

N-SULFONILPURINI I PEPTIDNI DERIVATI FENANTRIDINA SINTEZA, INTERAKCIJE S POLINUKLEOTIDIMA I BIOLOŠKA ISPITIVANJA

Matić, Josipa

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:740737>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Josipa Matić

**N-SULFONILPURINI I PEPTIDNI
DERIVATI FENANTRIDINA – SINTEZA,
INTERAKCIJE S POLINUKLEOTIDIMA I
BIOLOŠKA ISPITIVANJA**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2016

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Josipa Matić

***N*-SULFONILPURINI I PEPTIDNI
DERIVATI FENANTRIDINA – SINTEZA,
INTERAKCIJE S POLINUKLEOTIDIMA I
BIOLOŠKA ISPITIVANJA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Biserka Žinić
Komentor: Dr. sc. Marijana Radić Stojković

Rijeka, 2016.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Josipa Matic

***N*-SULFONYLPURINES AND PEPTIDE
PHENANTHRIDINE DERIVATIVES –
SYNTHESIS, INTERACTIONS WITH
POLYNUCLEOTIDES AND BIOLOGICAL
TESTING**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2016.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Biserka Žinić
Komentor rada: Dr. sc. Marijana Radić Stojković

Doktorski rad obranjen je dana 28. listopada 2016. na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić
Doc. dr. sc. Karlo Wittine
Doc. dr. sc. Nela Malatesti
Prof. dr. sc. Biserka Žinić, znan. savj.
Dr. sc. Marijana Radić Stojković, znan. sur.

Hvala mentoricama, prof. dr. sc. Biserki Žinić i dr. sc. Marijani Radić Stojković na brojnim vrijednim savjetima i velikoj pomoći tijekom izrade doktorskog rada, na stručnom vodstvu, ali i poticanju kreativnosti.

Hvala svim, sadašnjim i bivšim, članovima Laboratorija za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković na pomoći, savjetima, raspravama i dobrom društvu. Posebno hvala mojim kolegicama iz Labosa 5C, dr. sc. Dijani Saftić, dr. sc. Željki Ban, mag. chem. Tamari Šmidlehner i Davorki Pevec Rak na nesebičnoj pomoći i dobrim idejama, vremenu koje su odvojile za mene tijekom izrade ovog rada te na ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac i njenoj istraživačkoj grupi s Medicinskog fakulteta u Osijeku na ispitivanju antitumorske aktivnosti pripremljenih spojeva.

Zahvaljujem dr. sc. Mariji Luić, dr. sc. Ivani Leščić Ašler i dr. sc. Goranu Mikleuševiću na ispitivanju inhibicije enzima PNP pomoću pripremljenih spojeva.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Carstenu Schmucku i njegovoj istraživačkoj grupi sa Sveučilišta Duisburg-Essen, posebno dipl. chem. Patryciuszu Piotrowskom na pripremljenim gvanidinopirolnim prekursorima.

Zahvaljujem svim članovima Centra za NMR Instituta Ruđer Bošković, posebno mr. sc. Željku Mariniću i dr. sc. Vilku Smrečkom, na pomoći kod asignacije spektara.

Zahvaljujem članovima Laboratorija za biomimetičku kemiju Instituta Ruđer Bošković na brojnim korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada, posebno hvala dipl. ing. Lidiji Brkljačić na pomoći kod identifikacije spojeva masenom spektrometrijom.

Hvala svim mojim prijateljima na podršci tijekom izrade ovog rada.

Na kraju, veliko hvala mojim roditeljima i Borisu na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i strpljenju.

SAŽETAK

***N*-sulfonilpurini i peptidni derivati fenantridina – sinteza, interakcije s polinukleotidima i biološka ispitivanja**

U ovom radu istražene su metode pripreme i svojstva dvije vrste biološki aktivnih heterocikla iz grupe malih molekula: 1) *N*-sulfonilpurina (potencijalnih antitumorskih lijekova i inhibitora enzima purin nukleozid fosforilaze) i 2) peptidnih derivata fenantridina (potencijalnih antitumorskih lijekova i fluorescentnih senzora).

Pripravljena je serija C6, N9 supstituiranih purina sa sulfonamidnim farmakoforima. Najprije je sintetizirana serija 6-klorpurinskih derivata uvođenjem sulfonilnog supstituenta u položaj N9 purinske baze. Potom su, supstitucijom klora u C6 položaju, sintetizirani 6-morfolino- i 6-bis(2-hidroksietil)amino-derivati *N*-9-sulfonilpurina.

Biološka aktivnost 6-morfolino- i 6-bis(2-hidroksietil)amino-derivata purina ispitana je MTT testom na staničnim linijama leukemije i limfoma (Raji, HuT 78, K-562), karcinoma (CaCo-2, HeLa) i na normalnoj staničnoj liniji (MDCK I). Najjači citotoksični učinak pokazao je 6-morfolino-derivat **17** s *trans*- β -stirensulfonilnim supstituentom u N9 položaju purina na svim ispitanim staničnim linijama. 6-morfolinski derivati s tosilnim, naftilsulfonilnim i bifenilsulfonilnim supstituentom u N9 položaju purina (**8**, **9** i **10**) pokazali su srednje jako antiproliferativno djelovanje na Raji i HuT 78 stanične linije, a spojevi **9** i **10** pokazali su i srednje jako djelovanje na stanice K-562.

Ispitana je i sposobnost inhibicije PNP enzima izoliranog iz dva soja bakterije *Helicobacter pylori* te PNP enzima iz bakterije *Escherichia coli*. Najbolji rezultati dobiveni su s 6-morfolino-derivatima **8** i **18**.

Peptidni derivati fenantridina pripremljeni su klasičnim metodama peptidne kemije (sinteza u otopini). Negishijevom reakcijom pripremljen je alaninski derivat fenantridina **22** koji je funkcionaliziran peptidnom okosnicom nadograđenom preko N-terminalnog kraja. Pripremljeni su di-, tri- i tetrapeptidni derivati s fenantridinom u bočnom lancu, koji sadrže gvanidinopirolnu, gvanidinsku (arginin), pirensku ili fluorensku strukturnu jedinicu. Gvanidinopirolni i argininski derivati prevedeni su u hidrokloridne soli.

Ispitane su interakcije odabranih spojeva (gvanidinopirolni derivati **28b** i **29b**) s polinukleotidima pomoću spektrofotometrijskih (UV/Vis, CD, fluorimetrija) metoda. Spojevi su, ovisno o konformaciji u kojoj se nalaze, pokazali različiti tip interakcija. Spoj **28b**, čiji

kromofori nisu u intramolekulskoj interakciji u blago kiselom mediju, najvjerojatnije se veže u mali utor DNA i veliki utor RNA. Spoj **29b**, čiji kromofori su u intramolekulskoj π - π interakciji, veže se uz okosnicu polinukleotida. U neutralnom mediju oba spoja aglomeriraju uz fosfatnu okosnicu.

Ključne riječi: *N*-sulfonilpurini, antitumorska aktivnost, inhibicija purin nukleozid fosforilaze, peptidni derivati fenantridina, fluorescentne probe

SUMMARY

***N*-sulfonylpurines and peptide phenanthridine derivatives – synthesis, interactions with polynucleotides and biological testing**

The thesis presents preparation and characteristics of two types of biologically active heterocyclic small molecules: 1) *N*-sulfonylpurines (potential antitumor agents and inhibitors of the purine nucleoside phosphorylase enzyme, and 2) peptide phenanthridine derivatives (potential antitumor agents and fluorescent probes).

Series of C6, N9 substituted purines bearing sulfonamide pharmacophore has been prepared. Series of 6-chloropurine derivatives has been prepared by introduction of sulfonyl substituent at the N9 position of the purine base. Substitution of chlorine at the C6 position yielded 6-morpholino- and 6-bis(2-hydroxyethyl)amino-derivatives of *N*-9-sulfonylpurine.

Biological activities 6-morpholino- and 6-bis(2-hydroxyethyl)aminopurine derivatives have been tested by MTT test on the leukemia and lymphoma (Raji, HuT 78, K-562), carcinoma (CaCo-2, HeLa) and normal (MDCK 1) cell line.

Compound **17**, bearing *trans*- β -styrenesulfonyl substituent at N9 position of the purine base produced the strongest cytotoxic effect on all of the tested cell lines. 6-morpholino-derivatives with tosyl, naphthylsulfonyl and biphenylsulphonyl substituent at the N9 position of the purine (**8**, **9** and **10**) exhibited moderate antiproliferative effect on the Raji and HuT 78 cell lines, while **9** and **10** exhibited moderate antiproliferative effect on the K-562 cell line too.

The inhibition of the PNP enzyme isolated from two strains of *Helicobacter pylori* and PNP from *Escherichia coli* was also tested. Best results are obtained with 6-morpholino-derivatives **8** and **18**.

Peptide phenanthridine derivatives were prepared by classic peptide chemistry methods (synthesis in solution). Alanine derivative of phenanthridine **22** was prepared by Negishi reaction, and subsequently functionalized by peptide backbone constructed starting from the N-terminus of **22**. Di-, tri- and tetrapeptide phenanthridine derivatives with guanidinopyrrole, guanidine (arginine), pyrene or fluorene moiety have been prepared as well. Finally, guanidinopyrrole and arginine derivatives have been converted into hydrochloride salts.

Interactions of chosen compounds (guanidinopyrrole derivatives **28b** and **29b**) with polynucleotides have been studied *via* several spectrophotometric methods, namely UV/visible, circular dichroism and fluorescence spectroscopies. The compounds have shown different types of interactions, depending on their conformation. Compound **28b**, whose chromophores are not interacting mutually in mildly acidic media, most likely binds to minor groove of DNA and major groove of RNA. Compound **29b**, whose chromophores are involved in intramolecular π - π interaction, binds on the phosphate backbone of the polynucleotide. In neutral media both compounds agglomerate along the phosphate backbone.

Key words: *N*-sulfonylpurines, antitumor activity, inhibition of purine nucleoside phosphorylase, phenanthridine peptide derivatives, fluorescent probes

SAŽETAK	VI
SUMMARY	VIII
1. UVOD	1
1.1. Male molekule u medicinskoj kemiji	1
1.2. Cilj i svrha rada	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Purini	3
2.1.1. Sinteza purina	8
2.1.2. Reaktivnost purinskih nukleobaza	14
2.1.3. Biološki aktivni purini	15
2.1.4. <i>N</i> -sulfonilni derivati purina	17
2.2. Interakcije malih molekula s polinukleotidima	19
2.3. Fenantridini	21
2.3.1. Sinteza fenantridina	22
2.3.1.1. Radikalska sinteza fenantridina	23
2.3.1.2. Sinteza katalizirana prijelaznim metalima	26
2.3.2. Svojstva fenantridina	28
2.3.3. Utjecaj supstituenata na svojstva fenantridina	30
2.3.4. GCP-jedinica	34
3. EKSPERIMENTALNI DIO	36
3.1. Uvodne napomene	36
3.2. Priprava purinskih derivata	37
3.2.1. Opća procedura za pripravu <i>N</i> -9-sulfonil-6-klorpurinskih derivata 2-7	37
3.2.1.1. 6-klor-9-tosil-9 <i>H</i> -purin (2)	38
3.2.1.2. 6-klor-9-(naftalen-2-ilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (3)	38

3.2.1.3. 6-klor-9-(4-fenilbensulfonil)-9 <i>H</i> -purin (4)	39
3.2.1.4. 6-klor-9-(4-bromfenilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (5)	40
3.2.1.5. 6-klor-9-(4-klor-3-nitrofenilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (6)	41
3.2.1.6. (<i>E</i>)-6-klor-9-(stirilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (7)	41
3.2.2. Opća procedura za pripravu <i>N</i> -9-sulfonil-6-morfolinopurinskih derivata 8-13 i 15	42
3.2.2.1. 6-morfolino-9-tosil-9 <i>H</i> -purin (8)	42
3.2.2.2. 6-morfolino-9-(naftalen-2-ilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (9)	43
3.2.2.3. 6-morfolino-9-(4-fenilbensulfonil)-9 <i>H</i> -purin (10)	44
3.2.2.4. 6-morfolino-9-(4-bromfenilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (11)	45
3.2.2.5. 6-morfolino-9-(4-morfolino-3-nitrofenilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (12), 6-morfolino-9-(4-klor-3-nitrofenilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (13) i 6-klor-9-(4-morfolino-3-nitrofenilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (14)	46
3.2.2.6. 6-morfolino-9-(2-morfolino-2-feniletilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (15)	47
3.2.3. 6-morfolinopurin (16)	48
3.2.4. Opća procedura za pripravu <i>N</i> -9-sulfonil-6-morfolinopurinskih derivata 13, 17 i 18	49
3.2.4.1. 6-morfolino-9-(4-klor-3-nitrofenilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (13)	49
3.2.4.2. (<i>E</i>)-6-morfolino-9-(stirilsulfonil)-9 <i>H</i> -purin (17)	49
3.2.4.3. 9-(metilsulfonil)-6-morfolino-9 <i>H</i> -purin (18)	50
3.2.5. 6-[<i>N,N</i> -bis(2-hidroksietil)amino]-9-tosil-9 <i>H</i> -purin (19)	51
3.2.6. 6-[<i>N,N</i> -bis(2-hidroksietil)amino]-purin (20)	52
3.2.7. 9-(metilsulfonil)-6-[<i>N,N</i> -bis(2-hidroksietil)amino]-9 <i>H</i> -purin (21)	52
3.3. Priprava fenantridinskih derivata	54
3.3.2. Prekursori 25, 26 i 27 koji sadrže GCP jedinicu	54
3.3.2.1. Trietilamonijev 5-((3-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilat (25)	55
3.3.2.2. (<i>S</i>)-2-(6-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)-2-(2-((3-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)gvanidino)karbonil) -1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)heksanamido)octena kiselina (26)	55
3.3.2.3. (<i>S</i>)-6-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)-2-(2-(2-((3-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)gvanidino)karbonil) -1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)acetamido)heksanska kiselina (27)	56
3.3.3. Opća procedura za pripravu peptidnih derivata fenantridina 23-37	57

3.3.3.1. (<i>S</i>)-metil 2-(2-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (23)	57
3.3.3.2. (<i>S</i>)-metil 2-(2-(2-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)acetamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (24)	58
3.3.3.3. (<i>S</i>)-metil 2-(2-((3-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (28)	59
3.3.3.4. (<i>S</i>)-metil 2-(2-(2-((3-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (29)	60
3.3.3.5. (<i>S</i>)-metil 2-(2-(2-(2-((3-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)acetamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (30)	61
3.3.3.6. (<i>S</i>)-metil 2-(2-((<i>S</i>)-6-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)-2-(2-((3-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)heksanamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (31)	62
3.3.3.7. (<i>S</i>)-metil 2-((<i>S</i>)-6-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)-2-(4-(5-((3-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-4-oksobutanamido)heksanamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (32)	63
3.3.3.8. (<i>S</i>)-metil 3-(6-metilfenantridin-8-il)-2-(4-(piren-1-il)butanamido)propanoat (33)	64
3.3.3.9. (<i>S</i>)-metil 3-(6-metilfenantridin-8-il)-2-(piren-1-karboksamido)propanoat (34)	65
3.3.3.10. (<i>S</i>)-metil 2-(2-(2-(9 <i>H</i> -fluoren-9-iloksi)acetamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (35)	66
3.3.3.11. (<i>S</i>)-metil 2-((<i>S</i>)-2-(((9 <i>H</i> -fluoren-9-il)metoksi)karbonil)-5-(3-(2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-ilsulfonil)gvanidino)pentanamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (36)	67
3.3.3.12. (<i>S</i>)-metil 2-(2-((<i>S</i>)-2-(((9 <i>H</i> -fluoren-9-il)metoksi)karbonil)-5-(3-(2,2,4,5,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-6-ilsulfonil)gvanidino)pentanamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (37)	68
3.3.4. Opća procedura za pripravu hidrokloridnih soli gvanidinopirolnih derivata 28b-32b	70
3.3.4.1. (<i>S</i>)-metil 2-(2-(gvanidinokarbonil)-1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat dihidroklorid (28b)	70
3.3.4.2. (<i>S</i>)-metil 2-(2-(2-(gvanidinokarbonil)-1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat dihidroklorid (29b)	71

3.3.4.3. (<i>S</i>)-metil 2-(2-(2-(2-(gvanidinokarbonil)-1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)acetamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat dihidroklorid (30b)	72
3.3.4.4. (<i>S</i>)-metil 2-(2-((<i>S</i>)-6-amino-2-(2-(gvanidinokarbonil)-1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)heksanamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat trihidroklorid (31b)	73
3.3.4.5. (<i>S</i>)-metil 2-((<i>S</i>)-6-amino-2-(2-(2-(gvanidinokarbonil)-1 <i>H</i> -pirol-5-karboksamido)acetamido)heksanamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat trihidroklorid (32b)	74
3.3.5. Opća procedura za pripravu hidrokloridnih soli argininskih derivata 36c i 37c	75
3.3.5.1. (<i>S</i>)-metil 2-((<i>S</i>)-2-amino-5-gvanidinopentanamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat trihidroklorid (36c)	75
3.3.5.2. (<i>S</i>)-metil 2-(2-((<i>S</i>)-2-amino-5-gvanidinopentanamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat trihidroklorid (37c)	76
3.4. Određivanje antitumorske aktivnosti MTT testom	77
3.5. Određivanje inhibicijske aktivnosti purinskih derivata na enzim PNP	78
4. REZULTATI I RASPRAVA	79
4.1. Purini	79
4.1.1. 6-klor-purinska serija	79
4.1.1.1. NMR analiza 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata	82
4.1.1.2. Stabilnost 6-klor-purinskih derivata	86
4.1.2. 6-morfolino-purinska serija	88
4.1.2.1. NMR analiza 6-morfolino-9-sulfonilpurinskih derivata	93
4.1.3. 6-bis(2-hidroksietil)amino-purinska serija	95
4.1.4. Biološka ispitivanja purinskih derivata	96
4.1.4.1. Ispitivanje antitumorske aktivnosti purinskih derivata MTT testom	96
4.1.4.2. Ispitivanje inhibicije enzima PNP	97
4.2. Fenantridini	99
4.2.1. Sinteza peptidnih fluorescentnih probi za polinukleotide	100
4.2.1.1. Priprava ishodnog aminokiselinskog derivata 22	100

4.2.1.2. Priprava peptidnih derivata fenantridina 23-37	102
4.2.1.2.1. Priprava di-, tri- i tetrapeptidnih derivata fenantridina 23-37	104
4.2.1.2.1. Priprava glicinskih derivata fenantridina 23 i 24	105
4.2.1.2.2. Priprava gvanidinopirolnih peptidnih derivata fenantridina 28-32	106
4.2.1.2.3. Priprava argininskih derivata fenantridina 37 i 38	108
4.2.1.2.4. Priprava peptidnih derivata fenantridina koji sadrže pirensku i fluorensku skupinu	108
4.2.1.2.5. Priprava hidrokloridnih soli gvanidinopirolnih (28b-32b) i argininskih (36c i 37c) derivata fenantridina	109
4.2.2. Analiza spektara ^1H i ^{13}C NMR peptidnih derivata fenantridina na primjeru spoja 22	111
4.2.3. Spektrofotometrijska studija interakcija izabranih gvanidinopirolnih derivata s DNA i RNA	115
4.2.3.1. Spektroskopska svojstva spojeva 28b i 29b u vodenom mediju	115
4.2.3.1.1. Priprava otopina ispitivanih spojeva	115
4.2.3.1.2. UV/Vis spektri	115
4.2.3.1.3. Fluorescencijski spektri	120
4.2.3.1.4. Ovisnost spojeva 28b i 29b o pH vrijednosti otopine	122
4.2.3.1.5. CD spektri	123
4.2.3.2. Interakcije spojeva 28b i 29b s DNA/RNA u vodenom mediju	125
4.2.3.2.1. Fluorimetrijske titracije spojeva 28b i 29b s dvolančanim polinukleotidima	125
4.2.3.2.2. Promjena točke mekšanja dvolančanih polinukleotida uslijed interakcije sa spojevima 28b i 29b	128
4.2.3.2.3. CD titracije spojeva 28b i 29b s dvolančanim polinukleotidima	131
4.2.3.2.4. Zaključak o interakcijama spojeva 28b i 29b s nukleinskim kiselinama	133
5. ZAKLJUČAK	136
6. LITERATURNI IZVORI	139
7. DODACI	XV
8. ŽIVOTOPIS	XXVII

1. UVOD

1.1. Male molekule u medicinskoj kemiji

Medicinska kemija današnjice i dalje se uvelike bazira na istraživanju aktivnih tvari iz skupine malih molekula. Male molekule posjeduju brojne prednosti pred makromolekulama koje ih čine pogodnima za razvoj novih lijekova: lakše difundiraju kroz stanične membrane od makromolekula, a u dizajnu će se lakše zadovoljiti Lipinski pravilo ("pravilo 5").¹ Zbog toga čine osnovu većine današnjih lijekova. Nadalje, potraga za molekulama koje specifično reagiraju s nukleinskim kiselinama i proteinima je od velike važnosti za pronalazak novih senzora i lijekova.²

Tumorska oboljenja veliki su izazov moderne medicine, a pronalazak i odobravanje novih lijekova frustrirajuće je spor i neizvjestan proces, često s neuspješnim završetkom.³ Biološka i biokemijska ispitivanja potencijalnih lijekova relativno su skupa i provode se u kompliciranim sustavima u kojima je potrebno uzeti u obzir utjecaje mnogobrojnih čimbenika. Od velikog broja testiranih molekula odabiru se probrane molekule (*engl.* hit molecules) kojima se nadalje poboljšavaju svojstva u potrazi za vodećom molekulom (*engl.* lead molecule).⁴ Ispitivanjem interakcija novopripremljenih spojeva s biološkim molekulama moguće je obaviti određenu selekciju u početnoj fazi razvoja.⁵ Definiranje selektivnosti spojeva i specifičnosti interakcija s polinukleotidima često pruža mogućnost izdvajanja najzanimljivijih analoga iz velikih serija spojeva, uz znatnu uštedu vremena i materijala.

1.2. Cilj i svrha rada

U sklopu doktorskog rada sintetizirane su dvije serije biološki aktivnih spojeva: *N*-sulfonilni derivati purina kao potencijalni antitumorski lijekovi i inhibitori enzima purin nukleozid fosforilaze i peptidni derivati fenantridina kao potencijalni fluorescentni senzori i antitumorski lijekovi.

Purini sudjeluju u mnogim fiziološkim kontrolnim mehanizmima uključujući regulaciju srčane cirkulacije i funkcije miokarda, agregaciju trombocita, imunološke odgovore organizma i otpuštanje neurotransmitera iz neurona u centralnom i perifernom živčanom sustavu te su stoga predmet brojnih istraživanja već dugi niz godina. Ova istraživanja dovela su do spoznaje da velik broj modificiranih nukleozida i nukleobaza posjeduju potencijalne inhibicijske aktivnosti

različitih enzima što rezultira u protutumorskoj^{6,7} i protuvirusnoj^{8,9} aktivnosti. Veliki broj današnjih lijekova, kao što su aciklovir i ganciklovir sadrže purinsku nukleobazu.

Budući da purinski derivati kontroliraju neke od ključnih bioloških procesa te se nalaze u mnogim lijekovima, pretpostavka je da će njihovo modificiranje dodatnim poznatim farmakoforima dati novu skupinu spojeva sa zanimljivim biološkim odgovorima. U prethodnim istraživanjima, provedenima u našoj istraživačkoj grupi na Institutu Ruđer Bošković, dizajniran je i sintetiziran niz spojeva iz serije *N*-sulfonilpirimidinskih derivata koji su pokazali značajnu antitumorsku aktivnost u *in vitro* i *in vivo* uvjetima.¹⁰ Cilj ovog istraživanja je priprema nove serije C6, N9 supstituiranih purina koji sadrže sulfonamidne farmakofore i ispitivanje njihovih bioloških potencijala. Kao ishodni spoj izabran je 6-klorpurin koji omogućuje sulfoniliranje u N9 položaju purina i uvođenje različitih supstituenata na C6 položaj purina. Tako su sintetizirane nove serije spojeva 6-klor-, 6-morfolino-, 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-*N*-9-sulfonilpurina, ispitana je njihova inhibicijska sposobnost na enzimu purin nukleozid fosforilazi i određeno je njihovo antiproliferacijsko djelovanje na staničnim linijama solidnih tumora, leukemija i limfoma.

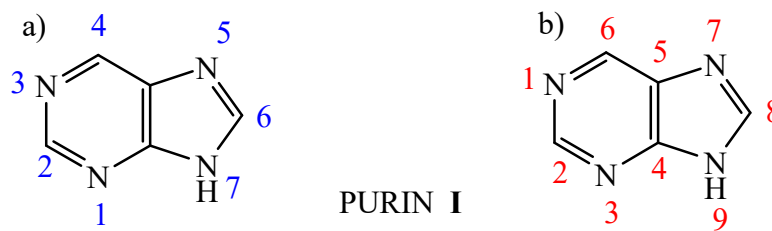
Peptidni interkalatori bazirani na fenantridinskoj jedinici kandidati su za razvoj novih lijekova te fluorescentnih probi i senzora. Ovi spojevi pripadaju skupini malih molekula povezanih peptidnom okosnicom koji se nekovalentnim interakcijama selektivno vežu u utore polinukleotida. Fenantridin je poznati interkalator i služi kao svojevrsno „sidro“ koje se veže na biološku metu, a ujedno i kao fluorescentni marker za polinukleotide i proteine.¹¹ Svojstva fenantridinskih spojeva često su istraživana zbog njihove sposobnosti učinkovitog vezanja na nukleinske kiseline, no dugo vremena ovi spojevi nisu bili pripravljeni zbog raznih toksičnih i mutagenih utjecaja na organizam.¹² Interes za fenantridinske spojeve opet je porastao nakon što su u pojedinim istraživanjima otkrivena njihova antiparazitska i antitumorska svojstva. Nadalje, dokazano je da mutagena svojstva pokazuju samo određeni derivati, npr. etidij bromid i njegovi analozi.¹²

Fenantridinski peptidni derivati sinergistički kombiniraju svojstva svojih sastavnica, a novi supstituenti pružaju dodatne mogućnosti za interakcije sa biološkim molekulama. U svrhu pripreme novih potencijalnih antitumorskih lijekova i fluorescentnih probi sintetizirani su derivati fenantridina premošteni peptidnim lancem na koji su vezani supstituenti koji kontroliraju selektivnost vezivanja na polinukleotide (derivati gvanidina i pirologvanidina) ili dodatni fluorescentni/interkalatorski sustavi (piren i fluoren). Sintetiziranim spojevima je ispitan način interakcije i afinitet prema polinukleotidima pomoću spektrofotometrijskih metoda (UV/Vis, CD i fluorescencijska spektroskopija).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Purini

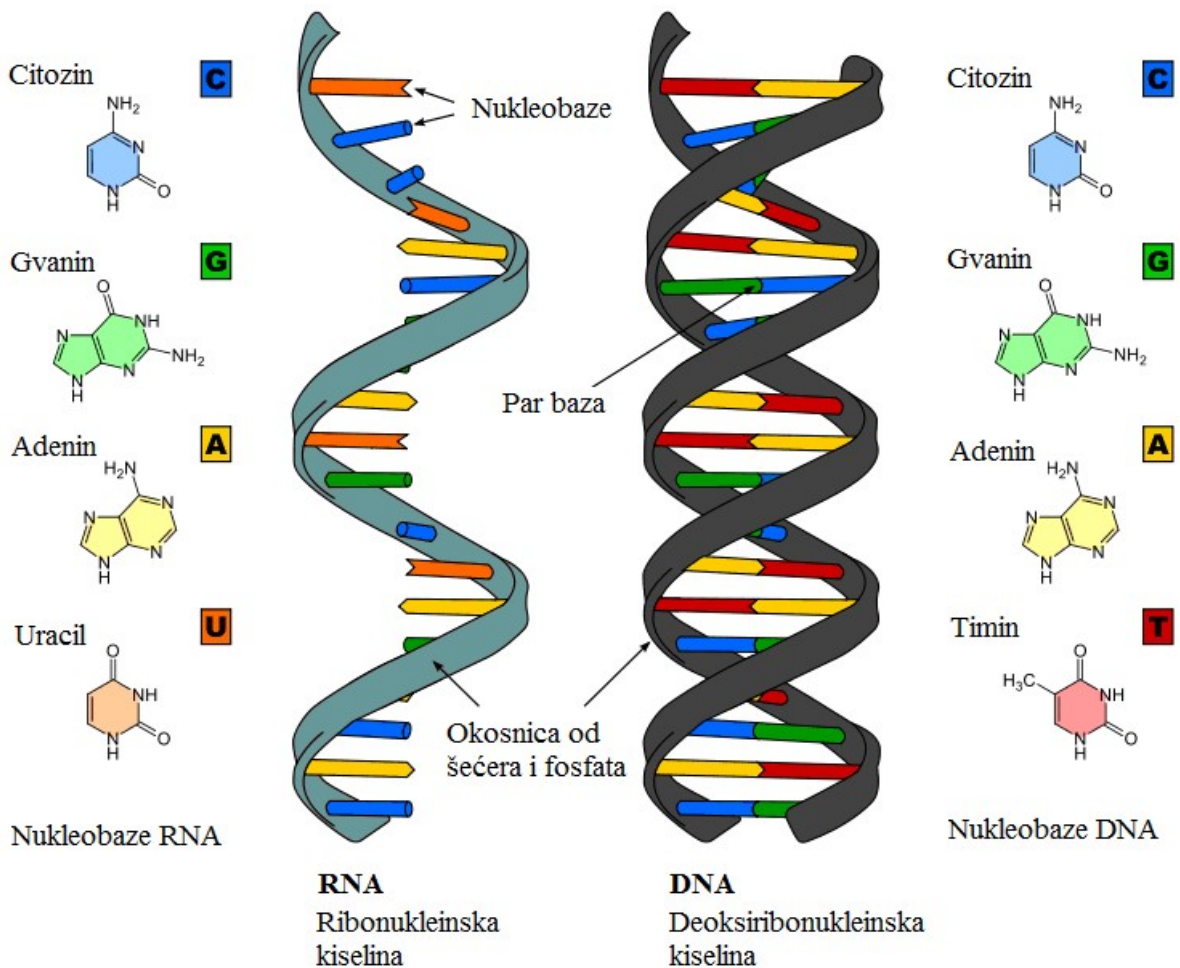
Purini su heterociklički, aromatski organski spojevi koji se sastoje od pirimidinskog prstena kondenziranog s imidazolnim prstenom, a ujedno su i najzastupljeniji heterocikli u prirodi koji sadrže atome dušika (*Slika 1*).¹³



Slika 1. Numeriranje purina I: a) prema IUPAC-u; b) trivijalno.

Purini zajedno s pirimidinima čine dvije grupe nukleobaza koje ulaze u sastav nukleinskih kiselina. Purinske nukleobaze su adenin (A) i gvanin (G) koje se u DNA vežu vodikovim vezama s komplementarnim pirimidinskim nukleobazama timinom (T), odnosno citozinom (C) tvoreći AT i GC parove. U RNA komplement adeninu je uracil (U) umjesto timina (AU i GC parovi). Vežanjem nukleobaza sa šećerom ribozom, odnosno deoksiribozom i fosfatnim jedinicama nastaju nukleotidi, a njihovom polimerizacijom nastaju nukleinske kiseline DNA (*engl.* deoxyribonucleic acid) i RNA (*engl.* ribonucleic acid). Nukleinske kiseline su polimeri koji se sastoje od ponavljajućih nukleotidnih jedinica (*Slika 2*). Slijed nukleotida je genetski predodređen te je nositelj genetske informacije.

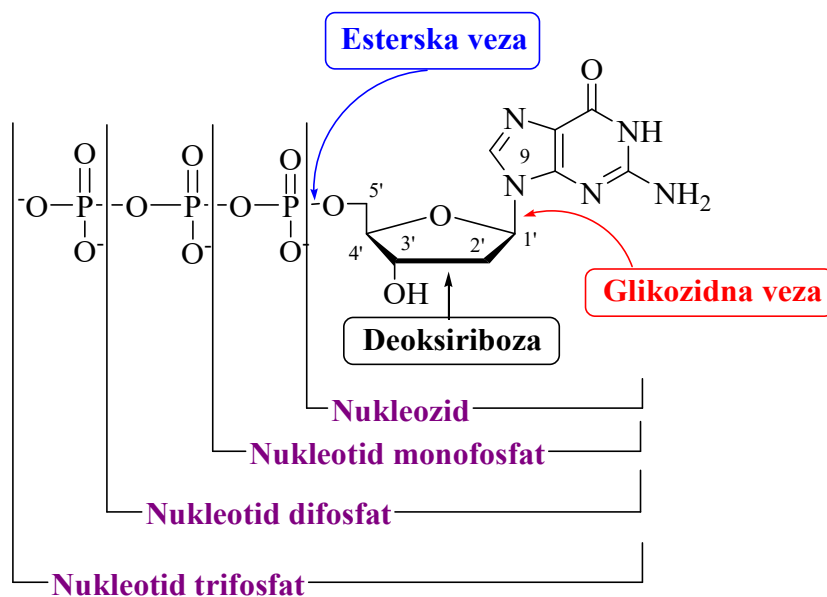
Nukleinske kiseline naziv duguju činjenici da su izolirane iz jezgre (*lat.* nucleus). Budući da su osnovne građevne jedinice živog svijeta te zbog sveobuhvatnosti procesa u kojima sudjeluju, one su predmet brojnih istraživanja moderne medicine i biotehnologije. Jedan od novijih primjera tog trenda su sintetske nukleinske kiseline nazvane peptidne nukleinske kiseline, odnosno PNA (*engl.* peptide nucleic acid) koje se koriste u dijagnostičkim testovima i „antisense“ terapiji.¹⁴



Slika 2. Shematski prikaz RNA, DNA i strukture nukleobaza.

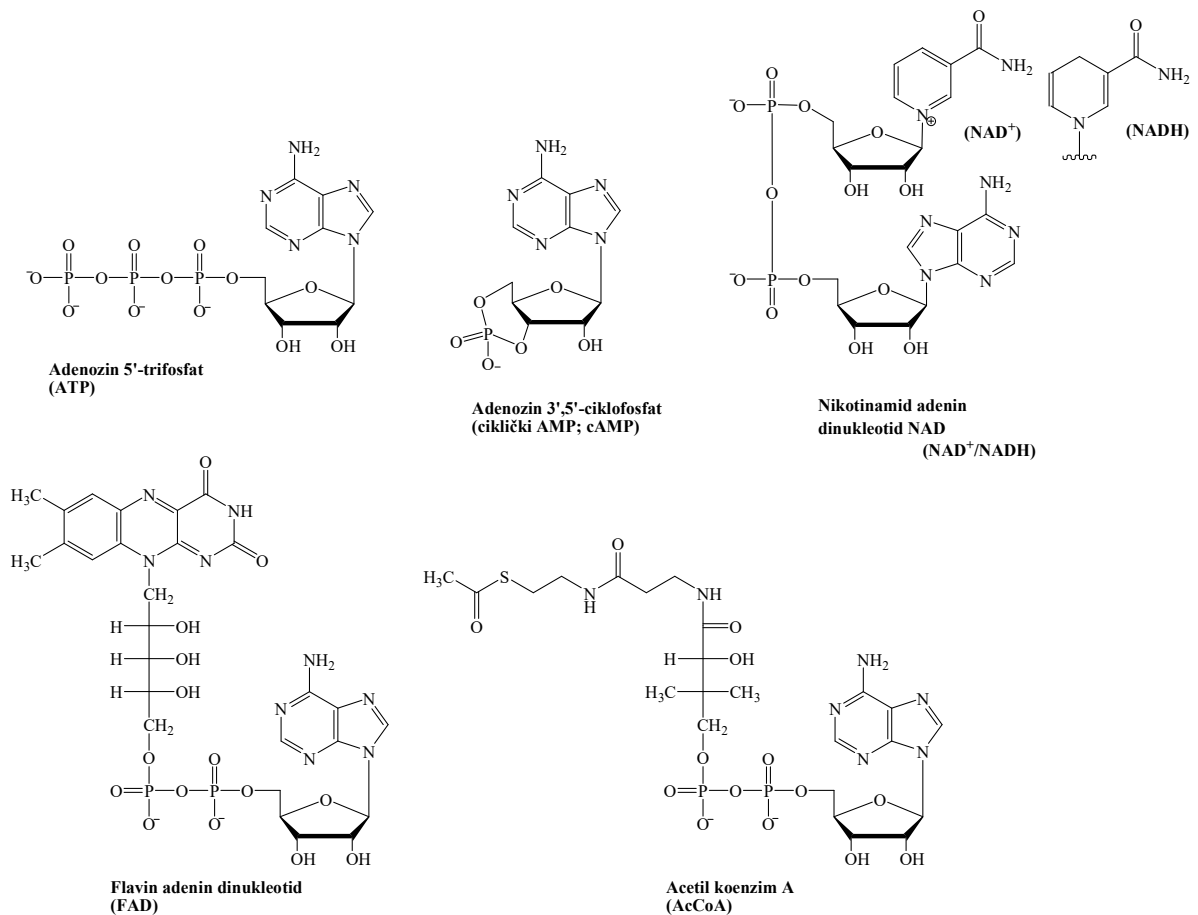
Sposobnost nukleobaza da vodikovim vezama tvore parove te dodatne interakcije slaganja (*engl.* stacking) razlog su helikalne strukture DNA i RNA. Vodikove veze nastale u komplementarnom sparivanju baza pomažu u stabilizaciji strukture nukleinske kiseline. Dvostruke zavojnice DNA i RNA sadrže mali i veliki utor koji imaju različita svojstva, npr. steričke karakteristike i elektrostatski potencijal.¹⁵

Nukleobaze vezane na anomerni ugljik (C1') šećera riboze (RNA) ili 2'-deoksiriboze (DNA) β -*N*-glikozidnom vezom čine nukleozide (Slika 3). Fosfatni esteri nukleozida kod kojih je fosfat vezan na C5', C3' ili C2' položaj šećera esterskom vezom zovu se nukleotidi. Kod svih prirodnih nukleotida prisutna je β -konfiguracija anomernog centra.



Slika 3. Shematski prikaz građevne jedinice nukleinskih kiselina.

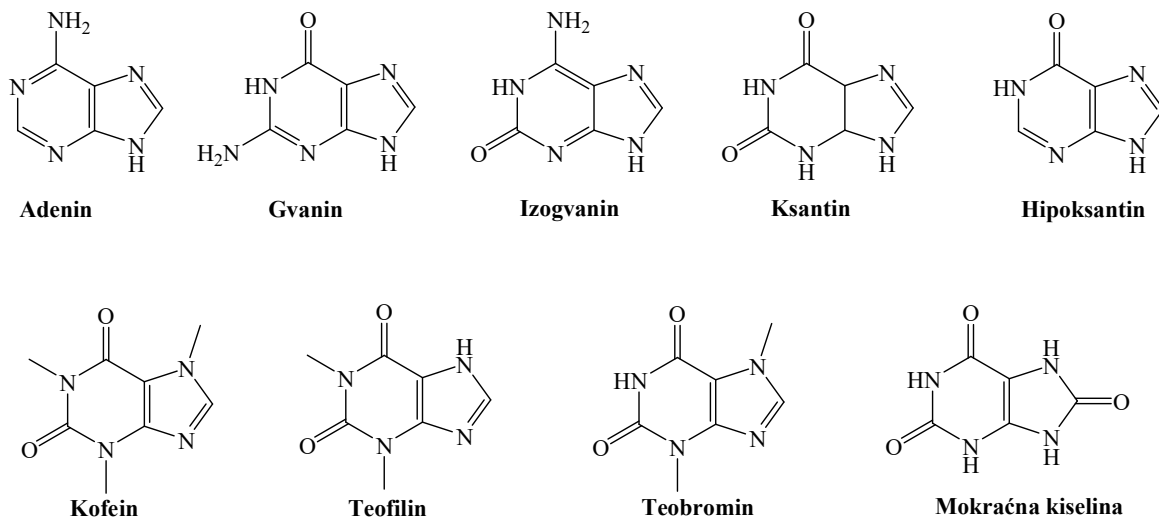
Purinski i pirimidinski nukleozidi i nukleotidi igraju važnu ulogu u fiziologiji žive stanice, preteče su sinteze osnovnih građevnih jedinica molekula DNA i RNA, sudjeluju u biosintezi glikogena, glikoproteina i fosfoglicerida; imaju ulogu donora energije i sastavni su dijelovi važnih koenzima: nikotinamid adenin dinukleotida NAD (NAD^+/NADH), flavin adenin dinukleotida (FAD) i acetil koenzima A (AcCoA) (Slika 4). Adeninski derivati su posebno značajni zbog uloge u metaboličkim procesima. Adenozin 5'-trifosfat (ATP) je koenzim koji služi kao najvažnije stanično skladište energije. Energija nastaje kao produkt hidrolize ATP-a u adenozin 5'-difosfat (ADP) a zatim u adenozin 5'-monofosfat (AMP). Adenozin 3',5'-ciklofosfat (ciklički AMP; cAMP) kontrolira aktivaciju protein kinaza i udjela kalija u stanici te sudjeluje kod transkripcije i drugih metaboličkih procesa.¹⁶ cAMP djeluje kao drugi glasnik (*engl.* second messenger) u adrenalinskoj i glukagonskoj signalizaciji.¹⁷ NAD i FAD su koenzimi uključeni u stanične oksidacijsko-redukcijske procese. Jedna od najvažnijih molekula za metabolizam živih bića je acetil-koenzim A koji ima ulogu prijenosa ugljikovih atoma u obliku acetilne skupine kao supstrata za oksidaciju u Krebsovom ciklusu.¹⁸



Slika 4. Strukture purinskih koenzima ATP, cAMP, NAD, FAD i AcCoA.

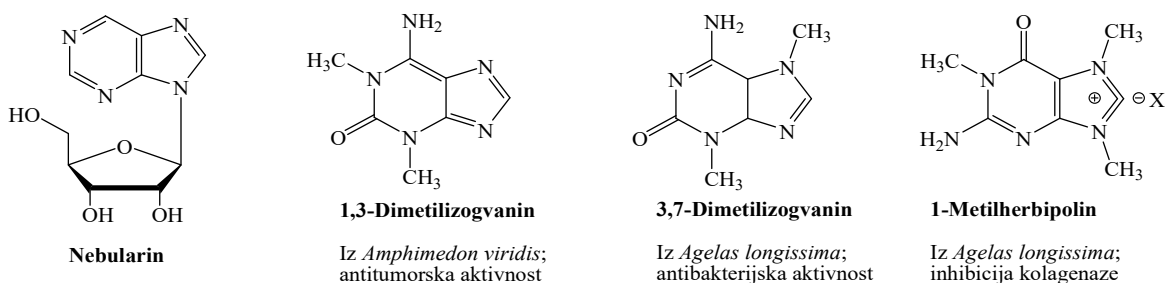
Nesupstituirani purin ne postoji u prirodi.¹⁹ Poznati su purinski analozi: purinske nukleobaze adenin i gvanin, izogvanin, ksantin, hipoksantin, kofein, teofilin, teobromin i mokračna kiselina (Slika 5). Izogvanin nastaje oksidativnim oštećenjem gvanina i dokazano je da uzrokuje mutacije DNA.²⁰ Hipoksantin s ribozom gradi nukleozid inozin koji čini dio tRNA, a prisutan je u nekim stanicama bakterija i parazita kao supstrat u metabolizmu ili kao izvor dušika. Kofein, teofilin i teobromin su ksantinski alkaloidi, prisutni u lišću, sjemenkama i plodovima mnogih biljaka. Kofein je prisutan u ~60 biljnih vrsta, a najzastupljeniji je u kavi, guarani i kola orahu. Nalazi se u velikom broju napitaka, stimulans je i ujedno najčešće konzumirana psihološki aktivna tvar na svijetu. Djelovanje kofeina se bazira na inhibiciji cAMP specifične fosfodiesteraze čime se usporava konverzija cAMP u AMP te se produljava djelovanje adrenalina. Teofilin se, uz kofein i teobromin, nalazi u čajevcu. Često se prepisuje u liječenju astme i kronične opstruktivne plućne bolesti. U kakaovim zrnima nalazi se teobromin koji je stoga prisutan u čokoladi i brojnim drugim prehrambenim proizvodima. Teobromin i ksantin su kataboliti kofeina.²¹ Mokračna kiselina je konačan proizvod metabolizma purina u ljudskom

tijelu, nalazi se u krvi u relativno visokim koncentracijama i poznati je antioksidans. Neki derivati ovih spojeva pokazuju biološku aktivnost pa je tako 1-(5-oksoheksil)teobromin snažan inhibitor čimbenika nekroze tumora alfa.



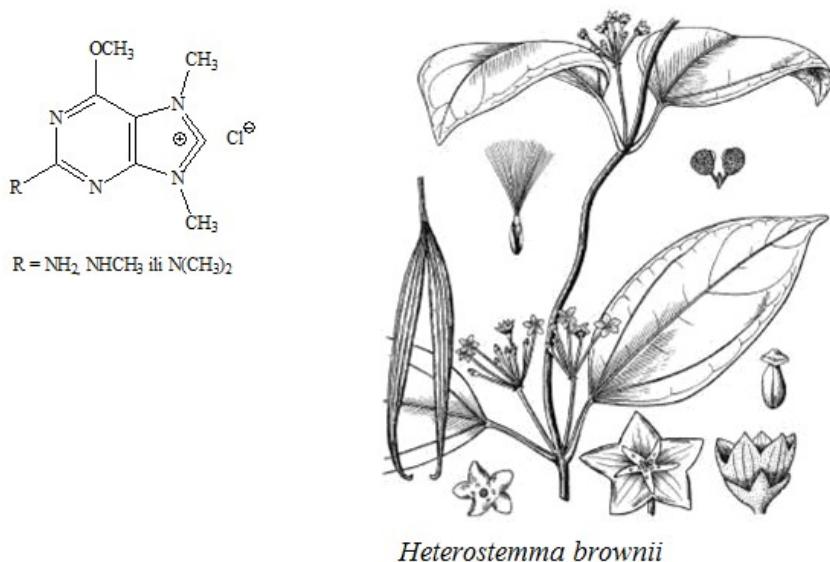
Slika 5. Poznati purinski analozi.

Najjednostavniji prirodni purinski spoj, β -D-ribonukleozid nebularin, je nukleozidni antibiotik izoliran iz gljive *Agaricus nebularis* (Slika 6). Vrlo često spojevi izolirani iz prirodnih izvora koji posjeduju određenu biološku aktivnost postaju vodeći spojevi u istraživanju novih lijekova. Serija metiliranih purina, najvjerojatnije sekundarnih metabolita, izolirana je iz nekoliko morskih organizama. Od tih spojeva, 1,3-dimetilizogvanin pokazuje antitumorsku aktivnost, 3,7-dimetilizogvanin ima antibakterijsku aktivnost, a 1-metilherbipolin inhibira kolagenazu (Slika 6).



Slika 6. Nebularin i purinski derivati izolirani iz morskih organizama.

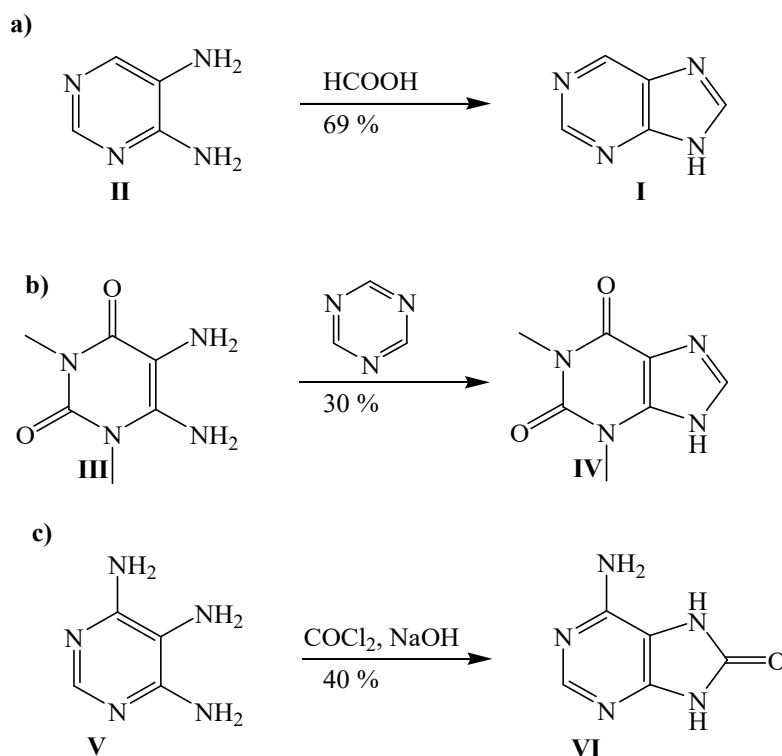
Tri derivata herbipolina s protutumorskom aktivnošću izolirana su iz biljke *Heterostemma brownii*. Biljka se koristi u narodnoj medicini u Taiwanu kod liječenja nekih vrsta tumora (Slika 7).



Slika 7. Strukture herbipolinskih derivata i skica biljke *Heterostemma brownii* (preuzeto iz referencije Rosemeyer¹⁹ i prerađeno).

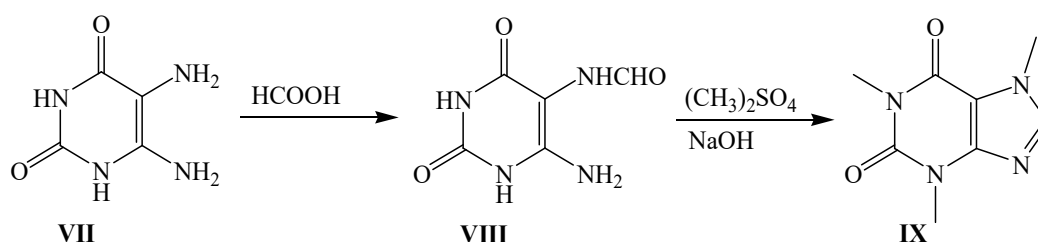
2.1.1. Sinteza purina

Nobelovac Emil Fischer prvi je 1898. godine sintetizirao purin **I** krenuvši iz mokraćne kiseline.²² Standardna metoda za dobivanje purina **I** je Traubeova sinteza ciklokondenzacije 5,6-diaminopirimidina **II** s mravljom kiselinom (Shema 1a).²³ Općenito, imidazolni prsten odgovarajućeg 5,6-diaminopirimidina **II**, **III** ili **V** zatvara se [4+1] cikloadicijom, pa nastaju purin **I**, teofilin **IV** odnosno 8-oksoadenin **VI** (Shema 1a-c), a osim mravlje kiseline koriste se i drugi karbonilni derivati i ortoesteri.²⁴



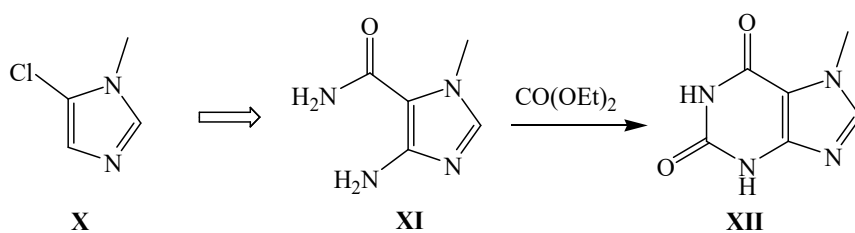
Shema 1. Traubeova sinteza derivata purina **IV** i **VI**.

Direktnu ciklizaciju 5,6-disupstituiranih pirimidina u purinski prsten je ipak teško postići i reakcije se uglavnom provode u dva stupnja. Primjer je sinteza kofeina **IX** gdje se u prvom stupnju 5,6-diaminouracil **VII** uz mravlju kiselinu prevodi u 5-*N*-formamid **VIII** koji zatim metiliranjem u baznim uvjetima ciklizira u produkt **IX** (Shema 2).



Shema 2. Sinteza kofeina **IX** Traubeovom metodom.

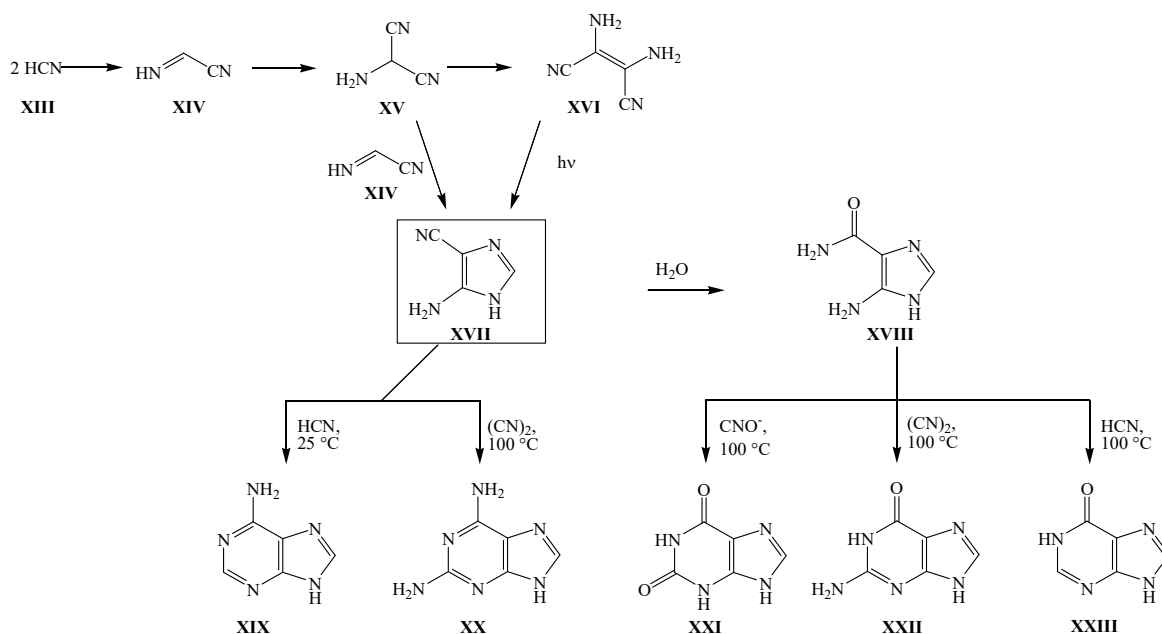
Purini se mogu sintetizirati i iz imidazolnih derivata. Ova metoda opisana je prvi put 1924. godine (Shema 3).²⁵ 5-klor-1-metil-1*H*-imidazol **X** preveden je u višestupnjevitom procesu u karboksilnu kiselinu, pa zatim u odgovarajući amid (4-amino-5-karbamoil derivat) **XI** koji ciklizacijom uz dietil karbonat daje 7-metil-7*H*-ksantin **XII**.



