd}_2\text{dba}_3/\text{tri}(2\text{-fural})\text{fosfin}$ najbolje reakcijsko iskorištenje pri sobnoj temperaturi dao posljednji primjer s Pd_2dba_3 .

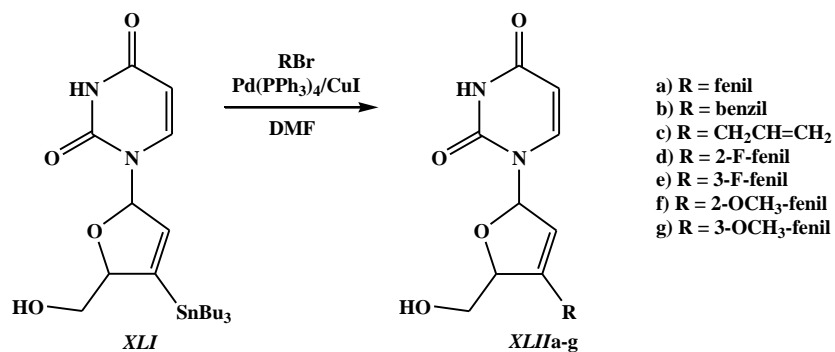
Zanimljivi primjeri modifikacije C5 položaja pirimidina su i sinteze 5-supstituiranih 2'-deoksiuridina primjenom simetričnih organostanana (R_4Sn , $\text{R} = \text{Me}$, vinil, fenil)⁶⁹ i antiherpesnih derivata 2'-deoksi-4'-tioprimidina.⁷⁰ Yamamoto i sur.⁷¹ dali su primjer kemoselektivnosti na vezu ugljik-kositar (Stilleova reakcija) u odnosu na vezu ugljik-bor (Suzuki-Miyaurina reakcija) usprkos tome što obje podliježu paladijem kataliziranim reakcijama sprezanja.

Biološki gledano, nukleozidi su nedvojbeno veoma bogat izvor antivirusnih derivata zbog čega su već dugi niz godina predmetom znanstvenog interesa. Od posebnog su značenja upravo oni kojima nedostaje 2'- i 3'-OH skupina šećera, a takvi su dobro poznati anti-HIV agensi [zidovudin (AZT) **IX**, stavudin (d4T) **XXXVIII**, didanozin (ddI) **XXXIX**, zalcitabin (ddC) **XL**] (Slika 10).



Slika 10. Poznati anti-HIV derivati nukleozida.

Kumamoto i sur.⁷² sintetizirali su C3' supstituirane analoge 2',3'-didehidro-2',3'-dideoksiuridina (d4U) (Shema 13), 2',3'-didehidro-2',3'-dideokscitidina (d4C) i derivate 2',3'-dideokscitidina te su ispitali njihovu antivirusnu aktivnost.

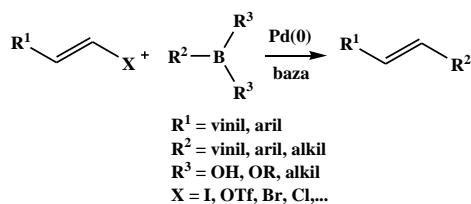


Shema 13. Stilleova reakcija priprave C3' supstituiranih d4U analoga *XLIIa-g*.

Poznato je da je d4U biološki inaktivan, a d4C pokazuje izvrsnu anti-HIV aktivnost u usporedbi s d4T dok njegov zasićeni analog ddC pokazuje najveću aktivnost od svih 2',3'-dideoksi derivata prirodnih nukleobaza. Međutim, C3' supstituirani analozi d4U, d4C i ddC nisu dali željene biološke rezultate.⁷²

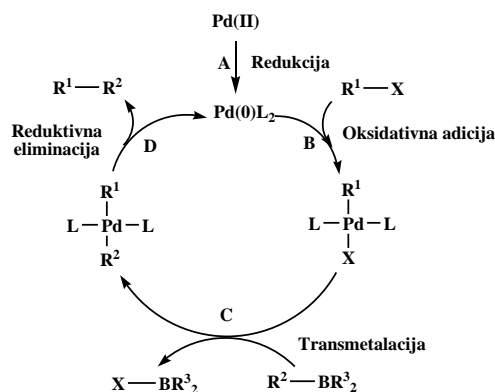
2.4.2.3. Suzuki-Miyaurina reakcija

Suzuki-Miyaurina reakcija spreznja uključuje povezivanje organoborovih spojeva s aril, alkenil i alkinil halogenidima pri čemu se također generira veza ugljik-ugljik (*Shema 14*).³⁰



Shema 14. Opća shema Suzuki-Miyaurine reakcije.

Katalitički ciklus Suzuki-Miyaurine reakcije prikazuje *Shema 15*.



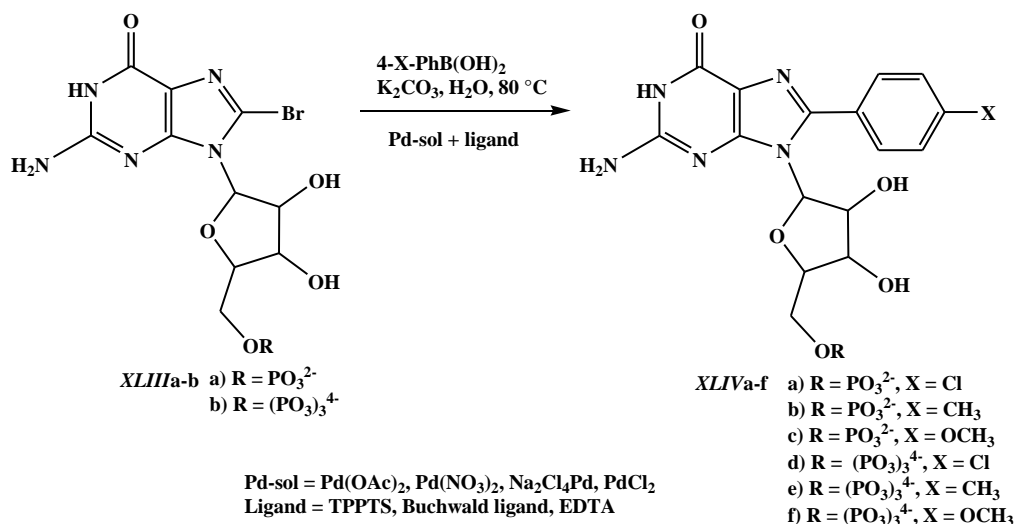
Shema 15. Katalitički ciklus Suzuki-Miyaurine reakcije.

Identično prethodnim katalitičkim ciklusima i ova reakcija uključuje **redukciju (A)** Pd(II) kompleksa do Pd(0), zatim **oksidativnu adiciju (B)** supstrata R^1-X i generiranje Pd(II) aktivne specije. Potom također slijedi **transmetalacija (C)** u prisutnosti baze koja aktivira vezu ugljik-bor čineći tako ugljikov atom nukleofilnijim. Transferom aktiviranog liganda R^2 s bora na Pd(II) nastaje Pd(II) intermedijer. Stupanj koji uvjetuje brzinu reakcije ovisi o prirodi odlazeće skupine (X) i to je transmetalacija u slučaju kada je $X = I$, a oksidativna adicija kada je $X = Br$. U zadnjem stupnju tj. **reduktivnom eliminacijom (D)** oslobađa se željeni produkt i aktivna Pd(0) specija za idući katalitički ciklus. Standardne reakcijske komponente Suzuki-Miyaurine reakcije su paladijev katalizator, najčešće $Pd(PPh_3)_4$ **XVI**, baza Na_2CO_3 (KOH, NaOH, Tl_2CO_3) i otapalo DMF (DME, THF, aceton ili benzen), a reakcije se najčešće odvijaju u temperaturnom intervalu 60–80 °C kroz 12 h.

Ova reakcija našla je svoju primjenu u organskoj kemiji prije tek nešto više od deset godina, a posebno je značajna u medicinskoj kemiji obzirom da su borovi derivati netoksični, stabilni i jednostavno se pripravlja.

Paladijem kataliziranu reakciju 2,6- i 2,8-halopurinskih derivata s različitim tipovima aril- ili alkenilbornih kiselina objavili su Havelková i sur.⁷³ Optimizacijom reakcije pokazali su da je učinkovitiji katalizator $Pd(PPh_3)_4$ **XVI** u usporedbi s drugim primijenjenim $[Pd(dba)_2/P(o-tol)_3]$, $Pd(dba)_2/AsPh_3$ ili $PdCl_2(PPh_3)_2$ **XIV**, a najučinkovitija baza K_2CO_3 u usporedbi s drugim korištenim (Na_2CO_3 , Cs_2CO_3 , $EtN(iPr)_2$ i NaOMe). Modifikaciju purinskog nukleozida pirenom objavili su Amann i Wagenknecht.⁷⁴ U reakciji 8-bromo-2'-deoksigvanozina s piren-1-ilboronskom kiselinom pripravljen je C8 pirenski nukleozidni derivat 2'-deoksigvanozina kao modelni spoj u svrhu spektroskopskog praćenja reduktivnog prijenosa elektrona unutar molekule

DNA. Takav način praćenja migracije naboja transformacijom nukleozida aromatskim sustavima mogao bi pomoći u razumijevanju nastanka oštećenja DNA koja uzrokuju mutacije i tumore. Primjer C8 arilacije nezaštićenih 8-bromgvanozina te 8-bromogvanozin mono- i trifosfata u reakciji s različitim arilbornim kiselinama (4-X-PhB(OH)_2 , $\text{X} = \text{Cl}, \text{CH}_3, \text{OCH}_3$) objavili su Collier i Wagner (*Shema 16*).⁷⁵

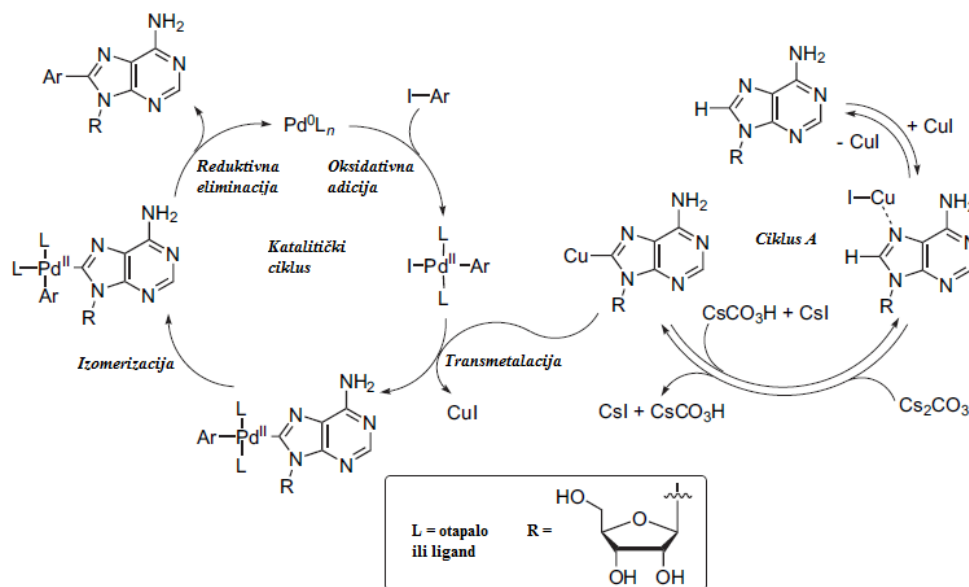


Shema 16. Suzuki-Miyaurina reakcija priprave C8 supstituiranih gvanozinskih mono- i trifosfata **XLIVa-f**.

Iako direktna strukturna modifikacija nezaštićenih nukleozida/nukleotida nije trivijalna iz više razloga (prisutnost više funkcionalnih skupina uključujući i fosfatne, podložnost hidrolitičkom cijepanju fosfatnih estera, pirofosfata i glikozidnih veza te topljivost nezaštićenih nukleozida/nukleotida u vodi) ovaj primjer pokazuje da je ona ipak moguća.

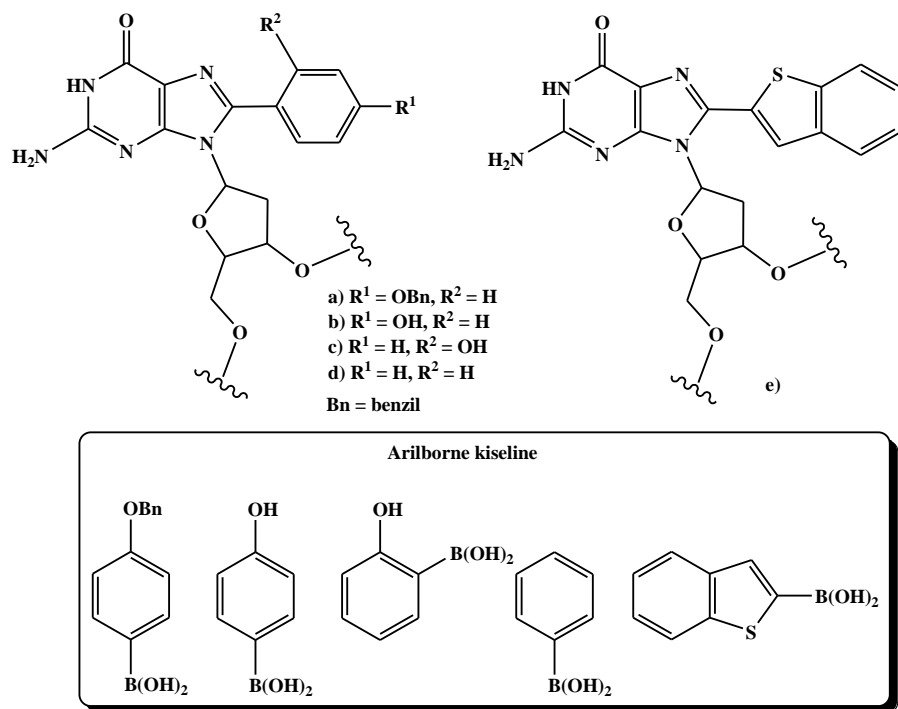
Obzirom da je poznata široka primjena purinskih nukleozida modificiranih u domeni baze kao inhibitora terapijski važnih proteina,^{76,77} antagonista purinskih receptora,^{78,79} kao proba za istraživanje strukture i funkcije RNA,⁸⁰ pH senzora,⁸¹ fluorescentnih markera⁸¹ te supramolekulskih strukturnih jedinica⁸¹ izuzetno je važan razvoj učinkovitih sintetskih metoda njihove priprave. Tako su Fairlamb i sur.⁸² objavili direktnu arilaciju nezaštićenog adenzina u C8 položaju variranjem različitih aril-jodida. Značaj ove reakcije je u činjenici da za primjenu Suzuki-Miyaurine metodologije nije bila potrebna prethodna funkcionalizacija C8 položaja purina halogenom (najčešće bromiranje). Bazom promovirana deprotonacija C8 položaja purina

omogućuje *in situ* generiranje organokuprata (ciklus A) koji dalje participira u reakciji transmetalacije s Pd(II) intermedijerom u katalitičkom ciklusu (Shema 17).



Shema 17. Katalitički ciklus arilacije C8 položaja adenzina Suzuki-Miyaurinom metodom uz primjenu baze Cs₂CO₃.

Modificirane nukleinske kiseline su od velikog značaja zbog njihove široke primjene u dijagnostici, katalizi, nanotehnologiji i razvoju novih materijala.^{83,84,85,86} Iz tog su razloga transformirane nukleobaze s fluorescentnim, električnim ili magnetskim svojstvima ili sa sposobnošću vezanja metala korisne u razumijevanju opsega primjene modificiranih nukleinskih kiselina. Prirodne transformacije nukleinskih kiselina koje nastaju djelovanjem različitih agensa kao što su diazokinoni, arilhidrazini i policiklički aromatski ugljikovodici (benzo(a)piren, 3-nitrobenzantron) u velikoj mjeri koreliraju s procesom mutagenoze i nastanka tumora. Istraživanje takvih adukata moglo bi pomoći objašnjenju mehanizama biološke aktivnosti tih toksina. Zanimljiv primjer primjene Suzuki-Miyaurine metodologije u sintezi niza C8 modificiranih arilgvanozinskih oligonukleotida s različitim arilbornim kiselinama objavili su Omumi i sur.⁸⁷ (Slika 11).



Slika 11. C8-arilgvanozinski monomeri pripremljeni Suzuki-Miyaurinom reakcijom s različitim arilbornim kiselinama koji grade sekvence oligonukleotida.

Obzirom na to da C8 purinski derivati supstituirani skupinama većima od NH_2 , Br ili CH_3 nisu pogodni supstrati za DNA polimerazu gotovo je nemoguće pripremiti C8 modificirane arilpurinske oligonukleotide enzimskom sintezom djelovanjem polimeraza. S druge strane, automatska ugradnja C8-arilpurinskih adukata u oligonukleotidni lanac na čvrstom nosaču također ima ograničenja. Ona proizlaze iz činjenice da su takvi adukti podložniji oksidaciji i netolerantni su na kisele reakcijske uvjete. Autori su stoga ponudili alternativni, vrlo uspješan način pripreme C8-arilgvanozinskih oligonukleotida postsintetskom arilacijom 8-bromgvanozina Suzuki-Miyaurinom reakcijom kao zanimljivih markera u dijagnostici i razumijevanju biološkog značaja takvih lezija. Utjecaj ciljanih C8-arilgvanozinskih lezija na stabilnost i strukturu dvostruke uzvojnice objasnili su ES-MS tehnikom, analizom temperature mekšanja praćenjem UV-a, zatim CD analizom i fluorescentnom spektroskopijom.

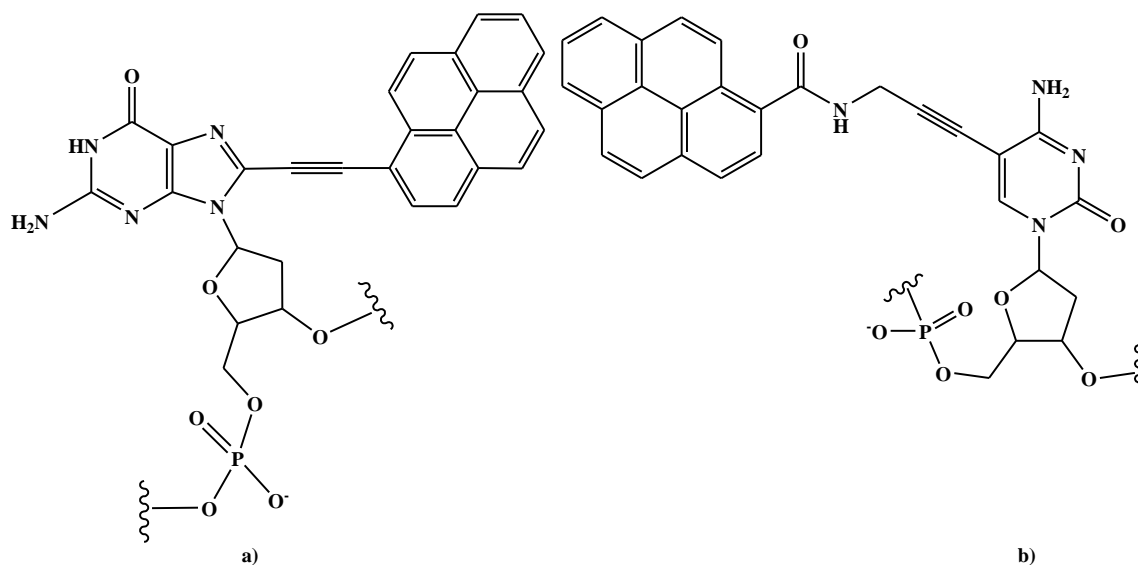
Suzuki-Miyaurina metodologija iskorištena je i u pripravi C5 supstituiranih 2'-deoksiuridinskih analoga kao bioloških markera i spojeva sa značajnom antivirusnom, antibakterijskom i protutumorskom aktivnošću.⁸⁸

Unatoč tome što katalitička količina bakrovog(I) jodida značajno ubrzava reakciju i omogućuje njenu provedbu na znatno nižim temperaturama, dodatak soli bakra u reakcijsku smjesu ima i svoje nedostatke. Oni se odnose prvenstveno na ekološke čimbenike kao i nemogućnost regeneracije takvih soli u katalitičkom ciklusu jer nastanak bakrovog acetilida često uzrokuje i samopovezivanje dviju molekula terminalnog alkina (tzv. Glaser coupling)^{90,91} kao nusprodukta. Ta paralelna reakcija predstavlja problem posebice kada se radi o skupom terminalnom alkinu ili je njegova priprava zahtjevna. Samopovezivanje molekula terminalnih acetilena može se spriječiti provedbom reakcije u atmosferi vodika (redukcijsko sredstvo), polaganim dodatkom acetilena ili se reakcija može provesti bez primjene bakra uz suvišak amina što je ponovno ekološki neprihvatljivo. Zbog ovih nedostataka posljednjih godina intenzivno se proučava Sonogashirina reakcija sprežanja koja bi isključila primjenu i bakra i amina.

Sonogashirina metodologija najčešće uključuje primjenu $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ katalizatora **XIV**, CuI, baze, i provodi se u THF-u pri 25 °C. Osim soli bakra, u novije vrijeme, proučava se i mogućnost primjene jeftinijih i stabilnijih katalizatora. U tom pogledu, kao moguća alternativa, istaknule su se soli željeza (FeCl_3 , Fe(III)acetilacetat, Fe(III)benzoilacetat i dr.). Kao alternativa primjeni amina upotrijebljene su druge baze (K_3PO_4 , Cs_2CO_3 , NaOtBu kao i K_2CO_3).⁹²

Alkinilacija aromatskih heterocikličkih sustava reakcijama kataliziranim prijelaznim metalima, gdje je oksidativna adicija stupanj koji određuje brzinu reakcije, ovisi o elektrofilnosti ugljika na heterociklu. Posljedično, elektronima bogati, halogenirani heterocikli pogodniji su reaktanti Sonogashirine reakcije, a također i elektrofilnije pozicije polihalogeniranih sustava.

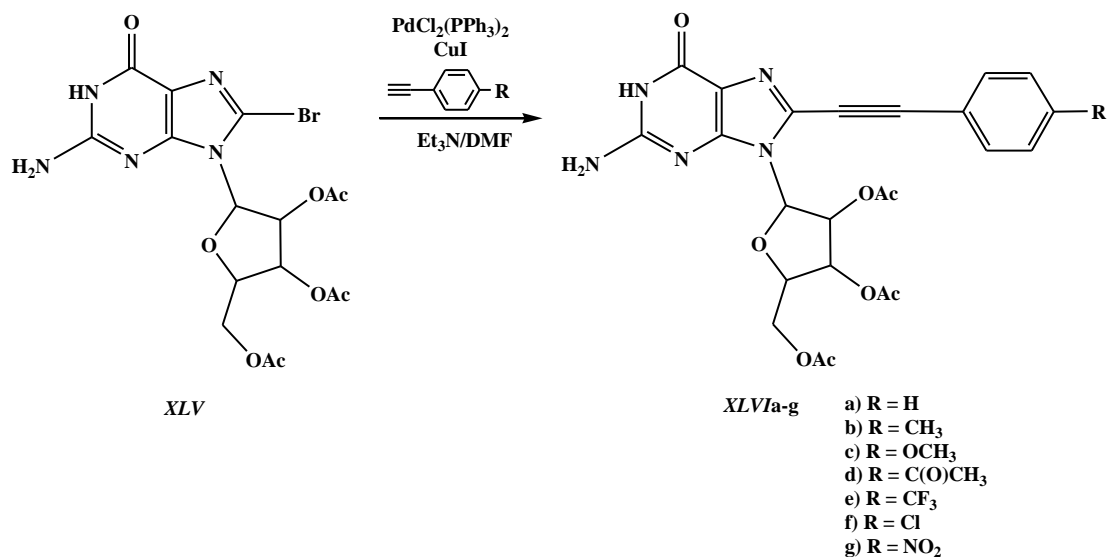
Zanimljiv primjer supstitucije heterocikličkog sustava objavili su Okamoto i sur.⁹³ Primijenivši Sonogashirinu metodologiju sintetizirali su derivat deoksigvanozina supstituiran pirenom u položaju C8 i derivat citozina supstituiran pirenom u položaju C5 (*Slika 12*). Strukturna modifikacija pirenom pruža mogućnost istraživanja različitih interakcija nukleinskih kiselina fluorescencijom.



Slika 12. Pirenom supstituirani; a) C8 derivat gvanozina i b) C5 derivat citozina koji grade oligonukleotidne sekvence.

Poznato je da su C5 pirimidinski i C8 purinski nukleozidni analozi važni terapijski agensi, posebno u razvoju antivirusnih i protutumorskih lijekova. Klinička primjena većine protutumorskih kemoterapeutika ograničena je zbog njihove nespecifičnosti i visoke citotoksičnosti kako na tumorsko tako i na zdravo tkivo. Stoga su brojne studije usmjerene na sintezu selektivnijih derivata sa smanjenim nuspojavama i mogućnošću primjene u niskim koncentracijama. Potaknuti ranije otkrivenim saznanjima o konjugatima steroidnih hormona i nukleozida Ali i sur.⁹⁴ pripravili su nukleozidne derivate estradiola te su ispitali uvjete vezanja takvih struktura na estrogene receptore eksprimirane u endokrinom tumoru dojke. Nažalost, biološki rezultati su pokazali izrazito nizak afinitet pripremljenih derivata za estrogene receptore u usporedbi s estradiolom.

Sonogashirinu alkinilaciju 8-bromadenozina i 8-bromgvanozina sterički manjim skupinama objavili su Firth i sur.⁹⁵ Pripravili su seriju C8 supstituiranih derivata adenzina i gvanozina alkinilacijom različitim *p*-supstituiranim fenilacetenima sa zanimljivim fluorescencijskim svojstvima i mogućnošću biološke primjene (*Shema 20*).



Shema 20. Sintetski put priprave C8 supstituiranih derivata gvanozina **XLVIa-g**.

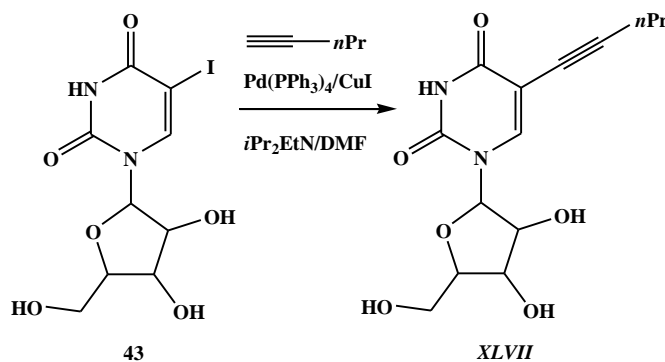
Zaključili su da najbolje rezultate Sonogashirine reakcije ostvaruju primjenom 1 mol % Pd(II) te da je optimalan omjer Pd(II)/Cu(I) 1:2. Iz eksperimentalnih rezultata pretpostavili su da veći udio Pd (10 mol %) značajno smanjuje reakcijsko iskorištenje, a kao uzrok su naveli brzu aglomeraciju i taloženje paladija u reakcijskoj smjesi. Utjecaj Cu(I) još nije u potpunosti razjašnjen, ali mehanističke studije koje su u tijeku zasigurno će dati zanimljive odgovore i objasniti dvojni ulogu tog metala u katalitičkom ciklusu. Neki od sintetiziranih derivata imaju i zanimljiva fluorescentna svojstva pa bi mogli naći primjenu u biokemijskim eksperimentima.

Sličan primjer supstitucije C5 položaja pirimidinskih i C8 položaja purinskih baza pirenkarboksamidatnim supstituentom primjenom Sonogashirine metodologije objavili su Saito i sur.⁹⁶ Dobivene fluorescentne nukleozide uspješno su primijenili kao izvrsne senzore za timin unutar komplementarnog lanca. Na taj način razvili su još jednu novu metodu u istraživanju polimorfizma pojedinačnog nukleotida (krat. **SNP**, *engl. Single Nucleotide Polymorphism*). Također su pripremljeni i C8 alkinil- i alkilamino- modificirani 2'-deoksigvanozinski derivati za praćenje stabilnosti dvostruke uzvojnice. Ugradnjom takvih struktura u oligonukleotidne lance utvrđeno je da se produljenjem lanca supstituenta stabilnost uzvojnice smanjuje.⁹⁷ Autori su pretpostavili da je razlog tome steričke prirode.

5-Joduracilni prsten (α -acilvinil kation ekvivalent kao sinton)⁹⁸ izuzetno je reaktivan i već pri sobnoj temperaturi može se alkinilirati primjenom Sonogashirine metodologije pa su stoga

poznati i brojni primjeri; uvođenje fluorescentnih policikličkih aromatskih sustava,^{99,100,101} porfirina,¹⁰² sinteza uridinskih oligonukleozida povezanih etinilinskim mostom,¹⁰³ uvođenje lipofilnih supstituenata u C5 položaj uracilne baze,¹⁰⁴ kao i primjeri 5-alkinil-2'-deoksiuridina koji pokazuju povećanje farmakološke aktivnosti protiv HSV¹⁰⁵ ili mikobakterija.^{106,107}

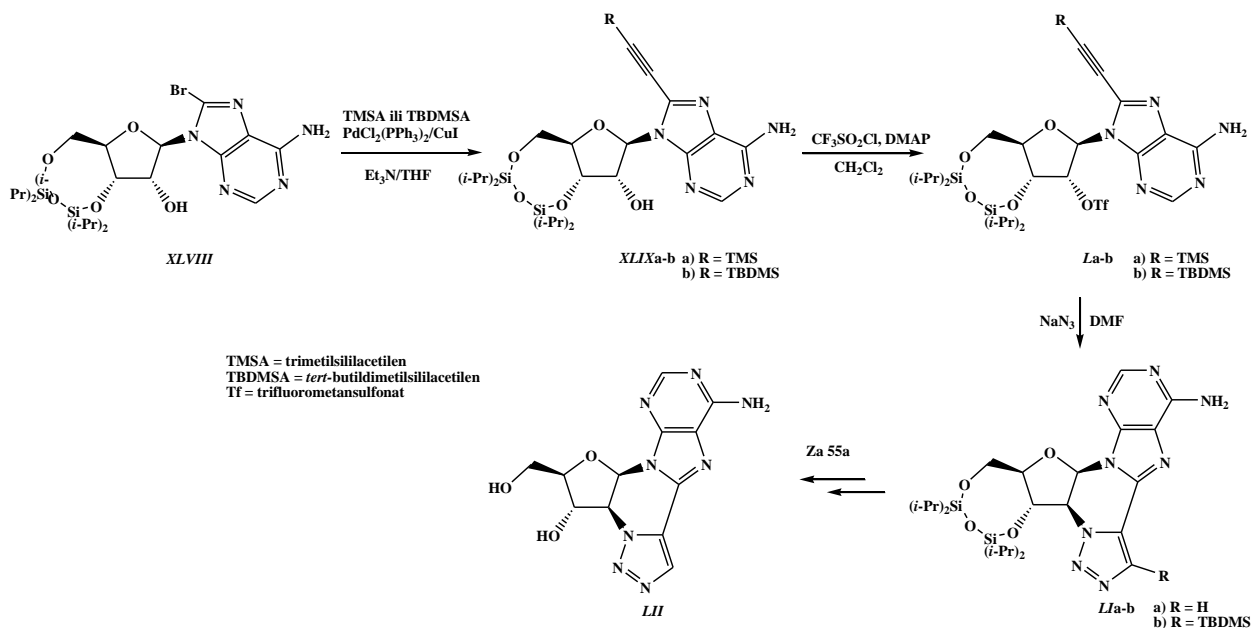
Primjer Sonogashirine reakcije povezivanja 5-joduridina **43** s 1-pentinom u svrhu poboljšanja farmakoloških svojstava spoja gdje nastaje 5-pentiniluridin **XLVII** prikazan je Shemom 21.^{106,107}



Shema 21. Sintetski put priprave 5-pentiniluridina **XLVII**.

Garg i sur.¹⁰⁸ objavili su zanimljiv primjer optimizacije Sonogashirine reakcije uvođenjem heterogene katalize zamjenom paladijevog kompleksa s Pd/C i smanjenjem udjela paladija u reakcijskoj smjesi.

Seriju novih fluorescentnih adenzinskih derivata s dodatnim heterocikličkim 1,2,3-triazolnim prstenom objavili su O'Mahony i sur.¹⁰⁹ Autori su najprije funkcionalizacijom C8 položaja adenzina Sonogashira reakcijom uz $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ kompleks **XIV**, CuI, Et_3N u THF-u pripravili odgovarajuće alkinilne derivate. Aktivacijom 2'-OH skupine šećera triflatom dobili su agense pogodne za $\text{S}_\text{N}2$ reakciju s NaN_3 . *In situ* generirani azidi potom su intramolekulskom [3+2] cikloadicijom dali odgovarajuće cikloadicijske produkte (Shema 22).



Shema 22. Sintetski put pripreve adenzinskih derivata **LIIa-b** i **LII** s dodatnim heterocikličkim 1,2,3-triazolnim prstenom.

Uvođenjem dodatnog heterocikličkog prstena u strukturu nukleozida proširuje se π -konjugacija između purinskog sustava i novog triazolnog prstena. Eksperimentalni rezultati pokazuju da se, usprkos vrlo jakoj fluorescenciji, emisijski spektar spoja **LII** u najvećem dijelu poklapa s UV spektrom. Autori predviđaju i ugradnju ovih struktura u oligonukleotidne lance čime će dodatno ispitati njihova svojstva.

2.5. Klik kemija

Pojam klik kemije prvi su put upotrijebili Sharpless i sur. 2001. godine¹¹⁰, a nedvojbeno predstavlja jedan od vodećih trendova suvremene organske kemije.¹¹¹ Njime su objedinili široku paletu kemijskih reakcija nastajanja veze ugljik-heteroatom u kojima se brzo i pouzdano dolazi do produkata spajanjem više manjih jedinica. Osim toga, strogo su definirali i uvjete koje reakcija treba zadovoljiti da bi se smatrala klik reakcijom:

- a) mora imati široki raspon primjene
- b) nusprodukti moraju biti neškodljivi i lako uklonjivi
- c) mora biti stereospecifična, ali ne nužno i enantioselektivna
- d) reakcijski uvjeti moraju biti jednostavni (tolerancija prisutnosti kisika i vode)
- e) reagensi i otapala (ako su potrebna) moraju biti pristupačni i lako uklonjivi
- f) treba rezultirati nastankom stabilnog produkta u visokom iskorištenju uz jednostavnu izolaciju (kristalizacija, filtracija)

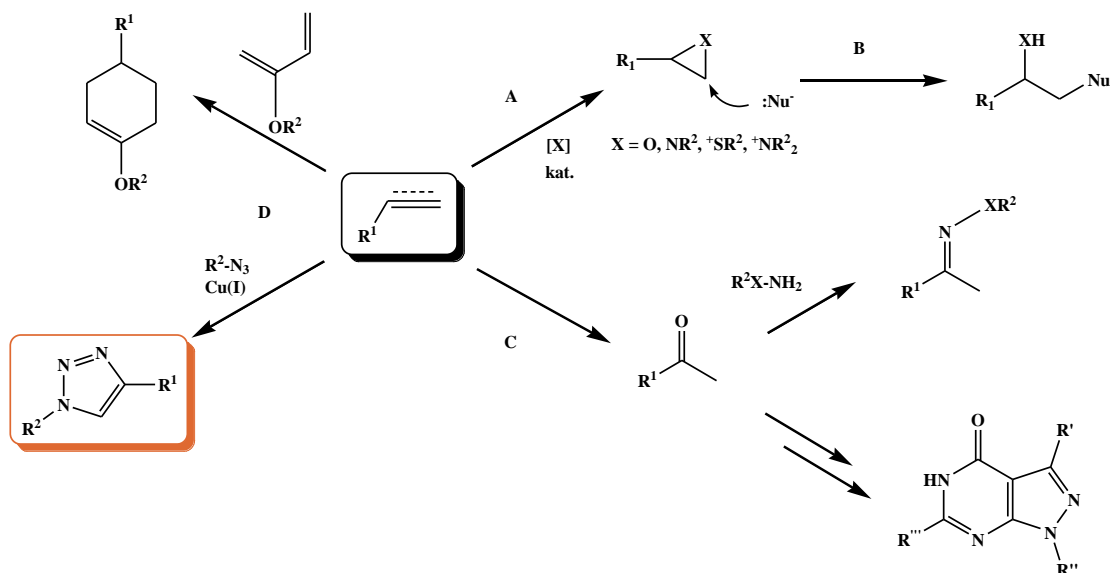
Gotovo je nemoguće da reakcija udovoljava svim navedenim zahtjevima, ali ipak postoji nekoliko tipova reakcija koje možemo smatrati reakcijama „klik tipa” (*Shema 23*).¹¹⁰ To su:

A. Adicije na nezasićenu vezu ugljik-ugljik (oksidacijske reakcije kao što su epoksidacija,¹¹² dihidroksilacija,¹¹³ aziridinacija,¹¹⁴ adicija nitrozil- i sulfenil halogenida¹¹⁵ i neke reakcije Michaelove adicije)

B. Reakcije nukleofilnog otvaranja prstena (S_N2 reakcije) (posebno napetih heterocikličkih elektrofila kao što su epoksidi, aziridini, ciklički sulfati i sulfamidati, aziridinijevi i episulfonijevi ioni)¹¹⁰

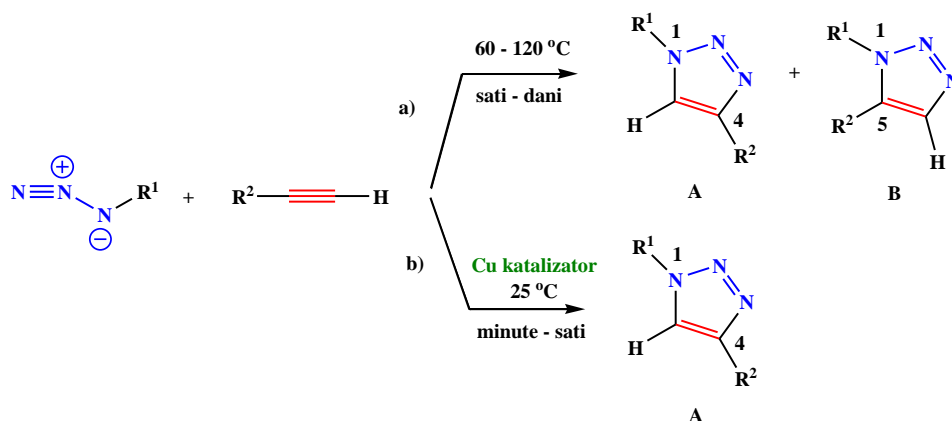
C. Karbonilna kemija ne-aldolnog tipa (nastajanje urea, oksima, hidrazona i aromatskih heterocikla)

D. Cikloadicijske reakcije (1,3-dipolarne cikloadicijske reakcije i Diels-Alder reakcije).



Shema 23. Neki tipovi reakcija koji udovoljavaju klik kriterijima: A) adicije na nezasićenu C-C vezu; B) reakcije nukleofilnog otvaranja prstena; C) karbonilna kemija ne-aldolnog tipa; D) cikloadicijske reakcije.

Najzastupljenija od svih reakcija „klik tipa” upravo je Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija azida i terminalnog alkina pri čemu nastaje 1,2,3-triazol. Jedna od prvih sinteza koja je uključivala reakciju terminalnog ili internog alkina i azida poznata je više od stotinu godina. Naime, prvi 1,2,3-triazol sintetiziran je 1893. godine iz fenil-azida i acetilendikarboksilata.¹¹⁶ Rolf Huisgen i sur. detaljno su istražili reakcije 1,3-dipolarne cikloadicije pedesetih godina prošlog stoljeća¹¹⁷ te zaključili da je, u termodinamičkom smislu, ovaj postupak egzoterman ($\Delta H^0 = -45$ do -55 kcal/mol), ali s relativno visokom energijom aktivacije ($E_a = 26$ kcal/mol za reakciju metil-azida i propina).¹¹⁸ To značajno utječe na brzinu reakcije te je ona za neaktivirane reaktante na sobnoj temperaturi vrlo spora. Alkin i azid vrlo su selektivni u reaktivnosti: inertni su prema većini funkcionalnih skupina i stabilni u velikom broju otapala, pri različitim temperaturama i pH vrijednostima. Nekatalizirana reakcija zahtjeva visoku temperaturu i pri tom nastaje smjesa 2 regioizomera (1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol **A** i 1,5-disupstituirani 1,2,3-triazol **B**) (Shema 24).¹¹⁹



Shema 24. a) Nekatalizirana i b) Cu(I) katalizirana 1,3-dipolarna azid-alkin cikloadicija.

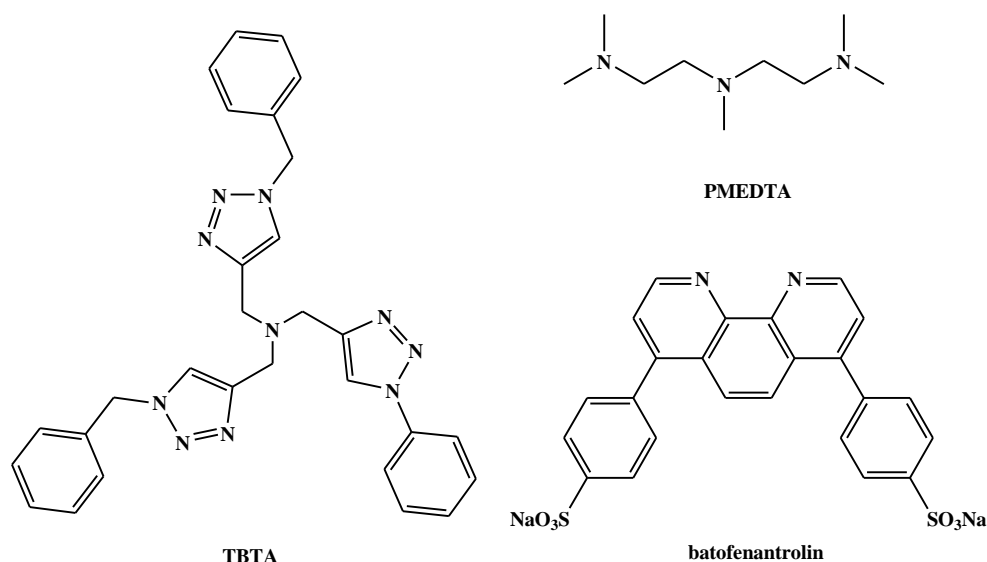
2.5.1. Cu(I) katalizirana azid-alkin 1,3-dipolarna cikloadicija (CuAAC)

U fokus interesa sintetske organske kemije posljednjih desetak godina dolazi Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija katalizirana bakrom(I). Tornøe i Meldal 2002. godine uvode bakar(I) kao katalizator te je ova reakcija od tada poznata kao Cu(I) katalizirana azid-alkin 1,3-dipolarna cikloadicija (krat. **CuAAC**, engl. *Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*).^{120,121,119} Cu(I) katalizirana 1,3-cikloadicija je do 10⁷ puta brža od nekatalizirane,¹²² odvija se pri temperaturi od 0 do 25 °C, a sterička i elektronska svojstva supstituenata ne utječu bitno na tijek katalizirane reakcije. Reakcijom regioselektivno nastaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli (Shema 24) koji su stabilni u hidrolitičkim i oksidoredukcijskim uvjetima te pri visokim temperaturama.

2.5.1.1. Izvori bakra u CuAAC reakcijama

Bakar(I) se u reakciju uvodi direktno ili se može pripremiti *in situ*. Ovisno o reakcijskim uvjetima izabire se i odgovarajući bakrovi katalizator. Najčešći reakcijski uvjeti su oni gdje se primjenjuje vodeni medij te CuSO₄ uz odgovarajuće redukcijsko sredstvo (najčešće Na-askorbat) koje će *in situ* generirati potrebni Cu(I). Neposredna primjena Cu(I) katalizatora najčešće uključuje primjenu Cu(I) soli (CuI ili CuBr) ili Cu(I) kompleksa ([Cu(CH₃CN)₄]PF₆, (EtO)₃P·CuI, [Cu(PPh₃)₃Br]). Kompleksi su se pokazali kao dobro riješenje kod reakcija u organskim otapalima gdje je topljivost Cu(I) soli ograničena. Osim Cu(I) i Cu(II) izvora bakra

poznate su i primjene Cu(0) katalizatora (bakrena žica ili bakreni prah)^{123,124} te nano čestica bakra¹²⁵ u CuAAC reakcijama. Cu(I) je termodinamički nestabilan te se relativno lako oksidira u Cu(II) koji je katalitički inaktivan. Cu(II) kao oksidacijsko sredstvo može uzrokovati nastanak neželjenih nusprodukata, a da bi se to spriječilo reakcije s Cu(I) solima treba voditi bez prisutnosti kisika. Kao alternativno rješenje strogo suhim reakcijskim uvjetima u CuAAC reakcijama mogu se upotrijebiti i kompleksi Cu(I) s različitim ligandima. Ligandi štite Cu(I) od oksidacije pa nije nužno voditi reakciju bez prisustva kisika, a mogu i poboljšati katalitička svojstva Cu(I) soli. Osim toga, ligandi mogu djelovati i kao proton akceptori pa nije potrebna upotreba baza. Najčešće upotrebljavani ligandi su TBTA (tris[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amin) ili batofenantrolin (upotrebljavaju se u organskoj sintezi i biokonjugaciji molekula) i PMEDTA (*N*¹-(2-(dimetilamino)etil)-*N*¹,*N*²,*N*²-trimetiletan-1,2-diamin), koji se koristi u kemiji polimera (Slika 12).¹²⁶



Slika 12. Najčešće upotrebljavani ligandi u CuAAC reakcijama.

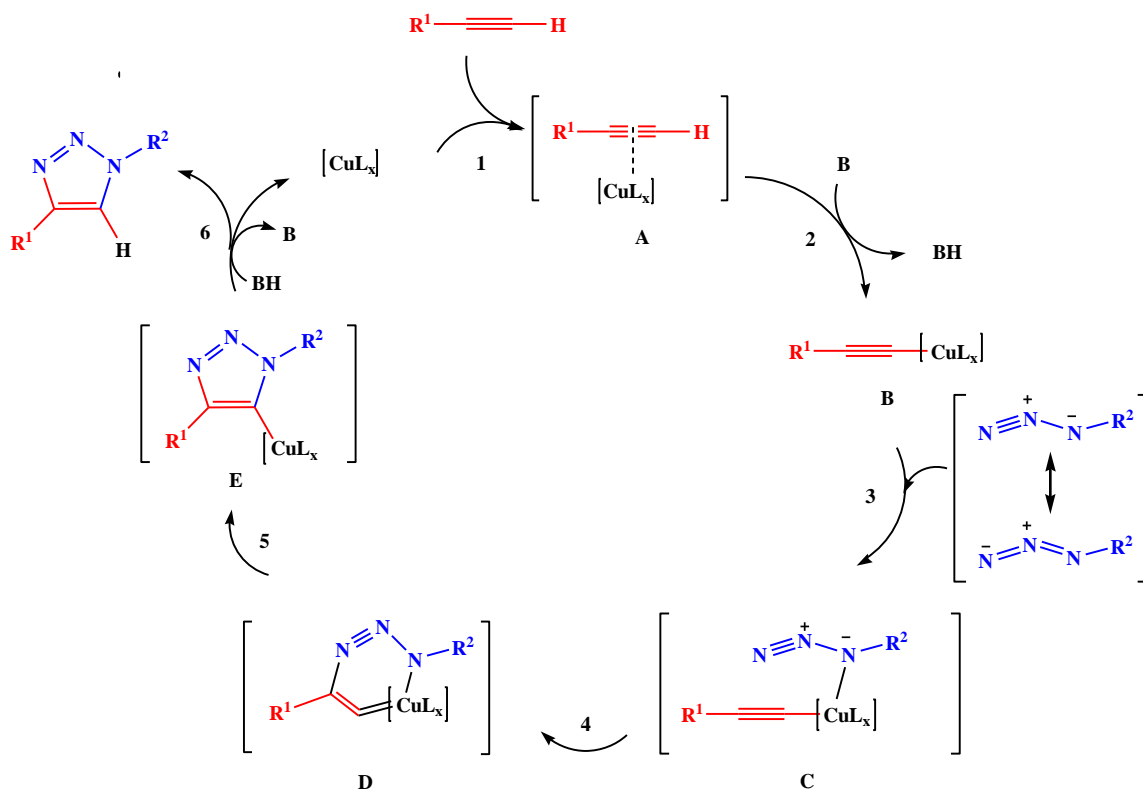
U CuAAC reakcijama upotrebljava se niz nepolarnih te polarnih aprotičnih i protičnih otapala (toluen, 1,4-dioksan, CHCl₃, CH₂Cl₂, THF, DMF, CH₃CN, DMSO, NMP, *t*BuOH, EtOH, MeOH), a moguća je i primjena vode u smjesi s nekim organskim otapalom (najčešće s EtOH ili *t*BuOH).

Kao baze se najčešće upotrebljavaju DIPEA, *N,N'*-dimetiletildiamin (DMEDA) i Et₃N, a nešto rjeđe 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en (DBU), piperidin i 2,6-lutidin.

2.5.1.2. Mehanizam CuAAC reakcije

Na Shemi 25 prikazan je pretpostavljeni mehanizam Cu(I) katalizirane azid-alkin 1,3-dipolarne cikloadicije. Oznaka [CuL_x] podrazumijeva bilo koji bakrov katalizator koji može sudjelovati u reakciji.

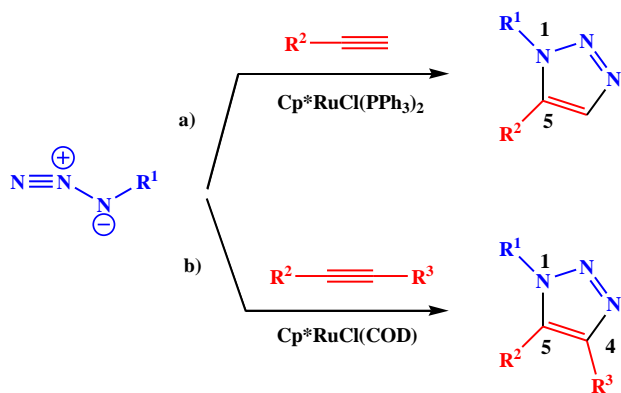
U Cu(I) kataliziranim klik reakcijama sudjeluje isključivo terminalni alkin te se pretpostavlja da u prvom koraku reakcije Cu⁺ koordinira π-elektrone alkina i nastaje π-kompleks bakra i alkina (**A**). Koordinacijom Cu⁺ na trostruku C-C vezu smanjuje se pK_a vrijednost terminalnog protona alkina i omogućava deprotonacija i nastanak bakrovog acetilida (**B**). Bakrov acetilid kompleks koordinira azid pri čemu nastaje intermedijer (**C**). Njegovom pregradnjom, u ključnom koraku katalitičkog ciklusa, nastajanje šesteročlani prsten (**D**) u koji je uključen i bakar (Cu-prsten). Ovaj korak ima energetska barijeru 18,7 kcal/mol što je znatno manje od 23,7 kcal/mol koliko iznosi barijera nekatalizirane reakcije. Energetska barijera za nastajanje triazolila (**E**) (triazola supstituiranog bakrom) je niska; 3,2 kcal/mol. Protoniranjem triazolila oslobađa se bakar i nastaje triazol.



Shema 25. Prikaz mehanizma Cu(I) katalizirane azid-alkin 1,3-dipolarne cikloadicije.

Zbog činjenice da se radi o reakciji drugog reda obzirom na Cu(I),¹²⁷ te da acetilidi najčešće koordiniraju barem dva bakrova atoma, pretpostavlja se da azid i alkin nisu koordinirani istim bakrovim atomom i da u reakciji sudjeluju barem dva bakrova atoma. DFT (*engl. Density Functional Theory*) proračun pokazuje da se uz dva bakrova atoma energetska barijera cikloadicije smanjuje za 4 kcal/mol (17 kcal/mol u slučaju jednog bakrovog atoma i 13 kcal/mol u slučaju dva bakrova atoma).¹²⁸

U azid-alkin 1,3-dipolarnoj cikloadiciji osim Cu(I) može sudjelovati i Ru(II). Saznanja o Ru(II) kataliziranoj azid-alkin 1,3-cikloadiciji objavili su 2005. godine Zhang i suradnici.¹²⁹ Za razliku od Cu(I) katalizirane 1,3-cikloadicije kojom nastaju 1,4-disupstituirani produkti, Ru(II) kataliziranom reakcijom regioselektivno nastaju 1,5-disupstituirani 1,2,3-triazoli, a uz azid osim terminalnih mogu sudjelovati i interni alkini dajući 1,4,5-trisupstituirane 1,2,3-triazole (*Shema 26*).

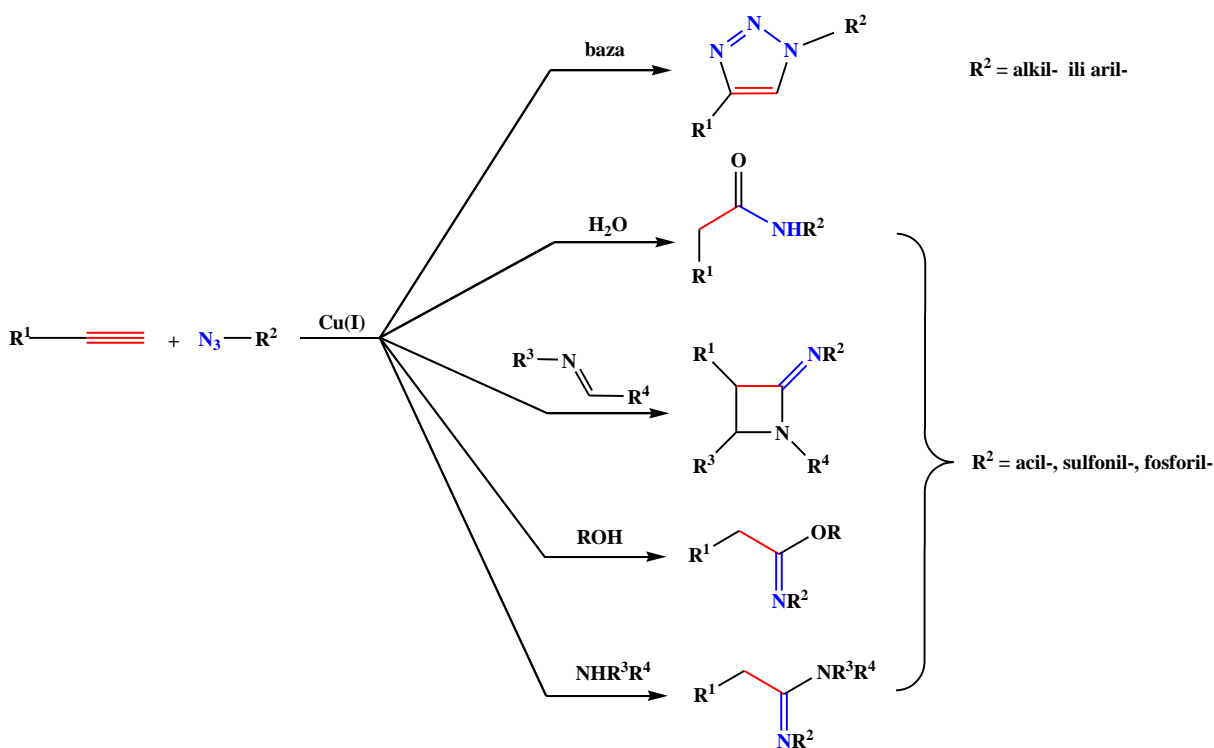


Shema 26. Ru(II) katalizirana 1,3-cikloadicija azida i a) terminalnog i b) internog alkina.

Pregled razvoja metodologije sinteze 1,4,5-trisupstituiranih 1,2,3-triazola uz Cu(I) katalizator dali su Spiteri i Moses¹³⁰, a prema rezultatima preliminarnih studija Sharpless, Fokin i sur. predložili su mehanizam reakcije.^{131,132}

2.5.2. Trokomponentna Cu(I) katalizirana klik reakcija

Iako je poznato da u CuAAC reakcijama može sudjelovati široki spektar azida i alkina i da je to jedna od najuspješnijih metoda pripreme 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola u visokom iskorištenju, opisani su i uvjeti kada to nije slučaj. Naime, ukoliko u reakciji sudjeluje acil-, sulfonil- ili fosforil-azid odgovarajući triazoli nastaju u vrlo niskom reakcijskom iskorištenju ili njihovo nastajanje uopće nije primijećeno. Tako je započelo istraživanje mehanizama Cu(I) kataliziranih klik reakcija u ovisnosti o trećoj reakcijskoj komponenti. Ovisno o uvjetima i trećoj komponenti koja sudjeluje u reakciji¹³³ uz terminalni alkin i sulfonil- (fosforil-)azid mogu nastati odgovarajući amidi,^{134,135} azetidini,¹³⁶ imidati,¹³⁷ i amidini (Shema 27).¹³⁸ Reakcijom sulfonil- (fosforil-)azida i terminalnih alkena, u odsustvu treće komponente, a uz 2,6-lutidin kao bazu nastaju odgovarajući triazoli.¹³⁹



Shema 27. Trokomponentne Cu(I) katalizirane klik reakcije.

2.5.3. CuAAC reakcije u nukleozidnoj kemiji

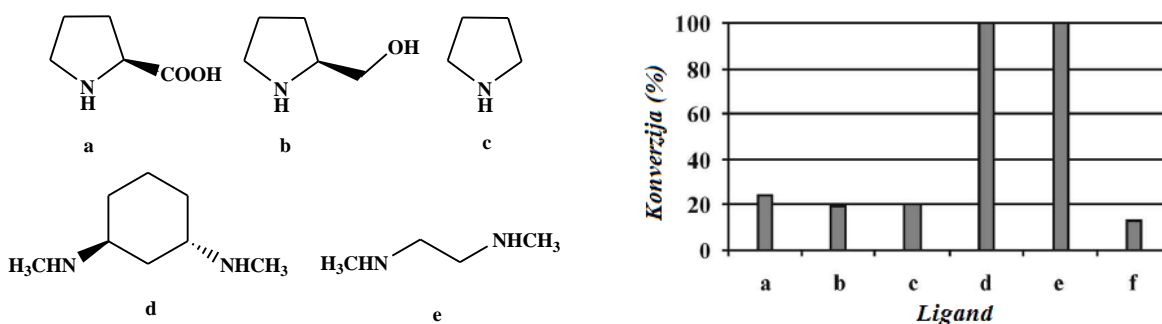
Strukturna raznolikost biološki aktivnih nukleozidnih derivata (*Slika 7*) sintetiziranih u posljednjih 50-ak godina evidentno pokazuje da nukleozidni analozi ne moraju nužno biti u uskoj strukturnoj povezanosti s prirodnim nukleozidima, a da bi istodobno bili biološki zanimljivi. Stoga se čini logičnim kako su od otkrića CuAAC reakcije njene brojne prednosti upotrijebljene i u ovom neiscrpnom području kemije u sintezi potencijalnih biološki aktivnih nukleozidnih derivata.

Činjenica da supstitucija alkinom ili azidom može biti provedena na širokoj paleti spojeva također objašnjava široku primjenu CuAAC reakcije. U prethodnom poglavlju opisane su samo neke najčešće upotrijebljene metode supstitucije nukleobaza/nukleozida Pd(0) kataliziranim reakcijama, a upravo je jedna od njih, Sonogashirina reakcija, sveprisutna metoda sinteze terminalnih alkina primijenjena i u izradi ove disertacije. Osim Pd(0) kataliziranim reakcijama, terminalni alkin moguće je pripremiti i drugim metodama (npr. Bestmannova reakcija iz aldehida).¹⁴⁰

S druge strane, azidnu funkcionalnu skupinu također je moguće generirati na više načina, a metoda pripreme azida često ovisi o tome radi li se o alkil- ili aril-azidu. Najčešći polazni spoj za pripremu azida je neki primarni, sekundarni ili tercijarni halogenid, a ovisno o vrsti ishodnog spoja potrebna je ili nije njegova prethodna aktivacija. Ito i sur. objavili su zanimljivu metodu sinteze alkil-azida bez prethodne aktivacije alkil-halogenida, fosfata odnosno tosilata s trimetilsilil-azidom i uz prisutnost fluoridnog aniona.¹⁴¹ Organski azidi su jedni od najvažnijih sintetskih intermedijera za pripremu organskih spojeva koji sadrže dušik. Azido skupina podliježe širokom spektru reakcija¹⁴² s nukleofilima i elektrofilima i može se upotrijebiti kod pripreme anilina i nitrena, a također i različitih heterocikličkih spojeva.^{119,121,143,144} Osim toga, aril-azidi imaju široku primjenu kao fotoafinitetne probe zbog sposobnosti da postanu radioaktivni s visoko specifičnom aktivnosti.¹⁴⁵ Opsežnu reviju pripreme azidonukleozida s karakterističnim reakcijama i biološkim svojstvima objavio je Pathak 2002. godine.¹⁴⁶

Iskustva istraživanja utjecaja različitih liganada (*Slika 13*) i otapala u sintezi aril-azida Ullmannovom metodom uz Cu(I) katalizator koju su objavili Andersen i sur.¹⁴⁷ pomogla su u odabiru optimalnih reakcijskih uvjeta pripreme azida u izradi ove disertacije. Autori su

optimizirali reakciju pripreve 5-azido-2-metilanilina iz odgovarajućeg brom derivata uz odgovarajući ligand (Slika 13) u mikrovalnom reaktoru.



Slika 13. Strukture liganada korištenih u reakciji s pripadajućom usporedbom konverzije (%) dobivenom LC-MS metodom.

Iz grafa Slike 13 vidljivo je da su najbolje rezultate dali ligandi **d** i **e**. Prolin (**a**), neočekivano za ovaj tip reakcije, nije rezultirao znatnijim povećanjem postotka pretvorbe polaznog spoja u usporedbi s ligandima **b** i **c** kao ni usporedbom s reakcijom bez prisutnosti liganda (**f**). Osim testiranih liganada na stupanj pretvorbe, provedeni su i eksperimenti utjecaja otapala. Tako se od niza testiranih sustava (1,4-dioksan, CH₃CN, DMSO, DMSO/H₂O 5:1, toluen, *t*BuOH/H₂O 2:1) najboljim pokazao sustav EtOH/H₂O 7:3 s kvantitativnim rezultatom pretvorbe polaznog spoja u azid. Autori su eksperimentalno utvrdili i najbolji molarni udio katalizatora (CuI) i liganda u reakciji te su u uvjetima s 1 mmol polaznog spoja i 2 mmol NaN₃ te 10 mol % CuI i 15 mol % liganda **e** u smjesi EtOH/H₂O 7:3 u mikrovalnom reaktoru pri temp. 100 °C i 30 min dobili 100 %-tnu pretvorbu. Istovjetna reakcija uz klasičan način zagrijavanja dala je isti rezultat u vremenu od 40 min. Daljnjim proučavanjem optimiranih reakcijskih uvjeta na drugom reakcijskom sustavu autore su došli do zaključka da udio Na-askorbata od 5 mol % uz primjenu CuI katalizatora i liganda **e** omogućuje 100 %-tnu pretvorbu u vremenu od 45 min. Na kraju, kako bi utvrdili može li se reakcija provesti pri temperaturi refluksa sustava u kojemu se reakcija odvija (niža od 100 °C) proveli su eksperimente u tim uvjetima. Rezultat je pokazao da je pri temperaturi refluksa sav polazni spoj izreagirao već za 10 min. Posljednjim eksperimentom utvrdili su i da je Na-askorbat neophodan za kvantitativni ishod reakcije.

Zbog izrazite opasnosti pri rukovanju organskim azidima male molekulske mase¹⁴⁸ razvijene su brojne metode sinteze 1,2,3-triazola iz terminalnih alkina i *in situ* pripremljenih organskih azida

(*engl. one-pot* reakcije).^{149,150,151} Tako su Andersen i sur.¹⁵² potaknuli metodom koju su razvili Fokin i sur.¹⁵¹ objavili učinkovitu metodu sinteze 1-aril 1,2,3-triazola iz aril-halogenida i terminalnih alkina uz prisutnost NaN_3 . Kumar i sur.¹⁵³ objavili su također trokomponentnu metodu pripreme 1,2,3-triazolnih derivata klik reakcijom aromatskih, heterocikličkih i alifatskih terminalnih alkina s *in situ* pripremljenim azidima iz odgovarajućih α -tosiloksi ketona.

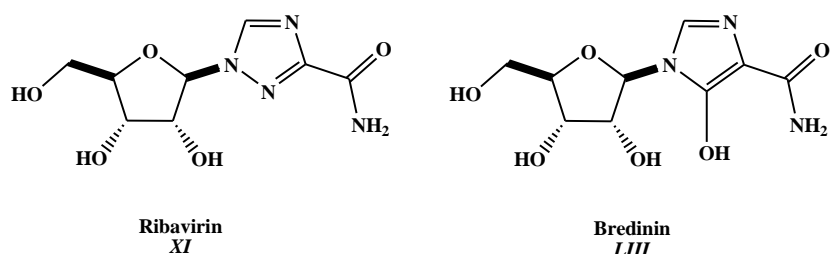
Odlo i sur.¹⁵⁴ su 2007. godine objavili pripravu azida iz etil bromacetata također uz primjenu NaN_3 te njegovu *in situ* transformaciju u 1,2,3-triazol. Variranjem različitih arilnih terminalnih alkina pripremili su seriju 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola regioselektivno i pri tom nisu uočili nastajanje N-H triazola. Produkte su izolirali jednostavnom filtracijom, a tragove bakra u finalnom produktu uklanjali su ispiranjem s 10 %-tnim amonijevim puferom (pH = 8,5).

Kao reagensi trokomponentnih reakcija *in situ* generiranja azida supstitucijom s NaN_3 osim alkil- ili aril-halogenida i tosil derivata mogu se upotrijebiti epoksidi¹⁵⁵ i Baylis–Hilmanovi adukti.¹⁵⁶ Osim NaN_3 kao reagens za transfer azida može služiti i TfN_3 u konjugaciji s alifatskim ili aromatskim primarnim aminom¹⁵⁷ kao i TMSN_3 .^{158,159} Zbog eksplozivne prirode i nestabilnosti TfN_3 u sintezi se kao reagens za transfer azida često upotrebljava imidazol-1-sulfonil azid hidroklorid.¹⁶⁰ Kao katalizator azidacije i cikloadicije u jednom reakcijskom stupnju osim CuI literaturno je poznat i Cu(II) triflat uz odgovarajući reducens.¹⁶¹

Metode provođenja reakcije u jednom stupnju bez izolacije eventualnih međuprodukata (*engl. one-pot* reakcije), osim za 1,3-dipolarnu cikloadiciju, razvijene su i za druge multikomponentne reakcije iz sekvencionalnih inačica. Takve su primjerice Passerinijeva reakcija¹⁶² pripreme α -aciloksi amida, Ugijeva reakcija¹⁶³ pripreme bis-amida te Mannichova reakcija¹⁶⁴ generiranja β -amino-karbonilnog spoja (Mannichove baze).

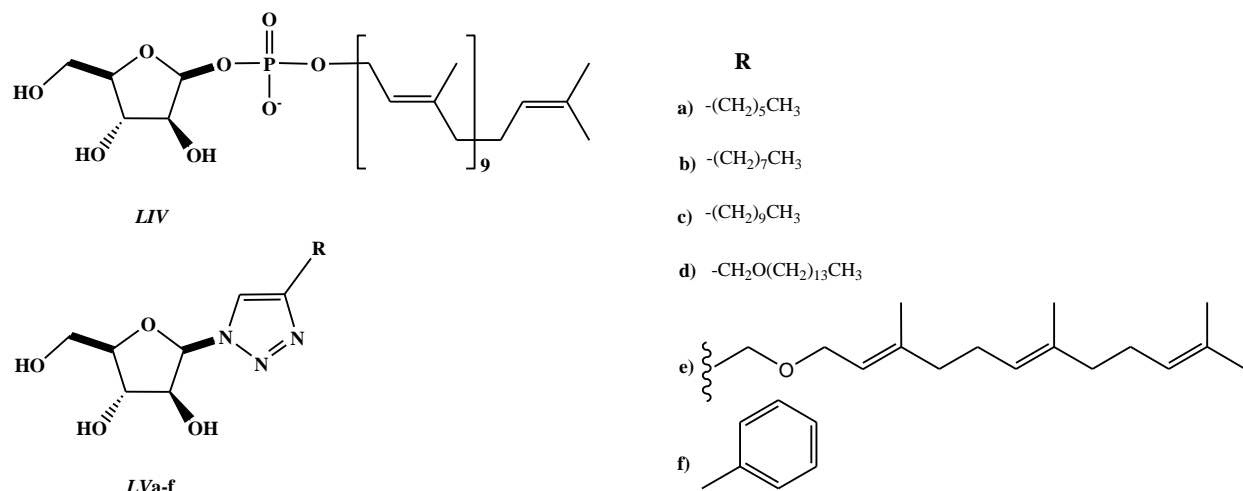
2.5.3.1. Modifikacije nukleozida u domeni nukleobaze

Obzirom na izvanrednu stabilnost triazolnog prstena u kiselim, bazičnim i oksidativnim odnosno reduktivnim uvjetima kao i činjenica da aromatski karakter ovog heterocikličkog sustava omogućuje stvaranje dipol-dipol i π -interakcija te vodikovih veza, ovaj strukturni motiv postao je inspiracija za sintezu brojnih klinički primjenjivih nukleozidnih analoga. Poseban doprinos razvoju novih potencijalno biološki aktivnih derivata s ugrađenom strukturom peteročlanog heterocikličkog motiva dala su otkrića danas dobro poznatih, ribavirina **XI**¹⁶⁵ u terapiji hepatitisa C (HCV) (Slika 7 f, Slika 14), bredinina **LIII** (Slika 14)¹⁶⁶ kao imunosupresivnog agensa te niza sličnih struktura.



Slika 14. Strukture nukleozidnih analoga ribavirina **XI** i bredinina **LIII** s peteročlanim heterocikličkim strukturnim motivom umjesto nukleobaze.

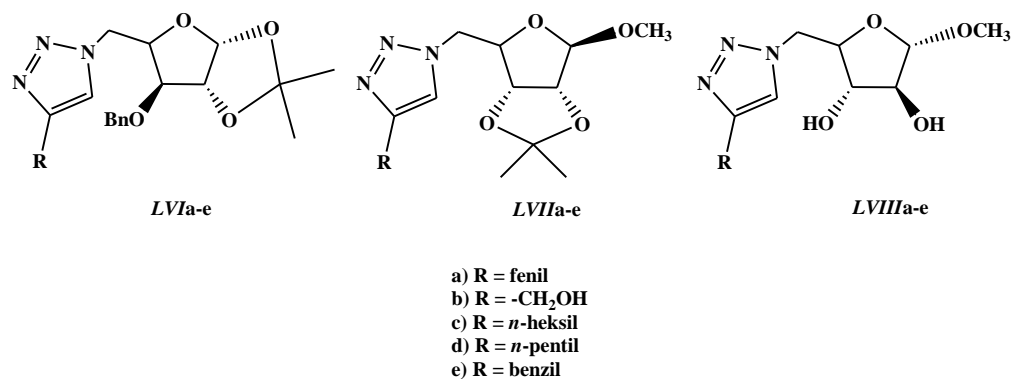
U dizajnu novih struktura do izražaja je došla upravo primjena 1,3-dipolarne cikloadicije koja je rezultirala sintezom niza nukleozidnih analoga. Posebno značajnu primjenu u sintezi imaju β -1'-azido šećeri i karbanukleozidi iz kojih su u reakcijama s nizom terminalnih alkina sintetizirani brojni 1,2,3-triazolni nukleozidni derivati.^{25,167,168,169,170,171} Primjenom klik kemije Wilkinson i sur.¹⁷² objavili su sintezu serije β -arabinoglikozil-triazola **LVa-f** supstituiranih različitim hidrofobnim lancima kao strukturnih analoga poznatog mikobakterijskog inhibitora biosinteze stanične stijenke; dekaprenolfosfoarabinoze **LIV** (Slika 15).



Slika 15. Strukturni analozi **LVA-f** dekaprenolfoarabinoze **LIV**.

Dekaprenolfoarabinoza **LIV** jedan je od ključnih supstrata arabinozil-transferaze, vrste glikozil-transferaze odgovorne za katalitički ciklus izgradnje polisaharidne stanične stijenke mikobakterija. Sintetizirani spojevi biološki su testirani na staničnoj liniji *Mycobacterium bovis* BCG, a rezultati su pokazali da aktivnost pojedinog derivata ovisi isključivo o prirodi hidrofobnog lanca.

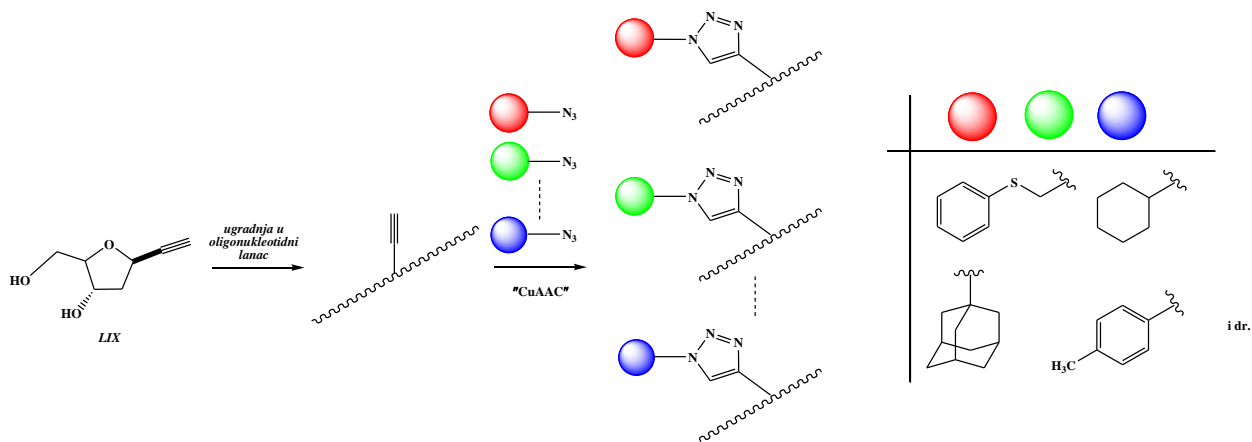
Istraživanjima utjecaja strukturnih analoga nukleozida na inhibiciju rasta mikobakterija bavili su se i Singh i sur.¹⁷³ Sintetizirali su seriju α -D-ksilo-, β -D-ribo- i α -D-arabinofuranozidnih triazolnih derivata (Slika 16) iz odgovarajućih 5'-azido šećera i niza terminalnih alkina te su testirali njihova biološka svojstva na staničnoj liniji *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Pripremljeni spojevi nisu pokazali značajnu inhibiciju rasta stanica mikobakterija u usporedbi s kontrolnim spojevima.