Shema 3. Sinteza purina **XII** iz imidazola **X**.

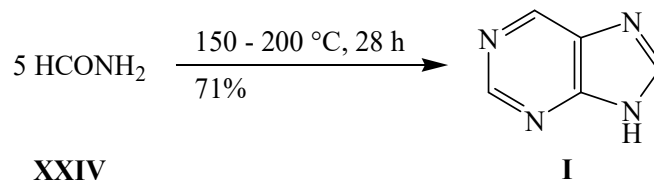
Uspješno je provedena i sinteza purina reakcijom 5-karbamoil derivata **XI** s mravljom kiselinom, esterima, ortoesterima, ureom, cijanatima i izotiocijanatima.^{25,26}

Zanimljiva je reakcija nastajanja purina polimerizacijom vodikova cijanida **XIII** koju su opisali Oró i Kimball sredinom prošlog stoljeća.²⁷ Oni su zagrijavali vodenu otopinu amonijeva cijanida na 90 °C i izolirali adenin u tragovima. Dokazano je da četiri molekule vodikova cijanida **XIII** tetrameriziraju tvoreći diaminomaleodinitril **XVI** koji se, preko imidazolnih derivata **XVII** i/ili **XVIII**, može transformirati u brojne prirodne purine **XIX–XXIII** (Shema 4)²⁸. Reakcija je važna jer se smatra osnovom prebiotičke sinteze purina, te je detaljno proučavana pod različitim reakcijskim uvjetima, a dobivena su i nešto bolja iskorištenja.²⁹



Shema 4. Sinteza purina **XIX – XXIII** tetramerizacijom vodikova cijanida **XIII**.

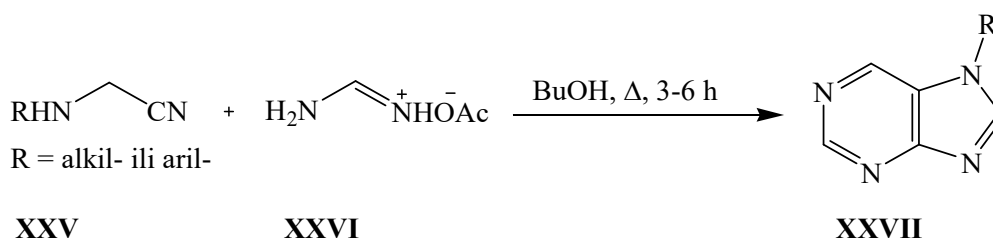
Nadalje, purin **I** nastaje u jednom stupnju s dobrim iskorištenjem od 71% grijanjem formamida **XXIV** u otvorenoj posudi na 160–200 °C (*Shema 5*).³⁰ I ova reakcija je razmatrana u kontekstu nastanka života.³¹



Shema 5. Sinteza purina **I** iz formamida **XXIV**.

Saladino i suradnici su 2003. godine objavili sintezu purinskih prstenova i njihovih acilnukleozidnih analoga iz formamida, uz katalizator titan dioksid.³²

Purini supstituirani u N7 položaju **XXVII** mogu se sintetizirati iz alkil- ili arilaminoacetonitrila **XXV** s formamidinijevim solima **XXVI** (*Shema 6*).³³

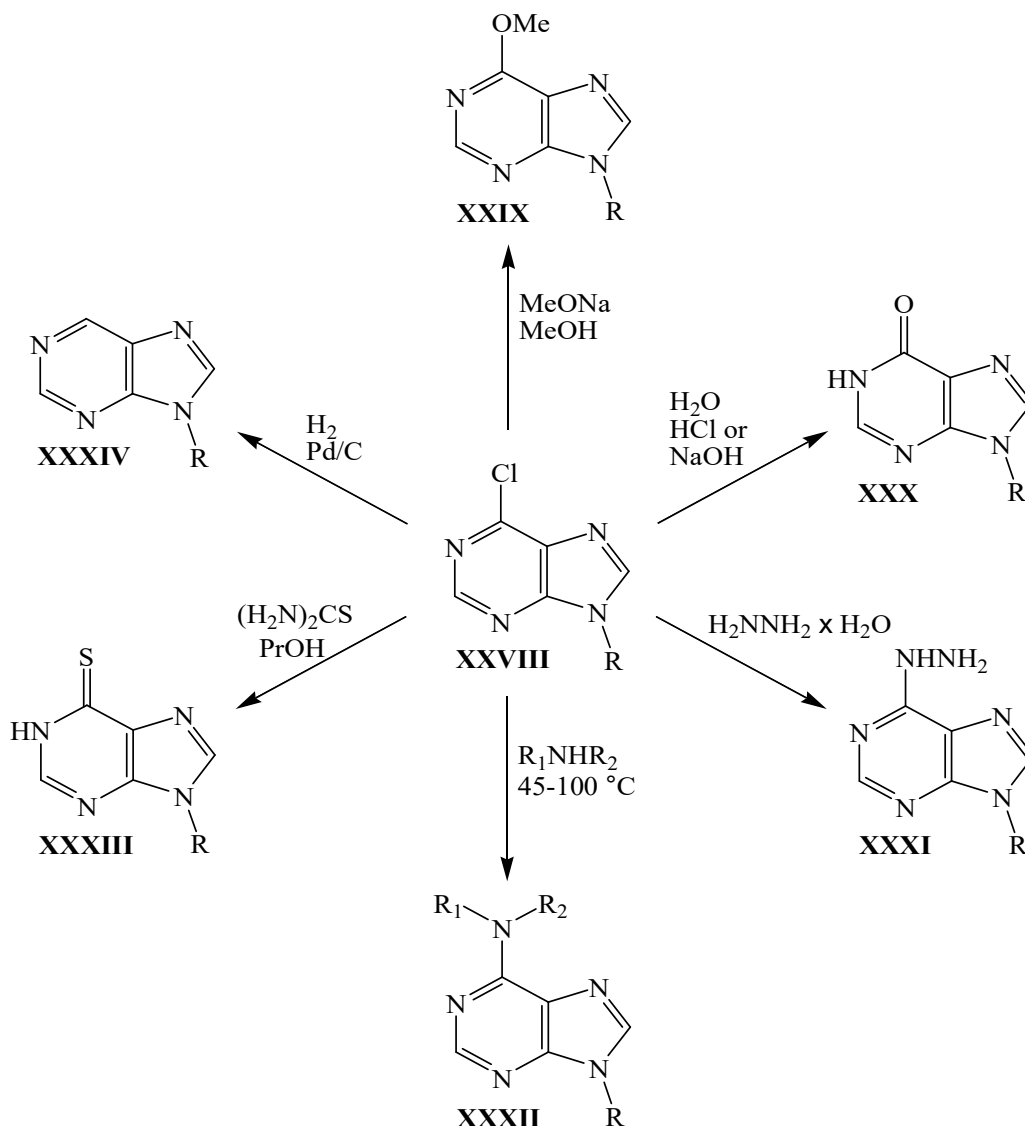


Shema 6. Sinteza N7-supstituiranih purina **XXVII** iz alkil- ili arilaminoacetonitrila **XXV**.

Uvođenje supstituenta u položaj N1, C2 i/ili C6 purinske baze (Watson-Crickova regija) može značajno izmijeniti mogućnost stvaranja vodikovih veza s komplementarnom nukleobazom te veznim mjestom enzima ili receptora. Naprotiv, supstituent u položaju C8 purinske baze najvjerojatnije neće utjecati na sparivanje s pirimidinskim bazama, kao ni na sposobnost tvorenja dvostruke zavojnice nukleinskih kiselina. Kod dvostrukih zavojnica koje sadrže purinske baze supstituirane u položaju C8, taj supstituent „strši“ u veliki utor i utječe na tvorbu trostrukih zavojnica i na interakciju s proteinima.

Uvođenje klora u položaj C6 purina omogućava uvođenje raznih funkcionalnih grupa.³⁴ Budući da je klor dobra odlazeća skupina, jednostavnim reakcijama supstitucije 6-klor derivata **XXVIII** pripremljeni su derivati 6-metoksipurina **XXIX**, hipoksantina **XXX**, 6-hidrazinopurina

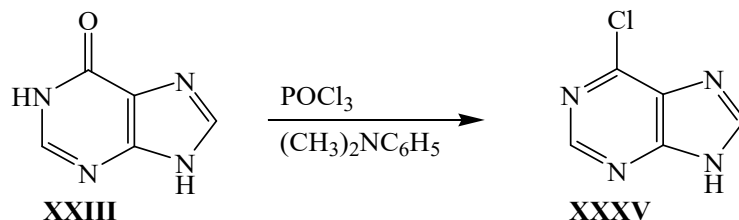
XXXI, 6-aminopurina **XXXII** i 6-tiopurina **XXXIII**. Katalitičkim hidrogeniranjem **XXVIII** mogu se dobiti i derivati alkil purina **XXXIV** nesupstituiranog u C6 položaju (*Shema 7*).



Shema 7. Supstitucije na C6 položaju purina **XXVIII**.

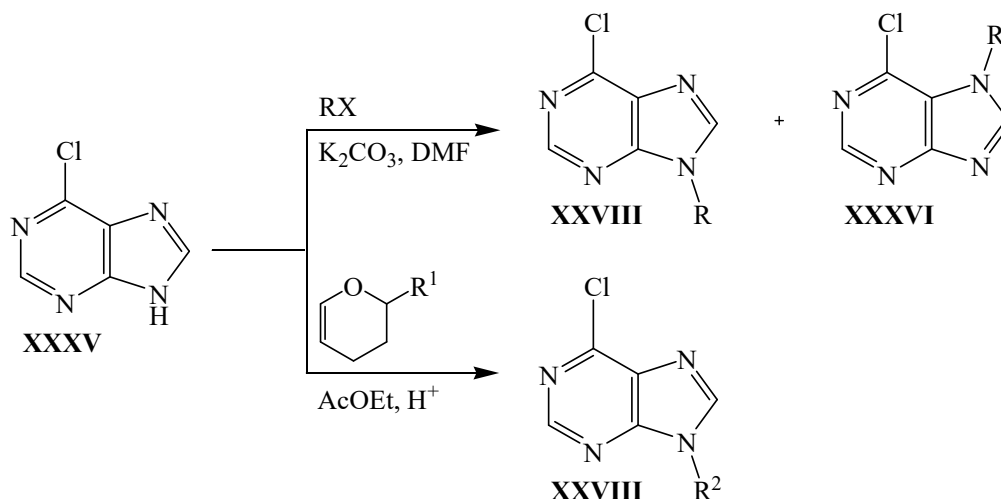
U seriji klor-, diklor- i triklor- purina, klorov atom u položaju C6 najviše je podložan supstituciji. Po reaktivnosti ga slijede klorovi atomi u položaju C8, pa zatim u položaju C2 purinske baze. Ovo pravilo vrijedi i za 9-alkil ili 7-alkil derivate kloriranih purina. Iznimka su 7- i 9-alkilni derivati 2,6,8-triklorpurina, kod kojih je najreaktivniji klorov atom u položaju C8. Osim sintetskog potencijala 6-klorpurina **XXXV** istraživani su i njegovi derivati zbog bioloških svojstava. Jedna od sintetskih metoda za dobivanje 6-klorpurina **XXXV** poznata je još iz 1954. godine, a uključuje tretiranje hipoksantina **XXIII** fosforilovim trikloridom u prisutnosti

dimetilanilina (*Shema 8*).³⁵ Općenito, klorovi derivati purina dobivaju se kloriranjem različitih purinskih spojeva klorirajućim reagensima kao što su sulfurov diklorid (SO₂Cl₂), fosforov pentaklorid (PCl₅) ili molekularni klor (Cl₂).³⁴



Shema 8. Dobivanje 6-klorpurina **XXXV** iz hipoksantina **XXIII**.

Alkiliranje 6-klorpurina **XXXV** raznim halogenim reagensima u aprotičnim otapalima, kao što je DMF, uz K₂CO₃ vodi do nastajanja smjese izomera 7-alkil **XXXVI** i 9-alkil derivata **XXVIII**, pri čemu većim dijelom nastaje 9-alkil izomer **XXVIII**.³⁴ 9-izomeri **XXVIII** dobiveni su u zadovoljavajućem iskorištenju u reakciji 6-klorpurina **XXXV** s 2,3-dihidropiranima u etil acetatu uz prisutnost *p*-toluensulfonske kiseline (*Shema 9*). Alkiliranje talijeve, srebrne i živinhe soli 6-klorpurina **XXXV** u DMF-u ili ksilenu rezultira nastajanjem 9-alkil derivata **XXVIII**.



R = Alk, CH₂O(CH₂), *c*-C₆-H₉, (CH₂)_nOH (n = 2-4), (CH₂)_mCOOAlk (m = 1, 2), ArCH₂

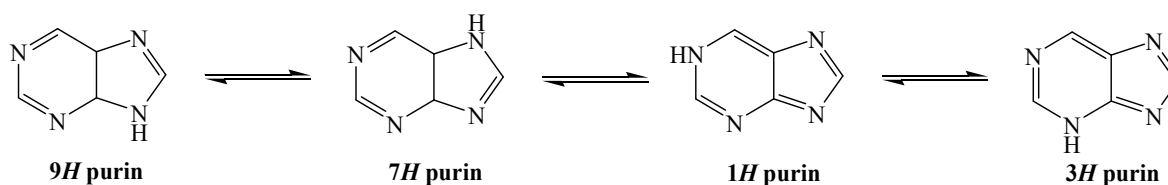
X = Cl, Br, I

R¹ = H, CH₂OAc; R² = tetrahidropirani, tetrahidropirani-2-acetat

Shema 9. Alkiliranje 6-klorpurina **XXXV**.

2.1.2. Reaktivnost purinskih nukleobaza

Purin može postojati u 4 tautomerna oblika: *9H*, *7H*, *1H* i *3H* purin (*Shema 10*). U većini slučajeva purin i njegovi derivati nalaze se u obliku *9H* i *7H*.³⁶ Ove tautomerne oblike purini poprimaju u plinskoj fazi i u otopini jer su stabilniji od *1H* i *3H* tautomera. U kristalnom stanju dominira oblik *7H*.

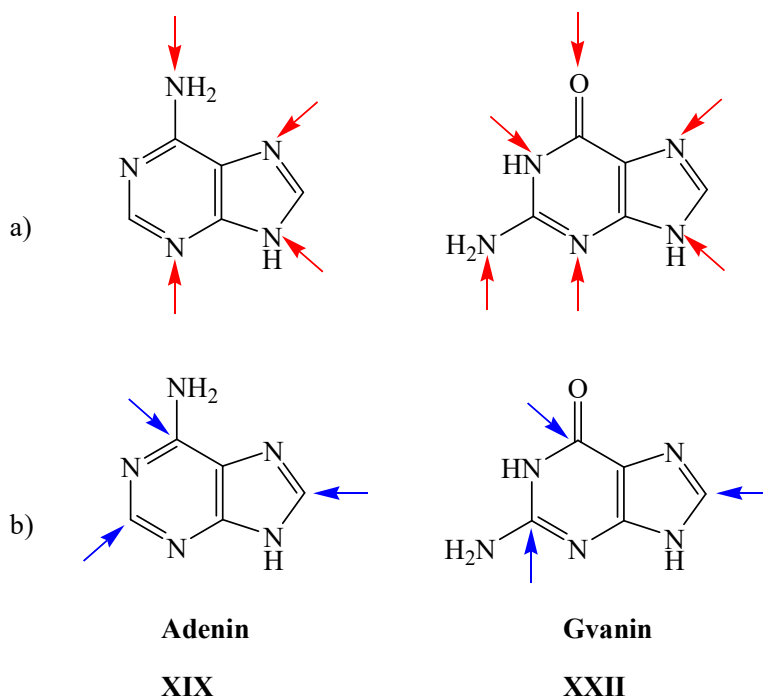


Shema 10. Tautomerni oblici purina.

Purini su, općenito, bijele krutine amfoternog karaktera. Mogu tvoriti soli i s kiselinama i s bazama. Zbog konjugiranih dvostrukih veza, purini su aromatski spojevi.

Nukleobaze imaju trigonalne sp^2 hibridizirane atome. Dušikovi atomi purina koji su povezani s tri druga atoma σ -vezama sudjeluju s dva p-elektrona u π -elektronskom sustavu prstena i nemaju neveznih, n-orbitala.³⁷ To su N1 atom gvanina, N9 atomi adenina i gvanina te dušikovi atomi egzocikličkih amino skupina adenina i gvanina. Dušikovi atomi povezani s dva druga atoma σ -vezama daju jedan p-elektron u π -elektronski sustav i imaju dva elektrona u neveznoj orbitali. To je N1 atom adenina te N3 i N7 atomi adenina i gvanina. Zbog keto-enolne tautomerije kisikovi atomi mogu kod enola stvarati dvije σ -veze i tada sudjeluju s dva p-elektrona u aromatskom sustavu i imaju dva elektrona u neveznoj orbitali, dok se u slučaju keto tautomera stvara jedna σ -veza, jedan p-elektron ulazi u aromatski sustav, a po dva elektrona se nalaze u dvije nevezne orbitale. Prema tome, atomi koji sudjeluju s dva elektrona u zajedničkom π -elektronskom sustavu imaju smanjenu elektronsku gustoću odnosno parcijalni naboj (δ^+). Atomi koji sudjeluju s jednim p-elektronom u sustavu imaju dva elektrona u neveznoj orbitali a time i negativni parcijalni naboj (δ^-). Općenito, u reakcijama s elektrofilnim reagensima najreaktivniji su atomi s najvećom elektronskom gustoćom, dok su u reakcijama s nukleofilnim reagensima najreaktivniji atomi s najmanjom gustoćom elektrona. Elektrofilna supstitucija na purinskim bazama najčešće se odvija na N1 položaju gvanina, N3, N7 i N9 položaju adenina i

gvanina te na egzocikličkim amino skupinama (*Slika 8*). Zbog keto-enolne tautomerije, moguća je i elektrofilna supstitucija protona na položaju C6 gvanina. Najčešća meta napada nukleofilnih reagensa su atomi C2, C6 i C8 purinskih baza. Nukleofilnoj supstituciji podliježu i egzocikličke amino skupine. Dvostruka veza između C4 i C5 atoma ne podliježe reakcijama adicije.

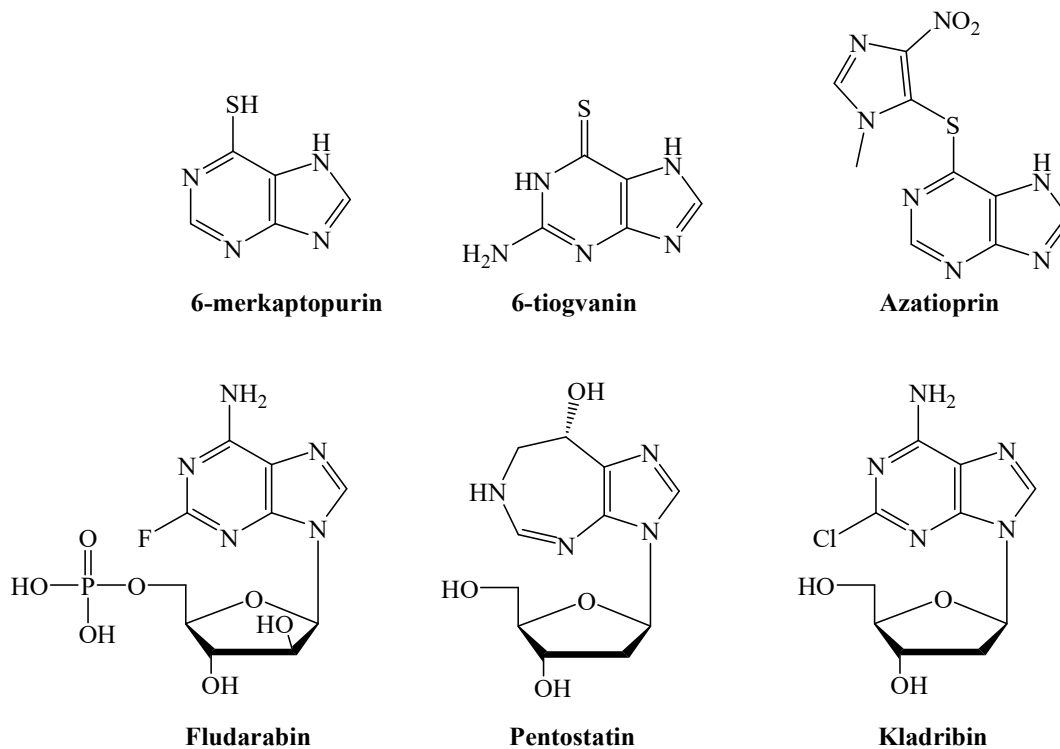


Slika 8. Reaktivnost purinskih nukleobaza: a) aktivna mjesta za elektrofilne napade; b) aktivna mjesta za nukleofilne napade.

2.1.3. Biološki aktivni purini

Mnogi purinski derivati pokazuju značajno citotoksično djelovanje i nalaze se u upotrebi za liječenje raznih vrsta raka (*Slika 9*). Analozi purina koji se koriste u terapiji akutne leukemije su 6-merkaptopurin i 6-tiogvanin.³⁸ Nakon transformacije u ribonukleotid, 6-merkaptopurin inhibira nekoliko enzima potrebnih za sintezu adenzina i gvanozina i tako selektivno sprječava rast tumora. 6-tiogvanin ima sličan metabolički učinak kao i 6-merkaptopurin. Može se uklopiti u DNA i RNA tumorskih, ali i normalnih stanica. 6-merkaptopurin i azatioprin pripadaju danas najčešće korištenim lijekovima u liječenju upalnih bolesti utrobe kao što je Crohnova bolest i ulcerozni kolitis.³⁹ Fludarabin se uspješno koristi u liječenju kronične limfocitne leukemije.⁴⁰ Fludarabin monofosfat se izvan stanice defosforilira i u nukleozidnom obliku ulazi u stanicu. Fosforiliranje fludarabina katalizira enzim deoksicitidin kinaza (dCK), a trifosfatni derivat je

jaki inhibitor enzima DNA polimeraze i ribonukleotid reduktaze. Fludarabin je toksičan za zloćudne limfoidne stanice kao i za normalne stanice. Pentostatin i kladribin se koriste u liječenju leukemije vlasastih stanica.⁴¹



Slika 9. Biološki aktivni purinski analozi s citotoksičnim djelovanjem.

Moguće je pronaći brojna literaturna priopćenja o različitim purinskim derivatima koji pokazuju biološko djelovanje, pa je tako poznato da 9-benzilpurini supstituirani u C6 položaju feniletinilnom, *trans*-stirilnom ili arilnom grupom inhibiraju rast bakterije *Mycobacterium tuberculosis*.⁴² Grupa trisupstituiranih purina pokazala je inhibitorno djelovanje na ciklin-ovisne kinaze (CDK), enzime ključne za diobu stanice, pa tako i za proliferaciju i tumore.⁴³ Značajna citotoksična svojstva pokazao je i 9-(β-D-ribofuranozil)-6-(trifluorometil)purin⁴⁴ te nekoliko derivata purina koji u C6 položaju nose halogenarilni⁴⁵ supstituent. Derivati 2-oksopurina s različitim supstituentima u C6 položaju pokazali su jaku citotoksičnu aktivnost usporedivu s djelovanjem 6-mercaptapurina.⁴⁶ N9 supstituirani derivati 6-klorpurina pokazuju citotoksična⁴⁷ i antiviralna⁴⁸ svojstva.

Jedan od najpoznatijih antivirusnih lijekova je aciklovir ili aciklogvanozin.⁴⁹ Koristi se za liječenje oboljenja uzrokovanih virusima iz porodice *Herpesviridae* (herpesvirusi). Otkriće ovog lijeka označavalo je određenu prekretnicu u terapiji virusa, budući da je aciklovir izrazito

selektivan, a jako slabo citotoksičan. U kliničkoj upotrebi su i esterski derivati aciklovira, kao što je valilni ester (valaciklovir) te strukturni analozi ganciklovir, njegov valilni ester (valganciklovir), penciklovir i buciklovir.

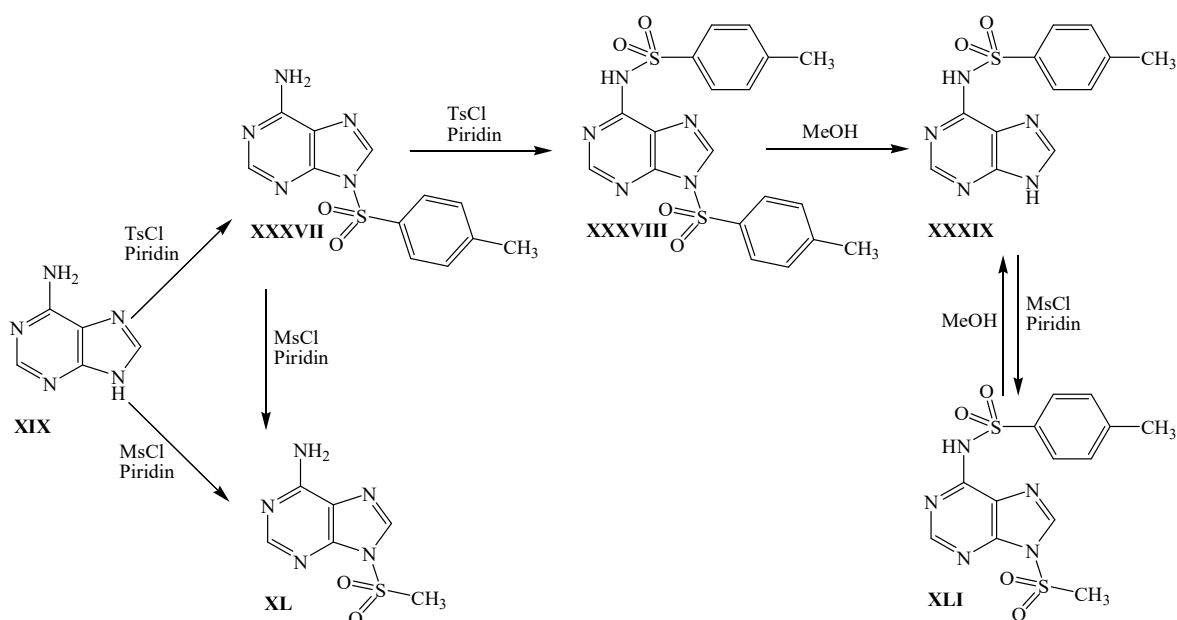
Različiti purinski derivati su supstrati ili inhibitori PNP (purin nukleozid fosforilaza) enzima. Taj enzim odgovoran je za fosforolizu purinskih nukleozida, što je jedan od važnih procesa ključnih za pravilno funkcioniranje i životni ciklus stanice. Uključuje reverzibilno cijepanje *N*-glikozidne veze pomoću fosfatnog iona. PNP katalizira reverzibilnu fosforilaciju ribo- i 2'-deoksiribonukleozida gvanina i hipoksantina (viši organizmi) te adenozina (prokarioti) pri čemu nastaje riboza-1-fosfat odnosno 2-deoksiriboza-1-fosfat i slobodna nukleobaza.⁵⁰ Friedkin i sur. su 1950. godine otkrili PNP enzim i dokazali da igra ključnu ulogu u metabolizmu nukleozida i nastajanju T-stanica.⁵¹ U slučaju inhibicije ili nedostatka PNP enzima dolazi do nakupljanja 2'-deoksigvanozin-5'-trifosfata (dGTP) u T-stanicama što ometa sintezu DNA i završava apoptozom T-stanica.⁵² Molekule koje inhibiraju PNP enzim mogu predstavljati novu skupinu imunosupresivnih agensa sa selektivnom inhibicijom odgovora T-stanica, ali bez utjecaja na odgovor B-stanica, i kao takve mogle bi se koristiti za liječenje autoimunih poremećaja (reumatoidni artritis, psorijaza, lupus, multipla skleroza, dijabetes tip 1) i malignih bolesti T-stanica leukemija i limfoma.⁵³ PNP može pocijepati i *N*-glikozidnu vezu nukleozidnih lijekova. Dobar inhibitor PNP-a koji ima mogućnost prolaska kroz membranu stanice u kojoj djeluje PNP mogao bi, prema tome, spriječiti prijevremenu metaboličku razgradnju tih lijekova i na taj način omogućiti njihovo terapijsko djelovanje.⁵⁴ Nadalje, mnogi paraziti i bakterije nemaju mogućnost *de novo* sinteze purina te su ovisni o metaboličkom procesu poznatom kao put spašavanja purina (*engl.* purine salvage pathway). Inhibitori enzima koji sudjeluju u tom procesu, uključujući i PNP, glavni su kandidati za antiparazitske i antibakterijske lijekove.⁵⁵

2.1.4. *N*-sulfonilni derivati purina

N-sulfonilni derivati purina vrlo su oskudno obrađeni u literaturi. Berlin i suradnici opisali su sintezu *N*⁶-(*p*-nitrobenzensulfonil)adenina u 65%-tnom iskorištenju.⁵⁶ Ruskin opisuje dobivanje acetilsulfanililnog⁵⁷ derivata adenina, a obrađena je i sinteza sulfonamidnih derivata ksantinskog⁵⁸ tipa. Martirosyan i suradnici opisali su dobivanje 9-tosiladenina **XXXVII** u 81%-tnom iskorištenju, a isti spoj dobili su slučajno Zemlicka i suradnici, u reakciji adenalena s *p*-toluensulfonil-kloridom (tosil klorid; TsCl).^{59,60} Beaman i suradnici sintetizirali su nekoliko purinskih sulfonamida reakcijom klorpurina s natrijevim sulfanilamidom.⁶¹

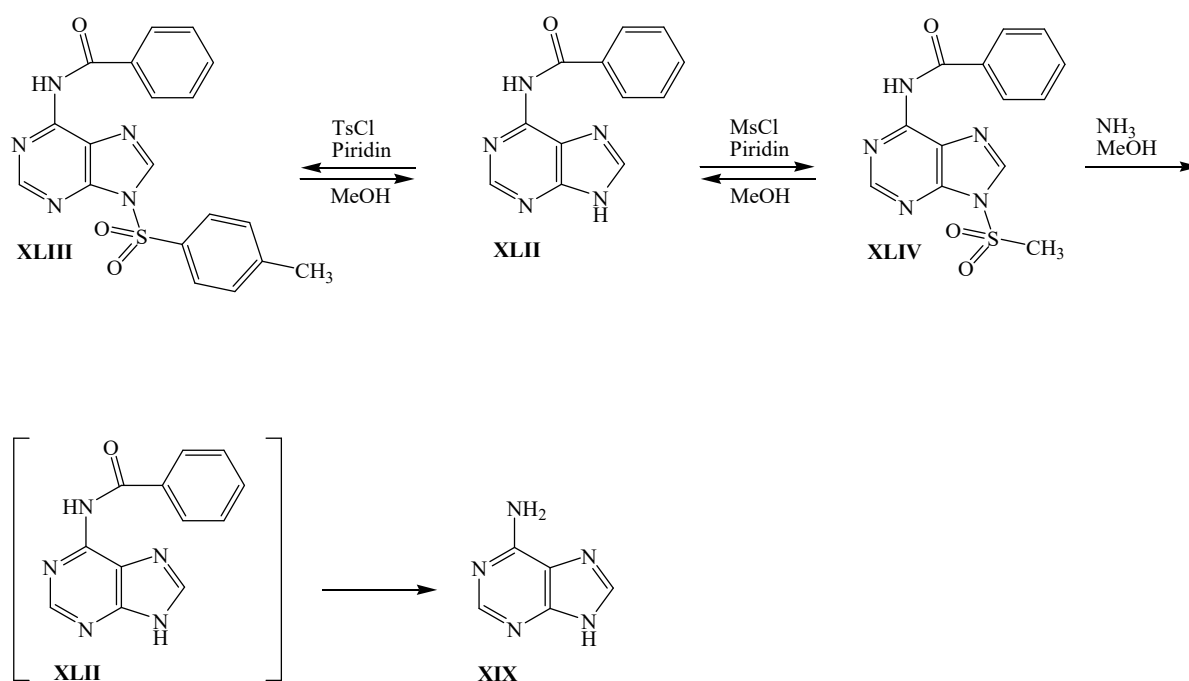
Nukleozidi sa sulfonilnim supstutuentom vezanim na amino skupinu također su slabo obrađeni u literaturi. Markiewicz i suradnici su sintetizirali N^4 -tosilcitudin i N^4 -mesilcitudin kao prekursore za sintezu N^4 -alkil supstutuiranih derivata citidina.⁶²

Iz literature je poznato da je vodik na položaju N9 adenina kiseliji od protona amino skupine.⁶³ U našoj grupi ispitane su reakcije uvođenja aril- i alkilsulfonilne grupe na egzocikličku amino skupinu adenina i/ili N9 položaj purinske baze (*Shema 11*).⁶⁴ Dokazano je da se na sobnoj temperaturi sulfoniliranje može provesti regioselektivno na N9 položaj pri čemu nije primijećeno nastajanje mogućih N3 i N7 izomera. 9-tosiladenin **XXXVII** sintetiziran je s 60%-tnim iskorištenjem reakcijom adenina **XIX** s 2 mola tosil klorida na sobnoj temperaturi u piridinu. Povećanjem količine tosil klorida (5 mola) nastaje smjesa 9-tosiladenina **XXXVII**, $N^6,9$ -ditosiladenina **XXXVIII** i N^6 -tosiladenina **XXXIX**. Pokazalo se da je disupstutuirani **XXXVIII** nestabilan na povišenoj temperaturi. Produljenjem vremena reakcije nastaju samo monosupstutuirani spojevi **XXXVII** i **XXXIX**. Sulfoniliranje adenina **XIX** alifatskim, 1-metansulfonil kloridom (mesil-klorid; MsCl) pokazalo je slične trendove u reaktivnosti i stabilnosti produkata. 9-mesiladenin **XL** izoliran je u 90%-tnom iskorištenju, a disulfonilni produkti **XXXVIII** i **XLI** su nestabilni u kiselim uvjetima i protičnim otapalima te prelaze u monosupstutuirani **XXXIX**.



Shema 11. Sinteza sulfonilnih derivata adenina **XIX**.

U slučaju tosilnih (XXXVII, XXXVIII i XXXIX) i mesilnih (XL i XLI) derivata adenina pokazalo se da se stabilnost N9-SO₂ veze smanjuje prisustvom tosilnog supstituenta na egzocikličkoj amino skupini adenina. Stabilnost N9-SO₂ veze ispitana je i na primjeru N⁶-benzoiladenina XLII (Shema 12). Reakcijom XLII i tosil- odnosno mesil-adenina dobiveni su odgovarajući disupstituirani spojevi XLIII i XLIV koji su također osjetljivi na različite uvjete pa kromatografskim pročišćavanjem na silikagelu ili prekrizacijom iz metanola prelaze u početni spoj XLII. Amonolizom XLIV nastaje adenin XIX.



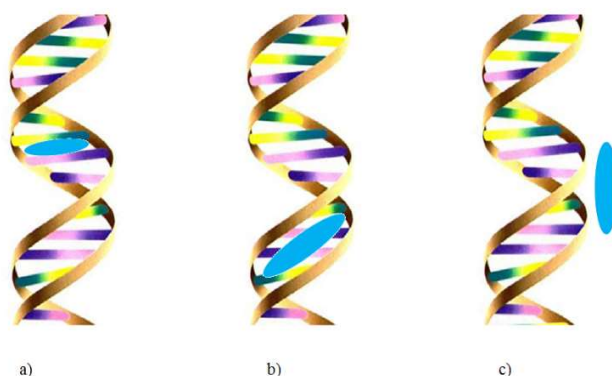
Shema 12. Ispitivanje stabilnosti sulfoniliranih spojeva na primjeru N⁶-benzoiladenina XLII.

2.2. Interakcije malih molekula s polinukleotidima

Postoji jasna veza između afiniteta vezanja molekule interkalatora u DNA i biološke aktivnosti spoja, međutim citotoksičnost ovisi i o brojnim drugim faktorima, kao što su metabolički putovi i prolazak kroz citoplazmatsku i jezgrinu membranu.⁶⁵ Odnos između strukture i biološke reaktivnosti spoja intenzivno se proučava.

Dva su osnovna tipa interakcija malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama. Prvi tip su nepovratne interakcije, pri kojima nastaju kovalentne veze male molekule s polinukleotidima ili se cijepa polinukleotidni lanac, a drugi tip su ravnotežne interakcije, pri kojima nastaju nekovalentni kompleksi.⁵

Najčešći oblik interakcija malih molekula s dvostrukom zavojnicom DNA ili RNA je nekovalentno vezanje. Ligande razlikujemo prema dominantnom načinu vezanja za nukleinske kiseline, a to može biti: interkaliranje (umetanje između parova baza), vezanje u mali ili veliki utor zavojnice i elektrostatsko međudjelovanje (*Slika 10*).



Slika 10. Načini vezanja malih molekula na polinukleotide: a) interkaliranje, b) vezanje u mali utor i c) elektrostatsko vezanje.

Interkaliranje molekule stabilizira i ukružuje polinukleotidni lanac te dolazi do njegovog produljenja, djelomičnog odvijanja i deformacije.⁶⁶ Ujedno dolazi do promjene u raspodjeli elektrona na susjednim bazama, što rezultira promjenama apsorpcijskih UV/Vis i fluorescentnih spektara. Ovo svojstvo omogućuje korištenje interkalatora kao markera u istraživanju raznih bioloških molekula. Fenantridinski derivati, kao etidij bromid, među istaknutijim su primjerima ove prakse zbog izrazite promjene fluorescencije uslijed interkaliranja.⁵ Vezanje mnogih klinički korištenih antitumorskih lijekova kao što su amsakrin⁶⁷, daunomicin⁶⁸, daunorubicin⁶⁹ te nekih antibiotika, kao što su eritromicin⁷⁰, sandramicin⁷¹ temelji se na interkalativnom načinu vezanja.

Male molekule koje imaju izduženu strukturu i funkcionalne skupine koje mogu tvoriti vodikove veze pogodne su za vezanje u mali ili veliki utor DNA.⁷² Većina proteina koji dolaze u interakciju s DNA unutar organizma vezuje se u veliki utor, tako da je mali utor obično slobodan i predstavlja moguće mjesto za napad lijeka. Veliki potencijal stvaranja vodikovih veza s nukleobazama, unutar manjeg utora DNA i RNA, pokazali su sintetski poliamidi koji sadrže odijeljene prstenove pirola, imidazola i hidroksi-imidazola.⁷³ Dvolančane RNA imaju široki i plitki manji utor koji ne podupire vezanje malih molekula u usporedbi s dubokim i

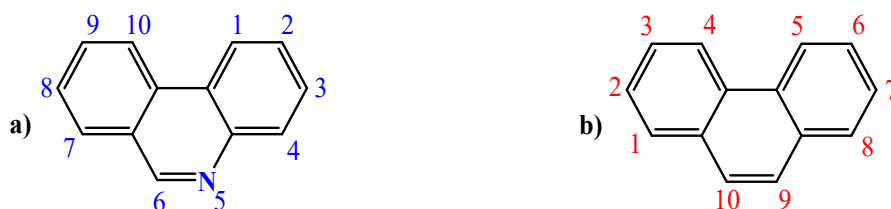
uskim manjim utorom dvolančane DNA tako da se spojevi koji ulaze u manji utor DNA vežu specifično.

Elektrostatsko vezanje supstance uključuje interakciju s negativno nabijenim fosfatnim skupinama i uglavnom nije specifično.

Za ispitivanje interakcija malih molekula s DNA i RNA koriste se sintetski analozi nukleinskih kiselina poznatog sastava i redoslijeda nukleotida. Nastajanje kompleksa ovisi o afinitetu i načinu vezanja ispitivanog spoja te o strukturnim karakteristikama i sastavu zavojnice polinukleotida. Veliki broj jednolančanih i dvolančanih sintetskih polinukleotida je komercijalno dostupan, a pomoću uređaja za automatsku sintezu moguće je pripremiti oligonukleotide željenog redoslijeda baza. Prirodne dvolančane DNA koje se najčešće koriste, a čiji redoslijed parova baza i strukturna svojstva nisu detaljno objašnjeni, su *ctDNA* izolirana iz timusne žljezde teleta (*calf thymus* DNA – *ctDNA*) i *stDNA* izolirana iz testisa lososa (*salmon testes* DNA – *stDNA*). Koriste se jednolančani RNA polinukleotidi (poli A, poli G, poli C, poli U), te odgovarajući analozi DNA. Sintetski dvolančani homopolinukleotidi su osnovne strukture poli X - poli Y (A - U, G - C, dA - dT, dG - dC) i alternirajući polinukleotidi osnovne strukture poli XY - poli XY (dAdT - dAdT, dGdC - dGdC). Svaki od navedenih polinukleotida posjeduje različita strukturna svojstva (npr. struktura dvostruke uzvojnice poli dA - poli dT je izrazito izvinuta s specifičnim manjim utorom pogodnim za vezanje malih molekula).⁷⁴

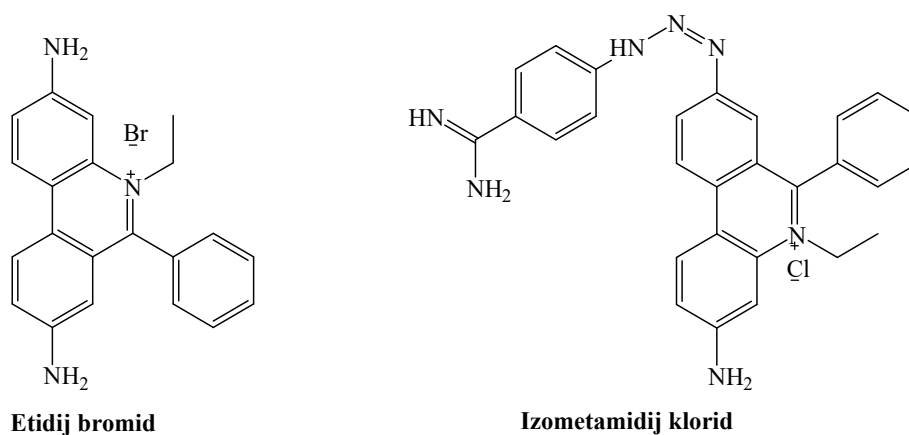
2.3. Fenantridini

Fenantridin je monoaza analog fenantrena u kojem je C9 atom fenantrena zamijenjen dušikom (Slika 11).



Slika 11. a) fenantridin; b) fenantren.

Otkriće tripanocidne aktivnosti nekih derivata fenantridina pokrenulo je potragu za novim terapeutcima iz ove klase spojeva.⁷⁵ Fenantridinski tripanocidi izometamidij klorid i etidij bromid u dugogodišnjoj su upotrebi u liječenju afričke tripanosomijaze (bolest spavanja), ali kod stoke (*Slika 12*).⁷⁶ Njihovo djelovanje se bazira na inhibiciji sinteze nukleinskih kiselina tripanosoma interkalacijom između parova baza DNA tog parazita.⁷⁷



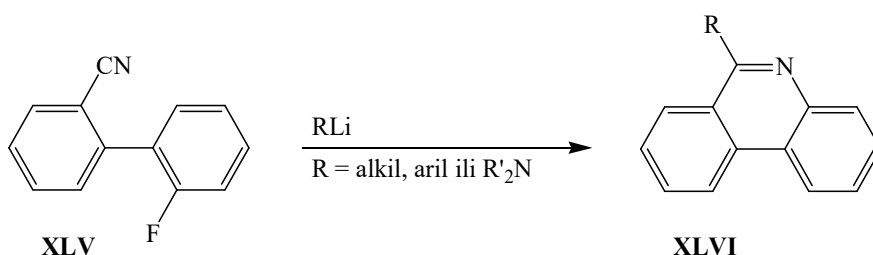
Slika 12. Fenantridinski tripanocidi: a) etidij bromid; b) izometamidij klorid.

Etidij bromid (EB; 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridiniij bromid) je poznati interkalator čija je sinteza objavljena 1952. godine.⁷⁸ Razvila ga je farmaceutska tvrtka Boots kao lijek za tripanosomijazu. EB je vjerojatno najpoznatiji predstavnik fenantridinske skupine spojeva koji osim antiparazitske aktivnosti pokazuje i značajno antitumorsko⁷⁹ i antivirusno⁸⁰ djelovanje. Zbog svoje mutagenosti ne može se koristiti u liječenju ljudi.⁸¹ Koristi se i kao fluorescentni marker za polinukleotide jer se specifično i s velikim afinitetom veže na dvostruke zavojnice DNA i RNA.¹² Zbog ovog svojstva, koje prati i snažno povećanje fluorescencije uslijed vezanja, već je dugi niz godina u upotrebi u spektrofluorimetrijskim studijama.⁸² Njegov analog propidij jodid koristi se kao proba za staničnu nekrozu.

Otkriće brojnih novih fenantridinskih alkaloida sa biološkim djelovanjem vratilo je interes za ove dugo zanemarivane spojeve. Istaknutiji predstavnici fenantridinskih alkaloida su sangvinarin i keleritrin za koje je dokazano da uzrokuju apoptozu različitih tumorskih stanica te su zbog toga dobri kandidati za razvoj antitumorskih lijekova.⁸³

2.3.1. Sintaza fenantridina

Fenantridin su prvi sintetizirali Pictet i Ankersmit pirolizom kondenzacijskog produkta anilina i benzaldehida.⁸⁴ Morgan i Walls su poboljšali reakcijske uvjete zatvaranja prstena dehidracijom pomoću fosfornog oksiklorida, kuhajući reaktante u nitrobenzenu.⁸⁵ Od tada je objavljen niz sintetskih metoda koje koriste različite reagense i reakcijske uvjete. Još iz 1950. poznato je dobivanje fenantridina redukcijom fenantridona.⁸⁶ Iste godine objavljena je i sinteza Bischler-Napieralski reakcijom.⁸⁷ Novije metode nude bolje iskorištenje i mogućnost uvođenja različitih supstituenata na prsten.⁸⁸ Poznata je reakcija dobivanja fenantridina u vrlo dobrom iskorištenju pomoću Grignardova reagensa (*Shema 13*).⁸⁹



Shema 13. Sinteza fenantridina **XLVI** Grignardovim reagensom.

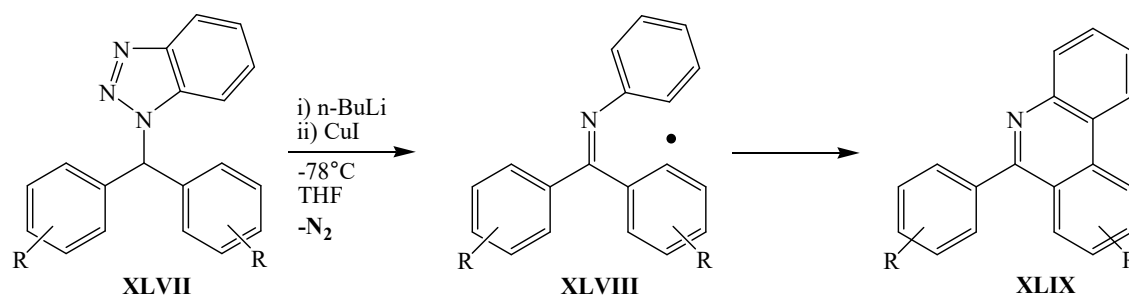
Dvije najčešće metode dobivanja fenantridina koje se koriste danas su sinteza u radikalnim uvjetima i sinteza katalizirana prijelaznim metalima.

2.3.1.1. Radikalna sinteza fenantridina

Radikalne metode sinteze fenantridina obično uključuju dva do tri reakcijska stupnja primjenom različitih inicijatora. Moguća je i fotoinducirana reakcija, tj. stvaranje radikala potaknuto ultraljubičastim zračenjem, sa ili bez fotokatalizatora. Reaktanti koji se koriste u radikalnim reakcijama obično su jeftini i relativno lako sintetski dostupni. Poznate metode obuhvaćaju upotrebu derivata benzotriazola, aminobifenila, arilaldehida, *N*-(*orto*-halobenzil)arilamina, oksim karbonata, izocijanobifenila, itd. Glavna prednost radikalnih metoda su blagi uvjeti reakcije u većini slučajeva. Iskorištenja uvelike ovise o supstituentima na početnim spojevima. Ovaj tip reakcija uglavnom se koristi za dobivanje 6-aril i 6-alkilfenantridinskih derivata te 6-fosforiliranih analoga s jednim ili dva dodatna supstituenta koji se obično nalaze na položajima C1, C2, C3, C4 ili C8.¹²

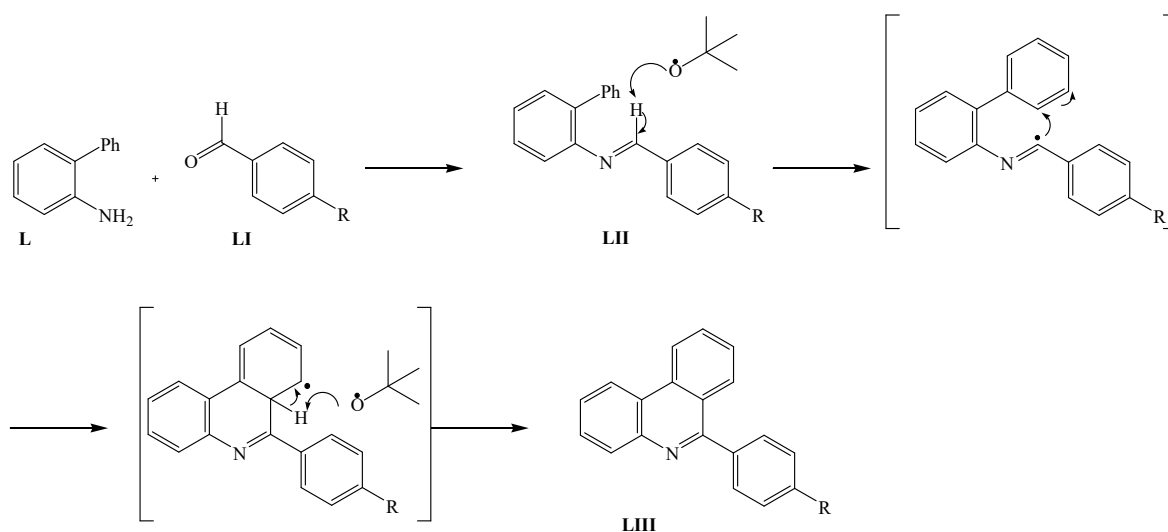
6-arilfenantridinski derivati **XLIX** mogu se sintetizirati ciklizacijom benzotriazolnih derivata diarilmetana, akridina, ksantena ili tioksantena **XLVII**.⁹⁰ Reakcija se temelji na stvaranju

karbaniona stabiliziranog benzotriazolom koji se oksidira u radikal **XLVIII** pomoću bakrovog (I) jodida. Slijedi eliminacija dušika i zatvaranje fenantridinskog prstena (*Shema 14*).



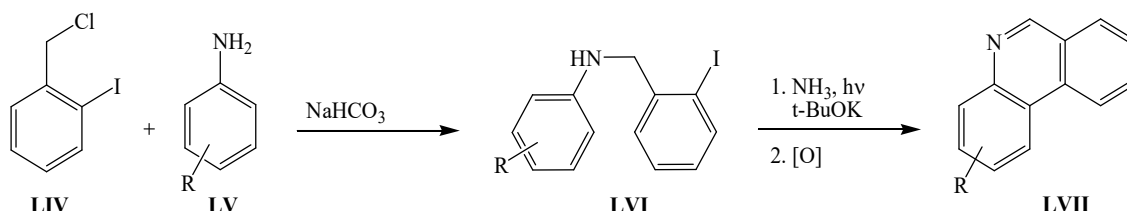
Shema 14. Sinteza 6-arilfenantridina **XLIX** iz benzotriazolnih derivata **XLVII**.

Različiti 6-arilfenantridinski derivati pripremljeni su radikalnim reakcijama iz diariliminskih prekursora.⁹¹ Reakcija je inicirana apstrakcijom vodikova atoma pomoću elektrofilnog izopropoksi radikala (iPrO[•]) nakon čega se događa intramolekulska ciklizacija i oksidativna aromatizacija u fenantridin. Bowman i suradnici modificirali su ovu metodu te iz sigurnosnih razloga upotrijebili *tert*-butoksi radikal (*t*-BuO[•]) dobiven iz di(*tert*-butil)peroksida.⁹² Arilimini **LII** su pripremljeni iz aminobifenila **L** i arilaldehida **LI**. Radikalna ciklizacija u prisutnosti di(*tert*-butil)peroksida u klorbenzenu dala je odgovarajuće fenantridinske derivate **LIII** (*Shema 15*).



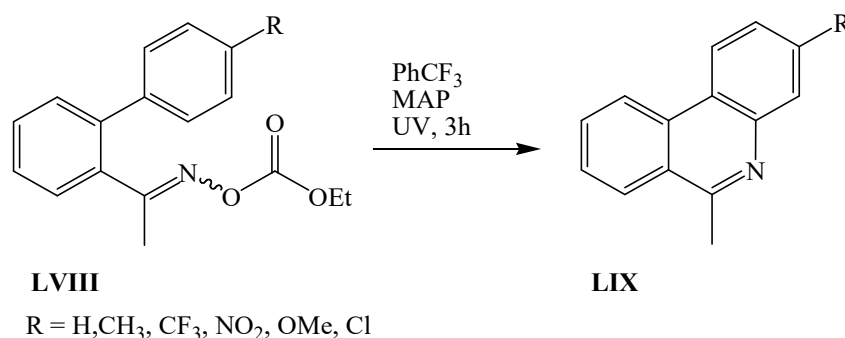
Shema 15. Sinteza 6-arilfenantridina **LIII** iz diariliminskih prekursora **LII**.

Poznata je i radikalska metoda dobivanja fenantridinskih derivata bez supstituenata u položajima C5 i C6.⁹³ Ovaj pristup uključuje sintezu *N*-(*o*-halobenzil)arilamina **LVI** iz 2-jodobenzil klorida **LIV** i različitih derivata anilina **LV**, a potom fotoinduciranu intramolekularnu ciklizaciju u nekoliko stupnjeva potpomognutu *t*-BuO• radikalom (*Shema 16*).



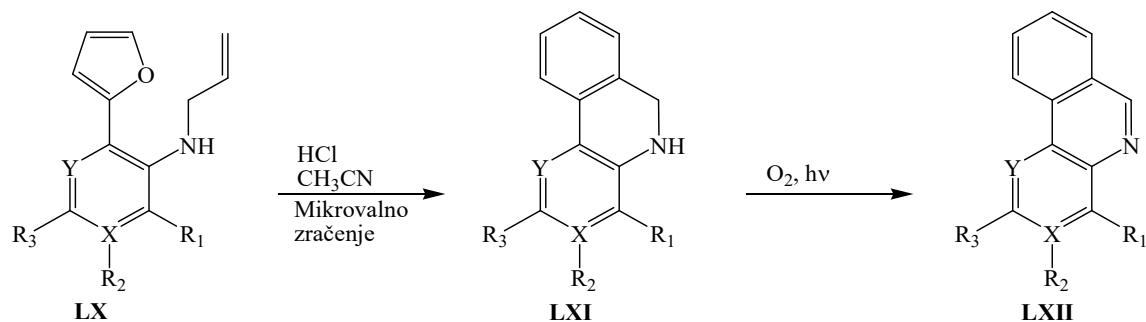
Shema 16. Sinteza fenantridinskih derivata **LVII** iz 2-jodobenzil klorida **LIV** i anilina **LV**.

Fenantridinski derivati **LIX** sintetizirani su fotoinduciranim stvaranjem iminil radikala iz oksim karbonata **LVIII** (*Shema 17*).⁹⁴ Prednosti metode koju su osmislili McBurney i suradnici su ekološki prihvatljivi uvjeti i nus-produkti koji se mogu lako ukloniti (ugljik dioksid, etanol i fenol) te zanemariv utjecaj elektronske prirode supstituenata na reakciju.



Shema 17. Sinteza fenantridinskih derivata **LIX** fotolizom oksim karbonata **LVIII**.

Zanimljiva je i sinteza u kojoj su Read i suradnici upotrijebili kombinaciju tehnika i relativno neuobičajene polazne spojeve.⁹⁵ Mikrovalnim zagrijavanjem provedena je Diels-Alderova ciklizacija *o*-furyl(alilamino)arena **LX** nakon koje se Diels-Alderov adukt transformira u dihidrofenantridine **LXI** uz prisutnost katalitičke količine kiseline. Izlaganjem ultraljubičastom zračenju dihidrofenantridini **LXI** se oksidiraju u (aza)fenantridine **LXII** (*Shema 18*).

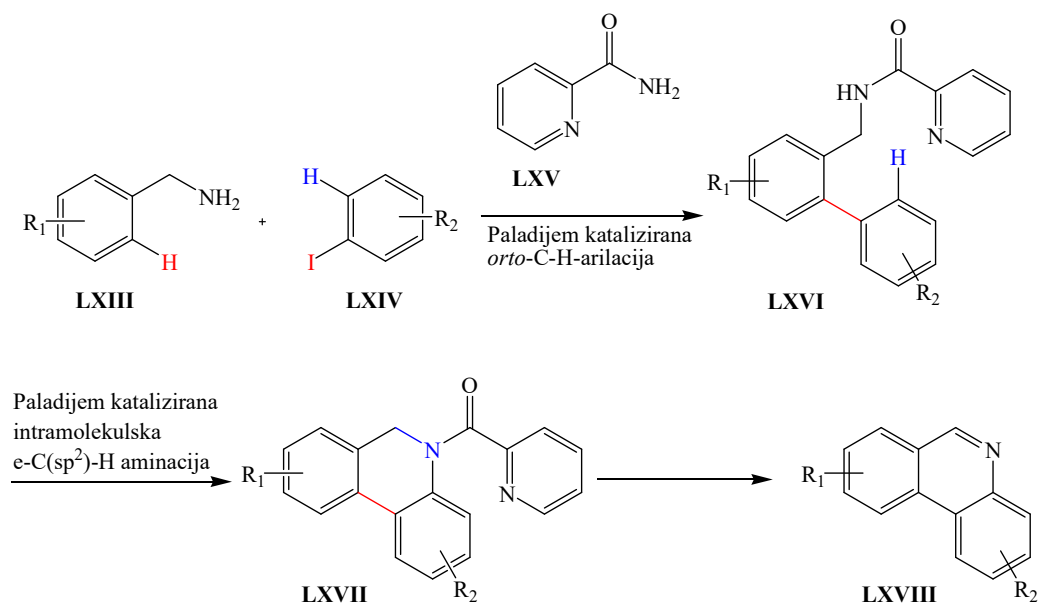


Shema 18. Sinteza fenantridina **LXII** kombinacijom mikrovalnog i ultraljubičastog zračenja.

2.3.1.2. Sinteza katalizirana prijelaznim metalima

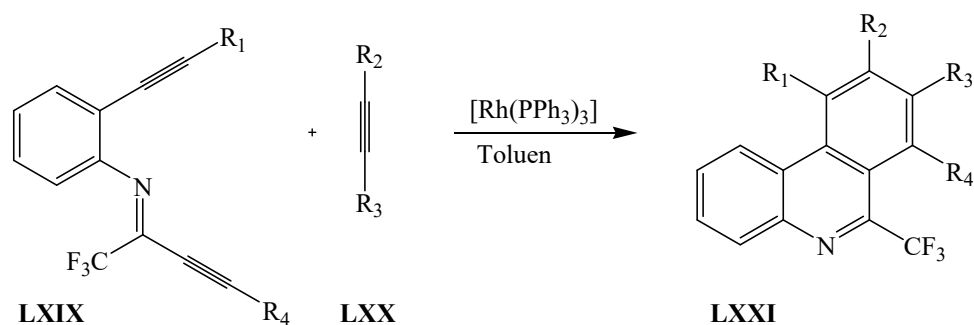
Kao i radikalna sinteza, sinteza katalizirana prijelaznim metalima omogućuje dobivanje različitih fenantridinskih derivata iz relativno jeftinih i sintetski lako dostupnih polaznih spojeva kao što su benzil amini, aril jodidi, imini, itd. Poznat je veliki broj različitih metoda, a sinteza uglavnom uključuje nekoliko sintetskih koraka i blage uvjete reakcije. Prednost ove metode je veća robusnost u odnosu na supstituente te stereo- i regioselektivnost. Međutim, kao katalizatori se najčešće koriste paladijevi kompleksi zbog čega je ova metoda znatno skuplja od radikalne sinteze te manje ekološki prihvatljiva.¹²

Noviji primjer paladijem katalizirane sinteze fenantridina u dva stupnja objavili su Pearson i suradnici.⁹⁶ U prvom stupnju reakcije sintetiziran je biarilni prekursor **LXVI**, iz benzil amina **LXIII**, aril jodida **LXIV** i pikolinamida **LXV** uz paladijev katalizator. Drugi stupanj, kataliziran s Pd(OAc)₂, obuhvaća ciklizaciju i oksidaciju u fenantridin **LXVIII** (*Shema 19*).



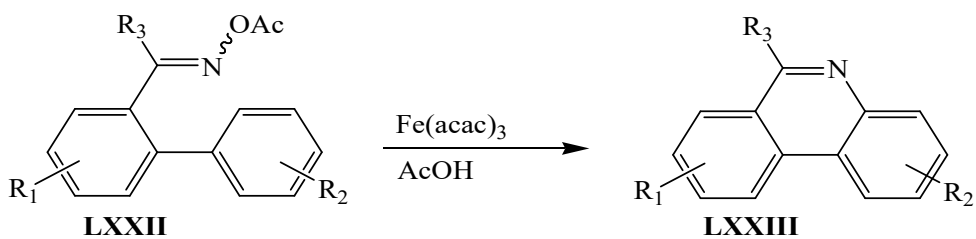
Shema 19. Sinteza fenantridina **LXVIII** uz paladijev katalizator.

Priprava polisupstituiranih fenantridina je sintetski zahtjevna, pogotovo ako je cilj dobiti supstituente na samo jednom fenilnom prstenu. Ovom problemu uspješno su odgovorili Li i suradnici.⁹⁷ Proveli su alkin[2+2+2]cikloadiciju kataliziranu rodijevim kompleksom i uspješno sintetizirali seriju fenantridina **LXXI** s različitim supstinentima (*Shema 20*).



Shema 20. Sinteza fenantridina **LXXI** alkin[2+2+2]cikloadicijom kataliziranom rodijevim kompleksom.

Istraživanja posljednjih godina usmjerena su prema pronalasku novih i jeftinijih katalizatora. Deb i suradnici objavili su sintezu fenantridina **LXXIII** intramolekularnom ciklizacijom *O*-acetil oksima **LXXII** uz katalizator željezo(III)acetilacetonat (*Shema 21*).⁹⁸

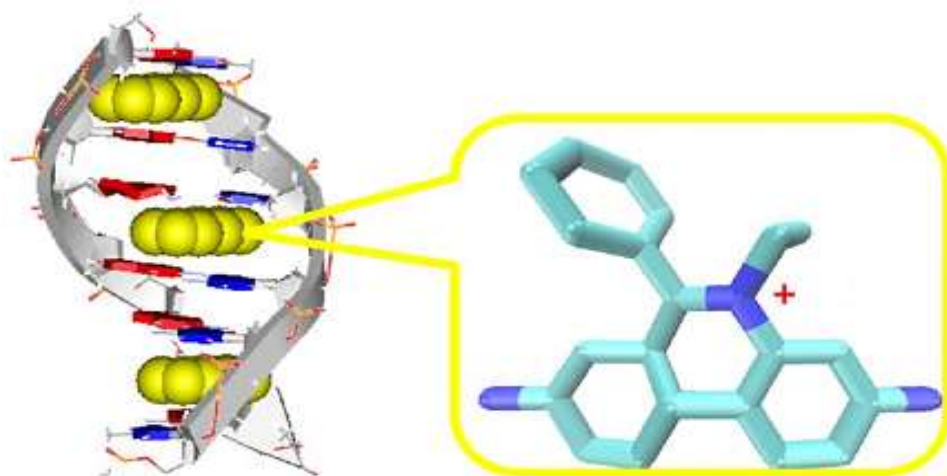


Shema 21. Sinteza fenantridina **LXIV** uz željezo(III)acetilacetonat.

Za većinu eksperimenata u kojima se cilja na interakciju derivata fenantridina s DNA ili RNA, fenantridin je izmjenjen u pozitivno nabijenu speciju alkiliranjem N5 ili protoniranjem N5 atoma u slabo kiselim uvjetima.

2.3.2. Svojstva fenantridina

Fenantridin i njegovi derivati često su proučavani u kontekstu nekovalentnih interakcija s polinukleotidima. Struktura samog fenantridina pogodna je za interkaliranje jer veličina i zakrivljenost aromatske površine odgovaraju prostoru između parova baza (Slika 13).¹²



Slika 13. Shematski prikaz interkaliranja etidij bromida (preuzeto iz referencije Tumir i sur.¹² i prerađeno).

Visoka polarizabilnost molekule ima povoljan utjecaj na aromatske i elektrostatske interakcije s polinukleotidima. Ovaj utjecaj posebno je izražen kod pozitivno nabijenih N5 alkiliranih

derivata kao što je etidij bromid. Protoniranjem N5 atoma u kiselom mediju može se također utjecati na jakost interakcija. Supstituenti u položaju C3 i C8 utječu na spektroskopski odgovor u UV/Vis i fluorescencijskoj spektroskopiji te se može predvidjeti kako će se on mijenjati promjenom supstituenata.⁹⁹

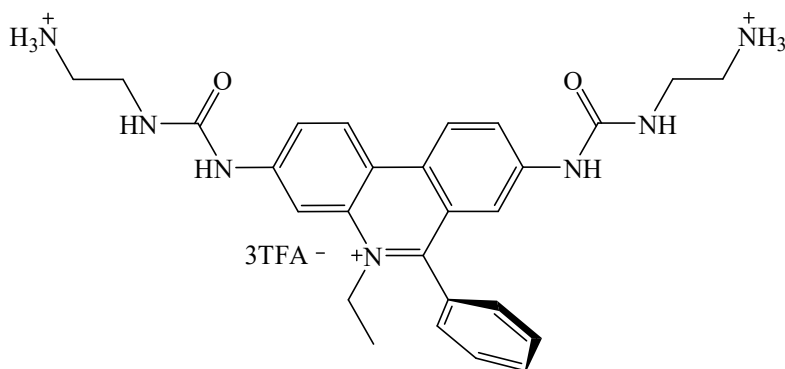
Etidij bromid je jednostavna policiklička aromatska molekula i predstavlja klasični interkalator koji uglavnom ne pokazuje specifičnost u interakcijama s različitim sekvencama polinukleotida. Modifikacije alkilnog lanca na N5 atomu¹⁰⁰, različiti supstituenti u C6 položaju¹⁰¹ te zamjena egzocikličkih amino skupina azido skupinama¹⁰² rezultirale su spojevima sa sličnim afinitetom za DNA kao i etidij bromid. Neki od navedenih derivata toksičniji su od etidij bromida. Luedtke i suradnici sintetizirali su seriju spojeva u kojima su amino skupine na položajima C3 i C8 zamijenjene gvanidino i pirolnom skupinom te ureom i supstituiranim derivatima uree.¹⁰³ Supstitucijom amino skupina na C3 i C8 dokazano je kako upravo one imaju značajan utjecaj na fluorescenciju i spektroskopska svojstva. Nadalje, poznato je da su te amino skupine odgovorne za mutagenost etidij bromida jer se u organizmu metabolički aktiviraju preko najmanje tri različita enzima.¹⁰⁴ Prema tome, enzimi koji djeluju na aromatske amine ne bi trebali prepoznati spojeve sa supstituiranim egzocikličkim amino skupinama, a eksperimentalni podaci pokazuju da većina takvih spojeva ima niži afinitet prema DNA od etidij bromida.¹⁰³ Jedan derivat pokazao je i veću selektivnost i afinitet prema Rev-regulatorskom proteinu virusa HIV-1 (*engl.* HIV-1 Rev Response Element; HIV-1 RRE) koji je ključan za replikaciju virusa.

Isti autori istraživali su i elektronsku strukturu etidij bromida i derivata sa supstituiranim egzocikličkim amino skupinama te utjecaj na interkaliranje. U slučaju etidij bromida, unatoč potizivnom naboju u N5 položaju, većina ugljikovih i vodikovih atoma u aromatskom sustavu ima veću gustoću elektrona u usporebi s nenabijenim 6-fenilfenantridinom jer je elektron-donorski utjecaj egzocikličkih amino skupina jači od elektron-odvlačećeg utjecaja endocikličkog iminija.⁹⁹ Egzocikličke amino skupine nose parcijalni pozitivni naboj. Nadalje, 3-amino derivat značajno je siromašniji elektronima od 8-amino derivata. Proizlazi da je elektronska struktura etidij bromida kombinacija utjecaja elektron-donorskih i elektron-odvlačećih grupa u kojoj posreduju dušikovi atomi. Elektronska svojstava etidij bromida mogu se podešavati derivatizacijom amino skupina. Ispitivanjem svojstava spojeva koji u položajima C3 i C8 imaju gvanidino, pirolne i karbamidne (urea) skupine pokazalo se kako derivati sa slabijim elektron-donorskim supstituentima pokazuju jaču fluorescenciju od etidij bromida dok oni koji sadrže supstituent s jačim elektron-donorskim svojstvima pokazuju znatno slabiju fluorescenciju.⁹⁹ Uzevši u obzir dosadašnja istraživanja može se izvući općeniti zaključak:

fenantridinski derivati bez NH₂ grupa pokazuju snažnu fluorescenciju u vodenoj otopini koja se gasi vezanjem na DNA, derivati s jednom NH₂ grupom (obično u položaju C8) pokazuju tek malu promjenu fluorescencije vezanjem na DNA, a derivati s dvije NH₂ grupe (u položajima C8 i C3) pokazuju slabu fluorescenciju sa snažnim porastom uslijed vezanja na DNA.¹² Ovi podaci govore u prilog tvrdnji da derivatizacijom egzocikličkih amino skupina etidij bromida možemo dobiti biološki aktivne spojeve sa podesivim spektroskopskim svojstvima koji nisu mutageni kao ishodni spoj.

2.3.3. Utjecaj supstituenata na svojstva fenantridina

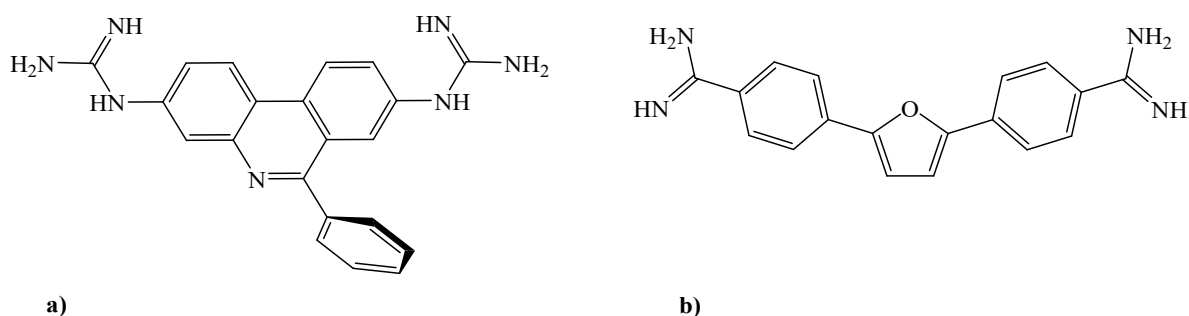
Izražen utjecaj supstituenata na svojstva fenantridinskih derivata najbolje objašnjavaju konkretni primjeri. Luedtke i suradnici željeli su pripremiti spoj koji će specifično inhibirati HIV-1 RRE. Već su dokazali da etidij bromid snažno veže taj protein, međutim, on se zbog toksičnosti ne može upotrijebiti za terapiju ljudi.¹⁰⁵ Budući da modifikacije egzocikličkih amino skupina pružaju mogućnost za dobivanje spojeva značajno izmjenjene elektronske strukture, smatrali su da upravo na taj način mogu dobiti spoj koji ima manji afinitet za DNA te bi stoga trebao biti manje toksičan. Elektronska struktura određuje i selektivnost, pa su se nadali spoju koji veže HIV-1 RRE s većom specifičnošću. Taj cilj je i postignut kod jednog od sintetiziranih spojeva (3,8-bis-urea-etilen-diamin-etidij) koji je zadovoljio oba kriterija (*Slika 14*).¹⁰³



Slika 14. Karbamidni derivat EB (3,8-bis-urea-etilen-diamin-etidij) koji pokazuje manji afinitet prema DNA i veći afinitet prema HIV-1 RRE od EB.

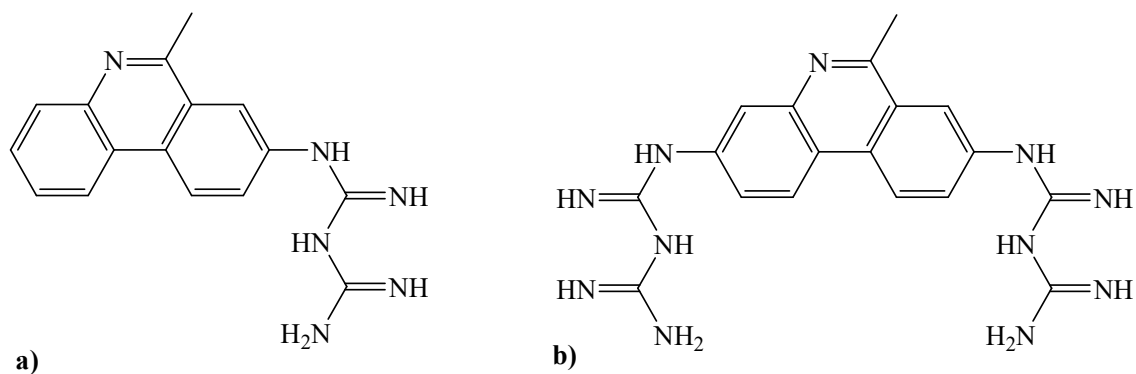
Bailly i suradnici također su istraživali derivate etidij bromida. Ispostavilo se da je supstitucijom egzocikličkih amino skupina gvanidinom dobiven spoj koji se veže u mali tor DNA (*Slika 15*).¹⁰⁶ Zanimljivo je da promjena načina vezanja nije oslabila afinitet spoja prema DNA,

naprotiv, afinitet prema AT-bogatim sekvencama gvanidino-derivata u usporedbi s etidij bromidom je jači te se može usporediti s poznatim utor-vežućim spojem furamidinom.



Slika 15. a) utor-vežući gvanidino derivat 6-fenilfenantridina; b) poznati utor-vežući spoj furamidin.

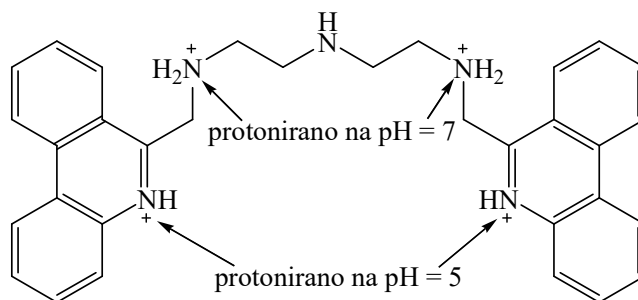
Inspirirani opisanom promjenom načina vezanja uslijed uvođenja različitih supstituenata, u našoj grupi su sintetizirani derivati s bigvanidnim skupinama u C3 i/ili C8 položaju. Pretpostavljalo se da će sustav s višestrukim mogućnostima stvaranja vodikovih veza povećati specifičnost kromofora prema različitim oblicima utora kod DNA i RNA, što se pokazalo točnim. Sintetizirani mono- i bis-bigvanidni derivati 6-metilfenantridina uspješno razlikuju dAdT i dGdC polinukleotide različitim odgovorom u fluorescencijskoj spektroskopiji te DNA i AU-RNA različitim odgovorom u CD spektroskopiji (Slika 16).¹⁰⁷



Slika 16. a) mono-; b) bis-bigvanidni derivat 6-metilfenantridina.

Sintetizirani su i bis-fenantridinski derivati povezani različitim poveznicama, među kojima se najzanimljiviji pokazao derivat sa triaminskom poveznicom. Vezanje ovog spoja kontrolirano

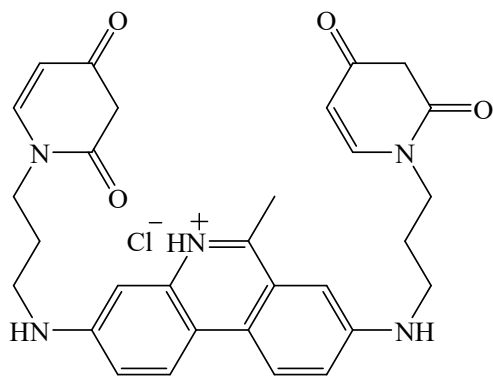
je pomoću pH, protoniranjem N5 fenantridina u slabo kiselim uvjetima (pH = 5,0). Interkaliranje se ostvaruje pomoću jedne fenantridinske podjedinice, a interakcije ostatka molekule s dijelovima utora polinukleotida utječu na prepoznavanje različitih polinukleotida (Slika 17).¹⁰⁸



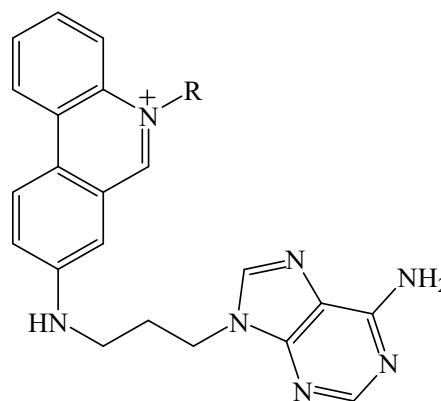
Slika 17. Bis-fenantridinski derivat s triaminskom poveznicom; pH vrijednost kontrolira količinu naboja na molekuli.

Povećanje selektivnosti jedan je od većih izazova u ovom području. Moguće rješenje tog problema je dizajn konjugata koji se sastoje od nekoliko podjedinica s različitim funkcijama prema DNA ili RNA. Tako imamo molekule koje kombiniraju interkalatorske jedinice s utor-vežućim komponentama, jedinicama koje se vežu elektrostatskim silama ili različitim komponentama kod kojih dominiraju sterički utjecaji. Fenantridin je vrlo često korišten kao interkalatorska jedinica, no dokazano je da njegovi derivati malim modifikacijama mogu postati i utor-vežući spojevi.¹⁰⁶

U potrazi za spojevima s povećanom selektivnošću prema različitim sekvencama DNA u našoj grupi pripravljena je serija fenantridinskih derivata s kovalentno vezanim nukleobazama u položajima C3 i/ili C8 (Slika 18). Pretpostavka da će doći do prepoznavanja komplementarnih nukleotida vodikovim vezama u vodenom mediju nije se obistinila zbog jake kompeticije ispitivanih spojeva s molekulama vode.¹⁰⁹ Ipak, hidrofobni okoliš unutar veznih mjesta u DNA i RNA omogućio je određeno prepoznavanje. Bis-uracilni derivat 6-metilfenantridina pokazao je sposobnost prepoznavanja konsekvencij AT sekvenci kombinacijom aromatskog slaganja i vodikovih veza. Adeninski derivat bez metilne skupine u položaju N5 pokazao je sposobnost prepoznavanja komplementarne poli U sekvence koja je u potpunosti nestala kod metiliranog derivata. Uvođenje još jednog adenina u položaj C3 potpuno je uništilo mogućnost međudjelovanja s DNA i RNA zbog jako zasjenjene strukture.



Prepoznavanje konsekvativnih AT sekvenci kombinacijom aromatskog slaganja i vodikovih veza



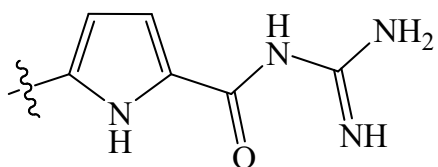
**a: R = H; prepoznavanje poli U sekvence
b: R = CH₃; gubitak prepoznavanja poli U**

Slika 18. Nukleobazni derivati fenantridina.

Napori oko pronalaska novih spojeva koji specifično prepoznaju različite vrste polinukleotida u našoj grupi su nastavljeni i s peptidnim derivatima. Sintetizirana je serija aminokiselina s fenantridinom na bočnom lancu (*Slika 19*).¹¹⁰ Za pripremu ovih spojeva razvijena je metoda sinteze na čvrstom nosaču koja pruža jedan od mogućih odgovora na sintetske probleme pripreme većih serija spojeva. Zanimljiva svojstva pokazao je bis-fenantridinski derivat s kratkom, rigidnom poveznicom (*Slika 19 b*). Zbog specifičnog fluorescentnog odgovora ovog spoja može se zaključiti da dolazi do stvaranja intramolekularnog ekscimera u vodenoj otopini, što je prvi takav slučaj opisan kod fenantridinskih derivata. Sintetizirani spojevi topljivi su u vodi te pokazuju slabu toksičnost *in vitro* što ih čini pogodnima za razvoj fluorescentnih markera za DNA i RNA.

širokom rasponu pH vrijednosti zbog delokalizacije tog naboja preko tri dušikova atoma. Nadalje, gvanidinska skupina učinkoviti je donor vodikovih veza, a može sudjelovati i u elektrostatskim interakcijama.¹¹³ Zbog svega navedenog, gvanidinska skupina je često dio sintetskih sustava za supramolekularno prepoznavanje aniona.

Dizajnirani umjetni receptori peptida vrlo se često koriste kao modelni sustavi za proučavanje interakcija iz prirodnih sustava. Za takvo ispitivanje poželjan je receptor koji snažno i specifično veže supstrat u fiziološki relevantnom, vodenom mediju. Vodikove veze i ionski parovi¹¹⁴ doprinose selektivnosti supramolekularnih receptora no ove interakcije su oslabljene solvatacijom receptora i supstrata¹¹⁵ molekulama vode. Hidrofobne interakcije, koje su izuzetno važne u vodenom mediju, su nespecifične i otežavaju dizajn receptora.¹¹⁶ U istraživačkoj grupi naših suradnika na Sveučilištu Duisburg – Essen dizajnirani su spojevi koji sadrže gvanidinokarbonilpirolnu jedinicu (GCP jedinica) za selektivno prepoznavanje supstrata u vodenom mediju (Slika 20).



Slika 20. Gvanidinokarbonilpirolni strukturni motiv.

Pokazalo se da „jednoruki“ kationski tripeptid koji sadrži GCP jedinicu snažno veže anionski tripeptid, model za C-terminalni kraj amiloidnog β -peptida, zahvaljujući hidrofobnim interakcijama alkilnih bočnih lanaca.¹¹⁷ Također, inhibira stvaranje amiloidnih niti *in vitro*.¹¹⁸ Gvanidinokarbonilpirolna jedinica poznata je po učinkovitom vezanju karboksilata u vodenom mediju.^{119,120} Dodavanjem linearnog peptidnog lanca otvaraju se mogućnosti dodatnih interakcija spojeva sa supstratom.¹²¹

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uvodne napomene

Otapala su destilirana nakon sušenja pomoću 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 lampom 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 sat 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.

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

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

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

FTIR (*engl. Fourier Transform Infrared*) spektri snimljeni su na spektrometru ABB Bomem MB102 single-beam rezolucijom 4 cm⁻¹ tehnikom KBr pločice. Frekvencije karakterističnih vrpci izražene su uobičajeno u obliku valnih brojeva (ν) čija je mjerna jedinica cm⁻¹.

UV/Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 100 Bio spektrofotometru u kvarcnim kivetama, a uzorci su otopljeni u metanolu ili u vodi. Apsorpcijski maksimumi (λ_{\max}) izraženi su u nanometrima (nm), a ekstinkcijski koeficijenti ($\log \epsilon$) u dm³ mol⁻¹ cm⁻¹.

Fluorescencijski spektri snimljeni su na Varian Cary Eclipse i Agilent Technologies Cary Eclipse Fluorescence spektrofotometru.

CD spektri snimljeni su na JASCO J815 spektrofotometru.

¹H NMR i ¹³C NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance DPX 300 i 600 (300/75 Hz i 600/150 MHz) u DMSO-*d*₆, CDCl₃ i CD₃CN. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm u odnosu na DMSO-*d*₆ ili na TMS kao unutrašnji standard, a konstante sprege (J) u Hercima (Hz). Dvodimenzijski COSY (*engl. Correlation Spectroscopy*), NOESY (*engl. Nuclear Overhauser*

Effect), HMQC (engl. *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) i HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) spektri snimljeni su na 20 °C uz upotrebu standardnog programskog paketa Varian Gemini.

Spektri mase visoke rezolucije purinskih i fenantridinskih 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 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 μ L/min, a protok desolvacijskog plina dušika 360 L/h. Desolvacijska temperatura održavana je na 300 °C.

Sinteza u mikrovalnom reaktoru provedena je pomoću instrumenta Monowave 300[®] (Anton Paar) u zatvorenom sustavu.

3.2. Priprava purinskih derivata

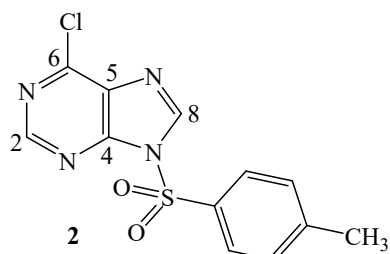
3.2.1. Opća procedura za pripravu *N*-9-sulfonil-6-klorpurinskih derivata 2-7

Serijski 9-*N*-sulfonil-6-klorpurinskih derivata pripremljena je modifikacijom literaturne metode¹²²:

U suspenziju 6-klorpurina **1** (250,0 mg, 1,6 mmol) u acetonu (16 mL) dodana je 0,4 M vodena otopina kalijevog hidroksida (8 mL). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi do potpunog otapanja **1**, a zatim je ohlađena na 0 °C. Tada je dodan odgovarajući sulfonil klorid (3,2 mmol) i novonastala suspenzija miješana je 3 sata pri 0 °C. Reakcijska smjesa je neutralizirana 1 M

kloridnom kiselinom. Sirovi produkt je odfiltriran, ispran vodom te prekrizaliziran iz vrućeg acetona, čime su dobiveni bijeli kristali **2-7**.

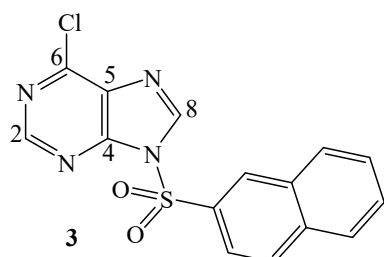
3.2.1.1. 6-klor-9-tosil-9*H*-purin (**2**)



6-klorpurin **1** (250,0 mg, 1,6 mmol) i tosil klorid (305,0 mg, 1,6 mmol) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Produkt **2** dobiven je u obliku bijelih kristala (317,3 mg, 64%).

T.t. = 174–175 °C; $R_f = 0,8$ (CH₂Cl₂:EtOAc/9:1); UV (MeOH) λ_{\max}/nm : 237; $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,52; IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3454 (vw), 3113 (w), 2924 (vw), 1587 (m), 1553 (m), 1475 (vw), 1433 (m), 1418 (w), 1387 (s), 1364 (m), 1333 (w), 1296 (vw), 1236 (vw), 1190 (s), 1178 (s), 1167 (s), 1140 (m), 1090 (s), 1070 (s), 928 (m), 889 (vw), 851 (w), 816 (w), 789 (vw), 704 (m), 691 (s), 671 (s), 644 (w), 631 (m), 581 (s), 559 (w), 550 (m), 532 (m); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 9,12 (s, 1H, H8), 8,90 (s, 1H, H2), 8,13 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Ar), 7,51 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, Ar), 2,38 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 153,33 (d, C2), 150,40 (s, C4 ili C6), 150,05 (s, C4 ili C6), 147,27 (s, Ar), 144,31 (d, C8), 132,75 (s, Ar), 131,63 (s, C5), 130,43 (d, Ar), 128,32 (d, Ar), 21,13 (q, CH₃); HRMS: m/z : 360,1118 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₆H₁₇N₅O₃S H⁺: 360,1125.

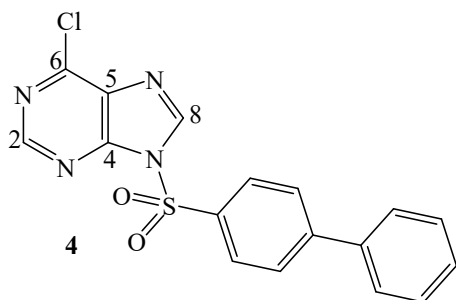
3.2.1.2. 6-klor-9-(naftalen-2-ilsulfonil)-9*H*-purin (**3**)



6-klorpurin **1** (250,0 mg, 1,6 mmol) i 2-naftalensulfonil klorid (366,4 mg, 1,6 mmol, 99%) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Produkt **3** dobiven je u obliku bijelih kristala (377,5 mg, 68 %).

T.t. = 217–219 °C; $R_f = 0,8$ (CH₂Cl₂:EtOAc/9:1); UV (MeOH) λ_{\max}/nm : 236, 265, 280 i 332; $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,70, 3,97, 3,76 i 3,19; IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3450 (m), 3111 (m), 3059 (w), 2922 (w), 2854 (w), 1626 (w), 1589 (m), 1560 (s), 1504 (w), 1475 (w), 1435 (m), 1389 (m), 1354 (m), 1236 (w), 1178 (s), 1163 (m), 1132 (m), 1074 (s), 926 (w), 854 (w), 808 (w), 748 (w), 692 (m), 664 (s), 631 (m), 573 (m), 548 (w), 527 (w), 490 (w), 471 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 9,22 (s, 1H, H8), 9,02 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H, Ar), 8,89 (s, 1H, H2), 8,29 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar), 8,22 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, Ar), 8,16 (dd, $J = 8,8$ i 1,8 Hz, 1H, Ar), 8,07 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar), 7,80 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar), 7,74 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 153,34 (d, C2), 150,38 (s, C4 ili C6), 150,18 (s, C4 ili C6), 144,39 (s, C8), 135,49 (s, Ar), 132,59 (s, Ar), 131,68 (s, C5), 131,32 (s, Ar), 131,01 (d, Ar), 130,55 (d, Ar), 130,22 (d, Ar), 129,89 (d, Ar), 128,25 (d, Ar), 127,95 (d, Ar), 121,92 (d, Ar); HRMS: m/z : 309,0206 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₂H₉ClN₄O₂S H⁺: 309,0207.

3.2.1.3. 6-klor-9-(4-fenilbensulfonil)-9H-purin (4)

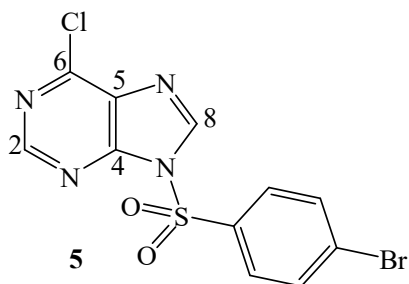


6-klorpurin **1** (249,5 mg mg, 1,6 mmol) i bifenil-4-sulfonil klorid (405,0 mg, 1,6 mmol, 95%) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Produkt **4** dobiven je u obliku bijelih kristala (456,9 mg, 77 %).

T.t. = 196–197 °C; $R_f = 0,9$ (CH₂Cl₂:EtOAc/9:1); UV (MeOH) λ_{\max}/nm : 270; $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,48; IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3117 (w), 1761 (vw), 1589 (s), 1556 (s), 1481 (w), 1474 (w), 1439 (s), 1391 (s), 1366 (m), 1339 (m), 1298 (vw), 1283 (vw), 1232 (w), 1211 (w), 1175 (s), 1144 (m), 1088 (s), 1070 (s), 1005 (w), 926 (m), 883 (vw), 845 (m), 789 (vw), 768 (s), 716 (m),

692 (s), 675 (s), 646 (m), 631 (s), 598 (s), 565 (s), 538 (s), 419 (vw); $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ/ppm : 9,19 (s, 1H, H8), 8,94 (s, 1H, H2), 8,39–8,27 (m, 2H, Ar), 8,09–7,93 (m, 2H, Ar), 7,74 (dd, $J = 8,1$ i $1,5$ Hz, 2H, Ar), 7,58–7,41 (m, 3H, Ar); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ/ppm : 153,52 (d, C2), 150,50 (s, C4 ili C6), 150,24 (s, C4 ili C6), 147,39 (s, Ar), 144,53 (d, C8), 137,65 (s, Ar), 134,27 (s, Ar), 131,80 (s, C5), 129,26 (d, Ar), 129,13 (d, Ar), 128,18 (d, Ar), 127,37 (d, Ar); HRMS: m/z : 371,0359 $[M+H]^+$; izračunato $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S H}^+$: 371,0364.

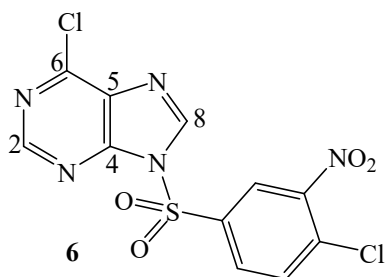
3.2.1.4. 6-klor-9-(4-bromfenilsulfonil)-9H-purin (5)



6-klorpurin (**1**) (250,0 mg, 1,6 mmol) i 4-brombenzensulfonil klorid (411,0 mg, 1,6 mmol, 98%) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Produkt **5** dobiven je u obliku blijedo žutih kristala (300,0 mg, 50%).

T.t. = 193–195°C; $R_f = 0,9$ (CH_2Cl_2 : EtOAc /9:1); UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 242 i 315, $\log \epsilon / \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,23 i 3,56; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3456 (w), 3125 (w), 3074 (w), 3009 (w), 2955 (vw), 2920 (vw), 2851 (vw), 1950 (vw), 1892 (vw), 1767 (vw), 1589 (m), 1572 (s), 1556 (s), 1477 (w), 1435 (m), 1394 (s), 1356 (m), 1285 (vw), 1236 (vw), 1192 (m), 1178 (m), 1163 (s), 1144 (m), 1088 (s), 1070 (s), 1007 (w), 926 (m), 853 (vw), 829 (w), 787 (vw), 752 (s), 700 (w), 685 (w), 656 (m), 631 (m), 608 (m), 565 (s), 534 (vw), 422 (vw) $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ/ppm : 9,14 (s, 1H, H8), 8,91 (s, 1H, H2), 8,17 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, Ar), 7,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ar); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ/ppm : 153,49 (d, C2), 150,46 (s, C4 ili C6), 150,25 (s, C4 ili C6), 144,41 (d, C8), 134,89 (s, Ar), 133,23 (d, Ar), 131,84 (s, C5), 130,69 (s, Ar), 130,37 (d, Ar); HRMS: m/z : 372,9158 $[M+H]^+$; izračunato $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S H}^+$: 372,9156.

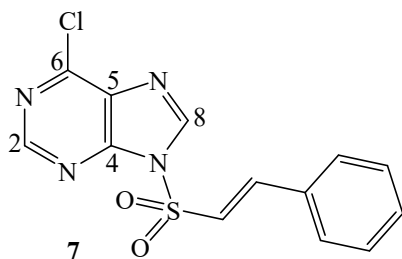
3.2.1.5. 6-klor-9-(4-klor-3-nitrofenilsulfonil)-9H-purin (6)



6-klorpurin **1** (250,0 mg, 1,6 mmol) i 4-klor-3-nitrobenzensulfonil klorid (422,0 mg, 1,6 mmol, 98 %) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Produkt **6** dobiven je prekrizacijom iz metanola u obliku bijelih kristala (399,0 mg, 66%).

T.t. = 204–206 °C; $R_f = 0,8$ (CH₂Cl₂:EtOAc/9:1); UV (MeOH) λ_{\max}/nm : 225, $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,13; IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3447 (m), 3132 (m), 3078 (w), 2920 (w), 2851 (vw), 1792 (vw), 1589 (s), 1560 (s), 1549 (s), 1479 (w), 1443 (m), 1400 (s), 1362 (s), 1339 (w), 1188 (s), 1161 (m), 1136 (m), 1097 (m), 1074 (s), 1049 (m), 928 (w), 887 (w), 854 (vw), 829 (vw), 783 (w), 691 (m), 664 (w), 652 (m), 631 (s), 563 (m), 548 (m), 503 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 9,13 (s, 1H, H8), 8,93 (s, 1H, H2), 8,89 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, Ar), 8,51 (dd, $J = 8,7$ i 2,2 Hz, 1H, Ar), 8,14 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, Ar); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 153,52 (d, C2), 150,46 (s, C4 ili C6), 150,33 (s, C4 ili C6), 147,57 (s, Ar), 144,42 (d, C8), 135,39 (s, Ar), 133,70 (d, Ar), 133,24 (d, Ar), 133,15 (s, Ar), 131,90 (s, C5), 126,30 (d, Ar); HRMS: m/z : 373,9530 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₃H₉ClN₄O₂S H⁺: 373,9512

3.2.1.6. (E)-6-klor-9-(stirilsulfonil)-9H-purin (7)



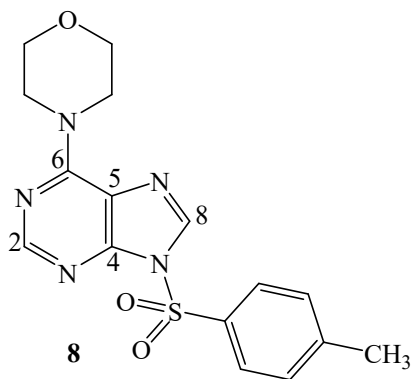
6-klorpurin **1** (248,9 mg, 1,6 mmol) i *trans*- β -stirensulfonilklorid (337,5 mg, 1,6 mmol, 97 %) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Produkt **7** dobiven je u obliku bijelih kristala (373,3 mg, 73%).

T.t. = 173–174 °C; $R_f = 0,8$ (CH₂Cl₂:EtOAc/9:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm : 272; $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,93; IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3447 (vw), 3119 (vw), 3047 (vw), 1610 (m), 1591 (m), 1562 (s), 1497 (vw), 1472 (w), 1445 (m), 1389 (s), 1339 (m), 1296 (vw), 1236 (w), 1204 (w), 1171 (s), 1157 (s), 1140 (s), 1072 (s), 974 (w), 932 (m), 866 (m), 824 (m), 812 (w), 789 (vw), 745 (s), 689 (m), 650 (s), 629 (m), 619 (m), 567 (s), 5420 (w), 521 (m), 488 (m); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 9,02 (s, 1H, H8), 8,92 (s, 1H, H2), 8,13 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, CH), 7,86–7,74 (m, 3H, CH, Ar), 7,57–7,41 (m, 3H, Ar); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 153,33 (d, C2), 150,39 (s, C4 ili C6), 150,22 (s, C4 ili C6), 148,33 (d, Ar ili CH), 144,56 (d, C8), 132,38 (d, Ar ili CH), 131,73 (s, C5), 131,37 (s, Ar), 129,68 (d, Ar), 129,10 (d, Ar), 122,71 (d, Ar ili CH); HRMS: m/z : 321,0215 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₃H₉ClN₄O₂S H⁺: 321,0208.

3.2.2. Opća procedura za pripremu *N*-9-sulfonil-6-morfolinopurinskih derivata **8-13** i **15**

U otopinu odgovarajućeg 6-klorpurinskog derivata **2-5** u tetrahidrofuranu ohlađenu na 0 °C dodana su 4 molarna suviška morfolina. Reakcijska smjesa miješana je na 0 °C tri sata. Morfolinski derivat **8-11** istaložio je dodatkom metanola u reakcijsku smjesu te je izoliran filtracijom.

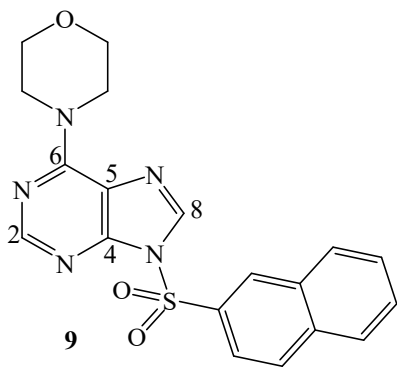
3.2.2.1. 6-morfolino-9-tosil-9*H*-purin (**8**)



Prema općoj proceduri upotrijebljeni su 6-klorpurinski derivat **2** (100,3 mg, 0,32 mmol), morfolin (112,6 μ L, 1,28 mmol, 99%) i tetrahidrofuran (10 mL). Morfolinski derivat **8** dobiven je u obliku bijelog taloga (70,0 mg, 61%).

T.t. = 178–180 °C; R_f = 0,3 (CH_2Cl_2 :EtOAc/9:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 235 and 272 $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ = 4,80 i 4,88; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3456 (vw), 3146 (vw), 2959 (w), 2860 (w), 1587 (s), 1560 (m), 1474 (m), 1450 (m), 1383 (m), 1331 (w), 1292 (m), 1184 (m), 1171 (s), 1150 (s), 1115 (s), 1092 (m), 989 (w), 864 (vw), 820 (w), 789 (w), 708 (m), 675 (m), 635 (m), 621 (m), 583 (s), 534 (m); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 8,66 (s, 1H, H8), 8,32 (s, 1H, H2), 8,08 (d, J = 8,4 Hz, 2H, Ar) 7,49 (d, J = 8,1 Hz, 2H, Ar), 4,14 (bs, 4H, CH_2), 3,68 (t, J = 4,8 Hz, 4H, CH_2), 2,38 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 153,48 (d, C2), 153,18 (s, C4 ili C6), 149,39 (s, C4 ili C6), 146,74 (s, Ar), 137,15 (d, C8), 133,32 (s, Ar), 130,26 (d, Ar), 128,14 (d, Ar), 119,07 (s, C5), 65,95 (t, CH_2), 45,27 (t, CH_2), 21,13 (q, CH_3). HRMS: m/z : 360,1118 [$M+\text{H}$] $^+$; izračunato $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3\text{S H}^+$: 360,1125.

3.2.2.2. 6-morfolino-9-(naftalen-2-ilsulfonil)-9H-purin (9)

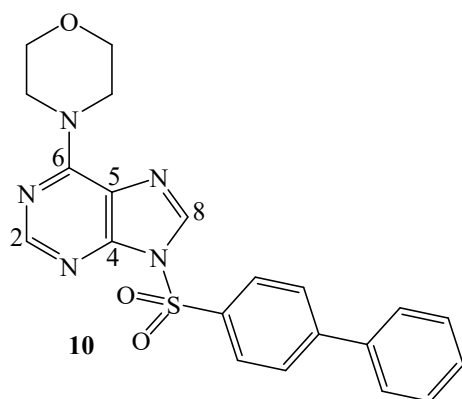


Prema općoj proceduri upotrijebljeni su 6-klorpurinski derivat **3** (48,0 mg, 0,14 mmol), morfolin (49,2 μ L, 0,56 mmol, 99%) i tetrahidrofuran (10 mL). Morfolinski derivat **9** dobiven je u obliku bijelog taloga (34,0 mg, 61%).

T.t. = 198–200 °C; R_f = 0,4 (CH_2Cl_2 :EtOAc/9:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 238 i 276, $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 4,71 i 4,37; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3444 (w), 3109 (w), 2922 (vw), 2853 (vw), 1596 (s), 1560 (w), 1471 (w), 1447 (w), 1384 (m), 1333 (w), 1286 (w), 1252 (m), 1205 (w), 1190 (w), 1151 (s), 1115 (m), 1072 (w), 990 (w), 877 (vw), 835 (w), 792 (w), 751 (w), 705 (w), 686

(w), 665 (m), 637 (w), 616 (m), 572 (m), 538 (w), 480 (w); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 8,97 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, Ar), 8,74 (s, 1H, H8), 8,32–8,04 (m, 5 H, H2, Ar), 7,83–7,69 (m, 2H, Ar), 4,13 (bs, 4H, CH₂), 3,67 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H, CH₂); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 153,50 (d, C2), 153,17 (s, C4 ili C6), 149,46 (s, C4 ili C6), 137,24 (d, C8), 135,30 (s, Ar), 133,13 (s, Ar), 131,29 (s, Ar), 130,62 (d, Ar), 130,37 (d, Ar), 130,05 (d, Ar), 129,81 (d, Ar), 128,22 (d, Ar), 127,96 (d, Ar), 121,93 (d, Ar), 119,06 (s, C5), 65,92 (t, CH₂); HRMS: m/z : 396,1115 [$M+\text{H}$]⁺; izračunato C₁₉H₁₇N₅O₃SH⁺: 396,1125.

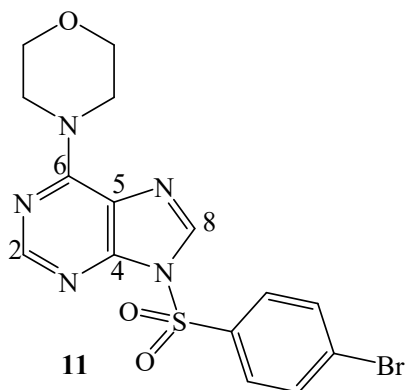
3.2.2.3. 6-morfolino-9-(4-fenilbenzensulfonil)-9H-purin (10)



Prema općoj proceduri upotrijebljeni su 6-klorpurinski derivat **4** (32,1 mg, 0,09 mmol), morfolin (31,6 μL , 0,36 mmol, 99%) i tetrahidrofuran (3 mL). Morfolinski derivat **10** dobiven je u obliku bijelog taloga (23,8 mg, 63%).