Slika 16. α -D-ksilo- **LVIa-e**, β -D-ribo- **LVIIa-e** i α -D-arabinofuranozidni triazolni derivati **LVIIIa-e**.

Kako bi izbjegli primjenu bakra u katalitičkoj reakciji 1,3-dipolarne cikloadicije Youcef i sur.²⁶ istražili su mogućnosti primjene surfaktanata (površinski aktivnih tvari) i tzv. micelarnu katalizu.¹⁷⁴ Prema ranije objavljenim radovima pretpostavili su kako bi ova vrsta katalize mogla ubrzati kemijsku reakciju i kontrolirati regioselektivnost cikloadicije. Zaključili su da je bakar moguće zamijeniti nekim surfaktantom u reakciji mono- i disupstituiranih alkina s benzilazidom prilikom sinteze analoga ribavirina **XI**, a ključnu ulogu u izboru odgovarajućeg surfaktanta ima upravo vrsta alkina.

Zbog sve veće važnosti kemijski promijenjenih oligonukleotida u svrhu povećanja stupnja selektivnog prepoznavanja i mogućnosti primjene ovih lanaca kao biološkog „alata” molekularne biologije i dijagnostike Nakahara i sur.¹⁷⁵ pristupili su upravo ovom tipu modifikacija. U svrhu sinteze novih oligonukleotida modificiranih u domeni nukleobaze pripravili su oligonukleotid s 1'-etnil-2'-deoksi- β -D-ribofuranozom (**LIX**), te su post-elongacijskom modifikacijom oligonukleotida CuAAC reakcijom s različitim primarnim, sekundarnim, tercijarnim i aromatskim azidima dobili finalni oligonukleotid. On u svojoj strukturi sadrži C-nukleotidne analoge kod kojih je nukleobaza supstituirana 1,2,3-triazolnim prstenom (*Shema 28*).

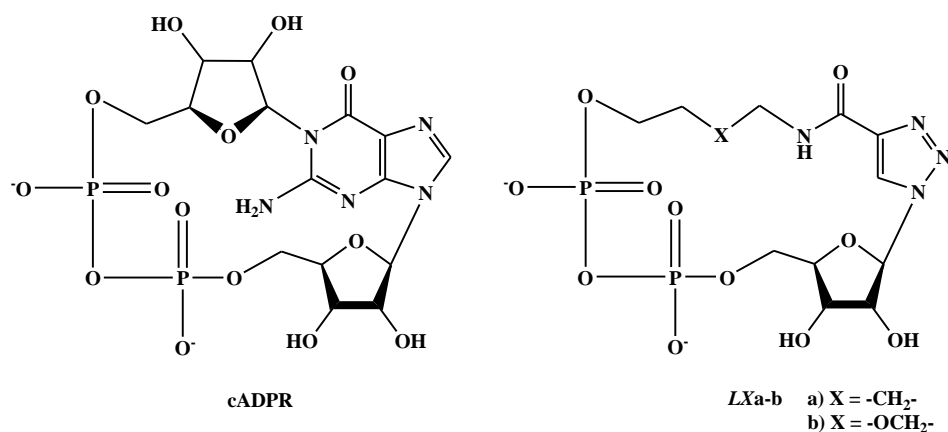


Shema 28. Shematski prikaz sinteze oligonukleotidnog lanca iz 1,2,3-triazolnih nukleozidnih analoga.

Kako bi se poboljšalo reakcijsko iskorištenje i skratilo vrijeme reakcija pored klasičnog načina zagrijavanja sve je češće u primjeni i mikrovalno zračenje kao alternativni izvor energije.¹⁷⁶ Ovaj nekonvencionalni izvor zračenja našao je svoju primjenu i u klik kemiji.¹⁷⁷ Sa stajališta tzv. „zelene kemije” značajnu primjenu ima mikrovalnim zračenjem potpomognuta sinteza bez

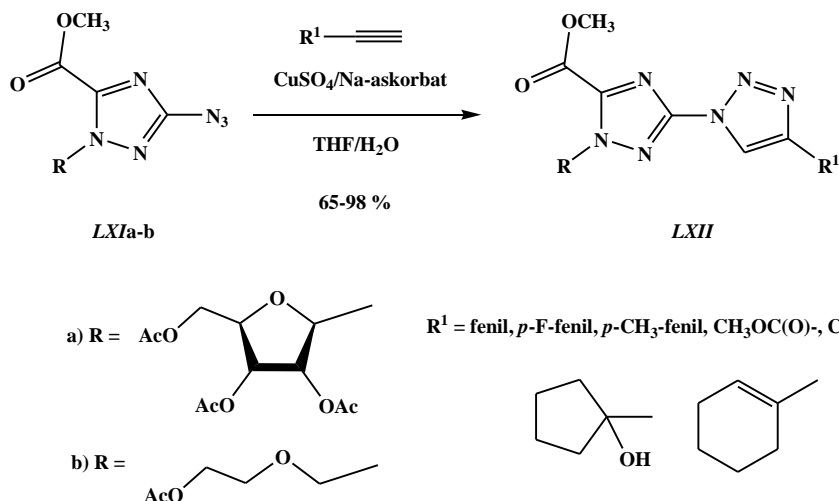
prisutnosti otapala.¹⁷⁸ Tako su Guezguez i sur.¹⁷⁹ objavili Cu(I) kataliziranu regioselektivnu sintezu funkcionaliziranih α - ili β -1,2,3-triazolil-nukleozinih analoga primjenom CuAAC reakcije između α - ili β -2'-deoksiriboze i različitih terminalnih alkina u mikrovalnom reaktoru bez prisutnosti otapala i pri atmosferskom tlaku. Optimizacijom reakcijskih uvjeta skratili su trajanje reakcije s 24 h na samo 1,5 do 3 min.

Zanimljiv sustav u potrazi za novim analogima cikličke adenzin-difosfat riboze (cADPR) primjenom klik kemije odabrali su Li i sur.¹⁸⁰ Poznato je da cADPR kontrolira Cu^{2+} -ovisni stanični odgovor brojnih sustava, a strukturni derivati ove molekule mogli bi pomoći u objašnjavanju mehanizma posredovanja cADPR-a u Cu^{2+} -ovisnoj staničnoj signalizaciji. Upravo su stoga sintetizirani 4-amido-1,2,3-triazolni nukleozidni analozi **LXa-b** (Slika 17), a preliminarna farmakološka ispitivanja pokazala su kako sintetizirani derivati induciraju otpuštanje iona Cu^{2+} u intaktnim humanim Jurkat stanicama.



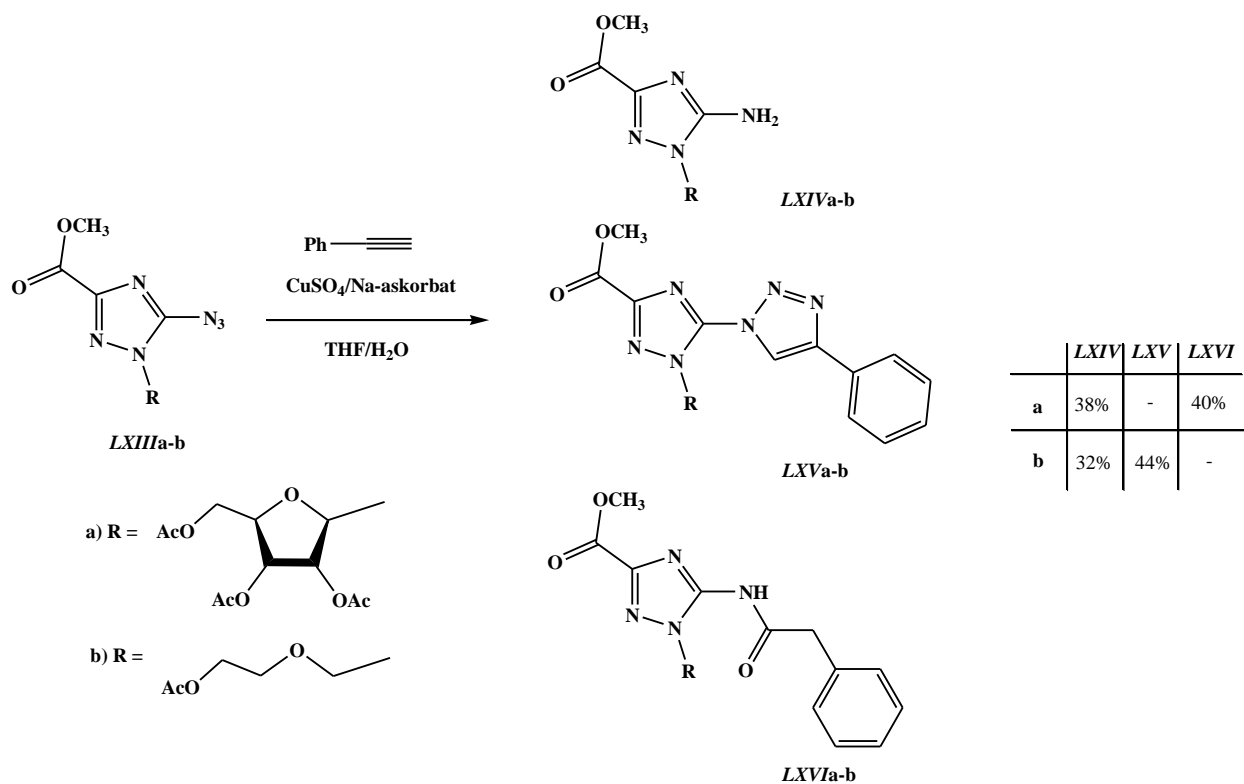
Slika 17. Struktura cADPR i strukturnih analoga **LXa-b**.

Xia i sur.^{181,182} sintetizirali su bistriazolil-nukleozidne analoge kao potencijalne anti-TMV (virus mozaične bolesti duhana) agense primjenom CuAAC reakcije (Shema 29).



Shema 29. Sintetski put pripreve bistriazolil-nukleozidnih derivata opće strukturne formule **LXII**.

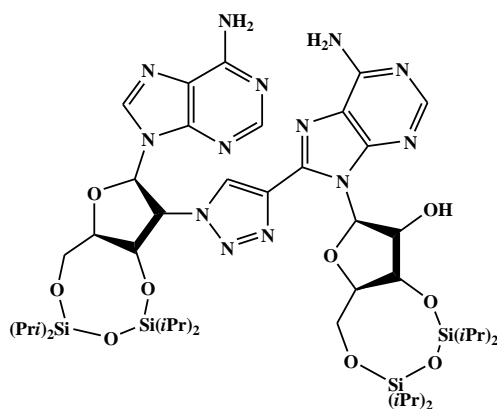
Variranjem različitih terminalnih alkina pripravili su strukturne analoge **LXII** u visokom iskorištenju, međutim, u slučaju 5-azidotriazola **LXIII** (*Shema 30*) Cu(I) katalizirana sinteza 1,2,3-triazola dala je neočekivane rezultate. Naime, u reakciji azida **LXIIIa** s fenilacetilenom nastaju neočekivani produkti, amin **LXIVa** i amid **LXVIa** dok nastanak triazolnog derivata **LXVa** nije uočen čak niti provođenjem reakcije u mikrovalnom reaktoru. U slučaju acikličkog analoga **LXIIIb** triazolni derivat **LXVb** nastaje u relativno niskom iskorištenju, ali je također uočen i nastanak aaminskog derivata **LXIVb**.



Shema 30. Reaktivnost azida **LXIIIa** i **LXIIIb** u uvjetima CuAAC reakcije.

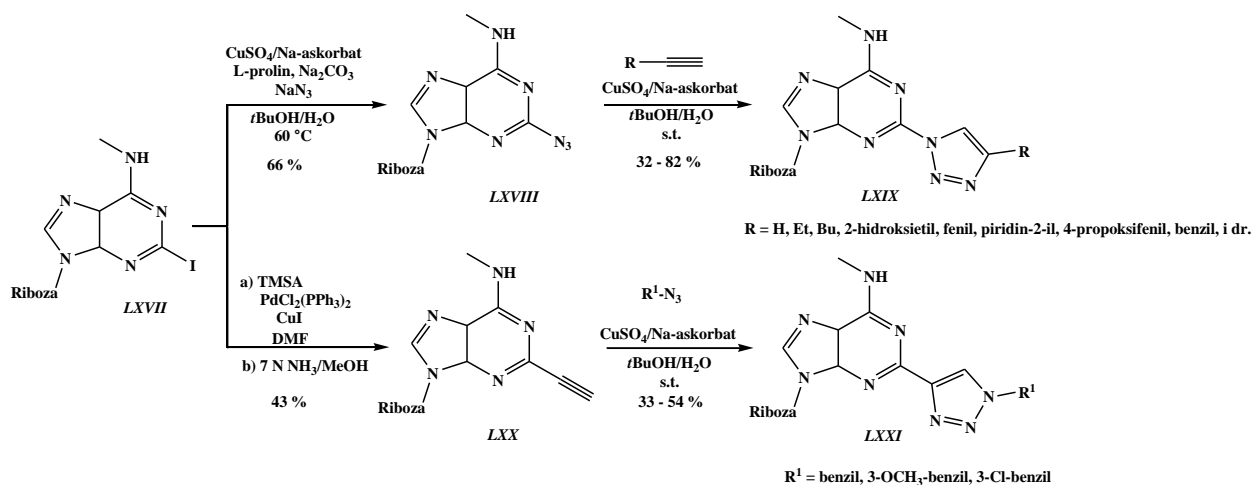
Kao objašnjenje neočekivane reaktivnosti autori pretpostavljaju da azid **LXIII** zbog heterocikličkog prstena siromašnog elektronima kao i steričke ometanosti inducirane prisutnošću vezanog šećera u strukturi nije povoljan reaktant 1,3-dipolarne cikloadicijske reakcije.

Međutim, O'Mahony i sur.¹⁰⁹ su sintezom adozinskih dimera povezanih 1,2,3-triazolnim prstenom pokazali da je CuAAC reakcija ipak izvediva na elektronima siromašnim heterocikličkim sustavima kao što su primjerice purini (Slika 18).



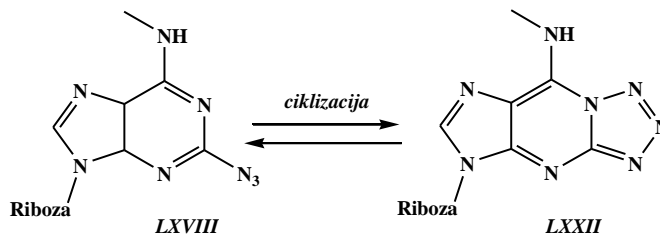
Slika 18. Struktura adozinskog dimera.

Modifikacijom također adenzinskog sustava Cosyn i sur.¹⁸³ sintetizirali su dvije serije 2-(1,2,3-triazolil)adenozinskih derivata (*Shema 31*).



Shema 31. Sintetski put priprave 2-(1,2,3-triazolil)adenozinskih derivata **LXIX** i **LXXI**.

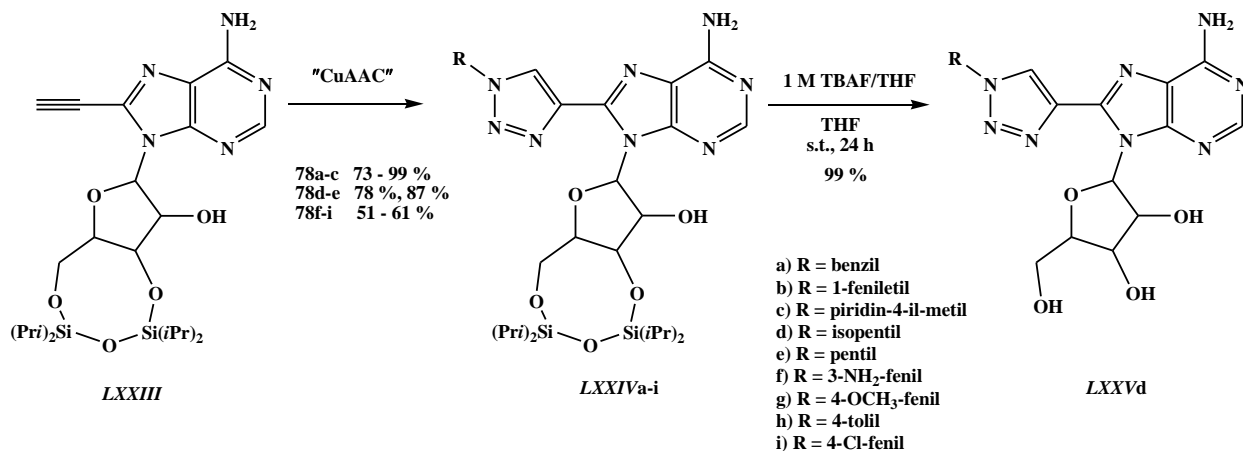
Autori su iz dobivenih rezultata zaključili da bolja iskorištenja daje reakcijski put priprave najprije azida **LXVIII** nukleofilnom supstitucijom s NaN₃ nakon čega slijedi Cu(I) katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija s različitim alkinima i nastanak triazola **LXIX**. Nadalje, iako su reakcijski uvjeti Cu(I) katalizirane nukleofilne supstitucije s NaN₃ i CuAAC reakcije slični, priprava derivata **LXIX** u jednom reakcijskom stupnju dala je neočekivano vrlo nisko iskorištenje. Osim toga, prilikom sinteze azida **LXVIII** autori su uočili i nastanak cikličkog adukta, tetrazola **LXXII** (*Shema 32*) te mogućim pomicanjem reakcijske ravnoteže tijekom cikloadicijske reakcije upravo na stranu tog strukturnog izomera objašnjavaju relativno niska iskorištenja priprave nekih derivata **LXIX**.



Shema 32. Kemijska ravnoteža dva strukturna izomera, 2-supstituiranog adenzinskog derivata **LXVIII** i tetrazola **LXXII**.

Posljednjih godina veliku ekspanziju doživjelo je područje fluorescentnih nukleozidnih analoga u okviru studija struktura nukleinskih kiselina i proučavanju bioloških svojstava kao što su replikacija, transkripcija, rekombinacija i mehanizmi popravka. Najčešći nukleozidni fluorescentni analozi uglavnom su derivati purina. Najviše se upotrebljava 2-aminopurin, a komercijalno su dostupni i derivati pterina i pteridina.

O'Mahony i sur.^{109,184} opisali su funkcionalizaciju C8 položaja adenzina koja je rezultirala sintezom derivata s fluorescentnim svojstvima. Isti sustav upotrijebila je Dyrager sa sur.¹⁸⁵ te su primjenom CuAAC reakcije u mikrovalnom reaktoru uz prethodnu funkcionalizaciju C8 položaja adenzina Sonogashirinom metodom pripravili 8-(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)adenozinske analoge **LXXIVa-i** (Shema 33).

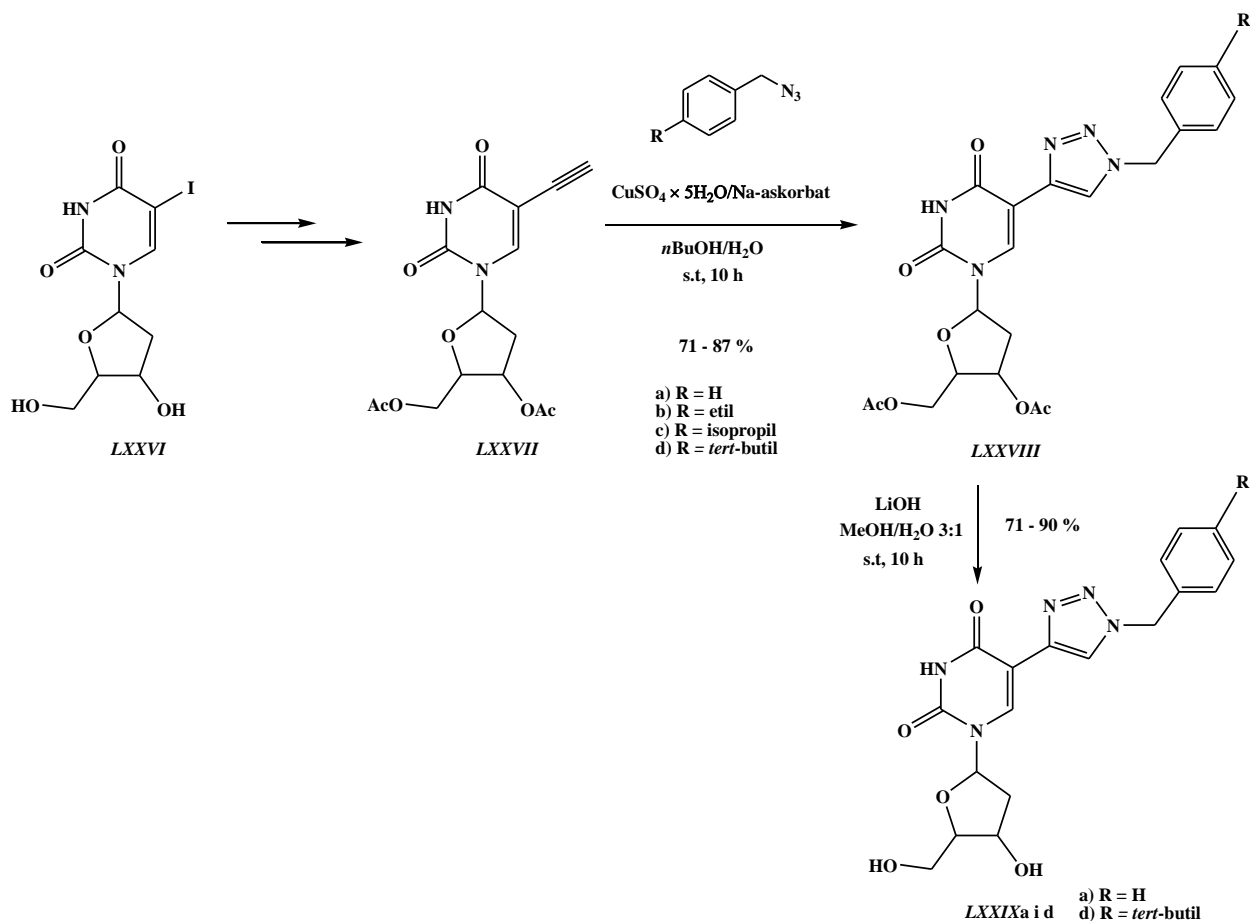


Shema 33. Sintetski put priprave 8-(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)adenozinskih analoga **LXXIVa-i**.

Pripravljeni spojevi pokazali su veliku sposobnost apsorpcije (ekstinkcijski koeficijenti, $\epsilon > 24000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), visoku efikasnost emisije apsorbiranog zračenja (kvantni prinos fluorescencije, *engl. quantum yield*, $\Phi_F > 64 \%$) te visok faktor osvjjetljenja ($\epsilon \cdot \Phi_F$) kao i usklađene i usporedive valne duljine emisije u ovisnosti o vrsti supstituenta na triazolnom prstenu. Fluorescencijska svojstva razlikuju se za derivate s alifatskim supstinentima u usporedbi s aromatskim. Iznimku čini derivat **LXXIVf** čiji koeficijent Φ_F iznosi 0,38 unatoč konjugaciji između aromatskog supstituenta i triazolnog prstena.

Prema statistici Svjetske zdravstvene organizacije (krat. **WHO**, *engl. World Health Organization*) od posljedica nekog oblika tumorskog oboljenja godišnje umre 7,6 milijuna ljudi. Iako rizik oboljenja raste s godinama njima su sve više pogođene i mlađe populacije. Pet

najčešćih organa koje zahvaća neki oblik karcinoma su pluća, jetra, crijeva, želudac i dojke, a sve učestalija smrtnost posljedica je i raka grlića vrata maternice i karcinoma prostate. Među prvim otkrivenim onkološki primjenjivim terapeutcima upravo su nukleozidni analozi (kladribin, klofarabin, kapecitabin, citarabin, fludarabin, gemcitabin, decitabin, floksuridin i dr.). Meneni i sur.¹³ su 2007. godine objavili sintezu serije 5-etinil-2'-deoksiuridinskih analoga s protutumorskom aktivnošću, a Lee i sur.¹⁸⁶ upotrijebili 5-etinil-2'-deoksiuridinski derivat u CuAAC reakciji pripreve triazola **LXXVIIIa-d** (Shema 34).

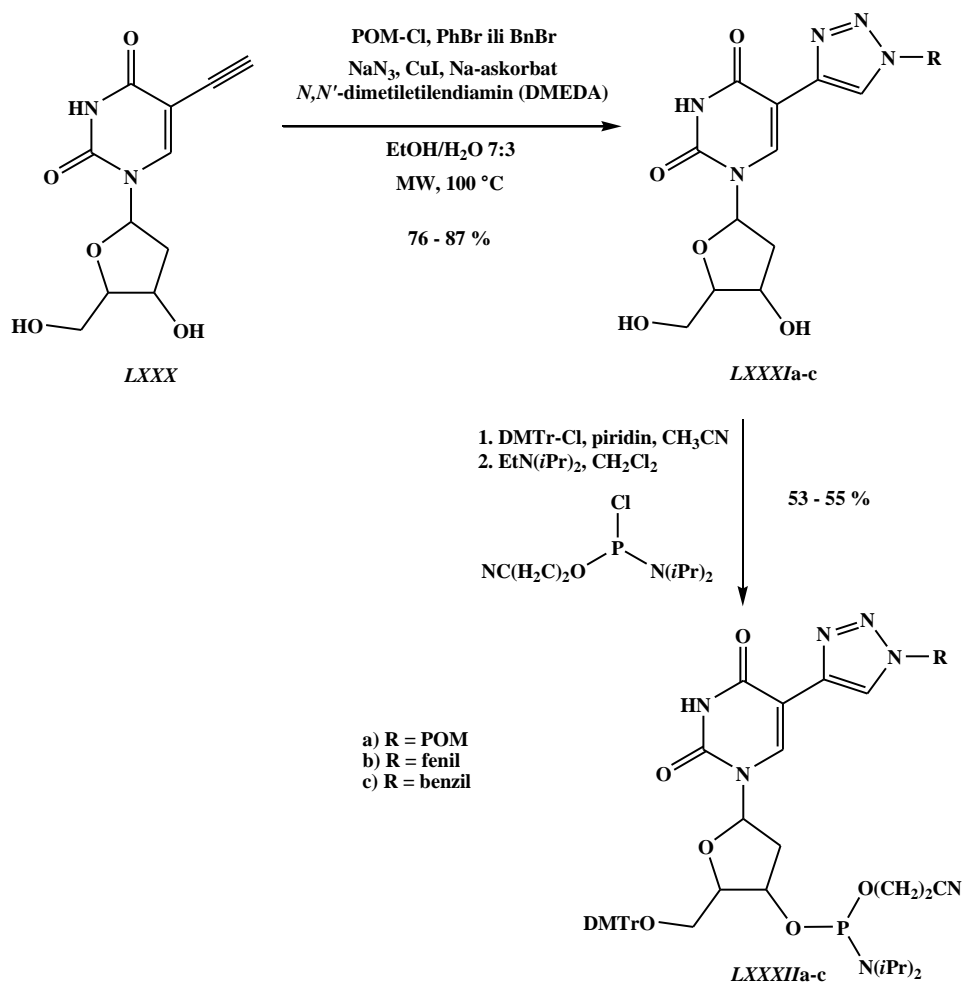


Shema 34. Sintetski put pripreve C5-triazolil-2'-deoksiuridinskih derivata **LXXVIIIa-d**.

Pripravljeni spojevi testirani su na šest humanih tumorskih staničnih linija (bubrega, pluća, dojke, crijeva, želuca i prostate), a najbolju aktivnost pokazao je spoj **LXXVIIIb**. Istovremeno, deacetilirani derivati **LXXIXa** i **LXXIXd** pokazali su nešto slabiju protutumorsku aktivnost u usporedbi s acetiliranim analogima **LXXVIII**. Sintezom C5-triazolil-2'-deoksiuridinskih derivata

te antivirusnim¹⁸⁷ i protutumorskim¹⁸⁸ testiranjima pripremljenih spojeva bavili su se i drugi autori.

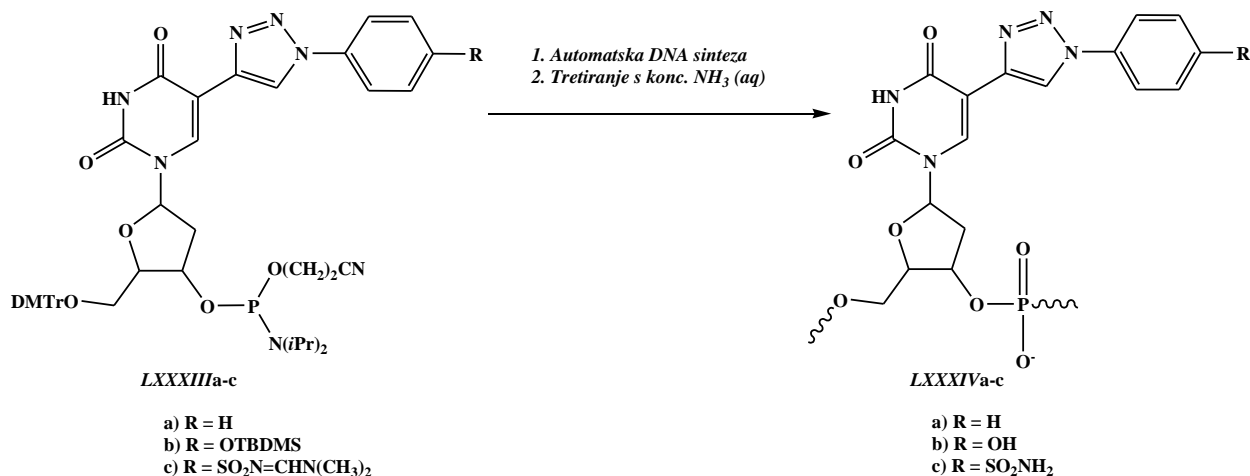
Osim bioloških testiranja brojni radovi govore i o ugradnji C5 modificiranih pirimidinskih analoga unutar dvostruke uzvojnice RNA/DNA te njihovom utjecaju na stabilnost. Dobiveni rezultati potvrdili su da upravo supstitucija nekim heterocikličkim peteročlanim prstenom povećava stabilnost dvostruke uzvojnice.^{189,190,191,192} Kočalka i sur.¹⁹¹ su u dvostruku uzvojnica DNA:RNA inkorporirali C5-triazolil-2'-deoksiuridinske analoge **LXXXIIa-c** (Shema 35).



Shema 35. Sintetski put pripreve C5-triazolil-2'-deoksiuridinskih derivata **LXXXIIa-c**.

Iz dobivenih rezultata utjecaja inkorporiranih triazolnih struktura u veliki utor dvostruke uzvojnice zaključili su općenito da jedan ugrađeni triazolni derivat unutar oligonukleotidnog lanca destabilizira dvostruku uzvojnica dok četiri uzastopno povezana analoga imaju suprotan

efekt. Naime, zamjenom metilne skupine timidina triazolnim supstituentom u lancu 5'-dGTGTTTTGC:3'-rCACAAAACG temperatura mekšanja (T_m) viša je za 14 °C u usporedbi s nemodificiranim lancem. Vrsta supstituenta na triazolnom prstenu dodatno može (de)stabilizirati sustav. Andersen i sur.¹⁹³ proveli su stoga sustavnu studiju utjecaja fenilnog i *p*-supstituiranog fenilnog supstituenta na triazolnom prstenu 2'-deoksiuridina na jakost π - π interakcija unutar lanaca dvostruke uzvojnice (*Shema 36*).

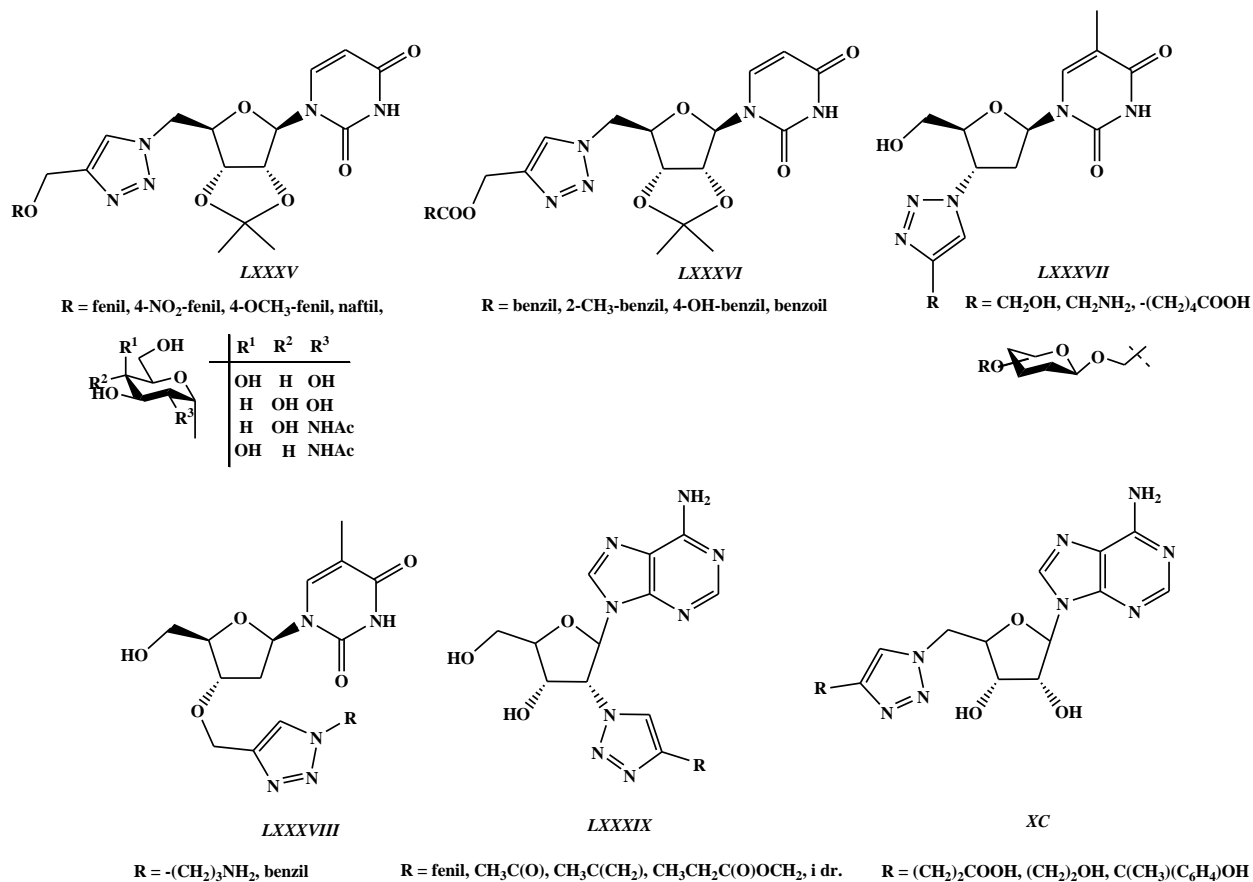


Shema 36. Ugradnja fosforamidatnih triazolnih monomera **LXXXIIIa-c** u oligonukleotidni lanac automatskom sintezom na čvrstom nosaču.

Nakon provedenih hibridizacijskih studija UV spektroskopijom (određivanje T_m) te studija utjecaja π - π interakcija u ovisnosti o stupnju (broju ugrađenih modificiranih monomera **LXXXIIIa-c**) i vrsti ugrađenih monomera primjenom CD spektroskopije autori su zaključili da se modifikacijom oligonukleotidnog lanca stabilnost dvostruke uzvojnice DNA:RNA povećava. Nadalje, najjače π - π interakcije i stoga najstabilniju dvostruku uzvojnica omogućile su modifikacije oligonukleotidnog lanca ugradnjom monomera sa sulfonamidnim supstituentom (**LXXXIIIc**).

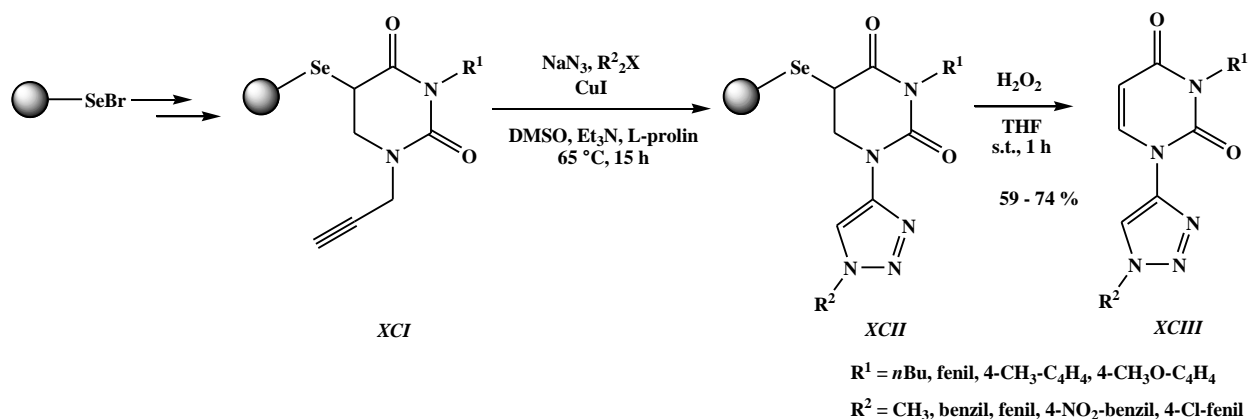
2.5.3.2. Modifikacije nukleozida u domeni šećera i nukleozidni biokonjugati

Osim strukturnih modifikacija nukleozida u domeni nukleobaze, u cilju pronalaska novih potencijalno biološki aktivnih derivata, provedene su i strukturne promjene u domeni šećera. I u ovom području značajnu primjenu nalazi također CuAAC reakcija u sintezi različitih pirimidinskih^{194,195,196,197,198,199} i purinskih²⁰⁰ nukleozidnih analoga (Slika 19).



Slika 19. Strukture pirimidinskih (LXXXV,^{194,195} LXXXVI,¹⁹⁴ LXXXVII^{196,197} i LXXXVIII) i purinskih (LXXXIX i XC)²⁰⁰ nukleozidnih derivata s triazolnim supstituentom.

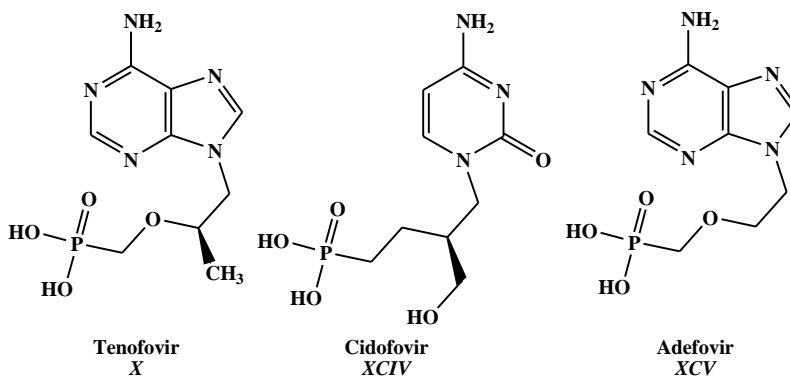
Osim modifikacija šećernog dijela molekule nukleozida, furanozni prsten moguće je i potpuno zamijeniti nekim heterocikličkim ili čak acikličkim supstituentom. Tako su Cao i Huang²⁰¹ objavili paralelnu sintezu serije uridinskih analoga na čvrstom nosaču selenidne smole primjenom CuAAC reakcije kao ključnog reakcijskog stupnja (Shema 37).



Shema 37. Sinteza triazolnih nukleozidnih analoga **XCIII** na čvrstom nosaču.

Poznati antivirusni agens tenofovir **X** (Slika 7 e, Slika 20) te njegovi strukturni analozi cidofovir **XCIV** i adefovir **XCIV** (Slika 20) primjeri su acikličkih nukleozidnih derivata.^{202,203,204,205}

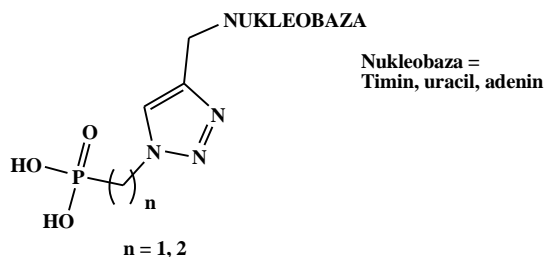
Koncept zamjene šećernog dijela molekule nukleozida acikličkim supstytutentom prije 25 godina postao je temeljem razvoja derivata s potencijalnim antivirusnim djelovanjem.



Slika 20. Strukture poznatih antivirusnih lijekova tenofovira **X**, cidofovira **XCIV** i adefovira **XCIV**.

S bogatim ranije stečenim iskustvom pripreme modificiranih 1,2,3-triazolilnih aciklonukleozida Elayadi i sur.²⁰⁶ objavili su sintezu modificiranih struktura poznatih antivirusnih spojeva primjenom 1,3-dipolarne cikloadicije. Autori su, naime, unutar acikličkog supstytutenta ugradili triazolni prsten čime su fleksibilnost strukture dodatno ograničili (Slika 21). Osim toga, variranjem dužine lanca pripremljenih acikličkih nukleozidnih triazolil-fosfonata pratili su utjecaj na biološku aktivnost testiranih spojeva na HCV i HIV. Pronašli su da duljina lanca nema

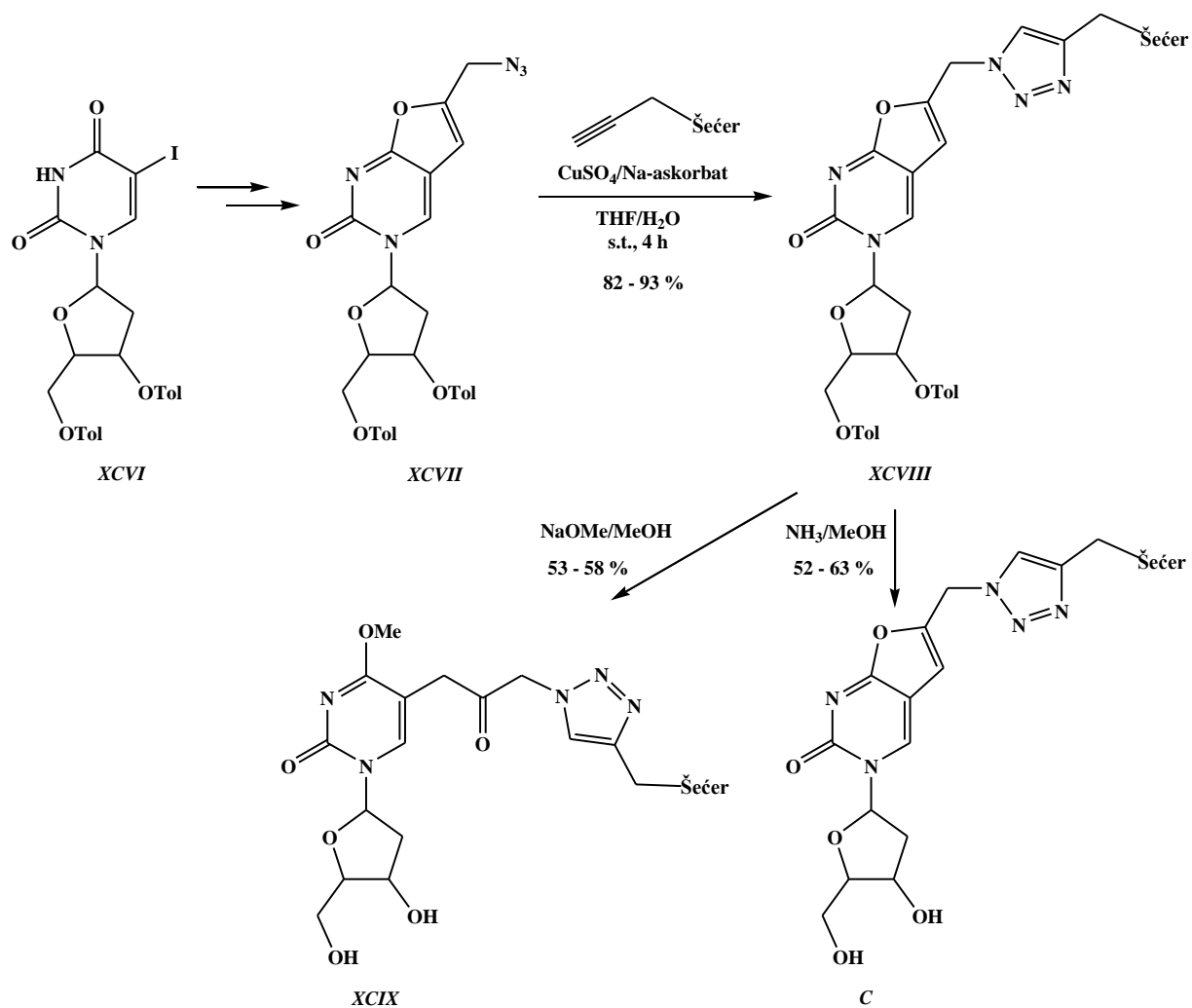
dramatičan utjecaj na aktivnosti i citotoksičnost u slučaju pirimidinskih derivata dok u slučaju purinskih analoga dužina lanca utječe na aktivnost.



Slika 21. Strukturni motiv acikličkih nukleozidnih triazolil-fosfonatnih analoga.

Trakossas i sur.²⁰⁷ pripravili su slične triazolom modificirane nukleozide s jednom ili dvije nukleobaze u svrhu biološke evaluacije antioksidativne i reduktivne sposobnosti.

Osim u sintezi nukleozidnih mono-derivata modificiranih u domeni šećera, CuAAC reakcija primijenjivana je i u dizajnu nukleozidnih biokonjugata²⁰⁸ i modificiranih oligonukleotida.^{209,210} Tako su u okviru dizajna novih anti-VZV derivata Jin i sur.²⁰⁸ objavili zanimljivu sintezu serije furo[2,3-*d*]timidinskih nukleozidnih konjugata **XCVIII** sa šećerima primjenom Sonogashirine reakcije i klik kemije (*Shema 38*).



Shema 38. Sintetski put priprave nukleozidnih konjugata **XCIX** i **C**.

U posljednjem reakcijskom stupnju deprotekcije 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih konjugata **XCVIII** dobivene su dvije nove serije ugljikohidratnih konjugata, **XCIX** i **C**.

2.5.4. Primjena triazolnih nukleozidnih derivata

Izuzetno široka primjena CuAAC reakcije očituje se u iznimno velikom broju radova iz različitih područja; dizajn novih lijekova,^{211,212,213} biokonjugacija,^{214,215,216,217,218,219,220,221} kemija polimera i razvoj novih materijala^{222,223,224,225} te srodna područja, posebice supramolekularna kemija.^{226,227,228} Osim toga, primjena je prisutna i u području; označavanja DNA²²⁹ i sinteze oligonukleotida,²³⁰ povezivanja glikozidnih klastera²³¹ i dendrimera,^{232,233} pripremi stacionarnih faza za HPLC kolone²³⁴ i dr.

Od otkrića i adaptacije Huisgenove 1,3-dipolarne [3+2] azid-alkin cikloadicije uvođenjem Cu(I) katalizatora CuAAC reakcija nije dobila samo naziv „klik” nego je općenito postala sinonimom brze, mnogostrane i jednostavne sintetske metode sa širokim područjem primjene. Upravo je stoga značajno utjecala na razvoj velikih klastera spojeva s potencijalnom primjenom u biološkim sustavima.

Kao veliko područje primjene CuAAC reakcije posebno se izdvajaju modifikacije nukleinskih kiselina i njihovih oligomera. Kako je dano u dosadašnjem pregledu literature, nukleinske kiseline moguće je modificirati na tri karakteristična položaja: nukleobazi, šećeru ili fosfodieterskoj internukleotidnoj vezi. Ipak, najčešća je modifikacija upravo ona na nukleobazi zbog prisutnosti reaktivnih mjesta, relativno kratkih sintetskih puteva i široke primjene tako derivatiziranih produkata. Prednosti modifikacija nukleobaze u odnosu na šećer ili fosfatnu okosnicu su što takve modifikacije još uvijek ne ometaju produljenje polinukleotidnog lanca,²³⁵ a očuvana je i komplementarnost dvostruke uzvojnice jer nisu narušene Watson-Crickove interakcije.^{236,237} Pozicije modifikacija nukleobaza su različite i kod purina uglavnom obuhvaćaju 7-aza i -deaza položaj, N9 položaj te supstitucije egzocikličkih amino skupina adenina i gvanina dok je kod pirimidina najčešća modifikacija C5 položaja, supstitucija egzocikličke amino skupine citozina te N1 položaj. Ipak, kako bi se izbjegla Watson-Crickova regija i omogućila ugradnja modificiranih nukleotida upravo u veliki utor DNA/RNA dvostruke uzvojnice najčešće se modificiraju C5 položaj kod pirimidinskih te 7-aza/-deaza i nešto rjeđe C8 položaj purinskih nukleobaza. Takva strategija modifikacija omogućuje primjenom klik kemije konjugaciju molekula u svrhu provođenja različitih studija od terapijskih učinaka do fluorescentne vizualizacije i konformacijskih analiza. Osim navedenih funkcija, nukleobazni analozi kao takvi

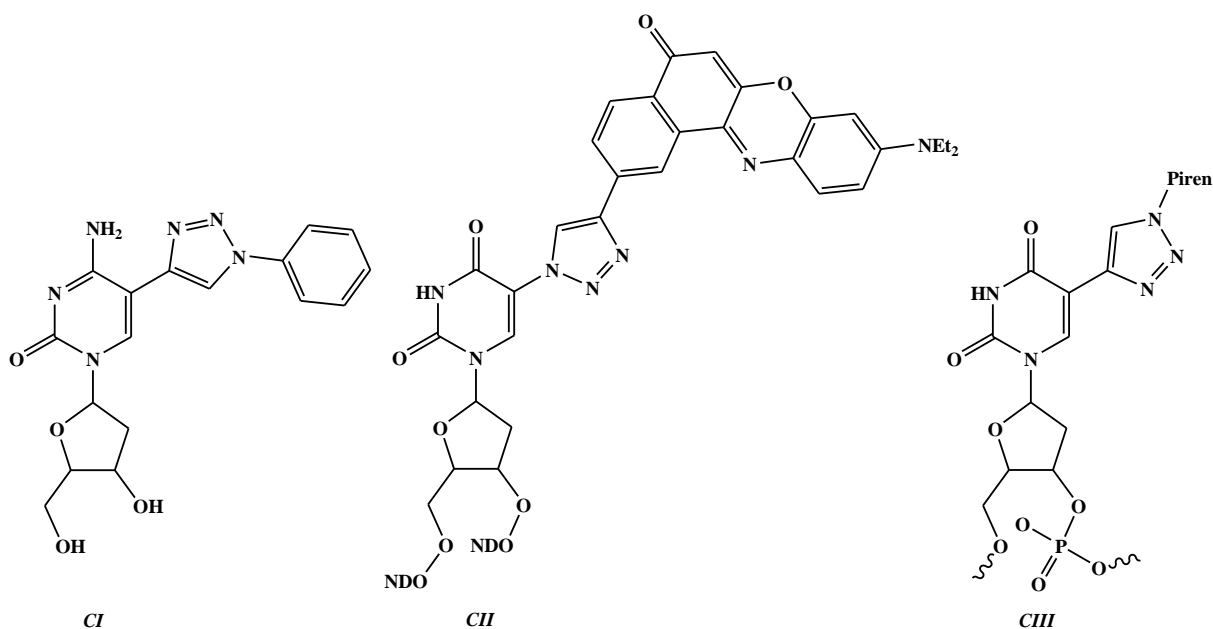
tvore i paletu antivirusnih i protutumorskih derivata. Implementacija CuAAC reakcije u razvoj novih terapijskih agensa inspirirana je otkrićima ranije spomenutim, 1,2,4-triazolnog antivirusnog nukleozidnog derivata ribavirina **XI**^{238,239} i potencijalnog anti HIV agensa, zidovudina **IX**.²⁴⁰

Zahvaljujući koplanarnoj orijentaciji triazolnog prstena u C5 položaju u odnosu na pirimidinski prsten uracila¹⁹¹ odnosno citozina,²⁴¹ ugradnjom takvih struktura u oligonukleotidne lance omogućena je značajna stabilizacija dvostruke uzvojnice nastale hibridizacijom tako modificiranih lanaca s komplementarnim DNA odnosno RNA lancima,^{191,193,242} kao i trostruke uzvojnice nastale hibridizacijom s dvostrukom uzvojnicom DNA.²⁴² Na temelju UV krivulja određene su temperature mekšanja (T_m) pojedinih hibrida te je utvrđeno da feniltriazolni supstituenti u C5 položaju pirimidina značajno stabiliziraju dvostruku uzvojnici DNA:RNA iz čega se može zaključiti o visokom afinitetu dizajniranih oligonukleotidnih DNA sekvenci upravo za RNA.²⁴³ Ova spoznaja veoma je značajna sa stajališta razvoja novih terapijski primjenjivih oligonukleotida (*engl. antisense therapy*). Naime, dizajniranjem modificiranih jednolančanih DNA sekvenci (krat. ASOs, *engl. antisense oligonucleotides*) s visokim afinitetom za mRNA transkripte mogli bi se učinkovito kontrolirati procesi ekspresije ciljanih proteina, posebno translacijski korak kao posljednja faza biokemijskog puta sinteze proteina. Osim ASOs sekvenci značajnu ulogu u „antisense” terapiji (*engl. antisense therapy*) imaju i dvolančane RNA sekvence (krat. siRNAs, *engl. short-interfering RNAs*) gdje posebno dolaze do izražaja modifikacije purinskih nukleobaza.²⁴⁴

Triazolni purinski odnosno pirimidinski analozi specifično označeni radikalskim supstituentima našli su primjenu i u proučavanju struktura i konformacija DNA i RNA oligomera elektronskom paramagnetskom rezonancijom/spektroskopijom elektronske spinske rezonancije (EPR/ESR),²⁴⁵ a specifično obilježeni derivati, najčešće radioaktivnim fluorom (¹⁸F), koriste se u praćenju distribucije i ponašanja bioaktivnih molekula u *in vivo* uvjetima pozitron emisijskom tomografijom (PET).²⁴⁶

Doprinos CuAAC reakcije očituje se i u vezanju različitih fluorescentnih markera na nukleobaze, a nerijetko je fluorescencija posljedica samog generiranja triazolnog prstena (C8 položaj adenzina).^{247,185} Prvi primjer fluorescencije inducirane samim uvođenjem triazolnog prstena u sustav primjenom CuAAC reakcije bez vezanja dodatnog fluorofora bila je sinteza citidinskog analoga **CI**,²⁴⁸ a iste godine sintetiziran je i uridinski analog **CII** klik konjugacijom fluorofora

Nile Red (Slika 22).²⁴⁹ Primjenom klik kemije Ostergaard i sur.²⁵⁰ vezali su pirenski fluorofor na C5 položaj uridina te tako priredili analog **CIII** (Slika 22). On se pokazao izuzetno uspješnim u detekciji polimorfizma pojedinačnog nukleotida (SNP) zbog izrazitog smanjenja efikasnosti emisije apsorbiranog zračenja (Φ_F) u prisutnosti krivo sparenih sekvenci (*engl. mismatched sequences*). Fluorescentni oligonukleotidni sustavi predstavljaju značajan biološki alat za vizualizaciju specifičnih svojstava nastalih njihovim povezivanjem sa ciljanim oligonukleotidima ili proteinima, a također mogu dati i brojne informacije o odnosu strukture i reaktivnosti (krat. SAR, *engl. Structure-Activity Relationship*).



Slika 22. Primjeri fluorescencijskih C5 modificiranih pirimidinskih klik derivata.

Da je 1,2,3-triazolni prsten prisutan kao ključni farmakofor biološki aktivnih molekula²⁵¹ svjedoči nekoliko potencijalnih farmaceutika u posljednjem stadiju kliničkih ispitivanja, a koji u svojoj strukturi sadrže upravo ovaj prsten.²⁵² Posebnu skupinu potencijalnih lijekova s 1,2,3-triazolnim prstenom čine C5 modificirani pirimidinski derivati, a ekspanziju njihova razvoja možemo zahvaliti 5-fluorouracilu (5-FU) i drugim C5 modificiranim nukleozidima kao što su 5-jodo-2'-deoksiuridin, 5-trifluorometil-2'-deoksiuridin te brojni 5-alkenilni i 5-alkinilni derivati 2'-deoksiuridina. Mehanizam specifičnog protutumorskog djelovanja 5-fluorouracila temelji se na inhibiciji timidilat sintetaze kao jednog od ključnih enzima u biokemijskom ciklusu sinteze stanične DNA. Timidilat sintetaza katalizira transformaciju 2'-deoksiuridin-5'-monofosfata u

prisutnosti koenzima 5,10-metilentetrahidrofolne kiseline u timidin-5'-monofosfat. Međutim, kada je supstrat enzima modificiran u C5 položaju tada je onemogućena disocijacija nastalog kompleksa enzim-supstrat-koenzim i na taj je način inhibirana biosinteza timidin-5'-monofosfata. Cilj protutumorske terapije je postići spomenutu aktivnost selektivno u malignim stanicama što je bio i poticaj razvoju novih derivata neselektivnog i visoko toksičnog 5-FU-a.

U razvoju novih biološki primjenjivih sustava osim pirimidinskih 1,2,3-triazolnih derivata zastupljeni su i purinski derivati s istim peteročlanim heterocikličkim prstenom i to posebno kao potencijalni agonisti odnosno antagonisti purinskih receptora kao ciljanih molekula potencijalnih lijekova.^{253,254}

Iz gore navedenog, pored brojnih primjera prisutnosti 1,2,3-triazola kao strukturnog motiva molekula s biološkom aktivnošću i to kao:

- a) potencijalnih citostatika, virostatika, antiproliferativnih agensa i GABA-antagonista, antifungika te anti HIV i antimikrobnih agensa;
- b) sintetskih intermedijera za antibiotike, antihistaminike, muskarinske antagoniste za liječenje Alzheimerove bolesti, rotaksane i kemiluminiscentne spojeve te poliheterocikličke spojeve s neuroleptičkom aktivnošću,

1,2,3-triazolni heterocikli pronašli su i širu industrijsku primjenu. Tako se danas koriste kao boje i fotostabilizatori u industriji optičkih vlakana,²⁵⁵ inhibitori korozije metala i legura,^{256,257} svjetlosni stabilizatori organskih materijala i polimera te u agronomiji kao insekticidi,²⁵⁸ fungicidi,²⁵⁹ herbicidi i regulatori rasta.^{260,261}

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Otapala su destilirana s odgovarajućih sredstava za sušenje kratko vrijeme prije upotrebe.

Tankoslojna kromatografija provedena je na folijama silikagela DC-plastikfolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), a spojevi su detektirani UV svjetlom pri 254 i 365 nm te parama joda. Određene R_f vrijednosti su približne.

Preparativna kromatografija provedena je na staklenim pločama (20·20 cm) sa slojem silikagela debljine 2 mm Kieselgel 60 PF₂₅₄ (Merck). Ploče su aktivirane 2 sata na 100 °C. Osim toga, preparativna kromatografija provedena je i na staklenim pločama (20·20 cm) sa slojem silikagela debljine 2 mm TLC-plates SIL G-200 UV₂₅₄ (Macherey-Nagel). Otapala i njihovi volumni omjeri za tankoslojnu kromatografiju navedeni su u eksperimentalnom dijelu za svaki spoj.

Flash kromatografija provedena je na stupcu primjenom silikagela Kieselgel 60, high-purity grade, pore size 60 Å, 220–440 mesh particle size, 35–75 µm particle size (Fluka).

Kromatografija na lijevku provedena je primjenom silikagela Kieselgel 60 F₂₅₄ (0,063–0,200 mm) (Merck).

Analitički uzorci sušeni su na sobnoj temperaturi i tlaku 2,6 Pa.

Temperature tališta pripremljenih spojeva određene su na Koflerovom mikroskopu i nisu korigirane.

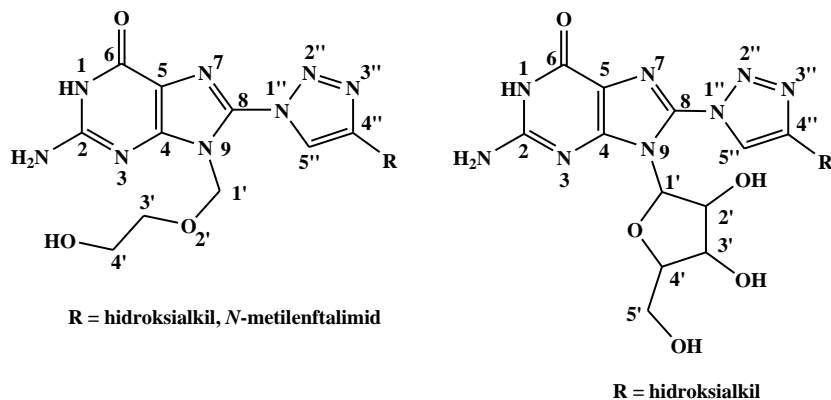
UV spektri snimljeni su na Phillips (Pye Unicam) PU-8700 UV/VIS spektrofotometru u kvarcnim kivetama, a uzorci su otopljeni u metanolu. Apsorpcijski maksimumi (λ_{\max}) izraženi su u nanometrima (nm), a ekstinkcijski koeficijenti ($\log \varepsilon$) u dm³ mol⁻¹ cm⁻¹.

Fluorescencijski spektri snimljeni su na Varian Cary Eclipse spektrofotometru.

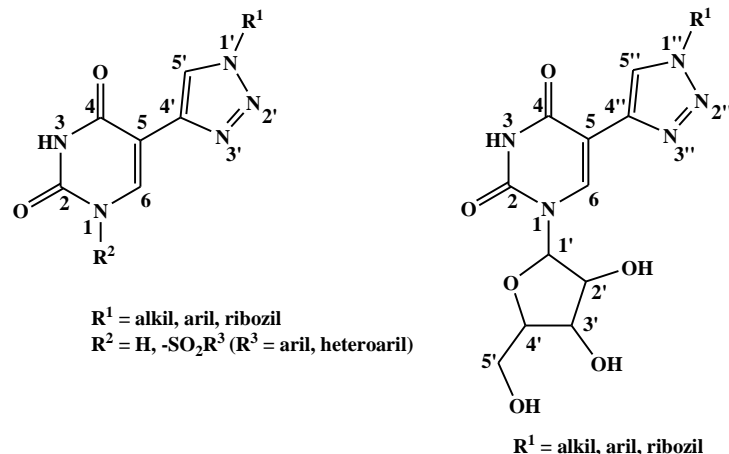
FTIR (*engl. Fourier Transform Infrared*) spektri snimljeni su na spektrofotometru Perkin-Elmer Infrared Spectrofotometer 297 tehnikom KBr pločice. Frekvencije karakterističnih vrpca izražene su uobičajeno u obliku valnih brojeva (ν) čija je mjerna jedinica cm⁻¹.

Za praćenje tijeka cikloadicijskih reakcija pripreve triazolnih derivata uracilne serije kao i provjeru čistoće izoliranih produkata korišten je Shimadzu® HPLC uređaj (*solvent delivery unit; LC-20AT, PDA detector; SPD-M20A*) s kolonom *Nucleosil 100-07 C-18, Reverse Phase 250 mm × 8.0 mm*.

¹H NMR i ¹³C NMR spektri snimljeni su na Bruke Avance DPX 300 i 600 (300/75 Hz i 600/150 MHz) u DMSO-*d*₆ (ako nije drugačije navedeno). Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm u odnosu na TMS kao unutrašnji standard [kalibracija je provedena prema DMSO-*d*₆ ($\delta_{\text{H}} = 2,50$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39,51$ ppm)], a konstante sprege (*J*) u hercima (Hz). Dvodimenzijski COSY (*engl. Correlation Spectroscopy*), NOESY (*engl. Nuclear Overhauser Effect*) i HMQC (*engl. Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) spektri snimljeni su na 20 °C uz upotrebu standardnog programskog paketa Varian Gemini. Numeracija atoma radi asignacije NMR spektara prikazana je na Slici 1 za purinske derivate (što slijedi nomenklaturno obilježavanje spojeva uobičajeno u purinskoj kemiji) odnosno na Slici 2 za pirimidinske derivate gdje smo za osnovu uzeli uracil (što djelomično slijedi nomenklaturno obilježavanje spojeva u odnosu na prioritete pojedinih prstenova ili funkcionalnih skupina).



Slika 1. Opća struktura purinskih derivata.



Slika 2. Opća struktura pirimidinskih derivata.

Maseni spektri visoke rezolucije triazolnih derivata uracilne serije i sulfonilnih triazolnih derivata snimljeni su na kvadrupolnom *time of flight* masenom spektrometru (analizator masa s vremenom leta) Micromass[®] Q-ToF2 tvrtke Waters sa Z - sprej sučeljem koji detektira ione u intervalu od 100 do 2000 Da u kontinuiranom modu. Kao vanjski kalibracijski standardi upotrijebljeni su rezerpin i sulfadimetoksin definirane mase ($[M+H]^+ = 609,2812 \text{ Da}$ i $[M+H]^+ = 311,0814 \text{ Da}$). Ionizacija uzoraka vršila se elektroraspršenjem (ESI) s radom u pozitivnom (ES^+) modu uz napon izvora od 3,5 kV i kolizijske ćelije od 30 eV. Spektri su snimljeni u rasponu m/z 10–1000 Da. Brzina injektiranja uzorka bila je 5–10 $\mu\text{L}/\text{min}$, a protok desolvacijskog plina 500 L/h. Temperatura kapilare bila je 100 °C, a desolvacijska temperatura održavana je na 150 °C.

Spektri mase visoke rezolucije purinskih i uridinskih derivata triazola snimljeni su tandemskim uređajem MALDI-TOF/TOF (matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja - analizator masa s vremenom leta) 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) opremljenim Nd:YAG laserom koji generira laserski puls zračenja valne duljine 355 nm s učestalošću od 200 Hz u pozitivnom modu. Snimanje je izvršeno uz 1600 laserskih pulseva po spektru, raspon m/z 100–1000 Da, fokus masa 500 Da i vrijeme zadržavanja 500 ns. Točnost određivanja masa od 5 ppm dobivena je internom kalibracijom.

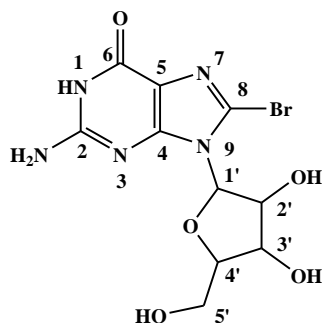
Identifikacijski maseni spektri (ESI-MS) spojeva **35** i **36** snimljeni su u Laboratoriju za kemiju ugljikohidrata, peptida i glikopeptida Instituta Ruđer Bošković primjenom LCMS uređaja Agilent 6410 Triple Quad[®] tvrtke Agilent Technologies s elektronskim multiplikatorom kao detektorom koji detektira ione u intervalu m/z 0–2000 Da u kontinuiranom modu. Kao

kalibracijski standard korišten je ESI-L *Low Concentration Tuning Mix* Agilent Technologies. Ionizacija uzoraka vršila se elektroraspršenjem (ESI) s radom u pozitivnom (ES^+) i negativnom (ES^-) modu uz napon izvora od 135 V i kolizijske ćelije 0–15 eV. Spektri su snimljeni u rasponu m/z 10–1000 Da. Brzina injektiranja uzorka bila je 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, a protok desolvacijskog plina dušika 360 L/h. Desolvacijska temperatura održavana je na 300 °C.

Sinteza u mikrovalnom reaktoru provedena je pomoću instrumenta CEM Discover[®] LabmateTH/ExplorerPLS[®] single mode microwave reactor primjenom tehnike otvorenog sustava te instrumenta Monowave 300[®] (Anton Paar) u zatvorenom sustavu.

3.2. Priprava spojeva

3.2.1. Priprava C8 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata gvanozina



3.2.1.1. 2-Amino-8-bromo-9-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-purin-6(9*H*)-on (**2**); 8-bromgvanozin **2**.

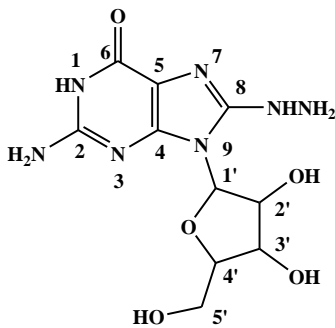
8-Bromgvanozin **2** pripravljen je prema literaturno poznatom propisu.^{262,263,264,265}

U suspenziju gvanozina **1** (1 g, 3,5 mmol) u vodi (6 mL) dokapava se vodena otopina broma* (28 mL) kap po kap u razmacima od 2–3 sekunde, tako da između svakog dodatka nove kapi nestane narančasta boja. Ukupno vrijeme dokapavanja je 4–6 min. Bijeli talog potom se brzo filtrira i ispire najprije s 30 mL hladne vode, a potom s 30 mL hladnog acetona te je tako dobiveno 1,27 g (kvant.) bijelog taloga 8-bromgvanozina **2**. Sirovi produkt prekrizaliziran je iz vode.

*Bromna voda dobivena je otapanjem 1 mL broma u 100 mL vode i miješanjem (oko 15 min) do potpunog otapanja broma i homogenizacije otopine.

t.t. 193 °C (193 °C)²⁶⁵; $R_f = 0,5$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 262, $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,00; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3335 (s), 3157 (s), 2933 (m), 1692 (s), 1642 (s), 1523 (w), 1469 (w), 1339 (w), 1293 (w), 1220 (w), 1128 (w), 1090 (m), 1025 (w), 984 (vw), 911 (vw), 872 (w), 776 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 10,79 (s, 1H, NH-1), 6,48 (s, 2H, NH₂), 5,69 (d, 1H, *J* = 6,3 Hz, H-1'), 5,41 (bs, 1H, OH-2'), 5,04 (bs, 1H, OH-3'), 5,01 (t, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-2'), 4,89 (bs, 1H, OH-5'), 4,14 (dd, 1H, *J* = 3,6 Hz, *J* = 5,1 Hz, H-3'), 3,86 (dd, 1H, *J* = 5,1 Hz, *J* = 8,7 Hz, H-4'), 3,65 (dd, 1H, *J* = 5,0 Hz, *J* = 11,8 Hz, H-5'_a), 3,52 (dd, 1H, *J* = 5,6 Hz, *J* = 11,8 Hz, H-5'_b); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 155,37 (s, C-6), 153,41 (s, C-2), 152,03 (s, C-4), 121,03 (s, C-8),

117,48 (s, C-5), 89,66 (d, C-1'), 85,82 (d, C-4'), 70,46 (d, C-2'(C-3')), 70,28 (d, C-3' (C-2')), 61,97 (t, C-5'). Elem. anal. račun za C₁₀H₁₂BrN₅O₅ (*M*_r = 362,137): C 33,17 %; H 3,34 %; N 19,34 %; nađeno C 32,68 %; H 3,12 %; N 19,15 %.



3.2.1.2. 2-Amino-9-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-8-hidrazinil-1*H*-purin-6(9*H*)-on (**3**); 8-hidrazingvanozin **3**.

8-Hidrazingvanozin **3** pripravljen je prema literaturno poznatom propisu Metodom 1^{266,267} i uz modifikaciju (Metoda 2) u višem reakcijskom iskorištenju.

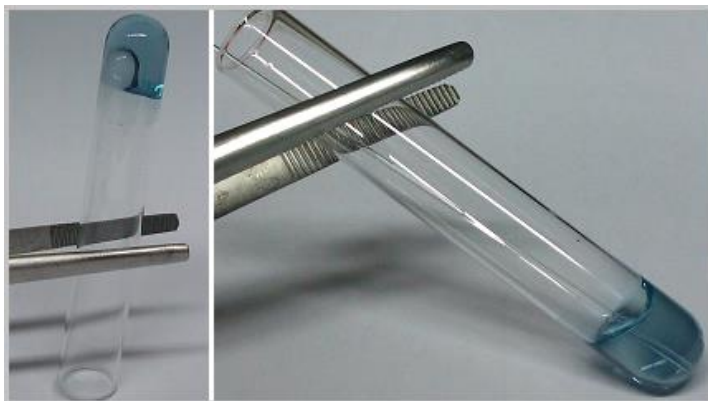
3.2.1.2.1. Metoda 1

U otopinu hidrazin hidrata (390 μL) u smjesi EtOH/H₂O (18,6 mL, 30:1 *v/v*) doda se 8-bromgvanozin **2** (181 mg, 0,5 mmol) i suspenzija se miješa na 100 °C 19 h. Nakon 2 h suspenzija se izbistrila. Nakon 19 h refluksa na 100 °C nastali bijeli pahuljasti talog se filtrira iz vruće reakcijske smjese u atmosferi argona te je tako dobiveno 80 mg (51 %) bijele do svijetlo plave krutine (mijenja boju na zraku i svjetlosti) 8-hidrazingvanozina **3**.

t.t. > 237 °C (raspad) (> 238 °C (raspad),²⁶⁶ > 240 °C (raspad)²⁶⁷); *R*_f = 0,5 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 261, log ε/dm³mol⁻¹cm⁻¹ 3,61; IR (KBr) ν/cm⁻¹: 3421 (s), 2920 (m), 1701 (m), 1686 (m), 1678 (m), 1655 (m), 1637 (m), 1601 (m), 1578 (m), 1572 (m), 1560 (m), 1555 (w), 1523 (vw), 1491 (w), 1458 (w), 1419 (w), 1126 (w), 1092 (w), 1070 (w), 1041 (w), 908 (vw), 770 (w), 586 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,00 (bs, 1H, NH-1), 7,31 (bs, 3H, NHNH₂), 6,22 (bs, 2H, NH₂), 5,70 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz, H-1'), 5,60 (bs, 1H, OH-5'), 5,21 (bd, 1H, OH-2'(OH-3')), 5,01 (bs, 1H, OH-3'(OH-2')), 4,47 (m, 1H, H-2'), 4,05 (m, 1H, H-3'), 3,84 (m,

^1H , H-4'), 3,59 (m, 2H, H-5_a', H-5_b'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 155,68 (s, C-6), 153,69 (s, C-2), 152,34 (s, C-4), 151,41 (s, C-8), 112,21 (s, C-5), 85,91 (d, C-1'), 85,12 (d, C-4'), 70,65 (d, C-2'(C-3')), 70,20 (d, C-3'(C-2')), 61,14 (t, C-5').

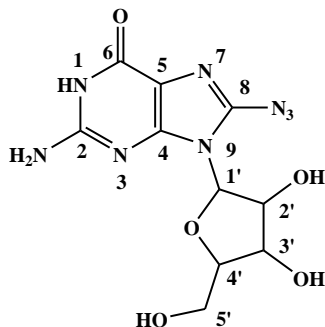
Kruti produkt **3** je nestabilan i raspada se stajanjem na zraku i izložen svjetlosti, a također i u otopini. Stoga je odmah nakon izolacije bez prethodnog čišćenja upotrijebljen u idućem stupnju sinteze, a u svrhu identifikacije NMR spektri sirovog produkta (^1H i ^{13}C) snimljeni su odmah nakon otapanja u DMSO- d_6 . Stajanjem vodene otopine derivata **3** nastaje hidrogel plave boje (Slika 3).



Slika 3. Hidrogel derivata **3**.

3.2.1.2.2. Metoda 2

U otopinu hidrazin hidrata (780 μL) u smjesi EtOH/H₂O (12,4 mL, 30:1 v/v) doda se 8-bromgvanozin **2** (362 mg, 1 mmol) i suspenzija se miješa na 100 °C 4 h u mikrovalnom reaktoru. Nakon 4 h izloženosti mikrovalnom zračenju na 100 °C nastali bijeli pahuljasti talog se filtrira u atmosferi argona te je tako dobiveno 235,3 mg (75 %) bijele do svijetlo plave krutine (mijenja boju na zraku i svjetlosti) 8-hidrazingvanozina **3**.



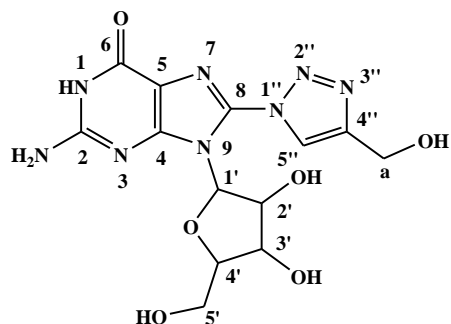
3.2.1.3. 2-Amino-8-azido-9-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-purin-6(9*H*)-on (**4**); 8-azidgvanozin **4**.

8-Azidgvanozin **4** pripravljen je prema literaturno poznatom propisu.^{266,267}

U ohlađenu (~ 0 °C) bezbojnu otopinu 8-hidrazingvanozina **3** (68 mg, 0,217 mmol) u 5 %-tnoj HCl (1 mL) dokapava se uz miješanje ohlađena vodena otopina NaNO₂ (18 mg, 0,261 mmol u 870 μL H₂O) pri čemu po dodatku cijelog volumena otopine NaNO₂ nastaje svijetlo žuta, gotovo bijela suspenzija. Miješanje se nastavlja naredna 4 h uz strogu kontrolu temperature koja ne smije biti viša od 2 °C. Reakcijska smjesa zatim se filtrira u atmosferi argona pri čemu je dobiveno 50 mg (71 %) bijele do svijetlo smeđe krutine (mijenja boju na zraku i svjetlosti) 8-azidgvanozina **4**.

t.t. > 200 °C (raspad) (> 202 °C (raspad),²⁶⁶ > 200 °C (raspad)²⁶⁷); $R_f = 0,4$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3326 (s), 3142 (s), 2938 (m), 2158 (m), 1690 (s), 1643 (s), 1542 (s), 1503 (w), 1430 (m), 1378 (m), 1335 (w), 1283 (w), 1214 (w), 1131 (w), 1091 (m), 1033 (w), 982 (vw), 938 (vw), 869 (w), 773 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 10,78 (bs, 1H, NH-1), 6,50 (bs, 2H, NH₂), 5,55 (d, 1H, $J = 6,3$ Hz, H-1'), 4,95–5,40 (m, 3H, OH-5', OH-3', OH-2'), 4,75 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, H-2'), 4,09 (m, 1H, H-3'), 3,80 (m, 1H, H-4'), 3,60 (m, 1H, H-5_b'), 3,48 (m, 1H, H-5_a').

Zbog nestabilnosti produkta i vrlo brze promjene boje na zraku i svjetlosti nije snimljen UV spektar niti ¹³C NMR spektar.



3.2.1.4. 2-Amino-9-(3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-8-(4-(hidroksimetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-1*H*-purin-6(9*H*)-on (**5**); 8-triazolilhidroksimetilgvanozin **5**.

3.2.1.4.1. Metoda 1

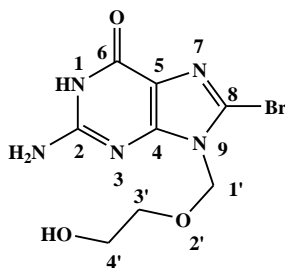
U suspenziju 8-azidgvanozina **4** (100 mg, 0,308 mmol) u 7,5 mL smjese toluen/MeOH 2:1 doda se propargilni alkohol (27 μ L, 0,463 mmol), Et₃N (2,15 mL, 15,42 mmol) i na kraju CuI (89 mg, 0,463 mmol). Reakcijska smjesa je dodatkom CuI pozelenila. Nakon 24 h miješanja na sobnoj temperaturi zelena suspenzija se upari do suha, a zaostali talog suspendira u MeOH i zagrije do vrenja. Vruća suspenzija se brzo filtrira, a filtrat upari. Dodatkom etil acetata u upareni filtrat istaložio je talog te je nakon filtracije i sušenja dobiveno 24,63 mg (21 %) bijele krutine triazola **5**.

t.t. 183–185 °C (170 °C); $R_f = 0,3$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 202 i 274, $\log \epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 4,42 i 4,33; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3431 (s), 2921 (w), 2851 (w), 1695 (m), 1644 (m), 1631 (m), 1620 (m), 1594 (m), 1582 (m), 1465 (w), 1404 (w), 1350 (w), 1306 (w), 1253 (vw), 1223 (vw), 1123 (w), 1051 (w), 1012 (w), 863 (vw), 781 (vw), 682 (w), 637 (w), 554 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,05 (bs, 1H, NH-1), 8,41 (s, 1H, CH-5''), 6,63 (bs, 2H, NH₂), 5,64 (bs, 1H, H-1'), 5,46 (d, 1H, $J = 6,5$ Hz, OH-2'), 5,40 (bs, 2H, OH-3', OH-a), 5,04 (bs, 1H, H-2'), 4,84 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, OH-5'), 4,63 (s, 2H, CH₂-a), 3,98 (m, 1H, H-3'), 3,83 (m, 1H, H-4'), 3,60 (m, 1H, H-5_a'), 3,48 (m, 1H, H-5_b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 156,83 (s, C-6), 153,56 (s, C-2), 151,22 (s, C-4), 148,11 (s, C-4''), 134,97 (s, C-8), 125,63 (d, C-5''), 115,23 (s, C-5), 88,60 (d, C-1'), 86,24 (d, C-4'), 70,92 (d, C-2'(C-3')), 70,72 (d, C-3'(C-2')), 62,16 (t, C-5'), 54,63 (t, C-a); HRMS: m/z : 381,1270 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₃H₁₃N₈O₆·H⁺: 381,1266.

3.2.1.4.2. Metoda 2

U suspenziju 8-azidgvanozina **4** (40 mg, 0,123 mmol) u 3 mL smjese toluen/MeOH 2:1 doda se propargilni alkohol (10,8 μ L, 0,187 mmol), Et₃N (860 μ L, 6,166 mmol) i na kraju CuI (4,7 mg, 0,024 mmol). Reakcijska smjesa je dodatkom CuI pozelenila. Nakon 24 h miješanja na sobnoj temperaturi zelena suspenzija se upari do suha, a zaostali talog suspendira u MeOH i zagrije do vrenja. Vruća suspenzija potom se brzo filtrira, a filtrat upari. Čišćenjem filtrata preparativnom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 3:1) dobiveno je 32,7 mg (70 %) bijele krutine triazola **5**.

3.2.2. Priprava C8 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata aciklovira



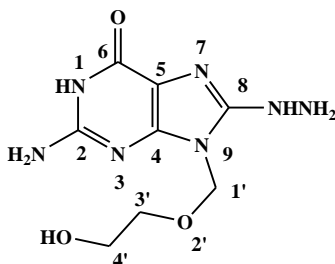
3.2.2.1. 2-Amino-8-bromo-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-1*H*-purin-6(9*H*)-on (**7**); 8-bromaciklovir **7**.

U suspenziju aciklovira **6** (1 g, 4,4 mmol) u vodi (7,4 mL) dokapava se vodena otopina broma* (34,2 mL) kap po kap u razmacima od 2–3 sekunde, tako da između svakog dodatka nove kapi nestane narančasta boja. Ukupno vrijeme dokapavanja je 4–6 min. Bijeli talog potom se brzo filtrira i ispire najprije s 30 mL hladne vode, a potom s 30 mL hladnog acetona te je tako dobiveno 1,28 g (95 %) bijelog taloga 8-bromaciklovira **7**. Sirovi produkt prekrizaliziran je iz smjese voda/MeOH (1:1).

*Bromna voda dobivena je otapanjem 1 mL broma u 100 mL vode i miješanjem (oko 15 min) do potpunog otapanja broma i homogenizacije otopine.

t.t. > 300 °C (raspad); $R_f = 0,7$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 261, $\log \epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 3,98; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3489 (m), 3391 (m), 3265 (m), 3240 (m), 3178 (m), 2949 (w), 1711 (s), 1630 (s), 1605 (s), 1570 (s), 1520 (m), 1460 (m), 1402 (w), 1360 (w), 1350 (w), 1327 (w),

1302 (w), 1279 (m), 1254 (w), 1178 (w), 1130 (m), 1107 (w), 1076 (m), 1055 (w), 999 (w), 887 (w), 829 (w), 777 (m), 762 (m), 690 (m), 650 (w), 629 (w), 546 (vw), 490 (w), 457 (w); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 10,74 (bs, 1H, NH-1), 6,62 (bs, 2H, NH $_2$), 5,30 (s, 2H, CH $_2$ -1'), 4,68 (t, 1H, J = 5,3 Hz, OH-4'), 3,47 (m, 4H, CH $_2$ -3', CH $_2$ -4'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 155,55 (s, C-6), 154,17 (s, C-2), 152,86 (s, C-4), 120,91 (s, C-8), 116,58 (s, C-5), 72,39 (t, C-1'), 70,81 (t, C-3'), 59,85 (t, C-4').



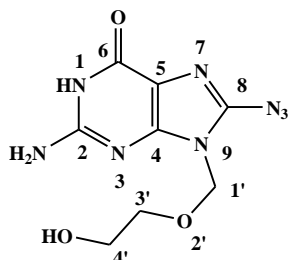
3.2.2.2. 2-Amino-8-hidrazinil-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-1*H*-purin-6(9*H*)-on (**8**); 8-hidrazinaciklovir **8**.

U 60 %-tnu vodenu otopinu hidrazin hidrata (7,9 mL) doda se 8-bromaciklovir **7** (1 g, 3,29 mmol) i suspenzija se miješa na 100 °C 20 h. Nakon 2 h suspenzija je promijenila boju u žutu i izbistrila se. Nakon 20 h miješanja na 100 °C reakcijska smjesa se ohladi na sobnu temperaturu, a nastali bijeli talog filtrira u atmosferi argona te je tako dobiveno 592 mg (71 %) bijele do svijetlo zelene krutine (mijenja boju na zraku i svjetlosti) 8-hidrazinaciklovira **8**.

t.t. 235 °C; R_f = 0,3 (CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH 3:1); IR (KBr) ν /cm $^{-1}$: 3406 (m), 3303 (s), 3178 (s), 2929 (w), 2871 (w), 2742 (w), 1686 (s), 1636 (s), 1583 (s), 1565 (s), 1406 (m), 1391 (m), 1361 (w), 1294 (w), 1104 (w), 1065 (w), 887 (vw), 768 (w), 691 (w), 619 (w); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 10,43 (bs, 1H, NH-1), 7,29 (s, 1H, NH-NH $_2$), 6,29 (s, 2H, NH $_2$ -C-2), 5,20 (s, 2H, CH $_2$ -1'), 4,67 (pt, 1H, OH-4'), 4,12 (bs, 2H, NH-NH $_2$), 3,45 (m, 4H, CH $_2$ -3', CH $_2$ -4'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 155,64 (s, C-6), 152,66 (s, C-2), 151,78 (s, C-4), 151,37 (s, C-8), 112,28 (s, C-5), 70,09 (t, C-1'), 69,85 (t, C-3'), 59,90 (t, C-4').

Kruti produkt **8** je nestabilan i raspada se stajanjem na zraku i izložen svjetlosti, a također i u otopini. Stoga je odmah nakon izolacije bez prethodnog čišćenja upotrijebljen u idućem stupnju

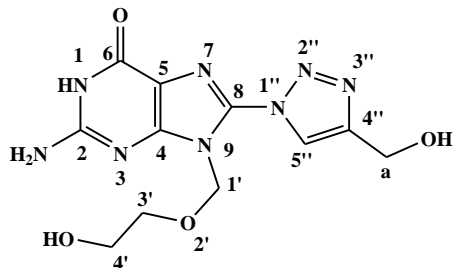
sinteze, a u svrhu identifikacije NMR spektri (^1H i ^{13}C) snimljeni su odmah nakon otapanja u DMSO- d_6 . UV spektar nije snimljen također zbog nestabilnosti spoja i brze promjene boje.



3.2.2.3. 2-Amino-8-azido-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-1*H*-purin-6(9*H*)-on (**9**); 8-azidaciklovir **9**.

U ohlađenu ($\sim 5\text{ }^\circ\text{C}$) bijelu suspenziju 8-hidrazinaciklovira **8** (0,5 g, 1,96 mmol) u 5 %-tnoj HCl (9,8 mL) dokapava se uz miješanje hladna vodena otopina NaNO_2 (162 mg u 7,8 mL H_2O) pri čemu suspenzija mijenja boju u svijetlo ružičastu, a potom u svijetlo ljubičastu. Miješanje se nastavlja naredna 4 h uz strogu kontrolu temperature koja ne smije biti viša od $5\text{ }^\circ\text{C}$. Reakcijska smjesa se zatim filtrira u struji argona pri čemu je dobiveno 347 mg (67 %) bijele do svijetlo smeđe krutine 8-azidaciklovira **9** koja mijenja boju na zraku i svjetlosti.

t.t. $> 300\text{ }^\circ\text{C}$ (raspad); $R_f = 0,7$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 204 i 280, $\log \epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,10 i 4,05; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3321 (m), 3160 (m), 2920 (w), 2778 (w), 2155 (m), 1696 (s), 1657 (s), 1617 (m), 1574 (m), 1551 (m), 1508 (w), 1477 (w), 1448 (w), 1401 (m), 1358 (w), 1293 (w), 1279 (w), 1217 (w), 1105 (m), 1071 (w), 975 (w), 903 (w), 852 (vw), 774 (w), 747 (vw), 720 (vw), 524 (vw); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 10,71 (s, 1H, NH-1), 6,57 (s, 2H, NH_2), 5,14 (s, 2H, CH_2 -1'), 4,66 (bs, 1H, OH-4'), 3,48 (m, 4H, CH_2 -3', CH_2 -4'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 155,56 (s, C-6), 153,82 (s, C-2), 151,67 (s, C-4), 140,10 (s, C-8), 113,70 (s, C-5), 70,89 (t, C-1'), 70,66 (t, C-3'), 59,86 (t, C-4').



3.2.2.4. 2-Amino-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-8-[4-(hidroksimetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]-1*H*-purin-6(9*H*)-on (**10**); 8-triazolilhidroksimetilaciklovir **10**.

3.2.2.4.1. Metoda 1

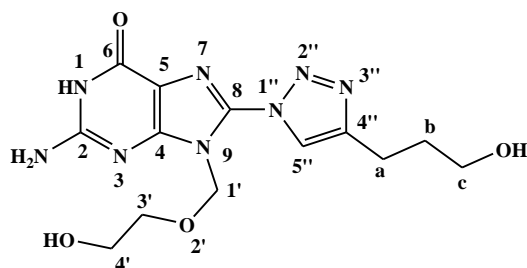
U suspenziju 8-azidaciklovira **9** (53,24 mg, 0,2 mmol) u THF-u (10 mL) doda se uz miješanje propargilni alkohol (23,28 μ L, 0,4 mmol), Et₃N (1,39 mL, 10 mmol) i CuI (57,13 mg, 0,3 mmol). Reakcijska smjesa je dodatkom CuI pozelenila. Nakon 72 h miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska smjesa se filtrira te se tako ukloni najveći dio CuI. Filtrat se zatim ponovno filtrira kroz kratki stupac Celita koji se ispiru vrućim metanolom. Tako dobiveni filtrat upari se gotovo do suha, a dobiveni talog filtrira i osuši. Dobiveno je 13 mg (20 %) žutog praha triazola **10**.²⁶⁸

t.t. 209–210 °C; $R_f = 0,4$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 204 i 279, $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,32 i 4,25; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3404 (w), 3169 (m), 3144 (m), 2920 (m), 2851 (s), 1769 (m), 1717 (vw), 1655 (w), 1570 (m), 1466 (m), 1393 (m), 1321 (m), 1250 (s), 1188 (s), 1115 (m), 1086 (s), 1034 (s), 941 (s), 777 (s), 710 (m), 530 (s); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 10,89 (s, 1H, NH-1), 8,54 (s, 1H, CH-5''), 6,75 (bs, 2H, NH₂), 5,49 (s, 2H, CH₂-1'), 5,39 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, OH-a), 4,63 (m, 3H, CH₂-a, OH-4'), 3,40 (m, 4H, CH₂-3', CH₂-4'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 156,37 (s, C-6), 154,64 (s, C-2), 152,15 (s, C-4), 148,14 (s, C-4''), 136,02 (s, C-8), 124,09 (d, C-5''), 113,80 (s, C-5), 71,93 (t, C-1'), 70,83 (t, C-3'), 59,71 (t, C-4'), 54,57 (t, C-a); HRMS: m/z : 323,1218 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₁H₁₄N₈O₄·H⁺: 323,1210.

3.2.2.4.2. Metoda 2

U suspenziju 8-azidaciklovira **9** (100 mg, 0,375 mmol) u 7,5 mL smjese toluen/MeOH 2:1 doda se propargilni alkohol (32,8 μ L, 0,563 mmol), Et₃N (2,6 mL, 18,78 mmol) i na kraju CuI (107,3 mg, 0,563 mmol). Reakcijska smjesa je dodatkom CuI pozelenila. Nakon 50 h miješanja na

sobnoj temperaturi zelena suspenzija se upari do suha, a zaostali talog suspendira u MeOH i zagrije do vrenja. Vruća suspenzija potom se brzo filtrira, a filtrat upari i osuši te je tako dobiveno 60 mg (50 %) žutog praha triazola **10**. Sirovi produkt prekrizaliziran je iz MeOH.

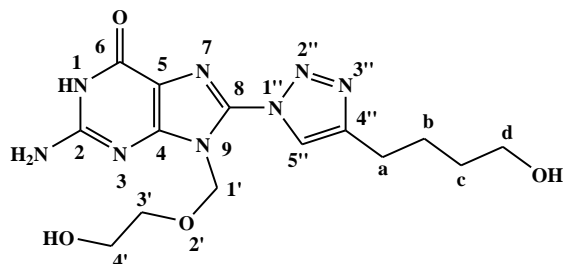


3.2.2.5. 2-Amino-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-8-[4-(3-hidroksipropil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]-1*H*-purin-6(9*H*)-on (**11**); 8-triazolilhidroksipropilaciklovir **11**.

U suspenziju 8-azidaciklovira **9** (100 mg, 0,375 mmol) u 7,5 mL smjese toluen/MeOH 2:1 doda se pent-4-in-1-ol (52,97 μ L, 0,563 mmol, 98 %-tni), Et₃N (2,6 mL, 18,78 mmol) i na kraju CuI (107,3 mg, 0,563 mmol). Reakcijska smjesa je dodatkom CuI pozelenila. Nakon 24 h miješanja na sobnoj temperaturi zelena suspenzija se upari do suha, a zaostali talog suspendira u MeOH i zagrije do vrenja. Vruća suspenzija potom se brzo filtrira, a filtrat upari. Dodatkom metanola u upareni filtrat istaložio je talog te je nakon filtracije i sušenja dobiveno 24,7 mg (19 %) bijelog praha triazola **11**.

t.t. 208–209 °C; $R_f = 0,5$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 204 i 278, $\log \epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 4,17 i 4,15; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3347 (s), 3171 (s), 3150 (s), 2931 (s), 2765 (m), 1693 (s), 1660 (s), 1614 (s), 1545 (m), 1483 (w), 1468 (w), 1403 (w), 1382 (w), 1348 (w), 1321 (w), 1279 (w), 1234 (w), 1122 (m), 1078 (w), 1044 (m), 994 (w), 911 (vw), 898 (w), 875 (vw), 853 (vw), 839 (vw), 782 (w), 766 (w), 719 (w), 659 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 10,88 (s, 1H, NH-1), 8,48 (s, 1H, CH-5''), 6,74 (bs, 2H, NH₂), 5,51 (s, 2H, CH₂-1'), 4,61 (t, 1H, $J = 5,2$ Hz, OH-c(OH-4')), 4,53 (t, 1H, $J = 5,1$ Hz, OH-4'(OH-c)), 3,47 (dd, 2H, $J_1 = 11,6$, $J_2 = 6,3$ Hz, CH₂-c), 3,38 (m, 4H, CH₂-3', CH₂-4'), 2,77 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH₂-a), 1,82 (m, 2H, CH₂-b); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 156,37 (s, C-6), 154,63 (s, C-2), 152,15 (s, C-4), 147,15 (s, C-4''), 136,15 (s, C-8), 123,25

(d, C-5''), 113,76 (s, C-5), 71,99 (t, C-1'), 70,79 (t, C-3'), 59,89 (t, C-4'), 59,74 (t, C-a), 31,94 (t, C-b(c)), 21,39 (t, C-c(b)); HRMS: m/z : 351,1513 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₃H₁₈N₈O₄·H⁺: 351,1524.

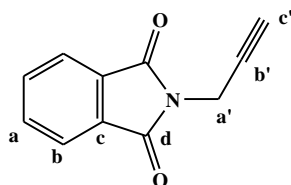


3.2.2.6. 2-Amino-8-[4-(4-hidroksibutil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-9-[(2-hidroksietoksi)metil]-1H-purin-6(9H)-on (**12**); 8-triazolilhidroksibutilaciklovir **12**.

U suspenziju 8-azidaciklovira **9** (100 mg, 0,375 mmol) u 7,5 mL smjese toluen/MeOH 2:1 doda se heks-5-in-1-ol (64 μ L, 0,563 mmol, 97 %-tni), Et₃N (2,6 mL, 18,78 mmol) i na kraju CuI (107,3 mg, 0,563 mmol). Reakcijska smjesa je dodatkom CuI pozelenila. Nakon 24 h miješanja na sobnoj temperaturi zelena suspenzija se upari do suha, a zaostali talog suspendira u MeOH i zagrije do vrenja. Vruća suspenzija potom se brzo filtrira, a filtrat upari. Dodatkom metanola u upareni filtrat istaložio je talog te je nakon filtracije i sušenja dobiveno 19,7 mg (15 %) bijelog praha triazola **12**.

t.t. 178–180 °C; R_f = 0,6 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{max} /nm 205 i 277, log ϵ /dm³mol⁻¹cm⁻¹ 4,31 i 4,24; IR (KBr) ν /cm⁻¹: 3430 (s), 3331 (s), 3148 (s), 2920 (m), 2757 (m), 1687 (s), 1637 (s), 1574 (m), 1567 (m), 1547 (m), 1490 (w), 1458 (w), 1407 (w), 1383 (m), 1292 (w), 1248 (w), 1121 (m), 1065 (m), 984 (w), 883 (w), 855 (w), 807 (w), 785 (w), 775 (w), 717 (w), 673 (w), 632 (w), 580 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 10,88 (s, 1H, NH-1), 8,47 (s, 1H, CH-5''), 6,74 (bs, 2H, NH₂), 5,50 (s, 2H, CH₂-1'), 4,60 (pt, 1H, OH-d(OH-4')), 4,40 (t, 1H, J = 5,1 Hz, OH-4'(OH-d)), 3,38 (m, 4H, CH₂-3', CH₂-4'), 3,17 (d, 2H, J = 4,9 Hz, CH₂-d), 2,74 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂-a), 1,70 (m, 2H, CH₂-b), 1,48 (m, 2H, CH₂-c); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 156,28 (s, C-6), 154,53 (s, C-2), 152,06 (s, C-4), 147,21 (s, C-4''), 136,05 (s, C-8), 123,17 (d, C-5''), 113,67 (s, C-5), 71,89 (t, C-1'), 70,69 (t, C-3'), 60,26 (t, C-4'), 59,64 (t, C-a), 31,77 (t, C-b(C-

c, C-d)), 25,17 (t, C-c(C-b, C-d)), 24,41 (t, C-d(C-b, C-c)); HRMS: m/z : 365,1665 $[M+H]^+$; izračunato $C_{14}H_{20}N_2O_4 \cdot H^+$: 365,1680.



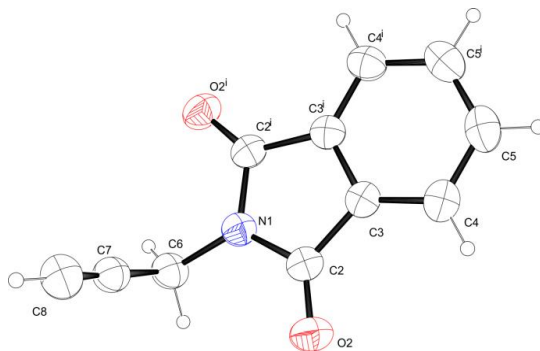
3.2.2.7. 2-(Prop-2-inil)izoidolin-1,3-dion (**13**); *N*-propargilftalimid **13**.

N-propargilftalimid **13** pripravljen je prema literaturno poznatom propisu bez potrebe kromatografskog čišćenja u 60 %-tnom iskorištenju (lit. 58 %).²⁶⁹

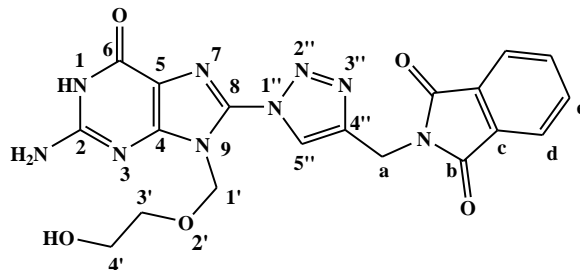
1H NMR ($CDCl_3$) δ ppm: 7,89 (dd, 2H, $J_1 = 5,4$, $J_2 = 3,1$ Hz, Pha(b)), 7,75 (dd, 2H, $J_1 = 5,4$, $J_2 = 3,0$ Hz, Phb(a)), 4,47 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz, CH_2 -a'), 2,23 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz, CH-c'); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ ppm: 167,17 (s, C-d), 134,5 (d, C-a), 132,25 (s, C-c), 123,80 (d, C-b), 77,39 (s, C-b'), 71,68 (d, C-c'), 27,22 (t, C-a').

Napomena! C-c' se u APT-u (*engl. Attached Proton Test*) nalazi na suprotnoj strani od očekivanog.

Dobivenim monokristalima snimljena je i kristalna struktura (*Slika 4*).



Slika 4. ORTEP prikaz kristalne strukture derivata **13**.

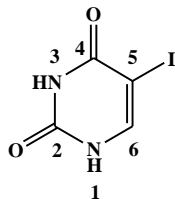


3.2.2.8. 2-[[1-(2-Amino-9-((2-hidroksietoksi)metil)-6-okso-6,9-dihidro-1*H*-purin-8-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]izoindolin-1,3-dion (**14**); 8-triazolilftalimidaciklovir **14**.

U suspenziju 8-azidaciklovira **9** (200 mg, 0,75 mmol) u 15 mL smjese toluen/MeOH 2:1 doda se *N*-propargilftalimid **13** (208,67 mg, 1,13 mmol), Et₃N (5,23 mL, 37,56 mmol) i na kraju CuI (214,6 mg, 1,13 mmol). Reakcijska smjesa je dodatkom CuI pozelenila. Nakon 50 h miješanja na 60 °C zelena suspenzija se upari do suha, a zaostali talog suspendira u MeOH i zagrije do vrenja. Vruća suspenzija potom se brzo filtrira, a filtrat upari te je tako dobiveno 80 mg (24 %) svijetlo žutog praha triazola **14**.

t.t. 250–251 °C; $R_f = 0,8$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 219 i 278, $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,66 i 4,14; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3408 (m), 3306 (w), 3136 (m), 2916 (m), 2764 (s), 1699 (vw), 1655 (vw), 1610 (w), 1572 (m), 1477 (s), 1389 (m), 1306 (s), 1250 (m), 1119 (m), 1059 (m), 989 (m), 860 (s), 777 (m), 669 (s), 588 (s); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 10,88 (bs, 1H, NH-1), 8,74 (s, 1H, CH-5''), 7,83–7,93 (m, 4H, Ph-d, Ph-e), 6,75 (bs, 2H, NH₂), 5,48 (s, 2H, CH₂-1'), 4,96 (s, 2H, CH₂-a), 4,58 (t, 1H, OH-4'), 3,40 (m, 4H, CH₂-3', CH₂-4'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 167,34 (s, C-b), 156,29 (s, C-6), 154,63 (s, C-2), 152,12 (s, C-4), 142,68 (s, C-4''), 135,72 (s, C-8), 134,69 i 134,50 (d, C-e), 131,65 (s, C-c), 124,52 (d, C-5''), 123,34 i 123,20 (d, C-d), 113,77 (s, C-5), 73,70 (t, C-1'), 70,80 (t, C-3'), 59,69 (t, C-4'), 32,66 (t, C-a); HRMS: m/z : nije detektiran.

3.2.3. Priprava C5 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata uracila

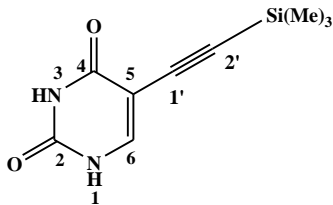


3.2.3.1. 5-Jodopirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**16**); 5-joduracil **16**.

5-Joduracil **16** pripravljen je prema literaturno poznatom propisu.^{270,271,272}

Uracil **15** (5 g, 0,045 mol) suspendira se u dioksanu (355 mL) te se smjesi doda I₂ (22,5 g, 0,089 mol) i 0,5 M HNO₃ (89 mL). Smjesa se refluksira 1 h pri čemu suspenzija daje tamno smeđu otopinu. Dobivena otopina se upari, a u zaostali talog doda CH₂Cl₂ te se suspenzija filtrira. Dobiveni talog ispiri se hladnim CH₂Cl₂ sve do obezbojenja matičnice (indikacija da nema više zaostalog joda). Bijeli talog prekrystalizira se iz vruće vode pri čemu je dobiveno 9,1 g (86 %) sedefastih bijelih ljuskastih kristala 5-joduracila **16**.

t.t. 237–240 °C (272 °C,²⁷⁰ 198 °C, 245 °C (raspad),²⁷¹ > 250 °C (raspad)²⁷²); *R*_f = 0,4 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 216 i 278 log ε/dm³mol⁻¹cm⁻¹ 4,00 i 3,80 (λ_{max}/nm 280, log ε/dm³mol⁻¹cm⁻¹ 3,85);²⁷² IR (KBr) ν/cm⁻¹: 3440 (s), 3286 (s), 3022 (s), 2918 (s), 2851 (s), 2818 (s), 1871 (vw), 1784 (m), 1700 (m), 1647 (s), 1607 (m), 1466 (m), 1431 (m), 1323 (w), 1215 (m), 1136 (m), 1045 (w), 995 (vw), 939 (w), 885 (vw), 845 (vw), 775 (w), 756 (w), 731 (w), 635 (w), 598 (vw), 542 (w), 428 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,43 (bs, 1H, NH-3), 11,14 (bs, 1H, NH-1), 7,87 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H, H-6); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 161,38 (s, C-4), 151,16 (s, C-2), 146,92 (d, C-6), 67,41 (s, C-5).



3.2.3.2. 5-[2-(Trimetilsilil)etnil]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**17**); 5-TMS-etiniluracil **17**.

5-TMS-etiniluracil **17** pripravljen je prema literaturno poznatom propisu.²⁷³

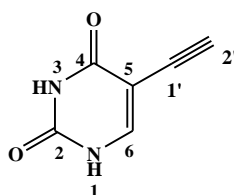
5-Joduracil **16** (1,19 g, 5 mmol) otopi se u smjesi DMF-a (15 mL) i Et₃N (2,09 mL, 15 mmol) te se iz otopine uklone plinovi u ultrazvučnoj kupelji i propuše se argonom. U potpuno bistru otopinu se uz miješanje doda trimetilsililacetilen (TMSA) (2,16 mL, 15 mmol, 98 %-tni), CuI (190,4 mg, 1 mmol) i PdCl₂(PPh₃)₂ (351 mg, 0,5 mmol). Dodatkom CuI bistra bezbojna otopina postaje zelena, a potom dodatkom Pd katalizatora postaje žuta pa tamno smeđa (*Slika 5*). Promjena boje odvija se u vremenskom razmaku od nekoliko minuta. Reakcijska smjesa miješa se na sobnoj temperaturi 3 h, a potom upari do suha. U zaostali crni talog doda se metanol (~ 200 mL) i nastala suspenzija se filtrira. Filtrat se upari gotovo do kraja te se izlučeni talog filtrira. Tako je dobiveno 0,93 g (89 %) narančastog 5-TMS-etiniluracila **17**.

t.t. 225–227 °C; $R_f = 0,5$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 230 i 290, $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,10 i 4,00; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3223 (m), 3176 (m), 3070 (s), 2957 (m), 2905 (m), 2824 (m), 2164 (m), 1716 (s), 1688 (s), 1624 (m), 1493 (w), 1447 (m), 1423 (w), 1340 (w), 1252 (m), 1232 (s), 1146 (vw), 1007 (vw), 953 (vw), 866 (s), 843 (s), 764 (m), 698 (vw), 648 (vw), 571 (vw), 546 (m), 473 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,35 (bs, 1H, NH-3), 11,30 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, NH-1), 7,79 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H, H-6), 0,18 (s, 9H, 3 CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 162,38 (s, C-4), 150,26 (s, C-2), 146,55 (d, C-6), 98,20 (s, C-5), 96,84 (s, C-2'), 45,78 (s, C-1'), -0,10 (q, 3 CH₃).



Slika 5. Promjena boje reakcijske smjese kod priprave derivata **17**.

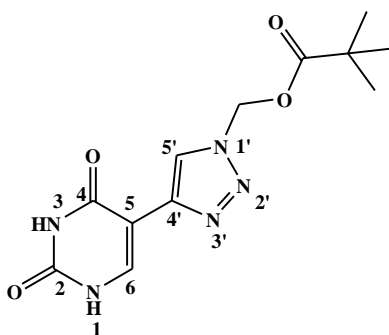
Derivat **17** je u narednom reakcijskom stupnju upotrijebljen kao sirovi produkt.



3.2.3.3. 5-Etilpirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**18**); 5-etiniluracil **18**.

Sirovi 5-TMS-etiniluracil **17** (0,93 g, 4,46 mmol) suspendira se u 1 M NaOH (27 mL) i miješa na sobnoj temperaturi 2 h, a potom razrijedi s još 27 mL vode i filtrira. Filtrat se upari do polovice volumena (~ 27 mL) te se zakiseli dodatkom octene kiseline do pH ~ 5, a nastali svijetlo žuti talog filtrira i ispere hladnom vodom. Tako je dobiveno 571 mg (94 %) 5-etiniluracila **18**.²⁷²

t.t. > 300 °C (raspad) (> 220 °C (raspad));²⁷² $R_f = 0,3$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 224 i 284, $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,10 i 4,00 (λ_{\max}/nm 224 i 284, $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,10 i 4,00);²⁷² IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3238 (s), 3176 (m), 3069 (s), 2967 (s), 2911 (s), 2812 (m), 1801 (w), 1705 (s), 1666 (s), 1626 (s), 1502 (m), 1445 (s), 1425 (m), 1335 (m), 1242 (m), 1223 (m), 1142 (w), 1007 (w), 953 (w), 862 (m), 798 (m), 768 (w), 721 (m), 677 (m), 646 (w), 561 (m), 471 (m), 436 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,33 (bs, 2H, NH-1, NH-3), 7,80 (s, 1H, H-6), 4,02 (s, 1H, CH-2'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 162,64 (s, C-4), 150,36 (s, C-2), 146,36 (d, C-6), 96,22 (s, C-5), 83,11 (s, C-1'), 76,51 (d, C-2').



3.2.3.4. [4-(2,4-dioksa-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil pivalat (**19**); 5-triazoliluracil derivat **19**.

3.2.3.4.1. Metoda 1

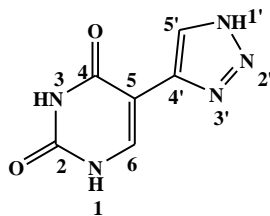
Pivaloiloksimetil klorid (POM-Cl) (297 μL , 2 mmol, 97 %-tni) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, *v/v*, 4 mL) te se otopini doda NaN₃ (130 mg, 2 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i *N,N'*-dimetiletilendiamin (DMEDA) (34 μL , 0,3 mmol, 95 %-tni). Tako pripremljena smjesa podvrgava se mikrovalnom zračenju u sustavu otvorenog tipa i to snage 100 W pri 100 °C kroz 1 h nakon čega se smjesi doda 5-etiniluracil **18** (109 mg, 0,8 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i DMEDA (34 μL , 0,3 mmol, 95 %-tni). Smjesa se ponovno podvrgava mikrovalnom zračenju snage 100 W pri 100 °C kroz 30 min nakon čega se nastala suspenzija filtrira, talog se otopi u MeOH i otopina se filtrira kroz nabrani filter papir te se filtrat upari. Tako je dobiveno 41 mg (18 %) bijelih kristala 5-triazoliluracilnog derivata **19**.

t.t. 245–248 °C; $R_f = 0,4$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 228 i 290, $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,30 i 4,20; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3165 (m), 3076 (m), 3032 (m), 2974 (m), 2934 (m), 2874 (m), 1755 (s), 1710 (s), 1672 (s), 1553 (m), 1481 (w), 1466 (w), 1445 (m), 1433 (m), 1404 (w), 1393 (w), 1367 (w), 1277 (w), 1238 (m), 1219 (w), 1186 (w), 1117 (s), 1061 (w), 1030 (m), 991 (w), 964 (vw), 943 (vw), 881 (w), 820 (w), 791 (w), 766 (w), 743 (w), 710 (vw), 667 (w), 650 (w), 555 (w), 532 (vw), 467 (w); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 11,25–11,45 (bs, 2H, NH-1, NH-3), 8,45 (s, 1H, H-6), 8,08 (s, 1H, H-5'), 6,34 (s, 2H, CH_2), 1,12 (s, 9H, 3 CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 176,45 (s, COOCH_2), 162,03 (s, C-4), 150,48 (s, C-2), 139,38 (s, C-4'), 138,00 (d, C-6), 122,76 (d, C-5'), 103,24 (s, C-5), 69,99 (t, NCH_2O), 38,16 (s, $(\text{CH}_3)_3\text{CCO}$), 26,43 (q, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$); HRMS: m/z : 294,1185 [$M+\text{H}$] $^+$; izračunato $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4\text{H}^+$: 294,1202.

NAPOMENA! UV spektar 5-triazoliluracil derivata **19** snimljen je i nakon dužeg stajanja (2–3 tjedna) te je dobiven spektar identičan onom dobivenom snimanjem odmah nakon otapanja uzorka. Tako je potvrđena njegova stabilnost u otopini!

3.2.3.4.2. Metoda 2

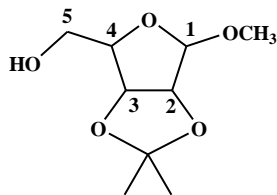
POM-Cl (297 μL , 2 mmol, 97 %-tni) otopi se u smjesi $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (7:3, v/v , 4 mL) te se otopini doda NaN_3 (130 mg, 2 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i DMEDA (34 μL , 0,3 mmol, 95 %-tni). Dodatkom DMEDA u bistru bezbojnu otopinu ona postaje plava potom zelena i na kraju žuta. Nakon 30 min miješanja bistra žuta otopina ponovno mijenja boju u zelenu. Nakon 1 h miješanja na ~ 90 °C u zelenu bistru otopinu doda se 5-etiniluracil **18** (109 mg, 0,8 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), pri čemu reakcijska smjesa postaje svjetlije zelena, CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i na kraju DMEDA (34 μL , 0,3 mmol, 95 %-tni) pri čemu se reakcijska smjesa počne pjeniti. Suspenzija bež boje miješa se na temperaturi od ~ 90 °C narednih 30 min, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Hlađenjem taloži talog oker boje koji se filtrira i otopi u MeOH. Otopina se vruća filtrira kroz sloj Celita, a filtrat upari te je tako dobiveno 190 mg (81 %) bijelih kristala 5-triazoliluracil derivata **19**.¹⁹¹ Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz metanola.



3.2.3.5. 5-(1*H*-1,2,3-Triazol-4-il)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**20**); 5-triazoliluracil derivat **20**.

5-Triazoliluracil derivat **19** (100 mg, 340,97 μmol) otopi se u smjesi dioksan/ NH_4OH (aq) 1:3 *v/v* (74 mL) te se otopina miješa na sobnoj temperaturi 1,5 h. Bistra bezbojna otopina potom se upari do suha, a zaostali bijeli talog osuši na vakuum pumpi. Tako je dobiveno 61 mg (kvant.) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **20**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz vode.

t.t. > 300 °C; $R_f = 0,6$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 231 i 290 $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,23 i 4,12; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3140 (s), 3084 (m), 3032 (m), 2983 (m), 2923 (m), 2857 (m), 2829 (m), 1761 (s), 1720 (s), 1683 (s), 1549 (w), 1516 (w), 1472 (w), 1429 (m), 1389 (w), 1319 (w), 1234 (m), 1205 (w), 1142 (w), 1121 (w), 1072 (w), 1005 (w), 980 (w), 943 (vw), 874 (w), 835 (w), 785 (w), 754 (m), 700 (w), 663 (m), 554 (m), 457 (w), 446 (w); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 14,87 (bs, 1H, NH-1'), 11,40 (bs, 2H, NH-1, NH-3), 8,12 (s, 1H, H-5'), 7,97 (s, 1H, H-6); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 162,26 (s, C-4), 150,66 (s, C-2), 139,96 (s, C-4'), 138,37 (d, C-6), 114,33 (d, C-5'), 103,11 (s, C-5); HRMS: m/z : 180,0513 [$M+\text{H}$] $^+$; izračunato $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_5\text{O}_2\cdot\text{H}^+$: 180,0521.

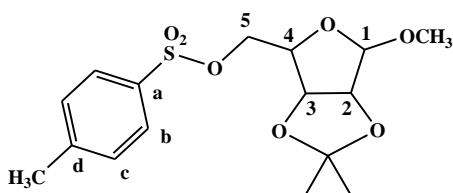


3.2.3.6. Metil 2,3-*O*-izopropiliden- β -D-ribofuranozid (**22**); derivat šećera **22**.

Sinteza i potpuna karakterizacija spoja **22** opisana je u literaturi prema kojoj je pripravljen.²⁷⁴

Otopina D-riboze (**21**) (5 g, 0,033 mol), suhog acetona (100 mL), 2,2-dimetoksipropana (10 mL) i 20 mL 3% MeOH/HCl miješana je 5 h na 0 °C, a potom još 12 h na sobnoj temperaturi. Svijetlo žuta otopina neutralizirana je piridinom (pH ~ 7) i uparena do suha. Dobiveno žuto ulje čišćeno je ekstrakcijom sa smjesom eter/H₂O (25 mL/50 mL). Vodeni sloj još je dva puta ekstrahiran s po 50 mL etera te je organski sloj sušen nad Na₂SO₄ i uparen. Sušenjem dobivenog ulja nastala je bijela pjenasta masa željenog produkta **22** (4,219 g, 62 %).

¹H NMR (CDCl₃) δ /ppm: 4,97 (s, 1H, H-1), 4,82 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz, H-2), 4,59 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz, H-3), 4,40 (t, 1H, *J* = 3,1 Hz, OH-5), 3,64 (m, 2H, H-4, H-5_b), 3,46 (m, 1H, H-5_a), 3,42 (s, 3H, OCH₃), 1,49 (s, 3H, CH₃), 1,32 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃) δ /ppm: 112,03 (s, (CH₃)₂C), 110,01 (d, C-1), 84,92 (d, C-4), 85,85 (d, C-2), 82,00 (d, C-3), 64,02 (t, C-5), 55,59 (q, OCH₃), 26,50 (q, CH₃), 24,81 (q, CH₃).



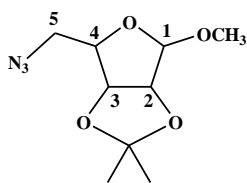
3.2.3.7. Metil 2,3-*O*-izopropiliden-5-*O*-*p*-toluensulfonil- β -D-ribofuranozid (**23**); tosilni derivat šećera **23**.

Sinteza i potpuna karakterizacija spoja **23** opisana je u literaturi prema kojoj je pripravljen.²⁷⁴

p-Toluensulfonil klorid (4,093 g, 0,02 mol) u manjim je obrocima dodan u ohlađenu otopinu derivata **22** (4,09 g, 0,02 mol) u suhom piridinu (43 mL). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi, a potom uparena do suha. Tragovi piridina uklonjeni su dodatkom

toluena (3·20 mL) te uparavanjem do suha. Dobiveno ulje čišćeno je ekstrakcijom sa smjesom eter/H₂O (50 mL/100 mL). Vodeni sloj još je dva puta ekstrahiran s po 50 mL etera te je organski sloj sušen nad Na₂SO₄ i uparen. Dobiveno je 5,46 g (76 %) bijelih kristala tosilnog derivata šećera **23**.

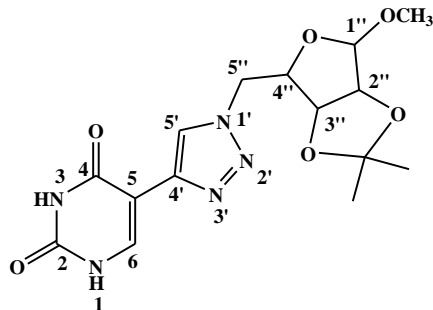
¹H NMR (CDCl₃) δ/ppm: 7,81 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ph-b), 7,54 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ph-c), 4,93 (s, 1H, H-1), 4,60 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-2), 4,53 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-3), 4,31 (t, 1H, *J* = 7,0 Hz, H-4), 4,02 (d, 2H, *J* = 7,0 Hz, H-5_a, H-5_b), 3,23 (s, 3H, OCH₃), 2,46 (s, 3H, Ph-CH₃), 1,46 (s, 3H, CH₃), 1,29 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃) δ/ppm: 145,28 (d, Ph-d), 132,90 (d, Ph-a), 130,12 (d, Ph-c), 128,16 (d, Ph-b), 112,88 (s, (CH₃)₂C), 109,62 (d, C-1), 85,05 (d, C-4), 83,74 (d, C-2), 81,53 (d, C-3), 69,39 (t, C-5), 55,21 (q, OCH₃), 26,50 (q, CH₃), 25,02 (q, CH₃).



3.2.3.8. Metil 2,3-O-izopropiliden-5-azido-β-D-ribofuranosid (**24**); šećerni azid **24**.

Derivat **23** (2 g, 5,58 mmol) otopljen je u DMF-u (17 mL) te je otopini dodan NaN₃ (1,09 g, 16,7 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na 80 °C 2 h, a potom uparena do suha. Sirovi produkt čišćen je ekstrakcijom sa smjesom CH₂Cl₂/H₂O (50 mL/100 mL). Vodeni sloj još je tri puta ekstrahiran s po 50 mL CH₂Cl₂ te je organski sloj sušen nad Na₂SO₄ i uparen. Sušenjem dobivenog ulja pri sniženom tlaku dobivena je bijela pjenasta masa šećernog azida **24** (1,024 g, 80 %).²⁷⁵

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 4,95 (s, 1H, H-1), 4,64 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz, H-2), 4,59 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz, H-3), 4,18 (t, 1H, *J* = 7,2 Hz, H-4), 3,26–3,39 (m, 5H, H-5_a, H-5_b, OCH₃), 1,38 (s, 3H, CH₃), 1,25 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 111,64 (s, (CH₃)₂C), 109,27 (d, C-1), 84,79 (d, C-4), 84,47 (d, C-2(C-3)), 81,47 (d, C-3(C-2)), 54,55 (q, OCH₃), 53,12 (t, C-5), 26,17 (q, CH₃), 24,57 (q, CH₃).



3.2.3.9. 5-{1-[(6-Metoksi-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]dioksol-4-il)metil]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**25**); 5-triazoliluracil derivat **25**.

3.2.3.9.1. Metoda 1

U suspenziju 5-etiniluracila **18** (99,4 mg, 0,73 mmol) i šećernog azida **24** (144,4 mg, 0,63 mmol) u smjesi THF/H₂O/*t*-BuOH 3:1:1 (8 mL) doda se svježe pripravljena otopina Na-askorbata (67 mg, 0,335 mmol, 99 %-tni) u 340 μL H₂O (1 M otopina) i svježe pripravljena otopina CuSO₄·5H₂O (20,2 mg, 0,081 mmol) u 270 μL H₂O. Žuto narančasta heterogena smjesa miješa se na sobnoj temperaturi 24 h pri čemu postepeno mijenja boju u pastelno zelenu. Reakcijska smjesa se potom upari do suha, a zaostali talog otopi u većem volumenu MeOH. Otopina se vrućca filtrira kroz sloj Celita, a filtrat upari te je tako dobiveno 42 mg (18 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **25**.²⁷⁶

t.t. 267–270 °C; *R*_f = 0,4 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 229 i 287, log ε/dm³mol⁻¹cm⁻¹ 4,20 i 4,10; IR (KBr) ν/cm⁻¹: 3238 (m), 3150 (m), 3069 (m), 2988 (m), 2943 (m), 2924 (m), 2839 (w), 1711 (s), 1678 (s), 1547 (w), 1493 (w), 1451 (m), 1440 (m), 1382 (w), 1371 (w), 1337 (vw), 1273 (vw), 1240 (m), 1245 (m), 1194 (w), 1165 (w), 1111 (m), 1094 (m), 1061 (w), 1047 (w), 1036 (m), 1005 (w), 960 (w), 897 (w), 872 (m), 822 (w), 798 (w), 770 (w), 721 (vw), 673 (vw), 650 (w), 557 (w), 465 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,41 (bs, 1H, NH-3), 11,20 (bs, 1H, NH-1), 8,44 (s, 1H, H-6), 8,03 (s, 1H, H-5'), 4,97 (s, 1H, H-1''), 4,79 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-2''), 4,68 (d, 1H, *J* = 5,9 Hz, H-3''), 4,41–4,60 (m, 3H, H-4'', H-5''_a, H-5''_b), 3,29 (s, 3H, OCH₃), 1,36 (s, 3H, CH₃), 1,25 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 162,11 (s, C-4), 150,60 (s, C-2), 139,15 (s, C-4'), 137,61 (d, C-6), 122,29 (d, C-5'), 111,72 (s, (CH₃)₂C), 109,12 (d, C-1''), 103,81 (s, C-5), 84,67 (d, C-2''(C-3'')), 84,44 (d, C-3''(C-2'')), 81,18 (d, C-4''), 54,75 (q, OCH₃),

52,33 (t, C-5"), 26,18 (q, CH₃), 24,63 (q, CH₃); HRMS: *m/z*: 366,1398 [*M*+H]⁺; izračunato C₁₅H₁₉N₅O₆·H⁺: 366,1414.

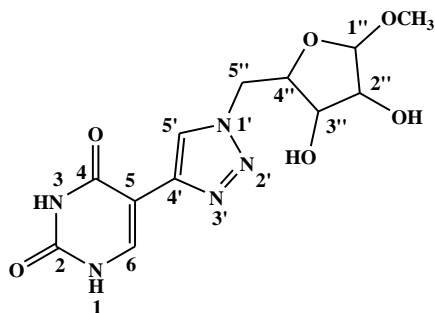
NAPOMENA! UV spektar 5-triazoliluracil derivata **25** snimljen je i nakon dužeg stajanja (2–3 tjedna) te je dobiven spektar identičan onom dobivenom snimanjem odmah nakon otapanja uzorka. Tako je potvrđena njegova stabilnost u otopini!

3.2.3.9.2. Metoda 2

5-Etiniluracil **18** (77 mg, 0,565 mmol), šećerni azid **24** (136,4 mg, 0,595 mmol), Na-askorbat (68 mg, 0,34 mmol, 99 %-tni) i CuSO₄·5H₂O (8,5 mg, 0,034 mmol) suspendiraju se u smjesi EtOH/H₂O 1:1 (4 mL) u epruveti za mikrovalni reaktor. Smjesa se potom podvrgava mikrovalnom zračenju snage 250 W pri 80 °C u trajanju od 6 min u otvorenom sustavu nakon čega se ohladi na sobnu temperaturu. Žuto narančasta suspenzija upari se do suha, a zaostali talog otopi u većem volumenu MeOH. Otopina se vruća filtrira kroz sloj Celita, a filtrat upari te je tako dobiveno 85 mg (41,2 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **25**.^{210,26}

3.2.3.9.3. Metoda 3

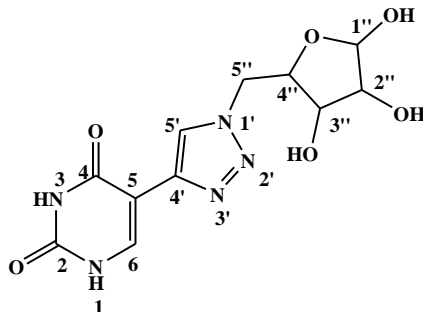
Reakcija je provedena i klasičnom metodom organske sinteze zagrijavanja reakcijske smjese u uljnoj kupelji pri temperaturi od 80 °C u vremenu od 1 h te je dobiveno 130 mg (63 %) željenog 5-triazoliluracil derivata **25**.



3.2.3.10. 5-{1-[3,4-Dihidroksi-5-metoksi-tetrahidrofuran-2-il)metil]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**26**); 5-triazoliluracil derivat **26**.

5-Triazoliluracil derivat **25** (130 mg, 0,356 mmol) suspendira se u smjesi 6 M HCl/MeOH (88 μ L/10 mL) te se suspenzija uz miješanje refluksira na temperaturi od 80 °C dok se potpuno ne izbistri. Po završetku reakcije (2 h) iz bistrine otopine hlađenjem taloži bijeli talog koji se filtrira i ispere hladnim metanolom te je tako dobiveno 95 mg (82 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **26**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz vode.

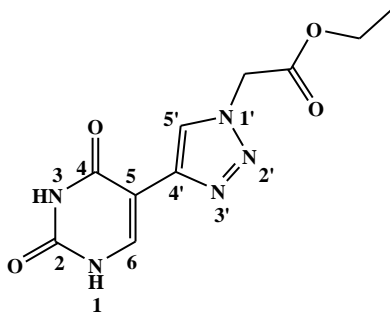
t.t. 168–170 °C; $R_f = 0,6$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 231 i 291, $\log \epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 4,20 i 4,10; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3402 (m), 3248 (m), 3190 (m), 3109 (w), 3060 (w), 2957 (w), 2918 (w), 2816 (w), 1699 (s), 1684 (s), 1551 (w), 1454 (w), 1429 (vw), 1414 (w), 1362 (w), 1234 (w), 1207 (w), 1188 (vw), 1119 (m), 1063 (w), 1030 (m), 997 (vw), 972 (vw), 945 (w), 845 (vw), 818 (w), 793 (vw), 783 (vw), 746 (vw), 669 (vw), 635 (vw), 604 (vw), 530 (vw), 430 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,37 (s, 1H, NH-3), 11,16 (bs, 1H, NH-1), 8,28 (s, 1H, H-6), 8,03 (s, 1H, H-5'), 5,15 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz, OH-3''), 5,09 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz, OH-2''), 4,64–4,71 (m, 1H, H-3''), 4,63 (s, 1H, H-1''), 4,41 (dd, 1H, $J_1 = 14,2$, $J_2 = 7,1$ Hz, H-2''), 4,10 (td, 1H, $J_1 = 7,2$, $J_2 = 3,4$ Hz, H-4''(H-5''_a)), 3,88 (dt, 1H, $J_1 = 11,7$, $J_2 = 5,9$ Hz, H-5''_a(H-4'')), 3,71 (t, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-5''_b(H-4'')), 3,19 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 162,15 (s, C-4), 150,62 (s, C-2), 138,87 (s, C-4'), 137,42 (d, C-6), 122,74 (d, C-5'), 108,41 (d, C-1''), 103,90 (s, C-5), 80,33 (d, C-4''), 74,02 (d, C-2''(C-3'')), 71,68 (d, C-3''(C-2'')), 54,54 (q, OCH₃), 52,37 (t, C-5''); HRMS: m/z : 326,1102 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₂H₁₅N₅O₆·H⁺: 326,1101.



3.2.3.11. 5-{1-[(3,4,5-Trihidroksi-tetrahidrofuran-2-il)metil]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**27**); 5-triazoliluracil derivat **27**.

5-Triazoliluracil derivat **25** (100 mg, 0,274 mmol) se suspendira u smjesi 6 M HCl/H₂O (68 μL/8 mL) te se suspenzija uz miješanje refluksira na temperaturi od 100 °C dok se potpuno ne izbistri. Po završetku reakcije (1,5 h) iz bistre otopine hlađenjem taloži bijeli talog koji se filtrira i ispere s hladnom vodom te je tako dobiveno 80 mg (94 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **27**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz vode.

t.t. 258–259 °C, tamni; $R_f = 0,4$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 232 i 291, $\log \epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 3,92 i 3,77; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3400 (s), 3229 (s), 3069 (m), 3025 (m), 2920 (m), 2815 (m), 1724 (s), 1680 (s), 1545 (m), 1448 (m), 1425 (m), 1364 (w), 1350 (w), 1284 (w), 1234 (m), 1202 (m), 1134 (m), 1088 (m), 1053 (m), 1024 (m), 968 (w), 933 (m), 879 (m), 831 (m), 787 (m), 770 (m), 708 (w), 669 (m), 650 (m), 554 (m), 463 (m); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,39 (s, 1H, NH-3), 11,16 (bs, 1H, NH-1), 8,28 (s, 1H, H-6), 8,02 (s, 1H, H-5'), 6,45 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, H-1''), 5,02 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz, OH-3''), 5,00 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz, OH-1''), 4,96 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, OH-2''), 4,65 (dd, 1H, $J_1 = 14,1$, $J_2 = 3,0$ Hz, H-3''), 4,40 (dd, 1H, $J_1 = 14,1$, $J_2 = 8,1$ Hz, H-2''), 3,93–4,02 (m, 2H, (H-4'')H-5''_a, H-5''_b), 3,65 (t, 1H, $J = 4,3$ Hz, H-4''(H-5''_b)); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 162,13 (s, C-4), 150,56 (s, C-2), 138,86 (s, C-4'), 137,39 (d, C-6), 122,58 (d, C-5'), 103,93 (s, C-5), 102,04 (d, C-1''), 79,96 (d, C-4''), 75,14 (d, C-2''(C-3'')), 71,94 (d, C-3''(C-2'')), 53,44 (t, C-5''); HRMS: m/z : 312,0935 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₁H₁₃N₅O₆·H⁺: 312,0944.

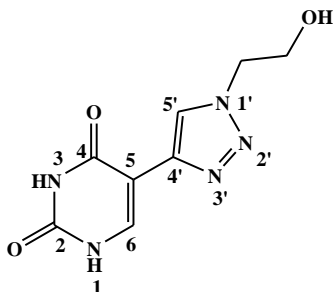


3.2.3.12. Etil 2-[4-(2,4-dioekso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]acetat (**28**); 5-triazoliluracil derivat **28**.

Etil bromacetat (223 μ L, 2 mmol) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, v/v, 4 mL) te se otopini doda NaN₃ (130 mg, 2 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i DMEDA (34 μ L, 0,3 mmol, 95 %-tni). Dodatkom DMEDA u bistru bezbojnu otopinu ona postaje plava potom zelena i na kraju žuta. Nakon 30 min miješanja bistra žuta otopina ponovno mijenja boju u zelenu. Nakon 1 h miješanja na ~ 90 °C u zelenu bistru otopinu doda se 5-etiniluracil **18** (109 mg, 0,8 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), pri čemu reakcijska smjesa postaje svijetlije zelena, CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i na kraju DMEDA (34 μ L, 0,3 mmol, 95 %-tni) pri čemu se reakcijska smjesa počne pjeniti. Suspenzija bež boje miješa se na temperaturi od ~ 90 °C narednih 30 min, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Hlađenjem taloži talog bijele boje koji se filtrira te je tako dobiveno 212 mg (kvant.) 5-triazoliluracil derivata **28**. Analitički uzorak dobiven je prekrizalizacijom sirovog produkta iz metanola.

t.t. 255–258 °C; R_f = 0,4 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 232 i 290, $\log \epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 4,10 i 3,90; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3435 (w), 3157 (m), 3142 (m), 3074 (m), 2989 (m), 2934 (m), 2833 (m), 1754 (s), 1713 (s), 1682 (s), 1639 (m), 1551 (w), 1514 (w), 1452 (m), 1398 (w), 1373 (w), 1348 (w), 1283 (w), 1229 (s), 1207 (s), 1161 (w), 1109 (vw), 1076 (w), 1043 (w), 1016 (w), 972 (vw), 935 (vw), 899 (w), 868 (w), 835 (w), 820 (w), 795 (w), 777 (w), 756 (w), 706 (w), 642 (w), 577 (vw), 565 (w), 552 (w), 455 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,39 (s, 1H, NH-3), 11,18 (bs, 1H, NH-1), 8,38 (s, 1H, H-6), 8,05 (s, 1H, H-5'), 5,41 (s, 2H, CH₂), 4,18 (q, 2H, $J_1 = 14,2$, $J_2 = 7,1$ Hz, OCH₂), 1,22 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 167,21 (s, COOCH₂), 162,10 (s, C-4), 150,52 (s, C-2), 138,97 (s, C-4'), 137,57 (d, C-6),

123,37 (d, C-5'), 103,70 (s, C-5), 61,39 (t, OCH₂CH₃), 50,26 (t, NCH₂CO), 13,92 (q, OCH₂CH₃); HRMS: m/z : 266,0885 [M+H]⁺; izračunato C₁₀H₁₁N₅O₄·H⁺: 266,0889.

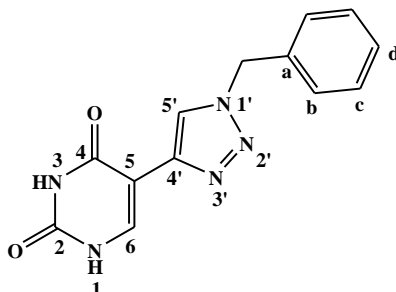


3.2.3.13. 5-[1-(2-Hidroksietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (**29**);
5-triazoliluracil derivat **29**.

U suspenziju ishodnog 5-triazoliluracilnog derivata **28** (100 mg, 0,377 mmol) u dimetoksietanu (DME) (4 mL) dodan je NaBH₄ (74,3 mg, 1,885 mmol). Bijela suspenzija refluksirana je 20-ak min, a potom je polako (u periodu od oko 15 min) kap po kap dodan MeOH (337 μL, 8,29 mmol) razrijeđen s DME (2 mL). Nakon što je dokapan cijeli volumen reagensa reakcijska smjesa se na trenutak gotovo izbistrila, a potom ponovno zamutila. Refluksiranje je nastavljeno narednih 25 h, a potom je reakcijska smjesa uparena do suha. Zaostala bijela krutina otopljena je u MeOH i nekoliko kapi H₂O te je čišćena preparativnom kromatografijom u sustavu CH₂Cl₂/MeOH 3:1. Izolirano je 50 mg (60 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **29**.

t.t. 267–269 °C; R_f = 0,2 (CH₂Cl₂/MeOH 6:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 232 i 291 log $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 4,12 i 3,97; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3240 (m), 3173 (m), 3107 (m), 3066 (m), 3013 (m), 2966 (w), 2918 (w), 2851 (w), 1716 (s), 1670 (s), 1553 (m), 1443 (w), 1431 (w), 1402 (w), 1370 (w), 1356 (w), 1217 (m), 1165 (w), 1076 (w), 1067 (w), 1058 (w), 1049 (w), 984 (w), 834 (w), 812 (w), 777 (vw), 756 (w), 745 (w), 705 (w), 694 (w), 674 (w), 633 (w), 619 (vw), 548 (w), 519 (vw), 440 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,40 (s, 1H, NH-3), 11,18 (bs, 1H, NH-1), 8,29 (s, 1H, H-6), 8,02 (s, 1H, H-5'), 5,02 (t, 1H, J = 5,2 Hz, NCH₂CH₂OH), 4,42 (t, 2H, J = 5,3 Hz, NCH₂CH₂OH), 3,77 (dd, 2H, J_1 = 10,4, J_2 = 5,1 Hz, NCH₂CH₂OH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 162,16 (s, C-4), 150,59 (s, C-2), 138,76 (s, C-4'), 137,33 (d, C-6), 122,41 (d, C-5'),

104,00 (s, C-5), 59,93 (t, NCH₂CH₂OH), 52,13 (t, NCH₂CH₂OH); HRMS: *m/z*: 224,0773 [M+H]⁺; izračunato C₈H₉N₅O₃·H⁺: 224,0784.

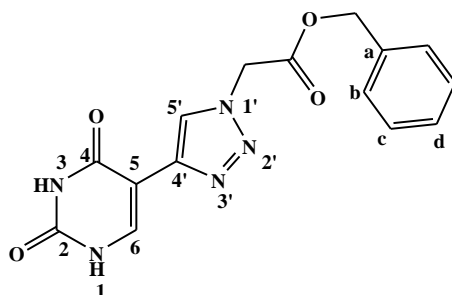


3.2.3.14. 5-(1-Benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**30**); 5-triazoliluracil derivat **30**.

Benzil bromid (243 μ L, 2 mmol) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, *v/v*, 4 mL) te se otopini doda NaN₃ (130 mg, 2 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i DMEDA (34 μ L, 0,3 mmol, 95 %-tni). Dodatkom DMEDA u bistru bezbojnu otopinu ona postaje plava, a potom nakon nekoliko minuta tamno zelena. Nakon 1 h miješanja na sobnoj temperaturi u tamno zelenu bistru otopinu doda se 5-etiniluracil **18** (109 mg, 0,8 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i na kraju DMEDA (34 μ L, 0,3 mmol, 95 %-tni) pri čemu reakcijska smjesa mijenja boju iz tamno zelene u svijetlo plavu. Suspenzija se miješa na sobnoj temperaturi narednih 1 h, a zatim filtrira. Tako je dobiveno 215 mg (kvant.) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **30**. Analitički uzorak dobiven je prekrizalizacijom sirovog produkta iz metanola/CH₂Cl₂.

t.t. 270–272 °C; *R_f* = 0,5 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max} /nm 231 i 291 log ϵ /dm³mol⁻¹cm⁻¹ 4,10 i 4,00; IR (KBr) ν /cm⁻¹: 3451 (w), 3221 (m), 3151 (m), 3065 (m), 3032 (m), 2972 (m), 2818 (m), 1794 (w), 1728 (s), 1682 (s), 1551 (m), 1495 (w), 1456 (m), 1425 (m), 1360 (w), 1342 (w), 1312 (vw), 1240 (w), 1227 (m), 1207 (w), 1196 (w), 1149 (vw), 1130 (vw), 1063 (vw), 1045 (m), 1014 (vw), 966 (vw), 874 (m), 829 (w), 818 (w), 793 (w), 771 (m), 721 (s), 692 (w), 667 (w), 650 (w), 582 (vw), 554 (w), 471 (w), 457 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 11,40 (s, 1H, NH-3), 11,19 (bs, 1H, NH-1), 8,37 (s, 1H, H-6), 8,02 (s, 1H, H-5'), 7,31–7,40 (m, 5H, Ph), 5,63 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 162,16 (s, C-4), 150,58 (s, C-2), 139,29 (s,

Ph_a), 137,61 (d, C-6), 136,17 (s, C-4'), 128,75 (d, Ph_b), 128,11 (d, Ph_d), 127,94 (d, Ph_c), 122,03 (d, C-5'), 103,79 (s, C-5), 52,70 (t, NCH₂Ph); HRMS: m/z : 270,0971 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₃H₁₁N₅O₂·H⁺: 270,0991.

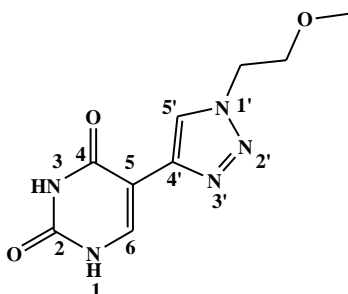


3.2.3.15. Benzil 2-[4-(2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]acetat (**31**); 5-triazoliluracil derivat **31**.

Benzil 2-bromacetat (330 μ L, 2 mmol, 96 %-tni) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, v/v , 4 mL) te se otopini doda NaN₃ (130 mg, 2 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i DMEDA (34 μ L, 0,3 mmol, 95 %-tni). Dodatkom DMEDA u bistru bezbojnu otopinu ona postaje plava potom zelena pa žuta i na kraju narančasta. Nakon 1 h miješanja na ~ 90 °C u narančastu bistru otopinu doda se 5-etiniluracil **18** (109 mg, 0,8 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), pri čemu reakcijska smjesa postaje svijetlija, CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i na kraju DMEDA (34 μ L, 0,3 mmol, 95 %-tni) pri čemu se reakcijska smjesa počne pjeniti. Suspenzija bež boje miješa se na temperaturi od ~ 90 °C narednih 30 min, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Hlađenjem taloži talog koji se filtrira te je tako dobiveno 260 mg (kvant.) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **31**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz metanola.

t.t. 292–295 °C; R_f = 0,4 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 231 i 291 log $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 4,10 i 4,00; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3440 (w), 3215 (m), 3160 (m), 3065 (m), 3034 (m), 2822 (w), 1744 (s), 1724 (s), 1682 (s), 1553 (w), 1493 (w), 1456 (w), 1427 (w), 1394 (w), 1362 (vw), 1339 (vw), 1223 (m), 1203 (m), 1067 (vw), 1045 (w), 1014 (vw), 974 (vw), 879 (w), 827 (vw), 802 (w), 771 (w), 737 (w), 694 (w), 652 (w), 608 (vw), 577 (vw), 554 (w), 498 (vw), 463 (w) 451

(vw); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 11,43 (s, 1H, NH-3), 11,22 (bs, 1H, NH-1), 8,42 (s, 1H, H-6), 8,06 (s, 1H, H-5'), 7,38 (m, 5H, Ph), 5,51 (s, 2H, OCH₂Ph), 5,21 (s, 2H, NCH₂CO); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 167,27 (s, COOCH₂), 162,15 (s, C-4), 150,58 (s, C-2), 139,00 (s, Ph_a), 137,64 (d, C-6), 135,40 (s, C-4'), 128,46 (d, Ph_b), 128,26 (d, Ph_d), 128,10 (d, Ph_c), 123,45 (d, C-5'), 103,69 (s, C-5), 66,70 (t, OCH₂Ph), 50,27 (t, NCH₂CO); HRMS: m/z : 328,1025 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₅H₁₃N₅O₄·H⁺: 328,1046.

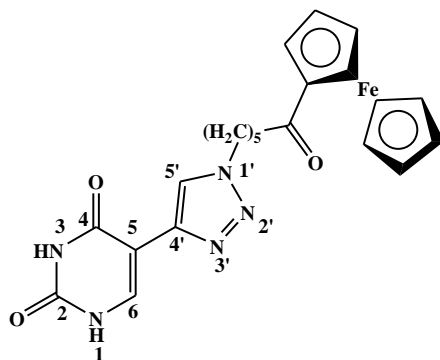


3.2.3.16. 5-[1-(2-Metoksietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (**32**);
5-triazoliluracil derivat **32**.

2-Brometil-metil-eter (190 μL , 2 mmol) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, v/v , 4 mL) te se otopini doda NaN₃ (130 mg, 2 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i DMEDA (34 μL , 0,3 mmol, 95 %-tni). Dodatkom DMEDA u bistru bezbojnu otopinu ona postaje plava, a potom grijanjem do ~ 90 °C tamno zelena. Nakon 1 h miješanja na temperaturi ~ 90 °C u tamno zelenu bistru otopinu doda se 5-etiniluracil **18** (109 mg, 0,8 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), pri čemu reakcijska smjesa mijenja boju u oker, CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i na kraju DMEDA (34 μL , 0,3 mmol, 95 %-tni). Suspenzija se miješa na temperaturi od ~ 90 °C narednih 30 min, a zatim ohladi na sobnu temperaturu i talog filtrira. Sirovi produkt potom se otopi u MeOH te se otopina vruća filtrira kroz sloj Celita, a filtrat upari. Tako je dobiveno 189 mg (kvant.) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **32**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz metanola.

t.t. 265–270 °C; $R_f = 0,3$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max} /nm 230 i 290 log $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,20 i 4,00; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3466 (w), 3163 (m), 3072 (m), 3037 (m), 2899 (m), 1707 (s),

1672 (s), 1551 (m), 1470 (w), 1445 (w), 1427 (m), 1364 (w), 1327 (vw), 1288 (vw), 1243 (w), 1227 (w), 1207 (w), 1196 (w), 1177 (w), 1140 (vw), 1122 (m), 1074 (vw), 1041 (w), 1014 (w), 962 (vw), 876 (w), 814 (m), 785 (w), 767 (vw), 702 (w), 646 (w), 621 (vw), 557 (w), 465 (w) 448 (vw); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 11,40 (s, 1H, NH-3), 11,19 (bs, 1H, NH-1), 8,29 (s, 1H, H-6), 8,02 (s, 1H, H-5'), 4,56 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,72 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,23 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 162,13 (s, C-4), 150,56 (s, C-2), 138,90 (s, C-4'), 137,41 (d, C-6), 122,29 (d, C-5'), 103,90 (s, C-5), 70,25 (t, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 57,90 (q, OCH_3), 49,14 (t, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); HRMS: m/z : 238,0923 [$M+\text{H}$] $^+$; izračunato $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot \text{H}^+$: 238,0940.



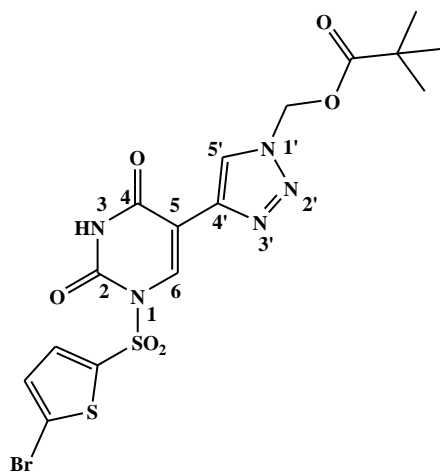
3.2.3.17. 5-[1-(6-Ferocenil-6-oksoheksil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**33**); 5-triazoliluracil derivat **33**.