T.t. = 188–190 °C; $R_f = 0,4$ (CH₂Cl₂:EtOAc/9:1); UV (MeOH): λ_{max} /nm: 274, $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 4,64; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3455 (w), 3121 (vw), 2967 (vw), 2859 (vw), 1589 (s), 1570 (m), 1479 (w), 1393 (w), 1332 (vw), 1286 (w), 1250 (w), 1169 (m), 11519 (s), 1113 (m), 987 (w), 844 (vw), 789 (vw), 774 (w), 763 (w), 683 (w), 637 (w), 621 (w), 601 (s), 568 (m), 538 (w); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 8,71 (s, 1H, H8), 8,35 (s, 1H, H2), 8,28 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, Ar), 7,99 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, Ar), 7,77–7,70 (m, 2H, Ar), 7,55–7,42 (m, 3H, Ar), 4,15 (s, 4H, CH₂), 3,75–3,62 (m, 4H, CH₂); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 153,55 (d, C2), 153,20 (s, C4 ili C6), 149,45 (s, C4 ili C6), 146,93 (s, Ar), 137,70 (s, Ar), 137,19 (d, C8), 134,81 (s, Ar), 129,13 (d, Ar), 129,06 (d, Ar), 128,80 (d, Ar), 127,92 (d, Ar), 127,26 (d, Ar), 119,10 (s, C5), 65,94 (t, CH₂); HRMS: m/z : 422,1281 [$M+\text{H}$]⁺; izračunato C₂₁H₁₉N₅O₃SH⁺: 422,1281.

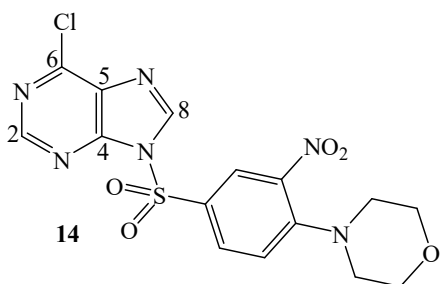
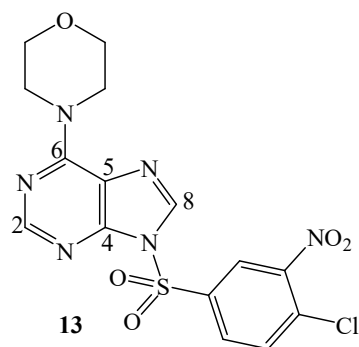
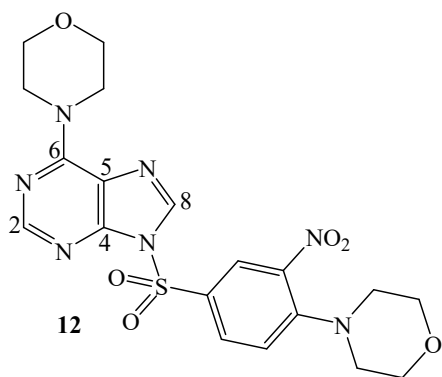
3.2.2.4. 6-morfolino-9-(4-bromfenilsulfonil)-9H-purin (11)



Prema općoj proceduri upotrijebljeni su 6-klorpurinski derivat **5** (100,0 mg, 0,27 mmol), morfolin (94,0 μ L, 1,07 mmol, 99%) i tetrahidrofuran (5 mL). Morfolinski derivat **10** dobiven je u obliku bijelog taloga (105,0 mg, 93%).

T.t = 180–183 °C; R_f = 0,5 (CH_2Cl_2 :EtOAc/9:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 246 i 272, $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,42 i 4,43; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3454 (vw), 3125 (w), 3088 (vw), 3051 (w), 3024 (vw), 2993 (vw), 2908 (vw), 2854 (w), 1589 (s), 1508 (w), 1477 (s), 1450 (s), 1418 (vw), 1394 (s), 1371 (m), 1327 (m), 1308 (w), 1285 (m), 1248 (s), 1192 (s), 1177 (s), 1161 (s), 1148 (s), 1117 (s), 1088 (m), 1069 (s), 1053 (m), 1009 (m), 989 (s), 961 (w), 862 (w), 845 (w), 818 (m), 789 (m), 750 (s), 702 (w), 660 (m), 638 (s), 625 (s), 611 (s), 567 (s), 546 (m), 424 (w); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 8,67 (s, 1H, H8), 8,32 (s, 1H, H2), 8,13 (d, J = 8,7 Hz, 2H, Ar), 7,93 (d, J = 8,7 Hz, 2H, Ar), 4,14 (bs, 4H, CH_2), 3,69 (m, 4H, CH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 153,55 (d, C2), 153,18 (s, C4 ili C6), 149,38 (s, C4 ili C6), 137,05 (d, C8), 135,39 (s, Ar), 132,97 (d, Ar), 130,05 (d, Ar), 119,04 (s, C5), 65,94 (t, CH_2); HRMS: m/z : 424,0072 [$M+\text{H}$] $^+$; izračunato $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{BrN}_5\text{O}_3\text{SH}^+$: 424,0073.

3.2.2.5. 6-morfolino-9-(4-morfolino-3-nitrofenilsulfonil)-9H-purin (12), 6-morfolino-9-(4-klor-3-nitrofenilsulfonil)-9H-purin (13) i 6-klor-9-(4-morfolino-3-nitrofenilsulfonil)-9H-purin (14)



Prema općoj proceduri upotrijebljeni su 6-klorpurinski derivat **6** (100,0 mg, 0,27 mmol), morfolin (94,0 μ L, 1,07 mmol, 99%) i tetrahidrofuran (5 mL). Morfolinski derivat **12** dobiven je u obliku žutog taloga (100,0 mg, 79%).

Iz filtrata su izolirani i tragovi još dva nusprodukta **13** i **14**.

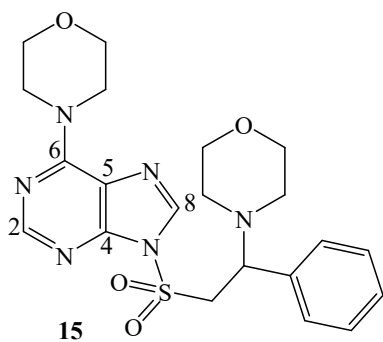
Spoj **12**: t.t. = 185–190 °C; R_f = 0,2 (CH_2Cl_2 :EtOAc/9:1); UV (MeOH): λ_{max} /nm: 274 i 304, $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,32 i 4,22; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3445 (w), 3119 (vw), 2858 (w), 1593 (s), 1518 (m), 1477 (w), 1450 (w), 1389 (s), 1348 (w), 1281 (w), 1250 (m), 11800 (s), 11550 (s), 1115 (s), 1043 (w), 989 (w), 939 (w), 885 (w), 781 (w), 706 (w), 656 (m), 635 (m), 621 (m), 590 (m), 577 (m), 540 (w); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 8,63 (s, 1H, H8), 8,58 (d, J = 2,4 Hz, 1H, Ar), 8,34 (s, 1H, H2), 8,20 (dd, J = 2,4 i 9,2 Hz, 1H, Ar), 7,47 (d, J = 9,2 Hz, 1H, Ar), 4,15

(bs, 4H, CH₂), 3,68 (m, 8H, CH₂), 3,23 (m, 4H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 153,46 (d, C2), 153,17 (s, C4 ili C6), 149,29 (s, C4 ili C6), 148,8 (s, Ar), 137,13 (d, C8), 137,10 (s, Ar), 132,51 (d, Ar), 128,45 (d, Ar), 123,48 (s, Ar), 120,62 (d, Ar), 119,05 (s, C5), 65,97 (t, CH₂), 65,47 (t, CH₂), 50,03 (t, CH₂); HRMS: *m/z*: 476,1349 [*M*+H]⁺; izračunato C₁₉H₂₁N₇O₆SH⁺: 476,1347.

Spoj 13: bijeli talog, t.t. = 145–150 °C; R_f = 0,7 (CH₂Cl₂:EtOAc/9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm: 221 i 272, log ε/ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 4,39 i 4,30; IR (KBr) λ_{max}/cm⁻¹: 3449 (vw), 3148 (vw), 1595 (s), 1541 (w), 1477 (w), 1389 (m), 1356 (w), 1296 (w), 1248 (w), 1191 (s), 1163 (s), 1113 (m), 1049 (w), 989 (vw), 889(vw), 779 (w), 660 (w), 631 (w), 569 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,89 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, Ar), 8,68 (s, 1H, H8), 8,50 (dd, *J* = 2,2 i 8,6 Hz, 1H, Ar), 8,34 (s, 1H, H2), 8,13 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, Ar), 4,15 (bs, 4H, CH₂), 3,73–3,65 (m, 4H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 153,64 (d, C2), 153,17 (s, C4 ili C6), 149,43 (s, C4 ili C6), 147,48 (s, Ar), 137,07 (d, C8), 135,84 (s, Ar), 133,59 (d, Ar), 133,01 (d, Ar), 132,82 (s, Ar), 125,96 (d, Ar), 119,01 (s, C5), 65,99 (t, CH₂); HRMS: *m/z*: 425,0424 [*M*+H]⁺; izračunato C₁₅H₁₃ClN₆O₅SH⁺: 425,0429.

Spoj 14: žuti talog, t.t. = 145–147 °C; R_f = 0,4 (CH₂Cl₂:EtOAc/9:1); UV (MeOH): λ_{max}/nm: 257, log ε/ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 4,19; IR (KBr) λ_{max}/cm⁻¹: 3443 (s), 2920 (vw), 2860.2 (vw), 1605 (m), 1385 (m), 1350 (w), 1263 (w), 1236 (w), 1169 (m), 1115 (s), 943 (w), 727 (w), 619 (m); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,10 (s, 1H, H8), 8,92 (s, 1H, H2), 8,59 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, Ar), 8,22 (dd, *J* = 2,3 i 9,2 Hz, 1H, Ar), 7,49 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H, Ar), 3,67 (m, 4H, CH₂), 3,24 (m, 4H, CH₂).

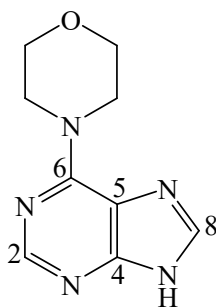
3.2.2.6. 6-morfolino-9-(2-morfolino-2-feniletilsulfonil)-9H-purin (15)



Prema općoj proceduri upotrijebljeni su 6-klorpurinski derivat **7** (25,9 mg, 0,08 mmol), morfolin (28,1 μ L, 0,32 mmol, 99%) i tetrahidrofuran (3 mL). Morfolinski derivat **15** dobiven je u obliku bijelog taloga (26,7 mg, 73%).

T.t. = 169–171 °C; R_f = 0,1 (CH₂Cl₂:EtOAc/9:1); UV (MeOH): λ_{\max}/nm 273, $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 4,17; IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3446 (w), 3126 (w), 2867 (w), 1590 (s), 1566 (m), 1514 (vw), 1480 (w), 1450 (w), 1376 (m), 1329 (w), 1286 (w), 1250 (w), 1240 (w), 1158 (s), 1130 (w), 1113 (s), 1048 (w), 988 (m), 895 (w), 852 (w), 792 (w), 759 (m), 703 (m), 652 (w), 637 (m), 618 (w), 608 (vw), 572 (w), 556 (w), 543 (w), 528 (w), 502 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 8,43 (s, 1H, H8), 8,39 (s, 1H, H2), 7,32–7,22 (m, 3H, Ar), 7,20–7,10 (m, 2H, Ar), 4,86–4,69 (m, 1H, CH), 4,41–4,06 (m, 6H, CH₂), 3,81–3,61 (m, 4H, CH₂), 3,24–3,11 (m, 2H, CH₂), 2,97 (bs, 2H, CH₂), 2,21–2,08 (m, 2H, CH₂), 2,00 (bs, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 153,30 (d, C2), 153,16 (s, C4 ili C6), 149,99 (s, C4 ili C6), 137,33 (d, C8), 133,00 (s, Ar), 128,65 (d, Ar), 127,86 (d, Ar), 127,76 (d, Ar), 119,18 (s, C5), 66,13 (t, CH₂), 65,62 (t, CH₂), 63,58 (d, CH), 54,29 (t, CH₂), 48,57 (t, CH₂); HRMS: m/z : 459,1814 [$M+H$]⁺; izračunato C₂₁H₂₆N₆O₄SH⁺: 459,1809.

3.2.3. 6-morfolinopurin (16)



16

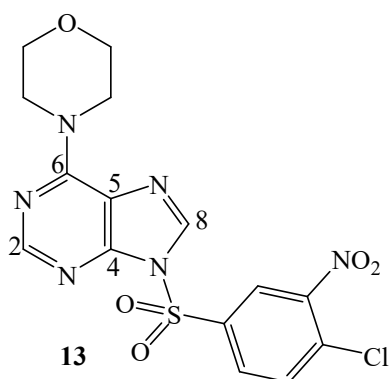
6-morfolinopurin (**16**) pripremljen je prema poznatom propisu (183,2 mg, 69%, lit. 99%).¹²³

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 13,06 (s, 1H, NH), 8,23 (s, 1H, H8 ili H2), 8,13 (s, 1H, H8 ili H2), 4,20 (s, 4H, CH₂), 3,82 – 3,59 (m, 4H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm : 153,19 (s, C4 ili C6), 151,76 (d, C2), 151,51 (s, C4 ili C6), 138,35 (d, C8), 118,81 (s, C5), 66,19 (t, CH₂), 45,16 (t, CH₂).

3.2.4. Opća procedura za pripremu *N*-9-sulfonil-6-morfolinopurinskih derivata **13**, **17** i **18**

U suspenziju 6-morfolinopurina **16** u acetonu dodana je 0,4 M vodena otopina kalijevog hidroksida. Smjesa je ohlađena na 0 °C i dodan je odovarajući sulfonil klorid. Novonastala suspenzija miješana je tri sata pri 0 °C nakon čega je neutralizirana 1 M kloridnom kiselinom. Sirovi produkt je ofiltriran i ispran vodom te prekrizaliziran iz smjese vrućeg acetona i metanola.

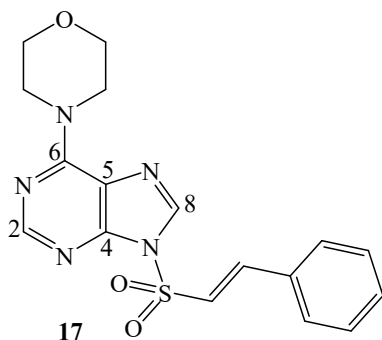
3.2.4.1. 6-morfolino-9-(4-klor-3-nitrofenilsulfonil)-9*H*-purin (**13**)



Prema općoj proceduri upotrijebljeni su 6-morfolinopurin **16** (80,2 mg, 0,39 mmol), 3-nitrobenzen-1-sulfonil klorid (102,4 mg, 0,39 mmol, 98%), 0,4 M vodena otopina kalijevog hidroksida (1,9 mL) i aceton (5 mL). Morfolinski derivat **13** dobiven je u obliku bezbojnih kristala (96,4 mg, 68%).

Karakterizacija **13** opisana je u poglavlju 3.2.2.5.

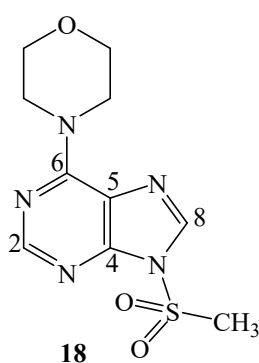
3.2.4.2. (*E*)-6-morfolino-9-(stirilsulfonil)-9*H*-purin (**17**)



Prema općoj proceduri upotrijebljeni su 6-morfolinipurin **16** (50,1 mg, 0,24 mmol), *trans*- β -stirensulfonilklorid (51,0 mg, 0,24 mmol, 97%), 0,4 M vodena otopina kalijevog hidroksida (1,2 mL) i aceton (3 mL). Morfolinski derivat **17** dobiven je u obliku bezbojnih kristala (52,0 mg, 58%).

T.t. = 156–157 °C; $R_f = 0,3$ (CH_2Cl_2 :EtOAc/9:1); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 279; $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$: 4.64; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3488 (m), 3109 (m), 3032 (w), 3015 (w), 2858 (w), 1593 (s), 1558 (m), 1474 (m), 1450 (m), 1377 (s), 1337 (w), 1304 (w), 1286 (w), 1275 (w), 1254 (m), 1203 (m), 1188 (m), 1176 (w), 1161 (s), 1151 (m), 1117 (m), 1070 (vw), 1053 (w), 989 (w), 972 (w), 933 (vw), 885 (vw), 864 (w), 822 (w), 791 (vw), 748 (m), 692 (w), 662 (w), 638 (m), 617 (m), 565 (m), 525 (w), 501 (vw); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 8,56 (s, 1H, H8), 8,34 (s, 1H, H2), 8,06 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, CH), 7,82–7,76 (m, 3H, Ar, CH), 7,52 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, Ar), 7,46 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, Ar), 4,17 (bs, 4H, CH_2), 3,72–3,68 (m, 4H, CH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 153,53 (d, C2), 153,23 (s, C4 ili C6), 149,62 (s, C4 ili C6), 147,75 (d, Ar ili CH), 137,23 (d, C8), 132,26 (d, Ar ili CH), 131,54 (s, Ar), 129,63 (d, Ar), 129,19 (d, Ar), 123,02 (d, Ar ili CH), 119,20 (s, C5), 66,06 (t, CH_2); HRMS: m/z : 372,1137 [$M+\text{H}$] $^+$; izračunato $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3\text{SH}^+$: 372,1130

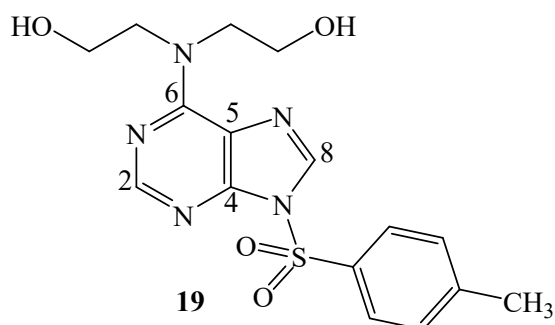
3.2.4.3. 9-(metilsulfonil)-6-morfolino-9H-purin (18)



Prema općoj proceduri upotrijebljeni su 6-morfolinipurin **16** (50,5 mg, 0,24 mmol), metansulfonil klorid (37,9 μL , 0,24 mmol), 0,4 M vodena otopina kalijevog hidroksida (1,2 mL) i aceton (3 mL). Morfolinski derivat **18** dobiven je u obliku bezbojnih kristala (29,9 mg, 42%).

T.t. = 186–187 °C; $R_f = 0,8$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}/9:1$); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 272; $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,18; IR (KBr) $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3441 (w), 3132 (w), 3032 (w), 3001 (w), 2976 (vw), 2922 (w), 2870 (w), 2849 (w), 1927 (vw), 1747 (vw), 1591 (s), 1560 (m), 1506 (w), 1475 (m), 1454 (m), 1421 (vw), 1366 (s), 1327 (m), 1303 (w), 1286 (w), 1275 (m), 1246 (m), 1209 (w), 1188 (s), 1165 (s), 1149 (s), 1115 (s), 1067 (w), 1055 (w), 1028 (vw), 984 (m), 970 (m), 930 (vw), 905 (vw), 889 (vw), 878 (vw), 864 (w), 829 (vw), 791 (w), 779 (m), 727 (vw), 660 (w), 635 (m), 617 (m), 588 (vw), 561 (w), 550 (m), 515 (m); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 8,47 (s, 1H, H8), 8,41 (s, 1H, H2), 4,21 (bs, 4H, CH_2), 3,79 (s, 3H, CH_3), 3,76–3,70 (m, 4H, CH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 153,46 (d, C2), 153,26 (s, C4 ili C6), 149,68 (s, C4 ili C6), 136,84 (d, C8), 119,17 (s, C5), 66,08 (t, CH_2), 41,71 (q, CH_3); HRMS: m/z : 284,0822 [$M+\text{H}$] $^+$; izračunato $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3\text{SH}^+$: 284,0817.

3.2.5. 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-9-tosil-9*H*-purin (19)

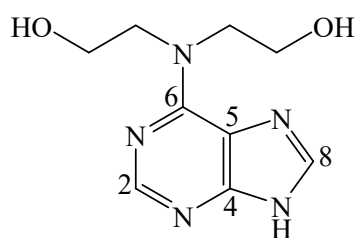


U otopinu 6-klor-9-tosil-9*H*-purina **2** (105,3 mg, 0,34 mmol) u tetrahidrofuranu (3 mL) ohlađenu na 0 °C dodana je 0,5 M otopina dietanolamina u vodi (900 μL , 0,45 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na 0 °C tri sata. Produkt je izoliran iz reakcijske smjese preparativnom tankoslojnom kromatografijom u smjesi otapala $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}/20:1$ (bijeli talog, 23,0 mg, 18%).

T.t. = 168–170 °C; $R_f = 0,5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}/9:1$); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 234 i 271; $\log \varepsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: 4,23 i 4,28; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3346 (w), 3142 (w), 2957 (w), 2934 (w), 2891 (w), 2854 (w), 2368 (vw), 2345 (vw), 1925 (vw), 1595 (s), 1565 (m), 1510 (vw), 1479 (w), 1468 (vw), 1437 (vw), 1377 (m), 1333 (w), 1292 (w), 1194 (s), 1180 (s), 1155 (s), 1097 (m), 1065 (w), 1011 (w), 916 (vw), 858 (vw), 814 (w), 791 (vw), 706 (m), 681 (w), 665 (s), 648 (w), 635 (m), 608 (vw), 582 (s), 561 (vw), 534 (w); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 8,61 (s, 1H, H8), 8,27

(s, 1H, H2), 8,08 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Ar), 7,49 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Ar), 4,75 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H, OH), 4,18 (s, 2H, CH₂), 3,79 (s, 2H, CH₂), 3,63 (s, 4H, CH₂), 2,38 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 153,83 (s, C4 ili C6), 153,38 (d, C2), 149,14 (s, C4 ili C6), 146,69 (s, Ar), 136,86 (d, C8), 133,40 (s, Ar), 130,25 (d, Ar), 128,15 (d, Ar), 118,95 (s, C5), 58,89 (t, CH₂), 51,85 (t, CH₂), 21,15 (q, CH₃); HRMS: m/z : 378,1244 [$M+H$]⁺; izračunato C₁₆H₁₉N₅O₄SH⁺: 378,1236.

3.2.6. 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-purin (20)

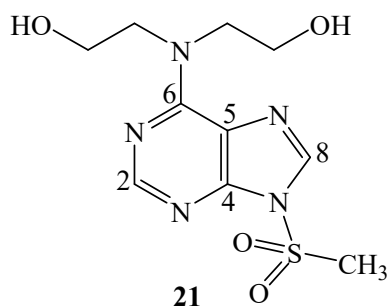


20

Spoj **20** pripremljen je prema poznatom propisu (226,9 mg, 63%, lit. 90%).¹²⁴

T.t. = 207–208 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 12,94 (s, 1H, NH), 8,17 (s, 1H, H8 ili H2), 8,08 (s, 1H, H8 ili H2), 4,80 (s, 2H, OH), 4,47–3,48 (m, 8H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 153,75 (s, C4 ili C6), 151,76 (d, C2), 151,13 (s, C4 ili C6), 138,09 (d, C8), 118,64 (s, C5), 56,29 (t, CH₂), 48,90 (t, CH₂).

3.2.7. 9-(metilsulfonyl)-6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-9*H*-purin (21)



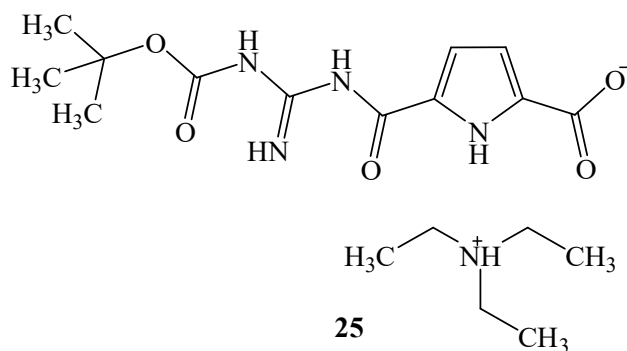
21

U suspenziju 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-purina **20** (100,5 mg, 0,45 mmol) u acetonu (6,4 mL) dodana je 0,4 M vodena otopina kalijevog hidroksida (2,2 mL). Smjesa je ohlađena na 0

°C i dodan je mesil-klorid (34,9 μ L, 0,45 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 3 sata pri 0 °C te je neutralizirana 1 M kloridnom kiselinom. Sirovi produkt je izoliran iz smjese preparativnom tankoslojnom kromatografijom i prekrizaliziran iz smjese vrućeg acetona i metanola. Dobiveni su bijeli kristali produkta **21** (32,2 mg, 24%).

T.t. = 145–146 °C; $R_f = 0,4$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}/9:1$); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 271; $\log \varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 4,12; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3371 (s), 3121 (m), 2997 (m), 2932 (w), 2907 (m), 2854 (vw), 1684 (w), 1595 (s), 1562 (s), 1506 (w), 1485 (w), 1435 (w), 1379 (m), 1360 (s), 1335 (m), 1286 (m), 1232 (w), 1186 (w), 1167 (s), 1103 (w), 1076 (w), 1065 (w), 1040 (w), 1030 (w), 987 (w), 980 (m), 858 (vw), 791 (w), 783 (w), 710 (vw), 681 (vw), 658 (w), 635 (m), 590 (vw), 565 (w), 542 (m), 515 (w); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 8,43 (s, 1H, H8 ili H2), 8,36 (s, 1H, H8 ili H2), 4,81 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H, OH), 4,24 (bs, 2H, CH_2), 3,96 – 3,75 (m, 5H, CH_2 , CH_3), 3,68 (s, 4H, CH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 153,87 (s, C4 ili C6), 153,35 (d, C2), 149,40 (s, C4 ili C6), 136,58 (d, C8), 119,06 (s, C5), 59,81 (t, CH_2), 58,27 (t, CH_2), 52,31 (t, CH_2), 51,48 (t, CH_2), 41,64 (q, CH_3); HRMS: m/z : 302,0932 [$M+\text{H}$] $^+$; izračunato $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4\text{SH}^+$: 302,0923.

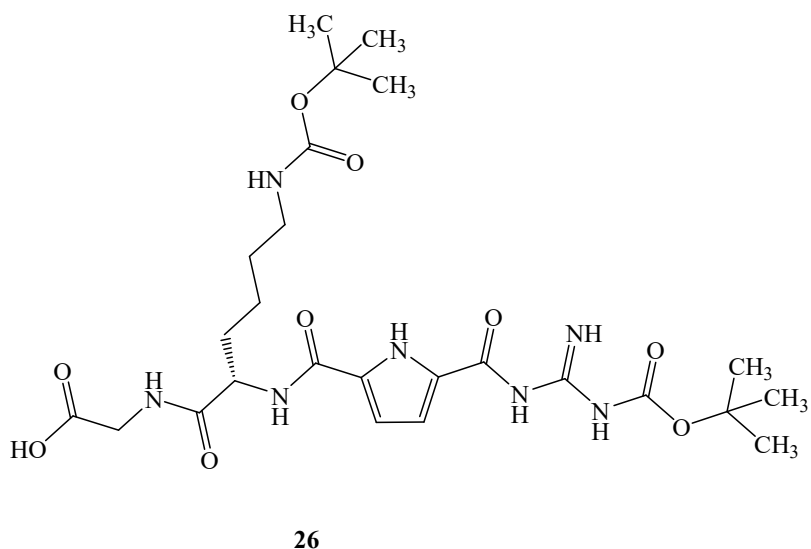
3.3.2.1. Trietilamonijev 5-((3-(*tert*-butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1*H*-pirol-2-karboksilat (25)



Boc-GCP-OH **25** pripravljen je prema poznatom propisu.¹²⁵

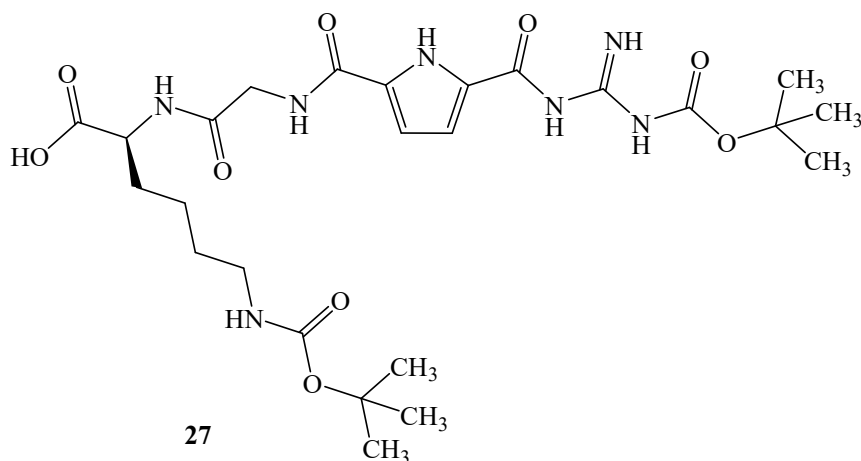
¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 10,88 (s, 1H, NH-Pyrr), 8,94 (d, $J = 225,4$ Hz, 3H, NH-Guan), 6,77 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H, Pyrr), 6,55 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H, Pyrr), 2,78 (q, $J = 7,2$ Hz, 6H, CH₂-Et₃N), 1,46 (s, 9H, CH₃-Boc), 1,07 (t, $J = 7,2$ Hz, 9H, CH₃-Et₃N); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 167,39 (s, C_q), 163,52 (s, C_q), 158,41 (s, C_q), 156,58 (s, C_q), 131,78 (s, C_q), 129,55 (s, C_q), 114,00 (d, CH-Pyrr), 112,60 (s, CH-Pyrr), 80,40 (s, C(CH₃)₃-Boc), 45,10 (t, CH₂-Et₃N), 27,77 (q, CH₃-Boc), 9,18 (q, CH₃-Et₃N).

3.3.2.2. (*S*)-2-(6-(*tert*-butoksikarbonil)-2-(2-((3-(*tert*-butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1*H*-pirol-5-karboksamido)heksanamido)octena kiselina (26)



^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 12,74–11,02 (m, 4H, NH-Guan, NH-Pyrr, COOH), 9,32–8,60 (m, 1H, NH-Guan), 8,89–8,33 (m, 1H, NH-Gly), 8,25–8,15 (m, 1H, NH-Lys), 6,94–6,63 (m, 3H, CH-Pyrr, NH-Boc), 4,27–4,11 (m, 1H, CH), 4,03–3,81 (m, 2H, CH₂), 2,97–2,79 (m, 2H, CH₂), 1,78–1,18 (m, 24H, CH₂, CH₃-Boc); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 172,3 (s, C_q), 172,2 (s, C_q), 172,1 (s, C_q), 171,2 (s, C_q), 161,7 (s, C_q), 159,5 (s, C_q), 159,2 (s, C_q), 158,5 (s, C_q), 155,6 (s, C_q), 130,2 (s, C_q-Pyrr), 125,5 (s, C_q-Pyrr), 113,7 (d, CH-Pyrr), 113,0 (d, CH-Pyrr), 77,4 (s, C(CH₃)₃-Boc), 52,6 (d, CH), 40,7 (t, Gly-CH₂), 39,8 (t, CH₂), 31,7 (t, CH₂), 29,3 (t, CH₂), 28,3 (q, CH₃-Boc), 27,8 (q, CH₃-Boc), 22,9 (t, CH₂); HRMS (ESI): m/z : 580,3790 [M -H]⁻; izračunato C₂₅H₃₉N₇O₉: 580,2736.

3.3.2.3. (*S*)-6-(*tert*-butoksikarbonil)-2-(2-(2-((3-(*tert*-butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1*H*-pirol-5-karboksamido)acetamido)heksanska kiselina (27)



^1H NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 12,91–11,0 (m, 4H, NH-Guan, NH-Pyrr, COOH), 9,32–8,59 (m, 1H, NH-Guan), 8,83–8,36 (m, 1H, NH-Gly), 8,25–8,15 (m, 1H, NH-Lys), 6,96–6,58 (m, 3H, CH-Pyrr, NH-Boc), 4,26–4,10 (m, 1H, CH), 4,01–3,77 (m, 2H, CH₂), 2,97–2,74 (m, 2H, CH₂), 1,76–1,11 (m, 24H, CH₂, CH₃-Boc); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ /ppm: 173,6 (s, C_q), 172,1 (s, C_q), 168,9 (s, C_q), 168,8 (s, C_q), 161,6 (s, C_q), 159,9 (s, C_q), 159,6 (s, C_q), 158,4 (s, C_q), 155,6 (s, C_q), 130,2 (s, C_q-Pyrr), 125,6 (s, C_q-Pyrr), 113,8 (d, CH-Pyrr), 112,2 (d, CH-Pyrr), 77,4 (s, C(CH₃)₃-Boc), 51,9 (d, CH), 41,7 (t, CH₂-Gly), 39,7 (t, CH₂), 30,9 (t, CH₂), 29,1 (t, CH₂), 28,3 (q, CH₃-Boc), 27,8 (q, CH₃-Boc), 22,7 (t, CH₂); HRMS (ESI): m/z : 580,3529 [M -H]⁻; izračunato C₂₅H₃₉N₇O₉: 580,2736.

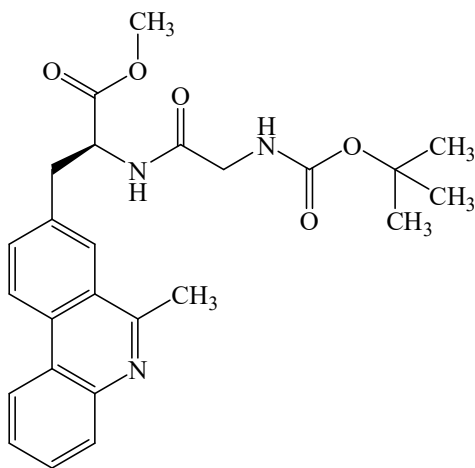
3.3.3. Opća procedura za pripremu peptidnih derivata fenantridina 23-37

Peptidni derivati pripremljeni su modifikacijom poznate metode za stvaranje peptidne veze (*engl. coupling*)¹²⁷:

Aminokiselina sa Boc-zaštićenim N-terminalnim krajem (**22**, **23** ili **24**) otopljena je u diklormetanu (2 mL) te je dodana smjesa trifluoroctene kiseline i vode (TFA:H₂O/9:1, 1mL). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja otapala pod sniženim tlakom dobivena je trifluoroctena sol slobodne aminokiseline (**22a**, **23a** ili **24a**) kao žuto ulje u kvantitativnom iskorištenju.

U otopinu trifluoroctene soli aminokiseline sa slobodnim N-terminalnim krajem (**22a**, **23a** ili **24a**) u suhom acetonitrilu pod argonom su dodane ekvimolarne količine odgovarajuće karboksilne kiseline, HBTU-a i HOBt-a te 4-8 molarnih suvišaka Et₃N. Reakcija je vođena na sobnoj temperaturi preko noći. Željeni produkt izoliran je iz smjese preparativnom tankoslojnom kromatografijom (eluens: CH₂Cl₂:CH₃OH/9:1).

3.3.3.1. (*S*)-metil 2-(2-(*tert*-butoksikarbonil)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (**23**)

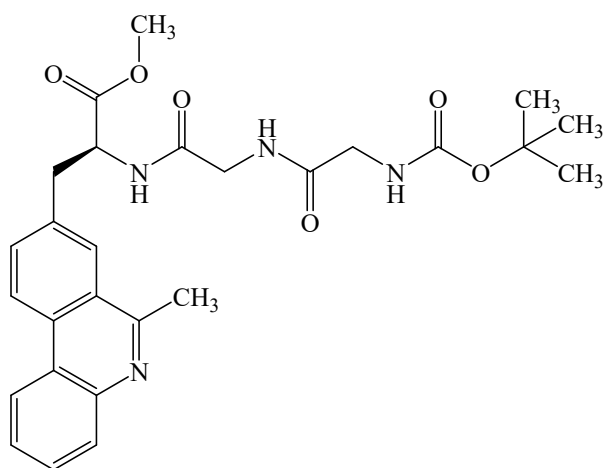


23

Fenantridinski derivat alanina **22** (11,8 mg, 0,03 mmol), *N*-(*tert*-butoksikarbonil)glicin (5,3 mg, 0,03 mmol), HBTU (11,6 mg, 0,03 mmol, 98%), HOBt (4,2 mg, 0,03 mmol, 97%), trietilamin (16,8 μ L, 0,12 mmol) i acetonitril (1 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **23** kao blijedo žuta krutina (12,4 mg, 92%).

T.t. = 63–65 °C; R_f = 0,6 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); ¹H NMR (CDCl₃) δ /ppm: 8,59–8,42 (m, 2H, Phen), 8,07 (d, J = 8,0 Hz, 1H, Phen), 7,93 (s, 1H, Phen), 7,75–7,54 (m, 3H, Phen), 6,83 (bd, J = 6,7 Hz, 1H, NH), 5,19 (bs, 1H, NH), 5,08–4,95 (m, 1H, CH), 3,92–3,68 (m, 5H, OCH₃, CH₂), 3,48–3,28 (m, 2H, CH₂), 3,01 (s, 3H, CH₃), 1,36 (s, 9H, CH₃-Boc); ¹³C NMR (CDCl₃) δ /ppm: 171,60 (s, C_q), 169,37 (s, C_q), 158,51 (s, C_q), 143,59 (s, C_q), 135,07 (s, C_q), 131,70 (d, Phen), 131,58 (s, C_q), 129,30 (d, Phen), 128,61 (d, Phen), 126,88 (d, Phen), 126,40 (d, Phen), 125,97 (s, C_q), 123,54 (s, C_q), 122,74 (d, Phen), 121,87 (d, Phen), 80,39 (s, C(CH₃)₃-Boc), 53,22 (CH ili OCH₃), 52,50 (CH ili OCH₃), 44,33 (t, CH₂), 38,12 (t, CH₂), 28,15 (q, CH₃-Boc), 23,36 (q, CH₃); M_w = 451,51; ESI-MS: m/z 452,4 [M+H]⁺.

3.3.3.2. (*S*)-metil 2-(2-(2-(*tert*-butoksikarbonil)acetamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (**24**)



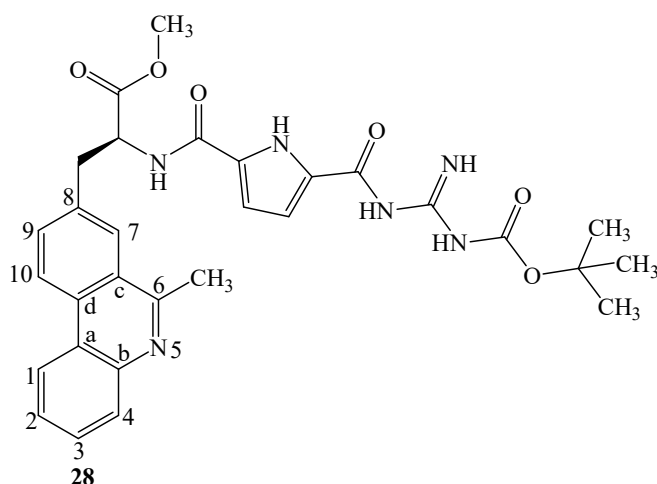
24

Fenantridinski dipeptid **23** (22,9 mg, 0,05 mmol), *N*-(*tert*-butoksikarbonil)glicin (10,5 mg, 0,06 mmol), HBTU (19,3 mg, 0,05 mmol, 98%), HOBT (7,0 mg, 0,05 mmol, 97%), trietilamin (27,9 μ L, 0,20 mmol) i acetonitril (2 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **24** kao blijedo žuta krutina (22,7 mg, 89%).

T.t. = 94–95°C; R_f = 0,4 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); ¹H NMR (CDCl₃) δ /ppm: 8,51 (d, J = 8,5 Hz, 1H, Phen), 8,46 (d, J = 8,1 Hz, 1H, Phen), 8,05 (d, J = 8,1 Hz, 1H, Phen), 7,95 (s, 1H, Phen), 7,70–7,64 (m, 1H, Phen), 7,63–7,59 (m, 2H, Phen), 7,14 (bd, J = 7,4 Hz, 1H, NH), 7,03 (bs, 1H, NH), 5,31 (s, 1H, NH), 4,99–4,92 (m, 1H, CH), 3,99–3,92 (m, 1H, CH₂), 3,90–3,83 (m,

1H, CH₂), 3,74–3,67 (m, 5H, OCH₃, CH₂), 3,42–3,35 (m, 1H, CH₂), 3,31–3,24 (m, 1H, CH₂), 2,99 (s, 3H, CH₃), 1,41 (s, 9H, CH₃-Boc); ¹³C NMR (CDCl₃) δ/ppm: 171,18 (s, C_q), 169,67 (s, C_q), 168,19 (s, C_q), 158,03 (s, C_q), 143,04 (s, C_q), 134,80 (s, C_q), 131,19 (d, Phen), 131,04 (s, C_q), 128,74 (d, Phen), 128,12 (d, Phen), 126,35 (d, Phen), 125,93 (d, Phen), 125,43 (s, C_q), 123,02 (s, C_q), 122,21 (d, Phen), 121,41 (d, Phen), 79,96 (s, C_q-Boc), 53,04 (CH ili OCH₃), 52,00 (CH ili OCH₃), 43,76 (t, CH₂), 42,37 (t, CH₂), 37,47 (t, CH₂), 27,76 (q, CH₃-Boc), 22,79 (q, CH₃); M_w = 508,57; ESI-MS: m/z 509,2 [M+H]⁺.

3.3.3.3. (S)-metil 2-(2-((3-(*tert*-butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1*H*-pirol-5-karboksamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (**28**)

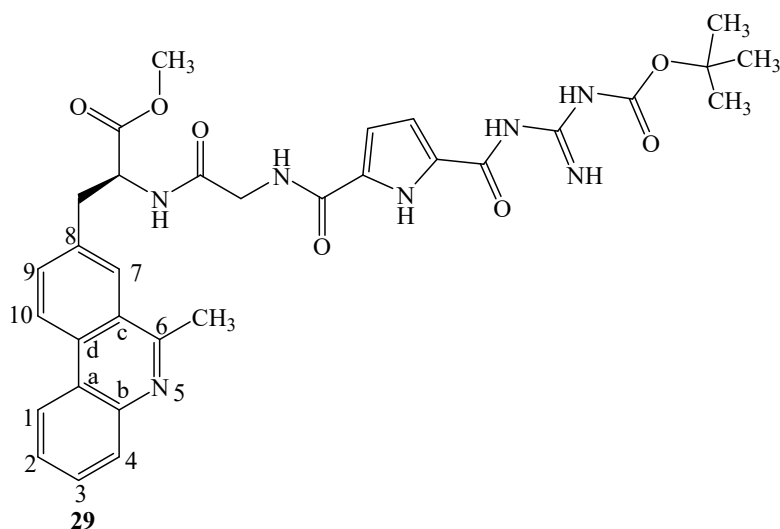


Fenantridinski derivat alanina **22** (35,0 mg, 0,09 mmol), gvanidinopirolni derivat **25** (35,8 mg, 0,09 mmol), HBTU (34,8 mg, 0,09 mmol, 98%), HOBt (12,5 mg, 0,09 mmol, 97%), trietilamin (75,4 μL, 0,54 mmol) i acetonitril (3 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **28** kao bijela krutina (31,8 mg, 63%).

T.t. = 130–132 °C; R_f = 0,6 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,34 (bs, 1H, NH), 10,81 (s, 1H, NH), 9,30 (s, 1H, NH), 8,86 (s, 1H, NH), 8,74 (d, J_{10,9} = 8,5 Hz, 1H, H10), 8,69 (d, J_{1,2} = 7,7 Hz, 1H, H1), 8,54 (s, 1H, NH), 8,23 (s, 1H, H7), 7,97 (d, J_{4,3} = 8,1 Hz, 1H, H4), 7,86 (d, J_{9,10} = 8,4 Hz, 1H, H9), 7,72–7,68 (m, 1H, H3), 7,65–7,60 (m, 1H, H2), 6,80 (s, 2H, Pyrr), 4,92–4,81 (m, 1H, CH-Ala), 3,68 (s, 3H, OCH₃), 3,48–3,41 (m, 1H, CH₂), 3,40–3,33 (m, 1H, CH₂), 2,90 (s, 3H, CH₃), 1,45 (s, 9H, Boc-CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 171,93 (s, COOCH₃), 159,44 (s, C_q), 158,34 (s, C6), 143,01 (s, C_q-b), 137,09 (s, C8), 132,15 (d, C9),

130,47 (s, C_q-d), 128,83 (d, C4), 128,45 (d, C3), 126,94 (d, C7), 126,38 (d, C2), 125,19 (s, C_q-c), 123,15 (s, C_q-a), 122,65 (d, C10), 122,46 (d, C1), 112,64 (d, Pyrr), 53,45 (d, CH), 52,04 (q, OCH₃), 36,53 (t, CH₂-Ala), 27,72 (q, CH₃-Boc), 22,90 (q, CH₃); M_w = 572,61; ESI-MS: m/z 573,4 [M+H]⁺.

3.3.3.4. (*S*)-metil 2-(2-(2-((3-(*tert*-butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1*H*-pirol-5-karboksamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (**29**)

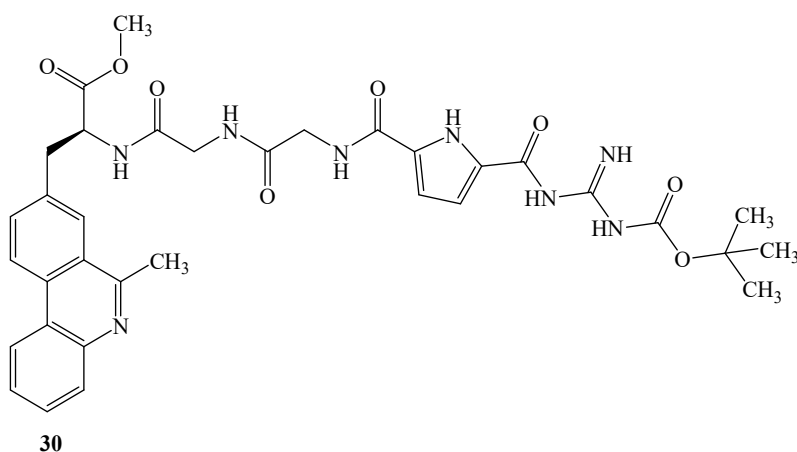


Fenantridinski dipeptid **23** (9,3 mg, 0,02 mmol), gvanidinopiroolni derivat **25** (11,0 mg, 0,03 mmol), HBTU (8,5 mg, 0,02 mmol, 98%), HOBt (3,0 mg, 0,02 mmol, 97%), trietilamin (11,2 μ L, 0,08 mmol) i acetonitril (2 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **29** kao blijedo žuta krutina (7,3 mg, 58%).

T.t. = 143–144 °C; R_f = 0,5 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 11,85–10,48 (bs, 2H, NH), 9,30 (s, 1H, NH), 8,70–8,65 (m, 2H, H10, H1), 8,63–8,45 (m, 3H, NH), 8,16 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, H7), 7,98 (dd, *J* = 8,1 i 1,2 Hz, 1H, H4), 7,80 (dd, *J* = 8,5 i 1,7 Hz, 1H, H9), 7,73–7,68 (m, 1H, H3), 7,65–7,61 (m, 1H, H2), 6,84–6,70 (m, 2H, Pyrr), 4,74–4,67 (m, 1H, CH), 3,92–3,86 (m, 1H, CH₂), 3,84–3,78 (m, 1H, CH₂), 3,66 (s, 3H, OCH₃), 3,37–3,18 (m, 2H, CH₂), 2,95 (s, 3H, CH₃), 1,44 (s, 9H, CH₃-Boc); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 171,71 (s, COOCH₃), 169,16 (s, CO-Gly), 158,50 (s, C6), 143,05 (s, C_q-b), 136,82 (s, C8), 132,26 (d, C9), 130,50 (s, C_q-d), 128,84 (d, C4), 128,43 (d, C3), 126,90 (d, C7), 126,33 (d, C2), 125,26 (s, C_q-c), 123,17 (s, C_q-a), 122,58 (d, C10), 122,44 (d, C1), 113,66 (d, Pyrr), 112,21 (d, Pyrr), 53,36 (d, CH-Ala),

51,97 (q, OCH₃), 41,68 (t, CH₂-Gly), 36,69 (t, CH₂-Ala), 27,77 (q, CH₃-Boc), 23,00 (q, CH₃); M_w = 629,66; ESI-MS: m/z 630,4 [M+H]⁺.

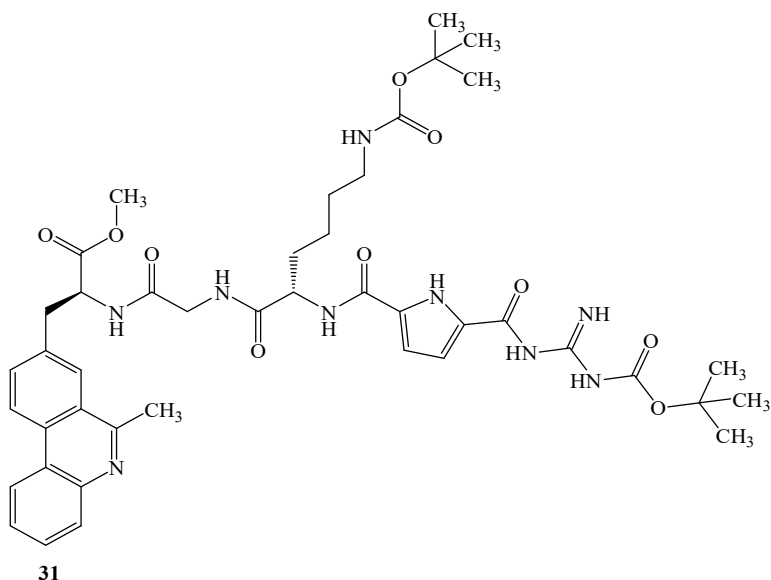
3.3.3.5. (*S*)-metil 2-(2-(2-(2-((3-(*tert*-butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1*H*-pirol-5-karboksamido)acetamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (**30**)



Fenantridinski tripeptid **24** (22,7 mg, 0,04 mmol), gvanidinopiroolni derivat **25** (15,9 mg, 0,04 mmol), HBTU (15,5 mg, 0,04 mmol, 98%), HOBT (5,6 mg, 0,04 mmol, 97%), trietilamin (44,6 μ L, 0,32 mmol) i acetonitril (2 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **30** kao blijedo žuta krutina (21,7 mg, 71%).

T.t. = 160–163 °C; R_f = 0,4 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); ¹H NMR (CDCl₃) δ /ppm: 10,57 (bs, 1H, NH), 9,06 (bs, 2H, NH), 8,62–8,17 (m, 3H, NH, Phen), 8,11–7,36 (m, 8H, NH, Phen), 6,76–6,42 (m, 2H, Pyrr), 4,92 (s, 1H, CH), 4,15–3,50 (m, 7H, CH₂, OCH₃), 3,39–3,10 (m, 2H, CH₂), 2,87 (s, 3H, CH₃), 1,44 (s, 9H, CH₃-Boc); ¹³C NMR (CDCl₃) δ /ppm: 158,02 (s, C_q), 142,86 (s, C_q), 134,84 (s, C_q), 131,12 (d, CH), 130,82 (s, C_q), 128,49 (d, CH), 127,96 (d, CH), 126,19 (d, CH), 125,78 (d, CH), 125,24 (s, C_q), 122,94 (s, C_q), 122,03 (d, CH), 121,38 (d, CH), 78,21 (s, C_q-Boc), 53,09 (d, CH), 52,01 (q, OCH₃), 42,67 (t, CH₂), 42,39 (t, CH₂), 37,23 (t, CH₂), 27,47 (q, CH₃-Boc), 22,59 (q, CH₃); M_w = 686,71; ESI-MS: m/z 687,3 [M+H]⁺.

3.3.3.6. (S)-metil 2-(2-((S)-6-(tert-butoksikarbonil)-2-(2-((3-(tert-butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1H-pirol-5-karboksamido)heksanamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (31)

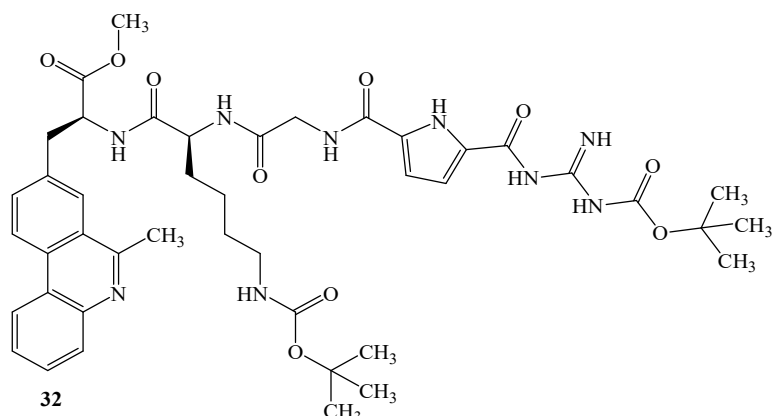


Fenantridinski derivat alanina **22** (3,4 mg, 0,01 mmol), gvanidinopiroolni derivat **26** (5,0 mg, 0,01 mmol), HBTU (3,3 mg, 0,01 mmol, 98%), HOBt (1,6 mg, 0,01 mmol, 97%), trietilamin (10,0 μ L, 0,07 mmol) i acetonitril (1 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **31** kao bijela krutina (4,9 mg, 66%).