6-Brom-1-oksoheksilferocen (726,2 mg, 2 mmol) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, v/v, 4 mL) te se otopini doda NaN₃ (130 mg, 2 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i DMEDA (34 μL , 0,3 mmol, 95 %-tni). Nakon 1 h miješanja na temperaturi ~ 90 °C u tamno crvenu bistru otopinu doda se 5-etiniluracil **18** (109 mg, 0,8 mmol), Na-askorbat (20 mg, 0,1 mmol, 99 %-tni), CuI (38,1 mg, 0,2 mmol) i na kraju DMEDA (34 μL , 0,3 mmol, 95 %-tni). Tamno crvena suspenzija se miješa na temperaturi od ~ 90 °C narednih 30 min, a zatim ohladi na sobnu temperaturu i dobiveni talog filtrira. Sirovi produkt potom se prekrizalizira iz MeOH te je tako dobiveno 180 mg (49 %) tamno crvenog taloga 5-triazoliluracil derivata **33**.

t.t. > 250 °C (raspad); $R_f = 0,5$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max} /nm 229 i 286 log $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,40 i 4,20; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3445 (w), 3223 (w), 3155 (m), 3074 (m), 3031 (m), 2934 (m), 2862 (w), 2825 (w), 1717 (s), 1670 (s), 1547 (w), 1452 (m), 1429 (w), 1377 (w), 1237

(w), 1225 (w), 1196 (w), 1105 (vw), 1063 (vw), 1040 (w), 1027 (vw), 1001 (vw), 972 (vw), 885 (w), 824 (w), 787 (w), 772 (w), 650 (w), 555 (w), 480 (w); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 11,39 (s, 1H, NH-3), 11,16 (s, 1H, NH-1), 8,26 (s, 1H, H-6), 7,98 (s, 1H, H-5'), [4,77 (s, 2H), 4,54 (s, 2H), 4,21 (s, 5H), ferocenski protoni], [4,41 (m, 2H), 2,71 (m, 2H), 1,91 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,37 (m, 2H), 5 CH₂]; ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 203,19 (s, (CH₂)₅C=O), 162,11 (s, C-4), 150,52 (s, C-2), 138,87 (s, C-4'), 137,36 (d, C-6), 121,86 (d, C-5'), 103,97 (s, C-5), [79,03 (s), 71,89 (d), 69,44 (d), 68,98 (d), ferocenski signali], [49,21 (t), 38,51 (t), 29,68 (t), 25,66 (t), 23,27 (t), 5 CH₂]; HRMS: m/z : 462,1227 [$M+\text{H}$]⁺; izračunato C₂₂H₂₃FeN₅O₃·H⁺: 462,1229.

3.2.4. Priprava *N*-1-sulfoniluracilnih C5 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata



3.2.4.1. {4-[1-(5-Bromotiofen-2-ilsulfonil)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il}metil pivalat (**34**); 5-triazoliluracil derivat **34**.

3.2.4.1.1. Metoda 1

U suspenziju 5-triazoliluracil derivata **19** (146,6 mg, 0,5 mmol) u suhom CH₃CN (2 mL) dokapa se *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamid (BSA) (257 μL , 1 mmol) te se reakcijska smjesa, bistra bezbojna otopina, refluksira 30 min, a potom ohladi na 0 °C. U ohlađenu bezbojnu otopinu uz miješanje se doda 5-bromtiofen-2-sulfonil klorid (116,2 mg, 0,5 mmol) te se žuta otopina miješa do sobne temperature, a potom ponovno refluksira narednih 1 h. Dodatkom nekoliko kapi metanola u ohlađenu reakcijsku smjesu taloži bijeli talog koji se filtrira te je tankoslojnom

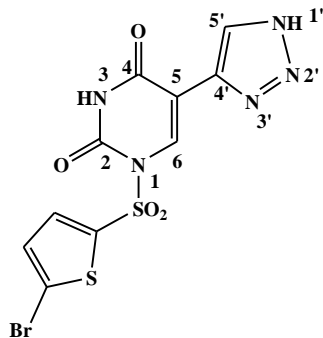
kromatografijom utvrđeno da se radi o polaznom 5-triazoliluracil derivatu **19**. Filtrat se čisti preparativnom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 9:1) te je izolirano 12 mg (4,6 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **34**.

Ista metoda s istim masama reaktanata ponovljena je uz produljeno vrijeme reakcije (24 h) te je tako izolirano 40 mg (15,4 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **34** i 80 mg polaznog 5-triazoliluracil derivata **19**.

t.t. 233–235 °C; $R_f = 0,7$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 237 i 290, $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,20 i 4,30; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3435 (w), 3217 (m), 3150 (w), 3096 (w), 3053 (w), 2999 (w), 2972 (w), 2935 (w), 2874 (w), 1730 (s), 1720 (s), 1693 (s), 1639 (w), 1537 (w), 1506 (vw), 1479 (w), 1448 (m), 1429 (w), 1418 (w), 1389 (m), 1340 (w), 1312 (vw), 1281 (w), 1257 (s), 1215 (w), 1188 (m), 1140 (s), 1092 (w), 1022 (m), 986 (w), 968 (w), 955 (vw), 831 (w), 804 (w), 791 (w), 743 (vw), 719 (w), 706 (w), 673 (w), 656 (vw), 617 (w), 590 (m), 557 (m), 540 (m), 478 (vw), 457 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 12,25 (bs, 1H, NH-3), 8,64 (s, 1H, H-6), 8,56 (s, 1H, H-5'), 7,97 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz, H-tiofenski), 7,50 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-tiofenski), 6,38 (s, 2H, CH₂), 1,12 (s, 9H, 3 CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 176,49 (s, COOCH₂), 161,02 (s, C-4), 153,70 (s, C-2), 146,79 (s, C-4'), 138,71 (d, C-6), 138,00 (s, CHCS), 135,05 (d, CHCS), 132,36 (d, CHCBr), 131,64 (d, C-5'), 124,90 (s, CHCBr), 106,86 (s, C-5), 70,10 (t, NCH₂O), nije izašao (s, (CH₃)₃CCO), 26,47 (q, (CH)₃C); HRMS: m/z : 517,9796 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₆H₁₆BrN₅O₆S₂·H⁺: 517,9804.

3.2.4.1.2. Metoda 2

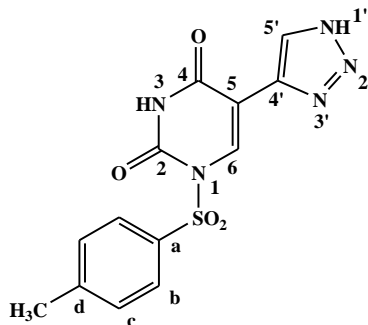
U otopinu 5-triazoliluracil derivata **19** (100 mg, 0,341 mmol) u DMF-u (2 mL) dokapa se uz miješanje DBU (53 μL , 0,341 mmol) i reakcijska smjesa, bistra bezbojna otopina miješa 1,5 h na sobnoj temperaturi, a potom ohladi na 0 °C. U ohlađenu otopinu doda se 5-bromtiofen-2-sulfonil klorid (79,3 mg, 0,341 mmol) te se žuta otopina miješa na sobnoj temperaturi naredna 4 h. Reakcijska smjesa potom se upari do suha pri sniženom tlaku u vodenoj kupelji temperature do 40 °C. U upareni ostatak doda se malo MeOH te se istaloženi produkt filtrira, a filtrat čisti preparativnom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Ukupno je izolirano 124 mg (70 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **34**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz metanola.



3.2.4.2. 1-(5-Bromotiofen-2-ilsulfonil)-5-(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**35**); 5-triazoliluracil derivat **35**.

U suspenziju 5-triazoliluracil derivata **20** (121,3 mg, 0,677 mmol) u suhom CH₃CN (2 mL) dokapa se BSA (523 μL, 2,0314 mmol) te se reakcijska smjesa, bistra bezbojna otopina, refluksira 30 min, a potom ohladi na 0 °C. U ohlađenu bezbojnu otopinu uz miješanje se doda 5-bromtiofen-2-sulfonil klorid (157,4 mg, 0,677 mmol, 97 %) te se žuta otopina refluksira narednih 2 h 45 min nakon čega se ohladi na sobnu temperaturu. Dodatkom nekoliko kapi metanola taloži bijeli talog koji se filtrira te je tankoslojnom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) i snimanjem ¹H NMR spektra (DMSO-*d*₆) utvrđeno da se radi o polaznom 5-triazoliluracil derivatu **20** (90,4 mg, 75 %). Filtrat se čisti preparativnom kromatografijom. Izolirane su dvije vrpce, a snimanjem ¹H NMR (DMSO-*d*₆) spektra donje vrpce utvrđeno je da se radi o željenom produktu **35** (15 mg, 5,5 %). On je potvrđen ESI-MS spektrima u pozitivnom (ES⁺) i negativnom (ES⁻) modu.

t.t. 173–175 °C; *R*_f = 0,4 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 234 i 289, log ε/dm³mol⁻¹cm⁻¹ 4,11 i 4,21; IR (KBr) ν/cm⁻¹: 3456 (s), 3096 (m), 1720 (m), 1701 (s), 1686 (s), 1541 (w), 1437 (w), 1431 (w), 1393 (m), 1356 (w), 1310 (w), 1256 (m), 1178 (m), 1124 (w), 1090 (w), 1022 (m), 970 (w), 910 (vw), 802 (w), 748 (w), 721 (w), 673 (w), 617 (m), 588 (m), 557 (m), 541 (m); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 15,30 (bs, 1H, NH-1'), 12,18 (bs, 1H, NH-3), 8,62 (s, 1H, H-5'), 8,45 (s, 1H, H-6), 7,96 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz, H-tiofenski), 7,50 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz, H-tiofenski); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 159,79 (s, C-4), 149,80 (s, C-2), 146,73 (s, C-4'), 138,58 (d, C-5'), 138,52 (d, C-6), 138,41 (s, CHCS), 135,05 (d, CHCS), 131,58 (d, CHCBr), 124,75 (s, CHCBr), 100,90 (s, C-5); HRMS: *m/z*: 403,9112 [*M*+H]⁺; izračunato C₁₀H₆BrN₅O₄S₂·H⁺: 403,9123.



3.2.4.3. 1-Tosyl-5-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (**36**); 5-triazoliluracil derivat **36**.

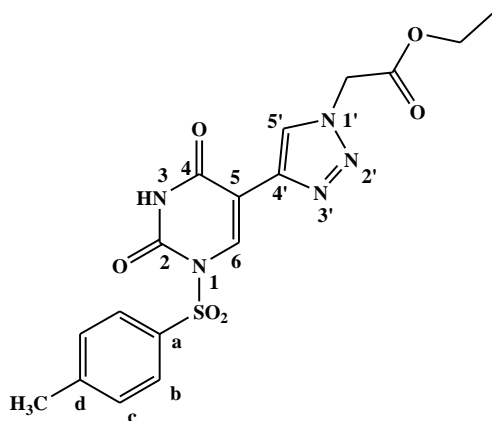
3.2.4.3.1. Metoda 1

U suspenziju derivata **20** (55 mg, 0,165 mmol) i K_2CO_3 (42,43 mg, 0,165 mmol) u DMF-u (2 mL) uz miješanje se doda tosil-klorid (TsCl) (58,54 mg, 0,165 mmol) te se žuta blago zamućena otopina miješa na sobnoj temperaturi 3 h. Nakon 3 h miješanja više se ne uočavaju ishodni spojevi na TLC-pločici nego samo mrlja potencijalnog produkta kao i produkt raspada TsCl. Reakcijska smjesa se upari do suha, a upareni ostatak čisti na pločama za preparativnu kromatografiju. Od niza mrlja koje su uočene na preparativnoj ploči izdvojene su vrlo bliske koje bi odgovarale potencijalnom produktu. Ponovnim čišćenjem izolirana je mrlja koja prema spektru 1H NMR (DMSO- d_6) odgovara željenom produktu **36**. Izolirano je 11,5 mg (11,23 %) produkta **36**. On je potvrđen i ukupnim odnosno fragmentacijskim ESI-MS spektrima u pozitivnom (ES^+) i negativnom (ES^-) modu.

t.t. 238–240 °C; $R_f = 0,4$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 229, 264 i 296, $\log \epsilon/dm^3mol^{-1}cm^{-1}$ 4,26, 4,06 i 4,17; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3447 (s), 3069 (m), 1713 (s), 1678 (s), 1637 (m), 1593 (w), 1535 (w), 1445 (w), 1431 (w), 1394 (m), 1315 (vw), 1246 (w), 1225 (w), 1198 (m), 1178 (w), 1161 (m), 1122 (vw), 1088 (w), 1074 (vw), 970 (vw), 945 (vw), 872 (w), 816 (w), 785 (vw), 702 (vw), 673 (m), 662 (m), 635 (vw), 584 (m), 554 (w), 542 (m), 453 (vw); 1H NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 15,05 (bs, 1H, NH-1'), 11,49 (bs, 1H, NH-3), 8,44 (s, 1H, H-5'), 8,04 (s, 1H, H-6), 7,90 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-Ts), 7,49 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, H-Ts), 2,40 (s, 3H, $CH_3(Ts)$); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 161,99 (s, C-4), 150,47 (s, C-2), 147,07 (s, C-4'), 145,82 (s, Ts_d), 141,84 (d, C-5'), 138,07 (d, C-6), 131,97 (s, Ts_a), 130,59 (d, Ts_c), 128,11 (d, Ts_b), 100,97 (s, C-5), 21,16 (q, $\underline{C}H_3(Ts_d)$); HRMS: m/z : 334,0592 [$M+H$] $^+$; izračunato $C_{13}H_{11}N_5O_4S \cdot H^+$: 334,0605.

3.2.4.3.2. Metoda 2

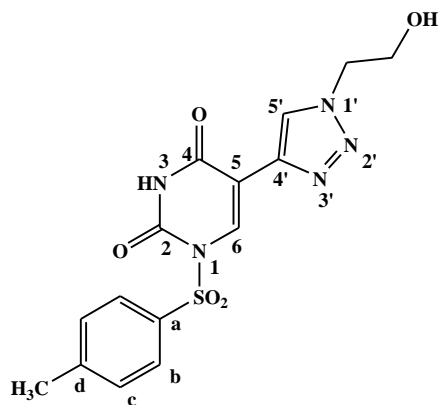
U suspenziju 5-triazoliluracil derivata **20** (100 mg, 0,56 mmol) u suhom CH₃CN (2 mL) dokapa se BSA (431 μL, 1,67 mmol) te se reakcijska smjesa, bistra bezbojna otopina, refluksira 30 min, a potom ohladi na 0 °C. U ohlađenu bezbojnu otopinu uz miješanje se doda TsCl (106,4 mg, 0,56 mmol) te se žuta otopina miješa do sobne temperature, a potom ponovno refluksira narednih 1 h. Dodatkom nekoliko kapi metanola u ohlađenu reakcijsku smjesu taloži bijeli talog koji se filtrira te je tankoslojnom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) i snimanjem ¹H NMR spektra (DMSO-*d*₆) utvrđeno da se radi o polaznom 5-triazoliluracil derivatu **20** (65 mg, 65 %). Filtrat se čisti preparativnom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 9:1) te je izolirano 15 mg (8 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **36**.



3.2.4.4. Etil 2-[4-(1,2,3,4-tetrahidro-2,4-diokso-1-tosilpirimidin-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]acetat (**37**); 5-triazoliluracil derivat **37**.

U otopinu 5-triazoliluracil derivata **28** (148 mg, 0,558 mmol) u DMF-u (3,3 mL) dokapa se uz miješanje DBU (86 μL, 0,558 mmol) i reakcijska smjesa, bistra bezbojna otopina miješa 2 h na sobnoj temperaturi, a potom se ohladi na 0 °C. U ohlađenu otopinu doda se TsCl (106,4 mg, 0,558 mmol) te se otopina miješa na sobnoj temperaturi narednih 2 h. Reakcijska smjesa potom se upari do suha pri sniženom tlaku u vodenoj kupelji temperature do 40 °C. U upareni žuti uljasti ostatak doda se malo MeOH te se istaloženi produkt filtrira. Ukupno je izolirano 210 mg (90 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **37**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 240–242 °C; $R_f = 0,6$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 230 i 287 $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,35 i 4,08; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3169 (m), 3104 (m), 3055 (m), 3001 (m), 2862 (m), 1738 (s), 1680 (s), 1594 (w), 1543 (m), 1466 (m), 1453 (w), 1436 (m), 1417 (w), 1383 (m), 1354 (w), 1344 (w), 1329 (w), 1309 (w), 1261 (s), 1231 (s), 1192 (s), 1176 (s), 1084 (m), 1045 (m), 1013 (m), 918 (w), 870 (w), 814 (m), 744 (w), 723 (w), 686 (w), 660 (m), 620 (w), 557 (s), 540 (m), 469 (w), 420 (vw); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 12,03 (bs, 1H, NH-3), 8,76 (s, 1H, H-6), 8,49 (s, 1H, H-5'), 8,01 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-Ts), 7,50 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-Ts), 5,45 (s, 2H, CH_2), 4,19 (q, 2H, $J_1 = 14,2$, $J_2 = 7,1$ Hz, OCH_2), 2,44 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{Ts})$), 1,23 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 167,07 (s, COOCH_2), 160,97 (s, C-4), 146,46 (s, C-2), 146,42 (s, Ts_d), 137,64 (s, C-4'), 132,88 (s, Ts_a), 132,34 (d, C-6), 129,80 (d, Ts_c), 129,14 (d, Ts_b), 124,72 (d, C-5'), 106,82 (s, C-5), 61,41 (t, OCH_2CH_3), 50,35 (t, NCH_2CO), 21,12 (q, $\text{CH}_3(\text{Ts}_d)$), 13,89 (q, OCH_2CH_3); HRMS: m/z : 420,0974 [$M+\text{H}$] $^+$; izračunato $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_6\text{S} \cdot \text{H}^+$: 420,0978.

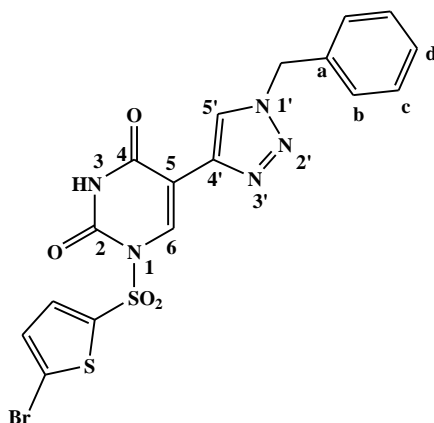


3.2.4.5. 5-[1-(2-Hidroksietil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1-tosilpirimidin-2,4(1H,3H)-dion (**38**); 5-triazoliluracil derivat **38**.

U otopinu 5-triazoliluracil derivata **29** (30 mg, 0,134 mmol) u DMF-u (800 μL) dokapa se uz miješanje DBU (21 μL , 0,134 mmol) i reakcijska smjesa, bistra bezbojna otopina miješa 1,5 h na sobnoj temperaturi, a potom se ohladi na 0 °C. U ohlađenu otopinu doda se TsCl (25,6 mg, 0,134 mmol) te se otopina miješa na sobnoj temperaturi narednih 2,5 h. Reakcijska smjesa potom se upari do suha pri sniženom tlaku u vodenoj kupelji temperature do 40 °C. U upareni žuti uljasti ostatak doda se malo MeOH te se istaloženi produkt filtrira, a filtrat čisti preparativnom

kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Ukupno je izolirano 30 mg (59 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **38**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 236–238 °C; $R_f = 0,5$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 231 i 286 $\log \epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,20 i 3,93; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3418 (m), 3160 (w), 3138 (w), 3107 (w), 3072 (w), 2956 (w), 2920 (w), 2852 (w), 1710 (s), 1686 (s), 1649 (m), 1630 (m), 1594 (w), 1553 (m), 1526 (w), 1448 (m), 1431 (w), 1385 (w), 1366 (w), 1350 (w), 1310 (w), 1259 (s), 1188 (s), 1176 (s), 1159 (m), 1084 (m), 1070 (m), 1040 (m), 1022 (m), 974 (w), 911 (vw), 870 (vw), 844 (vw), 802 (w), 733 (w), 665 (m), 608 (w), 561 (s), 540 (m), 463 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 12,02 (s, 1H, NH-3), 8,73 (s, 1H, H-6), 8,39 (s, 1H, H-5'), 8,00 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-Ts), 7,50 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, H-Ts), 5,00 (t, 1H, $J = 5,3$ Hz, NCH₂CH₂OH), 4,47 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz, NCH₂CH₂OH), 3,79 (dd, 2H, $J_1 = 10,7$, $J_2 = 5,3$ Hz, NCH₂CH₂OH), 2,44 (s, 3H, CH₃(Ts)); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 161,07 (s, C-4), 146,55 (s, C-2), 146,51 (s, Ts_d), 137,45 (s, C-4'), 132,88 (s, Ts_a), 132,09 (d, C-6), 129,89 (d, Ts_c), 129,20 (d, Ts_b), 123,76 (d, C-5'), 107,14 (s, C-5), 59,88 (t, NCH₂CH₂OH), 52,26 (t, NCH₂CH₂OH), 21,20 (q, CH₃(Ts_d)); HRMS: m/z : 378,0852 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₅H₁₅N₅O₅S·H⁺: 378,0872.



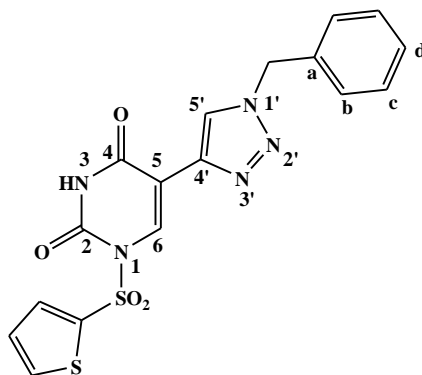
3.2.4.6. 5-(1-Benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1-(5-bromotiofen-2-ilsulfonil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (**39**); 5-triazoliluracil derivat **39**.

U otopinu 5-triazoliluracil derivata **30** (250 mg, 0,928 mmol) u DMF-u (5,5 mL) dokapa se uz miješanje DBU (143 μL , 0,928 mmol) i reakcijska smjesa, bistra bezbojna otopina miješa 1 h na sobnoj temperaturi, a potom se ohladi na 0 °C. U ohlađenu otopinu doda se 5-bromtiofen-2-

sulfonil klorid (209,4 mg, 0,928 mmol, 0,97 %) te se žuta otopina miješa na sobnoj temperaturi naredna 2 h. Reakcijska smjesa potom se upari do suha pri sniženom tlaku u vodenoj kupelji temperature do 40 °C. U upareni uljasti ostatak doda se malo MeOH te se istaloženi produkt filtrira, a filtrat se čisti preparativnom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Ukupno je izolirano 150 mg (35 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **39**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz smjese CH₂Cl₂/MeOH 1:1.

t.t. 204–207 °C; $R_f = 0,8$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 235 i 290, $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,30 i 4,30; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3440 (m), 3062 (w), 2853 (w), 1751 (m), 1742 (m), 1698 (m), 1678 (s), 1541 (w), 1499 (vw), 1460 (w), 1443 (w), 1429 (w), 1391 (m), 1335 (vw), 1259 (m), 1182 (s), 1090 (vw), 1047 (vw), 1013 (w), 972 (vw), 810 (vw), 744 (w), 732 (vw), 715 (w), 704 (w), 689 (vw), 673 (w), 625 (w), 588 (m), 557 (w), 540 (m), 467 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 12,21 (bs, 1H, NH-3), 8,60 (s, 1H, H-6), 8,50 (s, 1H, H-5'), 7,96 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-tiofenski), 7,50 (d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-tiofenski), 7,32–7,38 (m, 5H, Ph), 5,67 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 161,17 (s, C-4), 146,88 (s, C-2), 138,60 (d, C-6), 137,95 (s, Ph_a), 136,03 (s, C-4'), 135,14 (s, CHCS), 131,82 (d, CHCS), 131,61 (d, CHCBr), 128,76 (d, Ph_b), 128,16 (d, Ph_d), 127,93 (d, Ph_c), 124,82 (s, CHCBr), 123,48 (d, C-5'), 107,37 (s, C-5), 52,81 (t, NCH₂Ph); HRMS: m/z : 493,9591 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₇H₁₂BrN₅O₄S₂·H⁺: 493,9592.

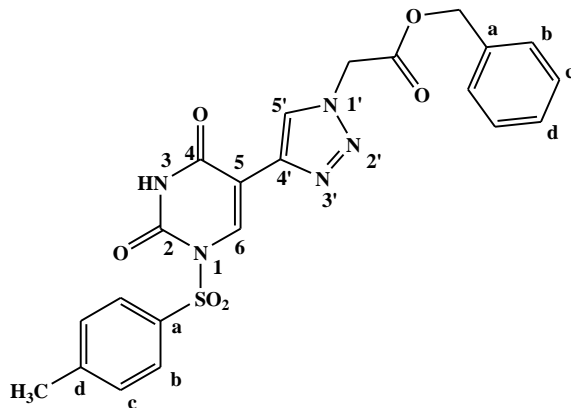
NAPOMENA! Za sintezu spoja **39** poželjno je da ishodni derivat **30** bude prekriziran jer to znatno olakšava izolaciju!



3.2.4.7. 5-(1-Benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-1-(tiofen-2-ilsulfonil)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**40**); 5-triazoliluracil derivat **40**.

Ishodni 5-triazoliluracil derivat **39** (100 mg, 0,202 mmol) otopi se u smjesi CH₂Cl₂/MeOH 1:1 (120 mL) te se u bistru otopinu doda 10 %-tni Pd/C (10 mg). Reakcijska smjesa se hidrira 24 h u Parr-ovom aparatu pri tlaku od 45 psi (3,1 bar). Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu CH₂Cl₂/MeOH 9:1 te je zaključeno da hidriranje treba nastaviti. Nakon 24 h u reakcijsku se smjesu ponovno doda jednaka količina 10 %-tnog Pd/C (10 mg) te se hidriranje nastavi narednih 24 h. Reakcijska smjesa potom se filtrira preko Celita, a filtrat upari do suha. Tako je dobiveno 77 mg (92 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **40**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz smjese CH₂Cl₂/MeOH.

t.t. 240–243 °C; $R_f = 0,6$ (CH₂Cl₂/MeOH 20:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 231 i 287, $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,30 i 4,10; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3425 (w), 3215 (m), 3161 (w), 3065 (w), 2870 (w), 1734 (m), 1697 (s), 1541 (w), 1495 (vw), 1448 (w), 1393 (w), 1339 (w), 1257 (m), 1225 (w), 1182 (s), 1130 (vw), 1092 (w), 1047 (w), 1011 (w), 912 (vw), 856 (w), 816 (vw), 746 (w), 739 (w), 729 (w), 708 (w), 686 (w), 667 (w), 619 (vw), 579 (m), 568 (w), 559 (w), 540 (m) 478 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 12,14 (bs, 1H, NH-3), 8,66 (s, 1H, H-6), 8,49 (s, 1H, H-5'), 8,28 (dd, 1H, $J_1 = 5,0$, $J_2 = 1,4$ Hz, H-tiofenski), 8,11 (dd, 1H, $J_1 = 4,0$, $J_2 = 1,5$ Hz, H-tiofenski), 7,30–7,38 (m, 6H, Ph, H-tiofenski), 5,67 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 160,92 (s, C-4), 146,52 (s, C-2), 138,57 (d, C-6), 138,00 (d, CHCHS), 137,86 (s, Ph_a), 135,96 (s, C-4'), 134,55 (s, CHCS), 131,93 (d, CHCS), 128,72 (d, Ph_b), 128,12 (d, CHCHS), 128,09 (d, Ph_d), 127,90 (d, Ph_c), 123,42 (d, C-5'), 107,16 (s, C-5), 52,79 (t, NCH₂Ph); HRMS: m/z : 416,0468 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₇H₁₃N₅O₄S₂·H⁺: 416,0487.



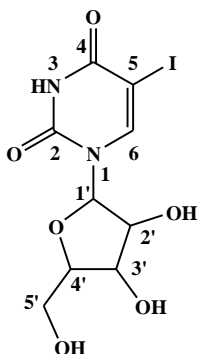
3.2.4.8. Benzil 2-(4-(1,2,3,4-tetrahidro-2,4-diokso-1-tosilpirimidin-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)acetat (**41**); 5-triazoliluracil derivat **41**.

U otopinu 5-triazoliluracil derivata **31** (100 mg, 0,306 mmol) u DMF-u (1,8 mL) dokapan je uz miješanje DBU (47,1 μL , 0,306 mmol) i reakcijska smjesa, bistra bezbojna otopina ostavljena da se miješa 1 h na sobnoj temperaturi, a potom je ohlađena na 0 °C. U ohlađenu otopinu dodan je TsCl (58,3 mg, 0,306 mmol) te je otopina ostavljena da se miješa na sobnoj temperaturi narednih 1,5 h. Reakcijska smjesa potom je uparena do suha pri sniženom tlaku u vodenoj kupelji temperature do 40 °C. U upareni žuti uljasti ostatak dodano malo MeOH te je istaloženi produkt filtriran. Ukupno je izolirano 126 mg (86 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **41**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz smjese $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:5.

t.t. 215–217 °C; $R_f = 0,7$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 231 i 285 $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,37 i 4,11; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3313 (w), 3139 (w), 3105 (w), 2960 (vw), 2918 (vw), 1736 (s), 1682 (s), 1595 (vw), 1543 (w), 1448 (w), 1385 (w), 1354 (vw), 1254 (s), 1223 (w), 1209 (w), 1191 (m), 1175 (m), 1086 (w), 1044 (w), 1020 (w), 1013 (w), 974 (vw), 814 (vw), 783 (w), 754 (w), 743 (w), 726 (vw), 690 (w), 658 (w), 613 (w), 557 (m), 541 (w); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 12,07 (bs, 1H, NH-3), 8,76 (s, 1H, H-6), 8,53 (s, 1H, H-5'), 8,01 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-Ts), 7,50 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-Ts), 7,37–7,41 (m, 5H, Ph), 5,55 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,22 (s, 2H, CH_2), 2,43 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{Ts})$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 167,19 (s, COOCH_2), 161,09 (s, C-4), 146,56 (s, C-2), 146,53 (s, Ts_d), 137,76 (s, Ph_a), 135,38 (s, C-4'), 132,89 (s, Ts_a), 132,43 (d, C-6), 129,89 (d, Ts_c), 129,26 (d, Ts_b), 128,49 (d, Ph_b), 128,29 (d, Ph_d), 128,11 (d, Ph_c), 124,85

(d, C-5'), 106,84 (s, C-5), 66,79 (t, OCH₂Ph), 50,42 (t, NCH₂CO), 21,22 (q, CH₃(Tsd)); HRMS: *m/z*: 482,1120 [*M*+H]⁺; izračunato C₂₂H₁₉N₅O₆S·H⁺: 482,1134.

3.2.5. Priprava C5 supstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata uridina

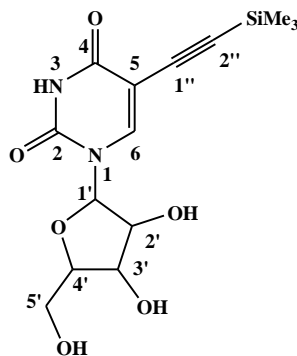


3.2.5.1. 1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-jodopirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**43**); 5-joduridin **43**.

Sinteza i potpuna karakterizacija spoja **43** opisana je u literaturi prema kojoj je pripravljen.^{277, 104}

Uridin **42** (4 g, 16,38 mmol) se suspendira u dioksanu (132 mL) te se suspenziji doda 0,5 M vodena otopina HNO₃ (82 mL, 40,95 mmol). Bistroj smjesi uz miješanje se doda I₂ (4,157 g, 16,38 mmol) te se refluksira (101 °C) 1,5 h, a potom upari gotovo do kraja. U ostatak se doda 20–30 mL CH₂Cl₂ prilikom čega dolazi do taloženja produkta. Smjesa se ponovno upari, a postupak dodatka i uparavanja CH₂Cl₂ ponovi se 3–4 puta. Nastala gotovo bijela krutina zatim se filtrira, prekrystalizira iz vrućeg etanola i ispere eterom te je tako dobiveno 5,33 g (88 %) bijelog taloga 5-joduridina **43**.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,66 (bs, 1H, NH-3), 8,47 (s, 1H, H-6), 5,72 (d, 1H, *J* = 4,7 Hz, H-1'), 5,20 (bs, 3H, OH-2'(OH-3'), OH-5', OH-3'(OH-2')), 4,03 (t, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-2'(H-3')), 3,98 (t, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-3'(H-2')), 3,84–3,88 (m, 1H, H-4'), 3,68 (dd, 1H, *J*₁ = 12,0 Hz, *J*₂ = 2,7 Hz, H-5'_a'), 3,57 (dd, 1H, *J*₁ = 12,0 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, H-5'_b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 160,43 (s, C-4), 150,33 (s, C-2), 145,10 (d, C-6), 88,28 (d, C-1'), 84,69 (d, C-4'), 73,90 (d, C-2'(C-3')), 69,35 (s, C-5), 69,23 (d, C-3'(C-2')), 60,17 (t, C-5').

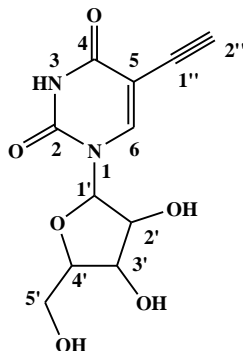


3.2.5.2. 1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-[2-(trimetilsilil)etiril]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**44**); 5-TMS-etiniluridin **44**.

U viali za mikroreaktor suspendiraju se 5-joduridin **43** (2,5 g, 6,75 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (105,3 mg, 0,15 mmol) i CuI (57,13 mg, 0,3 mmol) u DMF-u (4 mL) te se suspenziji dodaju TMSA (1,084 mL, 7,5 mmol, 98 %-tni) i *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA) (2,333 mL, 13,33 mmol, 99,5 %-tni). Reakcijska smjesa otplini se u ultrazvučnoj kupelji 2–3 min te se stavi u mikroreaktor. Reakcija traje 12 min na 100 °C, a reakcijska smjesa potom se ohladi na 55 °C i upari do suha. Zaostali crni uljasti ostatak razrijedi se metanolom te se čisti na sinter lijevku filtracijom preko kratkog sloja SiO₂ (eluens CH₂Cl₂/MeOH 6:1). Tako je uklonjen sav zaostali reducirani paladij iz reakcijske smjese, a sirovi produkt se čisti flash kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Dobiveno je 1,81 g (79 %) krutog narančastog 5-TMS-etiniluridina **44**.^{278,107}

t.t. 112–114 °C; *R*_f = 0,3 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 232 i 294 log ε/dm³mol⁻¹cm⁻¹ 3,97 i 3,99; IR (KBr) ν/cm⁻¹: 3429 (s), 3067 (m), 2961 (w), 2833 (w), 2162 (w), 1691 (s), 1618 (m), 1460 (m), 1421 (w), 1352 (w), 1279 (m), 1248 (m), 1107 (m), 1080 (m), 1055 (m), 989 (vw), 847 (s), 800 (w), 762 (m), 702 (w), 638 (w), 584 (w), 536 (w), 467 (w), 419 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,60 (bs, 1H, NH-3), 8,32 (s, 1H, H-6), 5,74 (d, 1H, *J* = 4,7 Hz, H-1'), 5,37 (bs, 1H, OH-2'(OH-3')), 5,16 (s, 1H, OH-5'), 5,03 (bs, 1H, OH-3'(OH-2')), 4,05 (t, 1H, *J* = 4,7 Hz, H-2'(H-3')), 3,98 (t, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-3'(H-2')), 3,83–3,88 (m, 1H, H-4'), 3,68 (d, 1H, *J* = 12,0 Hz, H-5_a'), 3,57 (d, 1H, *J* = 11,9 Hz, H-5_b'), 0,19 (s, 9H, 3 CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 161,29 (s, C-4), 149,57 (s, C-2), 144,76 (d, C-6), 98,27 (s, C-5), 97,81 (s, C-2''), 96,98 (s, C-1''), 88,39 (d, C-1'), 84,69 (d, C-4'), 73,75 (d, C-2'(C-3')), 69,20 (d, C-3'(C-2')), 60,16 (t, C-5'), -0,13 (q, 3 CH₃); HRMS: *m/z*: 363,0990 [*M*+Na]⁺; izračunato C₁₄H₂₀N₂O₆Si·Na⁺: 363,0983.

Derivat **44** je u narednom reakcijskom stupnju upotrijebljen kao sirovi produkt.

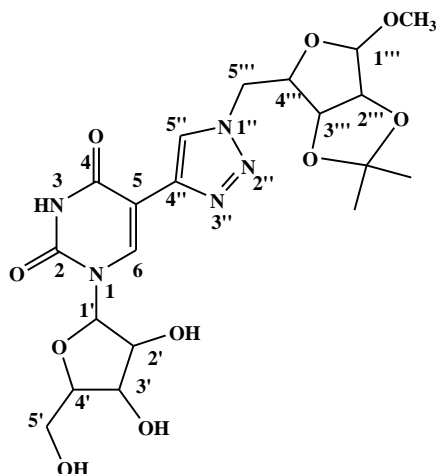


3.2.5.3. 1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-etinilpirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**45**); 5-etiniluridin **45**.

U otopinu ishodnog 5-TMS- etiniluridina **44** (1,8 g, 5,29 mmol) u THF-u (50 mL) ohlađenu na 0 °C dodana je 1 M otopina tetrabutilamonijevog fluorida (TBAF) u THF-u (6,35 mL, 6,35 mmol). Bistra narančasta otopina miješana je dalje na sobnoj temperaturi 10-ak minuta te je potom uparena do kraja pazeći pri tom da temperatura kupelji za uparavanje ne prijeđe 40 °C (spoj se raspada zagrijavanjem). Uljasti ostatak čišćen je dalje flash kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 9:1) te je tako dobiveno 1,29 g (91 %) žutog taloga 5-etiniluridina **45**.²⁷⁹

t.t. 188–190 °C; $R_f = 0,7$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 225 i 289 $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,07 i 4,13; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3394 (s), 3244 (s), 3051 (m), 2961 (w), 2930 (w), 2833 (w), 1718 (s), 1701 (s), 1697 (s), 1676 (s), 1468 (w), 1460 (w), 1437 (w), 1427 (w), 1396 (vw), 1340 (vw), 1327 (vw), 1273 (w), 1248 (w), 1194 (vw), 1121 (w), 1086 (w), 1067 (w), 1043 (w), 1034 (w), 1020 (w), 937 (vw), 916 (vw), 897 (vw), 870 (vw), 856 (vw), 843 (vw), 822 (vw), 787 (vw), 752 (vw), 727 (vw), 692 (vw), 675 (vw), 646 (vw), 581 (vw), 542 (vw), 442 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,60 (s, 1H, NH-3), 8,36 (s, 1H, H-6), 5,74 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, H-1'), 5,37 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz, OH-2'(OH-3')), 5,19 (t, 1H, $J = 4,8$ Hz, OH-5'), 5,02 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz, OH-3'(OH-2')), 4,07 (s, 1H, CH-2''), 4,05 (dd, 1H, $J_1 = 10,1$, $J_2 = 5,0$ Hz, H-2'(H-3')), 3,99 (dd, 1H, $J_1 = 10,0$, $J_2 = 5,0$ Hz, H-3'(H-2')), 3,88–3,85 (m, 1H, H-4'), 3,68 (ddd, 1H, $J_1 = 12,0$, $J_2 = 4,7$, $J_3 = 3,0$ Hz, H-5_a'), 3,58 (ddd, 1H, $J_1 = 12,0$, $J_2 = 4,6$, $J_3 = 2,8$ Hz, H-5_b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆)

δ /ppm: 161,49 (s, C-4), 149,59 (s, C-2), 144,58 (d, C-6), 97,60 (s, C-5), 88,39 (d, C-1'), 84,74 (d, C-4'), 83,47 (s, C-1''), 76,24 (s, C-2''), 73,90 (d, C-2'(C-3')), 69,30 (d, C-3'(C-2')), 60,21 (t, C-5'); HRMS: m/z : 307,0328 $[M+K]^+$; izračunato $C_{11}H_{12}N_2O_6 \cdot K^+$: 307,0327.

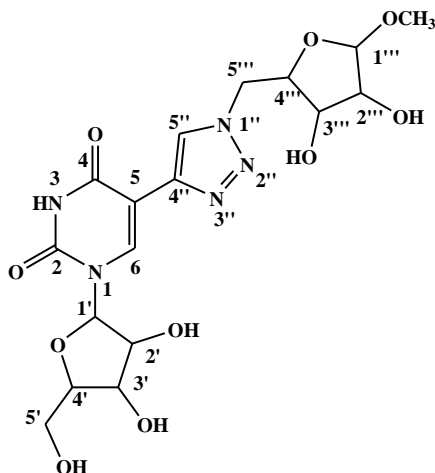


3.2.5.4. 1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-Dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-{1-[[((3*aS*,4*R*,6*R*,6*aS*)-6-metoksi-2,2-dimetil-tetrahidrofuro(3,4-d)(1,3)dioksol-4-il)metil]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**46**); 5-triazoliluridin derivat **46**.

5-Etiniluridin **45** (100 mg, 0,373 mmol), šećerni azid **24** (90 mg, 0,393 mmol), Na-askorbat (44,5 mg, 0,224 mmol, 99 %-tni) i $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (5,6 mg, 0,0224 mmol) suspendiraju se u smjesi EtOH/H₂O 1:1 (2,6 mL) u epruveti za mikrovalni reaktor. Reakcijska smjesa se podvrgava mikrovalnom zračenju pri 80 °C u trajanju od 10 min nakon čega se ohladi i upari do suha pazeći pri tom da temperatura kupelji za uparavanje ne prijeđe 40 °C. Zaostala krutina otopi se u MeOH i čisti flash kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 6:1) te je tako dobiveno 157 mg (80,13 %) poput vate bijelog taloga 5-triazoliluridin derivata **46**. Analitički uzorak dobiven je prekrizalizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 156–157 °C; $R_f = 0,3$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 232 i 294 $\log \epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 4,17 i 4,10; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3433 (m), 3229 (m), 3080 (w), 2993 (w), 2937 (w), 2839 (w), 1699 (s), 1686 (s), 1551 (w), 1468 (m), 1423 (w), 1385 (w), 1364 (w), 1275 (m), 1248 (w), 1215 (m), 1159 (w), 1109 (s), 1094 (s), 1061 (m), 1049 (m), 1028 (m), 987 (w), 960 (w), 926 (vw),

914 (vw), 864 (m), 829 (w), 806 (w), 783 (w), 763 (vw), 660 (vw), 640 (w), 586 (w), 540 (vw), 459 (vw); $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ ppm: 11,67 (s, 1H, NH-3), 8,60 (s, 1H, H-6), 8,47 (s, 1H, H-5''), 5,90 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, H-1'), 5,38 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, OH-2'(OH-3')), 5,09 (m, 2H, OH-5', OH-3'(OH-2')), 4,97 (s, 1H, H-1'''), 4,80 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, H-2'''), 4,67 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-3'''), 4,41–4,61 (m, 3H, H-4''', H-5_a''', H-5_b'''), 4,15 (dd, 1H, $J_1 = 10,9$, $J_2 = 5,5$ Hz, H-2'(H-3')), 4,01 (dd, 1H, $J_1 = 8,9$, $J_2 = 4,8$ Hz, H-3'(H-2')), 3,90 (q, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-4'), 3,52–3,70 (m, 2H, H-5_a', H-5_b'), 3,29 (s, 3H, OCH₃), 1,37 (s, 3H, CH₃), 1,25 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ ppm: 161,04 (s, C-4), 150,01 (s, C-2), nije izašao (s, C-4'''), 136,24 (d, C-6), 124,09 (d, C-5''), 111,70 (s, (CH₃)₂C), 109,11 (d, C-1'''), 105,34 (s, C-5), 87,91 (d, C-1'), 85,09 (d, C-4'), 84,66 (d, C-2'''(C-3''')), 84,41 (d, C-3'''(C-2''')), 81,17 (d, C-4'''), 73,71 (d, C-2'(C-3')), 70,18 (d, C-3'(C-2')), 61,04 (t, C-5'), 54,73 (q, OCH₃), 52,32 (t, C-5'''), 26,15 (q, CH₃), 24,62 (q, CH₃); HRMS: m/z : nije detektiran.

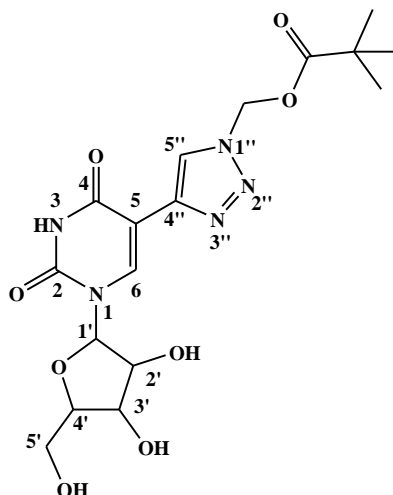


3.2.5.5. 1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-Dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-{1-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-metoksi-tetrahidrofuran-2-il]metil}-1*H*-1,2,3-triazol-4-il}pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**47**); 5-triazoliluridin derivat **47**.

5-Triazoliluridin derivat **46** (40 mg, 0,076 mmol) suspendira se u smjesi 6 M HCl/MeOH (20 $\mu\text{L}/5$ mL) te se suspenzija uz miješanje refluksira na temperaturi od 80 °C dok se potpuno ne izbistri. Po završetku reakcije (2 h) reakcijska smjesa upari se do suha pazeći pri tom da temperatura kupelji za uparavanje ne prijeđe 40 °C. Zaostala krutina čisti se preparativnom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 3:1) te je tako dobiveno 34,5 mg (99,1 %) bijelog taloga

5-triazoliluridin derivata **47**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 193–195 °C; $R_f = 0,4$ (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 232 i 294 $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,31 i 4,25; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3552 (m), 3439 (s), 3398 (s), 3175 (m), 3159 (m), 2951 (w), 2926 (w), 2835 (w), 1718 (s), 1703 (s), 1682 (s), 1555 (w), 1475 (w), 1450 (w), 1425 (vw), 1367 (vw), 1352 (vw), 1283 (w), 1254 (w), 1203 (w), 1161 (w), 1124 (m), 1111 (w), 1082 (m), 1057 (w), 1067 (w), 1032 (m), 1013 (w), 989 (w), 968 (w), 947 (w), 868 (vw), 839 (vw), 781 (w), 760 (w), 640 (w), 586 (w), 565 (w), 544 (w), 459 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,66 (s, 1H, NH-3), 8,59 (s, 1H, H-6), 8,31 (s, 1H, H-5''), 5,90 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, H-1'), 5,39 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz, OH-2'(OH-3')), 5,06–5,16 (m, 4H, OH-5', OH-3'(OH-2'), OH-2''', OH-3'''), 4,63–4,71 (m, 2H, H-1''', H-2'''), 4,43 (dd, 1H, $J_1 = 14,3$, $J_2 = 6,9$ Hz, H-3'''), 4,13 (m, 2H, (H-2')H-3', H-4'''), 4,01 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$, $J_2 = 4,3$ Hz, H-3'(H-2')), 3,83–3,94 (m, 2H, H-4', H-5_a'''), 3,71 (t, 1H, $J = 4,1$ Hz, H-5_b'''), 3,55–3,67 (m, 2H, H-5_a', H-5_b'), 3,19 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 161,07 (s, C-4), 150,02 (s, C-2), 138,50 (s, C-4''), 136,05 (d, C-6), 123,21 (d, C-5''), 108,41 (d, C-1'''), 105,43 (s, C-5), 87,88 (d, C-1'), 85,11 (d, C-4'), 80,32 (d, C-4'''), 73,98 (d, C-2'''(C-3''')), 73,66 (d, C-3'''(C-2''')), 71,66 (d, C-2'(C-3')), 70,21 (d, C-3'(C-2')), 61,08 (t, C-5'), 54,50 (q, OCH₃), 52,35 (t, C-5'''); HRMS: m/z : 458,1517 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₇H₂₃N₅O₁₀·H⁺: 458,1517.

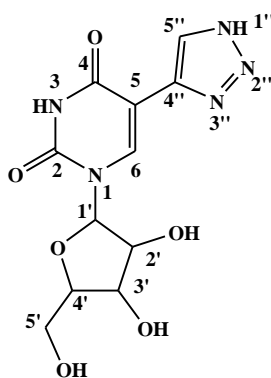


3.2.5.6. {4-[1-((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-Dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-2,4-dioksa-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il}metil pivalat (**48**); 5-triazoliluridin derivat **48**.

POM-Cl (148,6 μ L, 1 mmol, 97 %-tni) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, v/v, 2 mL) te se otopini doda NaN₃ (65 mg, 1 mmol), Na-askorbat (10 mg, 0,05 mmol, 99 %-tni), CuI (19 mg, 0,1 mmol) i DMEDA (17 μ L, 0,15 mmol, 95 %-tni). Tako pripremljena smjesa podvrgava se mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 1 h nakon čega se smjesi doda 5-etiniluridin **45** (107,3 mg, 0,4 mmol), Na-askorbat (10 mg, 0,05 mmol, 99 %-tni), CuI (19 mg, 0,1 mmol) i DMEDA (17 μ L, 0,15 mmol, 95 %-tni). Smjesa se ponovno podvrgava mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 30 min nakon čega se ohladi i upari do suha. Zaostala krutina otopi se u MeOH i čisti flash kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 6:1) te je tako dobiveno 142 mg (83,45 %) bijelog taloga 5-triazoliluridin derivata **48**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 197–200 °C; $R_f = 0,3$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 231 i 292 $\log \epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 4,39 i 4,32; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3456 (s), 3286 (m), 3171 (m), 3067 (w), 2974 (w), 2880 (w), 1709 (s), 1697 (s), 1680 (s), 1545 (w), 1475 (w), 1452 (w), 1437 (w), 1394 (w), 1352 (w), 1275 (m), 1246 (w), 1219 (w), 1157 (m), 1130 (m), 1067 (w), 1041 (w), 1007 (w), 995 (w), 916 (vw), 878 (vw), 847 (vw), 827 (vw), 793 (w), 770 (vw), 712 (vw), 640 (vw), 571 (vw), 536 (vw), 455 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,74 (s, 1H, NH-3), 8,67 (s, 1H, H-6), 8,49 (s, 1H, H-5''), 6,36 (s, 2H, CH₂), 5,89 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz, H-1'), 5,41 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, OH-2'(OH-3')), 5,11–

5,14 (m, 2H, OH-5', OH-3'(OH-2')), 4,15 (dd, 1H, $J_1 = 10,8$, $J_2 = 5,4$ Hz, H-2'(H-3')), 4,01 (dd, 1H, $J_1 = 9,0$, $J_2 = 4,8$ Hz, H-3'(H-2')), 3,90 (dd, 1H, $J_1 = 6,1$, $J_2 = 2,7$ Hz, H-4'), 3,53–3,70 (m, 2H, H-5_a', H-5_b'), 1,12 (s, 9H, 3 CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 176,50 (s, COOCH₂), 161,09 (s, C-4), 149,98 (s, C-2), 139,10 (s, C-4''), 136,72 (d, C-6), 123,41 (d, C-5''), 104,82 (s, C-5), 88,00 (d, C-1'), 85,10 (d, C-4'), 73,82 (d, C-2'(C-3')), 70,15 (d, C-3'(C-2')), 70,03 (t, NCH₂O), 60,98 (t, C-5'), 38,21 (s, (CH₃)₃CCO), 26,48 (q, (CH₃)₃C); HRMS: *m/z*: 426,1609 [*M*+H]⁺; izračunato C₁₇H₂₃N₅O₈·H⁺: 426,1619.

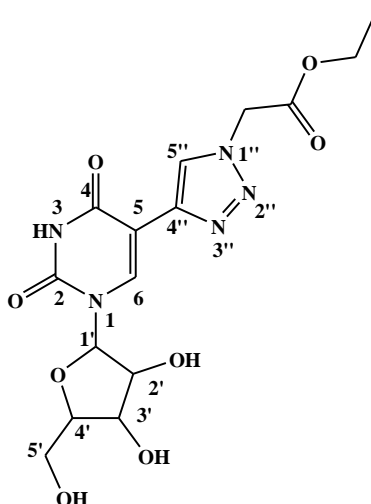


3.2.5.7. 1-((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-5-(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**49**); 5-triazoliluridin derivat **49**.

5-Triazoliluracil derivat **48** (60 mg, 0,141 mmol) otopi se u smjesi dioksan/NH₄OH (aq) 1:3 *v/v* (30 mL) te se otopina miješa na sobnoj temperaturi 1,5 h. Bistra bezbojna otopina potom se upari do suha, a zaostali bijeli talog osuši na vakuum pumpi. Tako je dobiveno 39 mg (89 %) bijelog taloga 5-triazoliluracil derivata **49**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz vode.

t.t. 207–209 °C; *R*_f = 0,5 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm 231 i 293 log ε/dm³mol⁻¹cm⁻¹ 4,14 i 4,11; IR (KBr) ν/cm⁻¹: 3416 (m), 3205 (m), 3059 (m), 2957 (w), 2926 (w), 2835 (w), 1707 (s), 1695 (s), 1545 (w), 1474 (w), 1468 (w), 1439 (w), 1313 (w), 1279 (w), 1163 (vw), 1117 (w), 1057 (w), 991 (vw), 912 (vw), 864 (vw), 795 (w), 752 (w), 654 (w), 627 (vw), 588 (vw), 538 (vw), 459 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 15,06 (bs, 1H, NH-1''), 11,65 (s, 1H,

NH-3), 8,52 (s, 1H, H-6), 8,12 (s, 1H, H-5''), 5,88 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, H-1'), 5,38 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, OH-2'(OH-3')), 5,07 (s, 1H, OH-5'), 5,06 (s, 1H, OH-3'(OH-2')), 4,14 (dd, $J_1 = 10,3$, $J_2 = 5,1$ Hz, 1H, H-2'(H-3')), 4,01 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H, H-3'(H-2')), 3,90 (dd, $J_1 = 6,8$, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H, H-4'), 3,65 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H, H-5_a'), 3,59 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H, H-5_b'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 161,14 (s, C-4), 149,97 (s, C-2), 137,15 (s, C-4''), 132,12 (d, C-6), 120,49 (d, C-5''), 105,24 (s, C-5), 88,00 (d, C-1'), 85,00 (d, C-4'), 73,69 (d, C-2'(C-3')), 70,03 (d, C-3'(C-2')), 60,89 (t, C-5'); HRMS: m/z : 312,0940 [$M+H$] $^+$; izračunato $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6 \cdot \text{H}^+$: 312,0938.

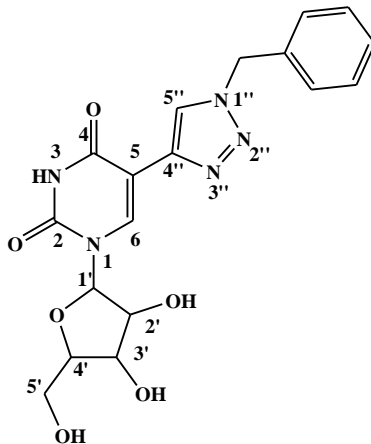


3.2.5.8. Etil 2-{4-[1-((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofurano-2-il)-2,4-dioksa-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il}acetat (**50**); 5-triazoliluridin derivat **50**.

Etil bromacetat (55,7 μL , 0,5 mmol) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, v/v , 1 mL) te se otopini doda NaN₃ (32,5 mg, 0,5 mmol), Na-askorbat (5 mg, 0,025 mmol, 99 %-tni), CuI (9,5 mg, 0,05 mmol) i DMEDA (8,5 μL , 0,075 mmol, 95 %-tni). Tako pripremljena smjesa podvrgava se mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 1 h nakon čega se smjesi doda 5-etiniluridin **45** (53,6 mg, 0,2 mmol), Na-askorbat (5 mg, 0,025 mmol, 99 %-tni), CuI (9,5 mg, 0,05 mmol) i DMEDA (8,5 μL , 0,075 mmol, 95 %-tni). Smjesa se ponovno podvrgava mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 30 min nakon čega se ohladi i upari do suha. Zaostala krutina otopi se u MeOH i čisti flash kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 6:1)

te je tako dobiveno 70 mg (88,1 %) bijelog taloga 5-triazoliluridin derivata **50**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 209–211 °C; $R_f = 0,3$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 231 i 295 $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,18 i 4,12; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3483 (m), 3354 (w), 3252 (w), 3180 (m), 3119 (w), 3059 (w), 2961 (w), 2826 (w), 1747 (m), 1718 (s), 1678 (s), 1541 (w), 1481 (w), 1450 (w), 1416 (w), 1410 (w), 1394 (vw), 1371 (w), 1356 (w), 1346 (w), 1296 (m), 1263 (m), 1229 (m), 1144 (w), 1126 (w), 1105 (w), 1082 (w), 1057 (w), 1028 (w), 986 (w), 937 (vw), 920 (vw), 866 (w), 814 (vw), 785 (w), 756 (vw), 721 (vw), 708 (vw), 700 (vw), 638 (w), 613 (vw), 577 (w), 542 (vw), 461 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,67 (s, 1H, NH-3), 8,61 (s, 1H, H-6), 8,42 (s, 1H, H-5''), 5,90 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, H-1'), 5,42 (s, 2H, CH₂), 5,37 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, OH-2'(OH-3')), 5,05–5,10 (m, 2H, OH-5', OH-3'(OH-2')), 4,15–4,20 (m, 3H, H-2'(H-3'), OCH₂), 4,02 (dd, 1H, $J_1 = 8,9$, $J_2 = 4,9$ Hz, H-3'(H-2')), 3,91 (dd, 1H, $J_1 = 6,7$, $J_2 = 3,3$ Hz, H-4'), 3,63–3,67 (m, 1H, H-5_a'), 3,57–3,61 (m, 1H, H-5_b'), 1,23 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 167,17 (s, COOCH₂), 161,05 (s, C-4), 149,96 (s, C-2), 138,62 (s, C-4''), 136,24 (d, C-6), 123,90 (d, C-5''), 105,24 (s, C-5), 87,94 (d, C-1'), 85,08 (d, C-4'), 73,65 (d, C-2'(C-3')), 70,15 (d, C-3'(C-2')), 61,37 (t, C-5'), 61,03 (t, OCH₂CH₃), 50,26 (t, NCH₂CO), 13,91 (q, OCH₂CH₃); HRMS: m/z : 398,1301 $[M+H]^+$; izračunato C₁₅H₁₉N₅O₈·H⁺: 398,1306.

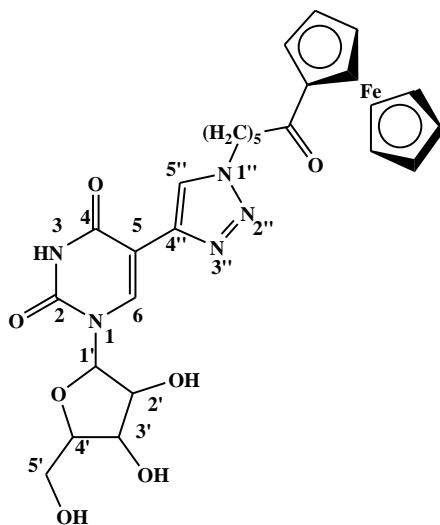


3.2.5.9. 5-(1-Benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**51**); 5-triazoliluridin derivat **51**.

Benzil bromid (59,5 μL , 0,5 mmol) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, v/v, 1 mL) te se otopini doda NaN₃ (32,5 mg, 0,5 mmol), Na-askorbat (5 mg, 0,025 mmol, 99 %-tni), CuI (9,5 mg, 0,05 mmol) i DMEDA (8,5 μL , 0,075 mmol, 95 %-tni). Tako pripremljena smjesa podvrgava se mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 1 h nakon čega se smjesi doda 5-etiniluridin **45** (53,6 mg, 0,2 mmol), Na-askorbat (5 mg, 0,025 mmol, 99 %-tni), CuI (9,5 mg, 0,05 mmol) i DMEDA (8,5 μL , 0,075 mmol, 95 %-tni). Smjesa se ponovno podvrgava mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 30 min nakon čega se ohladi i upari do suha. Zaostala krutina otopi se u MeOH i čisti flash kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 6:1) te je tako dobiveno 75 mg (93,43 %) bijelog taloga 5-triazoliluridin derivata **51**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 233–235 °C; $R_f = 0,3$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 230 i 294 $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,32 i 4,24; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3377 (m), 3209 (m), 3084 (w), 2928 (w), 2826 (vw), 1709 (s), 1691 (s), 1543 (w), 1475 (w), 1448 (w), 1433 (vw), 1420 (vw), 1389 (vw), 1350 (vw), 1265 (w), 1256 (w), 1209 (vw), 1165 (vw), 1132 (vw), 1095 (w), 1047 (w), 1032 (w), 987 (vw), 968 (vw), 901 (vw), 893 (vw), 843 (vw), 808 (vw), 758 (vw), 718 (w), 694 (vw), 669 (vw), 636 (vw), 590 (vw), 573 (vw), 538 (vw), 467 (vw), 453 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,69 (s, 1H, NH-3), 8,60 (s, 1H, H-6), 8,41 (s, 1H, H-5''), 7,29–7,41 (m, 5H, Ph), 5,89 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, H-1'), 5,64 (s, 2H, CH₂), 5,40 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, OH-2'(OH-3')), 5,06–5,14 (m, 2H, OH-5', OH-

3'(OH-2')), 4,14 (dd, 1H, $J_1 = 10,9$, $J_2 = 5,6$ Hz, H-2'(H-3')), 3,99 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$, $J_2 = 4,8$ Hz, H-3'(H-2')), 3,89 (dd, 1H, $J_1 = 6,2$, $J_2 = 2,8$ Hz, H-4'), 3,52–3,68 (m, 2H, H-5_a', H-5_b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 161,13 (s, C-4), 150,02 (s, C-2), 138,94 (s, C-4''), 136,29 (d, C-6), 136,17 (s, Ph_a), 128,74 (d, Ph_b), 128,10 (d, Ph_d), 127,91 (d, Ph_c), 122,59 (d, C-5''), 105,35 (s, C-5), 87,88 (d, C-1'), 85,12 (d, C-4'), 73,73 (d, C-2'(C-3')), 70,21 (d, C-3'(C-2')), 61,06 (t, C-5'), 52,70 (t, NCH₂Ph); HRMS: m/z : 402,1401 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₈H₁₉N₅O₆·H⁺: 402,1408.

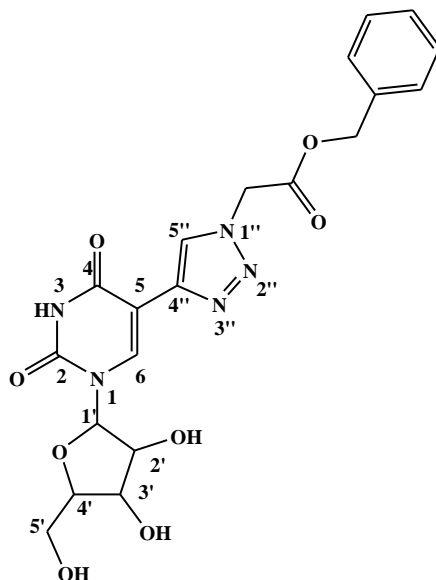


3.2.5.10. 5-[1-(6-Ferocenil-6-oksoheksil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**52**); 5-triazoliluridin derivat **52**.

6-Brom-1-oksoheksilferocen (181,55 mg, 0,5 mmol) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, *v/v*, 1 mL) te se otopini doda NaN₃ (32,5 mg, 0,5 mmol), Na-askorbat (5 mg, 0,025 mmol, 99 %-tni), CuI (9,5 mg, 0,05 mmol) i DMEDA (8,5 μ L, 0,075 mmol, 95 %-tni). Tako pripremljena smjesa podvrgava se mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 1 h nakon čega se smjesi doda 5-etiniluridin **45** (53,6 mg, 0,2 mmol), Na-askorbat (5 mg, 0,025 mmol, 99 %-tni), CuI (9,5 mg, 0,05 mmol) i DMEDA (8,5 μ L, 0,075 mmol, 95 %-tni). Smjesa se ponovno podvrgava mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 30 min nakon čega se ohladi i upari do suha. Zaostala krutina otopi se u MeOH i čisti flash kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 6:1)

te je tako dobiveno 90 mg (75,83 %) jarko crvenog taloga 5-triazoliluridin derivata **52**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 108–110 °C; $R_f = 0,3$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 227 i 286 $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,61 i 4,30; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3416 (m), 3080 (w), 2928 (m), 2858 (w), 1690 (s), 1545 (w), 1458 (m), 1412 (w), 1379 (w), 1354 (w), 1267 (w), 1159 (vw), 1105 (m), 1053 (m), 1001 (w), 987 (vw), 824 (w), 783 (vw), 758 (vw), 663 (vw), 638 (vw), 584 (vw), 536 (w), 484 (w), 461 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,60 (s, 1H, NH-3), 8,55 (s, 1H, H-6), 8,35 (s, 1H, H-5"), 5,90 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, H-1'), 5,33 (bs, 1H, OH-2'(OH-3')), 5,02 (bs, 2H, OH-5', OH-3'(OH-2')), [4,75–4,79 (m, 2H), 4,52–4,56 (m, 2H), 4,21 (s, 5H), ferocenski protoni], 4,15 (t, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-2'(H-3')), 3,99–4,04 (m, 1H, H-3'(H-2')), 3,91 (dd, 1H, $J_1 = 6,2$, $J_2 = 2,8$ Hz, H-4'), 3,54–3,71 (m, 2H, H-5_a', H-5_b'), [4,41 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 2,71 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz), 1,79–1,95 (m, 2H), 1,55–1,70 (m, 2H), 1,23–1,40 (m, 2H), 5 CH₂]; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 203,05 (s, (CH₂)₅CO), 160,99 (s, C-4), 149,91 (s, C-2), 138,48 (s, C-4"), 136,00 (d, C-6), 122,30 (d, C-5"), 105,48 (s, C-5), 87,92 (d, C-1'), 85,02 (d, C-4'), 78,98 (s, ferocenski signal), 73,57 (d, C-2'(C-3')), 71,78 (d, ferocenski signal), 70,10 (d, C-3'(C-2')), 69,35 (d, ferocenski signal), 68,90 (d, ferocenski signal), 61,04 (t, C-5'), [49,16 (t), 38,44 (t), 29,57 (t), 25,59 (t), 23,21 (t), 5 CH₂]; HRMS: m/z : 594,1631 [$M+H$]⁺; izračunato C₂₇H₃₁FeN₅O₇·H⁺: 594,1647.

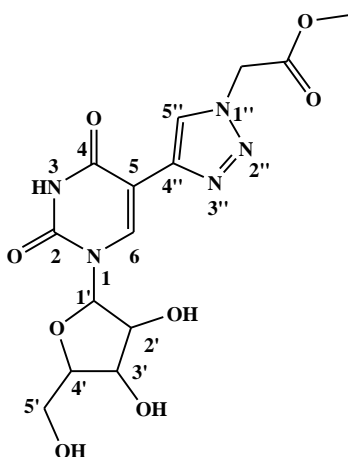


3.2.5.11. Benzil 2-{4-[1-((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il}acetat (**53**); 5-triazoliluridin derivat **53**.

Benzil 2-bromacetat (82,5 μL , 0,5 mmol, 96 %-tni) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, v/v , 1 mL) te se otopini doda NaN₃ (32,5 mg, 0,5 mmol), Na-askorbat (5 mg, 0,025 mmol, 99 %-tni), CuI (9,5 mg, 0,05 mmol) i DMEDA (8,5 μL , 0,075 mmol, 95 %-tni). Tako pripremljena smjesa podvrgava se mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 1 h nakon čega se smjesi doda 5-etiniluridin **45** (53,6 mg, 0,2 mmol), Na-askorbat (5 mg, 0,025 mmol, 99 %-tni), CuI (9,5 mg, 0,05 mmol) i DMEDA (8,5 μL , 0,075 mmol, 95 %-tni). Smjesa se ponovno podvrgava mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 30 min nakon čega se ohladi i upari do suha. Zaostala krutina otopi se u MeOH i čisti preparativnom kromatografijom (CH₂Cl₂/MeOH 6:1) te je tako dobiveno 75 mg (81,63 %) bijelog taloga 5-triazoliluridin derivata **53**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 110–112 °C; $R_f = 0,3$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 232 i 294 $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 4,29 i 4,22; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3433 (s), 3078 (w), 2924 (w), 1751 (w), 1707 (s), 1686 (s), 1656 (w), 1649 (w), 1560 (vw), 1545 (vw), 1474 (w), 1468 (w), 1458 (w), 1450 (w), 1389 (w), 1358 (w), 1290 (w), 1265 (w), 1248 (w), 1219 (w), 1202 (w), 1161 (vw), 1124 (w), 1055 (w), 984 (vw), 955 (vw), 916 (vw), 783 (vw), 756 (w), 700 (vw), 640 (vw), 615 (vw), 588 (vw), 573 (vw), 459 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 11,69 (s, 1H, NH-3), 8,62 (s, 1H, H-6), 8,45 (s, 1H,

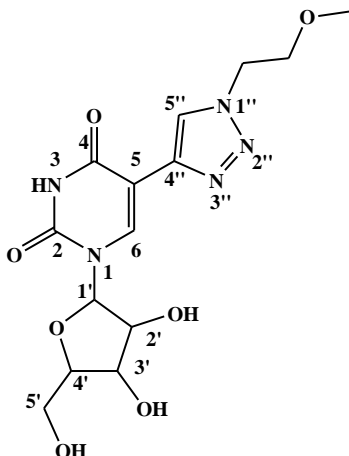
H-5''), 7,31–7,43 (m, 5H, Ph), 5,90 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, H-1'), 5,51 (s, 2H, OCH₂Ph), 5,38 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, OH-2'(OH-3')), 5,22 (s, 2H, CH₂), 5,05–5,12 (m, 2H, OH-5', OH-3'(OH-2')), 4,16 (dd, 1H, $J_1 = 10,9$, $J_2 = 5,5$ Hz, H-2'(H-3')), 4,01 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$, $J_2 = 4,9$ Hz, H-3'(H-2')), 3,91 (q, 1H, $J = 3,2$ Hz, H-4'), 3,54–3,70 (m, 2H, H-5_a', H-5_b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 167,17 (s, COOCH₂), 161,06 (s, C-4), 149,97 (s, C-2), 138,66 (s, C-4''), 136,27 (d, C-6), 135,35 (s, Ph_a), 128,41 (d, Ph_b), 128,21 (d, Ph_d), 128,01 (d, Ph_c), 123,97 (d, C-5''), 105,23 (s, C-5), 87,94 (d, C-1'), 85,09 (d, C-4'), 73,67 (d, C-2'(C-3')), 70,16 (d, C-3'(C-2')), 66,67 (t, OCH₂Ph), 61,03 (t, C-5'), 50,27 (t, NCH₂CO); HRMS: m/z : 460,1480 [$M+H$]⁺; izračunato C₂₀H₂₁N₅O₈·H⁺: 460,1462.



3.2.5.12. Metil 2-{4-[1-((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il}acetat (**54**); 5-triazoliluridin derivat **54**.

t.t. 135–137 °C; $R_f = 0,2$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); UV (MeOH): λ_{\max} /nm 231 i 292 log ϵ /dm³mol⁻¹cm⁻¹ 4,07 i 4,00; IR (KBr) ν /cm⁻¹: 3487 (m), 3423 (m), 3159 (m), 3049 (w), 2959 (w), 2843 (w), 1732 (s), 1715 (s), 1682 (s), 1541 (w), 1481 (w), 1452 (w), 1433 (w), 1367 (w), 1296 (w), 1265 (w), 1258 (w), 1227 (w), 1165 (vw), 1146 (vw), 1124 (w), 1107 (w), 1082 (w), 1057 (vw), 1028 (w), 991 (vw), 920 (vw), 872 (vw), 789 (vw), 758 (vw), 702 (vw), 642 (w), 613 (vw), 577 (w), 544 (vw), 465 (vw); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 11,71 (s, 1H, NH-3), 8,63 (s, 1H, H-6), 8,43 (s, 1H, H-5''), 5,90 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, H-1'), 5,39–5,49 (m, 3H, CH₂, OH-2'(OH-3')), 5,09–5,16 (m, 2H, OH-5', OH-3'(OH-2')), 4,16 (dd, 1H, $J_1 = 10,9$, $J_2 = 5,5$ Hz, H-2'(H-3')), 4,01 (dd, 1H, J_1

= 8,8, $J_2 = 4,7$ Hz, H-3'(H-2')), 3,90 (dd, 1H, $J_1 = 6,4$, $J_2 = 3,0$ Hz, H-4'), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,53–3,69 (m, 2H, H-5_a', H-5_b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 167,78 (s, COOCH₂), 161,13 (s, C-4), 150,04 (s, C-2), 138,71 (s, C-4''), 136,33 (d, C-6), 123,98 (d, C-5''), 105,27 (s, C-5), 87,92 (d, C-1'), 85,13 (d, C-4'), 73,73 (d, C-2'(C-3')), 70,21 (d, C-3'(C-2')), 61,05 (t, C-5'), 52,51 (q, CH₃), 50,22 (t, NCH₂CO); HRMS: *m/z*: 384,1146 [*M*+H]⁺; izračunato C₁₄H₁₇N₅O₈·H⁺: 384,1150.



3.2.5.13. 1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-Dihidroksi-5-(hidroksimetil)-tetrahidrofuran-2-il]-5-[1-(2-metoksietil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**55**); 5-triazoliluridin derivat **55**.