T.t. = 122–123 °C; R_f = 0,4 (CH_2Cl_2 :MeOH/9:1); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ /ppm: 11,59 (bs, 1H, NH), 10,83 (bs, 1H, NH), 9,31 (bs, 1H, NH), 8,78–8,62 (m, 2H, H10, H1), 8,61–8,27 (m, 3H), 8,26–8,05 (m, 2H), 7,98 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,85–7,61 (m, 3H), 6,93 – 6,63 (m, 3H), 4,76–4,61 (m, 1H, CH-Ala), 4,34 (s, 1H, CH-Lys), 3,84–3,53 (m, 5H, CH_2 -Gly, OCH₃), 3,47–3,16 (m, 1H, CH_2 -Ala), 3,02–2,81 (m, 6H, CH_2 -Ala, CH_2 -Lys, CH₃), 1,66 (bs, 2H, CH_2 -Lys), 1,55–1,05 (m, 22H, CH_2 -Lys, CH₃-Boc); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ /ppm: 172,12 (s, C_q), 172,01 (s, C_q), 171,71 (s, C_q), 171,69 (s, C_q), 168,88 (s, C_q), 168,83 (s, C_q), 159,71 (s, C_q), 158,57 (s, C_q), 158,46 (s, C_q), 158,41 (s, C_q), 155,52 (s, C_q), 143,07 (s, C_q), 136,85 (s, C_q), 132,16 (d, Phen), 130,47 (s, C_q), 128,87 (d, Phen), 128,46 (d, Phen), 126,91 (d, Phen), 126,38 (d, Phen), 125,24 (s, C_q), 123,19 (s, C_q), 122,63 (d, Phen), 122,46 (d, Phen), 113,12 (d, Pyrr), 77,29 (s, C_q-Boc), 55,75 (CH ili OCH₃), 53,33 (CH ili OCH₃), 51,98 (CH ili OCH₃), 41,61 (t, CH₂), 36,73 (t, CH₂),

31,26 (t, CH₂), 29,20 (t, CH₂), 28,23 (q, CH₃-Boc), 27,76 (q, CH₃-Boc), 23,02 (q, CH₃), 22,88 (t, CH₂); M_w = 857,95; ESI-MS: m/z 858,6 [M+H]⁺.

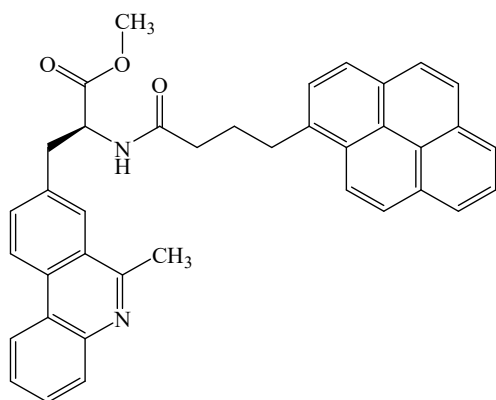
3.3.3.7. (S)-metil 2-((S)-6-(tert-butoksikarbonil)-2-(4-(5-((3-(tert-butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1H-pirol-2-il)-4-oksobutanamido)heksanamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (32)



Fenantridinski derivat alanina **22** (10,0 mg, 0,03 mmol), gvanidinopirolni derivat **27** (14,7 mg, 0,03 mmol), HBTU (9,8 mg, 0,03 mmol, 98%), HOBt (3,5 mg, 0,03 mmol, 97%), trietilamin (21,2 μL, 0,15 mmol) i acetonitril (2 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **32** kao bijela krutina (3,2 mg, 15%).

T.t. = 137–138 °C; R_f = 0,4 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,25 (bs, 1H), 8,80–8,37 (m, 5H, H₁₀, Phen, NH), 8,16 (s, 1H, Phen), 8,04–7,89 (m, 2H), 7,88–7,52 (m, 4H), 6,83–6,56 (m, 3H), 4,75–4,56 (m, 1H, CH-Ala), 4,36–4,21 (m, 1H, CH-Lys), 3,90–3,76 (m, 2H, CH₂), 3,68–3,55 (m, 4H, CH₂, OCH₃), 2,94 (s, 3H, CH₃), 2,86–2,75 (m, 2H, CH₂-Lys), 1,73–0,70 (m, 24H, CH₂-Lys, CH₃-Boc); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 171,73 (s, C_q), 171,64 (s, C_q), 158,70 (s, C_q), 158,52 (s, C_q), 155,49 (s, C_q), 143,05 (s, C_q), 136,97 (s, C_q), 132,31 (d, Phen), 130,49 (s, C_q), 128,84 (d, Phen), 128,42 (d, Phen), 126,82 (d, Phen), 126,36 (d, Phen), 125,27 (s, C_q), 123,21 (s, C_q), 122,60 (d, Phen), 122,51 (d, Phen), 113,56 (d, Pyrr), 112,59 (d, Pyrr), 77,29 (C_q-Boc), 55,75 (CH ili OCH₃), 53,47 (CH ili OCH₃), 51,99 (CH ili OCH₃), 42,10 (t, CH₂), 36,54 (t, CH₂), 31,69 (t, CH₂), 29,22 (t, CH₂), 28,25 (q, CH₃-Boc), 27,91 (q, CH₃-Boc), 23,03 (q, CH₃), 22,40 (t, CH₂); M_w = 857,95; ESI-MS: m/z 858,5 [M+H]⁺.

3.3.3.8. (S)-metil 3-(6-metilfenantridin-8-il)-2-(4-(piren-1-il)butanamido)propanoat (33)

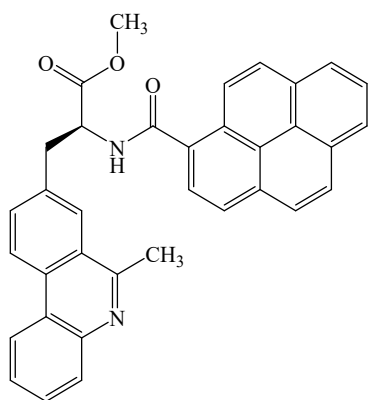


33

Fenantridinski derivat alanina **22** (12,3 mg, 0,03 mmol), 1-pirenbutanska kiselina (9,3 mg, 0,03 mmol, 97%), HBTU (11,4 mg, 0,03 mmol, 98%), HOBt (4,2 mg, 0,03 mmol, 97%), trietilamin (16,8 μ L, 0,12 mmol) i acetonitril (3 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **33** kao bijela krutina (9,4 mg, 56%).

T.t. = 131–132 °C; R_f = 0,8 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3418 (s), 3294 (s), 3038 (m), 2947 (m), 2858 (m), 1919 (vw), 1738 (s), 1643 (s), 1582 (m), 1535 (m), 1483 (w), 1435 (m), 1377 (m), 1348 (w), 1319 (w), 1277 (w), 1209 (m), 1180 (w), 1136 (w), 1034 (w), 887 (vw), 843 (s), 760 (s), 723 (m), 681 (w), 650 (w), 617 (w), 555 (w); ¹H NMR (CDCl₃) δ /ppm: 8,44 (d, J = 8,5 Hz, 1H, Phen ili Py), 8,33 (d, J = 8,1 Hz, 1H, Phen ili Py), 8,23–8,11 (m, 3H, Phen ili Py), 8,07–7,93 (m, 6H, Phen ili Py), 7,93–7,88 (m, 1H, Phen ili Py), 7,74 (d, J = 7,8 Hz, 1H, Phen ili Py), 7,67–7,45 (m, 3H, Phen ili Py), 5,98 (d, J = 7,7 Hz, 1H, NH), 5,08 (dd, J = 13,7, 6,0 Hz, 1H, CH), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 3,50–3,39 (m, 1H, CH₂-Ala), 3,37–3,20 (m, 3H, CH₂, CH₂-Ala), 2,92 (s, 3H, CH₃), 2,41–2,25 (m, 2H, CH₂), 2,24–2,10 (m, 1H, CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃) δ /ppm: 172,26 (s, C_q), 172,01 (s, C_q), 158,22 (s, C_q), 143,52 (s, C_q), 135,43 (s, C_q), 135,18 (s, C_q), 131,61 (d, Phen ili Py), 131,56 (s, C_q), 131,39 (s, C_q), 130,86 (s, C_q), 129,94 (s, C_q), 129,25 (d, Phen ili Py), 128,67 (s, C_q), 128,54 (d, Phen ili Py), 127,45 (d, Phen ili Py), 127,38 (d, Phen ili Py), 127,18 (d, Phen ili Py), 126,80 (d, Phen ili Py), 126,70 (d, Phen ili Py), 126,32 (d, Phen ili Py), 125,83 (d, Phen ili Py), 124,90 (d, Phen ili Py), 124,78 (d, Phen ili Py), 123,43 (s, C_q), 123,20 (d, Phen ili Py), 122,72 (d, Phen ili Py), 121,76 (d, Phen ili Py), 53,04 (CH ili OCH₃), 52,52 (CH ili OCH₃), 38,24 (t, CH₂), 35,92 (t, CH₂), 32,64 (t, CH₂), 27,20 (t, CH₂), 23,32 (q, CH₃); HRMS: m/z : 565,2464 [$M+H$]⁺; izračunato C₃₈H₃₂N₂O₃⁺: 565,2485.

3.3.3.9. (S)-metil 3-(6-metilfenantridin-8-il)-2-(piren-1-karboksamido)propanoat (34)

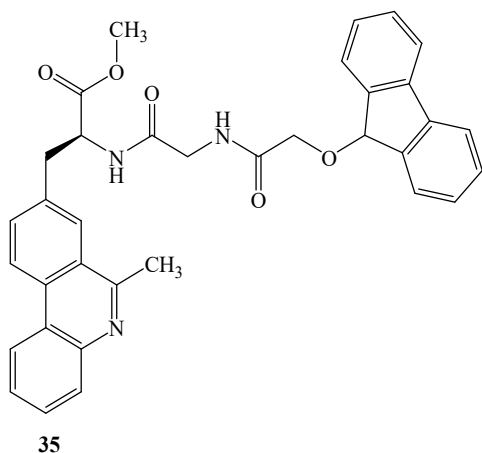


34

Fenantridinski derivat alanina **22** (12,0 mg, 0,03 mmol), 1-pirenkarboksilna kiselina (7,7 mg, 0,03 mmol, 97%), HBTU (11,6 mg, 0,03 mmol, 98%), HOBt (4,2 mg, 0,03 mmol, 97%), trietilamin (16,8 μ L, 0,12 mmol) i acetonitril (3 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **34** kao bijela krutina (15,9 mg, 84%).

T.t. = 230–231 °C; R_f = 0,8 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3435 (s), 3261 (s), 3042 (w), 2953 (w), 2920 (w), 2854 (w), 1740 (m), 1634 (s), 1531 (m), 1481 (w), 1435 (w), 1379 (w), 1344 (w), 1298 (w), 1273 (w), 1207 (w), 1178 (w), 1153 (w), 1115(w), 1088 (w), 849 (m), 760 (m), 725 (w), 559 (w); ¹H NMR (CDCl₃) δ /ppm: 8,59 (d, J = 8,5 Hz, 1H, Phen ili Py), 8,51 (d, J = 7,3 Hz, 1H, Phen ili Py), 8,36 (d, J = 9,3 Hz, 1H, Phen ili Py), 8,27–7,96 (m, 9H, Phen ili Py), 7,91 (d, J = 9,3 Hz, 1H, Phen ili Py), 7,80–7,67 (m, 2H, Phen ili Py), 7,67–7,58 (m, 1H, Phen ili Py), 6,66 (d, J = 7,6 Hz, 1H, NH), 5,51–5,41 (m, 1H, CH-Ala), 3,89 (s, 3H, OCH₃), 3,81–3,71 (m, 1H, CH₂-Ala), 3,58–3,47 (m, 1H, CH₂-Ala), 2,90 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CD₃CN) δ /ppm: 132,03 (d, Phen ili Py), 129,19 (d, Phen ili Py), 128,42 (d, Phen ili Py), 128,38 (d, Phen ili Py), 127,94 (d, Phen ili Py), 127,31 (d, Phen ili Py), 127,03 (d, Phen ili Py), 126,42 (d, Phen ili Py), 126,30 (d, Phen ili Py), 125,72 (d, Phen ili Py), 125,51 (d, Phen ili Py), 124,64 (d, Phen ili Py), 124,23 (d, Phen ili Py), 124,11 (d, Phen ili Py), 122,66 (d, Phen ili Py), 122,17 (d, Phen ili Py), 54,00 (CH ili OCH₃), 51,93 (CH ili OCH₃), 37,36 (t, CH₂), 22,36 (q, CH₃); HRMS: m/z : 523,2025 [$M+H$]⁺; izračunato C₃₅H₂₆N₂O₃⁺: 523,2022.

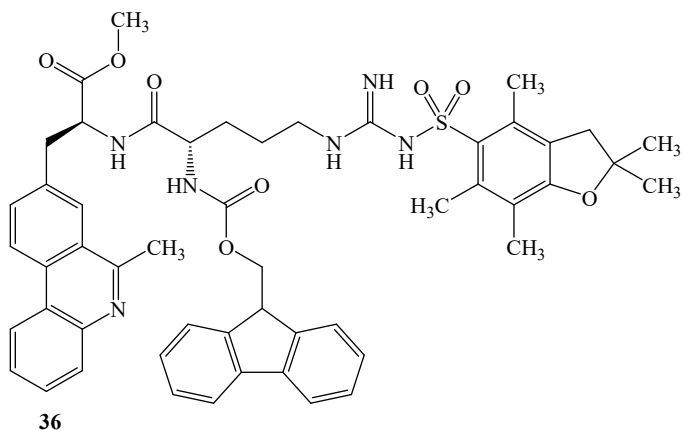
3.3.3.10. (S)-metil 2-(2-(2-(9H-fluoren-9-iloksi)acetamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (35)



Fenantridinski derivat alanina **22** (18,5 mg, 0,05 mmol), 2-(((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)octena kiselina (17,9 mg, 0,06 mmol), HBTU (19,2 mg, 0,05 mmol, 98%), HOBT (7,1 mg, 0,05 mmol, 97%), trietilamin (27,9 μ L, 0,20 mmol) i acetonitril (3 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **35** kao bijela krutina (19,4 mg, 68%).

T.t. = 211–212 °C; R_f = 0,7 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3423 (s), 3323 (s), 3263 (s), 3067 (w), 2953 (w), 2854 (w), 1733 (m), 1690 (s), 1659 (s), 1628 (w), 1580 (w), 1545 (m), 1483 (w), 1448 (m), 1377 (w), 1346 (w), 1273 (m), 1240 (w), 1173 (w), 1115 (w), 1078 (w), 1047 (w), 1007 (vw), 889 (vw), 833 (vw), 760 (m), 741 (m), 735 (m), 648 (w), 621 (w), 557 (w); ¹H NMR (CD₃CN, 80 °C) δ /ppm: 8,59 (d, J = 8,3 Hz, 1H, Phen), 8,53 (d, J = 7,8 Hz, 1H, Phen), 8,11 (s, 1H, Phen), 7,99 (d, J = 7,9 Hz, 1H, Phen), 7,84–7,76 (m, 2H, Phen ili Fmoc), 7,74–7,67 (m, 2H, Phen ili Fmoc), 7,63–7,54 (m, 3H, Phen ili Fmoc), 7,44–7,38 (m, 2H, Phen ili Fmoc), 7,34–7,28 (m, 2H, Phen ili Fmoc), 6,83 (bs, 1H, NH), 5,78 (bs, 1H, NH), 4,94–4,88 (m, 1H, CH), 4,29–4,21 (m, 2H, CH₂), 4,14 (bs, 1H, CH), 3,80–3,63 (m, 5H, OCH₃, CH₂), 3,49–3,43 (m, 1H, CH₂-Ala), 3,35–3,29 (m, 1H, CH₂-Ala), 2,99 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CD₃CN, 80 °C) δ /ppm: 131,39 (d, Phen ili Fmoc), 128,67 (d, Phen ili Fmoc), 127,81 (d, Phen ili Fmoc), 127,10 (d, Phen ili Fmoc), 126,51 (d, Phen ili Fmoc), 125,73 (d, Phen ili Fmoc), 124,54 (d, Phen ili Fmoc), 122,01 (d, Phen ili Fmoc), 121,56 (d, Phen ili Fmoc), 119,35 (d, Phen ili Fmoc), 66,12 (t, CH₂-Fmoc), 52,87 (CH i/ili OCH₃), 46,62 (d, CH), 36,88 (t, CH₂-Ala); M_w = 573,64; ESI-MS: m/z 574,5 [M+H]⁺.

3.3.3.11. (S)-metil 2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)-5-(3-(2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-ilsulfonil)gvanidino)pentanamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (36)

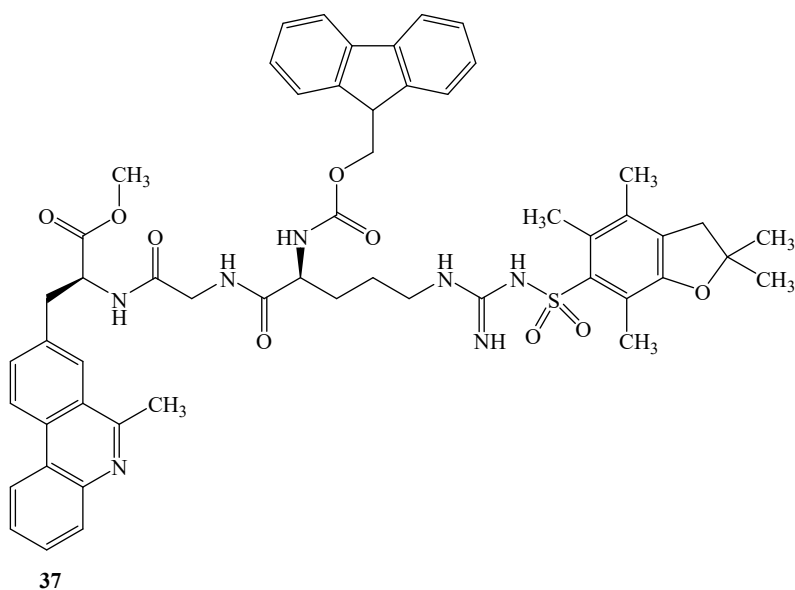


Fenantridinski derivat alanina **22** (51,5 mg, 0,13 mmol), N_{α} -Fmoc- N_{ω} -(2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil)-L-arginin (86,1 mg, 0,13 mmol, 98%), HBTU (50,3 mg, 0,13 mmol, 98%), HOBt (18,1 mg, 0,13 mmol, 97%), trietilamin (72,5 μ L, 0,52 mmol) i acetonitril (3 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **36** kao bijela krutina (114,6 mg, 95%).

T.t.= 127–130 °C; R_f = 0,6 (CH_2Cl_2 :MeOH/9:1); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ /ppm: 8,81–8,24 (m, 4H), 8,13 (s, 1H), 7,95 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,91–7,82 (m, 2H), 7,78 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,73–7,54 (m, 3H), 7,51–7,20 (m, 5H), 6,68 (bd, J = 108,8 Hz, 3H, NH-Guan), 4,79–4,66 (m, 1H, CH-Ala), 4,21–3,94 (m, 4H, CH_2 -Fmoc, CH-Fmoc i CH-Arg), 3,62 (s, 3H, OCH_3), 3,26–3,12 (m, 2H, CH_2 -Ala), 3,06–2,82 (m, 7H, CH_3 , CH_2 -Arg, CH_2 -Pbf), 2,48 (s, 3H, CH_3 -Pbf), 2,41 (s, 3H, CH_3 -Pbf), 1,98 (s, 3H, CH_3 -Pbf), 1,62–1,23 (m, 10H, CH_2 -Arg, CH_3 -Pbf); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ /ppm: 172,00 (s, C_q), 171,71 (s, C_q), 158,62 (s, C_q), 157,42 (s, C_q), 156,10 (s, C_q), 155,68 (s, C_q), 143,85 (s, C_q), 143,60 (s, C_q), 143,05 (s, C_q), 140,67 (s, C_q), 137,27 (s, C_q), 136,73 (s, C_q), 132,20 (d, Phen), 131,41 (s, C_q), 130,45 (s, C_q), 128,92 (d, Fmoc), 128,84 (d, Phen), 128,50 (d, Phen), 127,59 (d, Phen), 127,28 (d, Fmoc), 127,01 (d, Phen), 126,43 (d, Phen), 124,29 (s, C_q), 123,18 (s, C_q), 122,48 (d, Phen), 121,38 (d, Fmoc), 120,03 (d, Fmoc), 116,25 (s, C_q), 109,76 (s, C_q), 86,25 (C_q -Pbf), 65,52 (t, CH_2 -Fmoc), 54,00 (CH ili OCH_3), 53,10 (CH ili OCH_3), 51,94 (CH ili OCH_3), 46,55 (CH ili OCH_3), 42,44 (t, CH_2 -Ala ili CH_2 -Pbf), 36,55 (t,

CH₂-Ala ili CH₂-Pbf), 32,24 (CH₂-Arg), 29,25(CH₂-Arg), 28,26 (q, CH₃-Pbf), 25,44 (CH₂-Arg), 23,04 (q, CH₃-Phen), 18,94 (q, CH₃-Pbf), 17,59 (q, CH₃-Pbf), 12,25 (q, CH₃-Pbf); M_w = 925,10; ESI-MS: m/z 926,4 [M+H]⁺.

3.3.3.12. (S)-metil 2-(2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)-5-(3-(2,2,4,5,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-6-ilsulfonil)gvanidino)pentanamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat (37)



Fenantridinski dipeptid **23** (22,5 mg, 0,05 mmol), N_α-Fmoc-N_ω-(2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil)-L-arginin (33,1 mg, 0,05 mmol), HBTU (19,3 mg, 0,05 mmol, 98%), HOBT (7,0 mg, 0,05 mmol, 97%), trietilamin (27,9 μL, 0,20 mmol) i acetonitril (3 mL) upotrijebljeni su prema općoj proceduri. Tankoslojnom kromatografijom izoliran je produkt **37** kao bijela krutina (38,5 mg, 79%).

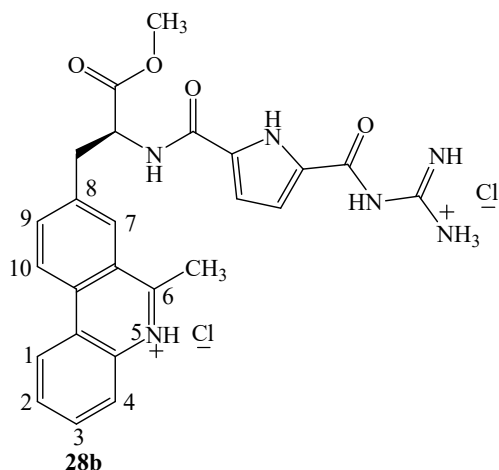
T.t. = 133–135 °C; R_f = 0,5 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,78–8,62 (m, 2H), 8,38 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,22–8,09 (m, 2H), 7,98 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,92–7,48 (m, 7H, 4H), 7,45–7,33 (m, 2H, Fmoc), 7,32–7,20 (m, 2H, Fmoc), 7,12–6,23 (m, 4H, NH), 4,76–4,61 (m, 1H, CH-Ala), 4,39–4,12 (m, 3H CH₂-Fmoc i CH-Fmoc ili Arg), 4,01–3,88 (m, 1H, CH-Fmoc ili Arg), 3,84–3,69 (m, 1H, CH₂-Ala), 3,64 (s, 3H, OCH₃), 3,51–3,37 (m, 2H, CH₂-Gly), 3,25–3,13 (m, 1H, CH₂-Ala), 3,06–2,86 (m, 7H, CH₃-Phen, CH₂-Arg, CH₂-Pbf), 2,47 (s, 3H, CH₃-Pbf), 2,41 (s, 3H, CH₃-Pbf), 1,98 (s, 3H, CH₃-Pbf), 1,64 – 0,99 (m, 10H, CH₂-Arg, CH₃-Pbf); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 172,02 (s, C_q), 171,70 (s, C_q), 168,75 (s, C_q), 158,55 (s, C_q),

157,41 (s, C_q), 156,06 (s, C_q), 156,03 (s, C_q), 143,79 (s, C_q), 143,68 (s, C_q), 143,07 (s, C_q), 140,67 (s, C_q), 137,25 (s, C_q), 136,75 (s, C_q), 132,16 (d, Phen), 131,40 (s, C_q), 130,52 (s, C_q), 128,91 (d, Phen ili Fmoc), 128,87 (d, Phen ili Fmoc), 128,49 (d, Phen ili Fmoc), 127,59 (d, Phen ili Fmoc), 127,28 (d, Phen), 127,01 (d, Phen), 126,88 (d, Phen), 126,39 (d, Phen), 125,24 (d, Phen), 124,29 (C_q), 123,18 (s, C_q), 122,65 (d, Phen), 122,47 (d, Phen), 121,37 (d, Phen ili Fmoc), 120,06 (d, Phen ili Fmoc), 116,23 (s, C_q), 109,76 (C_q), 86,25 (CH₂), 65,64 (CH₂), 56,01 (CH₂), 54,32 (CH ili OCH₃), 53,39 (CH ili OCH₃), 51,98 (CH ili OCH₃), 46,62 (CH ili OCH₃), 42,43 (CH₂), 41,56 (CH₂), 36,79 (CH₂), 28,25 (CH₃), 23,05 (CH₃), 18,94 (CH₃), 18,55 (CH₃), 17,58 (CH₃), 12,24 (CH₃); M_w = 982,15; ESI-MS: m/z 983,5 [M+H]⁺.

3.3.4. Opća procedura za pripremu hidrokloridnih soli gvanidinopirolnih derivata **28b-32b**

U otopinu odgovarajućeg Boc zaštićenog aminokiselninskog derivata **28-32** u diklormetanu (4 mL) dodana je smjesa trifluoroctene kiseline i vode (TFA:H₂O/9:1, 2 mL). Reakcijska smjesa mješana je preko noći na sobnoj temperaturi, a nakon uklanjanja otapala pod sniženim tlakom dobivena je trifluoroctena sol slobodne aminokiseline **28a-32a** koja je pročišćena tankoslojnom kromatografijom (eluens: CH₂Cl₂:CH₃OH/9:1) i dobivena u obliku bezbojnog ulja. Odgovarajuća trifluoroctena sol otopljena je u metanolu (2 mL), dodana je 5% kloridna kiselina (2 mL) i smjesa je miješana 1 sat na sobnoj temperaturi. Otapalo je uklonjeno pod sniženim tlakom i dobivena je hidrokloridna sol **28b-32b** kao svijetložuta krutina.

3.3.4.1. (*S*)-metil 2-(2-(gvanidinokarbonil)-1*H*-pirol-5-karboksamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat dihidroklorid (**28b**)

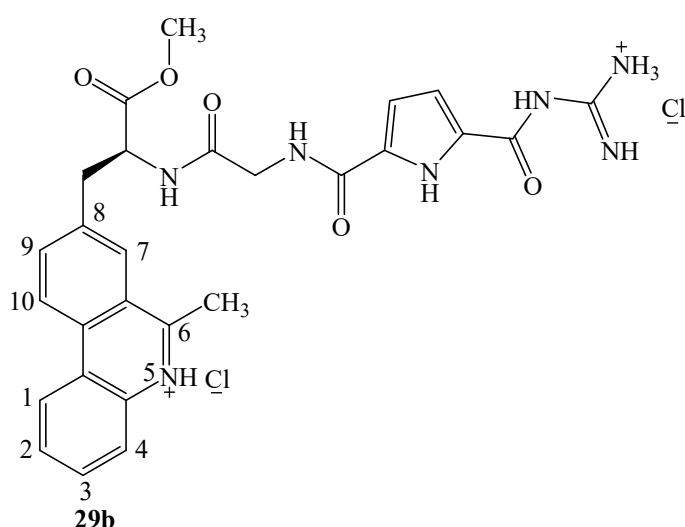


Gvanidinopirolni derivat **28** (17,2 mg, 0,03 mmol) tretiran je prema općoj proceduri za pripremu hidrokloridnih soli te je dobiven spoj **28b** kao svijetložuta krutina (14,9 mg, 91%).

T.t. > 300 °C (raspad); IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3400 (s), 3335 (s), 2957 (w), 2920 (w), 2854 (w), 1701 (s), 1645 (m), 1555 (m), 1481 (w), 1442 (w), 1362 (w), 1275 (m), 1227 (w), 1103 (vw), 852 (vw), 814 (vw), 758 (w), 604 (w); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 12,48 (s, 1H, NH-Pyrr), 12,16 (s, 1H, NH-Guan), 9,22 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, NH-Ala), 9,00–8,85 (m, 2H, H10, H1), 8,79–8,47 (m, 5H, NH-Guan, NH₂-Guan, H7), 8,37 (bs, 1H, H4), 8,19 (bs, 1H, H9), 7,98–7,82 (m, 2H, H3, H2), 7,56 (s, 1H, Pyrr), 6,89 (s, 1H, Pyrr), 4,97–4,87 (m, 1H, CH-Ala), 3,69 (s, 3H,

OCH₃), 3,57–3,50 (m, 2H, CH₂-Ala), 3,23 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 171,61 (s, COOCH₃), 159,52 (s, C_q), 159,01 (s, C_q), 155,53 (s, C_q), 139,08, 131,78 (s, C_q), 131,62 (s, C_q), 131,49 (d, Phen), 130,26 (d, Phen), 128,57 (d, Phen), 125,86 (s, C_q), 124,21 (s, C_q), 123,65 (s, C_q), 123,37 (d, Phen), 123,25 (d, Phen), 115,80 (d, Pyrr), 113,23 (d, Pyrr), 53,39 (d, CH-Ala), 52,15 (q, OCH₃), 36,05 (t, CH₂-Ala), 18,37 (q, CH₃); HRMS: *m/z*: 473,1941 [*M*+H]⁺; izračunato C₂₅H₂₄N₆O₄⁺: 473,1931.

3.3.4.2. (*S*)-metil 2-(2-(2-(gvanidinokarbonil)-1*H*-pirol-5-karboksamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat dihidroklorid (**29b**)

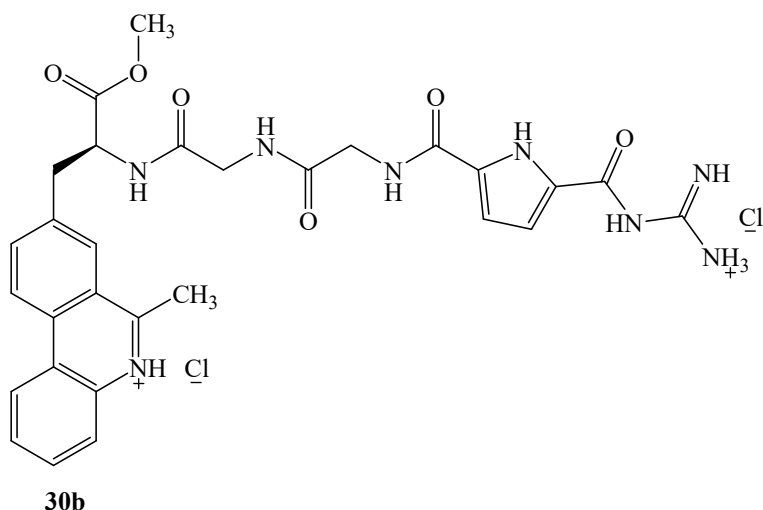


Gvanidinopiroolni derivat **29** (20,5 mg, 0,03 mmol) tretiran je prema općoj proceduri za pripremu hidrokloridnih soli te je dobiven spoj **29b** kao svijetložuta krutina (18,2 mg, 93%).

T.t. > 300 °C (raspad); IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3329 (s), 1699 (s), 2978 (m), 2922 (m), 1699 (s), 1655 (s), 1647 (s), 1556 (s), 1475 (m), 1441 (m), 1406 (w), 1364 (w), 1288 (s), 1254 (m), 1202 (m), 1161 (w), 1072 (w), 854 (w), 814 (w), 764 (m), 721 (w), 602 (m); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 12,28 (s, 1H, NH), 12,02 (s, 1H, NH), 8,95–8,85 (m, 2H, H10, H1), 8,76–8,42 (m, 7H, NH-Guan, NH₂-Guan, H7), 8,37 (bs, 1H, H4), 8,14 (bs, 1H, H9), 8,00–7,85 (m, 2H, H3, H2), 7,48 (s, 1H, Pyrr), 6,75 (s, 1H, Pyrr), 4,81–4,67 (m, 1H, CH-Ala), 3,90–3,77 (m, 2H, CH₂-Gly), 3,69 (s, 3H, OCH₃), 3,45–3,17 (m, 5H, CH₂-Ala, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 172,45 (s, C_q), 171,52 (s, C_q), 168,87 (s, C_q), 168,71 (s, C_q), 159,47 (s, C_q), 159,12 (s, C_q), 155,44 (s, C_q), 132,18 (s, C_q), 131,85 (s, C_q), 130,29 (d, Phen), 129,25 (d, Phen), 128,84 (d, Phen), 125,42 (s, C_q), 124,04 (s, C_q), 123,66 (s, C_q), 123,42 (d, Phen), 123,23 (d, Phen), 115,78 (d, Pyrr),

112,77 (d, Pyrr), 52,84 (d, CH-Ala), 52,08 (q, OCH₃), 41,74 (t, CH₂-Gly), 36,29 (t, CH₂-Ala), 19,45 (q, CH₃); HRMS: m/z : 530,2169 [$M+H$]⁺; izračunato C₂₇H₂₇N₇O₅⁺: 530,2146.

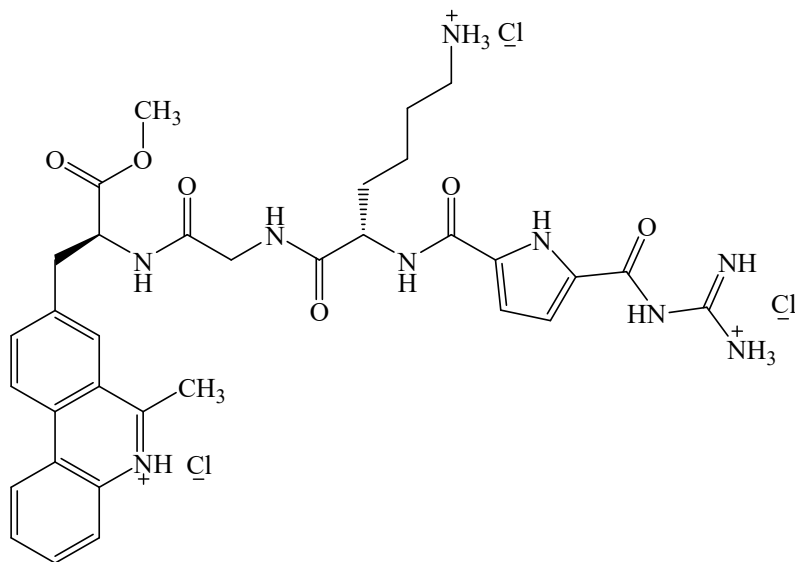
3.3.4.3. (S)-metil 2-(2-(2-(2-(gvanidinokarbonil)-1H-pirol-5-karboksamido)acetamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat dihidroklorid (30b)



Gvanidinopiroolni derivat **30** (21,7 mg, 0,03 mmol) tretiran je prema općoj proceduri za pripremu hidrokloridnih soli te je dobiven spoj **30b** kao žuto ulje (14,4 mg, 70%).

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3499 (s), 2980 (w), 2922 (w), 1701 (s), 1624 (s), 1660 (m), 1475 (w), 1447 (w), 1410 (w), 1366 (vw), 1286 (m), 1254 (m), 1203 (w), 1090 (w), 854 (vw), 812 (vw), 762 (w), 515 (m); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 12,36 (s, 1H, NH), 11,88 (s, 1H, NH), 8,96–8,78 (m, 3H), 8,66–8,21 (m, 7H), 8,13 (s, 1H), 7,98–7,82 (m, 2H), 7,44 (s, 1H, Pyrr), 6,85 (s, 1H, Pyrr), 4,77–4,67 (s, 1H, CH), 3,86 (s, 2H, CH₂), 3,75–3,61 (m, 5H, OCH₃, CH₂), 3,31–3,17 (m, 5H, CH₃, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 171,45 (s, Cq), 168,97 (s, Cq), 168,82 (s, Cq), 159,50 (s, Cq), 155,27 (s, Cq), 149,11 (s, Cq), 132,23 (s, Cq), 125,47 (s, Cq), 124,10 (s, Cq), 123,62 (s, Cq), 123,38 (d, Phen), 123,18 (d, Phen), 115,70 (d, Pyrr), 112,81 (d, Pyrr), 53,02 (CH ili OCH₃), 52,02 (CH ili OCH₃), 42,13 (t, CH₂), 41,58 (t, CH₂), 36,23 (t, CH₂); HRMS: m/z : 587,2366 [$M+H$]⁺; izračunato C₂₉H₃₀N₈O₆⁺: 587,2367

3.3.4.4. (S)-metil 2-(2-((S)-6-amino-2-(2-(gvanidinokarbonil)-1H-pirol-5-karboksamido)heksanamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat trihidroklorid (31b)

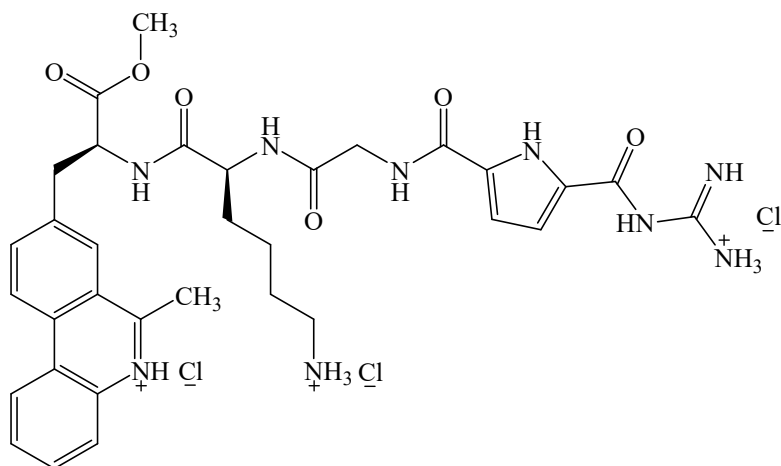


31b

Gvanidinopiroolni derivat **31** (19,6 mg, 0,02 mmol) tretiran je prema općoj proceduri za pripravu hidrokloridnih soli te je dobiven spoj **31b** kao žuta krutina (15,4 mg, 88%).

T.t. > 300 °C; IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3423 (s), 2974 (w), 2922 (w), 2858 (w), 1641 (s), 1626 (s), 1555 (m), 1474 (w), 1439 (w), 1377 (w), 1352 (w), 1271 (w), 1254 (w), 1134 (m), 1076 (m), 1051 (m), 922 (w), 889 (w), 856 (vw), 816 (w), 768 (w), 725 (m), 631 (w), 617 (w), 555 (w), 471 (m); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 12,54–12,40 (m, 1H, NH-Pyrr), 12,06 (s, 1H, NH), 8,90 (s, 2H), 8,78–8,61 (m, 3H), 8,57–8,28 (m, 6H), 8,13 (bs, 1H), 8,01–7,79 (m, 5H), 7,57–7,45 (m, 1H, Pyrr), 6,91–6,78 (m, 1H, Pyrr), 4,80–4,55 (m, 1H, CH-Ala), 4,45–4,20 (m, 1H, CH-Lys), 3,83–3,56 (m, 6H, CH₂-Ala, CH₂-Gly, OCH₃), 3,25 (s, 3H), 2,74 (s, 2H, CH₂-Lys), 1,82–1,10 (m, 6H, CH₂-Lys); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 172,56 (s, C_q), 172,00 (s, C_q), 171,94 (s, C_q), 171,59 (s, C_q), 169,34 (s, C_q), 169,00 (s, C_q), 168,83 (s, C_q), 159,71 (s, C_q), 159,24 (s, C_q), 155,48 (s, C_q), 132,12 (s, C_q), 130,51 (d, Phen), 125,62 (s, C_q), 124,16 (s, C_q), 123,75 (s, C_q), 123,56 (d, Phen), 123,31 (d, Phen), 115,70 (d, Pyrr), 113,77 (d, Pyrr), 53,19 (CH ili OCH₃), 52,99 (CH ili OCH₃), 52,19 (CH ili OCH₃), 41,67 (t, CH₂), 38,57 (t, CH₂), 36,25 (t, CH₂), 30,86 (t, CH₂), 26,59 (t, CH₂), 22,48 (t, CH₂); HRMS: m/z : 658,3099 [$M+H$]⁺; izračunato C₃₃H₃₉N₉O₆⁺: 658,3102.

3.3.4.5. (*S*)-metil 2-((*S*)-6-amino-2-(2-(2-(gvanidinokarbonil)-1*H*-pirol-5-karboksamido)acetamido)heksanamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat trihidroklorid (32b**)**



32b

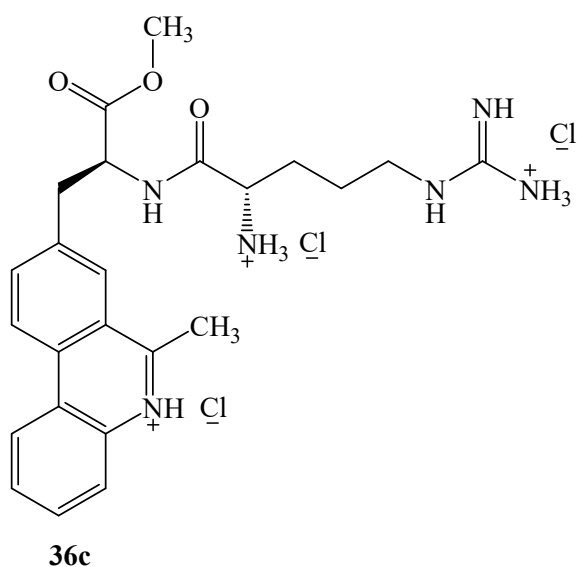
Gvanidinopiroolni derivat **32** (11,6 mg, 0,01 mmol) tretiran je prema općoj proceduri za pripravu hidrokloridnih soli te je dobiven spoj **32b** kao žuta krutina (7,2 mg, 95%).

T.t. > 300 °C; IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3429 (s), 2966 (w), 2922 (w), 2858 (w), 1641 (s), 1626 (s), 1560 (m), 1474 (w), 1439 (w), 1377 (w), 1352 (w), 1290 (w), 1134 (m), 1076 (m), 922 (w), 887 (w), 856 (w), 816 (w), 756 (w), 725 (m), 631 (m), 613 (m), 559 (m); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 12,33 (s, 1H, NH-Pyrr), 12,09 (s, 1H, NH), 8,99–8,86 (m, 2H), 8,85–8,62 (m, 4H), 8,60–8,45 (m, 3H), 8,38 (bs, 1H), 8,23–8,10 (m, 8,1 Hz, 2H), 8,02–7,80 (m, 5H), 7,51 (s, 1H, Pyrr), 6,80 (s, 1H, Pyrr), 4,77–4,54 (m, 1H, CH-Ala), 4,35–4,16 (m, 1H, CH-Lys), 3,88–3,66 (m, 4H, CH₂), 3,65 (s, 3H, OCH₃), 3,27 (m, 3H, CH₃), 2,71 (s, 2H, CH₂-Lys), 1,71–0,70 (m, 6H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 172,52 (s, C_q), 171,80 (s, C_q), 171,66 (s, C_q), 171,55 (s, C_q), 169,26 (s, C_q), 168,63 (s, C_q), 159,59 (s, C_q), 159,41 (s, C_q), 155,52 (s, C_q), 132,26 (s, C_q), 131,59 (d, Phen), 125,57 (s, C_q), 123,74 (s, C_q), 123,55 (d, Phen), 123,29 (d, Phen), 115,95 (d, Pyrr), 112,81 (d, Pyrr), 53,23 (CH ili OCH₃), 52,88 (CH ili OCH₃), 52,12 (CH ili OCH₃), 42,07 (t, CH₂), 38,47 (t, CH₂), 36,47 (t, CH₂), 31,11 (t, CH₂), 26,47 (t, CH₂), 22,10 (t, CH₂); HRMS: m/z : 658,3097 [$M+H$]⁺; izračunato C₃₃H₃₉N₉O₆⁺: 658,3102.

3.3.5. Opća procedura za pripremu hidrokloridnih soli argininskih derivata 36c i 37c

Argininski derivat s Fmoc zaštitnom skupinom **36** ili **37** otopljen je u diklormetanu (15 mL), dodan je piperidin (200 μ L) te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi. Nakon 4 h izoliran je spoj **36a** ili **37a** preparativnom tankoslojnom kromatografijom (eluens: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}/9:1$), pa zatim otopljen u diklormetanu, dodana je smjesa trifluoroctene kiseline i vode (TFA: $\text{H}_2\text{O}/9:1$) i miješano preko noći na sobnoj temperaturi. Spoj **36b** ili **37b** izoliran je preparativnom tankoslojnom kromatografijom (eluens: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}/9:1$). Potom je **36b** ili **37b** otopljen u metanolu (2mL) i dodana je 5% kloridna kiselina (2 mL). Nakon uklanjanja otapala pod sniženim tlakom dobivena je hidrokloridna sol **36c** kao žuto ulje.

3.3.5.1. (S)-metil 2-((S)-2-amino-5-gvanidinopentanamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat trihidroklorid (36c)

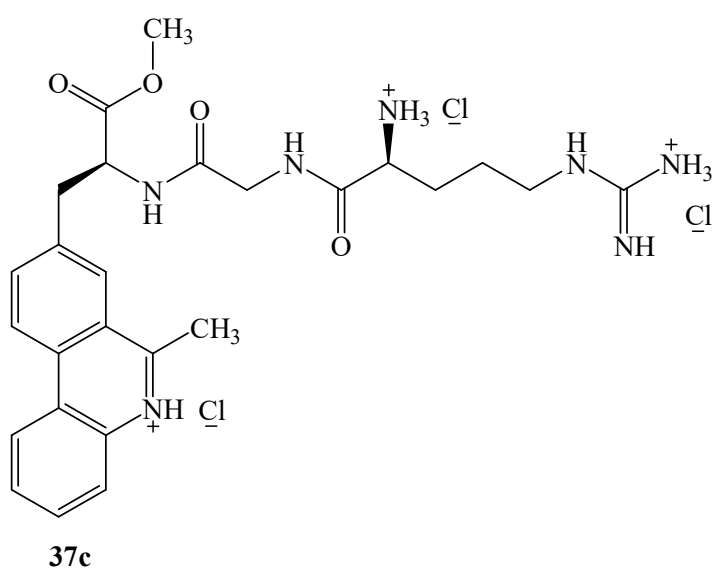


Argininski derivat **36** (68,4 mg, 0,07 mmol) tretiran je prema općoj proceduri za pripremu hidrokloridnih soli te je dobiven spoj **36c** kao žuto ulje (21,6 mg, 55%).

IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3425 (s), 2962 (w), 2924 (m), 2854 (w), 1643 (s), 1626 (s), 1464 (w), 1377 (m), 1354 (m), 1342 (m), 1271 (vw), 1134 (w), 1099 (vw), 1076 (w), 921 (vw), 887 (vw), 856 (vw), 814 (vw), 727 (m), 631 (m), 613 (m); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 9,12–8,93 (m, 2H), 8,67–8,46 (m, 2H), 8,48–8,25 (m, 2H), 8,13 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,06–7,90 (m, 2H), 7,87 (s, 1H), 7,72–6,83 (m, 5H, NH), 4,44 (s, 1H, CH), 3,81–3,60 (m, 4H, OCH_3 , CH), 3,50–3,29 (m,

5H, CH₂-Ala, CH₃), 2,73 (s, 2H, CH₂-Arg), 1,47–0,97 (m, 4H, CH₂-Arg); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 172,71 (s, C_q), 167,61 (s, C_q), 166,91 (s, C_q), 161,23 (s, C_q), 157,08 (s, C_q), 139,11 (s, C_q), 138,45 (d, Phen), 132,23 (s, C_q), 130,88 (d, Phen), 130,53 (d, Phen), 129,55 (d, Phen), 123,86 (s, C_q), 123,82 (d, Phen), 123,78 (s, C_q), 123,53 (d, Phen), 121,14 (d, Phen), 54,99 (CH ili OCH₃), 53,41 (CH ili OCH₃), 40,13 (t, CH₂), 37,96 (t, CH₂), 29,97 (t, CH₂), 23,69 (t, CH₂), 18,49 (q, CH₃); HRMS: *m/z*: 451,2458 [*M*+H]⁺; izračunato C₂₄H₃₀N₆O₃⁺: 451,2458.

3.3.5.2. (*S*)-metil 2-(2-((*S*)-2-amino-5-gvanidinopentanamido)acetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoat trihidroklorid (**37c**)



Argininski derivat **37** (55,7 mg, 0,06 mmol) tretiran je prema općoj proceduri za pripremu hidrokloridnih soli te je dobiven spoj **37c** u obliku žutog ulja (19,2 mg, 52%).

IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3412 (s), 2962 (w), 2856 (w), 1645 (s), 1487 (vw), 1447 (w), 1385 (vw), 1364 (vw), 1227 (w), 1163 (vw), 1122 (vw), 1076 (vw), 1024 (w), 764 (m), 721 (m), 552 (m); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,34 (bs, 2H), 9,16–8,81 (m, 3H), 8,81–8,40 (m, 4H), 8,36–6,91 (m, 7H), 4,82–4,62 (m, 1H), 3,90–3,61 (m, 4H, CH₂, OCH₃), 3,42–3,36 (m, 1H, CH₂), 3,21–3,08 (m, 5H, CH₂, CH₃), 2,94 (s, 2H, CH₂), 1,79–1,46 (m, 4H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 172,46 (s, C_q), 171,57 (s, C_q), 168,91 (s, C_q), 168,87 (s, C_q), 168,50 (s, C_q), 168,33 (s, C_q), 157,24 (s, C_q), 123,79 (s, C_q), 123,55 (d, Phen), 123,30 (d, Phen), 53,26 (d, CH), 52,16 (d, CH), 51,58 (q, OCH₃), 48,57 (q, CH₃), 43,35 (t, CH₂), 21,97 (t, CH₂), 21,78 (t, CH₂); HRMS: *m/z*: 508,2675 [*M*+H]⁺; izračunato C₂₆H₃₃N₇O₄⁺: 508,2672.

3.4. Određivanje antitumorske aktivnosti MTT testom

Utjecaj pripremljenih morfolinskih i bis(2-hidroksietil)aminskih derivata purina na stanične linije solidnih tumora, leukemija, limfoma kao i na staničnu liniju normalnih stanica, provedeno je kolorimetrijskim MTT testom.¹²⁸ MTT metoda određivanja preživljavanja stanica u nazočnosti potencijalno toksičnog agensa temelji se na određivanju aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza živih stanica koje kataliziraju pretvorbu žuto obojenog (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT-a) u ljubičasti talog formazana, čiji su kristali topljivi u dimetilsulfoksidu (DMSO).

Stanice leukemija i limfoma nasadene su u koncentraciji od 1×10^5 stanica/mL, te su potom tretirane novosintetiziranim spojevima u rangu koncentracija 10^{-7} – 10^{-4} mol dm⁻³. Nakon 72 h, u svaku jažicu sa stanicama dodan je MTT, te je slijedila inkubacija tijekom 4 h. Tijekom tog vremena mitohondrijske dehidrogenaze prevode žuti, u vodi topljivi MTT, u ljubičaste kristale formazana koji su netopljivi u vodi. Nastali kristali otapaju se u odgovarajućem detergentu (10 % SDS-a sa 0,01 mol dm⁻³ HCl-om) tijekom noći u inkubatoru, na 37 °C. Nakon toga, izmjerena je apsorbancija na čitaču mikrotitarskih ploča (ELISA Stat Fax 2100, Pharmacia Biotech, Švedska), pri valnoj duljini od 570 nm. Svi pokusi su rađeni u triplikatu i ponovljeni su tri puta.

Za razliku od stanica koje rastu u suspenziji, adherentne stanice su nasadene na ploče u koncentraciji od 2×10^4 stanica/mL. Stanice su inkubirane preko noći, te su potom dodani testirani spojevi u rangu koncentracija 10^{-7} – 10^{-4} mol dm⁻³. Nakon 72 h inkubacije, medij je odliven i u svaku jažicu dodan je MTT te je slijedila inkubacija tijekom 4 h. Nastali kristali formazana su potom otopljeni u DMSO. Apsorbancija je očitana na čitaču mikrotitarskih ploča (ELISA Stat Fax 2100, Pharmacia Biotech, Švedska), pri valnoj duljini od 570 nm. Svi pokusi su rađeni u triplikatu i ponovljeni su tri puta.

Postotak stanične proliferacije pod utjecajem derivata purina u odnosu na kontrolne stanice izračunat je prema izrazu:

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

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 ($0,01 \text{ mol dm}^{-3}$), odnosno s DMSO.

Dobiveni rezultati istraživanja statistički su analizirani Kruskal – Wallis ANOVA testom korištenjem STATISTICA™ (verzija 7.0) računalnog programa.

3.5. Određivanje inhibicijske aktivnosti purinskih derivata na enzim PNP

Određen je utjecaj pripremljenih purinskih derivata na aktivnost enzima PNP. Svi ispitivani spojevi otopljeni su u DMSO-u i pripremljeni su u koncentraciji 10 mM. Neka mjerenja provedena su sa spojevima koji su pripremljeni u koncentraciji 1mM, što je naznačeno napomenom u *Tablici 10*. Testirani enzimi su PNP izoliran iz bakterija *Escherichia coli* (*E. coli* PNP) i *Helicobacter pylori* soj 26695 (*HP* PNP-ref) te PNP izoliran iz kliničkog izolata *Helicobacter pylori* (*HP* PNP-Zg). 7-metil gvanozin ($m^7\text{Guo}$) korišten je kao supstrat u enzimatskoj reakciji. Reakcijska smjesa (1 mL ukupno) sadržavala je: 50 mM HEPES-NaOH pH 7,0 pufer, 50 mM fosfatni pufer pH 7,0, 0,075 nM supstrat i 10 μL testiranog spoja koncentracije 10 mM. Za mjerenja u kojima su korištene 1mM otopine spojeva dodano je 100 μL otopine spoja u 900 μL reakcijske smjese. Konačna koncentracija spoja u reakcijskoj smjesi bila je 0,1 mM.

Enzimsku aktivnost mjerena je spektrofotometrijski praćenjem apsorbancije reakcijske smjese na valnoj duljini $\lambda = 260$ nm u kivetu duljine 1 cm u vremenu od tri minute. Utjecaj samog DMSO-a na enzimsku aktivnost izmjeren je miješanjem 10 i 100 μL DMSO-a s 990 odnosno 900 μL smjese pufera i supstrata. Na taj način dobivena je „slijepa proba“ za DMSO koja sadrži jednak udio DMSO-a kao i ispitivana reakcijska smjesa (1 odnosno 10%). Rezultati su izraženi preko postotka početne aktivnosti (preostale aktivnosti enzima uslijed djelovanja inhibitora; %). Najmanje dva mjerenja su provedena za svaki spoj te je izračunato prosječno djelovanje.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Purini

U uvodnom dijelu opisana je uloga purina u živom svijetu te biomedicinska dostignuća koja ukazuju na potrebu za novim aktivnim supstancama purinskog podrijetla. U našoj grupi istraživani su *N*-sulfonilni derivati nukleobaza. Najprije je pripravljena serija *N*-sulfonil pirimidina koji su pokazali antitumorsku aktivnost u *in vitro* i *in vivo* uvjetima te su zaštićeni europskim patentom¹²⁹, a potom i serija *N*-9-sulfonil gvanina. Gvaninski derivati su pokazali citotoksični učinak na više tumorskih staničnih linija, ali u najvišoj upotrijebljenoj koncentraciji spojeva (1×10^{-4} M). Rezultati ukazuju na mogućnost poboljšanja aktivnosti pomoću novih supstituenata i strukturnih modifikacija.

U okviru ovog rada provedena je:

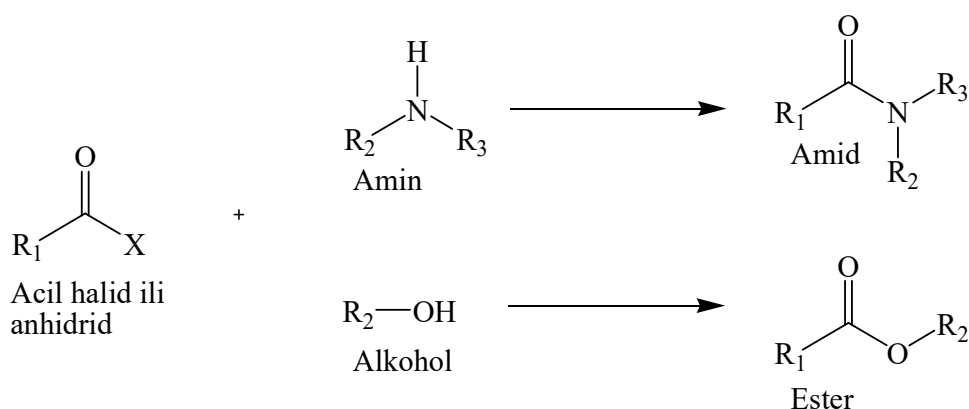
- sinteza 6-klor-*N*-9-sulfonilpurina,
- sinteza 6-morfolino-*N*-9-sulfonilpurina,
- sinteza 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-*N*-9-sulfonilpurina,
- ispitivanje antitumorske aktivnosti pripremljenih spojeva,
- ispitivanje inhibicije enzima purin nukleozid fosforilaza.

4.1.1. 6-klor-purinska serija

U potrazi za novim biološki aktivnim tvarima, sintetizirana je serija 6-klor-purinskih derivata. Poznato je da neki purini koji sadrže klor u C6 položaju pokazuju biološku aktivnost^{47,48}, no klor-derivati zanimljivi su i sa sintetskog gledišta. Kao dobra odlazeća skupina, klor se relativno jednostavno može supstituirati, pa nam je tako dostupan cijeli niz purinskih derivata.³⁴ Zbog toga je, s ciljem pripreme *N*-9-sulfonilpurina, kao polazni spoj odabran 6-klorpurin i ispitane su metode sulfoniranja tosil kloridom. U uvodnom dijelu je naglašeno da kod alkiliranja purina nastaju smjese regioizmera i to najčešće N9 i N7 izomera.³⁴ Stoga je prilikom pronalaženja najpovoljnije metode dobivanja *N*-9-sulfonilpurina posebna pažnja posvećena ispitivanju sirove reakcijske smjese u svrhu identifikacije mogućih N7 izomera.

Najprije je primijenjena naša metoda dobivanja *N*-9-sulfoniladeninskih derivata.⁶⁴ Reakcija sulfoniranja 6-klorpurina (**1**) tosil kloridom u prisutnosti piridina koji je služio kao baza i

otapalo nije dala rezultate i izolirani su samo početni spojevi. Isto se dogodilo kod reakcije sulfoniliranja uz bakrov oksid kao katalizator, kojim je uspješno katalizirana sinteza različitih sulfonamida i sulfonskih estera iz amina, alkohola i fenola.¹³⁰ Nadalje, Brik i suradnici sintetizirali su seriju N9 alkiliranih purina koristeći tetrabutilamonijev fluorid (TBAF) kao bazu.¹³¹ Ovom metodom dobiven je produkt 6-klor-9-tosil-9*H*-purin (**2**), ali u jako lošem iskorištenju od 5%. Iz literature je odavno poznata Schotten–Baumann reakcija pretvorbe acil halida ili anhidrida u amid, ako je drugi reaktant amin, ili u ester, ako je drugi reaktant alkohol (*Shema 22*).¹³² Reakcija se odvija u baznom mediju te u smjesi organskog otapala i vode. Organsko otapalo poboljšava topljivost reaktanata. U reakciji se oslobađa kiselina te je za njenu neutralizaciju potreban suvišak baze. Bez dodane baze, oslobođena kiselina protonirala bi amini reaktant te bi se reakcija zaustavila.



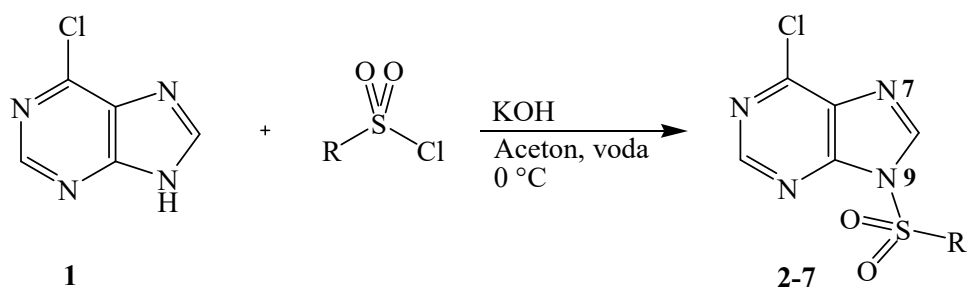
Shema 22. Schotten-Baumann reakcija dobivanja estera i amida.

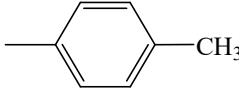
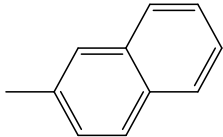
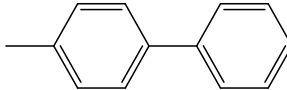
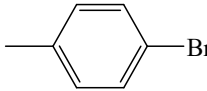
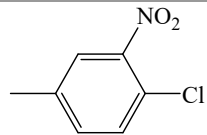
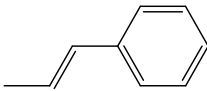
Ta iskustva i uvjete reakcije primjenili su Scozzafava i suradnici za sintezu serije *N*-9-sulfonil-6-tipurina koristeći smjesu acetona i vode te kalijevog hidroksida kao baze.¹²²

U našoj reakciji sulfoniliranja 6-klorpurina (**1**) s tosil kloridom isprobana je metoda s vodenom otopinom KOH u smjesi s acetonom i dobiven je produkt 6-klor-9-tosil-9*H*-purin (**2**) u iskorištenju od 64% kada je reakcija vođena na 0 °C. Osim toga prilikom neutralizacije reakcijske smjese kristalizirao je sirovi produkt. Prema ¹H NMR spektru sirovog produkta vidjelo se da nastaje samo N9 supstituirani izomer.

Ova metoda je izabrana za sintezu serije 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata (*Tablica 1*).

Tablica 1. Priprava 6-klorpurinskih derivata 2-7.



Spoj	R	Iskorištenje ^a
2		64%
3		68%
4		77%
5		50%
6		66%
7		73%

^a Iskorištenja su dana na količine dobivene nakon prekrizalizacije sirovih kristala.

Svi spojevi **2-7** stabilni su u krutom stanju, no tankoslojnom kromatografijom utvrđeno je da stajanjem u otopinama (MeOH, EtOH, DMSO) nakon nekog vremena dolazi do raspada i nestanka produkta (Poglavlje 4.1.1.2.). Budući da su sintetizirani spojevi namijenjeni biološkim ispitivanjima, ključno je da budu stabilni za vrijeme trajanja biološkog eksperimenta. Zato je napravljena NMR studija stabilnosti spojeva. Svi sintetizirani 6-klor-9-sulfonyl-purinski derivati

2-7 pokazali su isti profil ponašanja, tj. raspad u roku 24 sata u otopini. Istovremeno, bili su dovoljno dugo stabilni da im se snime NMR, IR i UV spektri i napravi HRMS analiza.

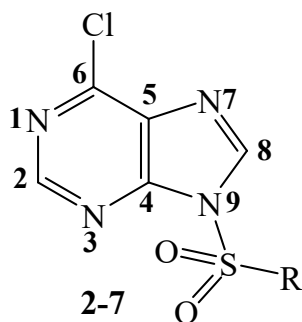
Zbog toga je odlučeno supstituirati klor u C6 položaju purina nekom drugom funkcionalnom skupinom; morfolinom i bis(2-hidroksietil)aminskom skupinom te ispitati stabilnost 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata u uvjetima reakcija supstitucije.

4.1.1.1. NMR analiza 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata

Asignacija signala protona i ugljikovih atoma 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata 2-7 provedena je uz pomoć standardnih ^1H i ^{13}C (APT) tehnika i 2D NMR (COSY, NOESY, HMQC, HMBC) tehnika. Sva mjerenja izvedena su u DMSO- d_6 .

Purinska baza sadrži dva vodikova atoma koji se u ^1H NMR spektrima pojavljuju kao singleti u aromatskom području s karakterističnim kemijskim pomakom oko δ 9,1 (H8) i δ 8,9 (H2) ppm (Tablica 2).

Tablica 2. ^1H NMR pomaci vodikovih atoma purinske jezgre kod 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata 2-7.



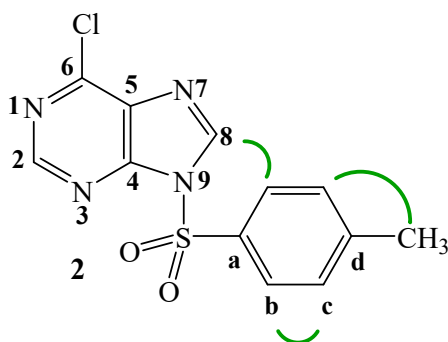
SPOJ	δ H2/ppm	δ H8/ppm
2	8,90	9,12
3	8,89	9,22
4	8,94	9,19
5	8,91	9,14
6	8,93	9,13
7	8,92	9,02

Isto tako signali ugljikovih atoma purinske jezgre pokazuju karakteristične kemijske pomake gdje se u najnižem polju kod $\delta \sim 153$ ppm pojavljuje signal C2 atoma zatim slijede signali C4 i C6 atoma ($\delta \sim 150$ ppm), C8 atom se pojavljuje kod $\delta \sim 144$ ppm, a u najvišem polju dolazi signal C5 atoma ($\delta \sim 132$ ppm; *Tablica 3*).

Tablica 3. ^{13}C NMR pomaci ugljikovih atoma 6-klorpurinskih derivata.

SPOJ	δ C2/ppm	δ C8/ppm	δ C4 i C6/ppm	δ C5/ppm
2	153,33	144,31	150,40 i 150,05	131,63
3	153,34	144,39	150,38 i 150,18	131,68
4	153,52	144,53	150,50 i 150,24	131,80
5	153,49	144,41	150,46 i 150,25	131,84
6	153,52	144,42	150,46 i 150,33	131,90
7	153,33	144,56	150,39 i 150,22	131,73

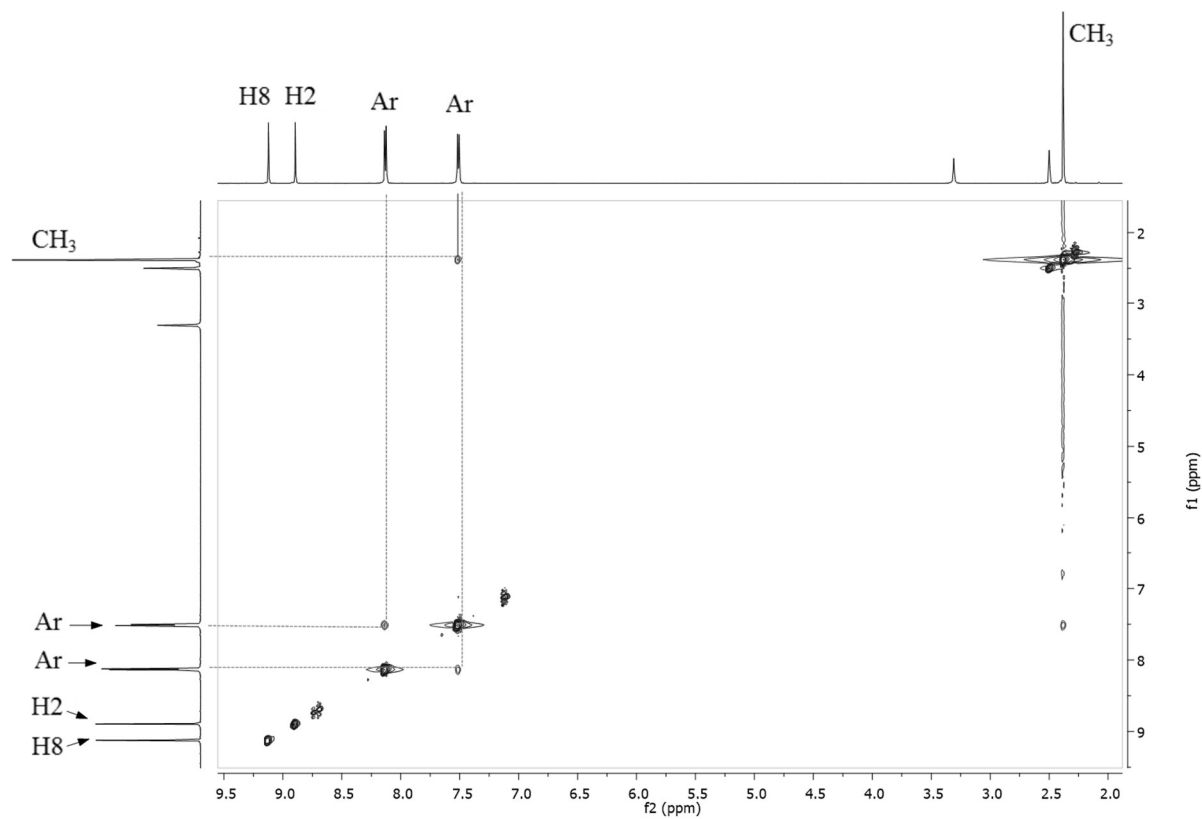
Uz pomoć 2D NMR spektara moguće je odrediti i konformacije spojeva u otopini. Tako je u slučaju 6-klor-9-tosil-9*H*-purina (**2**) zaključeno da se spoj nalazi u *anti*-konformaciji (*Slika 21*).



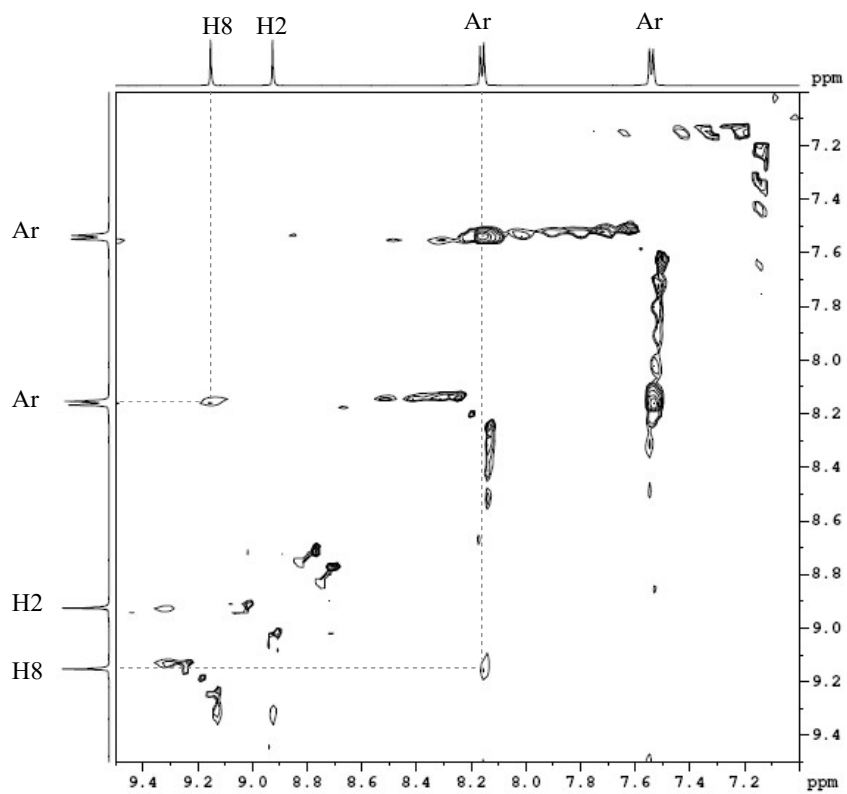
Slika 21. NOE efekti vidljivi u sprezanjima 6-klor-9-tosil-9*H*-purina (**2**).

U dvodimenzijском NOESY spektru tosilnog derivata **2** vidljiva su međusobna sprezanja aromatskih protona na δ 8,13 ppm (Ar-b) i δ 7,51 ppm (Ar-c). Također je vidljivo sprezanje aromatskih protona na δ 7,51 ppm (Ar-c) s protonima metilne skupine na δ 2,38 ppm, što dokazuje da se upravo ti aromatski protoni (Ar-c) nalaze u susjedstvu CH_3 skupine (*Slika 22*). U NOESY spektru vidljivo je i slabo sprezanje H8 protona s aromatskim protonima Ar-b (*Slika 23*) što govori u prilog *anti*-konformacije spoja **2** u DMSO otopini. Asignacija purinskih

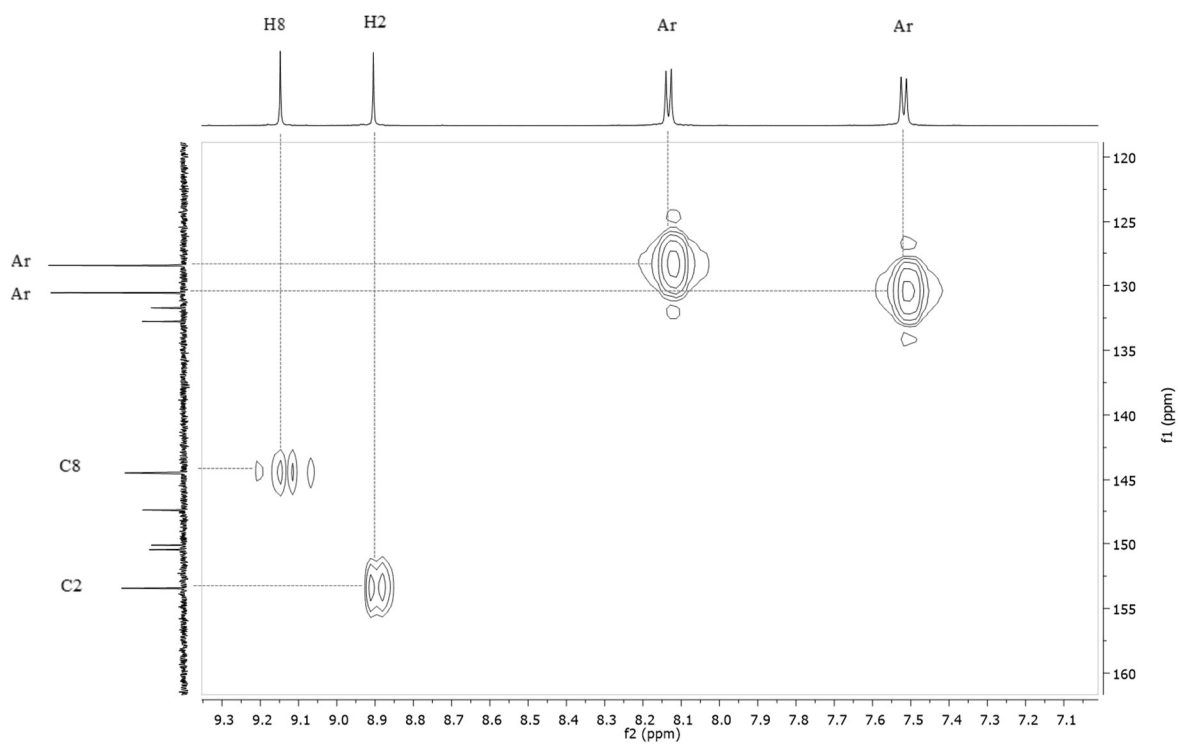
protona potvrđena je preko spreznjanja u HMQC spektru (Slika 24). U HMQC spektru dovode se u uzajamnu vezu kemijski pomaci spregnutih jezgara različitih vrsta i to ^1H i ^{13}C jezgara, ali kroz jednu vezu, što znači da je proton vezan na ugljikov atom s kojim pokazuje spregu.



Slika 22. NOESY spektar spoja 2.



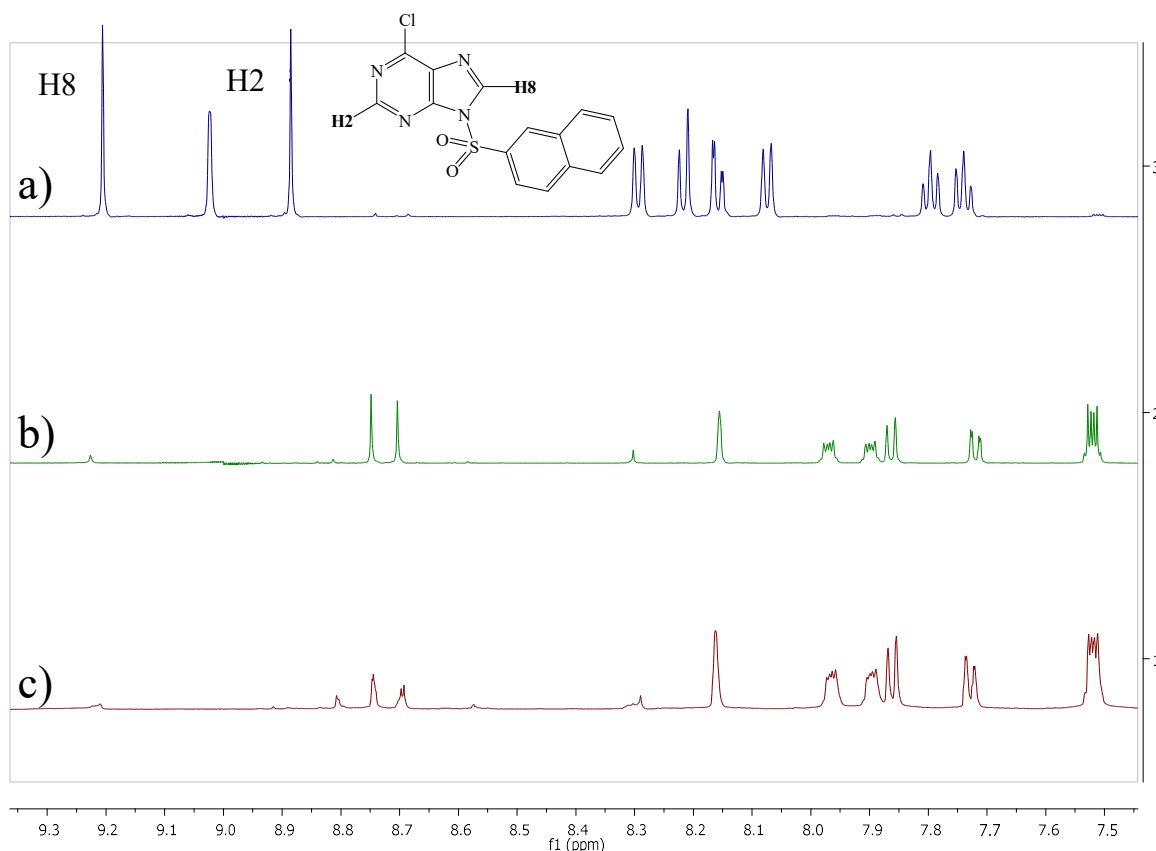
Slika 23. Dio uvećanog NOESY spektra spoja 2.



Slika 24. Dio HMQC spektra spoja 2.

4.1.1.2. Stabilnost 6-klor-purinskih derivata

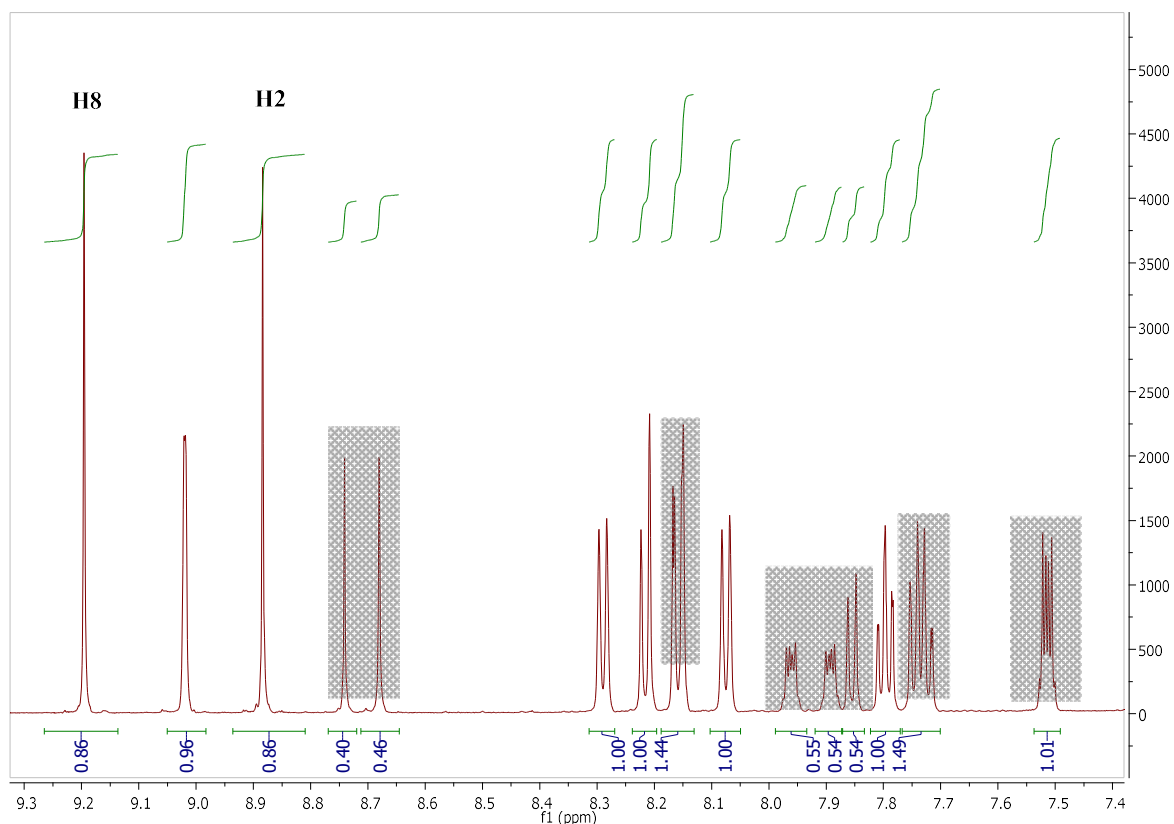
Kako bi se odredila stabilnost 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata **2-7**, napravljena je NMR studija. Kao modelni spoj poslužio je naftalenski derivat **3**. Ista otopina ispitivanog spoja snimljena je tri dana za redom (*Slika 25*). Spoj **3** je otopljen u DMSO-u i u snimljenom NMR spektru vide se svi očekivani protoni (*Slika 25a*), dok nakon 24 sata u otopini više nisu vidljivi signali spoja **3** (*Slika 25b*) što znači da je došlo do njegovog potpunog raspada. Tankoslojnom kromatografijom utvrđeno je da se spoj **3** raspada vrlo brzo i u drugim otapalima (npr. metanol). Međutim, pokazalo se da je spoj stabilan u krutom stanju na sobnoj temperaturi (više od godinu dana).



Slika 25. ¹H NMR spektri spoja **3** u DMSO-u: a) svježa otopina; b) otopina stara 24 sata; c) otopina stara 48 sati.

Kako bi se preciznije utvrdila stabilnost spoja **3**, snimljen je i ¹H NMR spektar otopine **3** stare šest sati (*Slika 26*). Nakon šest sati spoj **3** još uvijek je prisutan u otopini, ali se vide i signali

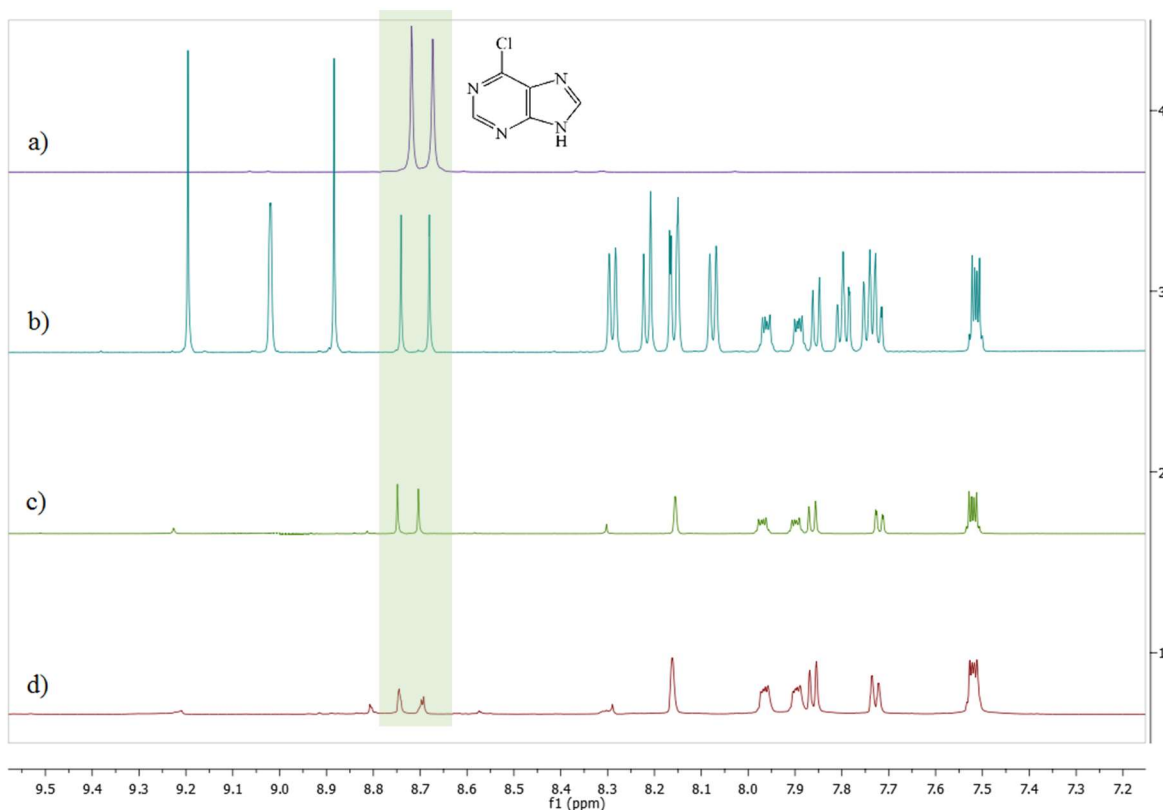
neke druge specije. Prema integralima površine signala vidi se da su spoj **3** i druga specija u otopini prisutni u omjeru 2:1.



Slika 26. ¹H NMR spektar otopine **3** stare šest sati; sivom bojom označeni su signali koji pripadaju produktu raspada spoja **3**.

U protonskom NMR spektru raspadnutog spoja **3** javlja se i široki singlet u vrlo niskom magnetskom polju (oko δ 13 ppm) koji odgovara kemijskom pomaku signala N9 protona purinske baze. Zbog toga je zaključeno da prilikom raspada najvjerojatnije dolazi do pucanja N-SO₂ veze. Međutim, kemijski pomaci produkta raspada ne odgovaraju pomaku signala 6-klorpurina (Slika 27) što znači da najvjerojatnije dolazi i do hidrolize klorova atoma.

Svi sintetizirani derivati 6-klorpurina **2-7** pokazali su isti profil ponašanja, tj. raspad kroz 24 sata u otopini, što je dokazano ¹H NMR spektrima. Mehanizam raspada 6-klorpurinskih derivata nije detaljno istražen jer je cilj ovog istraživanja priprava biološki aktivnih spojeva.



Slika 27. ^1H NMR spektri u DMSO: a) 6-klorpurin; b) spoj **3** nakon 6 sati u otopini; c) spoj **3** nakon 24 sata u otopini; d) spoj **3** nakon 48 sati u otopini.

4.1.2. 6-morfolino-purinska serija

Morfolinski prsten sastavni je dio brojnih biološki aktivnih spojeva.¹³³ Nalazi se u brojnim fungicidima, ali i u lijekovima, kao što je antibiotik linezolid (Zyvox®), antitumorski lijek gefitinib (Iressa®) i analgetik dekstromoramid (Palfium®). Zbog aminskog dijela, morfolin je baza, no kisik iz eterskog dijela odvlači elektrone od dušikovog atoma i tako smanjuje bazičnost i nukleofilnost morfolina.

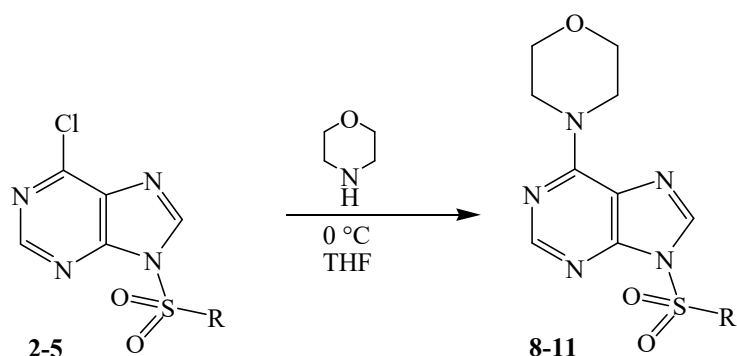
Supstitucija klora kod 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata pokušana je na nekoliko načina. Huang i suradnici objavili su 2007. sintezu serije purina s različitim supstituentima u C6 položaju.¹²³ 6-klorpurin (**1**) i različiti nukleofili (primarni i sekundarni amini, tioli i alkoholi) zagrijavani su pomoću mikrovalnog zračenja. Kao baza je korišten suvišak nukleofila, koji je u nekim slučajevima korišten i kao otapalo. Tako je sintetiziran i 6-morfolinopurin (**16**), zagrijavanjem 6-klorpurina (**1**) na 80 °C uz 10 ekvivalenata morfolina. U ovom slučaju morfolin je korišten kao baza i otapalo, a nakon pet minuta zagrijavanja, taloženjem je izoliran produkt

u 94%-tnom iskorištenju. Zbog odličnog iskorištenja i jednostavne izolacije, opisani uvjeti predstavljaju logičnu početnu točku za pronalaženje uvjeta i provedbu supstitucije kod pripremljenih 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata. Modelni spoj za optimiranje supstitucije bio je 6-klor-9-tosil-9*H*-purin (**2**).

Tosilni derivat **2** zagrijavan je u mikrovalnom reaktoru uz 10 molarnih suvišaka morfolina na 80 °C jednu minutu. Međutim, nakon jedne minute zagrijavanja, iz reakcijske smjese istaložio je 6-morfolinopurin (**16**), a tankoslojnom kromatografijom utvrđeno je da je nastala i mala količina produkta **8**. Pored toga što je prije dokazano da su 6-klor-9-sulfonilpurinski derivati nestabilni u polarnim i protičnim otapalima (Poglavlje 4.1.1.2.), vidjelo se da povišenje temperature uz prisutnost baze dovodi do brzog pucanja N-SO₂ veze.

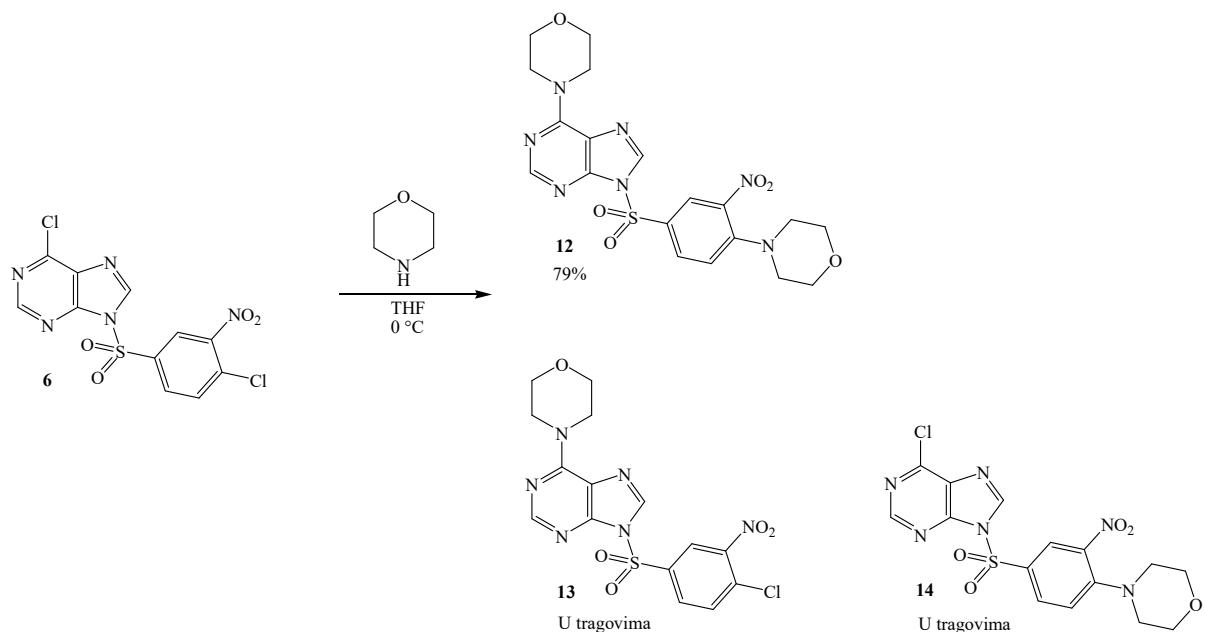
Zbog toga je supstitucija provedena na 0 °C uz diklormetan kao otapalo. Reakcija je bila učinkovitija, ali izolacija produkta **8** zahtjevala je čišćenje kromatografijom. Naposljetku je pronađeno da je tetrahidofuran odlično otapalo za ovu reakciju. Početni spoj **2** i produkt **8** se vrlo dobro otapaju u tetrahidofuranu, a nešto lošije u metanolu. Naprotiv, 6-klorpurin (**1**) i 6-morfolinopurin (**16**) dobro se otapaju u metanolu. Dodatkom metanola u reakcijsku smjesu taloži čisti produkt. Tako je željeni morfolinski derivat **8** izoliran je u dobrom iskorištenju od 61%. Budući da je metoda jednostavna i učinkovita izabrana je za pretvorbu ostalih klor-derivata u morfolinske (*Tablica 4*). U morfolinske derivate uspješno su prevedeni klor-derivati **2**, **3**, **4** i **5** te su sintetizirani dobiveni novi morfolinski derivati **8**, **9**, **10** i **11** u vrlo dobrim iskorištenjima.

Tablica 4. Priprava 6-morfolinopurinskih derivata **8-11**.



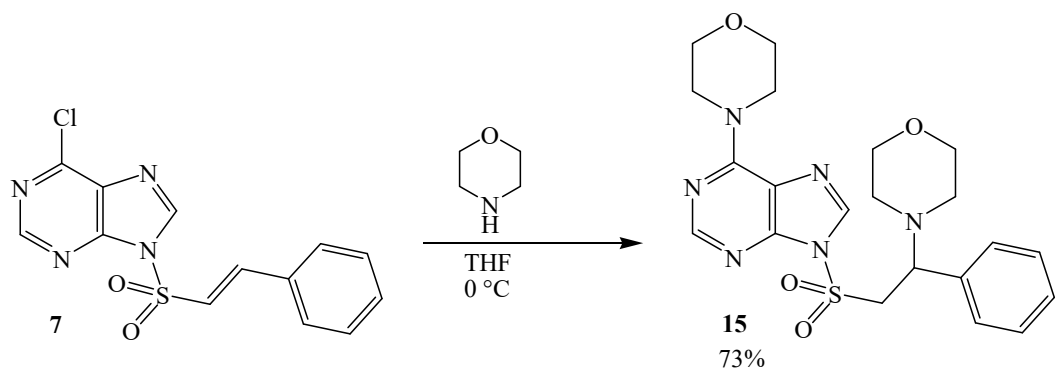
6-klor derivat	6-morfolino-derivat	R	Iskorištenje
2	8		61%
3	9		61%
4	10		63%
5	11		93%

Kod klor-derivata **6** i **7**, situacija je nešto kompliciranija. Kod derivata **6**, osim supstitucije klorova atoma u položaju C6 došlo je i do supstitucije klorova atoma na aromatskom prstenu sulfonilnog supstituenta, pa je kao glavni produkt reakcije izoliran dimorfolinski derivat **12** u iskorištenju od 79%. Izolirane su i male količine monosupstituiranih **13** i **14** (*Shema 23*). Kod derivata **5**, koji u N9 položaju ima *p*-bromfenil-sulfonilni supstituent, nije detekirano nastajanje disupstituiranog morfolinskog derivata. Izoliran je monosupstituirani produkt **11** u iskorištenju od 93%.



Shema 23. Sinteza dimorfolinskog derivata **12** iz klor derivata **6**.

Kod derivata **7** došlo je do supstitucije klora na purinu i adicije morfolina na dvostruku vezu stirensulfonilnog supstituenta, pa je kao jedini produkt izoliran dimorfolinski derivat **15** u iskorištenju od 73% (Shema 24).

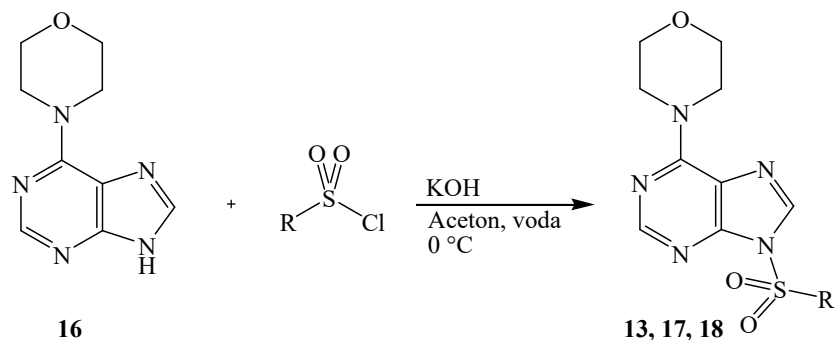


Shema 24. Sinteza dimorfolinskog derivata **15** iz klor derivata **7**.

Kako supstitucija klora u 6-klor-purinskim derivatima **6** i **7** nije tekla željenim tokom, pokušao je alternativni pristup. Sintetiziran je 6-morfolinopurin (**16**) prema poznatom propisu¹²³, te su, primjenom metode za sintezu spojeva **2-7**, pripremljeni i morfolinski derivati **13** i **17** u vrlo dobrim iskorištenjima (Tablica 5). Istom metodom pripremljen je i mesilni derivat **18**. Ranije je

pokušana priprava **18** iz 6-klor-9-(metilsulfonyl)-9*H*-purina, no zbog nestabilnosti tog klor derivata, sinteza nije bila uspješna.

Tablica 5. Priprava 6-morfolinopurinskih derivata **13**, **17** i **18**.



Spoj	R	Iskorištenje
13		68%
17		58%
18	—CH ₃	42%

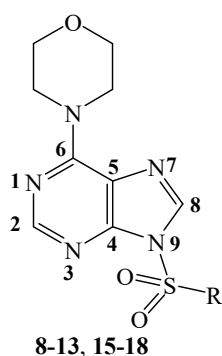
Stabilnost morfolinskih derivata također je ispitana NMR studijom. Otopine spojeva praćene su kroz 72 sata u DMSO otopini na sobnoj temperaturi. Pokazalo se da se spektri spojeva ne mijenjaju u navedenom vremenu što znači da su spojevi pogodni za ispitivanja biološke aktivnosti.

Iznimka je dimorfolinski derivat **15** za kojeg se ispostavilo da nije stabilan poput ostalih spojeva iz serije. NMR studijom dokazano je da **15** ostaje nepromijenjen u DMSO otopini tijekom šest sati na sobnoj temperaturi. Međutim, nakon 24 sata dolazi do pucanja N-SO₂ veze. Zanimljivo je da zagrijavanjem **15** preko noći u smjesi 6% DMSO u vodi ne dolazi do pucanja N-SO₂ veze već do eliminacije jedne molekule morfolina, pa je tako izoliran spoj **17**. Spoj **17** pokazao se stabilnim u otopini DMSO kroz 72 sata na sobnoj temperaturi.

4.1.2.1. NMR analiza 6-morfolino-9-sulfonilpurinskih derivata

Signali morfolinskih derivata purina također pokazuju karakteristične kemijske pomake koji su pomaknuti u nešto više magnetsko polje u usporedbi s klor-derivatima. Signali purinskih H2 i H8 protona međusobno se razlikuju jako malo unutar serije (do 0,11 ppm; *Tablica 6*). Iznimka su protoni H8 dimorfolinskog derivata **15** i H8 spojeva **17** i **18** koji su pomaknuti u nešto više magnetsko polje (za 0,1 do 0,3 ppm).

Tablica 6. ^1H NMR pomaci vodikovih atoma 6-morfolinopurinskih derivata.



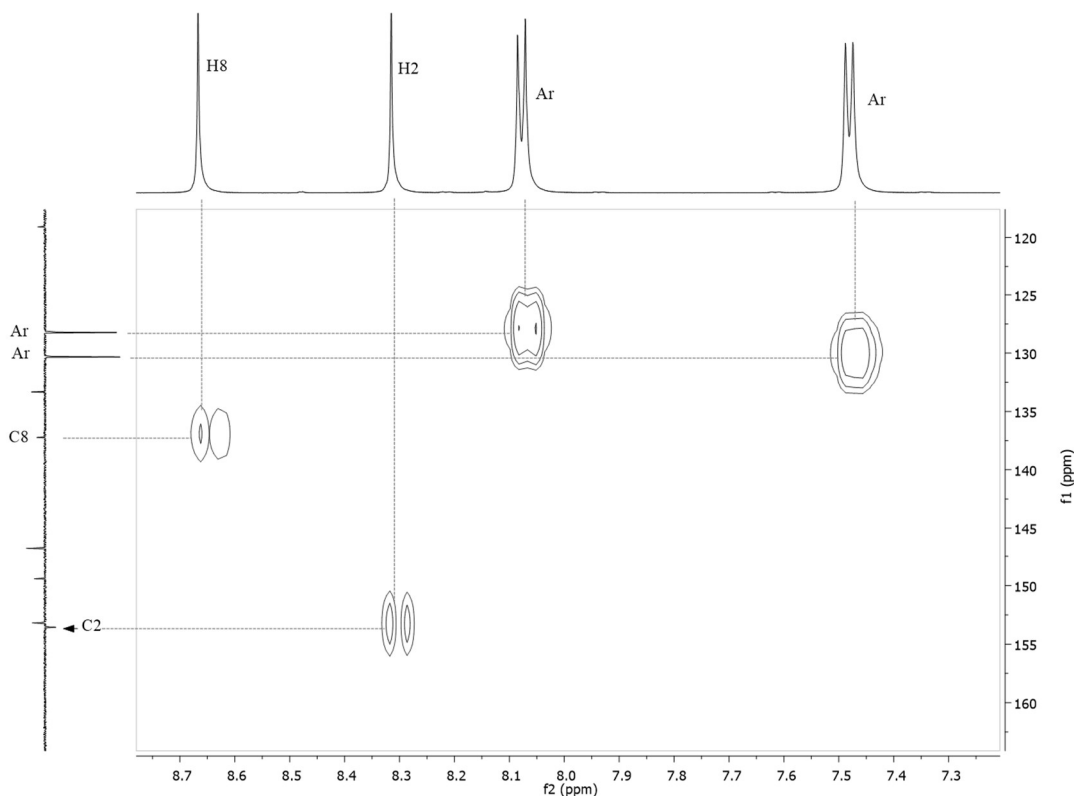
SPOJ	δ H2/ppm	δ H8/ppm
8	8,32	8,66
9	8,30	8,74
10	8,35	8,71
11	8,32	8,67
12	8,34	8,63
13	8,34	8,68
15	8,39	8,43
17	8,34	8,56
18	8,41	8,47

Kemijski pomaci ugljikovih atoma purinske jezgre također su vrlo slični unutar morfolinske serije spojeva (*Tablica 7*). Pomaci atoma C2 te kvarternih C4 i C6 morfolinske serije spojeva vrlo su slični pomacima odgovarajućih ugljikovih atoma klor-serije. Signali atoma C8 i C5 pomaknuti su u nešto više magnetsko polje u usporedbi s klor-derivatima.

Tablica 7. ^{13}C NMR pomaci ugljikovih atoma 6-klorpurinskih derivata.

SPOJ	δ C2/ppm	δ C8/ppm	δ C4 i C6/ppm	δ C5/ppm
8	153,48	137,15	153,18 i 149,39	119,07
9	153,50	137,24	153,17 i 149,46	119,06
10	153,55	137,19	153,20 i 149,45	119,10
11	153,55	137,05	153,18 i 149,38	119,04
12	153,46	137,13	153,17 i 149,29	119,05
13	153,64	137,07	153,17 i 149,43	119,01
15	153,30	137,33	153,16 i 149,99	119,18
17	153,53	137,23	153,23 i 149,62	119,20
18	153,46	136,84	153,26 i 149,68	119,17

Protoni H2 i H8 asignirani su preko HMQC dvodimenzijskih NMR spektara (Slika 28).

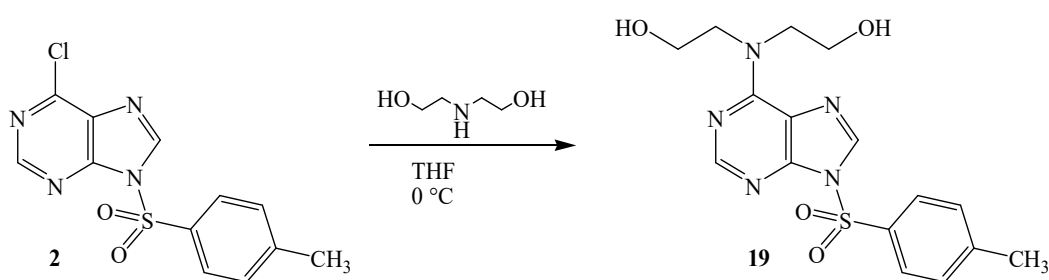


Slika 28. Dio HMQC spektra spoja **8**.

4.1.3. 6-bis(2-hidroksietil)amino-purinska serija

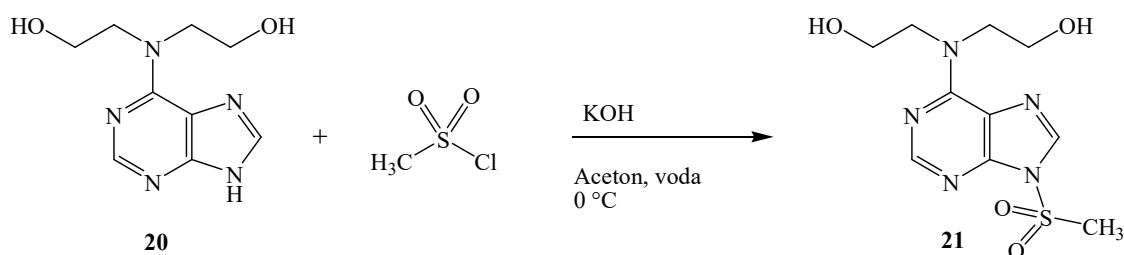
Dietanolamin (DEA) je aciklički analog morfolina. Također je slaba baza. Dehidratacijom dietanolamina u sulfatnoj kiselini može se dobiti morfolin. Sintetizirani su tosilni **19** i mesilni **21** derivat 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-purina (**20**), tj. derivati dietanolamina.