2-Brometil-metil-eter (95,2 μ L, 1 mmol) otopi se u smjesi EtOH:H₂O (7:3, *v/v*, 2 mL) te se otopini doda NaN₃ (65 mg, 1 mmol), Na-askorbat (10 mg, 0,05 mmol, 99 %-tni), CuI (19 mg, 0,1 mmol) i DMEDA (17 μ L, 0,15 mmol, 95 %-tni). Tako pripremljena smjesa podvrgava se mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 1 h nakon čega se smjesi doda 5-etiniluridin **45** (107,3 mg, 0,4 mmol), Na-askorbat (10 mg, 0,05 mmol, 99 %-tni), CuI (19 mg, 0,1 mmol) i DMEDA (17 μ L, 0,15 mmol, 95 %-tni). Smjesa se ponovno podvrgava mikrovalnom zračenju na temperaturi od 100 °C kroz 30 min nakon čega se ohladi i upari do suha. Zaostala krutina otopi se u MeOH i čisti flash kromatografijom (eluens CH₂Cl₂/MeOH 6:1) te je tako dobiveno 139 mg (94 %) bijelog taloga 5-triazoliluridin derivata **55**. Analitički uzorak dobiven je prekrizacijom sirovog produkta iz MeOH.

t.t. 213–215 °C; $R_f = 0,2$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 232 i 293 $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4,26 i 4,21; IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3451 (s), 3188 (m), 3159 (m), 3090 (m), 2951 (m), 2845 (w), 1713 (s), 1699 (s), 1690 (s), 1645 (m), 1535 (m), 1481 (w), 1470 (m), 1447 (m), 1429 (m), 1402 (w), 1356 (m), 1292 (m), 1261 (m), 1227 (m), 1205 (m), 1159 (w), 1146 (w), 1124 (m), 1101 (s), 1086 (m), 1068 (m), 1057 (m), 1024 (m), 1011 (m), 987 (m), 926 (m), 914 (w), 879 (w), 868 (w), 820 (m), 773 (w), 754 (w), 723 (w), 681 (m), 662 (m), 631 (w), 613 (w), 575 (m), 540 (w), 463 (w), 407 w); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 11,69 (s, 1H, NH-3), 8,58 (s, 1H, H-6), 8,32 (s, 1H, H-5''), 5,90 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, H-1'), 5,41 (d, 1H, $J = 5,7$ Hz, OH-2'(OH-3')), 5,07–5,15 (m, 2H, OH-5', OH-3'(OH-2')), 4,57 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4,15 (dd, 1H, $J_1 = 10,9$, $J_2 = 5,6$ Hz, H-2'(H-3')), 4,00 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$, $J_2 = 4,8$ Hz, H-3'(H-2')), 3,90 (q, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-4'), 3,73 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,52–3,68 (m, 2H, H-5_a', H-5_b'), 3,24 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 161,15 (s, C-4), 150,06 (s, C-2), 138,58 (s, C-4''), 136,19 (d, C-6), 122,89 (d, C-5''), 105,49 (s, C-5), 87,88 (d, C-1'), 85,13 (d, C-4'), 73,72 (d, C-2'(C-3')), 70,27 (t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70,24 (d, C-3'(C-2')), 61,09 (t, C-5'), 57,94 (q, OCH_3), 49,17 (s, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); HRMS: m/z : 370,1339 $[\text{M}+\text{H}]^+$; izračunato $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}^+$: 370,1357.

3.3. Određivanje protutumorske aktivnosti 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata purinske i pirimidinske serije

Utjecaj pripremljenih 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata na stanične linije solidnih tumora, leukemija, limfoma kao i na staničnu liniju normalnih stanica ispitan je MTT metodom²⁸⁰ za kvantitativno određivanje stanične proliferacije tj. za kvantifikaciju citotoksičnog djelovanja na stanice. Metoda se bazira na cijepanju veze tetrazolijeve soli (MTT-a) staničnim dehidrogenazama pri čemu iz žutog MTT-a nastaju ljubičasti kristali formazana. Redukcija tetrazolijeve soli ovisna je o NAD(P)H [nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)] ovisnim staničnim oksidoreduktazama koje su prisutne u staničnom citosolu.

U samom postupku stanice su nasadene na mikrotitarske ploče za uzgoj stanica u suspenziji u koncentraciji od $1 \cdot 10^5$ stanica/mL u ukupnom volumenu od 100 μ L (90 μ L suspenzije + 10 μ L odgovarajuće koncentracije ispitivanog derivata). Stanice su izložene djelovanju sintetiziranih 1,2,3-triazolnih derivata u rasponu koncentracija od $1 \cdot 10^{-4}$ do $1 \cdot 10^{-7}$ M. Kontrolne stanice rasle su u istim uvjetima, ali bez prisutnosti ispitivanog spoja. Nakon inkubacije od 72 h u svaku jažicu na ploči dodano je 10 μ L 10·MTT nakon čega je uslijedila inkubacija od 4 sata. Nastali kristali formazana otopljeni su dodatkom 100 μ L smjese 10 % natrijevog dodecil-sulfata (SDS) u HCl-u (0,01 M) nakon koje je provedena daljnja inkubacija preko noći. Optička gustoća očitana je na čitaču mikrotitarskih ploča (ELISA Stat Fax 2100, Pharmacia Biotech, Švedska) pri valnoj duljini od 540 nm. Svi pokusi provedeni su u triplicatu i ponovljeni su tri puta. Postotak stanične proliferacije nakon izlaganja 1,2,3-triazolnim derivatima u odnosu na kontrolne stanice izračunat je prema izrazu:

$$\text{Postotak rasta} = (A - \text{Blank}) \cdot 100 \% / (B - \text{Blank})$$

gdje je:

A, apsorbancija stanica nakon inkubacije s ispitivanim spojevima

B, apsorbancija stanica bez stimulacije, a

Blank je apsorbancija MTT-a s 10 % SDS-a u HCl-u (0,01 M) + medij.

Dobiveni rezultati istraživanja statistički su analizirani Kruskal-Wallis ANOVA testom primjenom STATISTICATM (verzija 7.0) računalnog programa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

U literaturnom pregledu dan je iscrpan pregled sintetskih pristupa modifikacijama nukleobaza i nukleozida. Na početku je prikazana primjena poznatih i široko primjenjivih metoda generiranja nove veze ugljik-ugljik u sintezi biološki aktivnih nukleobaznih odnosno nukleozidnih derivata, a potom su u nastavku detaljno obrađeni primjeri klik kemije kao novog sintetskog pristupa organske sinteze inspiriranog prirodnim procesima nastanka heteroatomskih veza kod biomolekula. Poseban naglasak u pregledu dosadašnjih primjera modifikacija nukleobaza/nukleozida dan je na novim biološki aktivnim molekulama te je time istaknuta potreba i važnost istraživanja protutumorskih spojeva i pronalaska novih skupina „malih molekula“ koje bi imale bolje biološke učinke u tretiranju tumorskih stanica. Također je naglašeno da modificirani nukleozidi, nukleobaze, sulfoniluree i spojevi s triazolnim strukturnim motivom kao dodatnim heteroaromatskim prstenom unutar molekule predstavljaju velike grupe biološki aktivnih spojeva i da su brojni predstavnici tih spojeva i danas u terapijskoj primjeni.

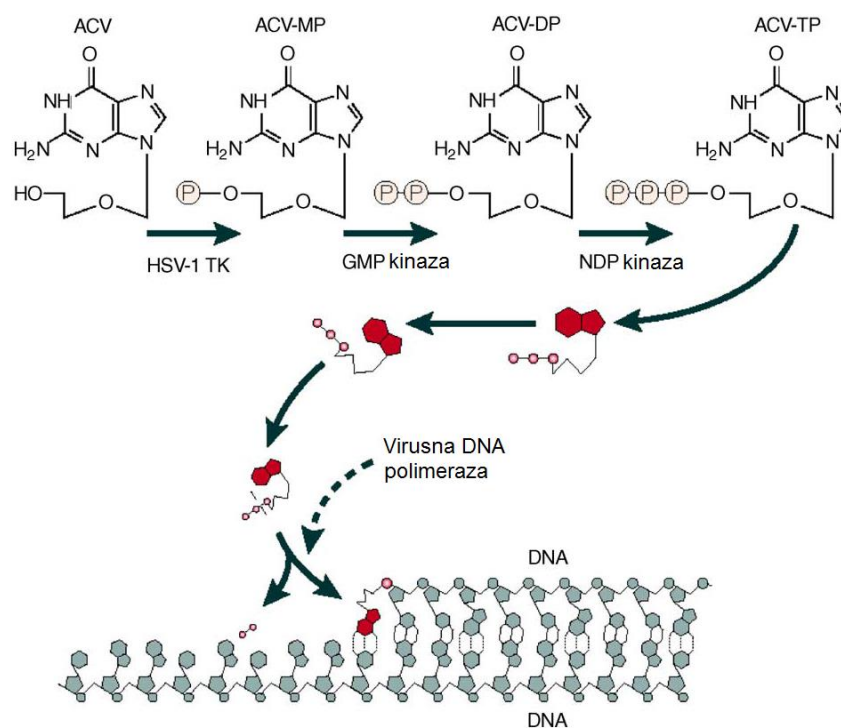
Slijedom navedenog, a kao nastavak istraživanja i razvoja novih biološki aktivnih nukleobaznih/nukleozidnih derivata u okviru ove doktorske disertacije sintetizirane su četiri serije spojeva;

- a) 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati purinskog nukleozida gvanozina i njegovog strukturnog analoga aciklovira,
- b) 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati nukleobaze uracila,
- c) *N*-1-sulfoniluracilni 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati i
- d) 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati nukleozida uridina.

U nastavku će biti detaljno opisane sinteze navedenih serija spojeva i prikazat će se rezultati bioloških utjecaja novih derivata na rast normalnih i tumorskih stanica u *in vitro* uvjetima. Na temelju tih rezultata komentirat će se povezanost između strukture, koncentracije novih spojeva i inhibicije rasta, te definirati spoj koji ima najveću učinkovitost i utjecaj na rast tumorskih stanica.

4.2. C8 supstituirani 1,2,3-triazolni derivati gvanozina i aciklovira

Obzirom na dobro poznatu biološku aktivnost aciklovira^{19,20} kao iznimno učinkovitog antivirusnog agensa u liječenju humanog herpes virusa (HHV1 i HHV2) poznatijeg kao HSV tipa I i II te HHV3 poznatijeg kao VZV i na činjenicu o sve izraženijoj pojavi rezistencije uzročnikâ oboljenjâ na primijenjenu antivirusnu terapiju odlučili smo provesti modifikacije aciklovira u svrhu pripreme derivata s poboljšanim svojstvima. Modifikaciju smo odlučili provesti u položaju C8 imidazolnog prstena purina, a taj položaj odabrali smo imajući na umu mehanizam djelovanja²⁰ aciklovira (*Slika 1*) te potrebu da tzv. Watson-Crickova regija ostane očuvana za ostvarivanje vodikovih veza kao nezaobilaznih interakcija kod sinteze DNA.^{237,281} Svrha rada bila je pripremiti strukturne derivate učinkovitog terapeutika s naglaskom na utvrđivanju povezanosti modificiranih struktura s biološkom aktivnošću.



Slika 1. Mehanizam antivirusne aktivnosti aciklovira (ACV).²⁰

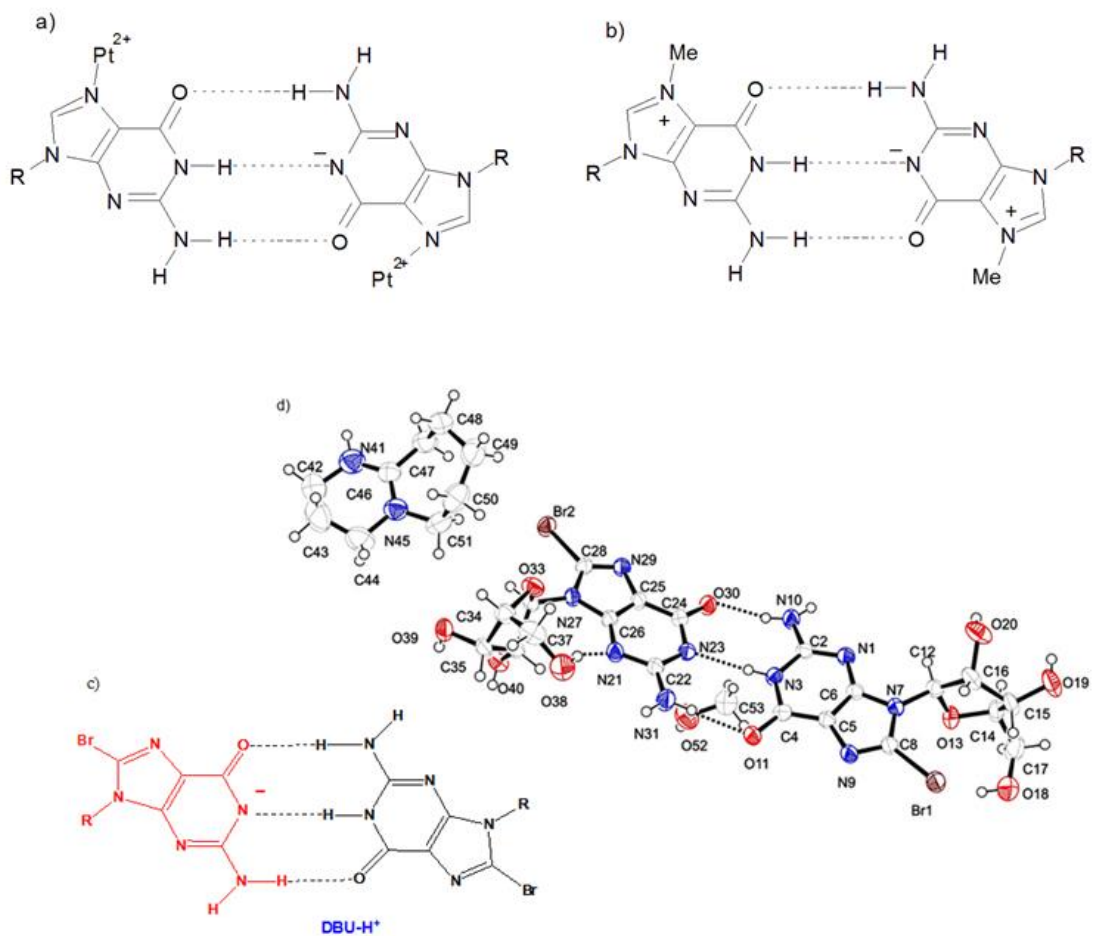
Ciljani enzim ACV-a je virusna DNA polimeraza. Prije no što se ostvari interakcija ACV-a s virusnom DNA polimerazom, on se mora fosforilirati unutar stanice u tri stupnja. Fosforilaciju

katalizira virusom kodirana (npr. HSV-1 kodirana) timidin kinaza, potom GMP kinaza i na kraju NDP kinaza (*Slika 1*).

Kako bismo ostvarili željeni cilj odlučili smo kao modelni spoj uzeti nukleozid gvanozin **1** te na njemu ispitati uvjete modifikacija C8 položaja, a potom analognim reakcijama pripremiti željene C8 supstituirane 1,2,3-triazolne derivate aciklovira. Uvođenjem dodatnog heterocikličkog prstena u strukturu željeli smo utvrditi antivirusnu aktivnost pripremljenih novih strukturnih derivata aciklovira kao i njihov biološki odgovor na rast normalnih odnosno tumorskih stanica u *in vitro* uvjetima u usporedbi sa samim aciklovirom kao standardom.

Prilikom ispitivanja uvjeta reakcija modifikacije C8 položaja gvanozina **1** primjetili smo da pod djelovanjem baze 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en (DBU) 8-bromgvanozin **2** može biti transformiran u dimer s tri vodikove veze između GG⁻ parova baza.⁶⁴ Poznato je da se gvaninske baze povezuju na različite načine uz pomoć dvije vodikove veze i postoje samo dva primjera GG⁻ parova s tri vodikove veze, stvorene od strane 7-platiniranih i 7-metiliranih gvaninskih derivata (*Slika 2. a* i *b*)).

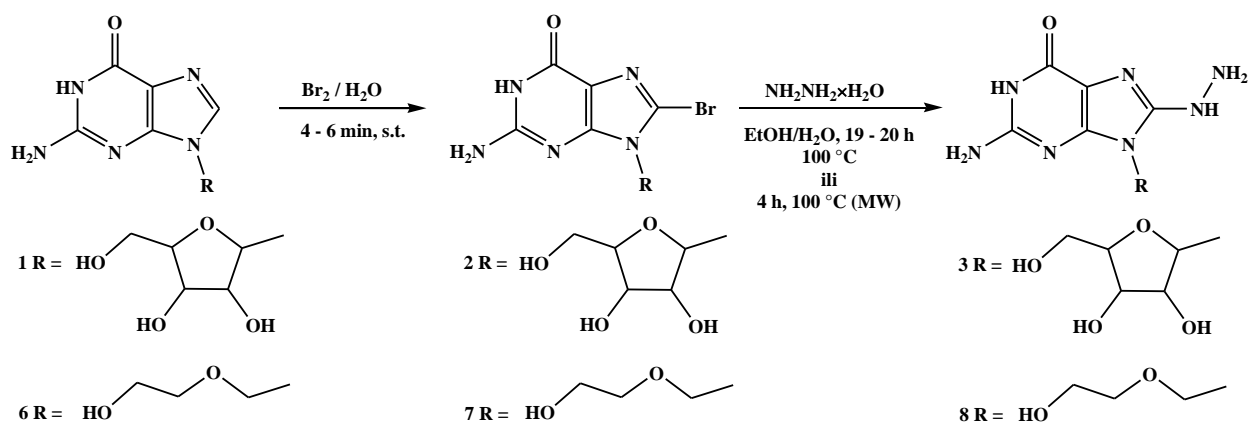
Dokazali smo da prilikom deprotoniranja 8-bromgvanozina **2** na N1 položaju purina, izazvanog s DBU, nastaje adukt [8-BrG][8-BrG]⁻[DBU-H]⁺ (*Slika 2. c*) koji sadrži tri vodikove veze u krutom stanju (rendgenska kristalografska analiza, *Slika 2. d*) i u otopini DMSO-a (NMR studij), što može biti od značajnog interesa za primjenu i proučavanje samoorganizirajućih bioloških sustava kako u čvrstom stanju tako i u otopini.⁶⁴



Slika 2. Primjeri GG⁻ parova s tri vodikove veze: a) C7-platinirani gvaninski derivat, b) 7-metil gvaninskih derivat, c) reverzni Watson Crick adukt [8-BrG][8-BrG⁻][DBU-H⁺], d) ORTEP-kristalna struktura adukta [8-BrG][8-BrG⁻][DBU-H⁺][MeOH].

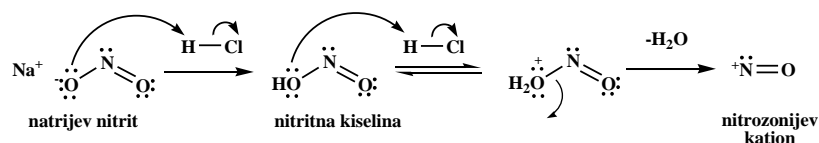
4.2.1. Sinteza azida i 1,3-dipolarne cikloadicijske reakcije gvanozina i aciklovira

U svrhu priprave odgovarajućeg azida za 1,3-dipolarnu cikloadicijsku reakciju modelni spoj gvanozin **1** je u prvom reakcijskom stupnju bromiranjem preveden u 8-bromgvanozin **2** u kvantitativnom iskorištenju.^{262,263,264,265} Nadalje, iz 8-bromgvanozina **2** pripravljen je 8-hidrazingvanozin **3** (*Shema 1*). Derivat **3** dobiven je u reakciji s hidrazin hidratom najprije prema literaturno poznatom propisu uz 19 h refluksa u 51 %-tnom iskorištenju (Metoda 1),^{266,267} a potom je optimizacijom reakcijskih uvjeta i provođenjem reakcije u mikrovalnom reaktoru u zatvorenom sustavu kroz 4 h pri 100 °C postignuto reakcijsko iskorištenje od 75 % (Metoda 2).



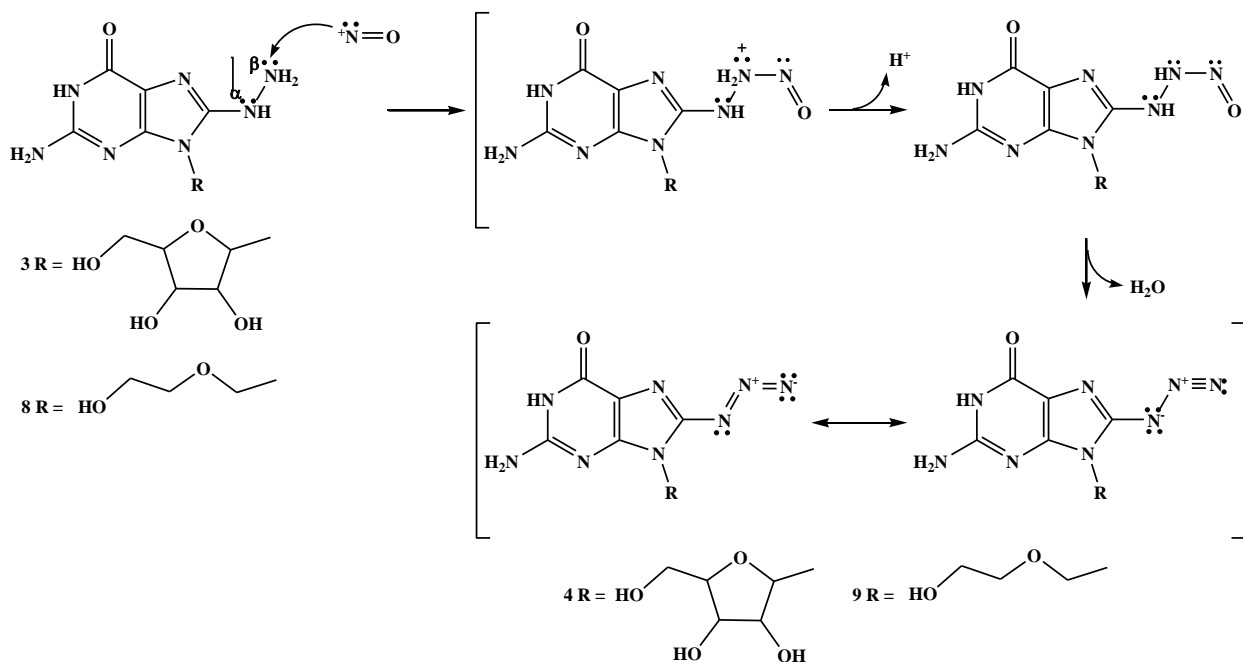
Shema 1. Reakcijski stupnjevi priprave hidrazinskih derivata **3** i **8** iz gvanozina **1** odnosno aciklovira **6**.

U slijedećem reakcijskom koraku priprave 8-azidgvanozina **4** sirovi derivat **3** otopljen je u hladnoj 5 %-tnoj vodenoj otopini klorovodične kiseline te je uz intenzivno miješanje dokapavana hladna vodena otopina natrijevog nitrita. Iz natrijevog nitrita i klorovodične kiseline *in situ* je generirana nitritna kiselina koja je otpuštanjem molekule vode dala nitrozonijev kation (*Shema 2*).



Shema 2. Generiranje nitrozonijevog kationa za reakciju diazotacije.

N-nitrozacijom (diazotacijom) aromatskog hidrazinskog derivata **3** nitrozonijskim kationom pripremljen je odgovarajući 8-azidgvanozin **4** (Shema 3).



Shema 3. Mehanizam reakcije nastajanja 8-azidgvanozina **4** i 8-azidaciklovira **9**.

Mehanizam na Shemi 3 prikazuje β -nitrozaciju derivata **3**, a ovisno o elektronskoj strukturi heterocikličkog sustava na koji je vezana hidrazinska skupina i o reakcijskim uvjetima, do nitrozacije može doći i u α - položaju. Osim azida koji nastaje u oba slučaja, α -nitrozacijom je moguć i nastanak diazonijeve soli kao i potpuna eliminacija hidrazinske skupine aril-radikalnim mehanizmom.²⁸²

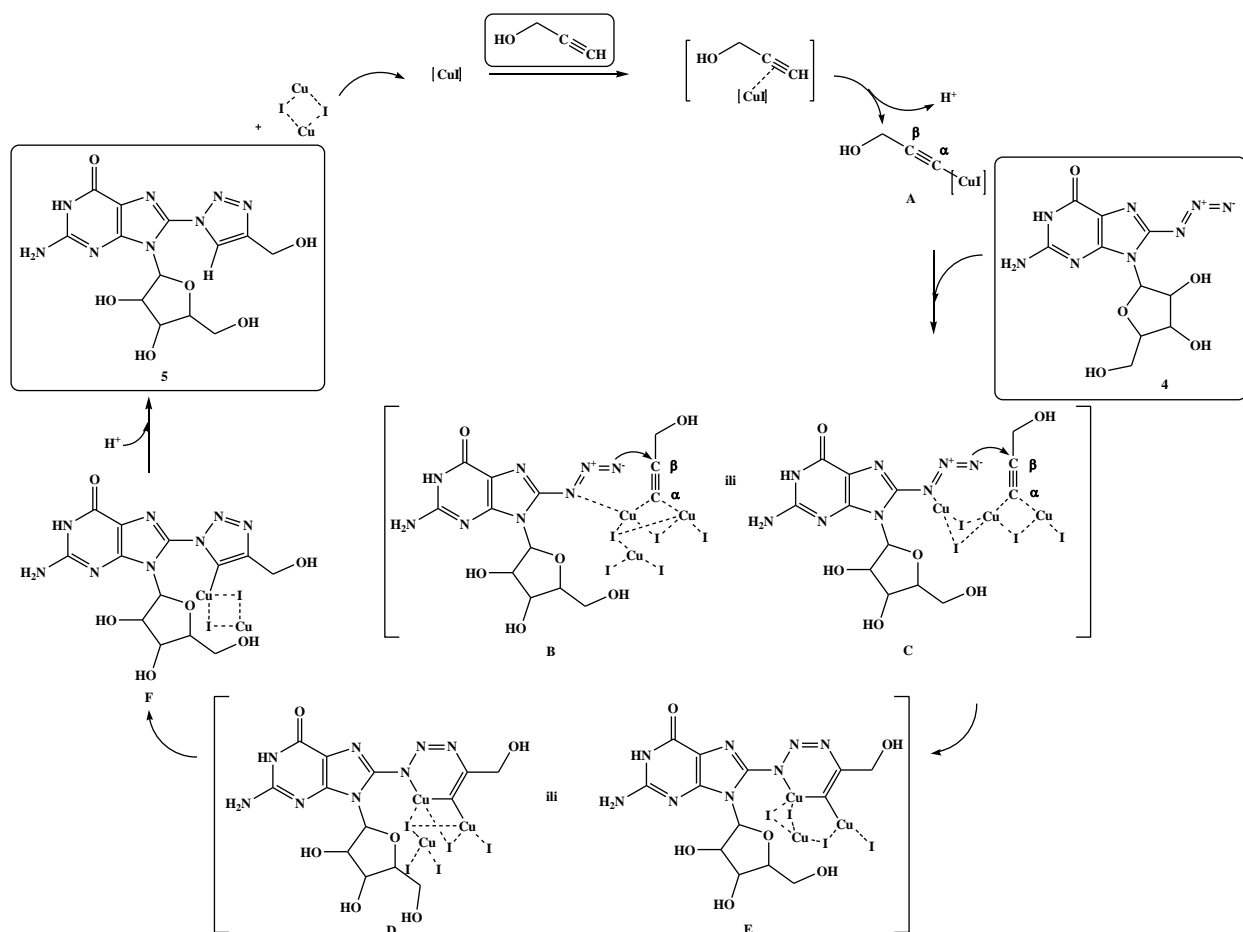
Kod sinteze derivata **4** izuzetno je važno naglasiti da temperatura reakcijske smjese ne smije tijekom cijelog trajanja reakcije (4 h) biti viša od 2 °C jer se u suprotnom bijela suspenzija počinje polagano bistriti te nastaje narančasto-crvena otopina raspadnih produkata. Što je jednako važno, dokapavanje ohlađene vodene otopine natrijevog nitrita treba izvoditi veoma polagano i to na način da se svaka sljedeća kap dodaje tek nakon nestanka blago ljubičaste boje reakcijske smjese prilikom dodatka prethodne kapi. Neophodno je i da se reakcijska smjesa tijekom cijelog trajanja reakcije dobro miješa. Izolacija željenog azida **4** provedena je filtracijom bijele suspenzije u atmosferi argona jer je produkt osjetljiv na prisutnost kisika i svjetlosti.

Obzirom da se azido skupina derivata **4** nalazi u susjedstvu dušikovih atoma imidazolnog prstena purina, u tom je slučaju literaturno poznata reakcija ciklizacije i nastajanje cikličkog adukta, tetrazola.^{183,283,284} Međutim, iz infracrvenog apsorpcijskog spektra derivata **4** jasno je vidljiva i izražena apsorpcijska vrpca na $1/\lambda = 2158 \text{ cm}^{-1}$ što je karakteristično za azido skupinu. Na taj način je potvrđeno da je izolirani produkt reakcije zaista željeni azid **4**.

Organski azidi su skupina spojeva poznata po svojoj termičkoj nestabilnosti, a u nekim slučajevima i eksplozivnosti stoga rad s organskim azidima u laboratorijskim uvjetima zahtijeva poseban oprez. Omjer $(N_C + N_O)/N_N$ (N = broj atoma elementa) mora biti veći ili jednak tri kod organskih azida da bi se azid smatrao neeksplozivnim.²⁸⁵

Iz tog su razloga kod rada s azidom **4** primijenjene nužne mjere opreza, a primijećena je intenzivno brza promjena boje izoliranog produkta na zraku i svjetlosti. Zbog toga je azid **4** sušen zaštićen od svjetlosti i odmah je upotrijebljen u idućem reakcijskom stupnju kako bi se izbjegao mogući raspad zbog izrazite nestabilnosti.

Cikloadicijska reakcija pripreme 8-triazolilhidroksimetilgvanozina **5** (*Shema 4*) s dobivenim azidom **4** provedena je uz 50 %-tni suvišak komercijalno dostupnog propargilnog alkohola u smjesi toluen/MeOH. Kao baza je upotrijebljen Et_3N , a izvor bakra za katalitičku reakciju bio je bakrov(I) jodid.



Shema 4. Mehanizam 1,3-dipolarne cikloadicijske reakcije pripreve 1,2,3-triazolnog derivata **5**.

Prema kinetičkom modelu 1,3-dipolarne cikloadicije koji su objasnili ranije spomenuti autori¹²⁷ kao i uvidom u moguće strukture klastera katalizatora (baza podataka Cambridge Crystal Database) evidentno je da nastali bakrov acetilid **A** i azid **4** u prijelaznom stanju neće nužno biti koordinirani na isti atom bakra. Indikacije takvih prijelaznih stanja²⁸⁶ dodatno su potvrđene i mehanističkim studijama¹²⁷ i teorijskim proračunima na drugim reakcijskim sustavima.²⁸⁷ Stoga su i na Shemi 4 prikazana dva moguća pretpostavljena prijelazna stanja, **B** i **C**. Kod prijelaznog stanja **B**, acetilid **A** i azid **4** koordinirani su na isti atom bakra dok je kod prijelaznog stanja **C** kordinacija ostvarena preko dva različita atoma bakra. U idućem stupnju reakcije između terminalnog negativno nabijenog dušikovog atoma azido skupine derivata **4** i parcijalno pozitivno nabijenog β -ugljkovog atoma acetilida **A** oba intermedijera, **B** i **C**, omogućuju stvaranje šestoročlanog prstena (struktura **D** i **E**), ali samo intermedijer **C** može objasniti 1,4-regioselektivnost i kinetiku drugog reda reakcije pa je stoga on i preferiran. Reorganizacijom

intermedijera **D** odnosno **E** formira se triazolni prsten koji protonacijom otpušta koordinirani bakar te nastaje željeni produkt **5**.

1,4-Disupstituirani triazolni derivat **5** pripremljen je u reakciji s propargilnim alkoholom uz 50 %-tni suvišak bakrovog(I) jodida²⁶⁸ u smjesi toluen/MeOH 2:1 u 21 %-tnom iskorištenju (Metoda 1), a optimizacijom reakcijskih uvjeta smanjenjem količine katalizatora na 20 % postignuto je iskorištenje od 70 % (Metoda 2).

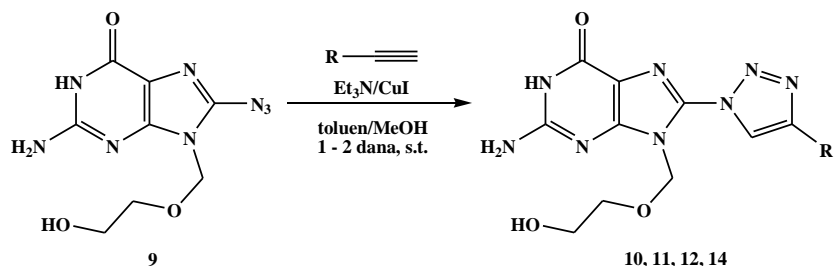
Bromiranjem aciklovira **6** s bromnom vodom dobiven je 8-bromaciklovir **7** u 95 %-tnom iskorištenju (*Shema 1*). Refluksiranjem 8-bromaciklovira **7** u 60 %-tnoj vodenoj otopini hidrazin hidrata kroz 20 h dobiven je 8-hidrazinaciklovir **8** u 71 %-tnom iskorištenju (*Shema 1*), a sirovi produkt je zbog izrazite nestabilnosti na zraku i svjetlosti odmah korišten u slijedećem reakcijskom stupnju. Analogno prethodno opisanom mehanizmu pripreme 8-azidgvanozina **4** dobiven je i njegov strukturni analog 8-azidaciklovir **9** u 67 %-tnom iskorištenju (*Shema 3*). Mjere opreza pri rukovanju i postupak sušenja jednake su kao i u slučaju derivata **4**. U infracrvenom spektru derivata **9** također se vidi izražena apsorpcijska vrpca azido skupine kod $1/\lambda = 2155 \text{ cm}^{-1}$.

Za pripravu C8-triazolnih derivata aciklovira odlučili smo uzeti alkinil alkohole različitih dužina alifatskog lanca kako bi utvrdili njihov utjecaj na biološku aktivnost, a u slučaju pozitivnih rezultata slobodna OH skupina supstituenta na C4" položaju triazola otvorila bi mogućnost za dodatne supstitucije, sintezu različitih konjugata i/ili fluorescentnih markera.

Cikloadicijskim reakcijama iz azida **9** uz komercijalno dostupne terminalne alkine (propargilni alkohol, pent-4-in-1-ol i heks-5-in-1-ol), prema prikazanom mehanizmu dobivanja 1,2,3-triazolnog derivata **5** (*Shema 4*), pripremljeni su 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati **10**, **11** i **12** (*Tablica 1*). Triazolni derivat **14** sintetiziran je iz azida **9** i *N*-propargilftalimida **13** koji je dobiven Gabrielovom sintezom iz propargilnog alkohola i ftalimida uz kalijev karbonat u etanolu.²⁶⁹ Prvi sintetizirani derivat iz serije aciklovira, spoj **10** pripremljen je naprije uz 50 %-tni suvišak bakrovog(I) jodida²⁶⁸ i molarni omjer azid/alkin 1:2 u THF-u u 20 %-tnom iskorištenju. Optimizacijom reakcijskih uvjeta smanjenjem molarnog omjera azid/alkin na 1:1,5 i promjenom otapala (toluen/MeOH 2:1) postignuto je 50 %-tno iskorištenje. Optimiziranom metodom

pripravljani su i derivati **11**, **12** i **14**. Iskorištenje se smanjivalo s produženjem lanca supstituenta na triazolnom prstenu (*Tablica 1*).

Tablica 1. 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati aciklovira.



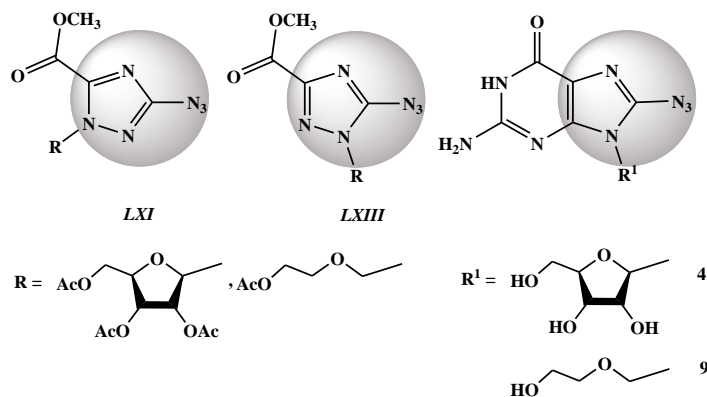
Spoj	R	Iskorištenje (%)
10	-CH ₂ OH	50
11	-(CH ₂) ₃ OH	19
12	-(CH ₂) ₄ OH	15
14		24

Zanimljiv literaturni primjer^{181,182} koji objašnjava nepovoljnu elektronsku strukturu heterocikličkog azida **LXIII** u odnosu na **LXI** (*Slika 3*) u 1,3-dipolarnoj cikloadicijskoj reakciji i niska reakcijska iskorištenja pripreve željenih triazola nedvojbeno se može povezati s našim purinskim sustavom.

U cikloadicijskoj reakciji azida **LXIII** sa šećernim supstumentom nastaju odgovarajući amin odnosno amid, a nastajanje 1,2,3-triazolnog produkta uopće nije uočeno. U slučaju azida **LXI**, zbog prostorno udaljenog supstituenta u odnosu na položaj azidne skupine (*Slika 3*), u cikloadicijskoj reakciji nastaje selektivno 1,2,3-triazolni produkt u visokom reakcijskom iskorištenju.

Činjenica je da je imidazolni prsten purina heterociklički sustav siromašan elektronima što se odražava na reaktivnost C8 položaja. Osim toga, dodatno smanjenje reaktivnosti C8 položaja možemo pripisati steričkoj ometanosti prisutnog šećera odnosno alifatskog dijela molekule

aciklovira u položaju N9. Zbog toga je jasno da niti 8-azidgvanozin **4** odnosno 8-azidaciklovir **9** neće biti povoljni reaktanti 1,3-dipolarne cikloadicijske reakcije.



Slika 3. Usporedba struktura azida **LXI** i **LXIII** s nukleozidnim azidima **4** i **9**.

U ovom radu, tijekom pripreme triazolnih derivata purina, nije uočeno nastajanje ni amina niti amida kao nusprodukata reakcije, ali navedene činjenice nepovoljnog utjecaja supstituenta u N9 položaju mogu objasniti relativno niska reakcijska iskorištenja 1,3-dipolarnih cikloadicijskih reakcija azida **4** odnosno **9** s odgovarajućim alkinima kod pripreme 1,2,3-triazolnih derivata **5**, **10**, **11**, **12** i **14**.

4.2.2. NMR spektri 1,2,3-triazolnih derivata gvanozina i aciklovira

Potpuna asignacija signala protona i ugljikovih atoma serije spojeva derivata gvanozina i aciklovira provedena je uz pomoć standardnih 1H i ^{13}C (APT) te 2D; COSY i NOESY tehnika. Sva mjerenja izvedena su u DMSO- d_6 .

1H kao i ^{13}C NMR spektri gvanozinskih derivata; 8-bromgvanozina **2**, 8-hidrazingvanozina **3** i 8-azidgvanozina **4** te analognih derivata aciklovira; 8-bromaciklovira **7**, 8-hidrazinaciklovira **8** i 8-azidaciklovira **9** daju karakteristične kemijske pomake signala protona [δ /ppm: NH_2 (6,2–6,6) i NH (10,4–11,0)] i ugljikovih atoma [δ /ppm: C-6 (155,5–155,7); C-2 (152,7–154,2); C-4 (151,7–152,9); C-5 (112,2–117,6)] purinske baze. Ovisno o vrsti supstituenta najveću razliku u kemijskom pomaku C-atoma pokazuje C8 položaj (δ /ppm: 120,9–151,4). Detaljan pregled

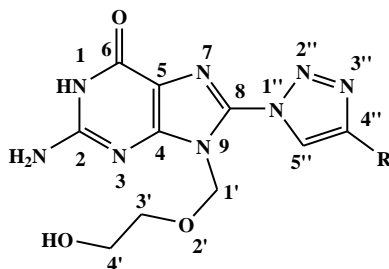
slijeda pomaka signala molekula prikazan je tablično u prilogu disertacije posebno za seriju spojeva derivata gvanozina odnosno aciklovira.

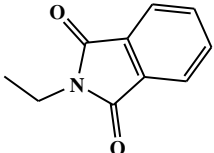
U slučaju 1,4-disupstituiranih derivata triazola ^1H i ^{13}C NMR spektri, osim karakterističnih pomaka za purinsku jezgru, pokazuju karakteristične pomake protona i ugljikovih atoma triazolnog prstena i alifatskog odnosno aromatskog supstituenta u položaju C-4" triazolnog prstena.

Signal triazolnog protona gvanozinskog derivata **5**, CH-5", pojavljuje se kao izraženi singlet na δ 8,41 ppm dok se signal protona CH₂ skupine alifatskog supstituenta na triazolnom prstenu (CH₂-a) pojavljuje također kao singlet na δ 4,63 ppm. Hidroksilna skupina alifatskog supstituenta pojavljuje se kao prošireni (*engl. broad*) singlet zajedno s OH-3' skupinom šećernog dijela molekule gvanozina. Da se zaista radi o signalima OH skupina potvrđeno je snimanjem ^1H NMR spektra uzorka izmiješanog s D₂O gdje je došlo do nestanka signala izmjenjivih protona. U ^{13}C NMR spektru derivata **5** vidimo karakteristične signale ugljikovih atoma triazolnog prstena, C-4" na δ 148,11 ppm i C-5" na δ 125,63 ppm. Triplet ugljikovog atoma CH₂ skupine alifatskog supstituenta vidi se na δ 54,63 ppm.

Kemijski pomaci karakterističnih signala protona triazolnog prstena (CH-5") koji se pojavljuju kao izraženi singleti kao i karakterističnih signala ugljikovih atoma triazolnog prstena, C-4" i C-5" derivata aciklovira **10**, **11**, **12** i **14** dan je u Tablici 2.

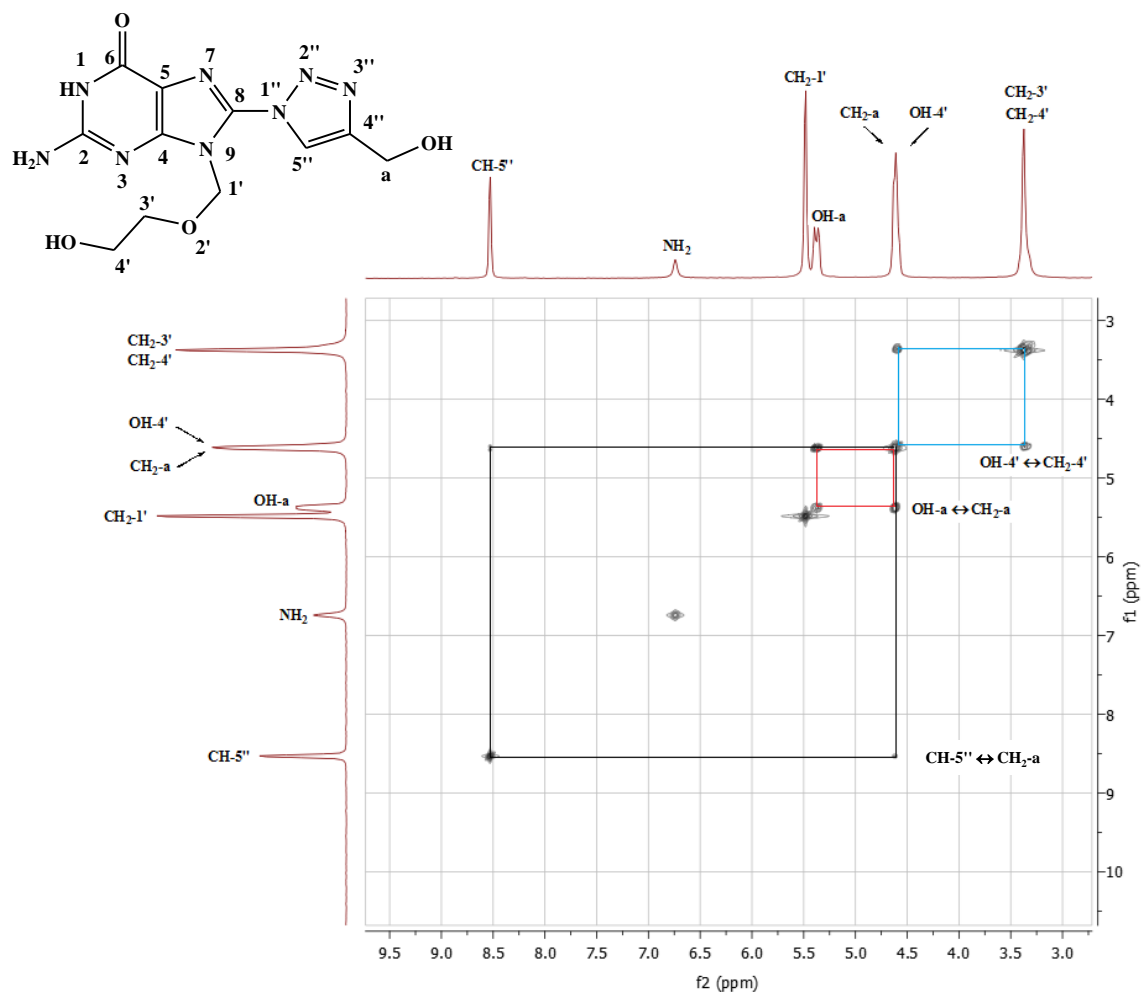
Tablica 2. Kemijski pomaci protona, CH-5'' i ugljikovih atoma, C-4'' i C-5'' triazolnih derivata **10**, **11**, **12** i **14** izraženi u ppm.



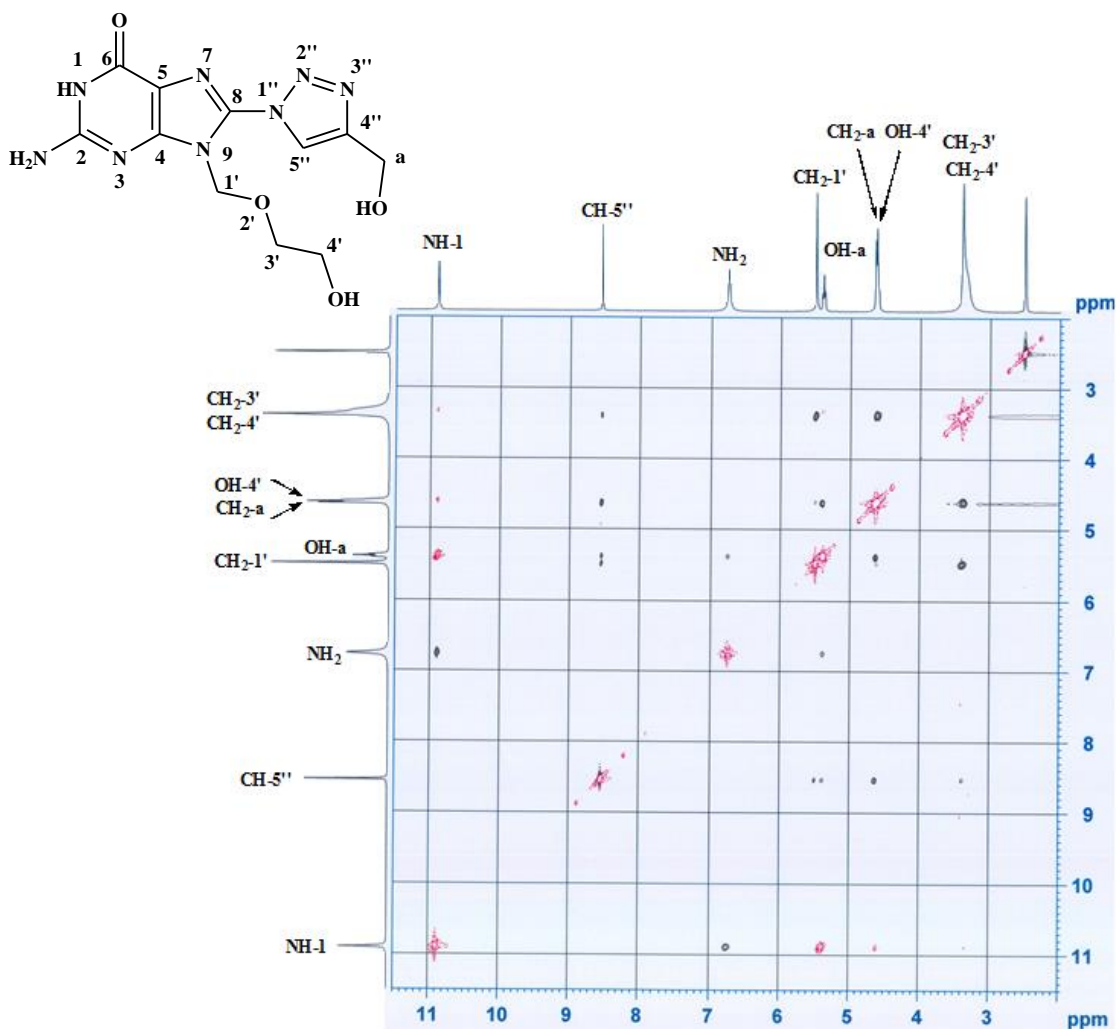
Spoj	R	CH-5'' (ppm)	C-4'' (ppm)	C-5'' (ppm)
10	-CH ₂ OH	8,54	148,14	124,09
11	-(CH ₂) ₃ OH	8,48	147,15	123,25
12	-(CH ₂) ₄ OH	8,47	147,21	123,17
14		8,74	142,68	124,52

Pregled slijeda signala alifatskog odnosno aromatskog supstituenta u položaju C-4'' triazolnog prstena derivata **10**, **11**, **12** i **14** prikazan je u tablici u prilogu disertacije.

2D NMR COSY spektar spoja **10** (Slika 4) kao i NOESY spektar spoja **10** (Slika 5) korišteni su kao modeli za asignaciju signala svih drugih derivata aciklovira, **11**, **12** i **14**.



Slika 4. COSY spektar spoja **10** u DMSO- d_6 . Pravokutnicima su označene interakcije koje su vidljive iz spektra (crni CH-5'' ↔ CH₂-a, crveni OH-a ↔ CH₂-a i plavi OH-4' ↔ CH₂-4'), a interakcija CH₂-3' ↔ CH₂-4' se nalazi na dijagonali i vidljiva je tek kod velikog povećanja (signali nisu razlučeni).



Slika 5. NOESY spektar spoja **10** u DMSO-*d*₆. Vidljive su; a) jake interakcije: NH-1 ↔ NH₂, CH₂-1' ↔ CH₂-3'(CH₂-4'), CH₂-a ↔ OH-a i CH₂-4' ↔ OH-4', b) srednje jake interakcije: CH-5'' ↔ CH₂-4'(CH₂-3'), CH-5'' ↔ CH₂-a, CH-5'' ↔ OH-a i CH-5'' ↔ CH₂-1' te c) slabe interakcije: NH₂ ↔ CH₂-1' i CH₂-1' ↔ CH₂-a.

NOESY tehnikom (Slika 5) utvrđene su interakcije protona kroz prostor te je na temelju tog spektra zaključeno o konformaciji molekule u otopini DMSO-a:

a) alifatski supstituent na N9 položaju purinske jezgre nalazi se u *anti* položaju (okrenut je prema imidazolnom prstenu odnosno C8 položaju purina),

b) triazolni prsten ima specifičnu orijentaciju tako da su dušici triazola okrenuti prema N7 položaju purina što omogućuje interakcije CH-5" triazola s alifatskim supstituentom na N9 položaju purinske jezgre.

4.2.3. Rezultati protutumorske aktivnosti 1,2,3-triazolnih derivata aciklovira

Djelovanje 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata aciklovira ispitano je na osam staničnih linija:

1. Normalnim stanicama

- MDCK - normalne epitelne stanice bubrega psa (*engl. Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells*)

2. Stanicama humanih karcinoma

- HeLa - adenokarcinom grlića vrata maternice (prvi puta izolirane iz pacijentice *Henriette Lacks*)
- CaCo-2 - karcinom debelog crijeva
- NCI-H358 - bronhioalveolarni karcinom pluća

3. Stanicama leukemija

- K562 - kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi
- Jurkat - stanična linija T-limfocita za studije akutne T-leukemije (leukemija T-stanica)

4. Stanicama limfoma

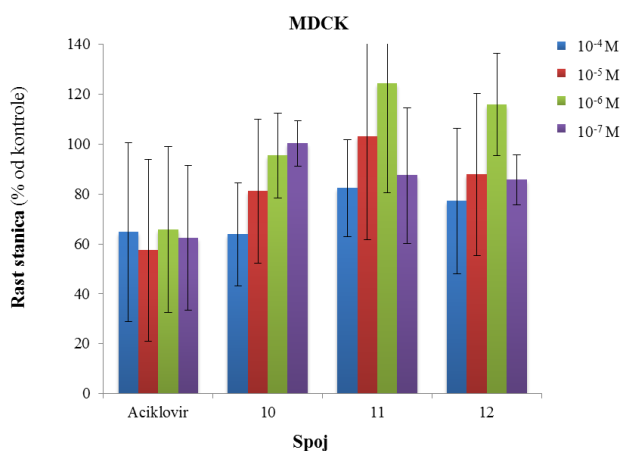
- HuT 78 - limfom T-stanica
- Raji - Burkittov limfom

Obzirom da se radi o strukturnim analogima poznatog antivirusnog terapeutika, pored provedenih ispitivanja protutumorske aktivnosti, u tijeku je i ispitivanje antivirusne aktivnosti pripremljenih derivata.

Novosintetizirani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati aciklovira pokazali su jako, srednje jako, odnosno slabo antiproliferativno djelovanje, a neki derivati uopće ne pokazuju protutumorsku aktivnost s obzirom na korištenu staničnu liniju, koncentraciju i strukturu

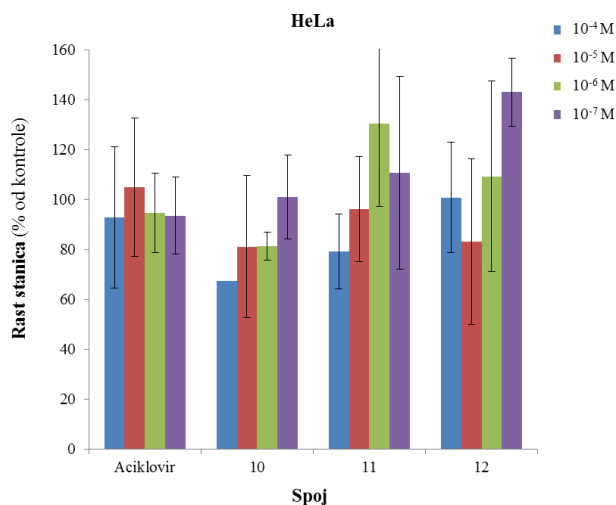
primijenjenog spoja. Svi testirani spojevi ispitivani su u rasponu koncentracija od $1 \cdot 10^{-4}$ do $1 \cdot 10^{-7}$ M.

Rezultati na normalnim MDCK stanicama (*Slika 6*) ukazuju na to da u koncentraciji od 10^{-4} M derivat **10** inhibira rast stanica za 36 % dok derivati **11** i **12** inhibiraju rast normalnih MDCK stanica za 18 % odnosno 23 %. To ukazuje na činjenicu da ispitani spojevi nisu izrazito citotoksični za normalne stanice. U nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) antiproliferativno djelovanje novosintetiziranih derivata **10**, **11** i **12** se smanjuje dok aciklovir **6** u svim ispitanim koncentracijama ima isti učinak, inhibira rast MDCK stanica za oko 40 %.



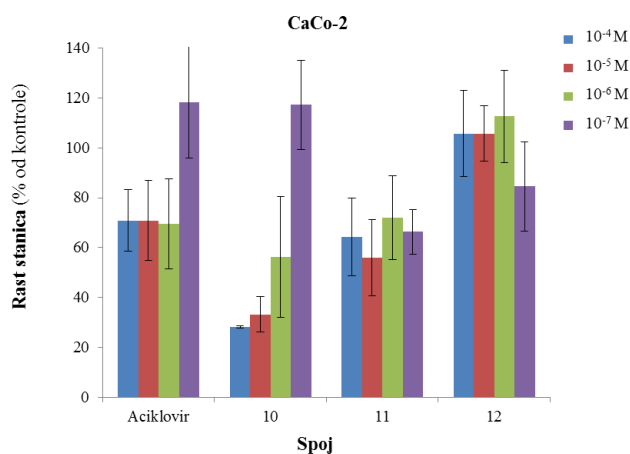
Slika 6. Učinak derivata **10**, **11** i **12** na rast normalnih MDCK stanica u usporedbi s aciklovirom **6** kao standardom.

Ispitivanje 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata aciklovira na staničnoj liniji adenokarcinoma grlića vrata maternice (HeLa) (*Slika 7*) pokazalo je da u koncentraciji od 10^{-4} M derivat **10** inhibira rast stanica za 33 %, derivat **11** za 21 % dok derivat **12** uopće ne inhibira rast tumorskih HeLa stanica. U nižim koncentracijama (10^{-5} i 10^{-6} M) derivat **10** inhibira rast HeLa stanica za 19 %, a slično djelovanje u koncentraciji od 10^{-5} M pokazuje i derivat **12** s inhibicijom rasta stanica od 17 %. U najnižoj koncentraciji (10^{-7} M) ispitivani spojevi **10** i **11** ne pokazuju inhibitorni učinak na rast HeLa stanica, a spoj **12** pokazuje čak slab stimulatívni učinak. Aciklovir **6** u svim ispitanim koncentracijama gotovo uopće ne utječe na rast HeLa stanica.



Slika 7. Učinak derivata **10**, **11** i **12** na rast stanica adenokarcinoma grlića vrata maternice (HeLa) u usporedbi s aciklovirom **6** kao standardom.

Najbolji rezultati dobiveni su sa spojem **10** koji pokazuje jako antiproliferativno djelovanje na stanice karcinoma debelog crijeva (CaCo-2) kada se primijeni u koncentraciji 10^{-4} i 10^{-5} M (72 % odnosno 67 % inhibicije rasta stanica), a učinak se smanjuje na 44 % inhibicije u koncentraciji 10^{-6} M (Slika 8).



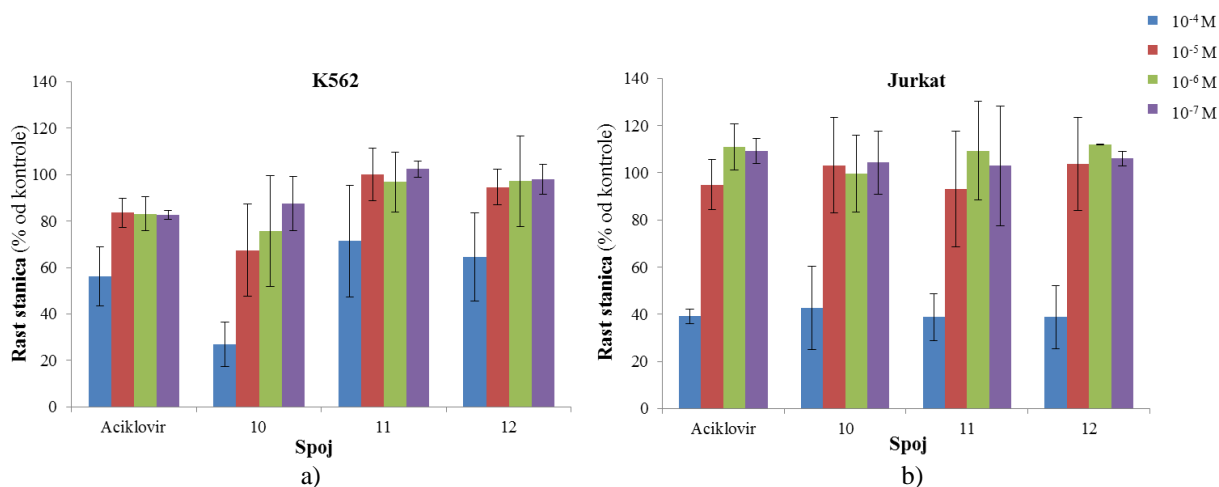
Slika 8. Učinak derivata **10**, **11** i **12** na rast stanica karcinoma debelog crijeva (CaCo-2) u usporedbi s aciklovirom **6** kao standardom.

Derivat **11** u svim ispitanim koncentracijama (10^{-4} – 10^{-7} M) pokazuje sličan profil srednje jako izraženog antiproliferativnog djelovanja na stanice karcinoma debelog crijeva (inhibira rast za oko 40 %) dok derivat **12** nema djelovanja na rast CaCo-2 stanica (Slika 8).

Antiproliferativno djelovanje aciklovira **6** na rast CaCo-2 stanica je jednako (30 %) u koncentracijama 10^{-4} – 10^{-6} M, a u koncentraciji 10^{-7} M spoj ne pokazuje djelovanje na rast CaCo-2 stanica.

Rezultati ispitivanja djelovanja pripremljenih derivata **10**, **11** i **12** kao i aciklovira **6** na rast stanica bronhioalveolarnog karcinoma pluća (NCI-H358) pokazali su da svi ispitani spojevi imaju sličan profil izrazito slabog antiproliferativnog učinka na NCI-H358 stanice s inhibicijom rasta od 22 % do 26 % u koncentraciji 10^{-4} M dok u nižim koncentracijama gotovo ne pokazuju djelovanje na rast NCI-H358 stanica.

Djelovanje ispitanih derivata **10**, **11** i **12** na rast stanica leukemija (K562 i Jurkat) prikazano je na Slici 9.

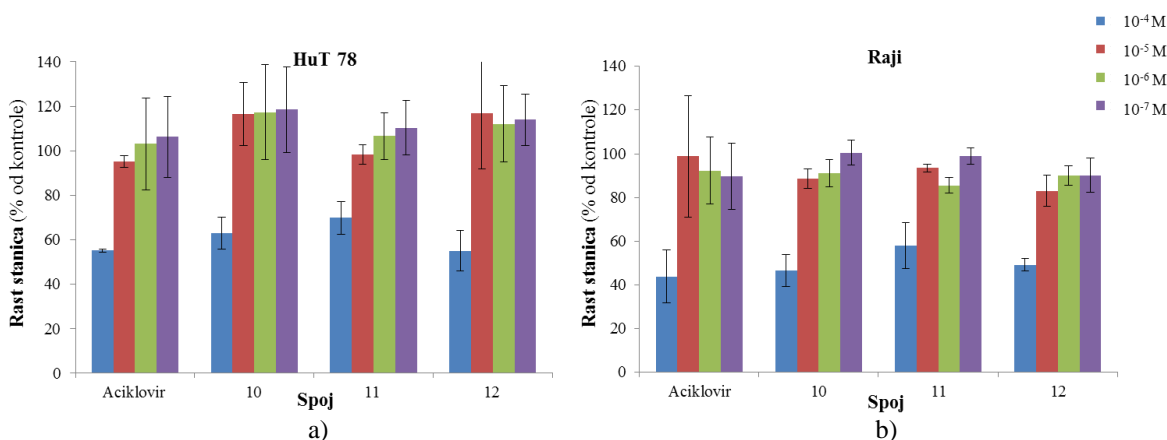


Slika 9. Učinak derivata **10**, **11** i **12** na rast stanica leukemija: a) K562 i b) Jurkat u usporedbi s aciklovirom **6** kao standardom.

Dobiveni rezultati pokazuju da derivat **10** ima jako antiproliferativno djelovanje na stanice kronične mijeloidne leukemije u blastičnoj krizi (K562) (Slika 9. a)) kada se primijeni u koncentraciji 10^{-4} M (73 % inhibicije rasta stanica) dok je inhibitorno djelovanje derivata **11**, **12** i aciklovira **6** u istoj koncentraciji puno slabije izraženo (29 %, 35 % odnosno 45 %). Smanjenjem koncentracije ispitivanih derivata smanjuje se i njihova antiproliferativna aktivnost na stanice leukemije K562 tako da derivat **10** u najnižoj koncentraciji (10^{-7} M) inhibira rast stanica za tek 13 %, a derivati **11** i **12** već u koncentraciji 10^{-5} M gotovo uopće ne djeluju na rast stanica K562.

Profil biološkog djelovanja derivata **10**, **11** i **12** na rast leukemije T-stanica (Jurkat) (Slika 9. b)) gotovo je identičan i u potpunom slaganju s trendom koji pokazuje sam aciklovir **6**. Inhibicija rasta od oko 40 % u koncentraciji 10^{-4} M vidljiva je za sva tri ispitana derivata kao i za aciklovir **6** dok za preostale tri ispitane koncentracije (10^{-5} – 10^{-7} M) novosintetizirani derivati kao i aciklovir **6** ne pokazuju učinak.

Posljednje stanične linije na kojima je ispitana antiproliferativna aktivnost pripremljenih derivata su stanične linije limfoma T-stanica (HuT 78) i Burkittovog limfoma (Raji). Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 10.



Slika 10. Učinak derivata **10**, **11** i **12** na rast stanica limfoma: a) HuT 78 i b) Raji u usporedbi s aciklovirom **6** kao standardom.

Djelovanje pripremljenih derivata **10**, **11** i **12** na rast stanica limfoma (HuT 78) (Slika 10. a)) u koncentraciji 10^{-4} M je srednje izraženo. Inhibicija rasta stanica za 45 % jednaka je za aciklovir **6** i derivat **12** dok derivati **10** i **11** imaju nešto slabije inhibitorno djelovanje na rast HuT 78 stanica (37 % odnosno 30 %). U nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) svi ispitani spojevi ne pokazuju djelovanje.

Profil djelovanja ispitanih derivata **10**, **11** i **12** kao i aciklovira **6** na stanice Burkittovog limfoma (Raji) gotovo je identičan (Slika 10. b)). U koncentracijama 10^{-5} – 10^{-7} M svi ispitani spojevi inhibiraju rast Raji stanica za oko 10 %, a tek u najvišoj ispitanoj koncentraciji (10^{-4} M) pokazuju nešto jači inhibitorni utjecaj na rast stanica (42–56 %).

4.2.4. Odnos strukture i biološke aktivnosti 1,2,3-triazolnih derivata aciklovira

Iz prikazanih bioloških djelovanja možemo zaključiti da novosintetizirani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati aciklovira **10**, **11** i **12** nisu citotoksični za normalne MDCK stanice dok aciklovir **6** inhibira rast stanica za oko 40 % u svim ispitivanim koncentracijama (10^{-4} – 10^{-7} M).

S obzirom na dužinu hidroksi metilenskog lanca u C4" položaju triazolnog prstena uočeno je da porastom dužine lanca dolazi do opadanja odnosno gubitka biološke aktivnosti.

Tako spoj **12** s četiri metilenske skupine u lancu ne pokazuje antiproliferativno djelovanje na stanice humanih tumora (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358), leukemija (K562 i Jurkat) i limfoma (HuT 78, Raji) u nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M), dok u višoj koncentraciji (10^{-4} M) pokazuje srednju aktivnost (35–50 % inhibicije) na rast stanica leukemija i limfoma.

Spoj **11** s tri metilenske skupine u lancu na C4" položaju triazolnog prstena pokazuje slično antiproliferativno djelovanje s izuzetkom inhibicije rasta stanica karcinoma debelog crijeva (CaCo-2), gdje u svim ispitivanim koncentracijama (10^{-4} – 10^{-7} M) pokazuje ~40 %-tnu inhibiciju. U višoj koncentraciji (10^{-4} M) pokazuje srednju aktivnost (30–45 % inhibicije) na rast stanica leukemija i limfoma.

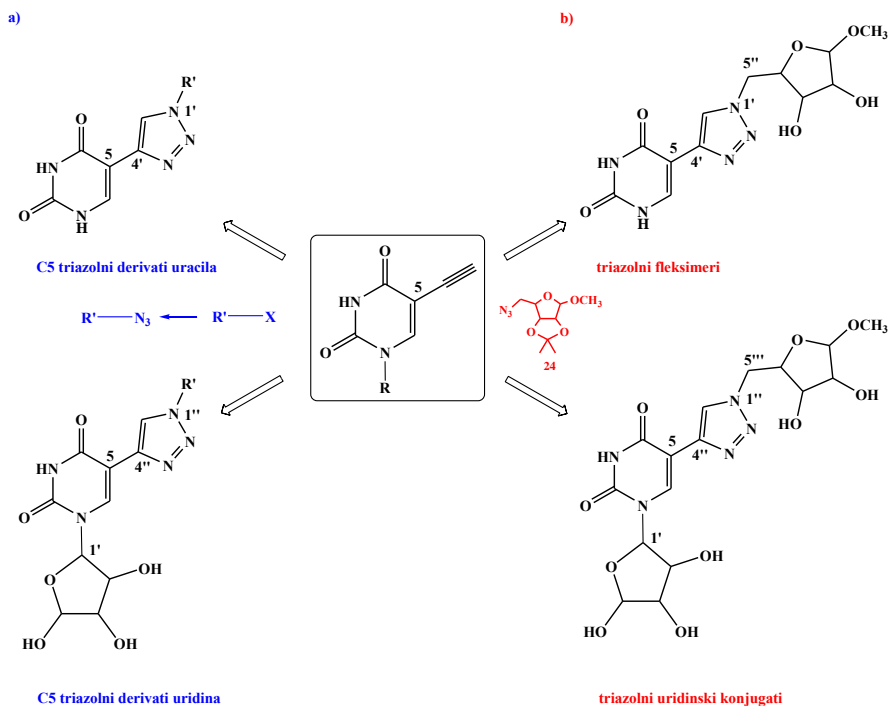
Slične vrijednosti inhibicije rasta stanica dobivene su s aciklovirom **6**, s time da on pokazuje 30 %-tnu inhibiciju rasta stanica karcinoma debelog crijeva (CaCo-2) u koncentracijama 10^{-4} – 10^{-6} M, a u najnižoj koncentraciji (10^{-7} M) ne pokazuje antiproliferativno djelovanje. U višoj koncentraciji (10^{-4} M) pokazuje srednju aktivnost (40–55 % inhibicije) na rast stanica leukemija i limfoma.

Najbolji rezultati dobiveni su sa spojem **10** koji u položaju C4" triazolnog prstena ima hidroksi metilensku skupinu, odnosno najkraći lanac. U visokoj koncentraciji (10^{-4} M) spoj **10** pokazuje jače antiproliferativno djelovanje na gotovo svim ispitivanim staničnim linijama, a posebno na CaCo-2 i K562 (> 70 % inhibicije). U niskim koncentracijama (10^{-5} i 10^{-6} M) posebno treba istaknuti djelovanje na stanice karcinoma debelog crijeva (CaCo-2) gdje je dobivena 67 %-tna inhibicija rasta stanica.

4.3. C5 supstituirani 1,2,3-triazolni derivati uracila i uridina

U literaturnom pregledu ove disertacije detaljno su opisani brojni primjeri modifikacija pirimidinskih nukleobaza i nukleozida uglavnom u svrhu pripreme novih biološki aktivnih derivata i/ili poboljšanja aktivnosti od ranije poznatih terapeutika. Drugi, jednako važan motiv uvođenja strukturnih promjena unutar pirimidinske nukleobaze/nukleozida je praćenje utjecaja takvih modifikacija na svojstva promijenjenih oligonukleotidnih sekvenci te mogućnosti njihove primjene prvenstveno unutar molekularne biologije i genetike te dijagnostike. Posebno je istaknuta važnost modifikacija pirimidina u položaju C5 što je bila čvrsta osnova i za sintezu pirimidinskih derivata iz ove disertacije.

U cilju pripreme C5 modificiranih pirimidinskih derivata kao polazni spoj odabran je 5-etiniluracil/uridin. Razvijene su sintetske metode modifikacija C5 položaja uracilne jezgre te optimizacija reakcijskih uvjeta pripreme 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata cikloadicijskim reakcijama (CuAAC) s: a) *in situ* pripremljenim azidima i b) 5-azido šećerom **24** (Slika 11).



Slika 11. Opća shema Cu(I) katalizirane azid-alkin 1,3-dipolarne cikloadicije (CuAAC) 5-etiniluracila/uridina s: a) *in situ* pripremljenim azidima, b) 5-azido šećerom **24**.

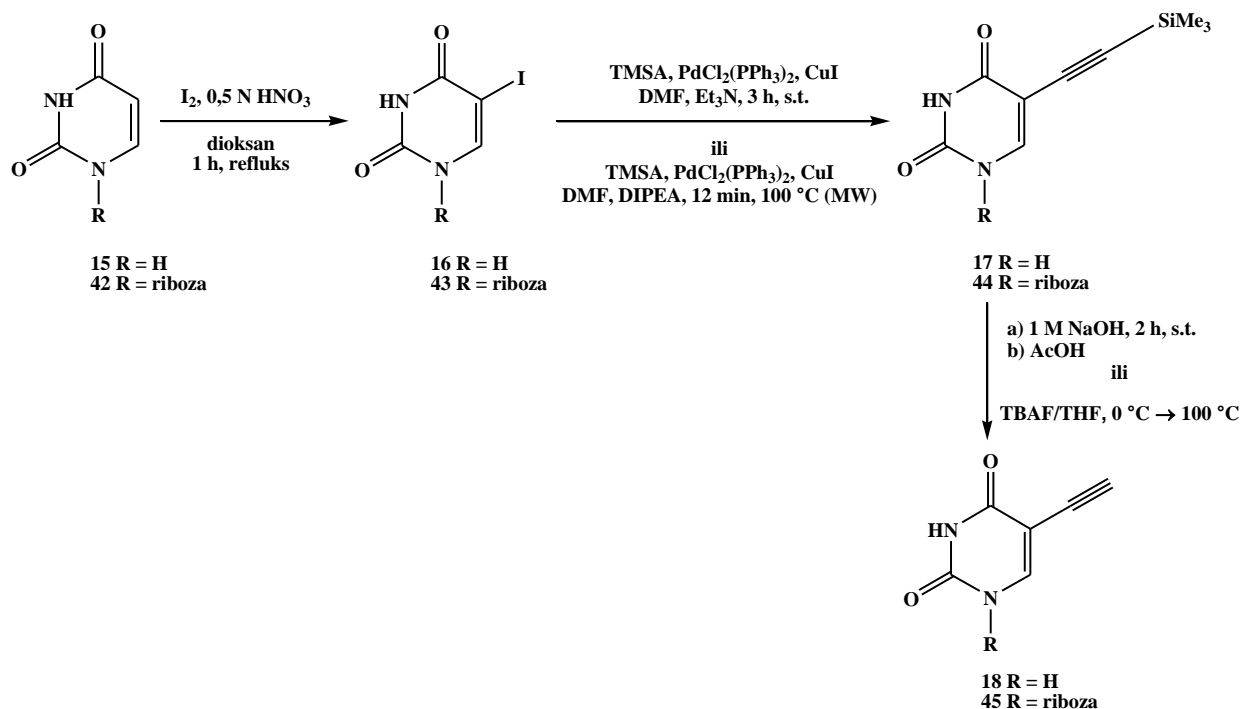
Cikloadicijom 5-etiniluracila s *in situ* pripremljenim azidima sintetizirana je serija C5-triazolnih derivata uracila kod kojih je C5 položaj uracila vezan na C4' položaj triazola, a u N1' položaju triazola nalaze se različiti supstituenti ovisno o upotrebljenim azidima (*Slika 11. a*), C5-triazolni derivati uracila).