Iskustva s morfolinskim derivatima iskorištena su u sintezi bis(2-hidroksietil)aminskih derivata. Tosilni derivat **19** sintetiziran je iz derivata **2** supstitucijom kloro pomoću dietanolamina (*Shema 25*). Reakcija je vođena na 0 °C, a **19** je izoliran kromatografijom u iskorištenju od 18%.



Shema 25. Priprava 6- bis(2-hidroksietil)amino-derivata **19**.

Zbog spomenute nestabilnosti 6-klor-9-(metilsulfonyl)-9*H*-purina, sintetiziran je 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-purin¹²⁴ (**20**) koji je iskorišten u sintezi mesilnog derivata **21**. Spoj **21** pripremljen je primjenom metode za sintezu kloro derivata **2-7**, u iskorištenju od 24% (*Shema 26*).



Shema 26. Priprava 6- bis(2-hidroksietil)amino-derivata **21**.

Bis(2-hidroksietil)aminski derivati **19** i **21** stabilni su u DMSO otopini kroz 72 sata na sobnoj temperaturi, čime su i ovi spojevi pogodni za ispitivanje biološke aktivnosti.

4.1.4. Biološka ispitivanja purinskih derivata

4.1.4.1. Ispitivanje antitumorske aktivnosti purinskih derivata MTT testom

Ispitana je antiproliferativna aktivnost pripremljenih 6-morfolinskih **8-13** i **15-18** te 6-bis(2-hidroksietil)aminskih derivata purina **19** i **21** te aktivnost mesilnog **XL** i tosilnog **XXXVII** derivata adenina opisanih u uvodnom dijelu. Radi usporedbe i određivanja utjecaja sulfonilnog supstituenta ispitana je i antiproliferativna aktivnost purinskih baza 6-morfolinopurina (**16**), 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-purina (**20**) i adenina (**XIX**). Istraživanja su provedena na pet tumorskih staničnih linija, stanice adenokarcinoma vrata maternice (HeLa), stanice raka debelog crijeva (CaCo-2), Burkittovom limfomu (Raji), limfomu T-stanica (HuT 78), stanicama kronične mijeloidne leukemije u blastičnoj krizi (K-562) i na epitelnim stanicama bubrega psa (MDCK 1). Rezultati ispitivanja prikazani su pomoću vrijednosti IC_{50} koja predstavlja koncentraciju koja uzrokuje inhibiciju rasta stanica za 50% odnosno 50%-tnu smrtnost stanica (*Tablica 8*).

Tablica 8. IC_{50} (μM) vrijednosti uslijed djelovanja purinskih derivata nakon 72h.

Spoj	IC_{50} (μM)					
	HeLa	CaCo-2	MDCK 1	Raji	K-562	HuT 78
8	>100	>100	>100	29,1 \pm 9,2	51,6 \pm 1,5	42,9 \pm 4,9
9	78,3 \pm 1,5	71,1 \pm 6,9	50,0 \pm 1,1	39,9 \pm 2,9	32,5 \pm 1,9	25,4 \pm 11,8
10	84,0 \pm 16,0	50,3 \pm 7,0	>100	19,9 \pm 2,6	27,1 \pm 4,3	27,0 \pm 10,0
11	>100	81,0 \pm 9,4	50,9 \pm 6,9	51,3 \pm 11,6	>100	54,5 \pm 4,4
12	>100	50,3 \pm 4,1	52,0 \pm 2,3	53,3 \pm 4,7	>100	51,0 \pm 9,9
13	58,0 \pm 6,3	70,2 \pm 8,3	74,4 \pm 8,4	50,9 \pm 1,2	46,9 \pm 1,1	83,0 \pm 24,2
17	48,2 \pm 5,4	12,4 \pm 5,3	9,1 \pm 1,2	5,3 \pm 0,2	4,9 \pm 0,2	4,3 \pm 0,1
18	>100	>100	>100	73,9 \pm 20,6	84,2 \pm 14,7	61,2 \pm 14,9
19	100 \pm 4,3	>100	>100	66,5 \pm 18,0	112,9 \pm 27,6	76,2 \pm 18,4
21	>100	>100	>100	>100	>100	84,5 \pm 7,7
XL	>100	>100	>100	86,2 \pm 21,9	>100	>100
XXXVII	>100	>100	>100	72,5 \pm 8,3	75,4 \pm 1,8	73,3 \pm 12,4
16	>100	>100	>100	66,2 \pm 11,7	78,7 \pm 5,9	64,2 \pm 7,5
20	>100	>100	>100	72,7 \pm 26,9	>100	69,9 \pm 17,9
XIX	>100	>100	>100	>100	>100	93,6 \pm 2,4

Najjaču aktivnost pokazao je morfolinski derivat **17** s *trans*- β -stirensulfonil supstituentom u N9 položaju purina, koji snažno zaustavlja proliferaciju Raji, K-562, HuT 78 i CaCo-2 tumorskih stanica, a pokazao je i srednje jako djelovanje na HeLa stanice. Međutim, spoj **17** ima i citotoksičan učinak na MDCK 1 stanice koje predstavljaju jedan od modela za proučavanje djelovanja testiranih spojeva na normalne stanice. Poželjno bi bilo da potencijalni lijek pokazuje što manju toksičnost prema normalnim stanicama i što veću citotoksičnu aktivnost na stanične linije tumorskih stanica.

6-morfolinski derivati s tosilnim, naftilnim i bifenilsulfonilnim supstituentima na N9 položaju purina (**8**, **9** i **10**) pokazali su također zanimljiv biološki odgovor. Sva tri spoja srednje jako inhibiraju rast dviju staničnih linija limfoma, Raji i HuT 78 stanica, a pokazuju znatno slabije ili zanemarivo djelovanje prema HeLa, CaCo-2 i MDCK 1 stanicama. Osobito je zanimljiv spoj **10** jer pokazuje srednje jako antiproliferativno djelovanje na Raji, K-562 i HuT 78 stanice dok uopće ne inhibira rast MDCK 1 stanica.

6-morfolinski derivati **10** i **17** predstavljaju dobre kandidate za daljnje strukturne modifikacije u svrhu dobivanja boljeg antiproliferativnog djelovanja.

6-morfolinski derivati **11**, **12** i **13** sa supstituiranim fenilsulfonilnim supstituentima pokazali su nikakvu ili slabu aktivnost na ispitivanim staničnim linijama. Također i 6-morfolinski derivat **18** i baza 6-morfolinopurin (**16**) te 6-bis(2-hidroksietil)aminski derivati **19** i **21**, 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-purin (**20**), mesilni (**XL**) i tosilni (**XXXVII**) derivati adenina kao i baza adenin (**XIX**) pokazali su zanemarivo ili izrazito slabo djelovanje na ispitivane stanične linije.

4.1.4.2. Ispitivanje inhibicije enzima PNP

Ispitana je sposobnost inhibicije PNP enzima izoliranog iz *Helicobacter pylori*, soj 26695 (*HP* PNP-ref), PNP-a dobivenog iz kliničkog izolata *Helicobacter pylori* (*HP* PNP-Zg) te PNP-a iz bakterije *Escherichia coli* (*E. coli* PNP) (*Tablica 10*). Kao potencijalni inhibitori ispitani su pripremljeni 6-morfolinski **8-13** i **15-18** i 6-bis(2-hidroksietil)aminski derivati purina **19** i **21** te mesilni **XL** i tosilni **XXXVII** derivati adenina opisani u literaturnom pregledu. Radi usporedbe i određivanja utjecaja sulfonilnog supstituenta ispitana je i inhibicijska aktivnost purinskih baza 6-morfolinopurina (**16**) i 6-[*N,N*-bis(2-hidroksietil)amino]-purina (**20**). Rezultati ispitivanja prikazani su u odnosu na početnu aktivnost enzima (% od početne aktivnosti).

Tablica 9. Utjecaj purinskih derivata na aktivnost *HP*-PNP-ref (spojevi su pripremljeni u koncentraciji 10 mM ili 1 mM^a, koncentracija testiranih spojeva u reakcijskoj smjesi je 0,1 mM u svim mjerenjima).

	<i>HP</i> PNP-Zg/ <i>HP</i> PNP-ref	<i>E. coli</i> PNP
Spoj	Preostala aktivnost (%)	Preostala aktivnost (%)
10 µl DMSO	100,0/100,0	100,0
100 µl DMSO	100,0/-	100,0
8	45,3/68,1	38,6^a
9	58,6 ^a /-	56,3 ^a
10	76,0 ^a /-	71,0 ^a
11	- ^b /-	- ^b
12	Taloženje u kivetu	Taloženje u kivetu
13	78,0 ^a /-	89,0 ^a
17	Taloženje u kivetu	Taloženje u kivetu
18	51,8/45,9	-
19	74,3/72,5	-
21	80,76/-	95,10
XL	64,1/52,0	-
XXXVII	32,1/39,3	-
16	71,5/78,6	-
20	110,36/-	93,46

^a Spoj je pripremljen u koncentraciji 1 mM.

^b Odstupanje u rezultatima više mjerenja je preveliko da bi se rezultat uzeo u obzir.

Najbolji rezultati dobiveni su s 6-morfolinskim derivatom **8** i adeninskim **XXXVII** koji su inhibirali aktivnost enzima *HP* PNP-Zg (**8** nešto više od 50%, a **XXXVII** za više od 60%). Spoj **8** inhibira i aktivnost *E. Coli* PNP za oko 60% te nešto slabije inhibira *HP* PNP-ref (oko 30%). Spoj **XXXVII** inhibira *HP* PNP-ref za oko 60%.

Ova dva spoja dobri su kandidati za daljnje strukturne modifikacije koje bi mogle rezultirati novim, moćnijim inhibitorima enzima PNP. Budući da oba spoja sadrže tosilni supstituent u položaju N9, a razlikuju se u C6 funkcionalnoj skupini, upravo bi uvođenje novih supstituenata u položaj C6 bio logičan prvi korak u pripravi budućih inhibitora.

Od ostalih spojeva najbolje djelovanje pokazao je 6-morfolinski derivat **18** s mesilnim supstituentom u N9 položaju purina, koji inhibira aktivnost *HP* PNP-ref za otprilike 50% te nešto slabije inhibira *HP* PNP-Zg.

4.2. Fenantridini

Većina bioloških procesa bazira se na određenom tipu prepoznavanja pri čemu ključnu ulogu igraju nekovalentne interakcije. Za proučavanje tih procesa potrebne su molekulske probe koje specifično reagiraju sa željenim metama.

U razvoju molekularnih probi, peptidni interkalatori imaju važnu ulogu jer kombiniraju jedinstvena svojstva svojih sastavnih dijelova. Interkalatorska jedinica često se koristi kako bi se povećao afinitet male molekule prema biološkim metama.¹¹ Budući da se njen spektroskopski odgovor mijenja uslijed interakcije s drugim molekulama, interkalatorska jedinica može poslužiti i kao fluorescentna reporterska funkcionalna grupa, što je opisano u literaturnom pregledu (Poglavlje 2.3.2.). Peptidni dio omogućava relativno jednostavnu nadogradnju različitim funkcionalnim grupama koje svojim specifičnim interakcijama mogu doprinijeti selektivnosti sintetiziranih spojeva prema različitim sekvencama polinukleotida. I sama peptidna okosnica ima mogućnost stvaranja vodikovih veza i vrlo često specifično reagira s utorima polinukleotida. Duljina peptidnog lanca može utjecati na rigidnost/fleksibilnost molekule. Podešavanjem svih ovih svojstava moguće je u konačnici dobiti male molekule koje selektivno reagiraju s biološkim metama.

Cilj ovog rada je priprava fluorescentnih probi s podesivim svojstvima koje specifično reagiraju s DNA, RNA i proteinima, koje mogu poslužiti kao prekursori u razvoju senzora, ali i potencijalnih lijekova. U tu svrhu sintetizirani su peptidni derivati 6-metilfenantridina koji sadrže:

- glicinsku poveznicu (spojevi **23** i **24**, prekursori za sintezu gvanidinopirolnih i gvanidinskih derivata)

te konačni spojevi koji sadrže:

- gvanidinopirolnu (spojevi **28-32**),
- gvanidinsku (derivati arginina, **36** i **37**),
- pirensku (spojevi **33** i **34**),
- fluorensku jedinicu (spoj **35**).

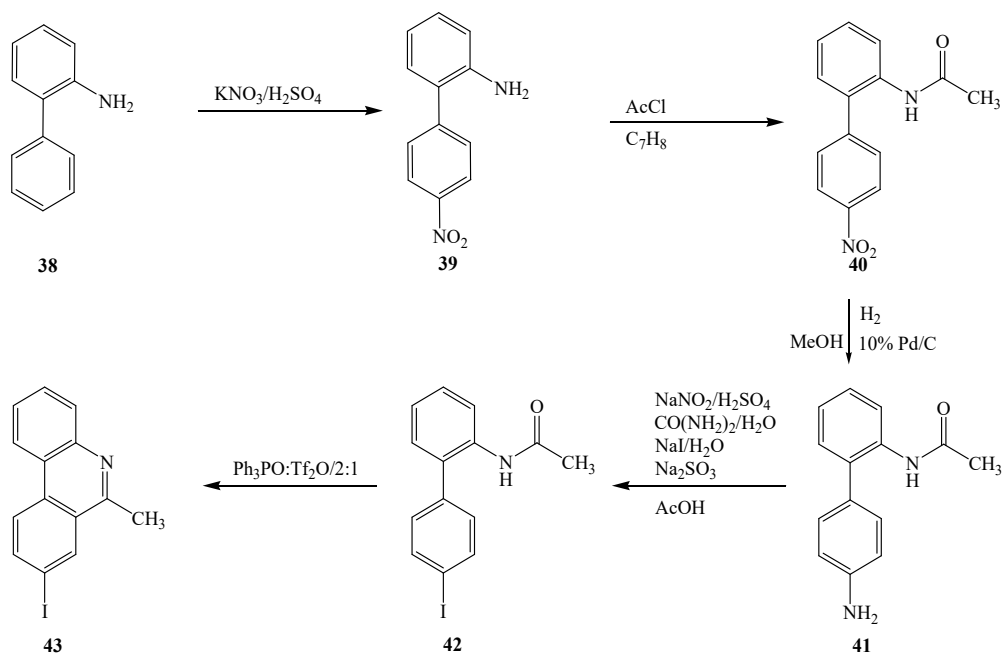
Gvanidinopirolni i argininski derivati prevedeni su u hidrokloridne soli čime se znatno poboljšala njihova topljivost u vodi, ali i povećala mogućnost interakcija amino grupa s biomolekulama. Spektrofotometrijskim metodama (UV/Vis, fluorescencija i CD) ispitane su interakcije odabranih gvanidinopirolnih derivata (**28b** i **29b**) s polinukleotidima.

4.2.1. Sinteza peptidnih fluorescentnih probi za polinukleotide

Svi konačni spojevi sintetizirani su iz početnog spoja (*S*)-metil 2-(*tert*-butoksikarbonil)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanoata (**22**) (alaninski derivat fenantridina) koristeći klasične metode peptidne kemije (sinteza u otopini). Spojevi **25**, **26** i **27** koji sadrže GCP jedinicu sintetizirani su u okviru hrvatsko-njemačke suradnje na sveučilištu Duisburg-Essen te su korišteni kao prekursori u sintezi gvanidinopirolnih derivata fenantridina **28-32**.

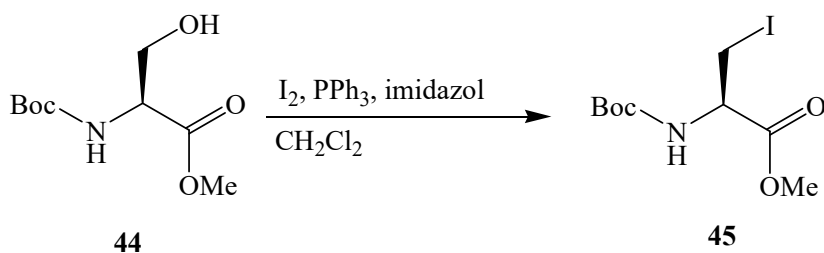
4.2.1.1. Priprava ishodnog aminokiselinskog derivata **22**

Fenantridinski derivat alanina **22** pripravljen je sintetskim postupkom od nekoliko koraka. Sinteza **22** optimizirana je ranije u našoj grupi.¹¹⁰ Prvo je pripravljen 8-jod-6-metilfenantridin **43** (*Shema 27*).



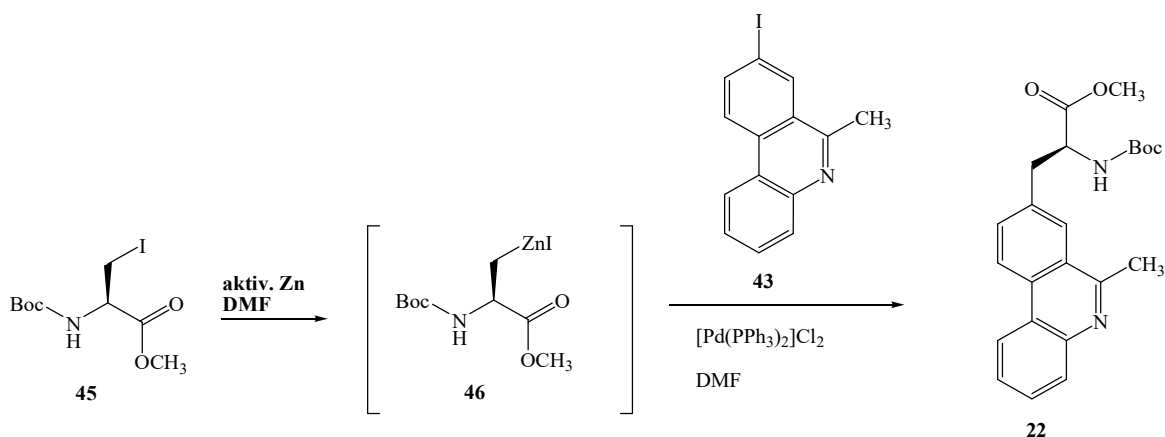
Shema 27. Sinteza 8-jod-6-metilfenantridina **43**.

(*R*)-metil 2-(*tert*-butoksikarbonil)-3-jodopropanoat (serin jodid) **45** pripravljen je prema poznatom propisu (*Shema 28*).¹³⁴



Shema 28. Priprava serin-jodida **45**.

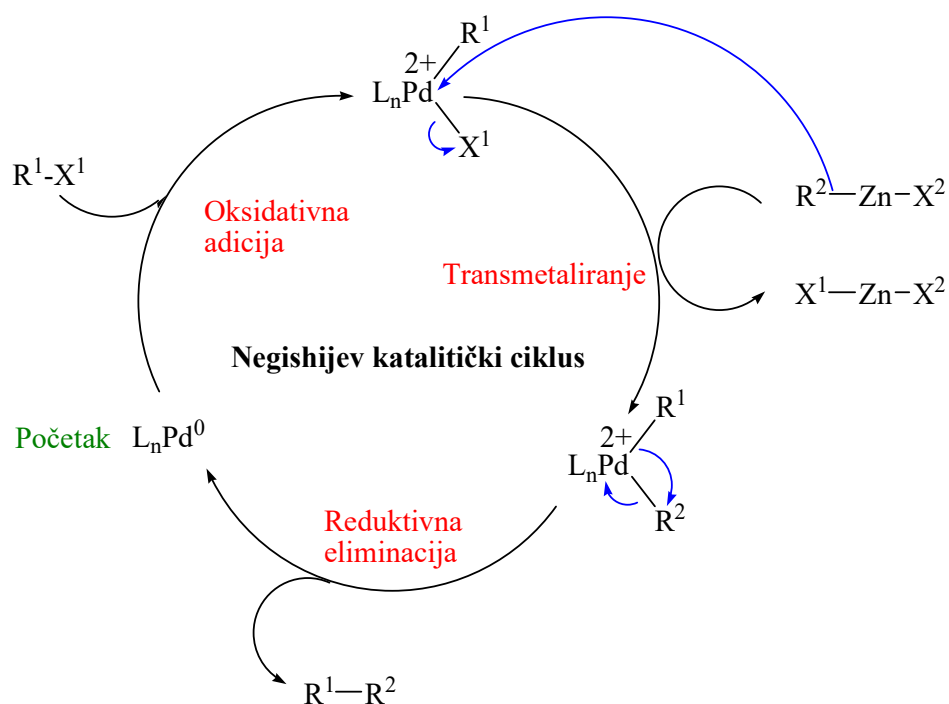
Spoj **22** pripravljen je iz serin jodida **45** i 8-jod-6-metilfenantridina **43** Negishijevom reakcijom (Shema 29).¹³⁵ Organocinkov derivat **46** pripravljen je *in situ* i nije izoliran.



Shema 29. Priprava spoja **22** Negishi “cross-coupling” reakcijom.

Negishi reakcija omogućava nastajanje nove C-C veze reakcijom organohalida s organocinkovim derivatom. Organohalid djeluje kao elektrofil, a reakcija je katalizirana paladijevim ili niklovim kompleksima. Paladijevi kompleksi općenito su se pokazali nešto uspješnijima, no zbog visoke cijene istražuju se drugi metalni kompleksi. Pokazalo se da se reakcija može katalizirati i željezovim, kobaltovim ili bakrovim katalizatorima.¹³⁶

Paladijem kataliziran mehanizam započinje oksidativnom adicijom organohalida na Pd(0) te nastaje Pd(II) kompleks (Shema 30).¹³⁷ Sljedeći korak je transmetaliranje organocinkovim spojem, pri čemu -R^2 s organocinkovog spoja zamjenjuje halid s paladijevog kompleksa te tvori cinkovu (II) sol tog halida. Konačni produkt nastaje reduktivnom eliminacijom, a katalizator se regenerira čime može započeti novi katalitički ciklus.

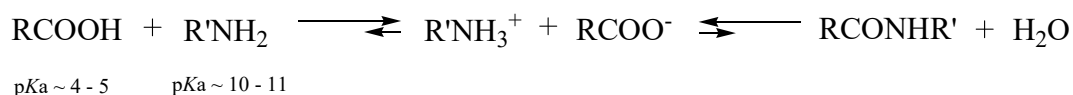


Shema 30. Shematski prikaz Negishijevog katalitičkog ciklusa.

Reakcije nastajanja C-C veze poznate su po niskim iskorištenjima, a u našem slučaju najbolje iskorištenje bilo je 40%. Ključ za uspješnu Negishijevu reakciju je aktivacija cinka za pripravu organocinkovog reagensa i održavanje strogo bezvodnih uvjeta.

4.2.1.2. Priprava peptidnih derivata fenantridina 23-37

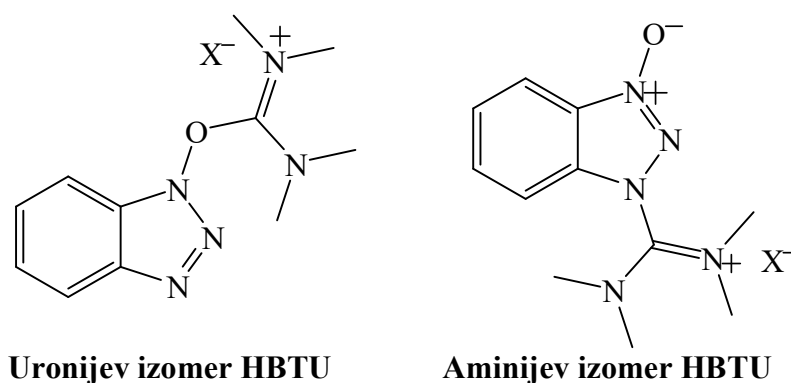
Peptidna veza izrazito je čest motiv u važnim prirodnim i sintetskim molekulama, a nastaje kondenzacijom karboksilne kiseline i amina. Miješanjem te dvije komponente najprije se događa kiselo-bazna reakcija i nastaje stabilna sol (Shema 31). Direktna kondenzacija nastale soli termodinamički je nepovoljna i događa se na 160–180 °C.¹³⁸



Shema 31. Nastajanje peptidne veze bez aktivacije karboksilne skupine.

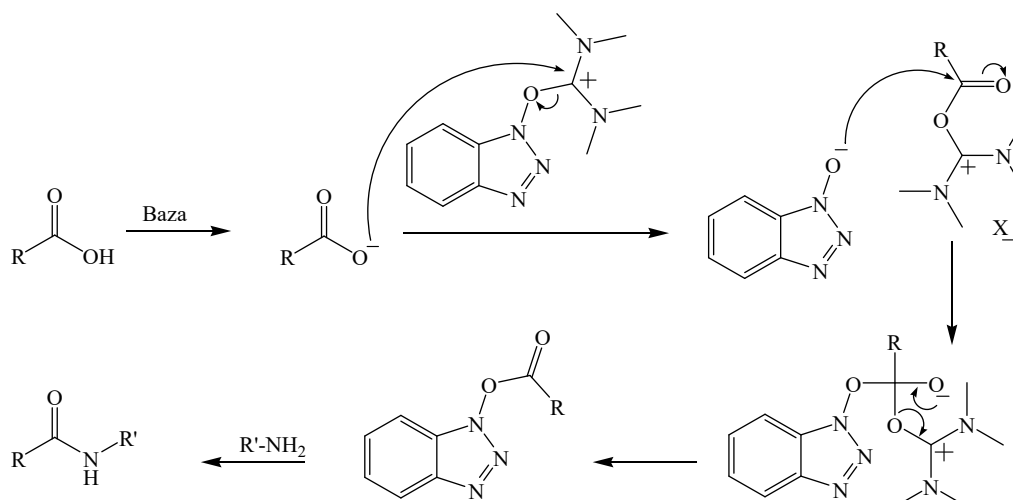
Da bi se omogućio nukleofilni napad amino skupine na karboksilni dio, potrebno je aktivirati karboksilnu skupinu. Aktivacija podrazumijeva supstituciju hidroksilne skupine nekom dobro odlazećom funkcionalnom grupom.

Uronijeve/aminijeve soli pripadaju skupini često korištenih i učinkovitih „coupling“ reagensa na bazi 1*H*-benzotriazola. Definirane su strukture uronijevih i aminijevih izomera (Slika 29), a stvarna struktura može ovisiti o protuionu i uvjetima reakcije.¹³⁹ Najprije je objavljeno da su strukture *O*-izomeri, no Carpino je 2002. godine X-ray kristalografijom dokazao da se radi o *N*-izomerima.¹⁴⁰ U otopini su ta dva oblika u ravnoteži.¹³⁸



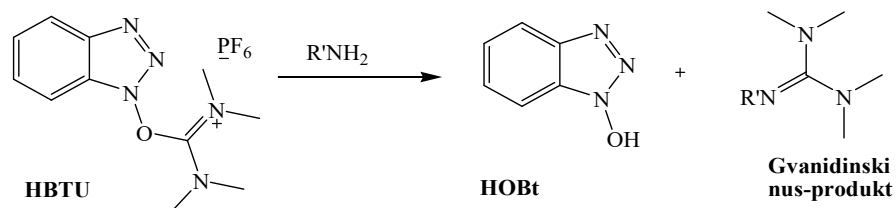
Slika 29. Izomeri HBTU reagensa.

U reakciji stvaranje peptidne veze, najprije reagiraju „coupling“ reagensi s karboksilnom kiselinom stvarajući aktivni ester koji tad reagira s aminom (Shema 32).



Shema 32. Mehanizam aktivacije karboksilne kiseline s HBTU.¹³⁹

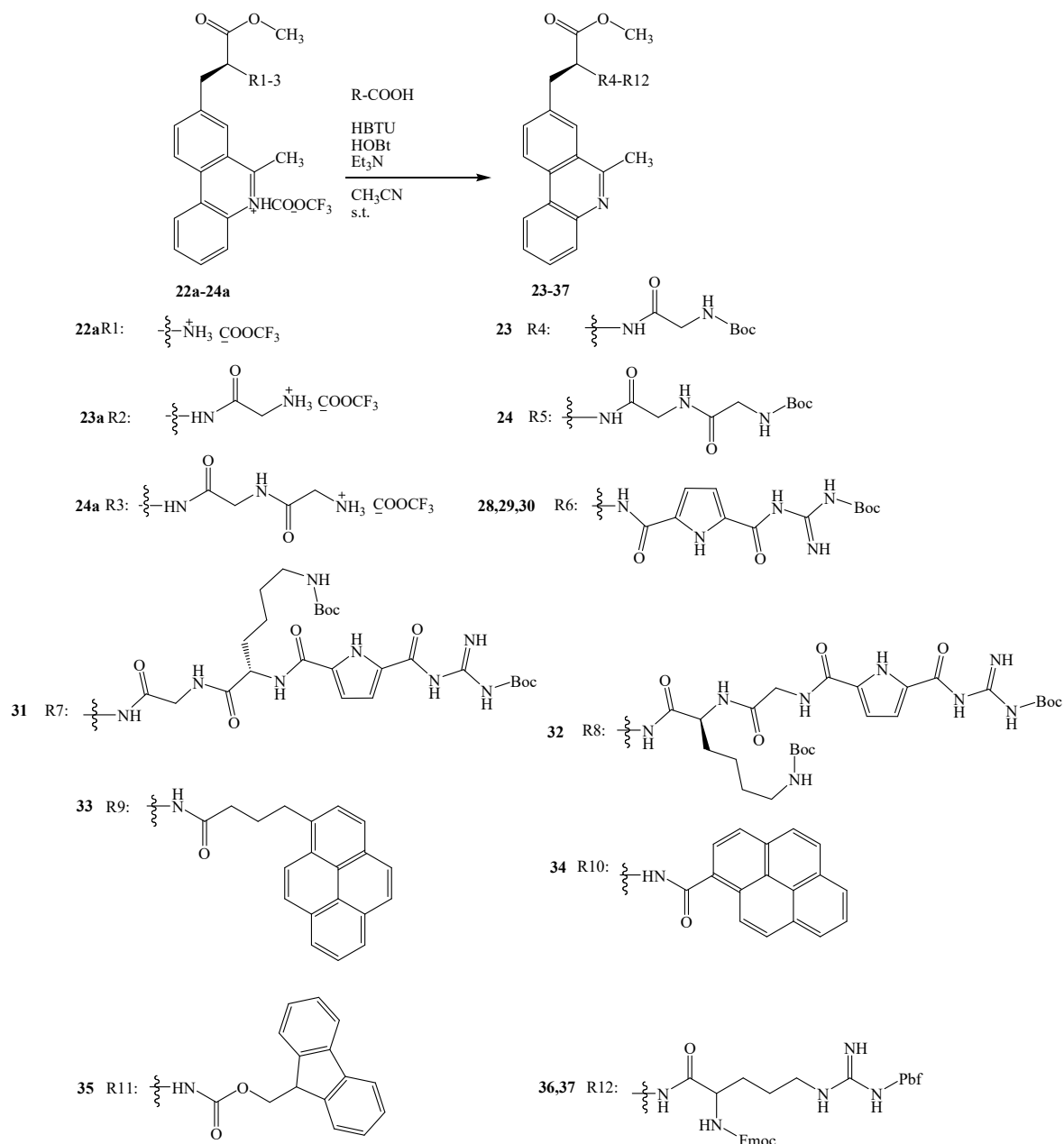
Mogući nusprodukt u reakciji s HBTU je gvanidilirana aminokiselina (*Shema 33*). Dodatkom HOBt-a značajno se sprječava neželjena gvanidilacija, ali i racemizacija.



Shema 33. Nastajanje gvanidiliranog nusprodukta.

4.2.1.2.1. Priprava di-, tri- i tetrapeptidnih derivata fenantridina 23-37

Nakon dobivanja Boc zaštićenog ishodnog spoja **22** pristupilo se daljnjoj funkcionalizaciji. Peptidni lanac građen je od N-terminalnog kraja ishodne aminokiseline **22**. Uklanjanjem Boc zaštitne skupine dobivena je trifluoroctena sol **22a** koja je podvrgnuta reakciji s različitim karboksilnim kiselinama, a na isti način sintetizirani su i derivati s glicinskim poveznicama (**29**, **30** i **37**) (*Shema 34*). Karboksilne kiseline aktivirane su HBTU reagensom, a HOBt je dodan kako bi se potisnula racemizacija. U reakciji je korištena organska baza trietilamin u suvišku te ekvimolarne količine ostalih reagensa. Većina spojeva pripravljena je u vrlo dobrom ili odličnom iskorištenju (56 – 95%). Spoj **35** pripremljen je u nešto slabijem iskorištenju od 15%.



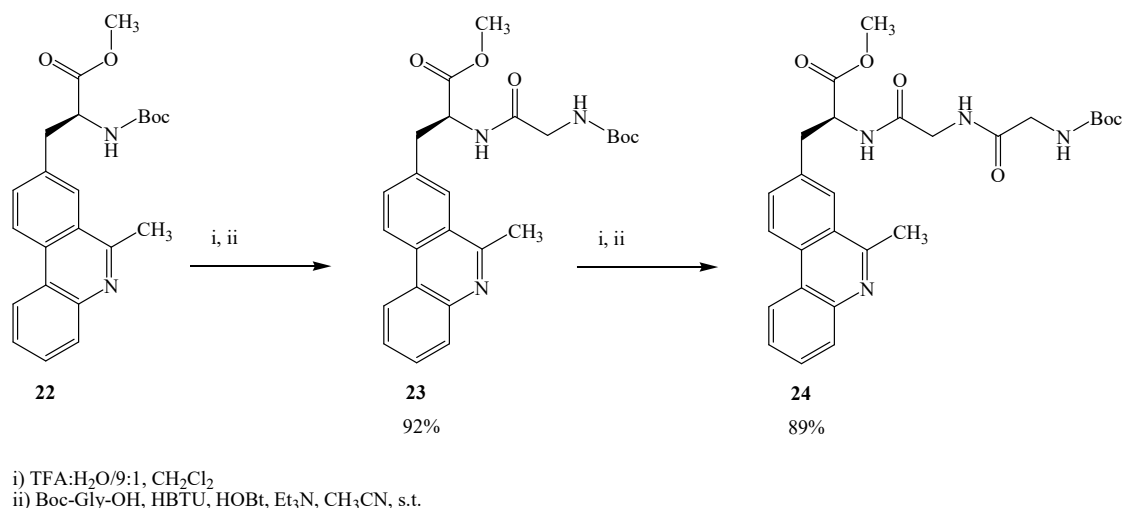
Shema 34. Sinteza peptidnih derivata fenantridina **23-37**.

4.2.1.2.1. Priprava glicinskih derivata fenantridina **23** i **24**

Reakcijski uvjeti optimirani su kod „couplinga“ spoja **22** s glicinom pa su najprije sintetizirani derivati **23** i **24** s glicinskom poveznicom. Reakcijom s glicinom sintetizirani su fenantridinski dipeptid **23** i tripeptid **24** (*Shema 35*), koji su korišteni kao prekursori u dobivanju gvanidinopirolnih (**29** i **30**) i gvanidinskog derivata **37**.

Pokazalo se kako su najbolja iskorištenja dobivena kad je reakcija vođena preko noći, uz 4 molarna suviška trietilamina. U nekim slučajevima dobivena su bolja iskorištenja uz još veći suvišak baze (do 8 puta).

Glicinska jedinica daje određenu fleksibilnost molekuli i može poslužiti kao poveznica preko koje su spojene druge funkcionalne skupine.



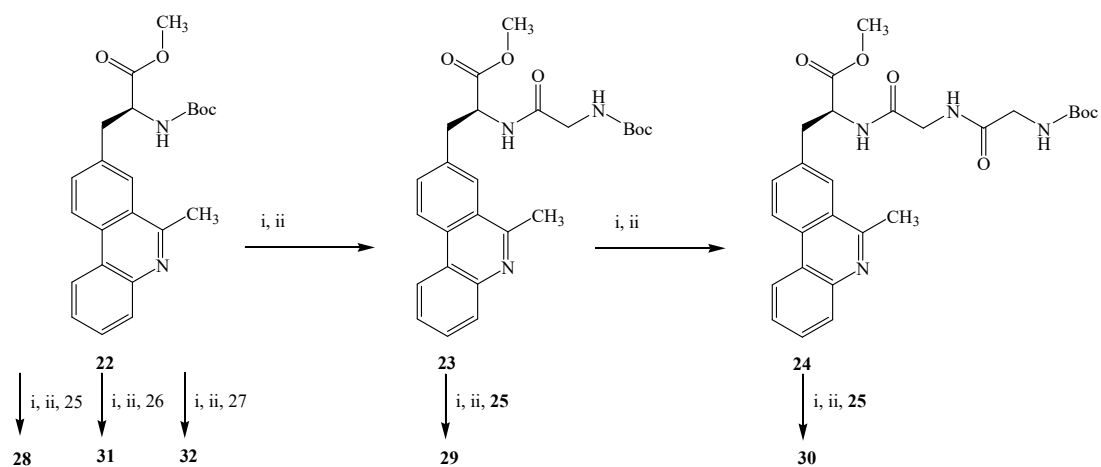
Shema 35. Priprava glicinskih derivata **23** i **24**.

4.2.1.2.2. Priprava gvanidinopirolnih peptidnih derivata fenantridina **28-32**

U literaturnom dijelu opisana je gvanidinopirolna (GCP) jedinica kao dio brojnih učinkovitih sintetskih sustava za prepoznavanje aniona u vodenom mediju. Da bi se dobili spojevi koji selektivno prepoznaju određene polinukleotidne sekvence isplanirana je sinteza serije peptidnih derivata fenantridina koji sadrže gvanidinopirolni strukturni motiv vezan preko različitih poveznica.

Gvanidinopirolni derivati su pripremljeni u dobrim iskorištenjima, s iznimkom spoja **32** (*Tablica 10*). GCP jedinica vezana je na fenantridin direktno (spoj **28**) te preko jedne (spoj **29**) i dvije (spoj **30**) glicinske jedinice. Pripremljeni su i spojevi u kojima je GCP jedinica vezana na fenantridin preko glicina i lizina (**31** i **32**).

Tablica 10. Gvanidinopiroolni derivati 28-32.



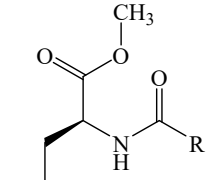
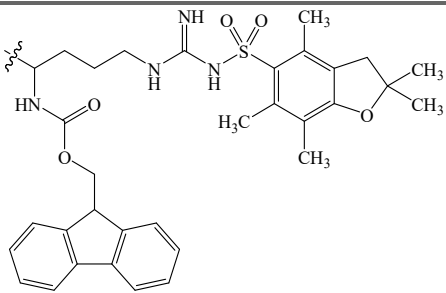
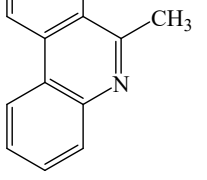
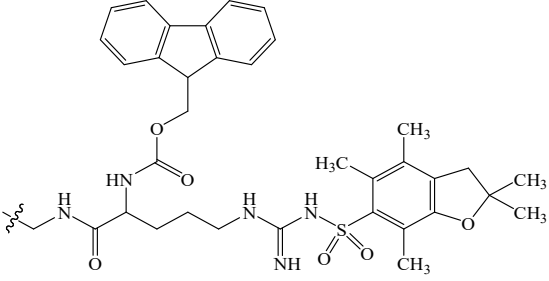
i) TFA:H₂O/9:1, CH₂Cl₂
 ii) HBTU, HOBT, Et₃N, CH₃CN, s.t.

Opća formula	Spoj	R	Iskorištenje
	28		63%
	29		58%
	30		71%
	31		66%
	32		15%

4.2.1.2.3. Priprava argininskih derivata fenantridina 37 i 38

Proveden je i „coupling“ fenantridinske aminokiseline **22** i glicinskog derivata **23** s argininom. Na taj način dobiveni su analozi **37** i **38** spojeva **28** i **29** s gvanidinskom skupinom umjesto gvanidinopiroalne skupine, što onda omogućava ispitivanje utjecaja finih strukturnih razlika na interakcije s DNA i RNA (*Tablica 11*).

Tablica 11. Argininski derivati fenantridina **36** i **37**.

Opća formula	Spoj	R	Iskorištenje
	36		95%
	37		79%

4.2.1.2.4. Priprava peptidnih derivata fenantridina koji sadrže pirensku i fluorensku skupinu

Kako bi ispitali i utjecaj različitih aromatskih supstituenata na interakcije s DNA i RNA pripremljeni su derivati s pirenskom i fluorenilnom jedinicom (*Tablica 12*).

Piren i njegovi derivati spadaju među najranije korištene fluorescentne probe za niz biomolekula, kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline. Njegov visok ekstinkcijski koeficijent omogućava učinkovito praćenje analita u vrlo niskim koncentracijama.¹⁴¹ Također, piren ima karakteristične fluorescencijske emisijske vrpce koje su osjetljive na okolinu u kojoj se nalazi te omogućavaju procjenu polarosti te okoline. Druga zanimljiva i spektroskopski korisna karakteristika pirena je tvorba ekscimera, tj. dimera pobuđenog stanja.¹⁴² Nakon

apsorpcije UV svjetla valne duljine ~ 340 nm piren može ili fluorescirati ili ostvariti interakciju s molekulom pirena u osnovnom stanju, ukoliko se nalazi u blizini (unutar ~ 10Å udaljenosti). Ovaj fenomen uzrokuje pojavu emisijske vrpce na valnoj duljini između 425 nm i 550 nm, a moguć je zbog neuobičajeno dugog vremena života fluorescencije pirena (>100 ns). Pirenski ekscimer omogućava dobivanje detaljnih informacija o unutarnjoj dinamici i strukturi velikog broja biomolekula.

Fluorenska jedinica dio je Fmoc zaštitne skupine, ali i dobro poznati fluorofor koji je sastavni dio mnogih fluorescentnih probi.¹⁴³ Osim probi, fluoren se nalazi u antivirusnim lijekovima i lijekovima protiv malarije. Ima i značajnu ulogu u razvoju nanomaterijala, pa se tako fluoren nalazi u organskim svjetlećim diodama (*engl.* Organic light-emitting diode, OLED), supravodljivim materijalima, holografskom mediju i optoelektroničkim uređajima

Tablica 12. Pirenski i fluorenilni derivati fenantridina 33-35.

Opća formula	Spoj	R	Iskorištenje
	33		56%
	34		84%
	35		68%

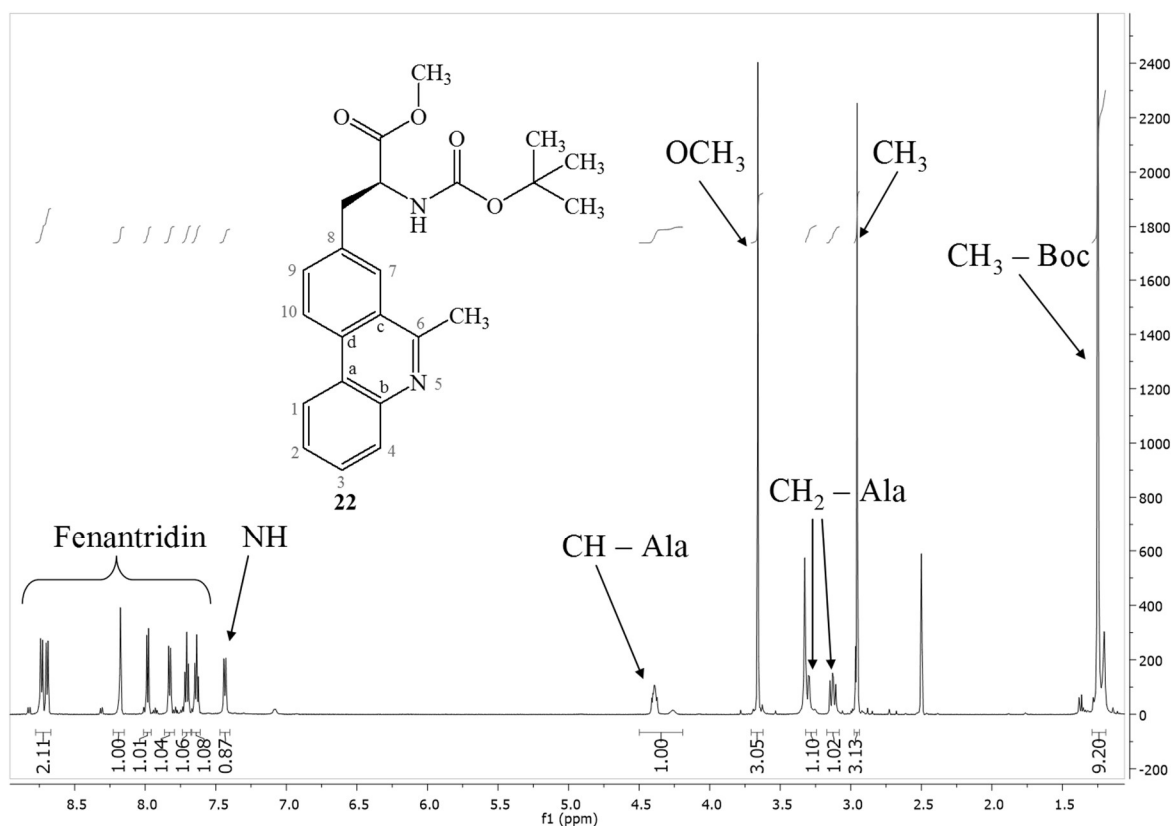
4.2.1.2.5. Priprava hidrokloridnih soli gvanidinopirolnih (28b-32b) i argininskih (36c i 37c) derivata fenantridina

Pripravljenim peptidnim derivatima su prije ispitivanja interakcija s polinukleotidima uklonjene zaštitne skupine sa amino skupina. Slobodne amino skupine mnogo će lakše ostvariti različite nekovalentne interakcije s polinukleotidima.

4.2.2. Analiza spektara ^1H i ^{13}C NMR peptidnih derivata fenantridina na primjeru spoja **22**

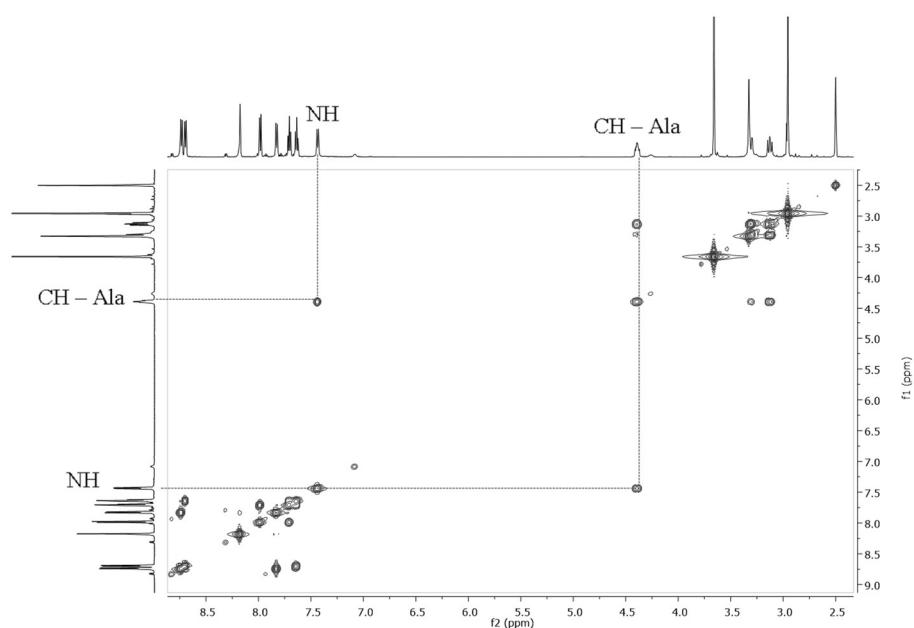
Asignacija signala protona i ugljikovih atoma fenantridinske serije spojeva provedena je pomoću standardnih ^1H i ^{13}C (APT, COMPLETE i DEPT), te 2D; COSY, NOESY i HMQC tehnika. Mjerenja su izvedena u deuteriranom DMSO-u, CDCl_3 i CD_3CN .

^1H NMR spektri alaninskog derivata fenantridina **22** pokazuju karakteristične kemijske pomake signala protona fenantridinskog prstena i alaninskog dijela (Slika 30). Signali sedam aromatskih protona fenantridina nalaze se u području od δ 8,72 do δ 7,64 ppm, a signal metilne skupine vezane na fenantridin pojavljuje se kao singlet na δ 2,96 ppm. Protoni alaninskog dijela molekule pojavljuju se na δ 4,39 do δ 3,13 ppm. Multiplet na δ 4,39 ppm pripada protonu vezanom na asimetrični ugljikov atom, a multipleti na δ 3,30 ppm i na δ 3,13 ppm pripadaju protonima metilenske skupine alaninskog dijela molekule. Na δ 3,66 ppm nalazi se singlet koji odgovara metilnim protonima esterske skupine, a na δ 1,25 ppm singlet karakterističan za metilne protone Boc zaštitne skupine.

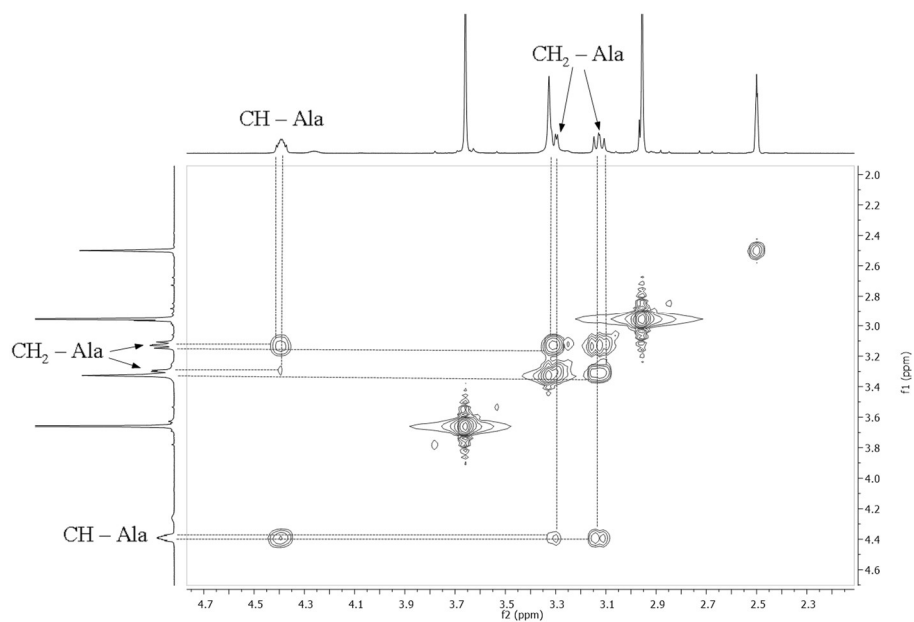


Slika 30. ^1H NMR spektar alaninskog derivata fenantridina **22**.

Signal NH-protona peptidne veze pojavljuje se kao dublet s konstantom sprege $J = 8,3$ Hz na δ 7,44 ppm. NH-proton spreže se sa susjednim protonom koji se nalazi na asimetričnom ugljiku (CH – Ala) što se lijepo vidi u COSY spektru i potvrđuje asignaciju (Slika 31). Osim s NH, CH – Ala spreže se i s protonima na CH₂ – Ala skupini, a protoni na CH₂ – Ala skupini sprežu se međusobno (Slika 32).

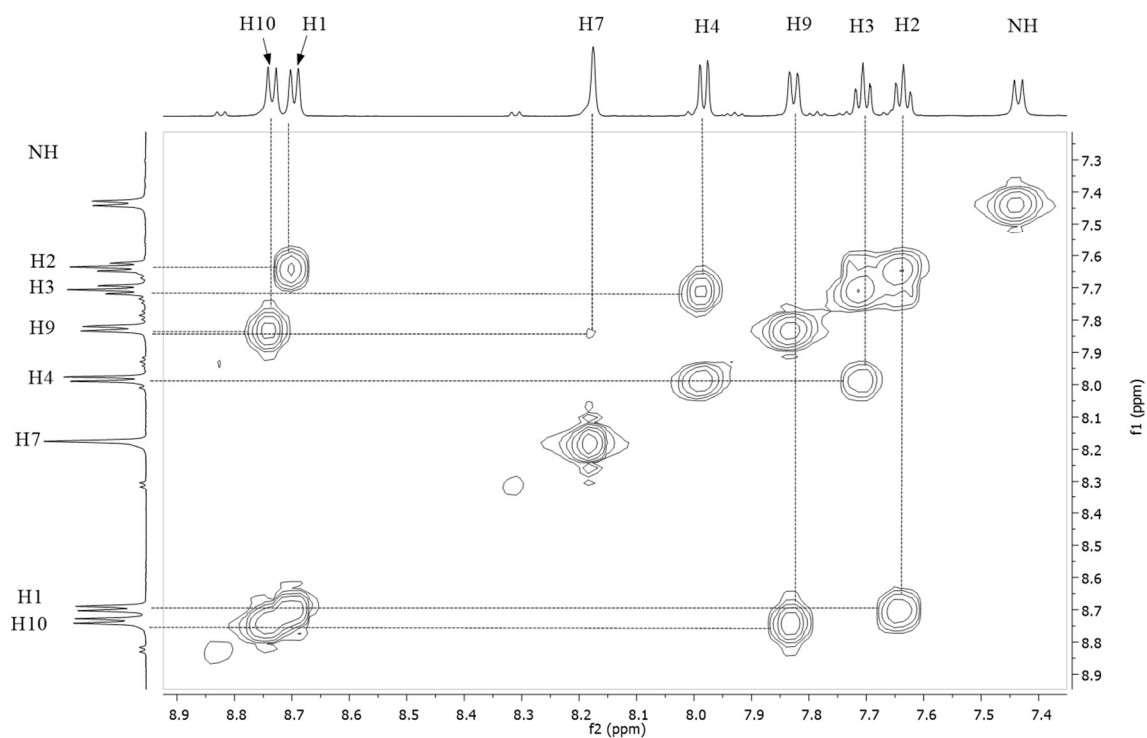


Slika 31. Dio COSY spektra spoja **22**; sprezanje NH i CH – Ala.