S druge strane dizajnirali smo sintezu C-nukleozida uracila kod kojih je C5 položaj uracila i C5'' položaj riboze povezan triazolnom premosnicom (preko N1' i C4' položaja triazola) (*Slika 11. b*), triazolni „fleksimeri”). Ovu grupu spojeva možemo gledati kao derivate pseudouridina, ali i kao derivate purinskih „fleksimera” odnosno derivate purina koje karakterizira specifična povezanost pirimidinskog i imidazolnog prstena samo jednom vezom (nemaju uobičajenu zajedničku dvostruku vezu tj. dva kondenzirana prstena kao što je karakteristično za purinsku jezgru). U tu svrhu, za pripremu triazolnih „fleksimera”, ispitane su bakrom katalizirane cikloadicijske reakcije 5-etiniluracila **18** s 5-azido šećerom **24** (*Slika 11. b*), triazolni „fleksimeri”).

Istovjetnim metodama pripravljena je serija C5-triazolnih derivata uridina (*Slika 11. a*) i sintetizirani su triazolni uridinski konjugati kod kojih je preko N1'' i C4'' položaja triazola povezan C5 položaj uridina i C5''' položaj riboze (*Slika 11. b*)).

4.3.1. Sinteza alkinskih prekursora i 1,3-dipolarne cikloadicijske reakcije

Kao ključni intermedijer svih cikloadicijskih reakcija pripreme C5-triazolnih derivata uracila pripremljen je 5-etiniluracil **18**. U prvom stupnju sinteze elektrofilnom aromatskom supstitucijom uracila **15** s jodom pripremljen je 5-joduracil **16** u 86 %-tnom iskorištenju.^{270,271,272} Derivat **16** potom je Sonogashira reakcijom uz katalizator PdCl₂(PPh₃)₂, kokatalizator CuI i bazu Et₃N te komercijalno dostupan alkin, TMSA, u DMF-u preveden u 5-TMS-etiniluracil **17**.²⁷³ Reakcija je vođena 3 h na sobnoj temperaturi, a produkt je izoliran u 89 %-tnom iskorištenju. Deprotekcijom derivata **17** s 1 M NaOH dobiven je željeni 5-etiniluracil **18** u 94 %-tnom iskorištenju (*Shema 5*).²⁷²



Shema 5. Sintetski put pripreve 5-etiniluracila **18** i 5-etiniluridina **45**.

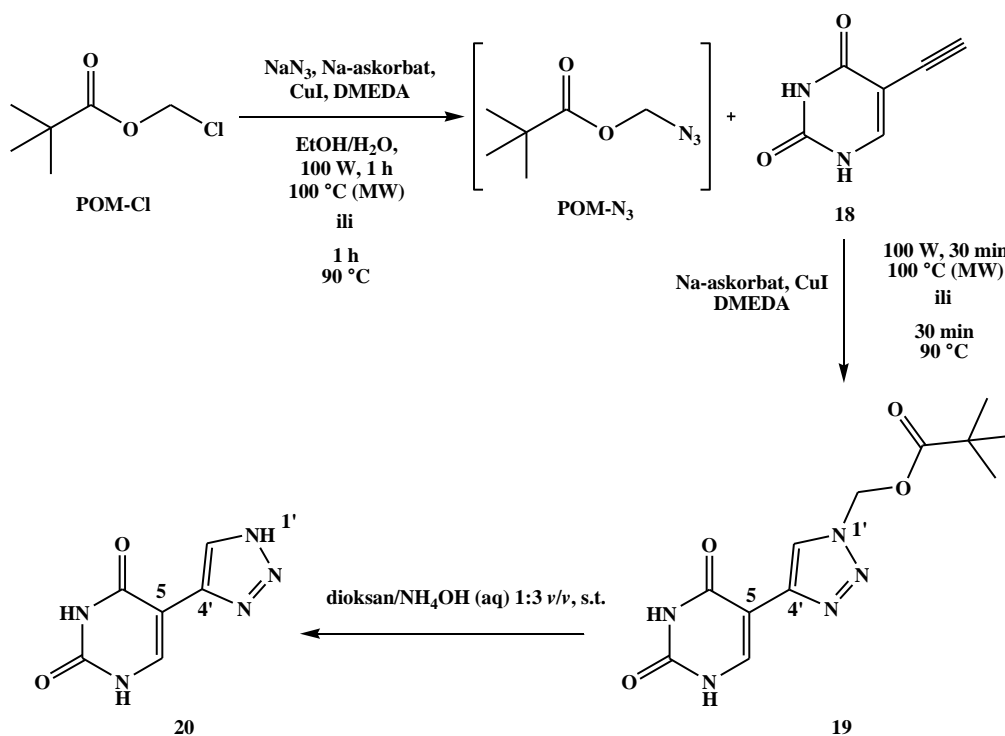
Derivat **18** dalje je upotrijebljen u svim 1,3-dipolarnim cikloadicijskim reakcijama pripreve C5-triazolnih derivata uracila s različitim *in situ* sintetiziranim azidima.

Prva CuAAC reakcija sinteze C5-triazolnog derivata uracila provedena je u mikrovalnom reaktoru u sustavu otvorenog tipa snage 100 W pri 100 °C. Azid je generiran iz odgovarajućeg alkil halogenida i NaN₃ u molarnom omjeru 1:1 uz prisutnost 15 mol % baze/liganda DMEDA, 10 mol % CuI i 5 mol % Na-askorbata u smjesi EtOH/H₂O 7:3. Ova metoda pripreve azida karakteristična je Ullmannova reakcija dobivanja aril azida nukleofilnom aromatskom supstitucijom aril halogenida različitim nukleofilima primjenom CuI kao katalizatora,¹⁴⁷ a uspješno je primijenjena i u ovom radu kod *in situ* pripreve alkil azida kao prekursora klik reakcija.

Kod odabira alkil-halogenida odlučili smo uzeti komercijalno dostupne halogenide supstituirane sa skupinama koje će nakon cikloadicijskih reakcija omogućiti dobivanje nesupstituiranog triazola u N1' položaju (uklanjanje pivaloileksimetilne (POM) ili benzilne zaštitne grupe), odnosno N1' supstituiranih triazola s različitim skupinama: etil acetatom koji redukcijom može dati hidroksietilnu skupinu, benzil acetatom koji se može transformirati u druge karboksilne

derivate, 2-metoksietilenskim supstuentom, te ferocenskim supstuentom koji bi mogao imati zanimljiva fluorescentna svojstva.

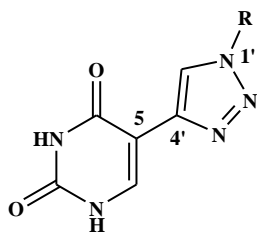
U prvom stupnju reakcije azidacijom pivaloiloksimetil klorida (POM-Cl) u mikrovalnom reaktoru otvorenog tipa, u trajanju od 1 h generiran je POM-N₃. Dobivenom azidu dodan je alkin **18** i dodatne količine katalizatora CuI, reducensa Na-askorbata i baze DMEDA te je kroz narednih 30 min, posredstvom mikrovalnog zračenja, dobiven C5-triazolni derivat uracila **19** u 18 %-tnom iskorištenju (*Shema 6*).



Shema 6. Sintetski put priprave C5-triazolnog derivata uracila **19** i nezaštićenog derivata **20**.

Obzirom da je provedbom reakcije u mikrovalnom reaktoru otvorenog tipa dobiveno nisko iskorištenje (18 %) te je izolirano više od 50 % neizreagirano polaznog spoja **18**, reakcija je ponovljena klasičnom metodom zagrijavanja reakcijske smjese u uljnoj kupelji. Postupkom identičnim opisanom, pri temperaturi od ~ 90 °C postignuto je 81 %-tno iskorištenje reakcije. Tom metodom uz različite komercijalno dostupne reagense (etil bromacetat, benzil bromid, benzil 2-bromacetat, 2-brometil-metil-eter, 6-brom-1-oksoheksilferocen) pripremljeni su i drugi C5-triazolni derivati uracila; **28**, **30**, **31**, **32** i **33** (*Tablica 3*).

Tablica 3. C5-triazolni derivati uracila i produkti uklanjanja/transformacije supstituenata na N1' položaju triazolnog prstena.



Spoj	R	Iskorištenje (%)
a 19		81
	H	kvant.
b 28		kvant.
		60
30		kvant.
31		kvant.
32		kvant.
33		49

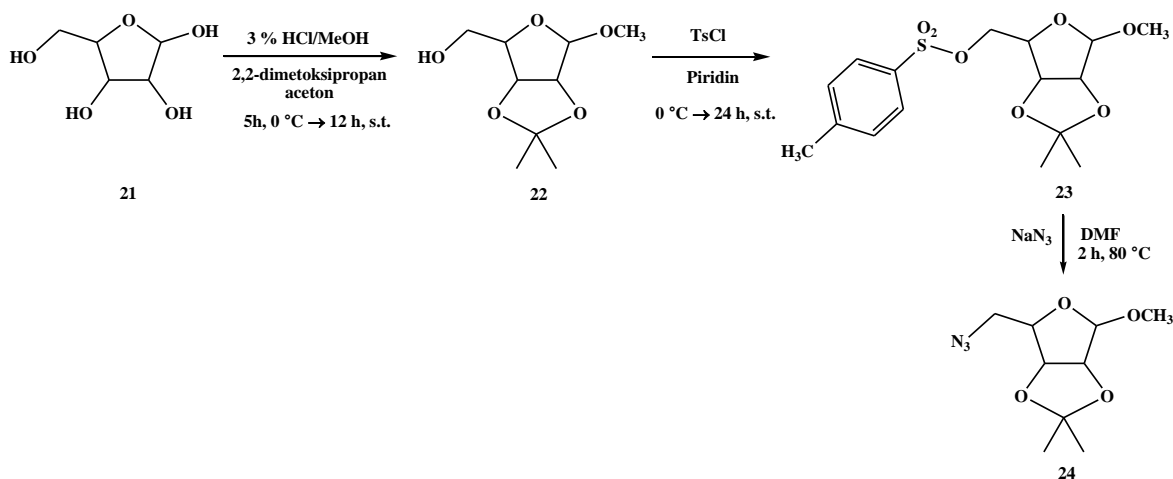
a NH₄OH/dioksan; b NaBH₄/DME

Deprotekcijom derivata **19**, uklanjanjem pivaloiloksimetilne zaštitne skupine u bazičnim uvjetima (NH₄OH) u dioksanu, pripravljen je spoj **20** u kvantitativnom iskorištenju (*Shema 6, Tablica 3*).

Redukcijom karbonilne skupine derivata **28** primjenom metalnog hidrida (NaBH₄) u dimetoksietanu dobiven je primarni alkohol **29** (*Tablica 3*) u 60 %-tnom iskorištenju.

U svrhu pripreve triazolnih fleksimera, kod kojih su C5 položaj riboze i C5 položaj uracila povezani preko triazola, ispitane su bakrom katalizirane cikloadicijske reakcije 5-etiniluracila **18** s 5-azido šećerom **24**.

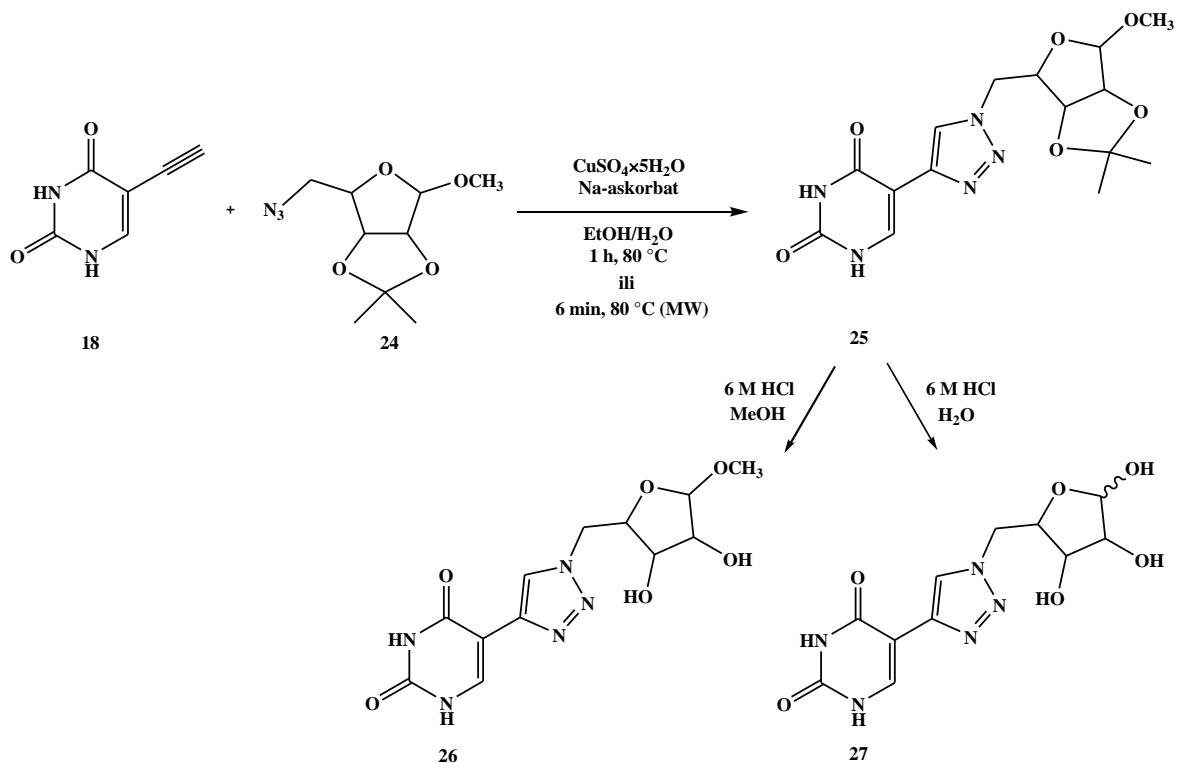
Prvo je transformacijom D-riboze **21** sintetiziran šećerni azid **24** prema poznatim propisima (*Shema 7*).^{274,275}



Shema 7. Sintetski put pripreve šećernog azida **24** iz D-riboze **21**.

Prilikom reakcije D-riboze **21** s 2,2-dimetoksiopropanom u acetonu uz dodatak metanolnog HCl dobiven je metil 2,3-*O*-izopropiliden-β-D-ribofuranozid (**22**) u 62 %-tnom iskorištenju. C5 hidroksilna skupina derivata **22** aktivirana je prevođenjem u 5-tosil derivat **23** (76 %) uz TsCl u piridinu, a nukleofilnom supstitucijom s NaN₃ izoliran je 5-azido šećer **24** u 80 %-tnom iskorištenju.

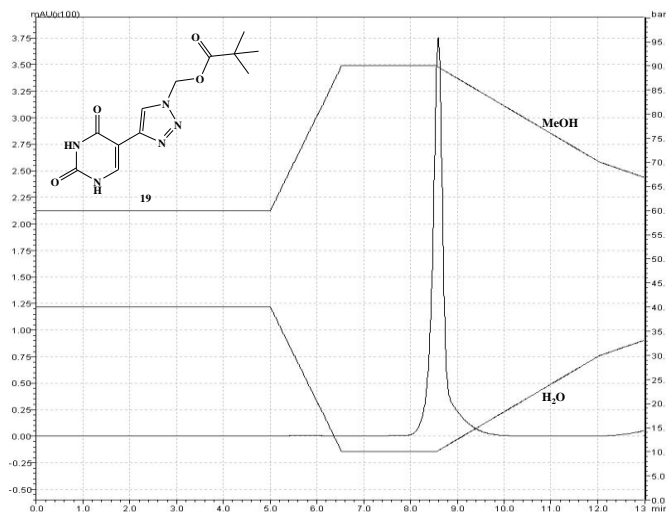
Cikloadicijskom reakcijom dobivenog azida **24** uz 15 % suviška alkina **18** i katalizator CuSO₄·5H₂O te reducens Na-askorbat u smjesi THF/H₂O/t-BuOH 3:1:1 pripravljen je triazolni fleksimer **25** u 18 %-tnom iskorištenju (Metoda 1).²⁷⁶ Optimizacijom reakcijskih uvjeta provođenjem reakcije uz 5 %-tni suvišak azida **24** i katalizator CuSO₄·5H₂O te reducens Na-askorbat u smjesi EtOH/H₂O 1:1 posredstvom mikrovalnog zračenja snage 250 W pri 80 °C u trajanju od 6 min u mikrovalnom reaktoru otvorenog tipa postignuto je iskorištenje od 41 % (Metoda 2).^{210,26} Naposljetku, klasičnom metodom sinteze zagrijavanja reakcijske smjese u uljnoj kupelji pri temperaturi od 80 °C u vremenu od 1 h dobiveno je 63 % željenog triazolnog fleksimera **25** (Metoda 3, *Shema 8*).



Shema 8. Cikloadicijska reakcija priprave triazolnog fleksimera **25** i uklanjanje zaštite šećera; triazolni fleksimeri **26** i **27**.

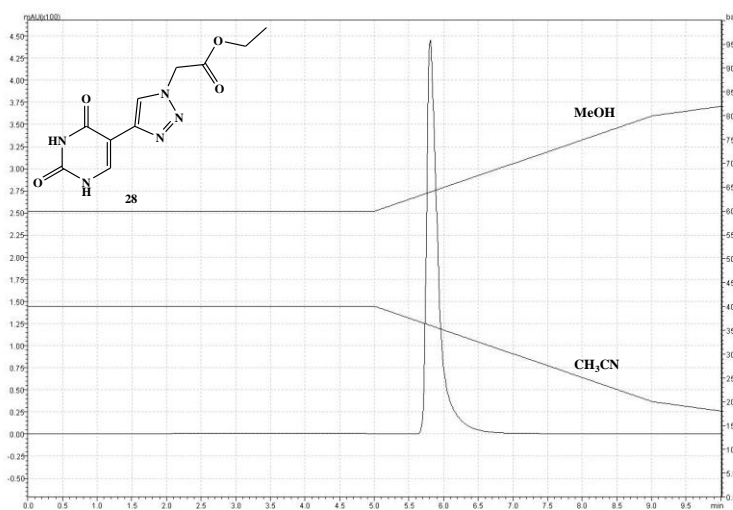
Tretiranjem derivata **25** s 6 M HCl u MeOH dolazi do uklanjanja izopropilidenske zaštite na šećeru te je tako pripremljen triazolni fleksimer **26** u 82 %-tnom iskorištenju, a reakcijom u H₂O dolazi do deprotekcije svih OH skupina šećera te je tako pripremljen triazolni fleksimer **27** u 94 %-tnom iskorištenju (Shema 8). NMR spektrima potvrđeno je da je deprotekcijom s HCl/MeOH zadržana β-konfiguracija anomernog centra fleksimera **26** dok je fleksimer **27** smjesa α i β anomera (β>α) u omjeru 1:0,2.

Za praćenje tijekom cikloadicijskih reakcija priprave C5-triazolnih derivata uracila kao i potvrdu čistoće razvijena je HPLC gradijentna metoda s protokom od 1,5 mL/min pri tlaku od 4 do 220 bar. Kao eluens je primijenjen sustav MeOH/H₂O odnosno MeOH/CH₃CN ovisno o polarosti spoja, a retencijska vremena uzoraka bila su u intervalu od 5 do 9 min. Koncentracije svih uzoraka injektiranih u sustav bile su 10⁻³ M. Primjer dobivenog HPLC spektra derivata **19** s pripadajućim režimom gradijentnog protoka sustava MeOH/H₂O prikazan je na Slici 12. Retencijsko vrijeme spoja **19** je 8,59 min.



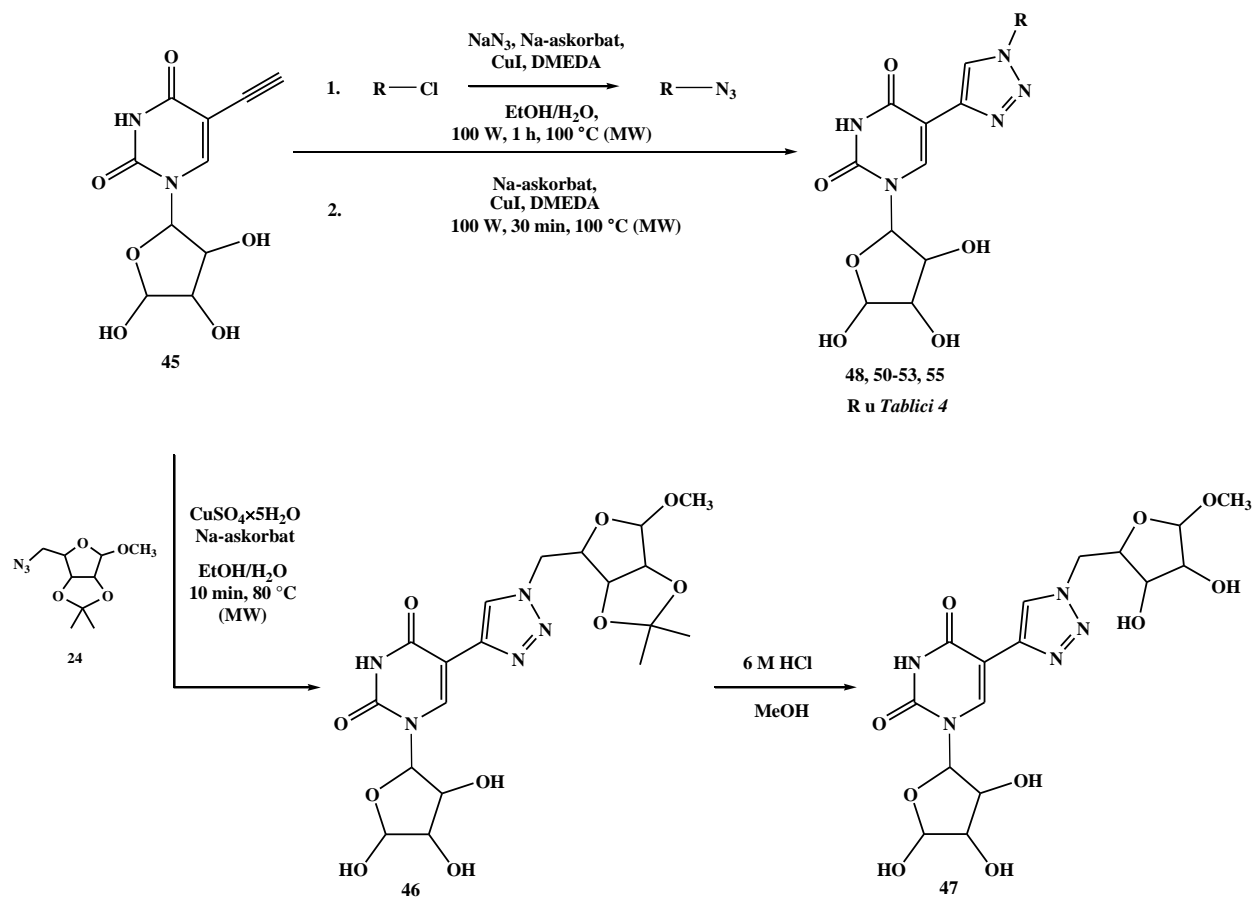
Slika 12. HPLC spektar spoja **19** s prikazom režima gradijentnog protoka sustava MeOH/H₂O.

Derivat **28** eluiran je s kolone također režimom gradijentnog protoka sustava MeOH/CH₃CN, a dobiveni spektar prikazan je na Slici 13. Retencijsko vrijeme spoja **28** je 5,76 min.



Slika 13. HPLC spektar spoja **28** s prikazom režima gradijentnog protoka sustava MeOH/CH₃CN.

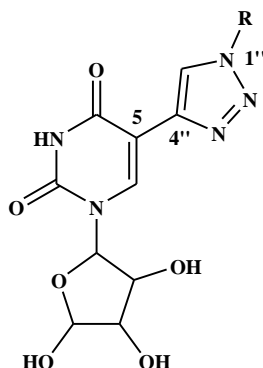
Analogno reakciji pripreve 5-joduracila **16** sintetiziran je i 5-joduridin **43** u 88 %-tnom iskorištenju (Shema 5). Sonogashirinom reakcijom 5-joduridina **43** s komercijalno dostupnim alkinom, TMSA uz katalizator PdCl₂(PPh₃)₂, kokatalizator CuI i bazu DIPEA u DMF-u zagrijavanjem reakcijske smjese u mikrovalnom reaktoru zatvorenog tipa kroz 12 min na 100 °C dobiven je 5-TMS-etiniluridin **44** u 79 %-tnom iskorištenju (Shema 5).



Shema 9. Cikloadicijska reakcija priprave triazolnog konjugata uridina **46**, uklanjanje zaštite šećera - derivat **47** i sinteza C5-triazolnih derivata uridina; **48**, **50–53** i **55**.

Tretiranjem derivata **44** 1 M otopinom TBAF-a u THF-u na 0 °C trenutnom reakcijom dobiven je 5-etiniluridin **45** u 91 %-tnom iskorištenju (Shema 5). On je dalje služio kao prekursor svih cikloadicijskih reakcija priprave triazolnih derivata uridina; **48**, **50–53** i **55** i triazolnog konjugata uridina **46** (Shema 9, Tablica 4).

Tablica 4. Triazolni uridinski konjugati, C5-triazolni derivati uridina i produkti uklanjanja/transformacije supstituenata na N1'' položaju triazolnog prstena.



Spoj	R	Iskorištenje (%)	
a		46	80
		47	99
b		48	83
		49	89
	H		
		50	88
		51	93
		52	76
c		53	82
		54	82
		55	94

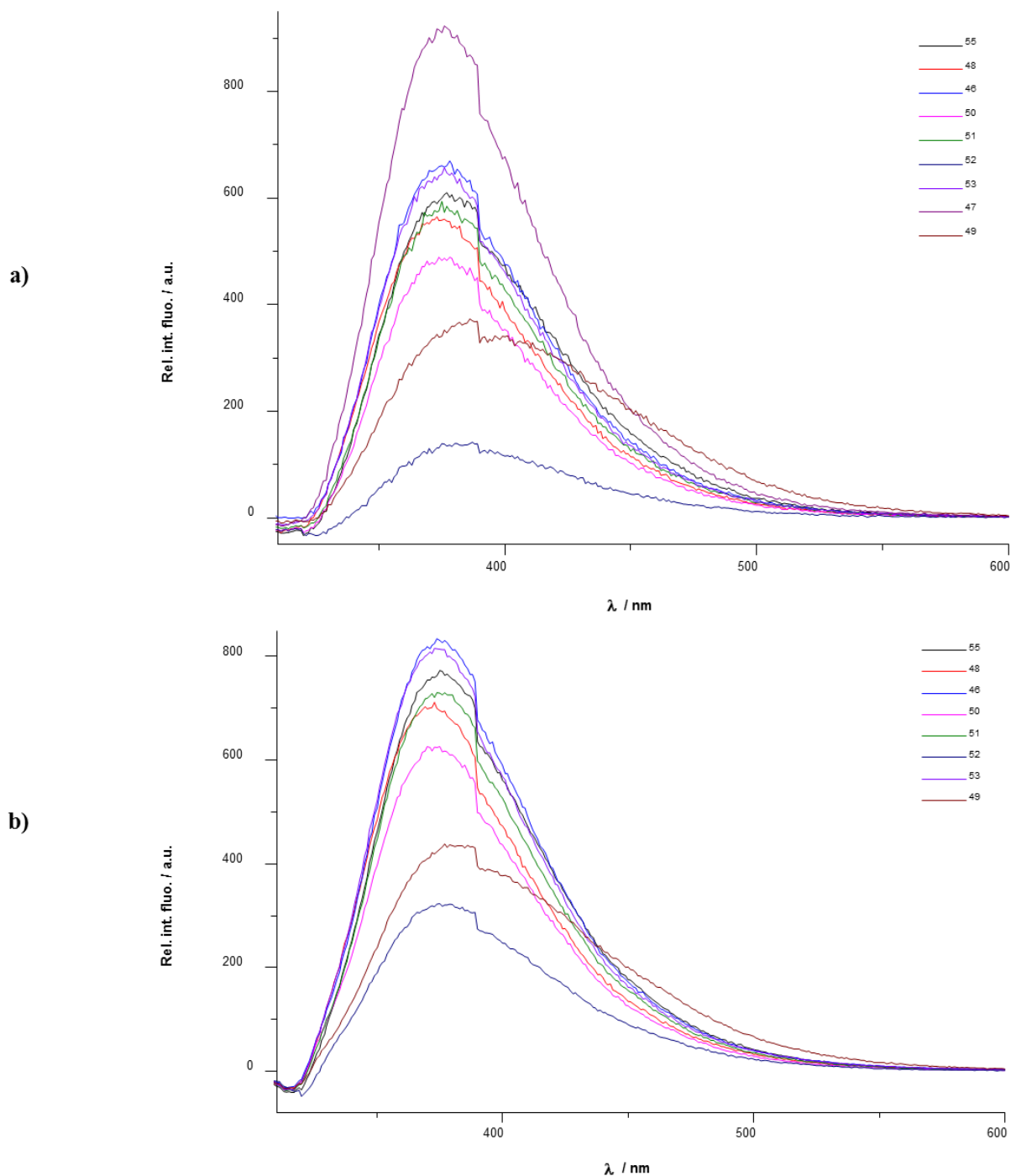
a 6M HCl/MeOH, b NH₄OH/dioksan, c MeOH

Spojevi uridinske serije navedeni u Tablici 4 sintetizirani su u mikrovalnom reaktoru u zatvorenom sustavu. Produkti **48**, **50–53** i **55** dobiveni su klik reakcijom 5-etiniluridina **45** s prethodno *in situ* generiranim odgovarajućim azidima iz različitih komercijalno dostupnih reagensa (pivaloiloksimetil klorid, etil bromacetat, benzil bromid, 6-brom-1-oksoheksilferocen, benzil 2-bromacetat, 2-brometil-metil-eter), a za sintezu triazolnog konjugata uridina **46** (*Shema 9, Taclica 4*) upotrijebljen je šećerni azid **24** čija priprava je prikazana Shemom 7.

Deprotekcijom derivata **48** uklanjanjem pivaloiloksimetilne zaštitne skupine u bazičnim uvjetima [NH_4OH (aq)] u dioksanu pripravljen je monosupstituirani triazol **49** u 89 %-tnom iskorištenju, a uklanjanjem izopropilidenske zaštite na šećeru triazolnog konjugata uridina **46** tretiranjem s 6 M HCl u MeOH pripravljen je triazolni konjugat **47** u 99 %-tnom iskorištenju. Stajanjem otopine spoja **53** u MeOH kroz nekoliko dana na sobnoj temperaturi došlo je do taloženja i izoliran je produkt transesterifikacije **54**.

Budući da je uvođenjem triazolnog supstituenta u C5 položaj uracila/uridina inducirana fluorescencija svih pripremljenih derivata, snimljeni su fluorescencijski spektri 1,2,3-triazolnih analoga uridinske serije. Obzirom da svi spojevi imaju karakteristična dva apsorpcijska maksimuma, emisijski spektri snimljeni su pri obje valne duljine ekscitacije (λ_{exc}). Primijenjene su otopine koncentracije $c \sim 3 \cdot 10^{-5}$ M u MeOH, a mjerenja su izvedena pri 25 °C i istim uvjetima snimanja.

Na Slici 14 a) prikazani su emisijski spektri spojeva **46–53**, **55** za prvi apsorpcijski maksimum ($\lambda_{\text{exc.}} = 227\text{–}232$ nm), a na Slici 14 b) za drugi apsorpcijski maksimum ($\lambda_{\text{exc.}} = 286\text{–}295$ nm).



Slika 14. Emisijski spektri 1,2,3-triazolnih derivata uridinske serije: a) **46–53, 55** za interval $\lambda_{\text{exc.}} = 227\text{--}232$ nm (200–400 nm) ($\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} = 4,14\text{--}4,61$), $\lambda_{\text{em.}} = 373\text{--}387$ nm (300–600 nm) i b) **46, 48–53, 55** za interval $\lambda_{\text{exc.}} = 286\text{--}295$ nm (200–400 nm) ($\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} = 4,10\text{--}4,32$), $\lambda_{\text{em.}} = 373\text{--}384$ nm (300–600 nm).

Emisijski spektar triazolnog konjugata **47** pri $\lambda_{\text{exc.}} = 294$ nm izlazi iz intervala snimanja pa nije uspoređivan s ostalim spojevima.

Obzirom na intrinzično svojstvo fluorescencije pripremljenih spojeva moguća je njihova primjena kao fluorescentnih markera pogodnih za ugradnju u polimerne strukture (DNA, RNA, PNA) s mogućom primjenom u području molekularne biologije i dijagnostike te u „antisense” terapiji (*engl. antisense therapy*).

4.3.2. NMR spektri spojeva uracilne i uridinske serije

Potpuna asignacija signala protona i ugljikovih atoma serije spojeva derivata uracila i uridina provedena je uz pomoć standardnih ^1H i ^{13}C (APT) tehnika. Sva mjerenja izvedena su u DMSO- d_6 .

^1H kao i ^{13}C NMR spektri uracilnih derivata; 5-joduracil **16**, 5-TMS-etiniluracil **17** i 5-etiniluracil **18** te analognih derivata uridina; 5-joduridin **43**, 5-TMS-etiniluridin **44** i 5-etiniluridin **45** daju karakteristične kemijske pomake signala protona [δ /ppm: NH-1(uracilna serija) (11,1–11,3); NH-3 (11,3–11,7); H-6 (7,8–8,5)] i ugljikovih atoma [δ /ppm: C-4 (160,4–162,6); C-2 (149,6–151,2); C-6 (144,6–146,9); C-5 (67,4–98,3)] pirimidinske nukleobaze odnosno nukleozida. Detaljan pregled slijeda pomaka signala molekula prikazan je tablično u prilogu disertacije posebno za seriju spojeva derivata uracila odnosno uridina.

Osim karakterističnih pomaka za nukleobazu kod uracilnih odnosno za nukleozid kod uridinskih derivata vidljivi su i karakteristični pomaci protona i ugljikovih atoma triazolnog prstena kao i signali odgovarajućih supstituenata na triazolnom prstenu.

Kemijski pomaci signala protona triazolnog prstena (CH-5' kod uracilne odnosno CH-5'' kod uridinske serije) koji se pojavljuju kao izraženi singleti i karakteristični signali ugljikovih atoma triazolnog prstena (C-4' i C-5' kod uracilne odnosno C-4'' i C-5'' kod uridinske serije) prikazani su u Tablici 5.

Usporedbom kemijskih pomaka signala protona (CH-5') triazolnog prstena uracilnih derivata uočeno je da se oni nalaze u uskom intervalu između $\delta = 7,98$ – $8,12$ ppm, a jednak slijed

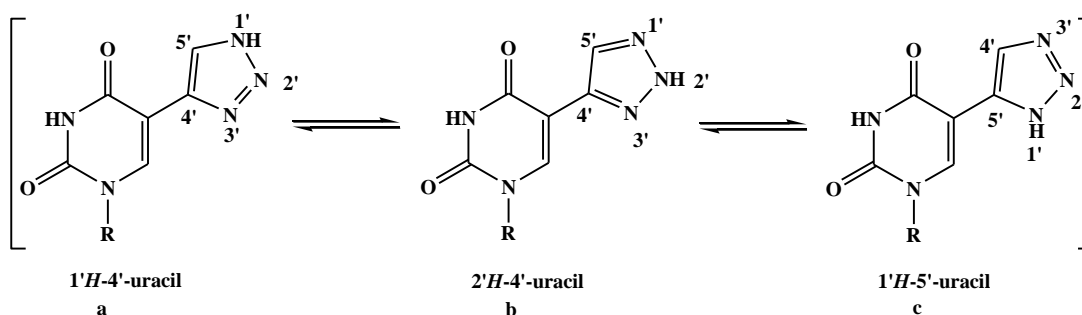
pokazuju i signali ugljikovih atoma u intervalu $\delta = 135,40\text{--}139,96$ ppm za C-4' i $\delta = 121,86\text{--}123,45$ ppm za C-5'. Iznimku čini samo kemijski pomak atoma C-5' triazola kod nesupstituiranog derivata **20**, koji se nalazi u nešto višem polju ($\delta = 114,33$ ppm).

Sličan trend kemijskih pomaka daju i uridinski derivati kod kojih se signali protona triazolnog prstena (CH-5") nalaze u intervalu $\delta = 8,12\text{--}8,49$ ppm, a signali ugljikovih atoma u intervalu $\delta = 137,15\text{--}139,10$ ppm za C-4", odnosno $\delta = 122,30\text{--}124,09$ ppm za C-5". Iznimku ponovno čini kemijski pomak atoma C-5" triazola kod nesupstituiranog derivata **49**, koji se nalazi u nešto višem polju ($\delta = 120,49$ ppm).

Tablica 5. Kemijski pomaci protona i ugljikovih atoma triazolnog prstena: a) uracilne i b) uridinske serije izraženi u ppm.

a)					b)				
Spoj	R	CH-5' (ppm)	C-4' (ppm)	C-5' (ppm)	Spoj	R	CH-5'' (ppm)	C-4'' (ppm)	C-5'' (ppm)
19		8,08	139,38	122,76	46		8,47	nije izašao	124,09
20	H	8,12	139,96	114,33	47		8,31	138,50	123,21
25		8,03	139,15	122,29	48		8,49	139,10	123,41
26		8,03	138,87	122,74	49	H	8,12	137,15	120,49
27		8,02	138,86	122,58	50		8,42	138,62	123,90
28		8,05	138,97	123,37	51		8,41	138,94	122,59
29		8,02	138,76	122,41	52		8,35	138,48	122,30
30		8,02	136,17	122,03	53		8,45	138,66	123,97
31		8,06	135,40	123,45	54		8,43	138,71	123,98
32		8,02	138,90	122,29	55		8,32	138,58	122,89
33		7,98	138,87	121,86					

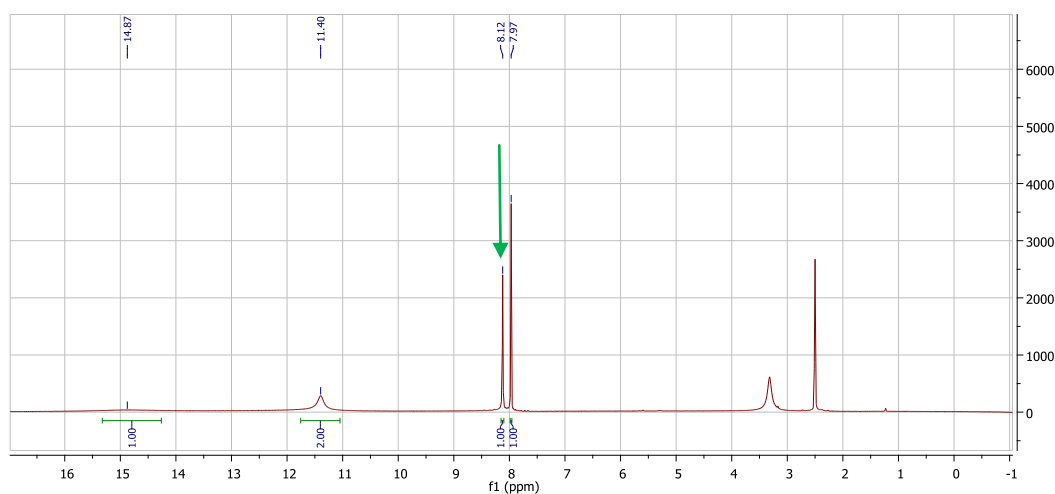
Monosupstituirani triazol derivata **20** teoretski može egzistirati u tri tautomerna oblika (*Shema 10*), a jednako tako i uracil ima svoje tautomerne oblike (nisu prikazani na Shemi 10).



Shema 10. Mogući tautomerni oblici triazolnog prstena derivata **20** (R = H) i **49** (R = riboza).

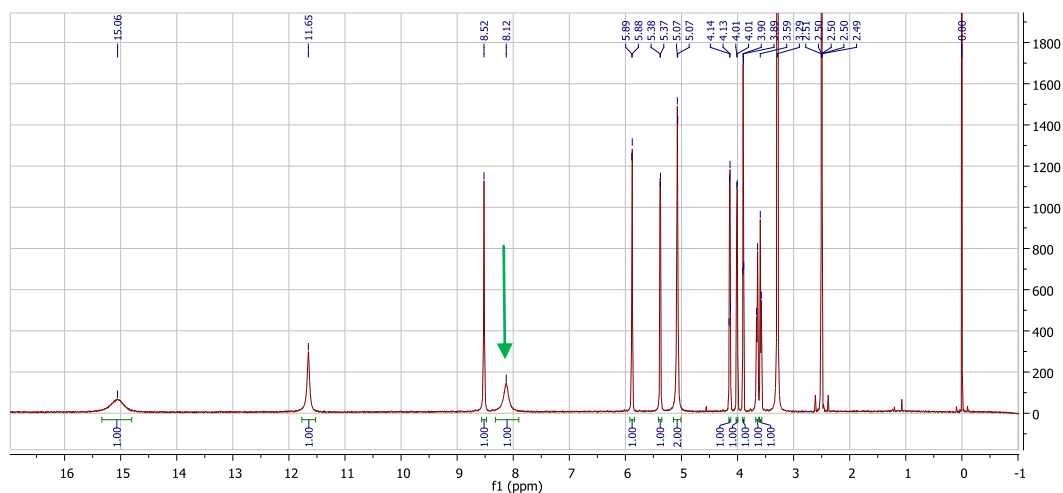
Rezultati *ab initio* proračuna na nivou B3LYP/6-31G* baznog skupa na sustavu 4-fenil-1,2,3-triazola pokazuju da takve specije mogu egzistirati kao smjesa tautomernih oblika: **a** 1'H-4'-fenil, **b** 2'H-4'-fenil i **c** 1'H-5'-fenil od kojih je tautomer **b** najstabilniji, zatim slijedi tautomer **a** (ima za 16,5 kJ mol⁻¹ višu energiju) i najnestabilniji je tautomer **c** (s energijom 20,1 kJ mol⁻¹) te je i najmanje vjerojatan. Pokazano je da u plinovitoj fazi egzistira samo tautomer **b** dok u vodenoj otopini (NMR studij) postoji smjesa **a** i **b** tautomera.²⁸⁸

Stoga je očekivano da će i monosupstituirani C5-triazolni derivat uracila **20** biti smjesa tautomera u otopini. Međutim, iz ¹H NMR spektra spoja **20** vidljivi su prošireni signali samo za protone NH skupina [14,87 (bs, 1H, NH-1'), 11,40 (bs, 2H, NH-1, NH-3)] što je uobičajeno, dok se signal H-5' protona triazolnog prstena ($\delta = 8,12$ ppm) pojavljuje kao oštar singlet (Slika 15). To potvrđuje da spoj **20** nije smjesa triazolnih **a** i **b** tautomera (Slika 14) u otopini DMSO-*d*₆.



Slika 15. ¹H NMR spektar spoja **20** u DMSO-*d*₆.

Monosupstituirani C5-triazolni uridinski derivat **49** s istom vjerojatnošću može egzistirati u dva tautomerna oblika (**a** i **b**, *Slika 14*) triazolnog prstena u otopini.



Slika 16. ^1H NMR spektar spoja **49** u $\text{DMSO-}d_6$.

^1H NMR spektar spoja **49**, osim proširenih signala protona NH skupina [15,06 (bs, 1H, NH-1''), 11,65 (bs, 1H, NH-3)], sadrži i prošireni signal H-5'' protona triazolnog prstena ($\delta = 8,12$ ppm, *Slika 16*) što je indicija ravnoteže tautomernih oblika triazola u otopini $\text{DMSO-}d_6$.

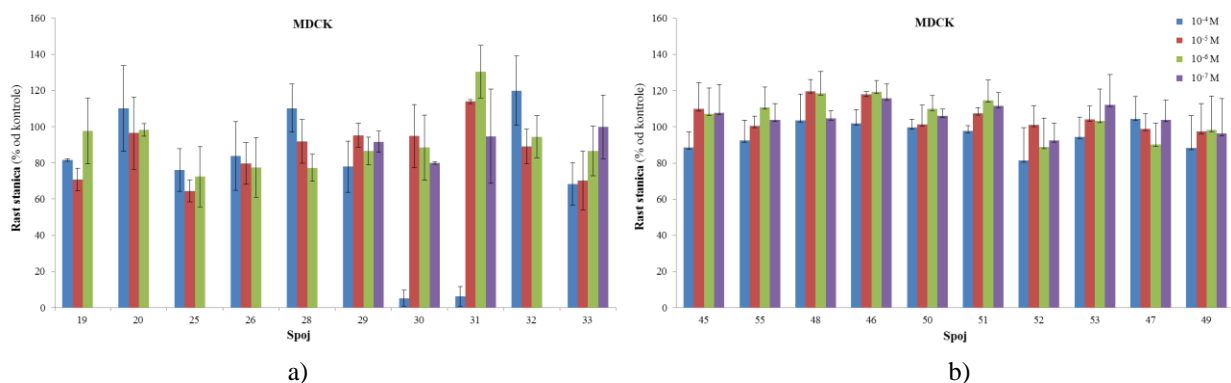
4.3.3. Rezultati protutumorske aktivnosti spojeva uracilne i uridinske serije

Novosintetizirani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati uracila odnosno uridina pokazali su jako, srednje jako, odnosno slabo antiproliferativno djelovanje, a neki derivati uopće ne pokazuju protutumorsku aktivnost s obzirom na korištenu staničnu liniju, koncentraciju i strukturu primijenjenog spoja. Svi testirani spojevi ispitivani su u rasponu koncentracija od $1 \cdot 10^{-4}$ do $1 \cdot 10^{-7}$ M.

Rezultati antiproliferativnog djelovanja C5-triazolnih derivata uracila na normalnim MDCK stanicama (*Slika 17. a*) pokazuju da u koncentraciji od 10^{-4} M N1'-benzilni derivat **30** i N1'-benzil acetatni derivat **31** inhibiraju rast stanica za više od 90 %. Ostali derivati uracilne serije (**19**, **25**, **26**, **28**, **29** i **33**) u najvećoj ispitanoj koncentraciji (10^{-4} M) imaju slabo izraženo inhibitorno djelovanje (6–31 %), a monosupstituirani C5-triazolni derivat uracila **20** i N1'-metoksietilenski derivat **32** uopće ne utječu na rast normalnih MDCK stanica. To ukazuje na

činjenicu da ispitani spojevi, osim derivata **30** i **31**, nisu izrazito citotoksični za normalne stanice. U nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) antiproliferativno djelovanje novოსintetiziranih derivata uracilne serije se smanjuje ($c = 10^{-5}$ M iznosi 3–35 %, $c = 10^{-6}$ M iznosi 1–27 %, $c = 10^{-7}$ M nema djelovanja).

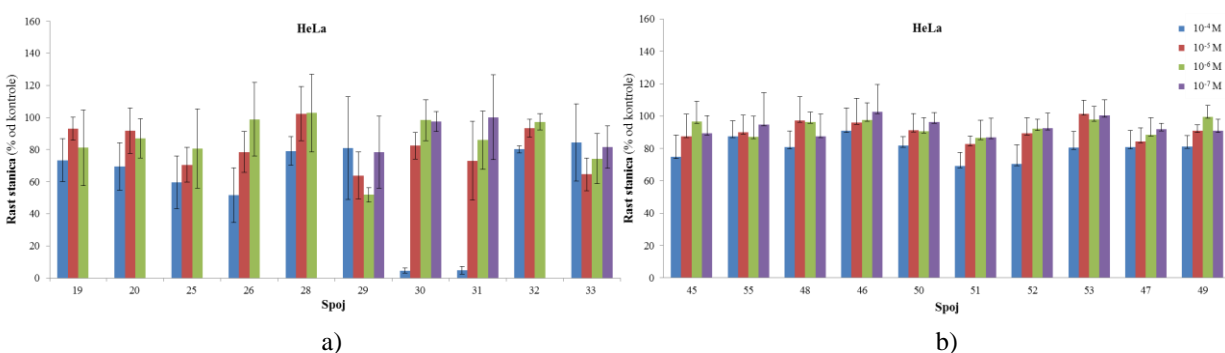
Antiproliferativno djelovanje derivata uridinske serije (*Slika 17. b*) slabo je izraženo i u koncentraciji od 10^{-4} M iznosi 0–20 %. U nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) slabo izraženu aktivnost (< 20 %) pokazuje samo ferocenski derivat **52** dok ostali spojevi (**45–51**, **53** i **55**) uopće ne utječu na rast normalnih MDCK stanica.



Slika 17. Učinak derivata: a) uracilne i b) uridinske serije na rast normalnih MDCK stanica.

Ispitivanje C5-triazolnih derivata uracila na staničnoj liniji adenokarcinoma grlića vrata maternice (HeLa) (*Slika 18. a*) pokazalo je da u koncentraciji od 10^{-4} M najjače djelovanje na rast tumorskih HeLa stanica imaju N1'-benzilni derivat **30** i N1'-benzil acetatni derivat **31** (inhibicija rasta > 95 %). Fleksimer **26** u koncentraciji od 10^{-4} M inhibira rast HeLa stanica za 48 % dok je djelovanje ostalih derivata (**19**, **20**, **25**, **28**, **29**, **32** i **33**) slabije izraženo (16–40 %). U nižim koncentracijama (10^{-5} i 10^{-6} M) inhibitorno djelovanje derivata uracilne serije na rast HeLa stanica je još manje izraženo ($c = 10^{-5}$ M iznosi 7–35 %, $c = 10^{-6}$ M iznosi 3–26 %). Pri tom u koncentraciji od 10^{-5} i 10^{-6} M derivat **28** nema djelovanje, a u koncentraciji 10^{-6} M utjecaj na rast stanica adenokarcinoma ne pokazuju ni fleksimer **26** niti N1'-benzilni derivat **30**. Najbolji rezultat inhibicije rasta HeLa stanica u koncentraciji 10^{-6} M pokazuje N1'-hidroksietilenski derivat **29** s gotovo 50 %-tnim učinkom.

Antiproliferativno djelovanje derivata uridinske serije (*Slika 18. b*) na rast HeLa stanica slabo je izraženo u koncentraciji od 10^{-4} M. Najjače djelovanje pokazuju N1"-benzilni derivat **51** i ferocenski derivat **52** s inhibicijom rasta stanica od oko 30 %, 5-etiniluridin **45** inhibira rast HeLa stanica za 25 % dok ostali spojevi (**46–50**, **53** i **55**) imaju još slabije izraženo antiproliferativno djelovanje (10–20 %). U nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) svi derivati uridinske serije imaju slabo inhibitorno djelovanje (< 15 %) na rast HeLa stanica.

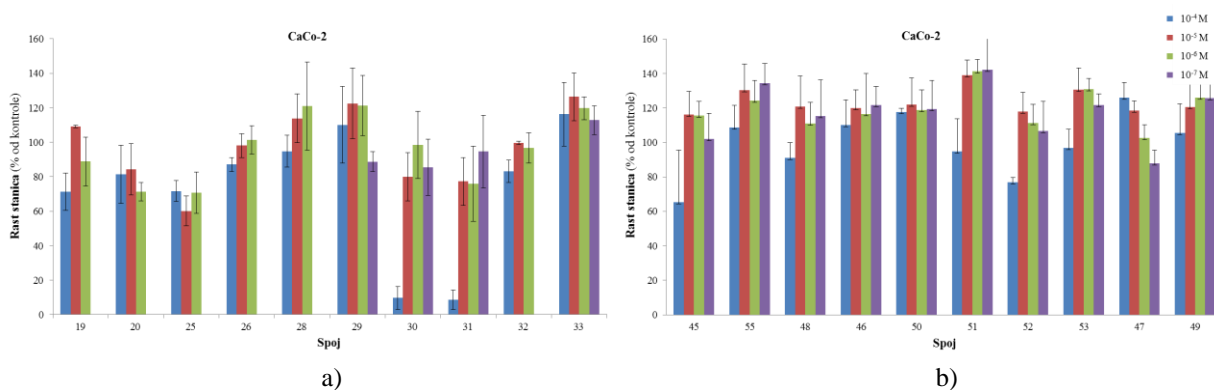


Slika 18. Učinak derivata: a) uracilne i b) uridinske serije na rast stanica adenokarcinoma grlića vrata maternice (HeLa).

Najbolje rezultate antiproliferativne aktivnosti derivata uracilne serije na rast stanica karcinoma debelog crijeva (CaCo-2) (*Slika 19. a*) u koncentraciji od 10^{-4} M ponovno pokazuju N1'-benzilni derivat **30** i N1'-benzil acetatni derivat **31** s inhibicijom rasta stanica većom od 90 % dok se aktivnost u nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) značajno smanjuje (< 24 %). Aktivnost ostalih derivata (**19**, **20**, **25**, **26**, **28** i **32**) u najvišoj koncentraciji (10^{-4} M) iznosi 5–29 % dok spojevi N1'-hidroksietilenski derivat **29** i ferocenski derivat **33** uopće ne pokazuju djelovanje. U nižoj koncentraciji (10^{-5} M) inhibitorna aktivnost derivata **20**, **26**, **30** i **31** je u intervalu 2–23 % dok ostali spojevi (**19**, **28**, **29**, **32** i **33**) ne pokazuju djelovanje na rast CaCo-2 stanica. Najbolji rezultat u koncentraciji 10^{-5} M daje fleksimer **25** s inhibicijom rasta od 40 %. U koncentraciji 10^{-6} M inhibitorno djelovanje derivata **19**, **20**, **25**, **31** i **32** je u intervalu 3–29 % dok drugi ispitani spojevi (**26**, **28**, **29**, **30** i **33**) nemaju djelovanje.

Djelovanje derivata uridinske serije (*Slika 19. b*) na rast stanica karcinoma debelog crijeva slabo je izraženo, a najbolji rezultat u koncentraciji od 10^{-4} M daju 5-etiniluridin **45** s inhibicijom rasta stanica od 35 % i ferocenski derivat **52** s inhibicijom rasta stanica od 25 %. Aktivnost ostalih

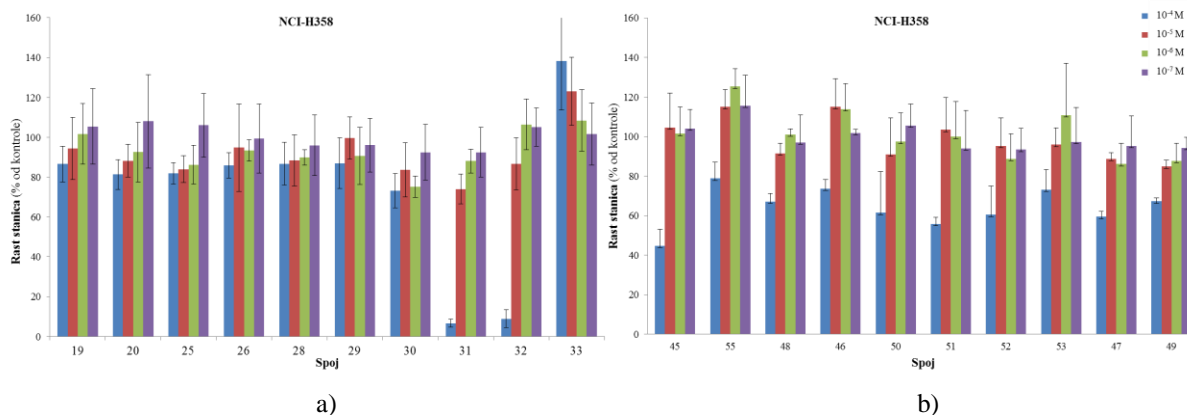
derivata manja je od 10 %, a većina, niti u jednoj od ispitanih koncentracija (10^{-4} – 10^{-7} M), ne pokazuje inhibitorno djelovanje na rast CaCo-2 stanica.



Slika 19. Učinak derivata: a) uracilne i b) uridinske serije na rast stanica karcinoma debelog crijeva (CaCo-2).

Rezultati ispitivanja inhibitorne aktivnosti derivata uracilne serije na rast stanica bronhioalveolarnog karcinoma pluća (NCI-H358) (Slika 20. a)) pokazuju da u koncentraciji od 10^{-4} M najjače djelovanje imaju N1'-benzil acetatni derivat **31** i N1'-metoksietilenski derivat **32** s inhibicijom rasta NCI-H358 stanica većom od 90 % dok se aktivnost u nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) značajno smanjuje (< 26 %). N1'-benzilni derivat **30** inhibira rast NCI-H358 stanica za 27 % u koncentraciji 10^{-4} M dok inhibitorna aktivnost ostalih derivata nije veća od 19 % i smanjuje se smanjenjem koncentracije.

Profil biološke aktivnosti derivata uridinske serije (Slika 20. b)) na rast NCI-H358 stanica je sličan. U najvišoj koncentraciji (10^{-4} M) imaju inhibitornu aktivnost u intervalu 25–55 %, a potom se aktivnost svih ispitanih derivata smanjuje smanjenjem koncentracije. Zaštićeni triazolni uridinski konjugat **46** i N1'-metoksietilenski derivat **55**, u svim nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) djeluju čak stimulatивно na rast NCI-H358 stanica.

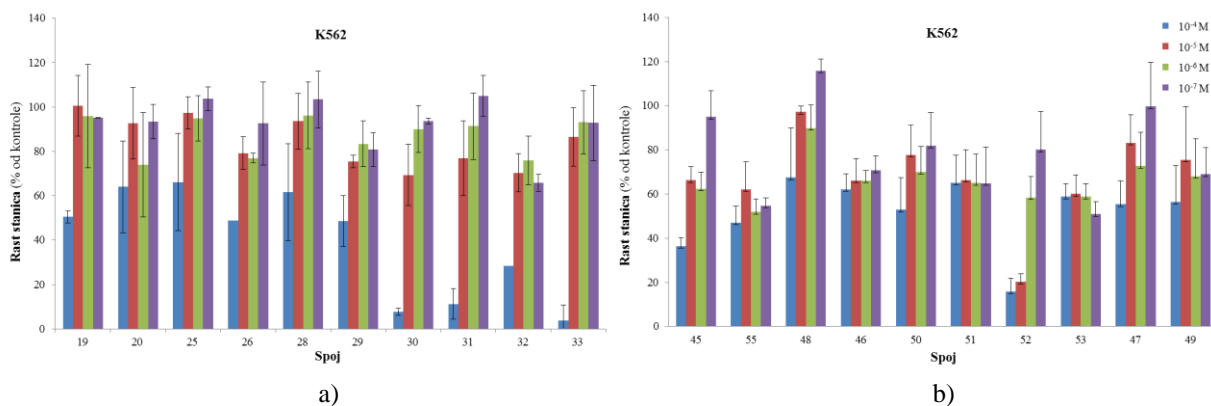


Slika 20. Učinak derivata: a) uracilne i b) uridinske serije na rast stanica bronhioalveolarnog karcinoma pluća (NCI-H358).

Aktivnost uracilnih derivata na rast stanica kronične mijeloidne leukemije u blastičnoj krizi (K562) (Slika 21. a)) u koncentraciji od 10^{-4} M najveća je za N1'-benzilni derivat **30**, N1'-benzil acetatni derivat **31** i ferocenski derivat **33** (inhibicija rasta stanica > 90 %), za N1'-metoksietilenski derivat **32** inhibicija iznosi 72 % dok ostali spojevi (**19**, **20**, **25**, **26**, **28** i **29**) pokazuju srednje jako inhibitorno djelovanje na rast K562 stanica (34–51 %). U koncentraciji od 10^{-5} M najjače inhibitorno djelovanje pokazuju N1'-benzilni derivat **30** (31 %) i N1'-metoksietilenski derivat **32** (30 %) dok je aktivnost ostalih derivata slabije izražena (3–25 %), a N1'-metilenpivalat **19** uopće nema djelovanja na rast K562 stanica. U nižoj koncentraciji (10^{-6} M) najveću inhibitornu aktivnost imaju monosupstituirani C5-triazolni derivat uracila **20** (26 %), fleksimer **26** (23 %) i N1'-metoksietilenski derivat **32** (24 %) dok je aktivnost ostalih derivata manja (4–17 %). U najnižoj koncentraciji (10^{-7} M) izdvajaju se N1'-hidroksietilenski derivat **29** s inhibicijom rasta K562 stanica od 19 % i N1'-metoksietilenski derivat **32** s inhibicijom rasta stanica od 34 % dok je aktivnost ostalih derivata izrazito mala.

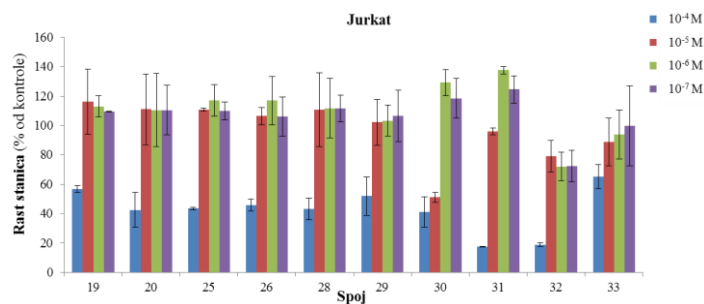
Kod derivata uridinske serije (Slika 21. b)) najveću aktivnost u koncentraciji od 10^{-4} M pokazuju 5-etiniluridin **45** (65 % inhibicije rasta stanica) i ferocenski derivat **52** (85 % inhibicije rasta stanica) dok je djelovanje ostalih spojeva slabije izraženo (35–55 % inhibicije rasta stanica). U nižoj koncentraciji (10^{-5} M) ponovno se izdvaja ferocenski derivat **52** s inhibicijom rasta stanica od 80 % dok je inhibitorno djelovanje ostalih derivata manje od 40 %. Aktivnost ispitanih derivata u koncentraciji od 10^{-6} M je 30–50 %, a nešto slabije djelovanje pokazuje POM-derivat **48** s inhibicijom rasta stanica od 10 %. U najnižoj koncentraciji (10^{-7} M) inhibicija rasta stanica

ne pokazuje trend sličnosti i ovisi isključivo o supstituentu na triazolnom prstenu, a najbolji rezultat daje N1''-benzil acetatni derivat **53** (50 % inhibicije rasta stanica) dok POM-derivat **48** pokazuje čak blagi stimulatívni učinak na rast K562 stanica.



Slika 21. Učinak derivata: a) uracilne i b) uridinske serije na rast stanica kronične mijeloidne leukemije u blastičnoj krizi (K562).

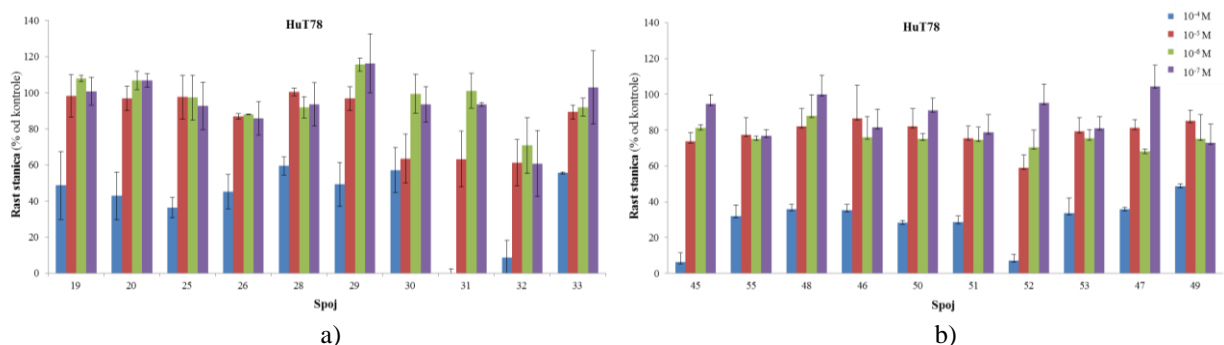
Antiproliferativna aktivnost na leukemije T-stanica (Jurkat stanična linija) ispitana je samo za derivate uracilne serije (Slika 22). Rezultati pokazuju srednje jako inhibitorno djelovanje ispitanih derivata na rast Jurkat stanica u koncentraciji od 10^{-4} M (35–59 % inhibicije rasta stanica) s jače izraženim djelovanjem N1'-benzil acetatnog derivata **31** i N1'-metoksietilenskog derivata **32** (> 80 % inhibicije rasta stanica). U nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) većina spojeva ne pokazuje inhibitorni nego stimulatívni učinak na rast Jurkat stanica, a iznimka su N1'-benzilni derivat **30**, N1'-metoksietilenski derivat **32** i ferocenski derivat **33** koji u koncentraciji od 10^{-5} M pokazuju inhibitorno djelovanje na rast stanica od 49, 21 odnosno 11 %. U koncentraciji od 10^{-6} i 10^{-7} M N1'-metoksietilenski derivat **32** pokazuje 28 %-tni inhibitorni učinak.



Slika 22. Učinak derivata uracilne serije na rast leukemije T-stanica (Jurkat).

Ispitivanjem aktivnosti derivata uracilne serije na rast limfom T-stanica (HuT 78) (Slika 23. a)) dobiveni su rezultati koji pokazuju da najjače djelovanje u koncentraciji od 10^{-4} M imaju N1'-benzil acetatni derivat **31** (100 %-tna inhibicija rasta stanica) i N1'-metoksietilenski derivat **32** (91 % inhibicije rasta stanica). Inhibitorna aktivnost ostalih derivata iznosi 41–64 %. U nižoj koncentraciji (10^{-5} M) izdvajaju se derivati N1'-benzilni derivat **30**, N1'-benzil acetatni derivat **31** i N1'-metoksietilenski derivat **32** s inhibicijom od oko 40 % dok je inhibitorna aktivnost ostalih derivata manja od 13 %. U najnižim koncentracijama (10^{-6} i 10^{-7} M) ističe se samo N1'-metoksietilenski derivat **32** s inhibicijom rasta stanica od 29 % odnosno 39 %, a aktivnost ostalih derivata je slabo izražena.

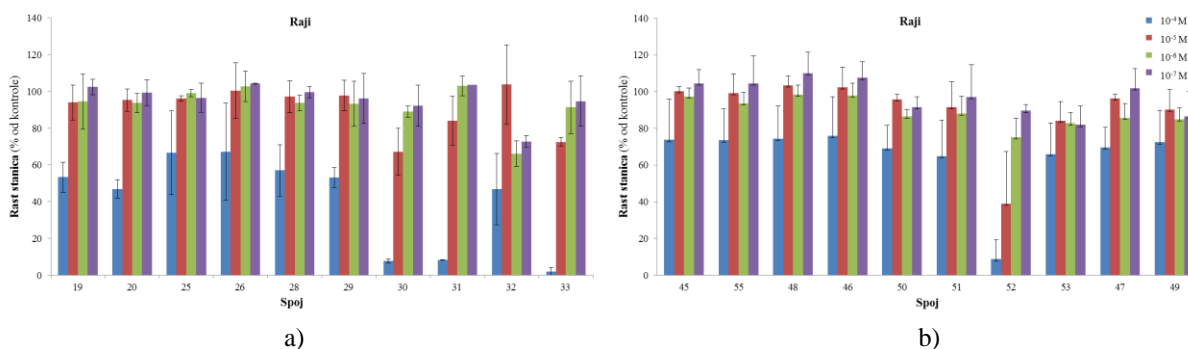
Uridinska serija spojeva (Slika 23. b)) pokazuje sličan trend inhibitornog djelovanja na rast HuT 78 stanica pri čemu se u koncentraciji od 10^{-4} M izdvajaju 5-etiniluridin **45** i ferocenski derivat **52** s najvećom inhibicijom rasta stanica (> 90 %) dok je aktivnost drugih derivata nešto manja (50–75 % inhibicije rasta stanica). U nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) inhibitorno djelovanje svih derivata na rast HuT 78 stanica je manje od 30 %.



Slika 23. Učinak derivata: a) uracilne i b) uridinske serije na rast limfoma T-stanica (HuT 78).

Antiproliferativno djelovanje derivata uracilne serije na rast stanica Burkittovg limfoma (Raji) (Slika 24. a)) je srednje jako izraženo. U koncentraciji od 10^{-4} M izdvajaju se N1'-benzilni derivat **30**, N1'-benzil acetatni derivat **31** i ferocenski derivat **33** s inhibicijom rasta stanica većom od 90 % dok je aktivnost ostalih derivata slabije izražena (33–53 % inhibicije). U nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) antiproliferativna aktivnost svih ispitanih derivata manja je od 10 % osim derivata **30** čija inhibitorna aktivnost u koncentraciji 10^{-5} M iznosi 33 % i derivata **33** s 28 %-tnim inhibitornim učinkom.

Inhibitorno djelovanje derivata uridinske serije (*Slika 24. b*) na rast Raji stanica slabo je izraženo, a od svih ispitanih derivata u koncentraciji od 10^{-4} i 10^{-5} M izdvaja se ferocenski derivat **52** s nešto jačom inhibitornom aktivnošću na rast Raji stanica (90 % odnosno 60 %). Antiproliferativna aktivnost ostalih derivata u koncentraciji od 10^{-4} M nije veća od 35 %, a bilježi i trend smanjenja sa smanjenjem koncentracije.



Slika 24. Učinak derivata: a) uracilne i b) uridinske serije na rast stanica Burkittovog limfoma (Raji).

4.3.4. Odnos strukture i biološke aktivnosti C5 supstituiranih triazolnih derivata uracilne i uridinske serije

Promatramo li odnos aktivnosti spojeva uracilne i uridinske serije, možemo zaključiti sljedeće:

- Novosintetizirani spojevi iz uracilne serije (fleksimeri i C5-triazolni derivati uracila) nisu izrazito citotoksični (0–30 %) za normalne MDCK stanice (10^{-4} – 10^{-7} M) izuzevši N1'-benzilni derivat uracila **30** i N1'-benzil acetatni derivat uracila **31**, koji samo u najvišoj koncentraciji (10^{-4} M) inhibiraju rast MDCK stanica za više od 90 %.
- Novosintetizirani spojevi iz uridinske serije (uridinski konjugati i C5-triazolni derivati uridina) nisu citotoksični za normalne MDCK stanice u svim ispitivanim koncentracijama (10^{-4} – 10^{-7} M)
- Općenito možemo reći da je antiproliferativno djelovanje spojeva uridinske serije na stanice humanih karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358) slabo izraženo dok iz uracilne serije neki spojevi imaju aktivnost. Suprotno je u slučaju antiproliferativnog djelovanja

na stanice leukemija (K562 i Jurkat) i stanice limfoma (HuT 78) gdje uridinska serija pokazuje bolje djelovanje od uracilne serije.

Ako usporedimo supstituente na N1' položaju triazola kod uracilne serije odnosno na N1" položaju triazola kod uridinske serije i njihove biološke rezultate, vidljivo je sljedeće:

- N1' slobodni triazolni derivat uracila **20** ne pokazuje značajnu inhibitornu aktivnost u koncentracijama 10^{-5} – 10^{-7} M niti na jednoj od ispitivanih staničnih linija. Isto tako se ponaša i N1" slobodni triazolni derivat uridina **49** na normalnim MDCK stanicama i na stanicama humanih karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358). Međutim, uridinski derivat **49** pokazuje interesantnu, ujednačenu inhibiciju (40 %) rasta stanica leukemija K562 u svim koncentracijama (10^{-4} – 10^{-7} M).
 - Kod uracilnih fleksimera **25** i **26** i uridinskih konjugata **46** i **47** gdje je u N1' odnosno N1" položaju triazola vezana riboza, spojevi uridinske serije nemaju antiproliferativno djelovanje na normalne MDCK stanice niti na stanice humanih karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358). Uridinski konjugat **46** pokazuje ujednačenu inhibiciju od 40 % na stanicama leukemije (K562) u svim koncentracijama, dok uridinskom konjugatu **47**, sa slobodnim OH skupinama riboze, opada inhibicija (50–0 %) smanjenjem koncentracije (10^{-4} – 10^{-7} M). Suprotno, uracilni fleksimeri **25** i **26** ne pokazuju aktivnost na stanicama leukemija i limfoma, ali izdvajamo uracilni fleksimer **25** s 40 %-tnom inhibicijom rasta CaCo-2 stanica (10^{-5} M).
 - Pivaloiloksimetilni derivati **19** kod uracila i **48** kod uridina te etil acetatni derivati **28** kod uracila i **50** kod uridina nisu citotoksični za normalne MDCK stanice, stanice humanih karcinoma niti pokazuju inhibiciju na stanicama leukemija i limfoma u svim ispitivanim koncentracijama.
 - Uočeno je da spojevi koji za supstituent na N1'/N1" položaju triazola imaju aromat ili metoksietilensku/hidroksietilensku skupinu daju interesantne rezultate inhibicije.
- Spojevi uracilne serije*, N1'-benzilni derivat **30** i N1"-benzil acetatni derivat **31** pokazuju izrazitu citotoksičnost (> 90 %) u koncentraciji od 10^{-4} M, na većini ispitanih staničnih linija. Iznimka su stanične linije NCI-H358, HuT 78 i Jurkat. N1'-benzilni derivat **30** pokazuje 50 %-tnu inhibiciju rasta Jurkat stanica u koncentraciji od 10^{-5} M, a najbolji

rezultat s 50 %-tnim učinkom inhibicije HeLa stanica pokazuje N1'-hidroksietilenski derivat **29** (10^{-6} M).

N1'-metoksietilenski derivat **32** u najvećoj koncentraciji (10^{-4} M) pokazuje jaku inhibiciju rasta NCI-H358 (> 90 %), K562 (72 %), Jurkat (> 80 %) i HuT 78 (91 %) stanica.

U nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M) ističe se derivat **30** s 50–30 %-tnom inhibicijom rasta stanica leukemije (Jurkat) i limfoma (HuT 78 i Raji).

Spojevi uridinske serije, N1"-benzilni derivat **51**, N1"-benzil acetatni derivat **53** i N1"-metoksietilenski derivat **55** nisu citotoksični za normalne MDCK stanice ni za stanice humanih karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358) u svim ispitivanim koncentracijama (10^{-4} – 10^{-7} M).

Međutim, značajno antiproliferativno djelovanje na rast leukemijskih K562 stanica pokazuju N1"-benzil acetatni derivat **53** i N1"-metoksietilenski derivat **55** s 50 %-tnom inhibicijom i N1"-benzilni derivat **51** s 40 %-tnom inhibicijom u svim koncentracijama (10^{-4} – 10^{-7} M).

- Ferocenski derivati uracila **33** i uridina **52** nemaju antiproliferativno djelovanje na normalne MDCK stanice ni na stanice humanih karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358). Ferocenski derivat uracila **33** inhibira rast K562 i Raji stanica za više od 90 % i pokazuje 40 %-tnu inhibiciju rasta Jurkat i HuT 78 stanica, ali samo u najvišoj koncentraciji (10^{-4} M).

Uridinski ferocenski derivat **52** ima jaku inhibiciju rasta HuT 78 stanica (> 90 %) u koncentraciji od 10^{-4} M koja se smanjuje na 30–10 % smanjenjem koncentracije (10^{-5} – 10^{-7} M). Slični rezultati dobiveni su i na Raji staničnoj liniji s inhibicijom rasta 90–40 % (10^{-4} – 10^{-6} M), no ovdje treba istaknuti da je to jedini spoj iz uridinske serije koji pokazuje antiproliferativno djelovanje na rast stanica Burkittovog limfoma (Raji). Najbolji rezultati dobiveni su na K562 stanicama gdje ferocenski derivat **52** ima jaku inhibiciju (80–85 %) u koncentracijama 10^{-4} – 10^{-5} M i 40 %-tnu inhibiciju u koncentracijama 10^{-6} – 10^{-7} M.

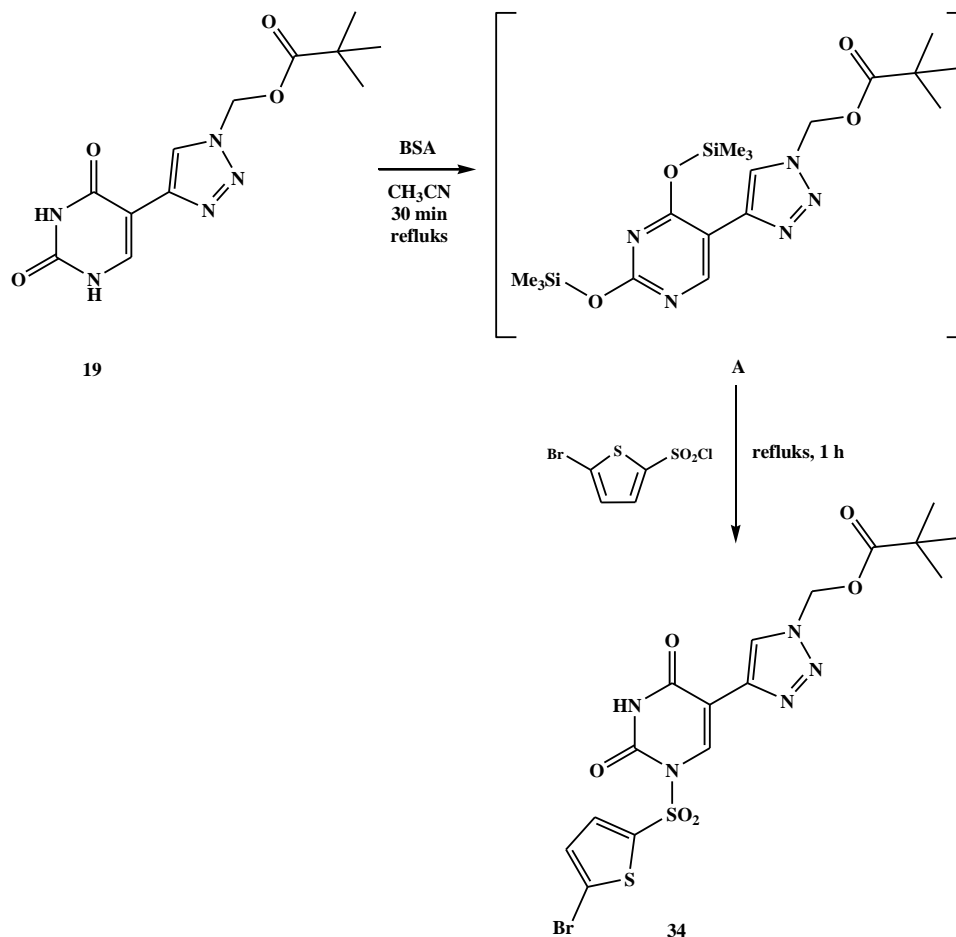
4.4. *N*-1-sulfoniluracilni C5 supstituirani 1,2,3-triazolni derivati

Nedavno su u našem laboratoriju kombinacijom dviju zasebno biološki aktivnih komponenti, fragmenta sulfonilciclouree i pirimidinske baze, sintetizirani novi *N*-1-sulfonilpirimidinski derivati,^{289,290,2} koji su pokazali značajnu protutumorsku aktivnost u *in vitro* i *in vivo* uvjetima.^{1,5} U usporedbi s 5-FU, kod nekih je derivata dokazan deset puta snažniji inhibicijski učinak na stanice tumora dok je djelovanje na normalne humane stanice bilo značajno manje. Pokazano je da ovi spojevi inhibiraju aktivnost nekih enzima koji sudjeluju u sintezi DNA i RNA kao i u *de novo* sintezama pirimidina i purina,^{3,4} a neki od njih su pokazali i mogućnost indukcije apoptoze u tretiranim tumorskim stanicama.^{3,4} *In vivo* eksperimenti pokazali su da *N*-sulfonilcitozinski derivati pokazuju značajnu protutumorsku aktivnost na modelu mišjeg karcinoma,⁵ a napravljena su i dodatna ispitivanja mehanizma djelovanja ovih spojeva i toksikološka ispitivanja.^{6,7}

Kao nastavak istraživanja u ovom području odlučili smo pripremiti i *N*-1-sulfoniluracilne C5 supstituirane 1,2,3-triazolne derivate kao novu seriju spojeva. Obzirom da su C5 supstituirani 1,2,3-triazolni derivati uracilne serije pokazali biološku aktivnost, njihovom dodatnom strukturnom modifikacijom uvođenjem nove biološki aktivne komponente, sulfonilnog fragmenta, očekivali smo i zanimljive biološke odgovore. Osim toga, značajan interes za sintezu ove serije spojeva potaknula je i činjenica da se oni strukturno razlikuju od analognih 1,2,3-triazolnih derivata uridinske serije samo u domeni šećera. Naime, šećerna je komponenta zamijenjena sulfonilnim supstituentom pa je stoga i u tom pogledu zanimljivo usporediti biološke odgovore strukturnih analoga.

4.4.1. Metode sinteze C5-triazolnih *N*-1-sulfoniluracilnih derivata

U svrhu sinteze željenih C5-triazolnih *N*-1-sulfoniluracilnih derivata ispitane su različite metode kondenzacije kako bi se pronašli optimalni uvjeti pripreme. Primjenom metode razvijene u našem laboratoriju najprije je provedena reakcija kondenzacije derivata **19** s 5-bromtiofen-2-sulfonil kloridom (Metoda 1) (*Shema 11*). Za aktivaciju nukleobaze upotrijebljen je *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamid (BSA) u acetonitrilu.



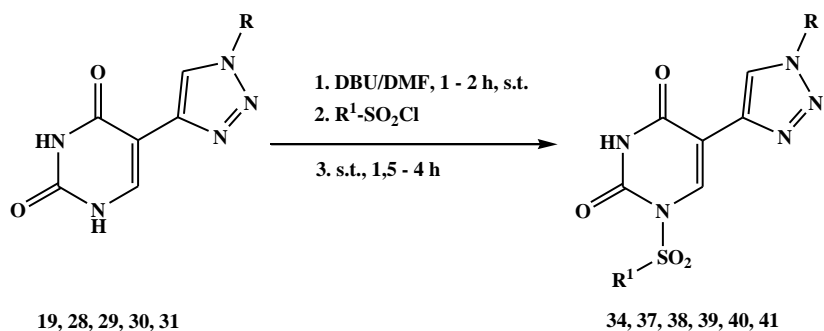
Shema 11. Sintetski put priprave C5-triazolnog *N*-1-sulfoniluracilnog derivata **34** metodom sililiranja s BSA.

Prednost metode sililiranja s BSA je u tome što dodatkom sililirajućeg reagensa u acetonitrilu nastali hidrolitički nestabilan međuprodukt **A** (*Shema 11*) nije potrebno izolirati, već se u nastalu otopinu ohlađenu na 0 °C izravno dodaje 5-bromtiofen-2-sulfonil klorid i zatim se reakcijska smjesa refluksira 1 h. U slučaju upotrebe HMDS-a kao sililirajućeg reagensa, višak reagensa koji je ujedno i otapalo morao bi se ukloniti prije dodatka propargil bromida. Za to vrijeme nestabilni 2,4-disililpirimidin mogao bi hidrolizirati s vlagom iz zraka.

Metodom sililiranja s BSA pripravljen je derivat **34** u vrlo slabom iskorištenju (15 %) te je stoga njegova sinteza provedena uz drugačiju aktivaciju nukleobaze, metodom kondenzacije s DBU-om u DMF-u na sobnoj temperaturi (Metoda 2).

Ovom metodom postignuto je dobro reakcijsko iskorištenje (70 %) te je ona primijenjena i kod sinteze drugih C5-triazolnih *N*-1-sulfoniluracilnih derivata **37**, **38**, **39** i **41** (Tablica 6) s aromatskim (*p*-toluensulfonilnim) i heteroaromatskim (5-bromtiofen-2-sulfonilnim) supstituentom na *N*-1-sulfonilnoj grupi.

Tablica 6. C5-triazolni *N*-1-sulfoniluracilni derivati.



Spoj	R	R ¹	Iskorištenje (%)
34			70
37			90
38			59
39			35
40			92
41			86

a H₂ Pd/C, CH₂Cl₂/MeOH

C5-triazolni *N*-1-sulfoniluracilni derivati **34**, **37**, **38** i **41** dobiveni su u dobrim reakcijskim iskorištenjima, jednostavnom izolacijom produkata uglavnom kristalizacijom iz metanola, a iznimku čini spoj **39** koji je dobiven u nešto nižem iskorištenju. To objašnjavamo činjenicom da je 5-bromtiofen-2-sulfonil klorid nestabilan reagens koji se raspada u primijenjenim uvjetima reakcije.

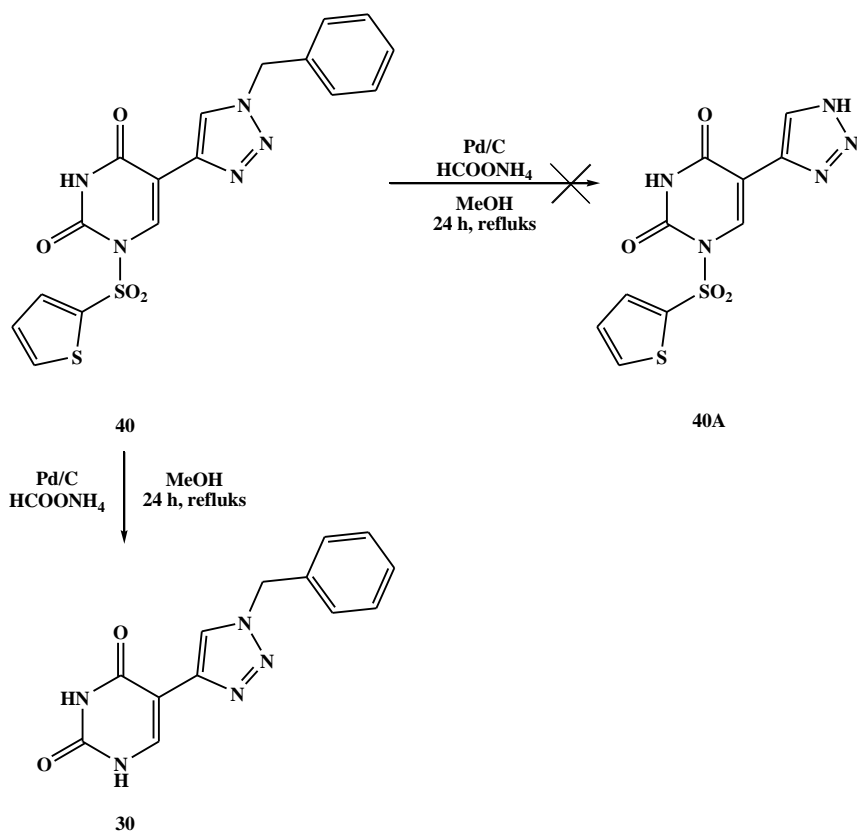
Hydrogenolizom derivata **39** uz katalizator Pd/C pri sobnoj temperaturi nije uklonjena benzilna zaštita (ni nakon primjene više temperature, tlaka i vremena hidrogeniranja) već je samo eliminiran brom iz tiofena i dobiven je produkt **40** u 92 %-tnom iskorištenju.

4.4.2. Priprava N1' slobodnih C5-triazolnih N-1-sulfoniluracilnih derivata

U nastavku rada željeli smo ukloniti supstituente na N1' položaju i tako prirediti C5-triazolne N-1-sulfoniluracilne derivate sa slobodnom NH skupinom u triazolnom prstenu.

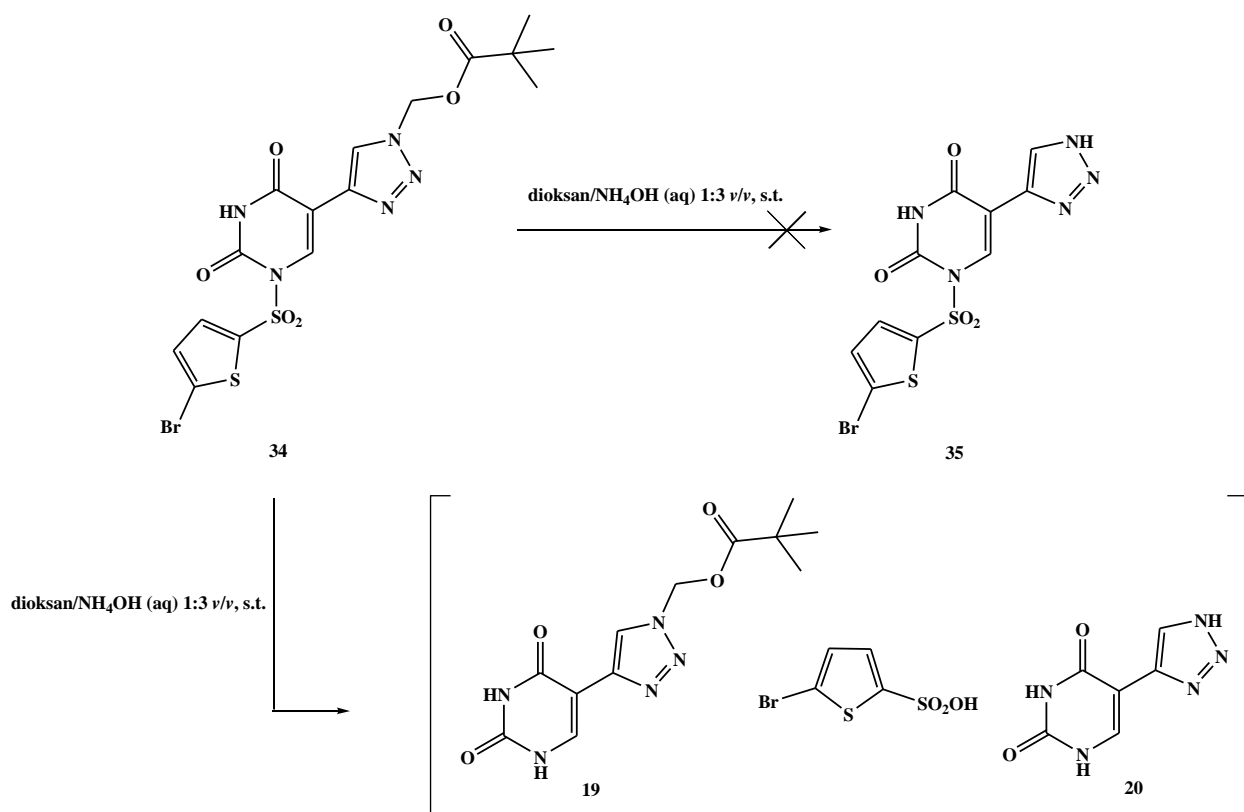
Uklanjanje N-benzilne skupine, za razliku od O-benzilne grupe, ponekad je otežano ili jednostavno ne ide uz hidrogeniranje s vodikom uz Pd/C kao katalizator. S druge strane, poznato je da se razne dvostruke veze ugljik-ugljik u olefinima i α,β -nezasićenim ketonima učinkovito reduciraju koristeći amonijev formijat kao sredstvo prijenosa vodika u prisustvu Pd/C katalizatora u refluksirajućem metanolu.²⁹¹ Isto tako transfer hidrogeniranje korištenjem Pd/C katalizatora uz mravlju kiselinu daje brzo i jednostavno uklanjanje O-benzilnih skupina ugljikohidrata.²⁹²

Kako bismo uklonili benzilnu zaštitnu skupinu odabrali smo tiofenski derivat **40**, dobiven hidrogenolizom bromtiofenskog derivata **39**, te smo proveli transfer hidrogeniranje uz amonijev formijat i katalizator Pd/C (*Shema 12*). Međutim, u primijenjenim reakcijskim uvjetima nije došlo do uklanjanja zaštitne grupe već do pucanja N-S veze te je iz reakcijske smjese izoliran derivat **30** u kvantitativnom iskorištenju. Ovo potvrđuje nestabilnost N-S veze u danim reakcijskim uvjetima kao i nemogućnost uklanjanja N-benzilne skupine s N1' triazola.



Shema 12. Pokušaj priprave derivata **40A** deprotekcijom N1' položaja triazola **40**.

Kako redukcijom derivata **40** nije dobiven željeni produkt **40A**, odlučili smo provesti reakciju deprotekcije pivaloiloksimetil derivata **34** (Shema 13) analognom metodom kojom je dobiven slobodni 5-triazoliluracil **20** (Shema 6). Ovim sintetskim pristupom u više pokušaja u kraćem (1 h) odnosno dužem (4 h) vremenu reakcije također nije dobiven željeni spoj **35**, a na TLC-pločici uočen je niz mrlja od kojih dvije prema R_f vrijednostima odgovaraju pivaloiloksimetilnom derivatu **19** i slobodnom 5-triazoliluracilnom derivatu **20**. Izolirana je i 5-bromtiofen-2-il sulfonska kiselina (potvrda ¹H NMR-om) što potvrđuje da ni u bazičnim uvjetima ove reakcije N-S veza nije stabilna i da prvo dolazi do njenog pucanja.

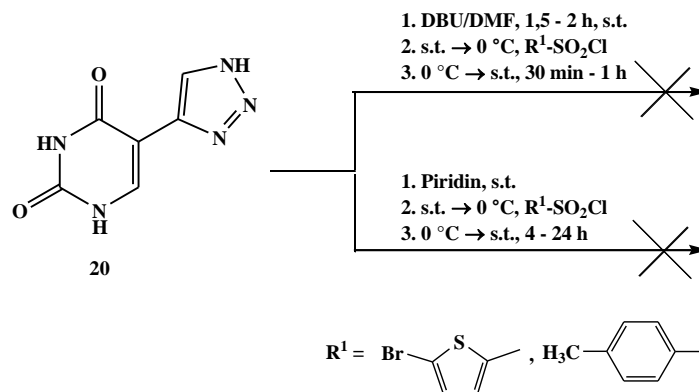


Shema 13. Pokušaj pripreve derivata **35** deprotekcijom spoja **34**.

Na temelju stečenih iskustava deprotekcije N1' položaja triazola zaključili smo da N-S veza u primijenjenim reakcijskim uvjetima nije stabilna te jednom izolirani N1' supstituirani triazolni derivati *N*-1-sulfoniluracila nisu pogodni za daljnju modifikaciju.

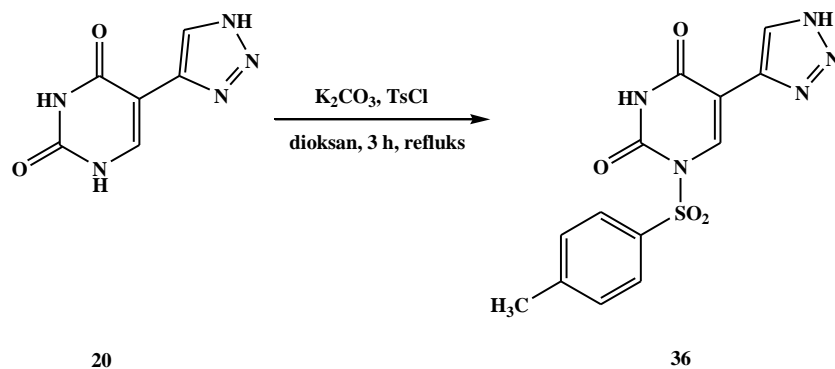
Stoga je za sintezu željenih N1' slobodnih triazolnih derivata supstituiranih sulfonilnim fragmentima u položaju N1 upotrijebljen drugi sintetski pristup. Provedene su reakcije kondenzacije sa slobodnim 5-triazoliluracilnim derivatom **20**, uz 5-bromtiofen-2-sulfonil klorid i *p*-toluensulfonil klorid (TsCl) uz upotrebu različitih baza. Za očekivati je da se sulfonilni supstituenti vežu na N1 položaj uracila, ali postoji i mogućnost vezivanja na N3 položaj uracila ili N1' položaj triazola.

U reakciji kondenzacije sa slobodnim 5-triazoliluracilnim derivatom **20** i spomenutim sulfonil kloridima (*Shema 14*) uz relativno slabu bazu piridin ili uz DBU u oba slučaja izoliran je ishodni spoj **20** (> 70 %), a tankoslojnom kromatografijom uočene su mrlje sulfonilnih reagensa kao i njihovi raspadni produkti, odgovarajuće sulfonske kiseline.



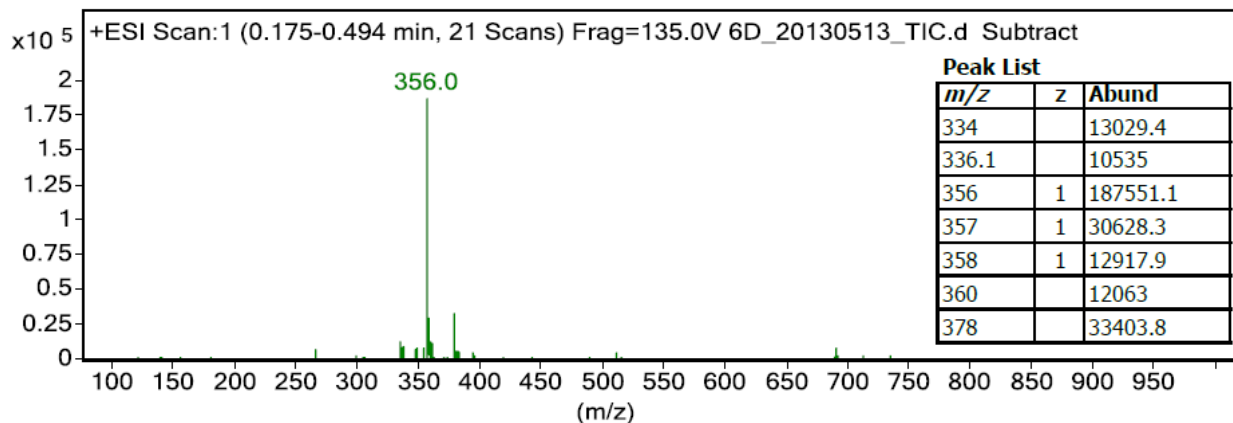
Shema 14. Pokušaj priprave derivata *N*-1-sulfonilnih derivata **35** i **36**.

Pod tim uvjetima, iako su reakcije provedene na sobnoj temperaturi u strogo bezvodnim uvjetima, s vremenom dolazi do raspada reagensa. Međutim, možda i nastaju željeni produkti koji se zatim u bazičnim uvjetima hidroliziraju u ishodni spoj **20** i odgovarajuće sulfonske kiseline. Proveden je pokus kondenzacije slobodnog 5-triazoliluracila **20** s TsCl uz jaku bazu K₂CO₃ u dioksanu odnosno DMF-u (*Shema 15*).



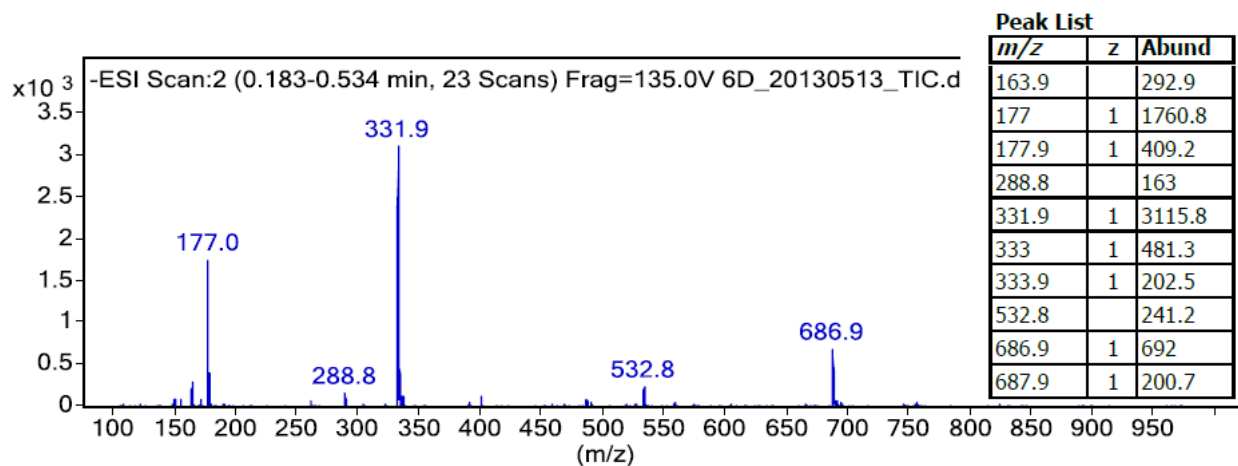
Shema 15. Kondenzacija N1' slobodnog triazola **20** s TsCl-om i priprava derivata **36**.

Kondenzacijom u dioksanu na temperaturi refluksa kroz 3 h na TLC-pločici uočena je jedna nova mrlja. ESI-MS analizom izoliranog produkta dobiven je maseni spektar spoja **36** tj. asigniran je pik pri *m/z* 356 koji odgovara aduktu [M+Na]⁺ (*Slika 25*).



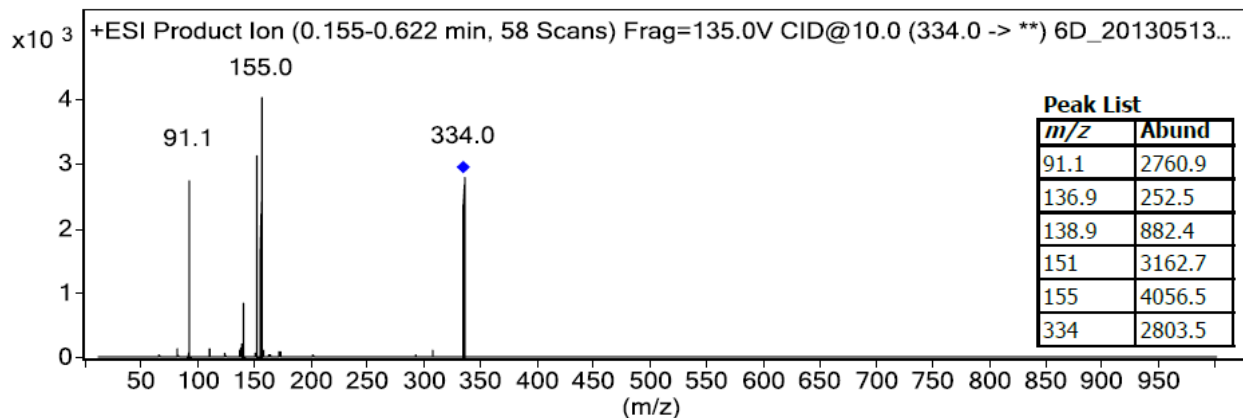
Slika 25. ESI-MS spektar spoja **36** u pozitivnom modu snimljen u MeOH (TIC kromatogram).

Na masenom spektru spoja **36** u negativnom modu (Slika 26) asigniran je pik pri m/z 332 koji odgovara aduktu $[M-H]^-$ i pik pri m/z 687 koji odgovara aduktu $[M_2+Na]^-$.

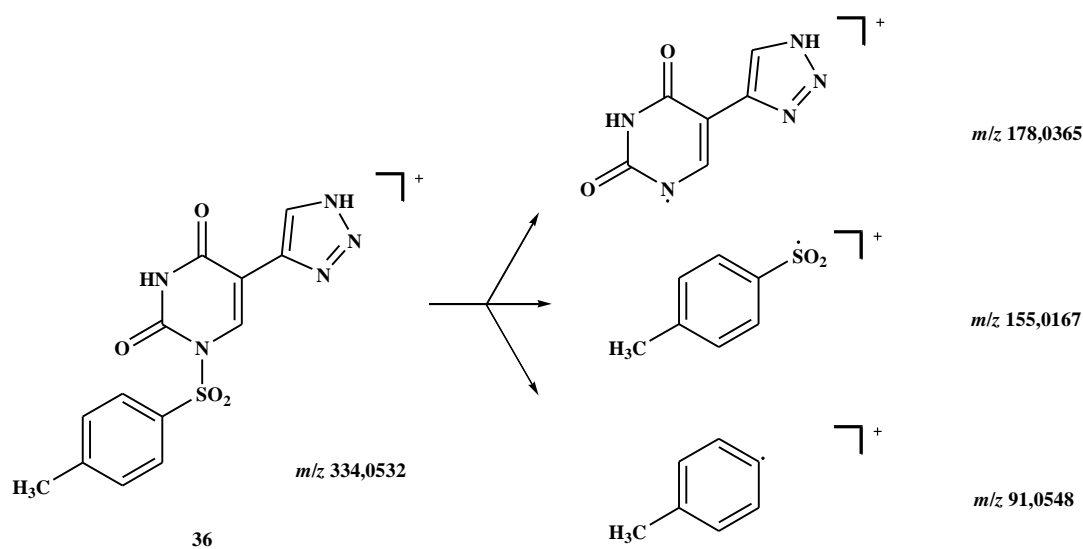


Slika 26. ESI-MS spektar spoja **36** u negativnom modu snimljen u MeOH (TIC kromatogram).

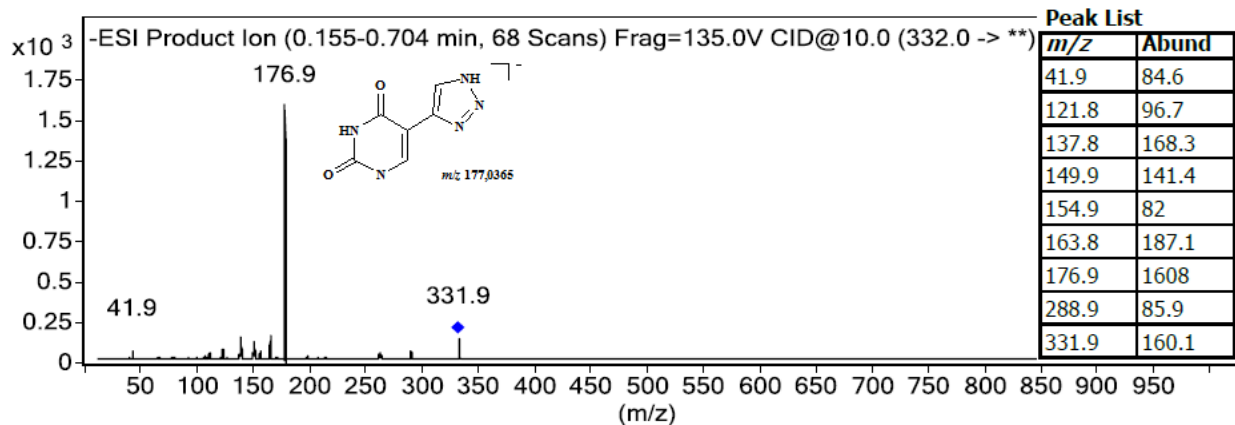
Spektar produkt iona snimljen u pozitivnom modu (m/z 334) asigniran je kao $[M+H]^+$ adukt (Slika 27) i daje još dva značajnija signala (m/z 155 i m/z 91) za koje se na temelju spektra pretpostavlja da odgovaraju fragmentima prikazanima na Shemi 16.



Slika 27. Spektar produkt iona (m/z 334) koji je asigniran kao $[M+H]^+$ adukt (pozitivan mod).



Shema 16. Moguća fragmentacija spoja **36** pretpostavljena na temelju spektra produkt iona (m/z 334).

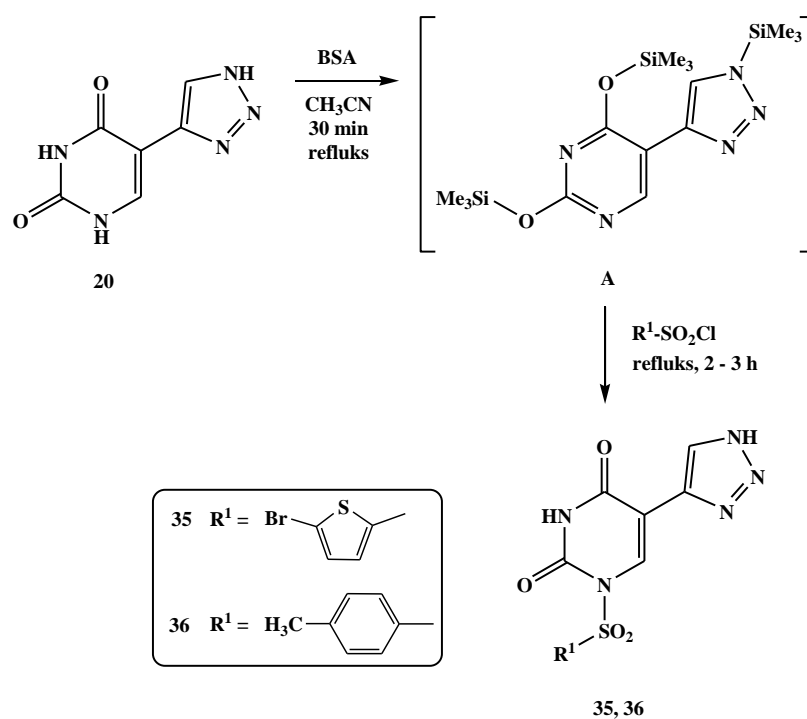


Slika 28. Spektar produkt iona (m/z 332) koji je asigniran kao $[M-H]^-$ adukt (negativan mod).

Spektar produkt iona snimljen u negativnom modu (m/z 332) asigniran je kao $[M-H]^-$ adukt (Slika 28) i daje još jedan značajan signal (m/z 177) za koji se na temelju spektra pretpostavlja da odgovara fragmentu prikazanom na Slici 28.

Obzirom da je iz reakcijske smjese u dioksanu izolirano više od 50 % neizreagirano polaznog spoja **20** reakcija je ponovljena u DMF-u. Tako je postignuta homogena reakcijska smjesa i izoliran je produkt **36** u 11 %-tnom iskorištenju (Metoda 1). Uzimajući u obzir činjenicu da se u trenutku prekida reakcije na TLC-pločici nisu vidjeli tragovi polaznog spoja **20** pretpostavka koja može objasniti nisko reakcijsko iskorištenje je da se nastali produkt raspada tijekom obrade reakcijske smjese. Tome u prilog govori i činjenica o nestabilnosti N-S veze što je potvrđeno iz ranije opisanih metoda pripreve N1' slobodnih N-1-sulfoniluracilnih 1,2,3-triazolnih derivata.

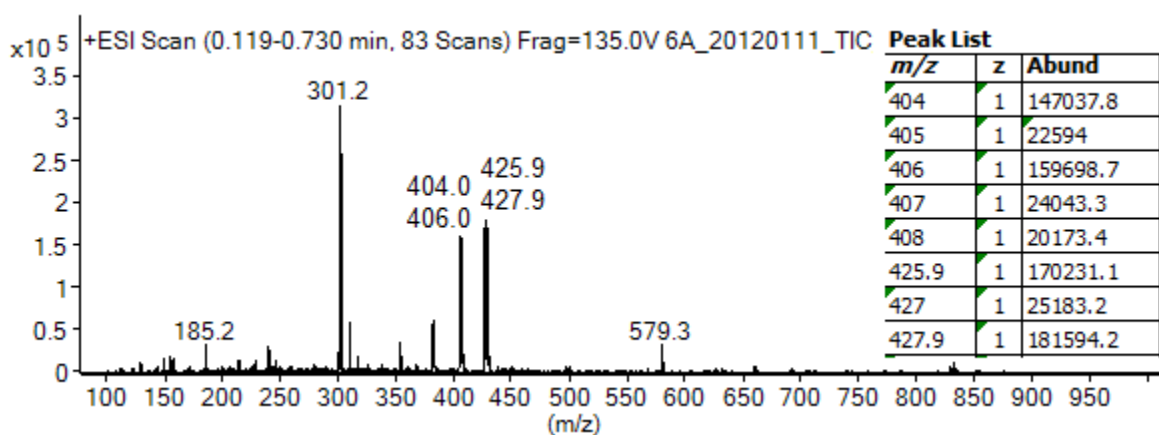
Kako bismo postigli bolje iskorištenje primjenili smo i kondenzacijsku metodu uz BSA reagens (Shema 17).



Shema 17. Sintetski put pripreve derivata **35** i **36** sililnom metodom uz BSA.

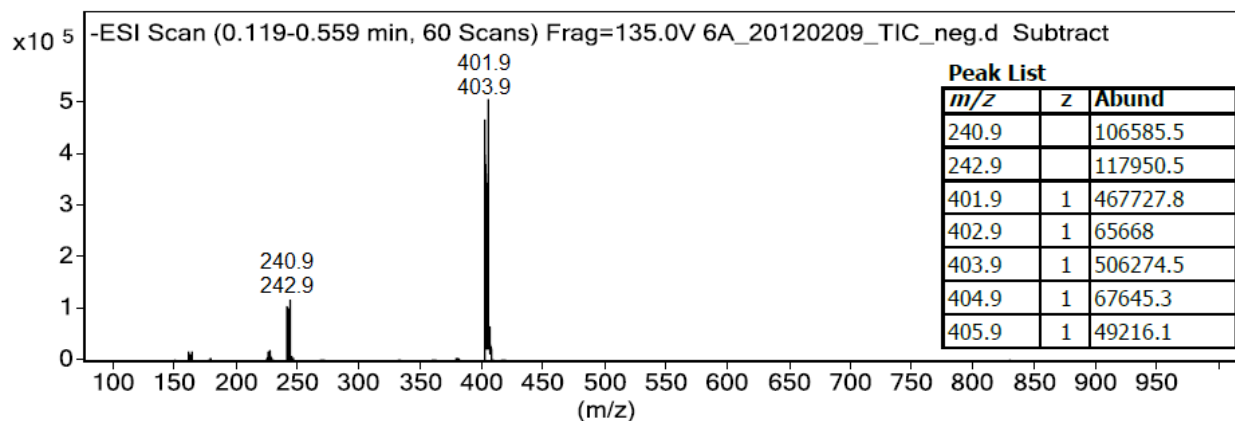
Ovom metodom iz reakcijske smjese nakon 3 h refluksa izolirano je 75 % polaznog triazola **20** i 6 % produkta **35**. Analogno je provedena i reakcija kondenzacije s TsCl te je iz reakcijske smjese izolirano 65 % polaznog spoja **20** i 8 % produkta **36** (Metoda 2).

ESI-MS analizom izoliranog dijela dobiven je maseni spektar spoja **35** tj. asigniran je pik pri m/z 404 koji odgovara aduktu $[M+H]^+$ i pik pri m/z 426 koji odgovara aduktu $[M+Na]^+$ (Slika 29). Obzirom da spoj u strukturi sadrži brom, a izotopna raspodjela broma je ^{79}Br 50,67 % i ^{81}Br 49,31 % u masenom spektru vidimo oba masena iona (m/z 404 i 406 kao i m/z 426 i 428).



Slika 29. ESI-MS spektar spoja **35** u pozitivnom modu snimljen u MeOH (TIC kromatogram).

Na masenom spektru spoja **35** u negativnom modu (Slika 30) asigniran je pik pri m/z 402 koji odgovara aduktu $[M-H]^-$. Također je vidljiva izotopna raspodjela obzirom na prisutnost broma u strukturi (maseni ioni pri m/z 402 i 404).

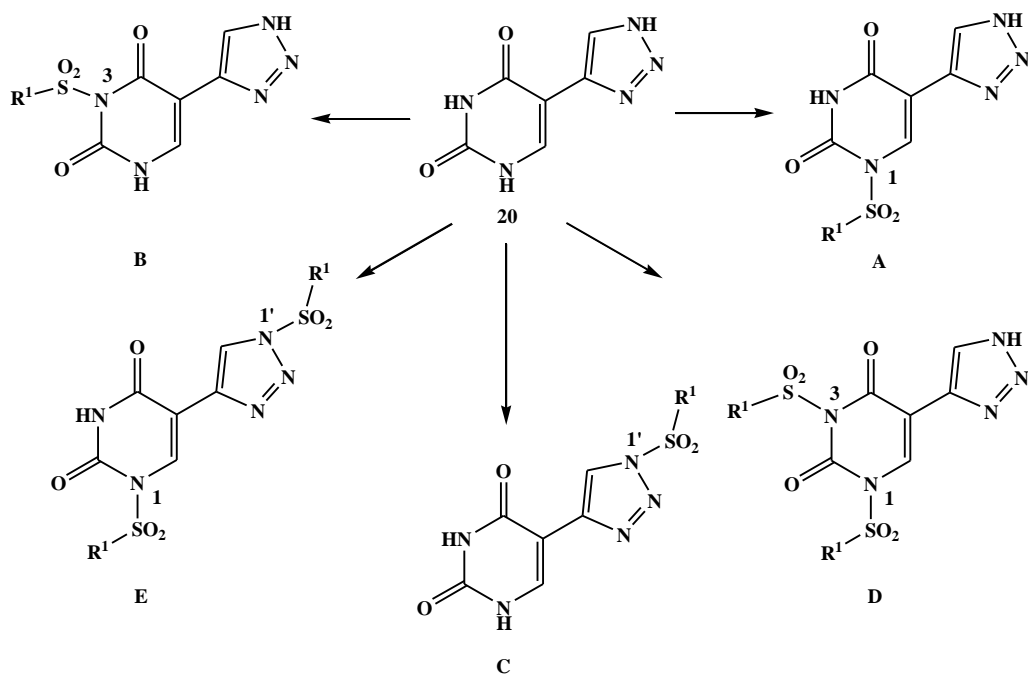


Slika 30. ESI-MS spektar spoja **35** u negativnom modu snimljen u MeOH (TIC kromatogram).

Iz svih provedenih pokusa pripreve C5-triazolnih *N*-1-sulfoniluracilnih derivata možemo zaključiti da kondenzacijom *N*1' supstituiranih C5-triazolnih uracilnih derivata sa sulfonil kloridima uz bazu DBU nastaju odgovarajući produkti, *N*1' supstituirani C5-triazolni *N*-1-sulfoniluracilni derivati u visokim iskorištenjima.

Međutim, kondenzacijom *N*1' slobodnog 5-triazoliluracilnog derivata **20** sa sulfonil kloridima uz različite baze ili sililnom, BSA metodom, ne dolazi do reakcije ili nastaju *N*1' nesupstituirani C5-triazolni *N*-1-sulfoniluracilni derivati (*Slika 31, A*) u jako slabim iskorištenjima.

Reakcijom slobodnog 5-triazoliluracilnog derivata **20** sa sulfonil kloridima bilo je očekivano da se sulfonilne skupine vežu na *N*1 položaj uracila (*Slika 31, A*). Međutim, kako je ranije spomenuto, postoji i mogućnost vezanja na *N*3 položaj uracila (*Slika 31, B*) ili *N*1' položaj triazola (*Slika 31, C*), a nije isključeno ni nastajanje disupstituiranih derivata (*Slika 31, D i E*). Vjerojatnost nastanka disupstituiranih produkata je najmanja obzirom da takve specije ne bi bile stabilne u otopini odnosno u bazičnim uvjetima. U postupku su teorijski računi koji će nam dati bolji uvid u elektronske strukture, kiselost pojedinih NH skupina i jakost N-S veza mogućih produkata što bi moglo pomoći pri sintezi željenih spojeva.



Slika 31. Teoretske mogućnosti supstitucije 5-triazoliluracilnog derivata **20** sa sulfonilnim kloridima.

4.4.3. NMR spektri C5-triazolnih N-1-sulfoniluracilnih derivata

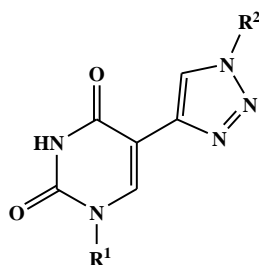
Potpuna asignacija signala protona i ugljikovih atoma N-1-sulfoniluracilne serije spojeva provedena je uz pomoć standardnih ^1H i ^{13}C (APT) te 2D; COSY i NOESY tehnika. Sva mjerenja izvedena su u DMSO- d_6 .

^1H kao i ^{13}C NMR spektri N-1-sulfoniluracilnih derivata; **34–41** daju karakteristične kemijske pomake signala protona [δ/ppm : NH-3 (11,5–12,3); H-6 (8,0–8,8)] i ugljikovih atoma [δ/ppm : C-4 (159,8–162,0); C-2 (146,5–153,7); C-6 (132,1–138,7); C-5 (101,0–107,4)] pirimidinske nukleobaze. Detaljan pregled slijeda pomaka signala molekula prikazan je tablično u prilogu disertacije.

4.4.4. Protutumorska aktivnost C5-triazolnih N-1-sulfoniluracilnih derivata u usporedbi s uracilnom i uridinskom serijom

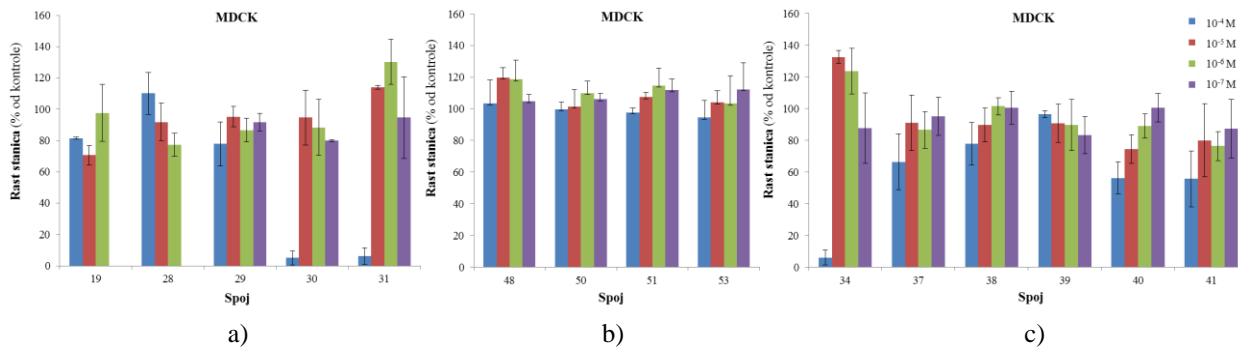
C5-triazolni N-1-sulfoniluracilni derivati **34**, **37–41** testirani su u *in vitro* uvjetima na osam staničnih linija (normalnim stanicama MDCK, stanicama humanih karcinoma; HeLa, CaCo-2 i NCI-H358, stanicama leukemija; K562 i Jurkat te stanicama limfoma; HuT 78 i Raji). Svi testirani spojevi ispitivani su u rasponu koncentracija od $1 \cdot 10^{-4}$ do $1 \cdot 10^{-7}$ M. Pokazali su jako, srednje jako, odnosno slabo antiproliferativno djelovanje, a rezultati su prikazani pojedinačno za svaku od navedenih staničnih linija u usporedbi s istim rezultatima dobivenima testiranjem analognih uracilnih odnosno uridinskih derivata (*Tablica 7*).

Tablica 7. Pregled analognih derivata uracilne (**19** i **28–31**), uridinske (**48**, **50**, **51** i **53**) i *N*-1-sulfoniluracilne (**34** i **37–41**) serije.



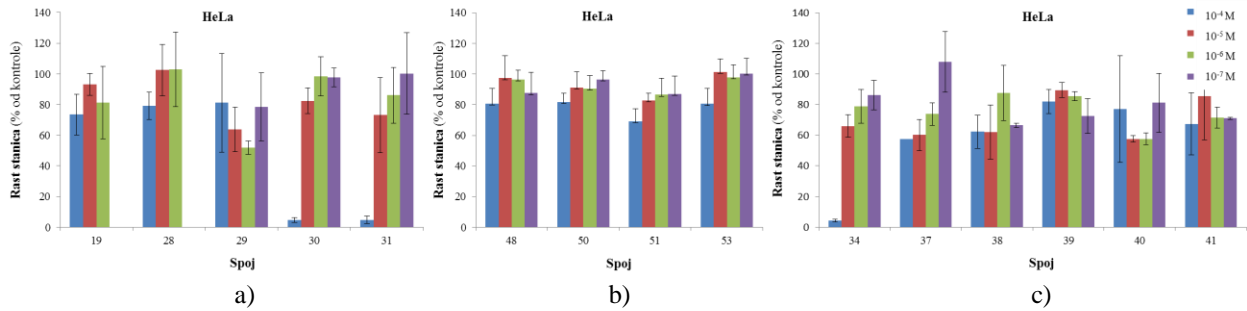
	19	48	34	28	50	37	29	38	30	51	39, (40)	31	53	41
R ¹	H			H			H		H			H		
R ²														

Rezultati na normalnim MDCK stanicama (Slika 32) ukazuju na to da N1'-metilenpivalatni derivat **34** u koncentraciji od 10^{-4} M inhibira rast normalnih stanica za više od 95 % dok analogni uracilni derivat **19** inhibira rast stanica za 20 %, a uridinski derivat **48** uopće ne djeluje na rast normalnih MDCK stanica. Antiproliferativno djelovanje ostalih *N*-1-sulfonilnih derivata, u koncentraciji od 10^{-4} M, slabo je do srednje jako izraženo (4–45 %). U nižoj koncentraciji (10^{-5} M) najjače inhibitorno djelovanje imaju spojevi N1'-benzilni derivat **40** (26 %) i N1'-benzilacetatni derivat **41** (20 %) dok je djelovanje ostalih derivata slabo izraženo. Prema dobivenim rezultatima evidentno je da svi nosintetizirani *N*-1-sulfoniluracilni derivati osim N1'-metilenpivalatnog derivata **34** nisu izrazito citotoksični za normalne MDCK stanice.

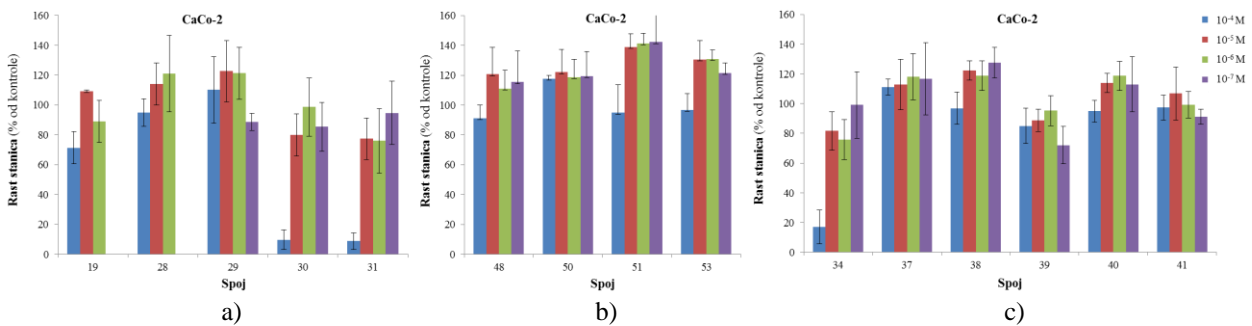


Slika 32. Usporedba učinka derivata: a) uracilne; b) uridinske i c) *N*-1-sulfoniluracilne serije na rast normalnih MDCK stanica.

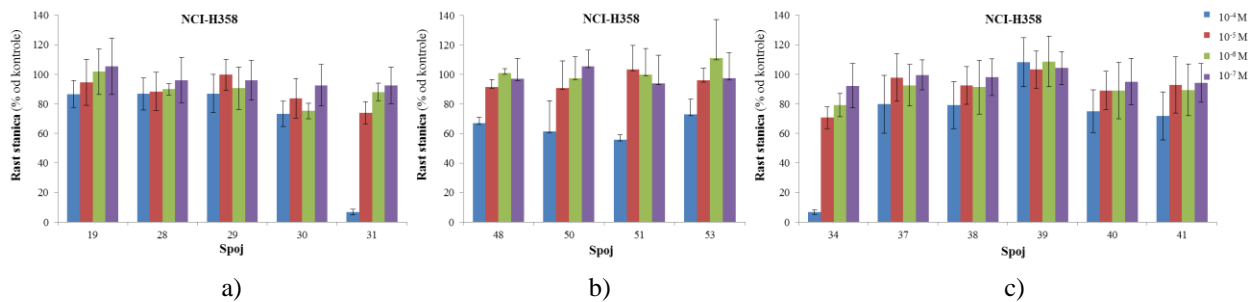
Antiproliferativna aktivnost *N*-1-sulfoniluracilnih derivata na rast stanica humanih karcinoma; HeLa (Slika 33), CaCo-2 (Slika 34) i NCI-H358 (Slika 35) uglavnom je slabo izražena. Rezultati pokazuju izrazito jako inhibitorno djelovanje N1'-metilenpivalatnog derivata **34** na rast sve tri stanične linije u najvišoj koncentraciji od 10^{-4} M (> 83 %) dok se u nižoj koncentraciji (10^{-5} M) antiproliferativna aktivnost smanjuje (34 % inhibicije rasta HeLa stanica, 18 % inhibicije rasta CaCo-2 stanica i 29 % inhibicije rasta NCI-H358 stanica). Za razliku od N1'-metilenpivalatnog derivata **34** koji pokazuje jako inhibitorno djelovanje u koncentraciji od 10^{-4} M, analogni uracilni N1'-metilenpivalat **19** i uridinski N1''-metilenpivalat **48** nemaju značajnije inhibitorno djelovanje. Najbolji rezultati dobiveni su s N1'-benzilnim derivatom **40** koji pokazuje 40 %-tnu inhibiciju rasta HeLa stanica u koncentracijama 10^{-5} – 10^{-6} M, a N1'-etil acetatni derivat **37** i N1'-hidroksietilenski derivat **38** imaju 40 %-tnu inhibiciju rasta HeLa stanica u koncentraciji od 10^{-5} M, koja se smanjuje na 30–15 % u koncentraciji 10^{-6} M. Od analognih uracilnih i uridinskih derivata jedino uracilni N1'-hidroksietilenski derivat **29** pokazuje 50 %-tni učinak inhibicije HeLa stanica (10^{-6} M).



Slika 33. Usporedba učinka derivata: a) uracilne; b) uridinske i c) *N*-1-sulfoniluracilne serije na rast stanica adenokarcinoma grlića vrata maternice (HeLa).



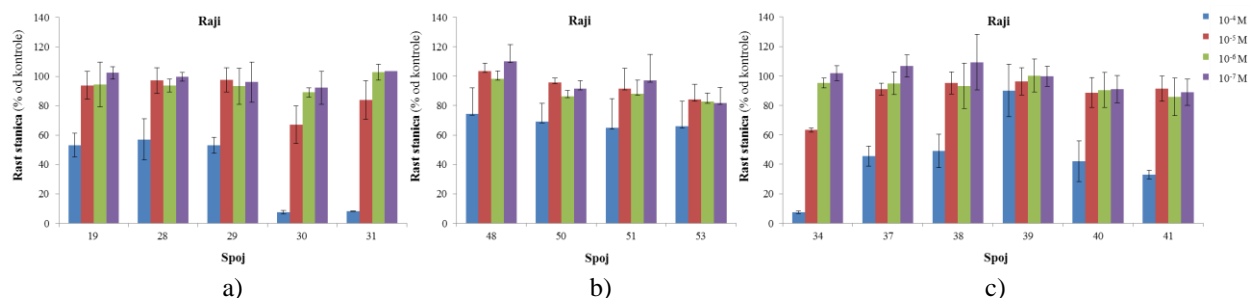
Slika 34. Usporedba učinka derivata: a) uracilne; b) uridinske i c) *N*-1-sulfoniluracilne serije na rast stanica karcinoma debelog crijeva (CaCo-2).



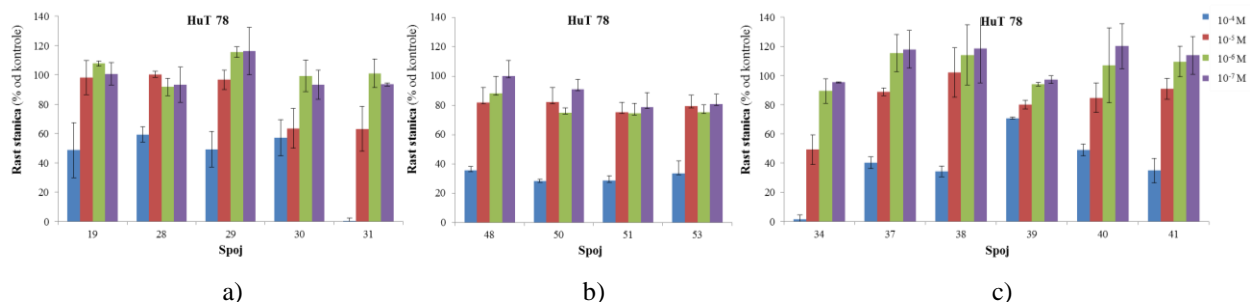
Slika 35. Usporedba učinka derivata: a) uracilne; b) uridinske i c) *N*-1-sulfoniluracilne serije na rast stanica bronhioalveolarnog karcinoma pluća (NCI-H358).

Inhibitorna aktivnost *N*-1-sulfoniluracilnih derivata na stanice limfoma; Raji (Slika 36) i HuT 78 (Slika 37) je srednje jako izražena (51–67 % inhibicije rasta Raji stanica i 29–66 % inhibicije rasta HuT 78 stanica) u koncentraciji od 10⁻⁴ M. Najjače inhibitorno djelovanje u koncentraciji od 10⁻⁴ M na rast Raji stanica ima N1'-metilenpivalatni derivat **34** (92 %), a najslabije djelovanje pokazuje N1'-benzilni derivat **39** (10 %). Isti trend aktivnosti dobiven je i na stanicama HuT 78

gdje najjače djelovanje ima ponovno derivat **34** koji inhibira rast za 98 %, a najslabije derivat **39** s 30 % inhibicije rasta HuT 78 stanica. U nižim koncentracijama *N*-1-sulfoniluracilni derivati nemaju djelovanje na rast Raji stanica.

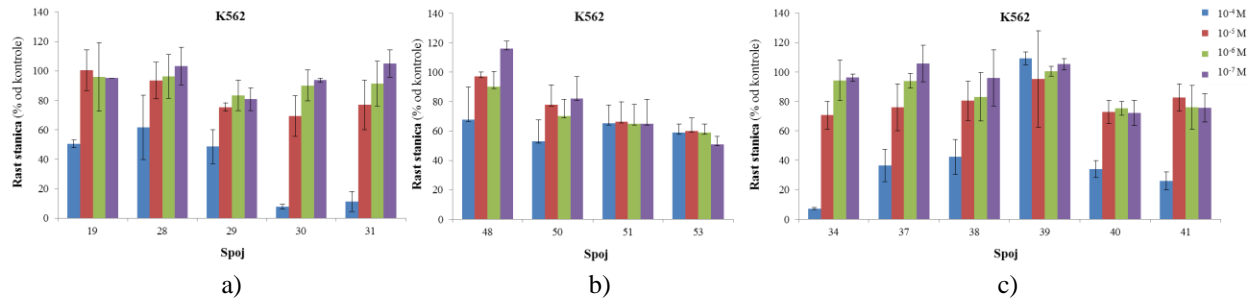


Slika 36. Usporedba učinka derivata: a) uracilne; b) uridinske i c) *N*-1-sulfoniluracilne serije na rast stanica Burkittovog limfoma (Raji).

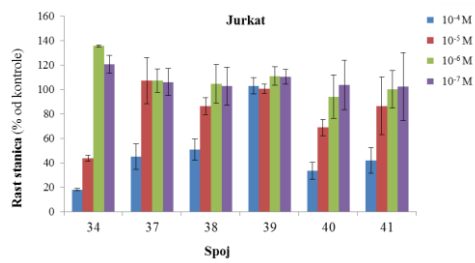


Slika 37. Usporedba učinka derivata: a) uracilne; b) uridinske i c) *N*-1-sulfoniluracilne serije na rast limfom T-stanica (HuT 78).

Rezultati bioloških testova utjecaja dobivenih *N*-1-sulfoniluracilnih derivata na rast stanica leukemija [K562 (Slika 38) i Jurkat (Slika 39)] pokazuju jako djelovanje spojeva u koncentraciji od 10^{-4} M (58–93 % inhibicije rasta K562 stanica i 34–98 % inhibicije rasta Jurkat stanica). Iznimka, kod obje stanične linije, je *N*1'-benzilni derivat **39** koji djeluje slabo stimulativno na rast stanica. U nižoj koncentraciji (10^{-5} M) djelovanje svih spojeva se smanjuje (< 30 % inhibicije rasta K562 stanica i < 31 % inhibicije rasta Jurkat stanica). Najbolje inhibitorno djelovanje na rast Jurkat stanica u koncentraciji od 10^{-5} M pokazuje *N*1'-metilpenvalatni derivat **34** (57 %).



Slika 38. Usporedba učinka derivata: a) uracilne; b) uridinske i c) *N*-1-sulfoniluracilne serije na rast stanica leukemija (K562).



Slika 39. Učinak derivata *N*-1-sulfoniluracilne serije na rast stanica leukemija (Jurkat).

5. ZAKLJUČAK

U nastavku istraživanja protutumorskih spojeva i pronalaska novih skupina „malih molekula” koje bi imale bolje biološke učinke u tretiranju tumorskih stanica u okviru ove doktorske disertacije sintetizirana su 33 nova spoja iz serije 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata nukleobaza i nukleozida. Antiproliferativno djelovanje 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata ispitano je (MTT test) na osam staničnih linija [normalne stanice (MDCK), stanice humanih karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358), stanice leukemija (K562 i Jurkat), stanice limfoma (HuT 78 i Raji)].

1,4-Disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati gvanozina i aciklovira

Gvanozin **1** je izabran kao modelni spoj i na njemu su ispitane mogućnosti modifikacija C8 položaja, a potom su analognim reakcijama sintetizirani C8 supstituirani 1,2,3-triazolni derivati aciklovira.

Pronađena je nova metoda sinteze nestabilnog 8-hidrazingvanozina **3** (75 %) u mikrovalnom reaktoru koji je zatim *N*-nitrozacijom s nitrozonijevim kationom preveden u 8-azidgvanozin **4** i na njemu su ispitani uvjeti za Cu(I) kataliziranu 1,3-dipolarnu cikloadiciju (CuAAC) s terminalnim alkinom. Optimizacijom reakcijskih uvjeta CuAAC reakcije azida **4** i propargilnog alkohola uz Et₃N i 20 %-tni suvišak CuI, u smjesi toluen/MeOH 2:1 dobiven je 1,4-disupstituirani triazolni derivat **5** (70 %).

Za pripravu C8-triazolnih derivata aciklovira odlučili smo uzeti alkinil alkohole različitih dužina alifatskog lanca kako bismo utvrdili njihov utjecaj na biološku aktivnost. Aciklovir **6** transformiran je analognim reakcijama u 8-azido derivat **9**. Cikloadicijskim reakcijama iz azida **9** uz komercijalno dostupne terminalne alkine (propargilni alkohol, pent-4-in-1-ol i heks-5-in-1-ol) pripremljeni su 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati **10** (50 %), **11** (19 %) i **12** (15 %) te derivat **14** (24 %) cikloadicijskom reakcijom s *N*-propargilftalimidom **13**.

Iz prikazanih bioloških djelovanja možemo zaključiti da novosintetizirani 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati aciklovira **10**, **11** i **12** nisu citotoksični za normalne MDCK stanice dok aciklovir **6** inhibira rast stanica za oko 40 % u svim ispitivanim koncentracijama (10^{-4} – 10^{-7} M). S obzirom na dužinu hidroksimetilenskog lanca u C4" položaju triazolnog prstena uočeno je da

porastom dužine lanca dolazi do opadanja odnosno gubitka biološke aktivnosti. Najbolji rezultati dobiveni su na CaCo-2 stanicama gdje spoj **10** pokazuje ~50 %-tnu inhibiciju (10^{-4} – 10^{-6} M), a spoj **11** ima ~50 %-tnu inhibiciju (10^{-4} – 10^{-7} M).

NOESY tehnikom utvrđena je konformacija produkta **10** u otopini DMSO-a. Alifatski supstituent na N9 položaju purinske jezgre nalazi se u *anti* položaju, a triazolni prsten ima specifičnu orijentaciju; dušici triazola su okrenuti prema N7 položaju purina.

Prilikom ispitivanja uvjeta reakcija modifikacije C8 položaja gvanozina dokazali smo da pod djelovanjem baze DBU dolazi do samoorganizacije molekula pri čemu nastaje dimer s tri vodikove veze između **GG**⁻ parova baza (D. Saftić, B. Žinić, A. Višnjevac, *Tetrahedron* **68** (2012) 1062–1070.), što može biti od značajnog interesa za primjenu i proučavanje samoorganizirajućih bioloških sustava kako u čvrstom stanju tako i u otopini.

1,4-Disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati uracila i uridina

U cilju pripreme C5 modificiranih pirimidinskih derivata sintetizirani su 5-etiniluracil **18** (94 %) i 5-etiniluridin **45** (91 %) Sonogashirinom reakcijom iz odgovarajućih 5-jod derivata (**16**, **43**) uz katalizator PdCl₂(PPh₃)₂, kokatalizator CuI i to klasičnim putem i u mikrovalnom reaktoru.

Azidi su generirani iz odgovarajućih alkil halogenida (pivaloiloksimetil klorid, etil bromacetat, benzil bromid, 6-brom-1-oksoheksilferocen, benzil 2-bromacetat, 2-brometil-metil-eter) i NaN₃ u molarnom omjeru 1:1 uz prisutnost 15 mol % baze/liganda DMEDA, 10 mol % CuI i 5 mol % Na-askorbata u smjesi EtOH/H₂O 7:3.

Cikloadicijskim reakcijama 5-etiniluracila **18** s *in situ* pripremljenim azidima uz dodatne količine katalizatora CuI, reducensa Na-askorbata i baze DMEDA (90 °C, 30 min) sintetizirani su C5-triazolni derivati uracila; **19**, **28**, **30–33** klasičnom metodom u uglavnom kvantitativnim iskorištenjima [osim ferocenskog derivata **33** (49 %)], a cikloadicijskim reakcijama 5-etiniluridin **45** s *in situ* pripremljenim azidima dobiveni su C5-triazolni derivati uridina; **48**, **50–53** i **55** u mikrovalnom reaktoru u odličnim iskorištenjima (76–94 %).

Deprotekcijom uracilnog derivata **19** i uridinskog derivata **48**, uklanjanjem pivaloiloksimetilne zaštitne skupine u bazičnim uvjetima (NH₄OH), pripremljeni su slobodni triazoli uracila **20** (100

%) i uridina **49** (89 %), a redukcijom karbonilne skupine derivata **28** (NaBH_4) dobiven je primarni alkohol **29** (60 %).

Dizajnirana je sinteza C-nukleozida uracila/uridina kod kojih je C5 položaj pirimidina povezan triazolnom prenosnicom (preko C4'(C4''), N1'(N1'') položaja triazola) s C5 položajem riboze. Cikloadicijskim reakcijama 5-etiniluracila **18** odnosno 5-etiniluridina **45** s 5-azido šećerom **24** uz katalizator $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i reducens Na-askorbat u smjesi $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (80 °C 1 h) sintetizirani su uracilni fleksimer **25** (63 %) i uridinski konjugat **46** (80 %).

Uklanjanjem izopropilidenske zaštite na šećeru triazola kod derivata **25** i **46** uz 6 M HCl u MeOH pripremljeni su triazolni fleksimer **26** (82 %) i triazolni konjugat **47** (99 %), a istovjetnom reakcijom u H_2O dolazi do deprotekcije svih OH skupina šećera spoja **25** te je izoliran triazolni fleksimer **27** u 94 %-tnom iskorištenju.

Novosintetizirani spojevi iz uridinske serije nisu citotoksični za normalne MDCK stanice u (10^{-4} – 10^{-7} M), a većina spojeva iz uracilne serije pokazuje slabu antiproliferativnu aktivnost (0–30 %) na MDCK stanice (10^{-4} – 10^{-7} M), izuzevši N1'-benzilni derivat uracila **30** i N1'-benzil acetatni derivat uracila **31**, koji samo u najvišoj koncentraciji (10^{-4} M) inhibiraju rast MDCK stanica za više od 90 %.

Općenito možemo reći da je antiproliferativno djelovanje spojeva uridinske serije na stanice humanih karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358) slabo izraženo ili ga nema, dok iz uracilne serije neki spojevi imaju aktivnost. Suprotno je u slučaju antiproliferativnog djelovanja na stanice leukemija (K562 i Jurkat) i stanice limfoma (HuT 78 i Raji) gdje uglavnom uridinska serija pokazuje bolje djelovanje od uracilne serije. Isto tako je uočeno da spojevi koji za supstituent na N1'/N1'' položaju triazola imaju aromat ili metoksietilensku/hidroksimetilensku skupinu daju interesantne rezultate inhibicije.

Najbolji rezultat s 50 %-tnim učinkom inhibicije HeLa stanica pokazuje N1'-hidroksietilenski derivat **29** (10^{-6} M), uracilni fleksimeri **25** ima 40 %-tnu inhibiciju na CaCo-2 stanicama (10^{-5} M), N1'-benzilni derivat **30** pokazuje 50 %-tnu inhibiciju na Jurkat stanicama (10^{-5} M), a N1'-metoksietilenski derivat **32** inhibira (50–30 %) Jurkat stanice i stanice limfoma (HuT 78 i Raji) u nižim koncentracijama (10^{-5} – 10^{-7} M).

Značajno antiproliferativno djelovanje na rast leukemijskih K562 stanica pokazuju N1"-benzil acetatni derivat **53** i N1"-metoksietilenski derivat **55** s 50 %-tnom inhibicijom te N1"-benzilni derivat **51**, slobodni triazolni derivat uridina **49** i uridinski konjugat **46** s 40 %-tnom inhibicijom K562 stanica u svim koncentracijama (10^{-4} – 10^{-7} M).

Intrinzično svojstvo fluorescencije 1,2,3-triazolnih analoga uridinske serije potvrđeno je snimanjem fluorescencijskih spektara. Primijenjene su otopine koncentracije $c \sim 3 \cdot 10^{-5}$ M u MeOH, a mjerenja su izvedena pri 25 °C i istim uvjetima snimanja. Obzirom na dobivene rezultate moguća je njihova primjena kao fluorescentnih markera pogodnih za ugradnju u polimerne strukture (DNA, RNA, PNA) s mogućom primjenom u području molekularne biologije i dijagnostike te u „antisense” terapiji (*engl. antisense therapy*).

1,4-Disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati N-1-sulfoniluracila

Pronađena je dobra metoda kondenzacije 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata uracila sa sulfonil kloridima uz DBU u DMF-u i pripremljeni su odgovarajući N-1-sulfoniluracilni derivati **34**, **37**, **38** i **41** u vrlo dobrim iskorištenjima (59–90 %) i derivat **39** u nešto nižem iskorištenju (35 %). Hidrogenolizom 5-bromtiofenskog derivata **39** uz katalizator Pd/C uklonjen je brom i dobiven je produkt **40** u 92 %-tnom iskorištenju.

N1' slobodni 1,2,3-triazolni derivati N-1-sulfoniluracila

U nastavku rada željeli smo ukloniti supstituente na N1' položaju triazola i prirediti C5-triazolne N-1-sulfoniluracilne derivate sa slobodnom NH skupinom triazolnog prstena. U pokusima deprotekcije pivaloiloksimetilne skupine kod spoja **34** i benzilne skupine kod spoja **40** nije došlo do uklanjanja zaštitnih skupina već do pucanja N-S veze. Iz toga zaključujemo da 1,4-disupstituirani triazolni derivati N-1-sulfoniluracila nisu pogodni za daljnju modifikaciju.

U drugom sintetskom pristupu provedene su reakcije kondenzacije s nesupstituiranim 5-triazoliluracilnim derivatom **20** i sulfonil kloridima uz različite baze. Uz relativno slabu bazu piridin ili uz DBU u oba slučaja izoliran je ishodni spoj **20** (> 70 %), dok kondenzacijom slobodnog 5-triazoliluracila **20** s TsCl uz jaku bazu K_2CO_3 u dioksanu odnosno DMF-u nastaje N-1-sulfoniluracilni derivat **36** u 11 %-tnom iskorištenju koji je potvrđen i ESI-MS analizom. Primjenom sililne (BSA) metode izoliran je ishodni triazol **20** i tragovi N-1-sulfonilnih derivata

35 (6 %) odnosno **36** (8 %). Obzirom na vrlo niska iskorištenja i mogućnosti vezanja sulfonilnog fragmenta na više položaja (N1 i N3 položaj uracila, N1' položaj triazolnog prstena te disupstituirani produkti) u postupku su teorijski računi koji će nam dati bolji uvid u elektronske strukture, kiselost pojedinih NH skupina i jakost N-S veza mogućih produkata što bi moglo pomoći pri sintezi željenih spojeva.

Prema dobivenim rezultatima evidentno je da svi novosintetizirani *N*-1-sulfoniluracilni derivati osim N1'-metilenpivalatnog derivata **34** nisu izrazito citotoksični za normalne MDCK stanice.

Antiproliferativna aktivnost *N*-1-sulfoniluracilnih derivata na rast stanica humanih karcinoma; HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 uglavnom je slabo izražena. Jako inhibitorno djelovanje (> 83 %) na rast sve tri stanične linije pokazuje N1'-metilenpivalatni derivat **34** u koncentraciji od 10^{-4} M. N1'-etil acetatni derivat **37** i N1'-hidroksietilenski derivat **38** imaju 40 %-tnu inhibiciju rasta HeLa stanica u koncentraciji od 10^{-5} M, a najbolji rezultat daje N1'-benzilni derivat **40** s 40 %-tnom inhibicijom rasta HeLa stanica u koncentracijama 10^{-5} – 10^{-6} M.

Najbolje inhibitorno djelovanje u koncentraciji od 10^{-5} M pokazuje N1'-metilenpivalatni derivat **34** i to na rast Jurkat stanica (57 %) i stanica limfoma HuT 78 (51 %).

Nova saznanja dobivena pripravom 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata nukleobaza i nukleozida kao i saznanja o protutumorskom djelovanju ovih spojeva poslužit će u odabiru smjernica u daljnjem radu na sintezi biološki aktivnih spojeva.

6. LITERATURNI IZVORI

1. Lj. Glavaš-Obrovac, I. Karner, B. Žinić i K. Pavelić, *Anticancer Res.* **21** (2001) 1979–1986.
2. B. Žinić, M. Žinić i I. Krizmanić (2003) *Synthesis of the Sulfonylpyrimidine Derivatives with Anticancer Activity.* **EP 0 877 022 B1** (Bulletin 1003/16).
3. Lj. Glavaš-Obrovac, I. Karner, M. Štefanić, J. Kašnar-Šamprec i B. Žinić, *Il Farmaco* **60** (2005) 479–483.
4. Lj. Glavaš-Obrovac, I. Karner, M. Pavlak, M. Radačić, J. Kašnar-Šamprec i B. Žinić, *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **24** (2005) 557–569.
5. M. Pavlak, R. Stojković, M. Radačić -Aumiler, J. Kašnar-Šamprec, J. Jerčić, K. Vlahović, B. Žinić i M. Radačić, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **131** (2005) 829–836.
6. F. Supek, M. Kralj, M. Marjanović, L. Šuman, T. Šmuc, I. Krizmanić i B. Žinić, *Invest. New Drugs* **26** (2008) 97–110.
7. J. Kašnar-Šamprec, I. Ratkaj, K. Mišković, M. Pavlak, M. Baus-Lončar, S. Kraljević Pavelić, Lj. Glavaš-Obrovac i B. Žinić, *Investigational new drugs* **30** (2012) 981–990.
8. F. Lauria, D. Benfenati, D. Raspadori, D. Rondelli, P. L. Zinzani i S. Tura, *Leuk. Lymphoma* **11** (1993) 399–404.
9. C. H. Pui, S. Jeha i P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Disc.* **4** (2005) 369–370.
10. P. L. Bonate, L. Arthaud, W. R. Cantrell, K. Stephenson, J. A. Secrist i S. Weitman, *Nat. Rev. Drug Disc.* **5** (2006) 855–863.
11. J.-P. Issa, H. Kantarjian i P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Disc.* **4** (2005) 275–276.
12. S. D. Gore, C. Jones i P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Disc.* **5** (2006) 891–892.
13. S. Meneni, I. Ott, C. D. Sergeant, A. Sniady, R. Gust i R. Dembinski, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007) 3082–3088.
14. G. J. Koomen, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **112** (1993) 51–65.
15. C. Simons, *Nucleoside Mimetics*, Gordon and Breach Science Publishers (2001).
16. J. Brånalt, I. Kvarnström, B. Classon i B. Samuelsson, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 3599–3603.
17. J. Brånalt, I. Kvarnström, B. Classon i B. Samuelsson, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 3604–3610.
18. E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 1297–1313.
19. E. De Clercq i H. J. Field, *British Journal of Pharmacology* **147** (2006) 1–11.

-
20. E. De Clercq, *Journal of Clinical Virology* **30** (2004) 115–133.
 21. M. Yokoyama i A. Momotake, *Synthesis-Stuttgart* (1999) 1541–1554.
 22. T. Ueda, *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, L. B. Townsend (ured.), Vol. 1, Plenum Press, New York, London, 1988, str. 1–70.
 23. R. G. Gish, *J. Antimicrob. Chemother.* **57** (2006) 8–13.
 24. J. Z. Wu, C.-C. Lin i Z. Hong, *J. Antimicrob. Chemother.* **52** (2003) 543–546.
 25. U. Pradere, V. Roy, T. R. McBrayer, R. F. Schinazi i L. A. Agrofoglio, *Tetrahedron* **64** (2008) 9044–9051.
 26. R. A. Youcef, M. D. Santos, S. Roussel, J.-P. Baltaze, N. Lubin-Germain i J. Uziel, *J. Org. Chem.* **74** (2009) 4318–4323.
 27. H. Nishimura, M. Mayama, Y. Komatsu, H. Kato, N. Shimaoka i Y. Tanaka, *J. Antibiot. (Tokyo)* **17** (1964) 148–155.
 28. T. Böttcher i S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 6964–6972.
 29. R. F. Heck, *J. Am. Chem. Soc.* **91** (1969) 6707–6714.
 30. L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau i Y. Saito, *Chem. Rev.* **103** (2003) 1875–1916.
 31. R. Kobetić i N. Biliškov, *Kem. Ind.* **56** (7-8) (2007) 391–402.
 32. J. L. Ruth i D. E. Bergstrom, *J. Org. Chem.* **43** (1978) 2870–2876.
 33. D. E. Bergstrom i J. L. Ruth, *J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 1587–1589.
 34. D. E. Bergstrom, J. L. Ruth i P. Warwick, *J. Org. Chem.* **46** (1981) 1432–1441.
 35. H.-C. Zhang i G. D. Daves, *J. Org. Chem.* **58** (1993) 2557–2560.
 36. B. M. Trost, G.-H. Kuo i T. Benneche, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 621–622.
 37. P. Espinet i A. M. Echavarren, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 4704–4734.
 38. A. O. King, N. Okukado i E. Negishi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **19** (1977) 683–684.
 39. Y. Hatanaka i T. Hiyama, *J. Org. Chem.* **53** (1988) 918–920.
 40. F. R. Hartley, *The Chemistry of Platinum and Palladium*, Applied Science, London, 1972.
 41. A. O. King, E. Negishi, F. J. Villani Jr. i A. Silveira Jr., *J. Org. Chem.* **43** (1978) 358–360.
 42. M. S. Kharasch, R. C. Seyler i R. R. Mayo, *J. Am. Chem. Soc.* **60** (1938) 882–884.
 43. A. J. Canty, *Acc. Chem. Res.* **25** (1992) 83–90.
 44. L. Tonks i J. M. J. Williams, *Contemp. Org. Synth.* **4** (1997) 353–372.
 45. C. Rosini, L. Franzini, A. Raffaelli i P. Salvadori, *Synthesis* **6** (1992) 503.
 46. K. W. Wellington i S. A. Benner, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **25** (2006) 1309–1333.

-
47. Z. Wang, X. Feng, W. Fang i T. Tu, *Synlett* **7** (2011) 951–954.
48. B. K. Allam i K. N. Singh, *Synthesis* **7** (2011) 1125–1131.
49. D. E. Bergstrom, *Nucleos. Nucleot.* **1** (1982) 1–34.
50. D. E. Bergstrom i M. K. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 8106–8112.
51. D. E. Bergstrom, P. Beal, J. Jenson i X. Lin, *J. Org. Chem.* **56** (1991) 5598–5602.
52. P. R. Langer, A. A. Waldrop i D. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78** (1981) 6633–6637.
53. G. B. Dreyer i P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82** (1985) 968–972.
54. J. Telser, K. A. Cruickshank, K. S. Schanze i T. L. Netzel, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 7221–7226.
55. J. K. Bashkin, J. K. Gard i A. S. Modak, *J. Org. Chem.* **55** (1990) 5125–5132.
56. B. L. Iverson i P. B. Dervan, *Nucleic Acids Res.* **15** (1987) 7823–7830.
57. J. H. Cho i K. H. Shaughnessy, *Synlett* **20** (2011) 2963–2966.
58. M. V. Reddington i D. Cunningham-Bryant, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 181–183.
59. J. A. Brazier, T. Shibata, J. Townsley, B. F. Taylor, E. Frary, N. H. Williams i D. M. Williams, *Nucleic Acids Res.* **33** (2005) 1362–1371.
60. P. Lagisetty, L. Zhang i M. K. Lakshmana, *Adv. Synth. Catal.* **350** (2008) 602–608.
61. D. Graham, J. A. Parkinson i T. Brown, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1998) 1131–1138.
62. G. Hogley, V. Gubala, M. D. Rivera-Sánchez i J. M. Rivera, *Synlett* **10** (2008) 1510–1514.
63. V. Gubala, J. E. Betancourt i J. M. Rivera, *Org. Lett.* **6** (2004) 4735–4738.
64. D. Saftić, B. Žinić i A. Višnjevac, *Tetrahedron* **68** (2012) 1062–1070.
65. P. Mamos, A. A. Van Aerschot, N. J. Weyns i P. A. Herdewijn, *Tetrahedron Lett.* **33** (1992) 2413–2416.
66. R. M. Moriarty, W. R. Epa i A. K. Awasthi, *Tetrahedron Lett.* **31** (1990) 5877–5880.
67. V. Ozola, T. Persson, S. Gronowitz i A.-B. Hörnfeldt, *J. Heterocycl. Chem.* **32** (1995) 863–866.
68. V. Farina i S. I. Hauck, *Synlett* **3** (1991) 157–159.
69. P. Herdewijn, L. Kerremans, P. Wigerinck, F. Vandendriessche i A. Van Aerschot, *Tetrahedron Lett.* **32** (1991) 4397–4400.
70. S. G. Rahim, N. Trivedi, M. V. Bogunovic-Batchelor, G. W. Hardy, G. Mills, J. W. T. Selway, W. Snowden, E. Littler, P. L. Coe, I. Basnak, R. F. Whale i R. T. Walker, *J. Med. Chem.* **39** (1996) 789–795.

-
71. Y. Yamamoto, T. Seko i H. Nemoto, *J. Org. Chem.* **54** (1989) 4734–4736.
72. H. Kumamoto, S. Onuma, H. Tanaka, G. E Dutschman i Y.-C. Cheng, *Antiviral Chem. Chemother.* **17** (2006) 225–234.
73. M. Havelková, M. Hocek, M. Česnek i D. Dvořák, *Synlett* **7** (1999) 1145–1147.
74. N. Amann i H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **5** (2002) 687–691.
75. A. Collier i G. Wagner, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 4526–4532.
76. M. Muraoka i H. Sakai, *Cell Struct. Funct.* **24** (1999) 305–312.
77. T. Läppchen, A. F. Hartog, V. A. Pinas, G.-J. Koomen i T. den Blaauwen, *Biochemistry* **44** (2005) 7879–7884.
78. E. Halbfinger, D. T. Major, M. Ritzmann, J. Ubl, G. Reiser, J. L. Boyer, K. T. Harden i B. Fischer, *J. Med. Chem.* **42** (1999) 5325–5337.
79. H. S. Kim, M. Ohno, B. Xu, H. O. Kim, Y. Choi, X. D. Ji, S. Maddileti, V. E. Marquez, T. K. Harden i K. A. Jacobson, *J. Med. Chem.* **46** (2003) 4974–4987.
80. S. R. Das, R. Fong i J. A. Piccirilli, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9** (2005) 585–593.
81. K. Burgess i D. Cook, *Chem. Rev.* **100** (2000) 2047–2060.
82. T. E. Storr, A. G. Firth, K. Wilson, K. Darley, C. G. Baumann i I. J. S. Fairlamb, *Tetrahedron* **64** (2008) 6125–6137.
83. M. Famulok, J. S. Hartig i G. Mayer, *Chem. Rev.* **107** (2007) 3715–3743.
84. J. Liu, Z. Cao i Y. Lu, *Chem. Rev.* **109** (2009) 1948–1998.
85. S. K. Silverman, *Acc. Chem. Res.* **42** (2009) 1521–1531.
86. F. A. Aldaye, A. L. Palmer i H. F. Sleiman, *Science* **321** (2008) 1795–1799.
87. A. Omumi, D. G. Beach, M. Baker, W. Gabryelski i R. A. Manderville, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 42–50.
88. N. Fresneau, M.-A. Hiebel, L. A. Agrofoglio i S. Berteina-Raboin, *Molecules* **17** (2012) 14409–14417.
89. R. Chinchilla i C. Nájera, *Chem. Rev.* **107** (2007) 874–922.
90. M. Kotorai i T. Takahashi, *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis*; E. Negishi, A. de Meijere, Wiley-Interscience, New York, 2002, str. 973.
91. P. Siemsen, R. C. Livingston i F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39** (2000) 2632–2657.
92. M. Carril, A. Correa i C. Bolm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 4862–4865.
93. A. Okamoto, Y. Ochi i I. Saito, *Chem. Commun.* (2005) 1128–1130.

-
94. H. Ali, N. Ahmed, G. Tessier i J. E. van Lier, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 317–319.
95. A. G. Firth, I. J. S. Fairlamb, K. Darley i C. G. Baumann, *Tetrahedron Lett.* **47** (2006) 3529–3533.
96. Y. Saito, K. Hanawa, K. Motegi, K. Omoto, A. Okamoto i I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **46** (2005) 7605–7608.
97. Y. Saito, K. Matsumoto, S. S. Bag, S. Ogasawara, K. Fujimoto, K. Hanawa i I. Saito, *Tetrahedron* **64** (2008) 3578–3588.
98. R. Chinchilla i C. Nájera, *Chem. Rev.* **100** (2000) 1891–1928.
99. M. Rist, N. Amann i H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **13** (2003) 2498–2504.
100. L. H. Thoresen, G.-S. Jiao, W. C. Haaland i M. L. Metzker, *Chem. Eur. J.* **9** (2003) 4603–4610.
101. G. T. Hwang, Y. J. Seo i B. H. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 6528–6529.
102. I. Bouamaied i E. Stulz, *Synlett* **9** (2004) 1579–1583.
103. S. Eppacher, N. Solladié i A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **87** (2004) 2926–2942.
104. W. Flasche, C. Cismas, A. Herrmann i J. Liebscher, *Synthesis* **14** (2004) 2335–2341.
105. M. V. Skorobogaty, A. A. Pchelintseva, A. L. Petrunina, I. A. Stepanova, V. L. Andronova, G. A. Galagov, A. D. Malakhov i V. A. Korshun, *Tetrahedron* **62** (2006) 1279–1287.
106. D. Rai, M. Johar, T. Manning, B. Agrawal, D. Y. Kunimoto i R. Kumar, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 7012–7017.
107. N. C. Srivastav, D. Rai, C. Tse, B. Agrawal, D. Y. Kunimoto i R. Kumar, *J. Med. Chem.* **53** (2010) 6180–6187.
108. N. K Garg, C. C. Woodroffe, C. J. Lacenere, S. R. Quake i B. M. Stoltz, *Chem. Commun.* (2005) 4551–4553.
109. G. O'Mahony, E. Ehrman i M. Grøtli, *Tetrahedron Lett.* **46** (2005) 6745–6748.
110. H. C. Kolb, M. G. Finn i K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 2004–2021.
111. J. F. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46** (2007) 1018–1025.
112. H. Adolfsson, A. Converso i K. B. Sharpless, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 3991–3994.
113. H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze i K. B. Sharpless, *Chem. Rev.* **94** (1994) 2483–2547.
114. A. V. Gontcharov, H. Liu i K. B. Sharpless, *Org. Lett.* **1** (1999) 783–786.
115. E. Kühle, *Synthesis* **11** (1970) 563–586.
116. A. Michael, *J. Prakt. Chem./Chem.-Ztg.* **48** (1893) 94–95.

-
117. R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, John Wiley & sons, New York (1984) 1–176.
118. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless i V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 210–216.
119. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin i K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002) 2596–2599.
120. C. W. Tornøe i M. Meldal, *Peptides 2001, Proc. Am. Pept. Symp.*, American Peptide Society and Kluwer Academic Publishers, San Diego, 2001, str. 263–264.
121. C. W. Tornøe, C. Christensen i M. Meldal, *J. Org. Chem.* **67** (2002) 3057–3064.
122. R. K. Smith, S. M. Reed, P. A. Lewis, J. D. Monnell, R. S. Clegg, K. F. Kelly, L. A. Bumm, J. E. Hutchison i P. S. Weiss, *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 1119–1122.
123. L. D. Pachón, J. H. Van Maarseveen i G. Rothenberg, *Adv. Synth. Catal.* **347** (2005) 811–815.
124. Q. Wan, J. Chen, G. Chen i S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 8244–8249.
125. F. Alonso, Y. Moglie, G. Radivoy i M. Yus, *Tetrahedron Lett.* **50** (2009) 2358–2362.
126. M. Meldal i C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **108** (2008) 2952–3015.
127. V. O. Rodionov, V. V. Fokin i M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005) 2210–2215.
128. M. Ahlquist i V. V. Fokin, *Organometallics* **26** (2007) 4389–4391.
129. L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. Y. Sun, I. D. Williams, B. Sharpless, V. V. Fokin i G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 15998–15999.
130. C. Spiteri i J. E. Moses, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49** (2010) 31–33.
131. J. E. Hein, J. C. Tripp, L. Krasnova, K. B. Sharpless i V. V. Fokin, *Angew. Chem.* **121** (2009) 8162–8165.
132. J. E. Hein, J. C. Tripp, L. Krasnova, K. B. Sharpless i V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48** (2009) 8018–8021.
133. E. J. Yoo, M. Ahlquist, I. Bae, K. B. Sharpless, V. V. Fokin i S. Chang, *J. Org. Chem.* **73** (2008) 5520–5528.
134. M. P. Cassidy, J. Raushel i V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 3154–3157.
135. S. H. Cho, E. Y. Yoo, I. Bae i S. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 16046–16047.
136. M. Whiting i V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 3157–3161.
137. E. J. Yoo, I. Bae, S. H. Cho, H. Han i S. Chang, *Org. Lett.* **8** (2006) 1347–1350.

-
138. I. Bea, H. Han i S. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 2038–2039.
139. E. Y. Yoo, M. Ahlquist, S. H. Kim, V. V. Fokin, K. B. Sharpless i S. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46** (2007) 1730–1733.
140. G. J. Roth, B. Liepold, S. G. Müller i H. J. Bestmann, *Synthesis* **1** (2004) 59–62.
141. M. Ito, K. Koyakumar, T. Ohta i H. Takaya, *Synthesis* **4** (1995) 376–378.
142. E. V. Scriven i K. Turnbull, *Chem. Rev.* **88** (1988) 297–368.
143. A. K. Feldman, B. Colasson i V. V. Fokin, *Org. Lett.* **6** (2004) 3897–3899.
144. J. S. Yadav, B. V. Subba Reddy i V. Geetha, *Synlett* **3** (2002) 513–515.
145. S. C. Alley, F. T. Ishmael, A. D. Jones i S. J. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 6126–6127.
146. T. Pathak, *Chem. Rev.* **102** (2002) 1623–1667.
147. J. Andersen, U. Madsen, F. Björkling i X. Liang, *Synlett* **14** (2005) 2209–2213.
148. E. F. V. Scriven i K. Turnbull, *Chem. Rev.* **2** (1988) 297–368.
149. A. K. Feldman, B. Colasson i V. V. Fokin, *Org. Lett.* **6** (2004) 3897–3899.
150. K. Kacprzak, *Synlett* **6** (2004) 943–946.
151. P. Appukkuttan, W. Dehaen, V. V. Fokin i E. Van der Eycken, *Org. Lett.* **6** (2004) 4223–4225.
152. J. Andersen, S. Bolvig i X. Liang, *Synlett* **19** (2005) 2941–2947.
153. D. Kumar, V. Buchi Reddy i R. S. Varma, *Tetrahedron Lett.* **50** (2009) 2065–2068.
154. K. Odlo, E. A. Høydahl i T. V. Hansen, *Tetrahedron Lett.* **48** (2007) 2097–2099.
155. J. S. Yadav, B. V. Subba Reddy, G. Madhusudham Reddy i D. Narasimha Chary, *Tetrahedron Lett.* **9** (2007) 8773–8776.
156. S. Chandrasekhar, D. Basu i C. Rambabu, *Tetrahedron Lett.* **47** (2006) 3059–3063.
157. H. S. G. Beckmann i V. Wittmann, *Org. Lett.* **9** (2007) 1–4.
158. K. Barral, A. D. Moorhouse i J. E. Moses, *Org. Lett.* **9** (2007) 1809–1811.
159. A. D. Moorhouse i J. E. Moses, *Synlett* **14** (2008) 2089–2092.
160. N. M. Smith, M. J. Greaves, R. Jewell, M. W. D. Perry, M. J. Stocks i J. P. Stonehouse, *Synlett* **9** (2009) 1391–1394.
161. S.-I. Fukuzawa, E. Shimizu i S. Kikucki, *Synlett* **15** (2007) 2436–2438.
162. R. Bossio, C. F. Marcos, S. Marcaccini i R. Pepino, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 2519–2520.

-
163. G. F. Ross, E. Herdtweck i I. Ugi, *Tetrahedron* **58** (2002) 6127–6133.
164. C. Wei i C.-J. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 9584–9585.
165. J. Y. Lau, R. C. Tam, T. J. Liang i Z. Hong, *Hepatology* **35** (2002) 1002–1009. i reference tamo citirane.
166. Y. Mizushina, A. Matsukage i K. Sakaguchi, *Biochim. Biophys. Acta* **1403** (1998) 5–11. i reference tamo citirane.
167. I. Perez-Castro, O. Caamano, F. Fernandez, M. D. Garcia, C. Lopez i E. De Clercq, *Org. Biomol. Chem.* **5** (2007) 3805–3813.
168. J. H. Cho, D. L. Bernard, R. W. Sidwell, E. R. Kern i C. K. Chu, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 1140–1148.
169. A. Goeminne, M. McNaughton, G. Bal, G. Surpateanu, P. Van der Veken, S. De Prol, W. Versees, J. Steyaert, S. Apers, A. Haemers i K. Augustyns, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17** (2007) 2523–2526.
170. J. Broggi, S. Diez-Gonzalez, J. L. Petersen, S. Berteina-Raboin, S. P. Nolan i L. A. Agrofoglio, *Synthesis* **1** (2008) 141–148.
171. J. Broggi, N. Joubert, V. Aucagne, T. Zevaco, S. Berteina-Raboin, S. P. Nolan i L. A. Agrofoglio, *Nucleos. Nucleot.* **26** (2007) 779–783.
172. B. L. Wilkinson, H. Long, E. Sim i A. J. Fairbanks, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 6265–6267.
173. B. K. Singh, A. K. Yadav, B. Kumar, A. Gaikwad, S. K. Sinha, V. Chaturvedic i R. P. Tripathia, *Carbohydr. Res.* **343** (2008) 1153–1162.
174. G. R. Lorello, M. Legault, B. Rakić, K. Bisgaard i J.-P. Pezacki, *Bioorg. Chem.* **36** (2008) 105–111.
175. M. Nakahara, T. Kuboyama, A. Izawa, Y. Hari, T. Imanishi i S. Obika, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 3316–3319.
176. A. De La Hoz, A. Diaz-Ortiz i F. Langa, *Microwaves in Organic Synthesis*, A. Loupy, Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2002, str. 295–343.
177. C. O. Kappe i E. Van der Eycken, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 1280–1290.
178. K. Bougrin, A. Loupy i M. Soufiaoui, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **6** (2005) 139–167.
179. R. Guezguez, K. Bougrin, K. El Akri i R. Benhida, *Tetrahedron Lett.* **47** (2006) 4807–4811.

-
180. L. Li, B. Lin, Z. Yang, L. Zhang i L. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 4491–4493.
181. Y. Xia, W. Li, F. Qu, Z. Fan, X. Liu, C. Berro, E. Rauzy i L. Peng, *Org. Biomol. Chem.* **5** (2007) 1695–1701.
182. W. Li, Y. Xia, Z. Fan, F. Qu, Q. Wu i L. Peng, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 2804–2809.
183. L. Cosyn, K. K. Palaniappan, S.-K. Kim, H. T. Duong, Z.-G. Gao, K. A. Jacobson i S. Van Calenbergh, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 7373–7383.
184. G. O'Mahony, E. Ehrman i M. Grötli, *Tetrahedron* **64** (2008) 7151–7158.
185. C. Dyrager, K. Börjesson, P. Dinér, A. Elf, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson i M. Grötli, *Eur. J. Org. Chem.* **10** (2009) 1515–1521.
186. Y.-S. Lee, S. M. Park, H. M. Kim, S.-K. Park, K. Lee, C. W. Lee i B. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 4688–4691.
187. A. Montagu, V. Roy, J. Balzarini, R. Snoeck, G. Andrei i L. A. Agrofoglio, *Eur. J. Org. Chem.* **4** (2011) 778–786.
188. S. M. Park, H. Yang, S.-K. Park, H. M. Kim i B. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 5831–5834.
189. A. J. Gutierrez, M. D. Matteucci, D. Grant, S. Matsumura, R. W. Wagner i B. C. Froehler, *Biochemistry* **36** (1997) 743–748.
190. A. J. Gutierrez, T. J. Terhorst, M. D. Matteucci i B. C. Froehler, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 5540–5544.
191. P. Kočalka, N. K. Andersen, F. Jensen i P. Nielsen, *ChemBioChem* **8** (2007) 2106–2116.
192. R. W. Sinkeldam, N. J. Greco i Y. Tor, *ChemBioChem* **9** (2008) 706–709.
193. N. K. Andersen, N. Chandak, L. Brulíková, P. Kumar, M. D. Jensen, F. Jensen, P. K. Sharma i P. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 4702–4710.
194. P. M. Chaudhary, S. R. Chavan, F. Shirazi, M. Razdan, P. Nimkar, S. P. Maybhate, A. P. Likhite, R. Gonnade, B. G. Hazara, M. V. Deshpande i S. R. Deshpande, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 2433–2440.
195. K. K. Yeoh, T. D. Butters, B. L. Wilkinson i A. J. Fairbanks, *Carbohydr. Res.* **344** (2009) 586–591.
196. L. Zhou, A. Amer, M. Korn, R. Burda, J. Balzarini, E. De Clercq, E. R. Kern i P. F. Torrence, *Antiviral Chem. Chemother.* **16** (2005) 375–383.
197. H. Ding, R. Yang, Y. Song, Q. Xiao i J. Wu, *Nucleos. Nucleot.* **27** (2008) 368–375.

-
198. Y. Byun, S. R. Vogel, A. J. Phipps, C. Carnrot, S. Eriksson, R. Tiwari i W. Tjarks, *Nucleos. Nucleot.* **27** (2008) 244–260.
199. L. Lee, K.-H. Chang, F. Valiyev, H.-J. Liu i W.-S. Li, *J. Chin. Chem. Soc.* **53** (2006) 1547–1555.
200. G. O’Mahony, S. Svensson, A. Sundgreen i M. Grøtli, *Nucleos. Nucleot.* **27** (2008) 449–459.
201. J. Cao i X. Huang, *J. Comb. Chem.* **10** (2008) 526–533.
202. E. De Clercq, *Antiviral Res.* **75** (2007) 1–13.
203. E. De Clercq i A. Holy, *Nat. Rev. Drug Disc.* **4** (2005) 928–940.
204. A. Holy, *Antiviral Res.* **71** (2006) 248–253.
205. W. A. Lee i J. C. Martin, *Antiviral Res.* **71** (2006) 254–259.
206. H. Elayadi, M. Smietana, C. Pannecouque, P. Leyssen, J. Neyts, J.-J. Vasseur i H. B. Lazrek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 7365–7368.
207. S. Trakossas, E. Coutouli-Argyropoulou i D. J. Hadjipavlou-Litina, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 1673–1676.
208. X. Jin, R. Yang, P. Jin, Q. Xiao i Y. Ju, *Synthesis* **19** (2007) 2967–2972.
209. F. Seela i V. R. Sirivolu, *Helv. Chim. Acta* **90** (2007) 535–552.
210. R. Lucas, R. Zerrouki, R. Granet, P. Krausz i Y. Champavier, *Tetrahedron* **64** (2008) 5467–5471.
211. S. Roper i H. C. Kolb, *Fragment-Based Approaches in Drug Discovery; Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Vol. 34 (Eds.: H. Baltés, W. Gçpel, J. Hesse), Wiley-VCH, Weinheim, 2006, str. 313–339.
212. K. B. Sharpless i R. Manetsch, *Expert Opin. Drug Discovery* **1** (2006) 525–538.
213. G. C. Tron, T. Piralì, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba i A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.* **28** (2008) 278–308.
214. R. J. Pieters, D. T. S. Rijkers i R. M. J. Liskamp, *QSAR Comb. Sci.* **26** (2007) 1181–1190.
215. A. J. Dirks, J. Cornelissen, F. L. van Delft, J. C. M. van Hest, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan i F. Rutjes, *QSAR Comb. Sci.* **26** (2007) 1200–1210.
216. C. M. Salisbury i B. F. Cravatt, *QSAR Comb. Sci.* **26** (2007) 1229–1238.
217. J. M. Baskin i C. R. Bertozzi, *QSAR Comb. Sci.* **26** (2007) 1211–1219.
218. J. F. Lutz, *Angew. Chem.* **120** (2008) 2212–2214.

-
219. J. F. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 2182–2184.
220. J. F. Lutz i H. G. Borner, *Prog. Polym. Sci.* **33** (2008) 1–39.
221. J.-F. Lutz i Z. Zarafshani, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60** (2008) 958–970.
222. W. H. Binder i C. Kluger, *Curr. Org. Chem.* **10** (2006) 1791–1815.
223. H. Nandivada, X. W. Jiang i J. Lahann, *Adv. Mater.* **19** (2007) 2197–2208.
224. D. Fournier, R. Hoogenboom i U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.* **36** (2007) 1369–1380.
225. P. L. Golas i K. Matyjaszewski, *QSAR Comb. Sci.* **26** (2007) 1116–1134.
226. O. S. Miljanic, W. R. Dichtel, I. Aprahamian, R. D. Rohde, H. D. Agnew, J. R. Heath i J. F. Stoddart, *QSAR Comb. Sci.* **26** (2007) 1165–1174.
227. D. D. Diaz, K. Rajagopal, E. Strable, J. Schneider i M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 6056–6057.
228. D. W. Dodd, N. D. Jones i R. H. E. Hudson, *Artif. DNA PNA XNA* **1** (2010) 90–95.
229. J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond i T. Carell, *Org. Lett.* **8** (2006) 3639–3642.
230. A. Nuzzi, A. Massi i A. Dondoni, *QSAR Comb. Sci.* **26** (2007) 1191–1199.
231. A. Dondoni i A. Marra, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 7546–7557. i reference tamo citirane
232. J. A. F. Joosten, N. T. H. Tholen, F. Ait El Maate, A. J. Brouwer, G. W. van Esse, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp i R. J. Pieters, *Eur. J. Org. Chem.* **15** (2005) 3182–3185.
233. E. Fernandez-Megia, J. Correa, I. Rodríguez-Meizoso i R. Riguera, *Macromolecules* **39** (2006) 2113–2120.
234. Z. Guo, A. Lei, X. Liang i Q. Xu, *Chem. Commun.* (2006) 4512–4514.
235. J. N. Wilson i E. T. Kool, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 4265–4274.
236. H. Peacock, O. Maydanovych i P. A. Beal, *Org. Lett.* **12** (2010) 1044–1047.
237. A. Okamoto, Y. Saito i I. Saito, *J. Photoch. Photobio. C* **6** (2005) 108–122.
238. J. H. Huffman, R. W. Sidwell, G. P. Khare, J. T. Witkowski, L. B. Allen i R. K. Robins, *Antimicrob. Agents Ch.* **3** (1973) 235–241.
239. D. G. Streeter, J. T. Witkowski, G. P. Khare, R. W. Sidwell, R. J. Bauer, R. K. Robins i L. N. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70** (1973) 1174–1178.
240. J. Lin, V. Roy, L. Wang, L. You, L. A. Agrofoglio, D. Deville-Bonne, T. R. McBrayer, S. J. Coats, R. F. Schinazi i S. Eriksson, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 3261–3269.

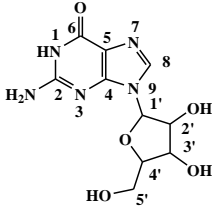
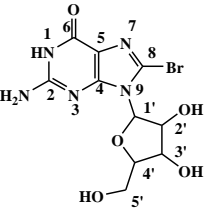
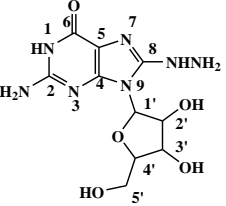
-
241. D. W. Dodd, K. N. Swanick, J. T. Price, A. L. Brazeau, M. J. Ferguson, N. D. Jones i R. H. E. Hudson, *Org. Biomol. Chem.* **8** (2010) 663–666.
242. N. K. Andersen, H. Dossing, F. Jensen, B. Vester i P. Nielsen, *J. Org. Chem.* **76** (2011) 6177–6187.
243. P. Kumar, N. Chandak, P. Nielsen i P. K. Sharma, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 3843–3849.
244. H. Peacock, E. Fostvedt i P. A. Beal, *ACS Chem. Biol.* **5** (2010) 1115–1124.
245. P. Ding, D. Wunnicke, H.-J. Steinhoff i F. Seela, *Chem. Eur. J.* **16** (2010) 14385–14396.
246. T. Kuboyama, M. Nakahara, M. Yoshino, Y. Cui, T. Sako, Y. Wada, T. Imanishi, S. Obika, Y. Watanabe, M. Suzuki, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 249–255.
247. A. Dierckx, P. Diner, A. H. El-Sagheer, J. D. Kumar, T. Brown, M. Grotli i L. M. Wilhelmsson, *Nucleic Acids Res.* **39** (2011) 4513–4524.
248. D. W. Dodd, K. N. Swanick, J. T. Price, A. L. Brazeau, M. J. Ferguson, N. D. Jones i R. H. E. Hudson, *Org. Biomol. Chem.* **8** (2010) 663–666.
249. C. Beyer i H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **46** (2010) 2230–2231.
250. M. E. Ostergaard, D. C. Guenther, P. Kumar, B. Baral, L. Deobald, A. J. Paszczynski, P. K. Sharma i P. J. Hrdlicka, *Chem. Commun.* **46** (2010) 4929–4931.
251. Y. Bourne, H. C. Kolb, Z. Radić, K. B. Sharpless, P. Taylor i P. Marchot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (2004) 1449–1454.
252. S. G. Agalave, S. R. Maujan i V. S. Pore, *Chem. Asian J.* **6** (2011) 2696–2718.
253. M. K. Lakshman, M. K. Singh, D. Parrish, R. Balachandran i B. W. Day, *J. Org. Chem.* **75** (2010) 2461–2473.
254. S. C. Mathew, Y. By, A. Berthault, M.-A. Virolleaud, L. Carrega, G. Chouraqui, L. Commeiras, J. Condo, M. Attolini, A. Gaudel-Siri, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **8** (2010) 3874–3881.
255. J. Rody i M. Slongo, *Eur. Pat.* 80-810394, 1981 (*Chem. Abstr.*, 1981, **95**, 187267).
256. A. M. S. Abdennabi, A. I. Abdulhadi, S. T. Abu-Orabi i H. Saricimen, *Corrosion Sci.* **38** (1996) 1791–1800.
257. K. K. Nippon Kasei Kogyo, Japan *Jpn. Pat.* 5610882, 1981 (*Chem. Abstr.*, 1981, **96**, 56298).

-
258. I. K. Boddy, G. G. Briggs, R. P. Harrison, T. H. Jones, M. J. O'Mahony, I. D. Marlow, B. G. Roberts, R. J. Willis i R. Bardsley, *J. Reid. Pestic. Sci.* **48** (1996) 189–196.
259. K. H. Buechel, H. Gold, P. E. Frohberger i H. Kaspers, *Ger. Pat.* 2407305, 1975 (*Chem. Abstr.*, 1975, **83**, 206290).
260. F. Reisser, *British. Pat.* 8101239, 1981 (*Chem. Abstr.*, 1981, **96**, 69006).
261. H. R. Krueger, U. Schroeer, D. Baumert i H. Joppien, *Ger. Pat.* 2936951, 1981 (*Chem. Abstr.*, 1981, **96**, 52509).
262. R. E. Holmes i R. K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.* **86** (1964) 1242–1245.
263. R. Shapiro i S. C. Agarwal, *Biochim. Biophys. Acta* **24** (1966) 401.
264. M. Ikehara, H. Tada i K. Muneyama, *Chem. Pharm. Bull.* **13** (1965) 639.
265. R. A. Long, R. K. Robins i L. B. Townsend, *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*, W. W. Zorbach, R. S. Tipson (ured.), Vol. 1, Wiley-Interscience, New York, 1968, str. 228–229.
266. T.-S. Lin, J.-C Cheng, K. Ishiguro i A. C. Sartorelli, *J. Med. Chem.* **28** (1985) 1194–1198.
267. M. Saneyoshi, *Chem. Pharm. Bull.* **16** (1968) 1616–1619.
268. I. Pérez-Castro, O. Caamaño, F. Fernández, M. D. García, C. López i E. De Clercq, *Arkivoc* **iii** (2010) 152–168.
269. P. Müller i H. Imogaï, *Tetrahedron: Asymmetry* **9** (1998) 4419–4428.
270. T. B. Johnson i C. O. Johns, *J. Biol. Chem.* **1** (1906) 305–318.
271. J.-I. Asakura i M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **55** (1990) 4928–4933.
272. Z. Janeba, J. Balzarini, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq i M. J. Robins, *Can. J. Chem.* **84** (2006) 580–586.
273. F. Amblard, V. Aucagne, P. Guenot, R. F. Schinazi i L. A. Agrofoglio, *Bioorg. Med. Chem.* **13** (2005) 1239–1248.
274. N. J. Leonard i K. L. Carraway, *J. Heterocycl. Chem.* **3** (1966) 485–489.
275. L. B. Townsend i R. S. Tipson, *Nucleic Acid Chemistry*, L. B. Townsend, R. S. Tipson (ured.), Part 1, Wiley-Interscience, New York, 1978, str. 341.
276. P. Chittepu, V. R. Sirivolu i F. Seela, *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 8427–8439.
277. J. H. Hunter, *The Upjohn Company, French Patent 1513754*, 1968 (*Chem. Abstr.*, 1969, **71**, 50465).
278. M. Erdélyi i A. Gogoll, *J. Org. Chem.* **66** (2001) 4165–4169.

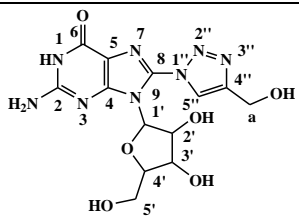
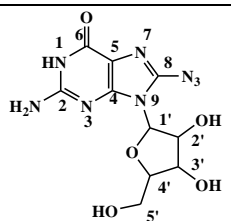
-
279. J. L. Sessler i R. Wang, *J. Org. Chem.* **63** (1998) 4079–4091.
280. N. Horiuchi, K. Nagawa, Y. Sasaki, K. Minato, Y. Fujiwara, K. Nezu, Y. Ohe i N. Sajo, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **22** (1988) 246–250.
281. H. Peacock, O. Maydanovych i P. A. Beal, *Org. Lett.* **12** (2010) 1044–1047.
282. Y. Matsuya, T. Itoh, K. Nagata i A. Ohsawa, *Tetrahedron* **53** (1997) 15701–15710.
283. C. Temple Jr., M. C. Thorpe, W. C. Coburn Jr. i J. A. Montgomery, *J. Org. Chem.* **31** (1966) 935–938.
284. C. Temple Jr., C. L. Kussner i J. A. Montgomery, *J. Org. Chem.* **31** (1966) 2210–2215.
285. S. Brase, C. Gil, K. Knepper i V. Zimmerman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005) 5188–5240.
286. V. D. Bock, H. Hiemstra i J. H. Van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **1** (2006) 51–68.
287. B. F. Straub, *Chem. Commun.* (2007) 3868–3870.
288. J.-L. M. Abboud, C. Foces-Foces, R. Notario, R. E. Trifonov, A. P. Volovodenko, V. A. Ostovskii, I. Alkorta i J. Elguero, *Eur. J. Org. Chem.* **16** (2001) 3013–3024.
289. B. Kašnar, I. Krizmanić i M. Žinić, *Nucleos. Nucleot.* **16** (1997) 1067–1071.
290. B. Žinić, I. Krizmanić, D. Vikić-Topić i M. Žinić, *Croat. Chem. Acta* **72** (1999) 957–966.
291. Z. Paryzek, H. Koenig i B. Tabacka, *Synthesis* **13** (2003) 2023–2026.
292. T. Bieg i W. Szeja, *Synthesis* **1** (1985) 76–77.

7. DODATAK

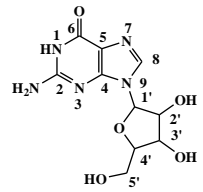
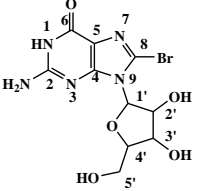
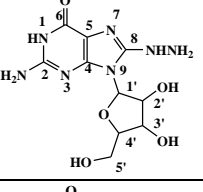
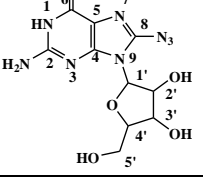
Tablica D1. ¹H NMR spektri gvanozina **1** i gvanozinskih derivata **2**, **3**, **4** i **5**.

Strukturna formula			
H-5'	3,51 - 3,54, m, 1H	3,47 - 3,55, m, 1H	3,59, m, 2H
H-5'	3,60 - 3,63, m, 1H	3,61 - 3,70, m, 1H	
H-4'	3,87, dd, 1H, $J_1 = 7,5$, $J_2 = 3,8$ Hz	3,86, dd, 1H, $J_1 = 8,6$, $J_2 = 5,2$ Hz	3,84, m, 1H
H-3'	4,09, dd, 1H, $J_1 = 8,4$, $J_2 = 4,6$ Hz	4,14, dd, 1H, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 5,1$ Hz	4,05, m, 1H
CH ₂ -a	-	-	-
OH-5'	4,40, dd, 1H, $J_1 = 11,2$, $J_2 = 5,8$ Hz	4,93, t, 1H, $J = 6,00$ Hz	5,60, bs, 1H
H-2'	5,02, t, 1H, $J = 5,5$ Hz	5,01, dd, 1H, $J_1 = 11,9$, $J_2 = 6,0$ Hz	4,47, m, 1H
OH-3'	5,10, d, 1H, $J = 4,7$ Hz	5,10, d, 1H, $J = 5,1$ Hz	5,21, bd, 1H
OH-a	-	-	-
OH-2'	5,37, d, 1H, $J = 6,0$ Hz	5,46, d, 1H, $J = 6,2$ Hz	5,01, bs, 1H
H-1'	5,69, d, 1H, $J = 6,0$ Hz	5,68, d, 1H, $J = 6,3$ Hz	5,70, d, 1H, $J = 8,5$ Hz
NH ₂	6,45, s, 2H	6,51, bs, 2H	6,22, bs, 2H
NH-1	10,63, s, 1H	10,60, bs, 1H	11,00, bs, 1H
H-8	7,93, s, 1H	-	-
NH-8	-	-	?
NH ₂ -8	-	-	7,31, bs, 2H
CH-5''	-	-	-

-	8.41, s, 1H
-	-
-	-
10.78, bs, 1H	11.05, bs, 1H
6.50, bs, 2H	6.63, bs, 2H
5.55, d, 1H, $J = 6.3$ Hz	5.64, bs, 1H
4.95 - 5.40, m, 1H	5.46, d, 1H, $J = 6.5$ Hz
-	5.40, bs, 2H
4.95 - 5.40, m, 1H	5.04, bs, 1H
4.75, t, 1H, $J = 5.8$ Hz	4.84, t, 1H, $J = 5.8$ Hz
4.95 - 5.40, m, 1H	4.63, s, 2H
-	3.98, m, 1H
4.09, m, 1H	3.83, m, 1H
3.80, m, 1H	3.60, m, 1H
3.60, m, 1H	3.48, m, 1H
3.48, m, 1H	3.48, m, 1H

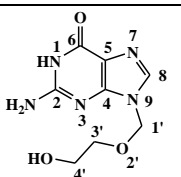
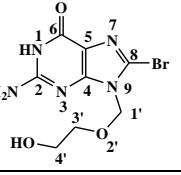
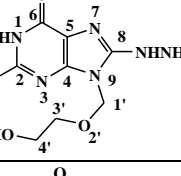
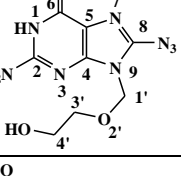
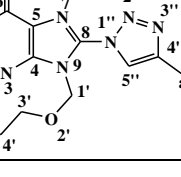


Tablica D2. ¹³C NMR spektri gvanozina **1** i gvanozinskih derivata **2**, **3** i **5**.

Strukturna formula	C-6	C-2	C-4	C-4''	C-8	C-5''	C-5	C-1'	C-4'	C-2'	C-3'	C-5'	C-4
	156,72, s	153,64, s	151,29, s	-	135,55, d	-	116,69, s	86,34, d	85,18, d	73,68, d	70,35, d	61,38, d	-
	155,53, s	153,50, s	152,13, s	-	121,27, s	-	117,55, s	89,72, d	85,90, d	70,57, d	70,34, d	62,06, t	-
	155,68, s	153,69, s	152,34, s	-	151,41, s	-	112,21, s	85,91, d	85,12, d	70,65, d	70,20, d	61,14, t	-
	Nije snimljen zbog nestabilnosti spoja!												

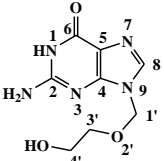
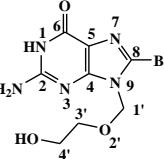
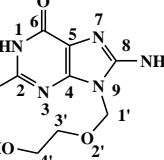
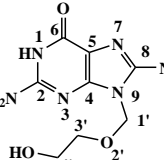
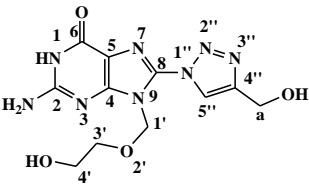
	156.83, s	153.56, s	151.22, s	148.11, s	134.97, s	125.63, d	115.23, s	88.60, d	86.24, d	70.92, d	70.72, d	62.16, t	54.63, t
--	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

Tablica D3. ¹H NMR spektri aciklovira 6 i derivata aciklovira 7–12 i 14.

Strukturna formula	CH ₂ -3' CH ₂ -4'	CH ₂ -a	OH-4'	OH-a	CH ₂ -1'	NH ₂	Realizirani protoni (1, 1A, 2, 2A)	CH-5''	H-8	NH-1	NH-8	NH ₂ -8	OH-c	OH-d
	3,47, m, 4H	-	4,72, bs, 1H	-	5,35, s, 2H	6,52, bs, 2H	-	-	7,82, s, 1H	10,67, bs, 1H	-	-	-	-
	3,47, m, 4H	-	4,68, t, 1H, J = 5,3 Hz	-	5,30, s, 2H	6,62, bs, 2H	-	-	-	10,74, bs, 1H	-	-	-	-
	3,45, m, 4H	-	4,67, pt, 1H	-	5,20, s, 2H	6,29, s, 2H	-	-	-	10,43, bs, 1H	7,29, s, 1H	4,12, bs, 2H	-	-
	3,48, m, 4H	-	4,66, bs, 1H	-	5,14, s, 2H	6,57, s, 2H	-	-	-	10,71, s, 1H	-	-	-	-
	3,40, m, 4H	4,63, m, 3H	-	5,39, t, 1H, J = 5,4 Hz	5,49, s, 2H	6,75, bs, 2H	-	8,54, s, 1H	-	10,89, s, 1H	-	-	-	-
CH ₂ -c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH ₂ -b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH ₂ -d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.47, dd, 2H, $J = 6.3, J_2 = 11.6$ Hz	1.48, m, 2H	-
1.82, m, 2H	1.70, m, 2H	-
3.38, m, 4H	3.38, m, 4H	3.40, m, 4H
2.77, t, 2H, $J = 7.6$ Hz	2.74, t, 2H, $J = 7.3$ Hz	4.96, s, 2H
4.53, t, 1H, $J = 5.1$ Hz	4.40, t, 1H, $J = 5.1$ Hz	4.58, t, 1H
-	-	-
5.51, s, 2H	5.50, s, 2H	5.48, s, 2H
6.74, bs, 2H	6.74, bs, 2H	6.75, bs, 2H
-	-	7.83 - 7.93, m, 4H
8.48, s, 1H	8.47, s, 1H	8.74, s, 1H
-	-	-
10.88, s, 1H	10.88, s, 1H	10.88, bs, 1H
-	-	-
-	-	-
4.61, t, 1H, $J = 5.2$ Hz	-	-
-	4.60, pt, 1H	-


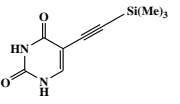
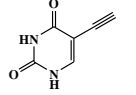
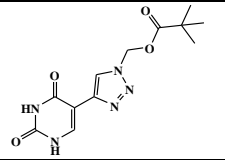
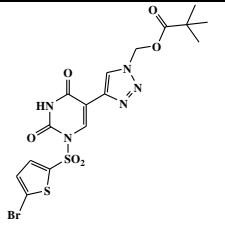
Tablica D4. ¹³C NMR spektri aciklovira 6 i derivata aciklovira 7–12 i 14.

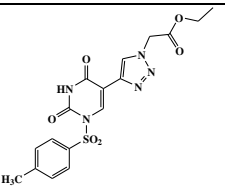
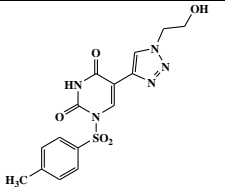
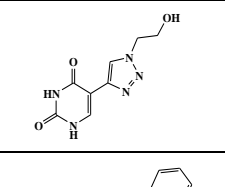
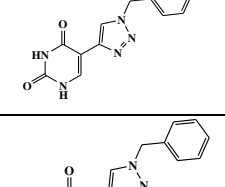
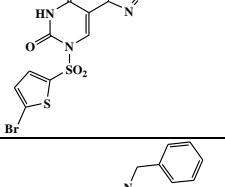
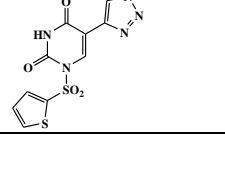
Strukturna formula	4, 4A (falsimidni)	C-6	C-2	C-4	C-8	C-4''	2, 2A (falsimidni)	3, 3A (falsimidni)	C-5''	1, 1A (falsimidni)	C-5	C-1'	C-3'	C-4'	C-8	C-6	C-e	C-d
	-	157,07, s	153,94, s	151,53, s	137,99, d	-	-	-	-	-	116,42, s	72,13, t	70,45, t	59,97, t	-	-	-	-
	-	155,55, s	154,17, s	152,86, s	120,91, s	-	-	-	-	-	116,58, s	72,39, t	70,81, t	59,85, t	-	-	-	-
	-	155,64, s	152,66, s	151,78, s	151,37, s	-	-	-	-	-	112,28, s	70,09, t	69,85, t	59,90, t	-	-	-	-
	-	155,56, s	153,82, s	151,67, s	140,10, s	-	-	-	-	-	113,70, s	70,89, t	70,66, t	59,86, t	-	-	-	-
	-	156,37, s	154,64, s	152,15, s	136,02, s	148,14, s	-	-	124,09, d	-	113,80, s	71,93, t	70,83, t	59,71, t	54,57, t	-	-	-

	-	24.41, t	-
	21.39, t	25.17, t	-
	31.94, t	31.77, t	-
	59.74, t	59.64, t	32.66, t
	59.89, t	60.26, t	59.69, t
	70.79, t	70.69, t	70.80, t
	71.99, t	71.89, t	73.70, t
	113.76, s	113.67, s	113.77, s
	-	-	123.34 123.20, d
	123.25, d	123.17, d	124.52, d
	-	-	131.65, s
	147.15, s	147.21, s	142.68, s
	136.15, s	136.05, s	135.72, s
	152.15, s	152.06, s	152.12, s
	154.63, s	154.53, s	154.63, s
	156.37, s	156.28, s	156.29, s
	-	-	167.34, s

	-	-	2.43, s, 3H	-	-
	-	-	-	3.23, s, 3H	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	4.77, s, 2H 4.54, s, 2H 4.21, s, 5H 4.41, m, 2H 2.71, m, 2H 1.91, m, 2H 1.66, m, 2H 1.37, m, 2H
	5.67, s, 2H	5.21, s, 2H	5.22, s, 2H	-	-
8.11, dd, 1H, $J_1 = 4.0, J_2 = 1.5$ Hz	-	-	-	-	-
8.28, dd, 1H, $J_1 = 5.0, J_2 = 1.4$ Hz	-	-	-	-	-
7.30 - 7.38, m, 6H (Ph, H-tolenski)	7.38, m, 5H	8.01, d, 2H, $J = 8.4$ Hz 7.50, d, 2H, $J = 8.2$ Hz 7.37 - 7.41, m, 3H	-	-	-
8.49, s, 1H	8.06, s, 1H	8.53, s, 1H	8.02, s, 1H	7.98, s, 1H	-
8.66, s, 1H	8.42, s, 1H	8.76, s, 1H	8.29, s, 1H	8.26, s, 1H	-
-	11.22, bs, 1H	-	11.19, bs, 1H	11.16, s, 1H	-
12.14, bs, 1H	11.43, s, 1H	12.07, bs, 1H	11.40, s, 1H	11.39, s, 1H	-
-	-	-	-	-	-

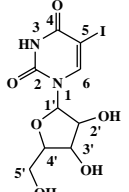
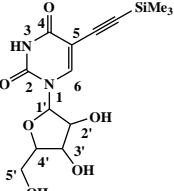
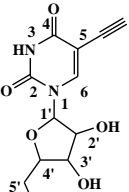
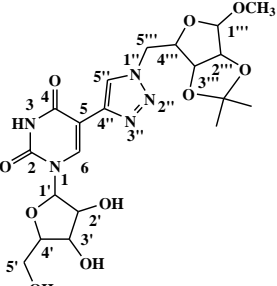
Tablica D6. ^{13}C NMR spektri 5-joduracila **16** i uracilnih derivata **17–20** i **25–41**.

CH_3	-	-0,10, q	-	-	-
$(\text{CH}_2)_2\text{C}$	-	-	-	26,43, q	26,47, q
$(\text{CH}_2)_2\text{CCO}$	-	-	-	38,16, s	Nije izražen!
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$	-	-	-	-	-
C-1'	-	45,78, s	83,11, s	-	-
OCH_2CH_3	-	-	-	-	-
OCH_2CH_3	-	-	-	-	-
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$	-	-	-	-	-
CH_2	-	-	-	69,99, t	70,10, t
OCH_2Ph	-	-	-	-	-
C-5''	-	-	-	-	-
OCH_3	-	-	-	-	-
C-3''(C-2'')	-	-	-	-	-
C-2''(C-3'')	-	-	-	-	-
C-4''	-	-	-	-	-
Pirocenski signali					
C-2'	-	96,84, s	76,51, d Signal izlazi na suprotnoj strani!	-	-
C-5	67,41, s	98,20, s	96,22, s	103,24, s	106,86, s
C-1''	-	-	-	-	-
$(\text{CH}_2)_2\text{C}$	-	-	-	-	-
C-5'	-	-	-	122,76, d	131,64, d
CH_2Br (CH_2HS)	-	-	-	-	124,90, s
Ph	-	-	-	-	-
Ts	-	-	-	-	-
CH_2Br (CH_2HS)	-	-	-	-	132,36, d
CH_2HS	-	-	-	-	135,05, d
CH_2HS	-	-	-	-	138,00, s
C-6	146,92, d	146,55, d	146,36, d	138,00, d	138,71, d
C-4'	-	-	-	139,38, s	146,79, s
C-2	151,16, s	150,26, s	150,36, s	150,48, s	153,70, s
C-4	161,38, s	162,38, s	162,64, s	162,03, s	161,02, s
COOCH_3	-	-	-	176,45, s	176,49, s
$(\text{CH}_2)_2\text{CO}$	-	-	-	-	-
					
					
					
					
					

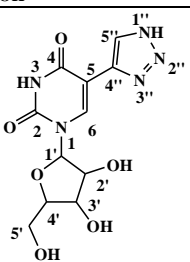
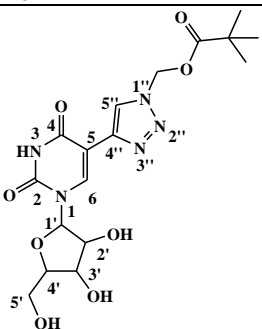
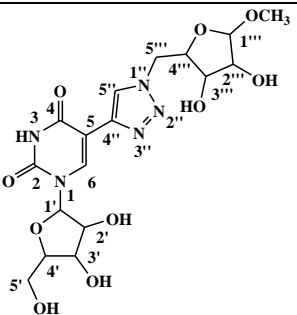
					
21.12, q	21.20, q	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	52.26, t	52.13, t	-	-	-
-	-	-	-	-	-
13.89, q	-	-	-	-	-
61.41, t	-	-	-	-	-
-	59.88, t	59.93, t	-	-	-
50.35, t	-	-	52.70, t	52.81, t	52.79, t
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
106.82, s	107.14, s	104.00, s	103.79, s	107.37, s	107.16, s
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
124.72, d	123.76, d	122.41, d	122.03, d	123.48, d	123.42, d
-	-	-	-	124.82, s	128.12, d
-	-	-	139.29, s	137.95, s	137.86, s
-	-	-	128.75, d	128.76, d	128.72, d
-	-	-	128.11, d	128.16, d	128.09, d
-	-	-	127.94, d	127.93, d	127.90, d
146.42, s	146.51, s	-	-	-	-
132.88, s	132.88, s	-	-	-	-
129.80, d	129.89, d	-	-	-	-
129.14, d	129.20, d	-	-	-	-
-	-	-	-	131.61, d	138.00, d
-	-	-	-	131.82, d	131.93, d
-	-	-	-	135.14, s	134.55, s
-	-	-	-	137.61, d	138.57, d
132.34, d	132.09, d	137.33, d	137.61, d	138.60, d	138.57, d
137.64, s	137.45, s	138.76, s	136.17, s	136.03, s	135.96, s
146.46, s	146.55, s	150.59, s	150.58, s	146.88, s	146.52, s
160.97, s	161.07, s	162.16, s	162.16, s	161.17, s	160.92, s
167.07, s	-	-	-	-	-

-	21,22, q	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
50,27, t	50,42, t	-	49,21, t 38,51, t 29,68, t 25,66, t 23,27, t
66,70, t	66,79, t	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	57,90, q	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	79,03, s 71,89, d 69,44, d 68,98, d
-	-	-	-
103,69, s	106,84, s	103,9, s	103,97, s
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
123,45, d	124,85, d	122,29, d	121,86, d
-	-	-	-
139,00, s 128,46, d 128,26, d 128,10, d	137,76, s 128,49, d 128,29, d 128,11, d	-	-
-	146,53, s 132,89, s 129,89, d 129,26, d	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
137,64, d	132,43, d	137,41, d	137,36, d
135,40, s	135,38, s	138,90, s	138,87, s
150,58, s	146,56, s	150,56, s	150,52, s
162,15, s	161,09, s	162,13, s	162,11, s
167,27, s	167,19, s	-	-
-	-	-	203,19, s

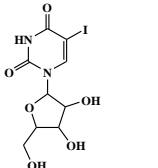
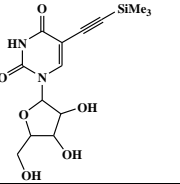
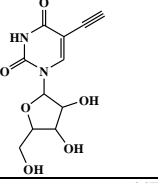
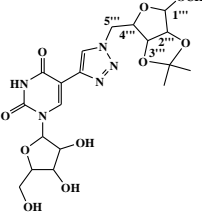
Tablica D7. ¹H NMR spektri 5-joduridina **43** i uridinskih derivata **44–55**.

CH ₃	-	0.19, s, 9H	-	-	1.37, s, 3H 1.25, s, 3H
OCH ₃	-	-	-	-	3.29, s, 3H
CH-2''	-	-	4.07, s, 1H	-	-
H-5''	3.57, dd, 1H, J ₁ = 12.0, J ₂ = 2.4 Hz	3.57, d, 1H, J = 11.9 Hz	3.58, ddd, 1H, J ₁ = 12.0, J ₂ = 4.6, J ₃ = 2.8 Hz	3.52 - 3.70, m, 2H	-
H-5'	3.68, dd, 1H, J ₁ = 12.0, J ₂ = 2.7 Hz	3.68, d, 1H, J = 12.0 Hz	3.68, ddd, 1H, J ₁ = 12.0, J ₂ = 4.7, J ₃ = 3.0 Hz	-	-
CH ₂ CH ₂ O	-	-	-	-	-
H-5'''	-	-	-	4.41 - 4.61, m, 1H	-
H-4'	3.84 - 3.88, m, 1H	3.83 - 3.88, m, 1H	3.85 - 3.88, m, 1H	3.90, q, 1H, J = 3.1 Hz	-
H-3' (H-2)	3.98, t, 1H, J = 4.8 Hz	3.98, t, 1H, J = 4.8 Hz	3.99, dd, 1H, J ₁ = 10.0, J ₂ = 5.0 Hz	4.01, dd, 1H, J ₁ = 8.9, J ₂ = 4.8 Hz	-
H-4'''	-	-	-	4.41 - 4.61, m, 1H	-
OCH ₂	-	-	-	-	-
H-2' (H-3')	4.03, t, 1H, J = 4.8 Hz	4.05, t, 1H, J = 4.7 Hz	4.05, dd, 1H, J ₁ = 10.1, J ₂ = 5.0 Hz	4.15, dd, 1H, J ₁ = 10.9, J ₂ = 5.5 Hz	-
CH ₂ CH ₂ O	-	-	-	-	-
H-3'''	-	-	-	4.67, d, 1H, J = 5.9 Hz	-
H-2'''	-	-	-	4.80, d, 1H, J = 6.0 Hz	-
H-1'''	-	-	-	4.97, s, 1H	-
OH-2''', OH-3''	-	-	-	-	-
OH-3' (OH-2')	-	5.03, bs, 1H	5.02, d, 1H, J = 5.4 Hz	5.09, m, 2H	-
OH-5'	5.20, bs, 3H	5.16, s, 1H	5.19, t, 1H, J = 4.8 Hz	-	-
OH-2' (OH-3')	-	5.37, bs, 1H	5.37, d, 1H, J = 5.4 Hz	5.38, d, 1H, J = 5.7 Hz	-
CH ₃ , ferocenci protoni	-	-	-	-	-
H-1'	5.72, d, 1H, J = 4.7 Hz	5.74, d, 1H, J = 4.7 Hz	5.74, d, 1H, J = 4.7 Hz	5.90, d, 1H, J = 5.7 Hz	-
Ph	-	-	-	-	-
H-5''	-	-	-	8.47, s, 1H	-
H-6	8.47, s, 1H	8.32, s, 1H	8.36, s, 1H	8.60, s, 1H	-
NH-3	11.66, s, 1H	11.60, bs, 1H	11.60, s, 1H	11.67, s, 1H	-
NH-1''	-	-	-	-	-
Strukturna formula					

			1.12, s, 9H	
			-	
			3.19, s, 3H	
			-	
			3.55 - 3.67, m, 2H	3.59, d, 1H, $J = 10.8$ Hz
			-	3.65, d, 1H, $J = 11.2$ Hz
			-	-
			3.71, t, 1H, $J = 4.1$ Hz	-
			-	-
			3.83 - 3.94, m, 2H	3.90, dd, 1H, $J_1 = 6.1, J_2 = 2.7$ Hz
			-	-
			4.01, dd, 1H, $J_1 = 8.2, J_2 = 4.3$ Hz	4.01, d, 1H, $J = 4.1$ Hz
			4.13, m, 1H	-
			-	-
			4.13, m, 1H	4.14, dd, 1H, $J_1 = 10.3, J_2 = 5.1$ Hz
			-	-
			-	-
			4.43, dd, 1H, $J_1 = 14.3, J_2 = 6.9$ Hz	-
			-	-
			4.63 - 4.71, m, 2H	-
			-	-
			5.06 - 5.16, m, 4H	5.06, s, 1H
			-	5.07, s, 1H
			5.39, d, 1H, $J = 5.6$ Hz	5.38, d, 1H, $J = 5.4$ Hz
			-	-
			-	-
			5.90, d, 1H, $J = 5.7$ Hz	5.88, d, 1H, $J = 5.3$ Hz
			-	-
			8.31, s, 1H	8.12, s, 1H
			8.59, s, 1H	8.52, s, 1H
			11.66, s, 1H	11.65, s, 1H
			-	15.06, bs, 1H



Tablica D8. ^{13}C NMR spektri 5-joduridina **43** i uridinskih derivata **44–55**.

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$	-	-	-	-
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$	-	-	-	-
OCH_2Ph	-	-	-	-
Ph	-	-	-	-
OCH_2CH_3	-	-	-	-
OCH_2CH_3	-	-	-	-
$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CO}$	-	-	-	-
CH_2	-	-	-	-
C-5'''	-	-	-	52,32, t
OCH_3	-	-	-	54,73, q
Ferocenski signali	-	-	-	-
C-4'''	-	-	-	81,17, d
C-3'''(C-2''')	-	-	-	84,41, d
C-2'''(C-3''')	-	-	-	84,66, d
C-1'''	-	-	-	109,11, d
$(\text{CH}_3)_2\text{C}$	-	-	-	111,70, s
C-5''	-	-	-	124,09, d
C-4''	-	-	-	nije izabao
CH_3	-	-0,13, q	-	26,15, q 24,62, q
C-5'	60,17, t	60,16, t	60,21, t	61,04, t
C-3'(C-2')	69,23, d	69,20, d	69,30, d	70,18, d
C-2'(C-3')	73,90, d	73,75, d	73,90, d	73,71, d
C-4'	84,69, d	84,69, d	84,74, d	85,09, d
C-1'	88,28, d	88,39, d	88,39, d	87,91, d
C-1''	-	96,98, s	83,47, s	-
C-2''	-	97,81, s	76,24, d Signal izlazi na krivnoj slici!	-
C-5	69,35, s	98,27, s	97,60, s	105,34, s
C-6	145,10, d	144,76, d	144,58, d	136,24, d
C-2	150,33, s	149,57, s	149,59, s	150,01, s
C-4	160,43, s	161,29, s	161,49, s	161,04, s
COOCH_3	-	-	-	-
$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	-	-	-	-
Strukturna formula				

8. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

AIDS – *engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome*, sindrom stečene imunodeficijencije

APT – *engl. Attached Proton Test*

Bn – benzil

br – *engl. broad*, široki

BSA – *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamid

Bz – benzoil

CaCo-2 – karcinom debelog crijeva

CD – *engl. Circular Dichroism*, cirkularni dikroizam

COSY – *engl. Correlation Spectroscopy*

COD – ciklooktadien

CMV – Cytomegalovirus

Cp – ciklopentadienil

CuAAC – *engl. Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*, Cu(I) katalizirana azid-alkin cikloadicija

Cy₂NMe – *N,N*-dicikloheksilmetilamin

d – dublet

DBU – 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en

dd – dublet dubleta

DFT – *engl. Density Functional Theory*, teorija funkcionalne gustoće

DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamin

DME – 1,2-dimetoksietan

DMEDA – *N,N'*-dimetiletildiamin

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DMTr – dimetoksitritil

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

Et₃N – trietilamin

ES-MS (ESI-MS) – *engl. ElectroSpray Mass Spectrometry*, elektrosprej-spektrometrija mâsa

5-FU – 5-fluorouracil

FTIR – *engl. Fourier Transform Infrared spectroscopy*

GMP – gvanozin monofosfat

HBV – Hepatitis B virus
HCV – Hepatitis C virus
HeLa – adenokarcinom grlića vrata maternice (prvi puta izolirane iz pacijentice *Henriette Lacks*)
HETCOR – *eng. Heteronuclear Correlation*
HIV – *engl. Human Immunodeficiency Virus*, virus humane imunodeficijencije
HMPA – heksametilfosforamid
HMQC – *engl. Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation spectroscopy*
HRMS – *engl. High Resolution Mass Spectrometry*
HSQC – *engl. Heteronuclear Single Quantum Coherence*
HSV – Herpes simplex virus (Human herpes virus)
Hut 78 – limfom T-stanica
IR – *engl. Infrared*, infracrveno
Jurkat – leukemija T-stanica
K562 – kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi
m – *engl. medium*, srednje jak, multiplet
M – mol·L⁻¹
MDCK – *engl. Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells*, normalne epitelne stanice bubrega psa
MeOH – metanol
MS – *engl. Mass Spectrometry*, spektrometrija mase, masena spektrometrija
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NCI-H358 – bronhioalveolarni karcinom pluća
NDP – nukleozid-difosfat
NMP – *N*-metil-2-pirolidon
NMR – nuklearna magnetna rezonancija
NOSEY – *engl. Nuclear Overhauser Effect spectroscopy*
p – *para*
Ph – fenil
PMB – *p*-metoksibenzil
PNA – *engl. peptide nucleic acid*
POM-Cl – pivaloiloksimetil-klorid
P(*o*-tol)₃ – tri(*o*-tolil)fosfin
q – kvartet

Φ_F – *engl. quantum yield*, kvantni prinos fluorescencije
Raji – Burkittov limfom
 R_f – *engl. retention factor*, vrijeme zadržavanja
RNA – ribonoukleinska kiselina
 s – *engl. strong*, jak, singlet
SDS – natrijev dodecilsulfat
SNP – *engl. Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfizam pojedinačnog nukleotida
 t – triplet
TBAF – tetrabutilamonijev fluorid
TBDMS – *tert*-butildimetilsilil
THF – tetrahidrofuran
TIC – *engl. Total Ion Current*, ukupna ionska struja
 T_m – temperatura mekšanja
TMS – tetrametilsilan
TMSA – trimetilsililacetilen
o-tol – *orto*-tolil-, *o*-tolil-, *o*-metilfenil-
TsCl – tosil-klorid
t.t. – točka tališta
UV – *engl. Ultraviolet*, ultraljubičasto
VZV – Varicella zoster virus
vw – *engl. very weak*, vrlo slab
w – *engl. weak*, slab
WHO – *engl. World Health Organization*, Svjetska zdravstvena organizacija
 δ – kemijski pomak

Ime i prezime:	Dijana Saftić
Adresa:	Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju, Bijenička 54, 10000 Zagreb
Datum i mjesto rođenja:	13.03.1984., Sisak
Narodnost:	Hrvatica
Školovanje:	1998. g. OŠ Davorin Trstenjak, Hrv. Kostajnica 2002. g. Zdravstveno učilište, smjer: Farmaceutski tehničar, Zagreb
Diplomirala:	5.11.2007. na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu, naslov diplomskog rada: "Kvaterne soli piridoksal-oksima" (voditelj Prof. dr. sc. Jasna Vorkapić-Furač, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije)
Doktorski studij upisala:	2008. g.
Radno iskustvo:	1.04.2008. do danas, Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju
Područje rada:	Organska sinteza u području nukleozidne kemije i biološka evaluacija potencijalno biološki aktivnih spojeva, aktivni projekt "Sinteza novih biološki aktivnih derivata nukleobaza i nukleotida", (voditelj dr.sc. Biserka Žinić)
Jezici:	Engleski i njemački jezik
Druge vještine i kompetencije:	MS Windows OS i MS Office, software s primjenom u organskoj kemiji (ChemDraw, SpinWorks, Origin, MestReNova, Mercury)
Znanstveni radovi:	1. D. Saftić, B. Žinić, A. Višnjavec, <i>Tetrahedron</i> 68 (2012) 1062–1070. 2. M. Cetina, A. Nagl, D. Gašo-Sokač, S. Kovač, V. Bušić, D. Saftić, <i>J. Chem. Crystallogr.</i> 42 (2012) 7; 752–758.
Pozvana predavanja:	Refraktometrija i polarimetrija; Siječanj 2012., Listopad 2013., u okviru kolegija: Instrumentalne mjerne tehnike i fizikalne metode u biomedicinskoj analitici, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Medicinski fakultet, Sveučilišni preddiplomski studij biomedicinsko laboratorijskih tehnologija, Zavod za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju (D. Saftić, Ž. Ban i B. Žinić)

Usmena kongresna priopćenja:	XXIII. HRVATSKI SKUP KEMIČARA I KEMIJSKIH INŽENJERA, Osijek, Hrvatska (21.–24.04.2013.) "SYNTHESIS OF 9-SULFONYLPURINE DERIVATIVES AND STABILITY ENHANCEMENT WITH SMALL STRUCTURAL MODIFICATION" (Dijana Saftić , Josipa Matić, Željka Ban, Hamit Ismaili i Biserka Žinić)
Posterska kongresna priopćenja:	<ol style="list-style-type: none"> 1. KONGRES HRVATSKOG DRUŠTVA ZA BIOKEMIJU I MOLEKULARNU BIOLOGIJU HDBMB 2008., Osijek, Hrvatska (17.–20.09.2008.) "SYNTHESIS AND BIOEVALUATION OF 5-FLUOROURACIL DERIVATIVES" (Željka Žakić, Dijana Saftić, Nataša Župančić, Ljubica Glavaš-Obrovac i Biserka Žinić) 2. XXI. HRVATSKI SKUP KEMIČARA I KEMIJSKIH INŽENJERA, Split, Hrvatska (19.–22.04.2009.) <ol style="list-style-type: none"> a) "SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NOVEL PYRIMIDINE DERIVATIVES" (Dijana Saftić, Željka Žakić, Nataša Župančić, Ljubica Glavaš-Obrovac i Biserka Žinić) b) "QUATERNIZATION OF PYRIDOXAL OXIME WITH PHENACYL HALOGENIDES" (Dajana Gašo-Sokač, Spomenka Kovač, Valentina Bušić i Dijana Saftić) 3. 18th HRVATSKO-SLOVENSKI KRISTALOGRAFSKI SASTANAK, Varaždin, Hrvatska (17.–21.06.2009.) "SUPRAMOLECULAR STRUCTURES OF TWO PHENACYL PYRIDOXAL OXIME DERIVATIVES" (Mario Cetina, Ante Nagl, Dajana Gašo-Sokač, Dijana Saftić i Spomenka Kovač) 4. XXII. HRVATSKI SKUP KEMIČARA I KEMIJSKIH INŽENJERA, Zagreb, Hrvatska (13.–16.02.2011.) "SYNTHESIS OF NOVEL C-8 SUBSTITUTED PURINE DERIVATIVES - POTENTIAL ANTIVIRAL AGENTS" (Dijana Saftić i Biserka Žinić) 5. XX. INTERNATIONAL ROUNDTABLE ON NUCLEOSIDES NUCLEOTIDES AND NUCLEIC ACIDS, Montréal, Québec, Kanada (05.–09.08.2012.) "SYNTHESIS OF N-1-SULFONYL-5-(1,2,3-TRIAZOL-4-YL)URACIL DERIVATIVES AND EVALUATION OF THEIR ANTICANCER ACTIVITY" (Dijana Saftić, Ljubica Glavaš-Obrovac i Biserka Žinić)
Vodenje stručne prakse:	U okviru preddiplomskog studija Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, komentor stručne prakse u području organske sinteze u Laboratoriju za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković
Dodatna obrazovanja i usavršavanja:	Sudjelovanje na više profesionalnih seminara i radionici iz područja organske kemije: <ol style="list-style-type: none"> a) Mass spectroscopy - Quadrupole UPLC/MS Innovations and Applications, Slovenian-Croatian Waters LC & MS Users' Meeting, Moravske Toplice, Slovenija, 04.–07.11.2008. b) Stationary phase of the HPLC and UPLC columns (News in liquid chromatography),

	<p>Zagreb, Hrvatska, 03.03.2009.</p> <p>c) Cambridge Structural Database Workshop, Zagreb, Hrvatska, 03.–04.03.2010.).</p>
Dodatne aktivnosti i članstva:	<ol style="list-style-type: none">1. Članica Hrvatskog kemijskog društva (HKD)2. Članica organizacijskog odbora znanstvenog festivala mladih IRB-a (07.–08.07.2011.)3. Višegodišnji angažman u promociji znanosti u okviru Otvorenih dana Instituta Ruđer Bošković (24.–26.04.2008., 06.–08.05.2010., 18.–20.04.2013.)4. Sudjelovanje na Festivalu znanosti u Tehničkom muzeju u Zagrebu (X. festival 23.–28.04.2012., XI. festival 22.–27.04.2013.)