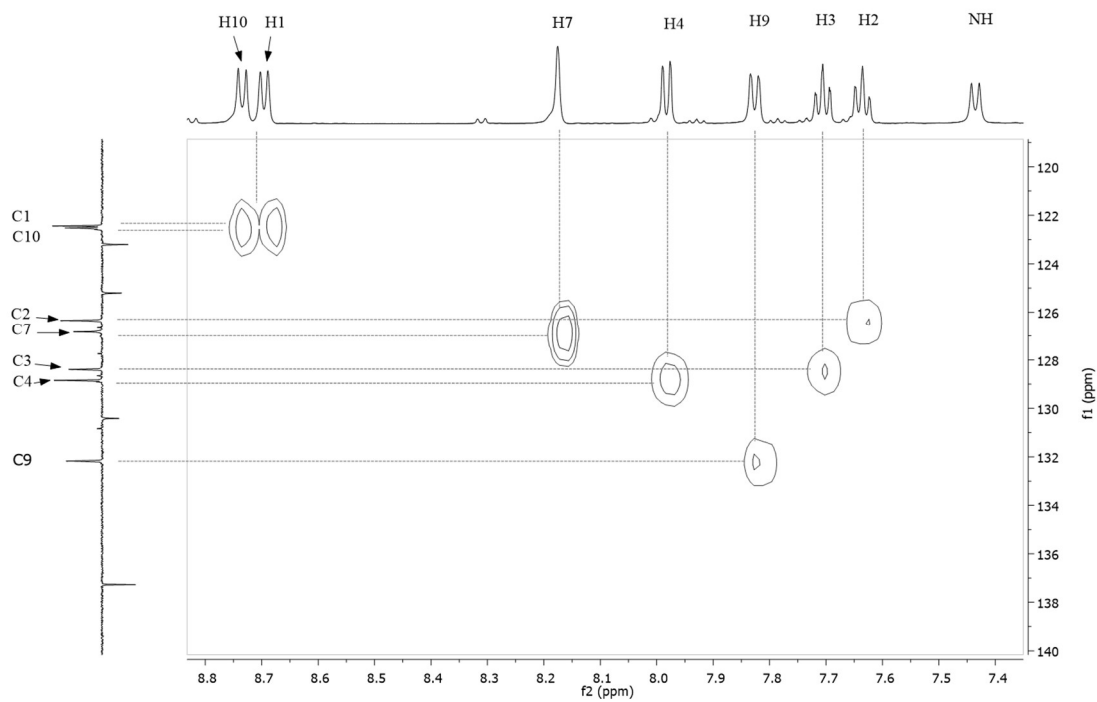


Slika 32. Dio COSY spektra **22**; sprezanje CH₂ – Ala i CH – Ala te spreaga CH₂ – Ala protona.

Pomoću dvodimenzijskih spektara mogu se asignirati i fenantridinski protoni (*Slika 33*). Singlet na δ 8,18 ppm ne pokazuje sprezanje s drugim protonima u COSY spektru te se može zaključiti da on pripada protonu H7 fenantridina. Signali na δ 7,71 i δ 7,64 su tripleti te pripadaju protonima H2 i H3, jer oni imaju po dva susjedna protona i međusobno se sprežu. Dubleti na δ 8,70 i δ 7,98 ppm pripadaju protonima H1 i H4 jer pokazuju spregu s H2 i H3 u COSY spektru. Dubleti na δ 8,73 ppm i δ 7,83 ppm pripadaju protonima H9 i H10. Uočena je i slaba *meta* sprega između H7 i dubleta na δ 7,83 ppm. Na osnovu toga signal na δ 7,83 ppm pripisan je protonu H9, a signal δ 8,73 ppm, prema tomu pripada protonu H10. Pomoću dvodimenzijskih HMQC (*Slika 34*) i HMBC spektara asignirani su i ugljikovi atomi. Protoni H7 i H9 pokazuju spregu s alaninskom CH₂ skupinom u HMBC spektru što je dodatna potvrda njihove asignacije. Preko sprezanja u HMBC spektru asignirani su protoni H1 i H4. Dublet δ 8,70 ppm pripada H1, a δ 7,98 ppm pripada H4. Prema tomu, signal na δ 7,71 ppm pripada protonu H3, a signal na δ 7,64 ppm pripada H2. Assignacija spoja **22** poslužila je kao model kod asigniranja ostalih pripremljenih spojeva.



Slika 33. Aromatski dio COSY spektra spoja **22**.



Slika 34. Aromatski dio HMQC spektra spoja **22**.

4.2.3. Spektrofotometrijska studija interakcija izabranih gvanidinopirolnih derivata s DNA i RNA

4.2.3.1. Spektroskopska svojstva spojeva **28b** i **29b** u vodenom mediju

4.2.3.1.1. Priprava otopina ispitivanih spojeva

Budući da je osnovna svrha pripreme novih spojeva bila ispitivanje njihovih interakcija s DNA/RNA u vodenom mediju, bilo je nužno ispitati njihovu topljivost i stabilnost u vodi. Spojevi su otopljeni u redestiliranoj vodi bez zagrijavanja ili uz blago zagrijavanje u ultrazvučnoj kupelji ili uz pomoć toplinskog pištolja. Spoj **28b** iz prve pokusne reakcije nije bio potpuno topljiv u vodi pa je dodana mala količina DMSO da bi se dobila bistra otopina (volumni udio DMSO u vodi = 25,6%). U ponavljanim sintetskim reakcijama, dobiveni **28b** se otapao u čistoj vodi i te su otopine korištene kod većeg broja ispitivanja. Ishodišne otopine novih spojeva priređene u koncentracijama od 2×10^{-3} – 6×10^{-3} mol dm⁻³. Pripravljene ishodišne otopine spojeva stabilne su unutar 2-4 tjedna, nakon čega je uočeno slabo taloženje spojeva. Otopine spojeva čuvane su na sobnoj temperaturi (~25 °C). Sva spektrofotometrijska istraživanja novih spojeva (UV/Vis, fluorescencija i cirkularni dikroizam) rađena su u kakodilatnom puferu ionske jakosti $I = 0,05$ mol dm⁻³ na pH = 7,0 i na pH = 5,0.

4.2.3.1.2. UV/Vis spektri

U spektrofotometrijskim istraživanjima korištene su koncentracije ispitivanih spojeva pri kojima je spektroskopski odgovor linearno ovisan o promjeni koncentracije. Snimljeni su UV/Vis spektri različitih koncentracija spoja, te je utvrđeno da se linarnost apsorbancije u ovisnosti o koncentraciji razlikuje ovisno o kiselosti otopine. Kod spojeva **28b** i **29b** je Lambert-Beerov zakon u neutralnom vodenom mediju (pH = 7,0) zadovoljen do koncentracije 3×10^{-5} mol dm⁻³, a u kiselom kiselom vodenom mediju (pH = 5,0) do koncentracije $2,5 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³. Molarni ekstinkcijski koeficijenti i valne duljine maksimuma apsorpcije spojeva **28b** i **29b** i referentnih spojeva **AlaP**, **GlyAlaP** i **GCP** prikazani su u *Tablici 13*.^{109,119} Apsorpcijski maksimumi spojeva **28b** i **29b** kao i vrijednosti njihovih molarnih ekstinkcijskih koeficijenata vrlo su slični i na pH = 5,0 i na pH = 7,0. Izuzetak je spoj **28b** koji na pH = 5,0 ima značajno više vrijednosti molarnih ekstinkcijskih koeficijenata nego na pH = 7,0.

Tablica 13. Molarni ekstinkcijski koeficijenti i valne duljine maksimuma apsorpcije spojeva **28b** i **29b** i referentnih spojeva^{109,119} **AlaP**, **GlyAlaP** i **GCP** snimljenih u kakodilatnom puferu ($c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\text{pH} = 5,0$ odnosno $\text{pH} = 7,0$.

SPOJ	pH = 7,0		pH = 5,0	
	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\epsilon / \text{mmol}^{-1} \text{cm}^2$	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\epsilon / \text{mmol}^{-1} \text{cm}^2$
28b	251	30271	252	46240
	299	21476	298	32200
	-	-	347	3513
29b	252	39540	252	38563
	299	17711	299	19589
	-	-	349	2048
AlaP	250	50598	250	49524
GlyAlaP	250	53709	250	51912
GCP	297	28430	297	27304

U svrhu ispitivanja mogućeg postojanja intramolekulskih π - π interakcija između fenantridina i kovalentno vezane gvanidinokarbonil-pirolne jedinice (GCP jedinica), uspoređeni su spektri spojeva **28b** i **29b** i pripremljenih referentnih spojeva **AlaP**, **GlyAlaP** i **GCP** (Slika 35). Radi jednostavnije usporedbe, UV/Vis spektri prikazani su kao ovisnost molarnog ekstinkcijskog koeficijenta ϵ o valnoj duljini apsorpcije (Slika 35).

kod spoja **28b** pri pH = 7,0 s obzirom na sumu UV/Vis spektara referentnih spojeva fenantridina (**AlaP** odnosno **GlyAlaP**) i referentnog pirolnog derivata (**GCP**).

Ukoliko između kromofora nema nikakve interakcije, pretpostavlja se da postoji aditivnost spektroskopskih svojstava kromofora. Na temelju spektroskopskih svojstava monomera i pretpostavljene aditivnosti, izračunati su postoci hipokromizma za derivate fenantridina **28b** i **29b** (Tablica 14). Promjena apsorbancije na valnim duljinama maksimuma apsorpcije referentnih fenantridina, **AlaP/GlyAlaP** i referentnog pirolnog derivata, **GCP** izračunata je iz razlike sume molarnih ekstinkcijskih koeficijenata pojedinih kromofora i molarnih ekstinkcijskih koeficijenta derivata fenantridina (**28b** i **29b**) prema jednadžbi (1).

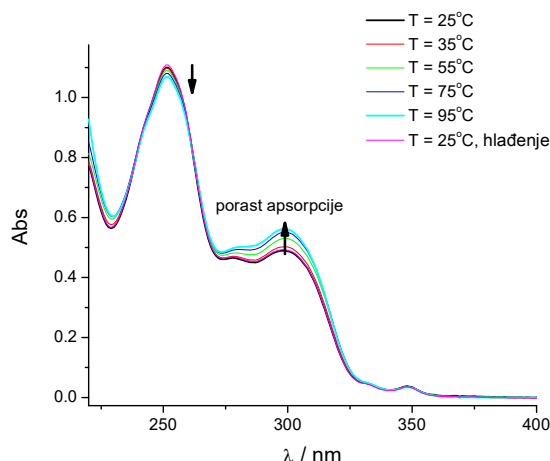
$$\Delta\text{Abs} (\%) = \{[\epsilon_{250/297 \text{ nm}} (\text{AlaP/GlyAlaP}) + \epsilon_{250/297 \text{ nm}} (\text{GCP}) - \epsilon_{250/297 \text{ nm}} (\text{28b/29b})]/[\epsilon_{250/297 \text{ nm}} (\text{AlaP/GlyAlaP}) + \epsilon_{250/297 \text{ nm}} (\text{GCP})]\} \times 100 \quad (1)$$

Tablica 14. Molarni ekstinkcijski koeficijenti spojeva **28b** i **29b** i referentnih spojeva **AlaP/GlyAlaP** i **GCP** na $\lambda = 250 \text{ nm}$ i na $\lambda = 297 \text{ nm}$ (valne duljine maksimuma apsorpcije referentnih spojeva **AlaP/GlyAlaP** i **GCP**) pri pH = 7,0 i pri pH = 5,0 i vrijednosti hipokromizma za derivate fenantridina, **28b** i **29b** u odnosu na referentne monomere **AlaP/GlyAlaP** i **GCP**.

SPOJ		pH = 7,0		pH = 5,0	
		$\epsilon/\text{mmol}^{-1} \text{ cm}^2$	ΔAbs	$\epsilon/\text{mmol}^{-1} \text{ cm}^2$	ΔAbs
28b	250	30244	47 %	45604	15 %
	297	21430	36 %	32268	0.3 %
29b	250	39255	34 %	37903	32 %
	297	17710	47 %	19592	40 %
AlaP	250	50598		49524	
	297	4922		5062	
GlyAlaP	250	53709		51912	
	297	5260		5367	
GCP	250	6107		4025	
	297	28430		27304	

Jaki hipokromni efekt na pH = 7,0 i pH = 5,0 kod spoja **29b**, odnosno izostanak aditivnosti spektroskopskih svojstava kromofora može se pripisati nastanku konformacije pirolnog derivata fenantridina kod kojeg su fenantridinska i pirolna jedinica međusobno intramolekulski slijepljene. Takva konformacija je kod spoja **29b** vrlo vjerojatna s obzirom da u usporedbi sa spojem **28b**, ima dužu i zahvaljujući glicinu fleksibilniju poveznicu između fenantridina i pirola. Kod spoja **28b** također je vidljiv značajni hipokromni efekt na pH = 7,0 koji, s obzirom na kraću i znatno manje fleksibilnu poveznicu između fenantridina i pirola, vjerojatno nije rezultat intramolekulskog sljepljivanja između fenantridinskog i pirolnog kromofora, ali ipak ukazuje na određeni stupanj interakcije između fenantridinskog kromofora i dijelova GCP jedinice. Takav određeni tip interakcije mogao bi biti povezan s protonacijskim stanjem fenantridina pri određenom pH. Pri pH = 7,0 heterociklički dušik na fenantridinu nije protoniran ($pK = 6$)¹⁴⁵ što utječe na dipolni moment, a time i na svojstva fenantridinskog kromofora.^{146,147} Za razliku od neutralnog medija, u blago kiselom mediju (pH = 5,0) primjećen je tek neznatni hipokromizam kod spoja **28b** što ukazuje na nastanak konformacije kod koje su fenantridinski i pirolni kromofor u slaboj interakciji ili nisu u interakciji.

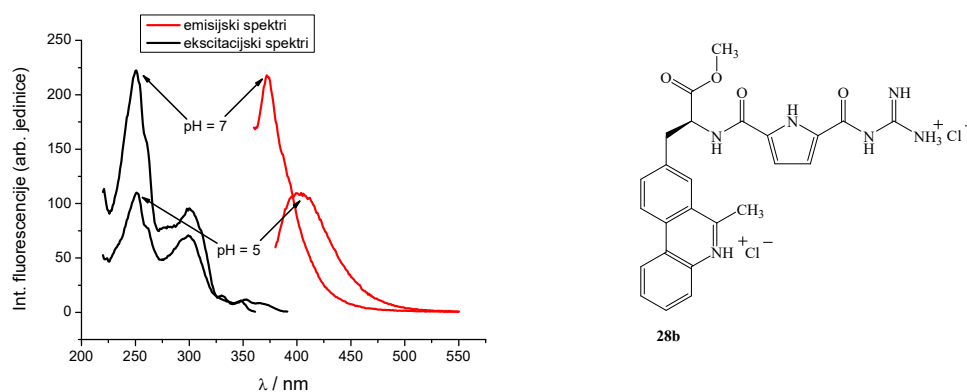
Utvrđeno je da se UV/Vis spektri spojeva **28b** i **29b** na pH = 5,0 i **28b** na pH = 7,0 ne mijenjaju značajno ($\Delta Abs_{max} < 5\%$) prilikom zagrijavanja otopina spojeva u temperaturnom rasponu od 25 °C–95 °C (*Slika 36*). Jedino kod spoja **29b** pri pH = 7,0 zamjećen je značajniji porast apsorbanције spoja ($\sim 15\% \uparrow$) prilikom zagrijavanja na 95 °C. Takva promjena kod spoja **29b** može ukazivati na pomak konformacijske ravnoteže prema "otvorenom" konformeru. Snimljeni su i spektri nakon hlađenja otopina na sobnu temperaturu. Opažena je vrlo mala promjena u apsorbanćiji ($\Delta Abs_{max} < 3\%$) te je zaključeno da su spojevi termostabilni. Prilikom zagrijavanja i hlađenja otopina spojeva ne mijenja se položaj apsorpcijskih maksimuma, te se može pretpostaviti da ne dolazi do kemijske promjene spojeva.



Slika 36. Utjecaj promjene temperature na apsorpcijski spektar spoja **29b** ($c = 2,8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,0$).

4.2.3.1.3. Fluorescencijski spektri

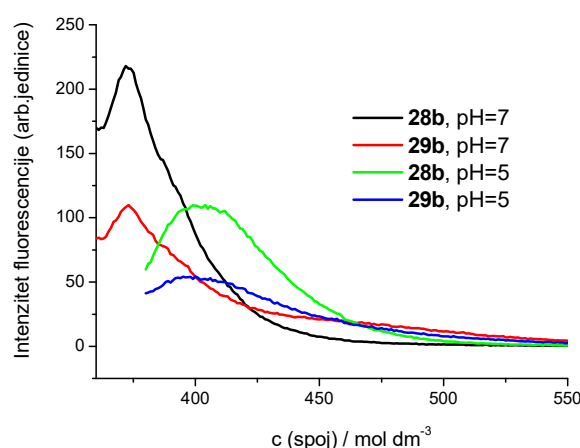
Ekscitacijski spektri svih ispitanih spojeva oblikom i međusobnim odnosom intenziteta maksimuma pobude odgovaraju apsorpcijskim spektrima spojeva, što ukazuje da su isti kromofori unutar molekule odgovorni i za emisiju i za apsorpciju UV i vidljivog dijela spektra. Kao primjer, prikazani su pobudni i emisijski spektri spoja **28b** (Slika 37).



Slika 37. Ekscitacijski (—, $\lambda_{\text{em}} = 372 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,0$ i —, $\lambda_{\text{em}} = 401 \text{ nm}$, $\text{pH} = 5,0$) i emisijski spektri (—, $\lambda_{\text{eks}} = 252 \text{ nm}$, $\text{pH} = 5,0$ i $\text{pH} = 7,0$) spoja **28b** ($c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u vodi (kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$); spektri su korigirani za intenzitet fluorescencije pufera.

Oblik emisijskog spektra kao i valna duljina maksimuma emisije ne ovise o izabranoj valnoj duljini pobude. Emisijski spektri spojeva snimani su u području 380-600 nm, uz pobudu na valnoj duljini maksimuma pobudnog spektra, u vodenim otopinama kakodilatnog pufera pH = 7,0 te pH = 5,0 (Slika 37). Intenzitet fluorescentne emisije pripremljenih spojeva **28b** i **29b** bio je proporcionalan koncentraciji spoja do koncentracije $c = 6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

Na Slici 38 prikazani su intenziteti fluorescentne emisije spojeva **28b** i **29b**, snimljeni radi usporedbe u istim uvjetima.



Slika 38. Emisijski spektri spojeva **28b** i **29b** snimljeni u kakodilatnom puferu ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 5,0 i pH = 7,0); $\lambda_{\text{eksc}} = 252 \text{ nm}$; $c(\mathbf{28b}, \mathbf{29b}) = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

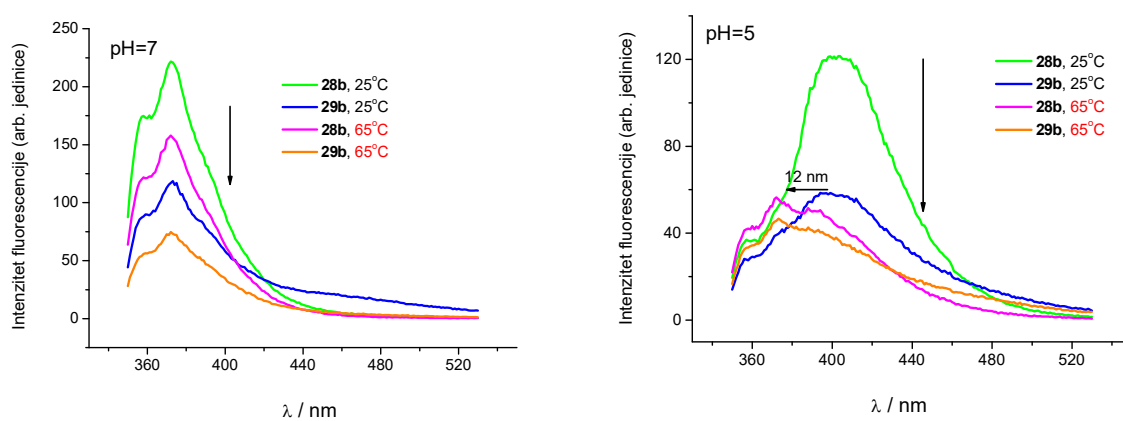
Tablica 15. Relativni intenziteti fluorescentne emisije I^a spojeva **28b** i **29b** ($c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{eksc}} = 252 \text{ nm}$) snimljeni u kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 7,0 i pH = 5,0.

SPOJ		$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	I_i / I_{29b}
pH = 7,0	29b	372	1
	28b	372	2,01
pH = 5,0	29b	401	1
	28b	401	2,04

^a relativni intenzitet računat je u odnosu na intenzitet spoja **29b** na $\lambda_{\text{em}} = 372 \text{ nm}$ pri pH = 7,0 i na $\lambda_{\text{em}} = 401 \text{ nm}$ pri pH = 5,0.

Usporedbom fluorescencijskih spektara spojeva **28b** i **29b** pri pH = 7,0 i pH = 5,0 (Slika 38, Tablica 15) može se uočiti dvostruko veći intenzitet fluorescencijske emisije spoja **28b** u

odnosu na spoj **29b** u neutralnom mediju kao i u kiselom mediju. Nadalje, oba spoja pokazuju veći intenzitet fluorescencije emisije na pH = 7,0 nego na pH = 5,0. Može se pretpostaviti da je razlog jače fluorescencije kod oba spoja pri pH = 7,0 različito protonacijsko stanje u neutralnom mediju u odnosu na kiseli medij (Poglavlje 4.2.3.1.4.). Nadalje, i razlika u polarizabilnosti GCP jedinice koja stupa u interakciju s fenantridinom (pH = 7,0) odnosno fenantridinijem (pH = 5,0) utječe na distribuciju naboja kromofora. Razlog manje fluorescencije spoja **29b** u odnosu na **28b** je vjerojatno određeni stupanj intramolekulskih π - π interakcija između pirolnog i fenantridinskog kromofora.



Slika 39. Utjecaj promjene temperature na emisijske spektre spojeva **28b** i **29b** ($c = 2 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} , kakoviladni pufer, $I = 0,05$ mol dm^{-3} , pH = 7,0).

Kod svih se spojeva primjećuje pad intenziteta fluorescencije ($\Delta \text{INT}_{\text{maks}} = 30\text{-}36\%$) s porastom temperature (Slika 39). Kod spoja **28b** zamjećen je veći pad intenziteta fluorescencije ($\Delta \text{INT}_{\text{maks}} = 63\%$) pri pH = 5,0. Snimljeni emisijski spektri nakon hlađenja otopina tih spojeva na sobnu temperaturu, ne razlikuju se puno od njihovih emisijskih spektara prije zagrijavanja ($\Delta \text{INT}_{\text{maks}} = 1\text{-}4\%$).

4.2.3.1.4. Ovisnost spojeva **28b** i **29b** o pH vrijednosti otopine

Pri ispitivanju spektroskopskih svojstava spojeva **28b** i **29b** uočeno je da UV/Vis i fluorescencijski spektri ovise o pH otopine.

Kod spoja **29b** prilikom promjene pH od 5,0 do 7,0 ne dolazi do pomaka apsorpcijskog maksimuma i neznatno je manja apsorpcija UV/Vis zračenja na 299 nm, a hipokromni efekt

spoja **29b** (*Tablica 13* i *Tablica 14*) malo je više izražen pri pH = 7 nego pri pH = 5 u odnosu na referentne spojeve **GlyAlaP** i **GCP**. Kod spoja **28b** zamjećen je veliki utjecaj pH otopine na njegova apsorpcijska svojstva. Kod spoja **28b** je vidljivo smanjenje apsorpcije UV/Vis zračenja prilikom promjene pH od 5,0 do 7,0, a hipokromni efekt spoja u odnosu na referentne spojeve **AlaP** i **GCP** pri pH = 7,0 (*Tablica 13* i *Tablica 14*) jako je izražen.

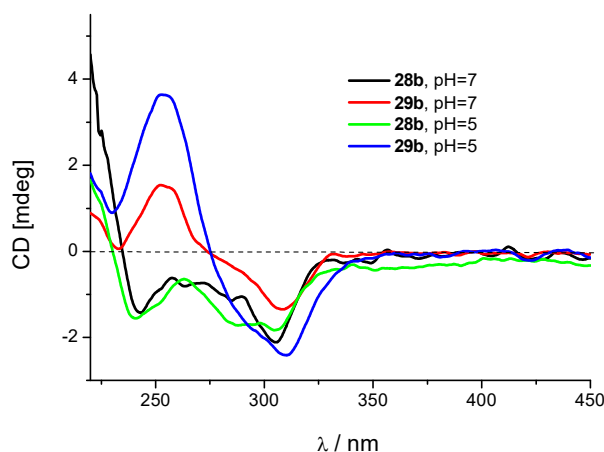
U fluorescencijskim spektrima spojeva **28b** i **29b** povećanjem pH od 5,0 do 7,0 dolazi do hipsokromnog pomaka emisijskog maksimuma (29 nm) i do povećanja intenziteta fluorescencije (*Slika 38*). Razlike u fluorescencijskom intenzitetu spojeva **28b** i **29b** (*Tablica 15*, *Slika 39*) očito ovise o protonacijskim stanjima tih spojeva pri određenom pH te o duljini i fleksibilnosti spojnice između fenantridina i GCP jedinice koja utječe i na opseg interakcija između fenantridina i GCP jedinice.

Iz literature je poznato da je heterociklički dušik fenantridina protoniran u kiselim uvjetima ($pK \approx 6$).¹⁴⁵ Na temelju pK vrijednosti drugih fenantridinskih derivata¹² može se pretpostaviti da se svi ispitivani spojevi pri pH = 5,0 nalaze u protoniranoj formi fenantridinijevog iona. S druge strane, na pH = 7,0, fenantridinski dušik nije protoniran. Gvanidinska skupina vezana je na pirol preko acetilne skupine smanjujući time pK vrijednost slobodne gvanidinske skupine od 13,5 na otprilike 6–7 pa se može pretpostaviti da je na pH = 5,0 GCP jedinica protonirana, dok je na pH = 7,0 djelomično protonirana.^{119,148} Na temelju ovih podataka, može se zaključiti da pirolni derivati fenantridina, **28b** i **29b**, pri pH = 7,0 imaju djelomično protoniranu, a djelomično deprotoniranu GCP jedinicu, dok pri pH = 5,0 ti derivati nose dva pozitivna naboja.

4.2.3.1.5. CD spektri

S obzirom da oba ispitivana spoja (**28b** i **29b**) imaju po jedan kiralni centar, snimljeni su CD spektri različitih koncentracija do koncentracije 2×10^{-5} ili 3×10^{-5} mol dm⁻³ u neutralnom vodenom mediju (na pH = 7,0) i u kiselom vodenom mediju (na pH = 5,0). Jaki hipokromni efekt zamjećen kod spoja **29b** u UV/Vis spektrima na pH = 7,0 i pH = 5,0 vjerojatno je rezultat intramolekulske interakcije dvaju kromofora spoja **29b**. CD spektar spoja **29b** na oba ispitivana pH ima jedan negativni i jedan pozitivni CD signal približno jednakih intenziteta, koji su smješteni blizu 309 nm odnosno blizu 254 nm (*Slika 40*). Te vrijednosti valnih duljina odgovaraju apsorpcijskim maksimuma spoja **29b**, odnosno valnim duljinama maksimuma fenantridinskog i pirolnog kromofora u UV/Vis spektru spoja **29b**. Ovakav bisignatni CD signal može ukazivati na nastanak intermolekuskog ili intramolekuskog dimera. Budući da je u

UV/Vis i CD mjerenjima uočena linearnost spektroskopskog odgovora s povećanjem koncentracije spoja **29b** do 2×10^{-5} ili 3×10^{-5} mol dm⁻³, može se pretpostaviti da ne dolazi do intermolekulskih interakcija odnosno do nastajanja intermolekulskih dimera. Na temelju zamjećenog hipokromnog efekta kod spoja **29b** i oblika CD spektara, može se zaključiti da postoji interakcija između GCP jedinice i fenantridina, najvjerojatnije između fenantridinskog i pirolnog kromofora. Nadalje, kod spoja **29b** zamjećeno je da su CD signali pri istim omjerima bili većeg intenziteta pri pH = 5,0, nego pri pH = 7,0. Za razliku od spoja **29b**, kod spoja **28b** nije uočen bisignatni CD signal pri niti jednoj ispitivanoj pH vrijednosti. U CD spektrima spoja **28b**, vidljiva su dva negativna CD signala smještena na 242 nm i 306 nm pri pH = 7,0 i tri negativna CD signala na 240 nm, 288 nm i 306 nm pri pH = 5,0 (Slika 40). Za razliku od pH = 5,0, u neutralnom vodenom mediju je u apsorpcijskim spektrima spoja **28b** zamjećena značajna neaditivnost molarnih ekstinkcijskih koeficijenata na 250 nm i 297 nm u odnosu na referentne spojeve **AlaP** i **GCP**. Ta odsutnost aditivnosti ukazuje na prisutnost interakcije između GCP jedinice i fenantridina koja najvjerojatnije ne uključuje interakciju između pirolnog i fenantridinskog kromofora. Na temelju UV/Vis spektara spoja **28b** (mali hipokromni efekt u odnosu na referentne spojeve) kao i njegovog CD spektra (dodatni negativni CD signal na 288 nm u usporedbi sa spojem **29b**) može se zaključiti da postoji vrlo slaba ili nikakva interakcija između GCP jedinice i fenantridina.



Slika 40. CD spektri spojeva **28b** i **29b** snimljeni u kakodilatnom puferu ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH = 5,0 i pH = 7,0); $c(28b, 29b) = 1,5 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³.

4.2.3.2. Interakcije spojeva 28b i 29b s DNA/RNA u vodenom mediju

Ispitivani spojevi su analozi etidijevog bromida, klasičnog interkalatora, koji se zbog izrazitog povećanja fluorescentne emisije prilikom vezanja na DNA/RNA koristi kao proba za polinukleotide. Fluorimetrijska metoda je visoko osjetljiva te omogućuje izvođenje eksperimenata pri mikromolarnim koncentracijama ispitivanog spoja. Stoga se vezanje pripremljenih spojeva na polinukleotide pratilo fluorimetrijskim titracijama. Za početna ispitivanja interakcija ispitivanih spojeva s DNA/RNA supstratima korištene su prirodna dvolančana DNA izolirana iz timusne žljezde teleta (*calf thymus* DNA, skraćeno *ctDNA*) kao tipični predstavnik skupine B-DNA, te dvolančana sintetska RNA, poli A – poli U kao tipični predstavnik skupine A-RNA. Titracije pripremljenih spojeva s navedenim polinukleotidima provedene su na pH = 7,0 i na pH = 5,0, jer su u tim uvjetima spojevi različito protonirani (Poglavlje 4.2.3.1.4.) te se očekivalo da će to utjecati na njihovu interakciju s polinukleotidima. Rezultati dobiveni spektroskopskim titracijama spojeva s *ctDNA* mogu ukazati na tip vezanja (interkalativni, elektrostatski ili kombinaciju) te u usporedbi s referentnim, prije ispitanim spojevima, **AlaP/GlyAlaP**¹⁰⁹ može se usporediti jačina vezanja ispitivanog spoja (K_s) i gustoća vezanja iz omjera n ([vezani spoj]/[polinukleotid]).

Na osnovu početnih rezultata sa *ctDNA* i poli A – poli U, testirane su interakcije ispitivanih spojeva i s drugim sintetskim polinukleotidima (poli dGdC – poli dGdC, poli dAdT – poli dAdT, poli dA – poli dT) pri pH = 5,0. Cilj je bio utvrditi postoji li razlika u interakcijama s dvolančanim (dl-) RNA i dvolančanim (dl-) DNA odnosno postoji li razlika u interakcijama spojeva s različitim parovima baza (dG-dC u odnosu na dA-dT).

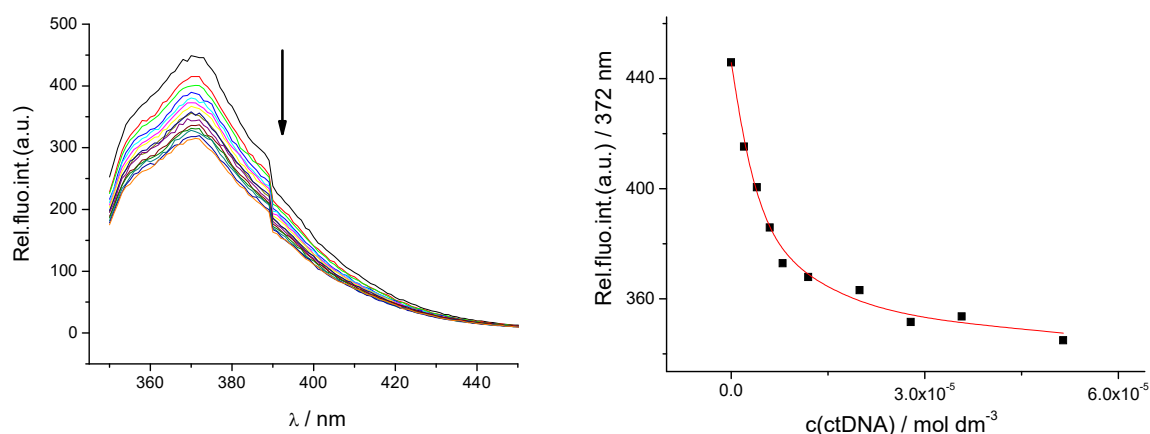
4.2.3.2.1. Fluorimetrijske titracije spojeva 28b i 29b s dvolančanim polinukleotidima

Iz fluorimetrijskih titracija spojeva **28b** i **29b** sa dvolančanim polinukleotidima pri pH = 7,0 vidljiva je razlika u promjenama emisijskih spektara između tih spojeva (*Tablica 16*). Dodatak polinukleotida u puferiranu vodenu otopinu spoja **28b** (kakodilatni pufer, pH = 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, sobna temperatura) uzrokovao je gašenje fluorescentne emisije (*Slika 41, Tablica 16*). Prilikom vezanja spoja **29b** s polinukleotidima u neutralnom vodenom mediju, došlo je samo do malog pada intenziteta fluorescentne emisije (*Tablica 16*).

Pri pH = 5,0 dodatak svih navedenih dvolančanih polinukleotida (*Slika 42, Tablica 16*) u otopine spoja **28b** izazvao je značajno gašenje intenziteta fluorescentne emisije. Dok je dodatak

ctDNA i poli(dGdC)₂ u puferirane vodene otopine spoja **29b** izazvao značajni pad intenziteta emisije, u titracijama tog spoja sa poli(dAdT)₂ i poli A – poli U došlo je samo do malog smanjenja intenziteta fluorescentne emisije. Dodatak ispitivanih polinukleotida izazvao je znatno veći pad intenziteta fluorescentne emisije spoja **28b** u usporedbi sa spojem **29b** (*Tablica 16*).

Prilikom vezanja **28b** i **29b** pri oba ispitivana pH nije došlo do pomaka valne duljine maksimuma emisije tih spojeva (*Slika 41* i *Slika 42*).



Slika 41. a) Pad intenziteta fluorescentne emisije spoja **28b** ($c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$) prilikom titracije s *ctDNA* ($c = 2,0 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Ovisnost intenziteta emisije spoja **28b** o koncentraciji *ctDNA* na valnoj duljini maksimuma emisije, $\lambda_{\text{max}} = 372 \text{ nm}$ (pH = 7,0, kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Iz podataka dobivenih fluorimetrijskim titracijama pomoću Scatchardove jednadžbe¹⁴⁹ izračunate su konstante stabilnosti K_s i vrijednosti omjera n kad je to bilo moguće izračunati ($n[\text{vezani } \mathbf{28b}, \mathbf{29b}]/[\text{polinukleotid}] = 0,9-0,1$).

Tablica 16. Konstante stabilnosti ($\log K_s$)^a i vrijednosti omjera n^b ([vezani **28b**, **29b**]/[polinukleotid]) izračunate na osnovu fluorimetrijskih titracija za komplekse spojeva **28b** i **29b** s dvolančanim polinukleotidima na na pH = 7,0 i pH = 5,0 (kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

pH		ctDNA			poli(dAdT) ₂			poli(dGdC) ₂			poli A - poli U		
		logK _s	n	I/I ₀ ^c	logK _s	n	I/I ₀ ^c	logK _s	n	I/I ₀ ^c	logK _s	n	I/I ₀ ^c
5	28b	5,3	0,2	0,1	5,1	0,3	0,6	5,2	0,9	0,2	4,2	0,8	0,3
	29b	4,1	0,7	0,5	- ^d	- ^d	- ^d	5,1	0,2	0,5	- ^d	- ^d	- ^d
7	28b	5,6	0,8	0,8	- ^e	- ^e	- ^e	- ^e	- ^e	- ^e	6,2	0,4	0,8
	29b	- ^d	- ^d	- ^d	- ^e	- ^e	- ^e	- ^e	- ^e	- ^e	- ^d	- ^d	- ^d

^a vrijednosti $\log K_s$ izračunate prema Scatchardovoj jednadžbi¹⁴⁹ za $n_{\text{[vezani R]}/\text{[polinukleotid]}} = 0,9-0,1$; koeficijenti korelacije > 0,99 za sve određene vrijednosti K_s

^b vrijednosti omjera n ([vezani **28b**, **29b**]/[polinukleotid]) izračunate prema Scatchardovoj jednadžbi

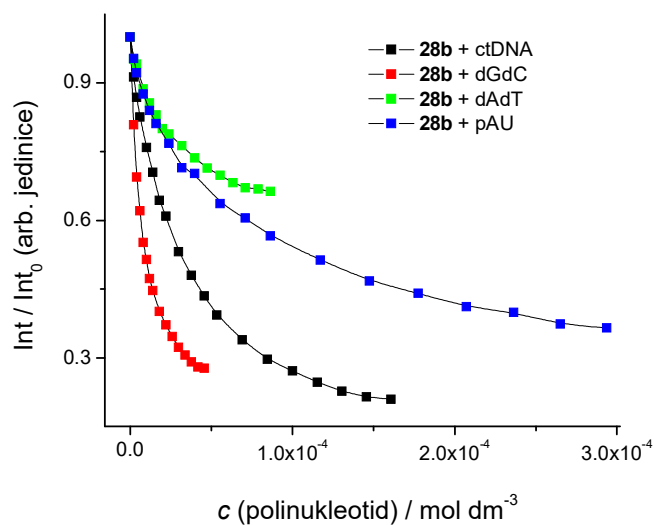
^c I₀ je početni intenzitet fluorescentne emisije ispitivanog spoja **28b** ili **29b**; I je intenzitet fluorescentne emisije kompleksa **28b** ili **29b**/polinukleotid izračunat prema Scatchardovoj jednadžbi

^d promjene intenziteta fluorescencijske emisije spoja **29b** s polinukleotidima bile su premale za točno izračunavanje konstante stabilnosti

^e nije određeno

Pri fiziološkom pH, promjene intenziteta fluorescencijske emisije u titracijama spoja **29b** sa polinukleotidima bile su premale za točno izračunavanje afiniteta prema polinukleotidima. Također, pri pH = 5,0 samo dodatak ctDNA i poli(dGdC)₂ je izazvao značajne promjene intenziteta fluorescencijske emisije spoja **29b**. Usporedbom rezultata navedenih u Tablici 16 može se uočiti da spoj **28b** ima veći afinitet vezanja prema polinukleotidima od spoja **29b**, ne samo pri fiziološkom pH već i pri pH = 5,0. Jedino se na alternirajuće dGdC sekvence oba spoja vežu sa vrlo sličnim konstantama stabilnosti.

Može se zaključiti da se spoj **28b** veže sa sličnim afinitetima vezanja na DNA i RNA pri pH = 7,0 dok je pri pH = 5,0 veći afinitet vezanja prema DNA (ctDNA, poli(dAdT)₂, poli(dGdC)₂) nego prema RNA. Spoj **29b** u kiselom je mediju pokazao jače vezanje prema DNA (osobito prema GC parovima baza) nego prema RNA.



Slika 42. Promjene intenziteta emisije spoja **28b** ($c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{eks}} = 300 \text{ nm}$, $\text{pH} = 5,0$) prilikom titracija s *ctDNA* (—■—), poli A – poli U (—■—), poli(dAdT)₂ (—■—) i poli(dGdC)₂ (—■—).

4.2.3.2.2. Promjena točke mekšanja dvolančanih polinukleotida uslijed interakcije sa spojevima **28b** i **29b**

Zagrijavanjem vodenih otopina dvolančanih polinukleotida dolazi do razdvajanja dvostruke uzvojnice na dva jednolančana polinukleotida jer pucaju vodikove veze između nukleobaza. Temperatura mekšanja (T_m) definirana je kao temperatura pri kojoj je otprilike približno pola dvolančane uzvojnice prešlo u dvije jednolančane, a karakteristična je za svaki dvolančani polinukleotid i ovisi o sastavu i redoslijedu nukleobaza unutar polinukleotida. Polinukleotid sastavljen od A-T(U) nukleobaza vezanih dvjema vodikovim vezama, razdvaja se pri nižim temperaturama u usporedbi s polinukleotidom sastavljenim od G-C nukleobaza, vezanim trima vodikovim vezama. Najčešće se za određivanje temperature mekšanja koristi UV spektroskopija, gdje se razdvajanje nukleinskih kiselina prati mjerenjem rezultirajućeg hiperkromnog efekta (obično pri 260 nm) u ovisnosti o temperaturi otopine. Vrijednost temperature mekšanja polinukleotida, T_m najčešće se određuje očitavanjem maksimuma prve derivacije krivulje mekšanja.¹⁵⁰

Vrijednosti ΔT_m izračunate su kao razlika T_m vrijednosti kompleksa ispitivanih spojeva s polinukleotidima i vrijednosti T_m određenih za čiste polinukleotide (2).

$$\Delta T_m = T_m (\text{kompleks}) - T_m (\text{dvolančani polinukleotid}) \quad (2)$$

Metodom temperature mekšanja polinukleotida mogu se uspoređivati interakcije spojeva koji se vežu na određeni polinukleotid ili interakcije jednog spoja prema više različitih polinukleotida. Pri vezanju klasičnih interkalatora na polinukleotid uglavnom dolazi do stabilizacije dvostruke uzvojnice i vrijednosti ΔT_m su pozitivne. Drugi načini vezanja spojeva na DNA ili RNA mogu uzrokovati stabilizaciju ali i destabilizaciju dvostruke uzvojnice, pa prema tome i pozitivne i negativne vrijednosti ΔT_m .

Ograničenje ove metode je što ispitivani spojevi moraju biti termički stabilni na temperaturama višim od standardne.

Eksperimenti temperaturnog mekšanja izvedeni su blizu ekvimolarnog omjera spoj/polinukleotid, što znači u uvjetima visokog zasićenja polinukleotida s molekulama ispitivanog spoja. U fiziološkim uvjetima ni **28b** niti **29b** nisu pokazali stabilizacijski učinak na dvolančane polinukleotide (*Tablica 17*).

Tablica 17. Promjene temperature mekšanja^a ($\Delta T_m/^\circ\text{C}$) dvolančanih DNA i RNA polinukleotida uslijed vezanja spojeva **28b** i **29b** pri različitim omjerima r^b ; pH = 7,0 (kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

		28b		29b	
^b $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} =$		0,3	0,5	0,3	0,5
pH 5,0					
	ctDNA	1,6	3,4	0,7	1,4
	poli dA-polu dT	1,0	1,6	-	0
	poli A- poli U	-0,4/-0,2 ^c	-	-0,3/-0,2 ^c	-
	poli(dAdT) ₂	-	4,5	-	0
pH 7,0					
	ctDNA	0	-	0	-
	poli A- poli U	0	-	0	-

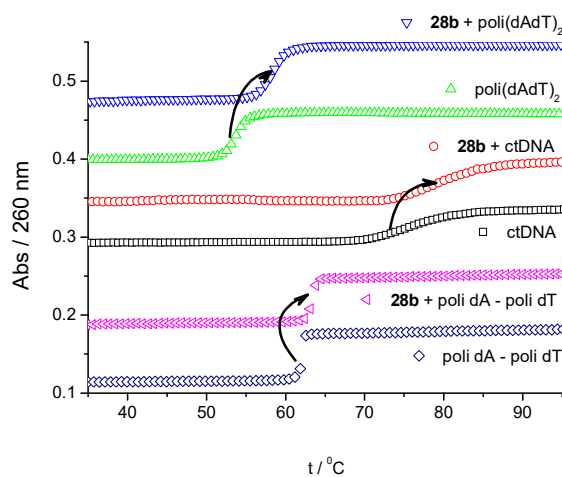
^a Pogreška mjerenja $\Delta T_m : \pm 0,5^\circ\text{C}$

^b $r = (\text{koncentracija ispitivanog spoja})/(\text{koncentracija polinukleotida})$

° bifazni prijelaz: prvi prijelaz pri $T_m = 47,3$ °C odgovara denaturaciji poli A – poli U, dok drugi prijelaz pri $T_m = 71,1$ °C odgovara denaturaciji poli AH^+ – poli AH^+ koji se formira pri pH = 5,0¹⁵¹

Pri pH = 5,0 oba spoja su stabilizirala samo dvolančanu DNA (58% AT, 42% GC), a nisu pokazali nikakav utjecaj na stabilnost dvostruke uzvojnice poli A – poli U (Tablica 17). Spoj **28b** pokazao je značajno jači stabilizacijski učinak prema ctDNA nego spoj **29b**. Nadalje, samo spoj **28b** stabilizirao je i AT parove baza s time da je jači stabilizacijski učinak zamjećen prema alternirajućim AT parovima baza nego prema konsektivnim AT parovima baza (Slika 43).

Jači stabilizacijski učinak prema DNA i AT parovima baza nego prema RNA karakteristično je za male molekule koje se vežu u manje utore dvolančanih polinukleotida.¹⁵² Dvolančane RNA imaju široki i plitki manji utor koji ne podupire vezanje malih molekula u usporedbi s dubokim i uskim manjim utorom dvolančane DNA. Nadalje, jači stabilizacijski učinak prema poli(dAdT)₂ (klasična B-DNA dvostruka uzvojnica) nego prema poli dA – poli dT vjerojatno je rezultat razlike u dimenzijama njihovih manjih utora. Polinukleotid sastavljen od konsektivnih parova baza ima puno uži manji utor koji se odlikuje i negativnijim elektrostatskim potencijalom nego polinukleotid sastavljen od alternirajućih AT parova baza.¹⁵³



Slika 43. Krivulje mekšanja ctDNA (\square), poli dA – poli dT (\diamond), poli(dAdT)₂ (\triangle) i kompleksa spoja **28b** – ctDNA (\circ), **28b** – poli dA – poli dT (\blacktriangleleft) i **28b** – poli(dAdT)₂ (∇) pri omjeru $r_{(\text{spoj})/(\text{polinukleotid})} = 0,5$; pH = 5 (kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³).

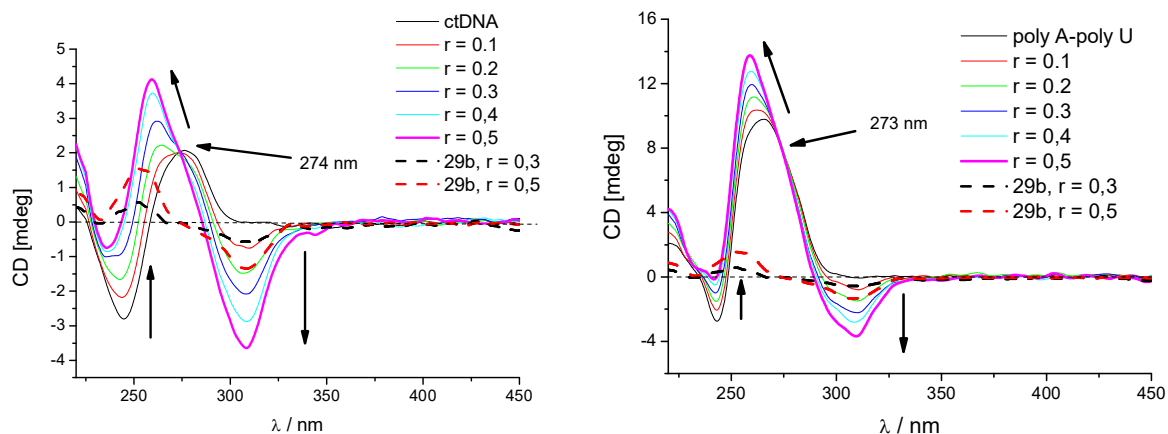
4.2.3.2.3. CD titracije spojeva **28b** i **29b** s dvolančanim polinukleotidima

Iz CD (cirkularni dikroizam) spektara kompleksa malih organskih molekula i polinukleotida mogu se dobiti informacije o konformacijskim promjenama u sekundarnoj strukturi polinukleotida nastalim uslijed vezanja malih molekula na polinukleotide.¹⁵⁴ Također, male akiralne molekule mogu uzrokovati nastajanje induciranih CD spektara (ICD spektri) prilikom vezanja na polinukleotide. Na temelju tih spektara mogu se izvesti zaključci o međusobnoj orijentaciji osi malih molekula i polinukleotida, a time i o načinu vezanja malih molekula na polinukleotide.^{155,156}

Ispitivani spojevi **28b** i **29b** su kiralni (svaki posjeduje jedan asimetrični ugljikov atom) te stoga posjeduju intrinzične CD spektre što treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata dobivenih iz CD titracija. Budući da ispitivani spojevi apsorbiraju u području od 220 – 360 nm pri pH = 7,0 i od 220–390 nm pri pH = 5,0 (*Slika 35*), nastanak induciranih CD spektara može se pripisati njihovoj interakciji s polinukleotidima. Također, treba uzeti u obzir i da polinukleotidi apsorbiraju u UV području do 300 nm. Stoga se pouzdanije informacije o načinima vezanja malih molekula na polinukleotide na temelju induciranih CD spektara mogu dobiti u području valnih duljina većih od 300 nm.

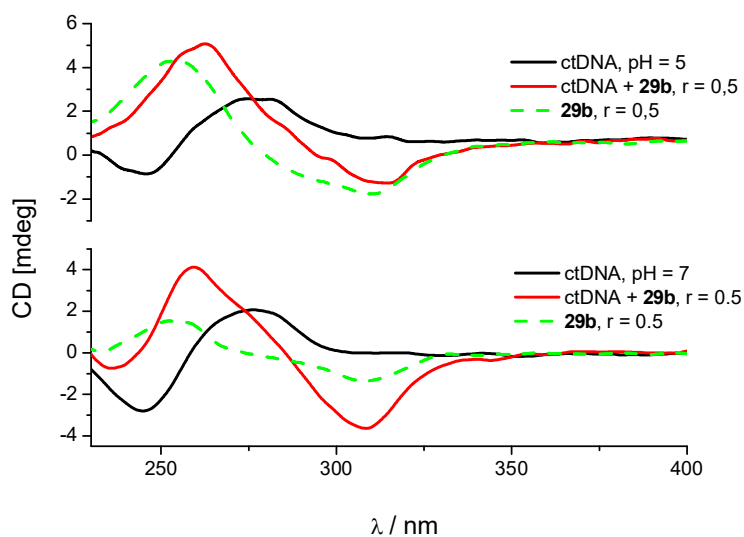
CD mjerenja su provedena u kakodilatnom puferu ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 7,0 i pH = 5,0). Prvo je snimljen CD spektar otopine polinukleotida ($c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu, a zatim su dodavani alikvoti otopine spoja do omjera, $r_{(\text{spoj})/(\text{polinukleotid})} = 0,5$ ili $0,6$ u većini slučajeva.

Pri pH = 7,0, blizu ekvimolarnih omjera **28b**, **29b**/polinukleotid, dodatak spojeva **28b** i **29b** otopini polinukleotida izazvao je različite promjene u CD spektrima ispitivanih polinukleotida. Dodatak **28b** rezultirao je većim ili manjim smanjenjem intenziteta maksimuma CD spektara ispitivanih polinukleotida i malim hipsokromnim pomacima. Nasuprot toga, dodatak **29b** izazvao je značajno povećanje maksimuma CD spektara ispitivanih polinukleotida i veće hipsokromne pomake, uglavnom 5-6 nm, a u titraciji s *ctDNA* i 18 nm (*Slika 44*). Oba ispitivana spoja su prilikom vezanja na polinukleotide izazvala nastanak negativnih induciranih CD signala smještenim oko 305 nm u titracijama s **28b** i oko 309 nm u titracijama s **29b**. Negativni ICD signali su bili jače izraženi u titracijama s **29b** nego s **28b**. Nadalje, ti su negativni ICD signali bili znatno većeg intenziteta od intenziteta CD signala samog spoja **29b** pri istim omjerima. Nasuprot tome su CD signali spoja **28b** bili pri istim omjerima veći od negativnih ICD signala nastalih uslijed vezanja spoja **28b** na polinukleotide. Jedino u titraciji spoja **28b** s alternirajućim AT parovima baza nije bio vidljiv negativni ICD signal na 305 nm, već je uočen pozitivni ICD signal smješten oko 291 nm.

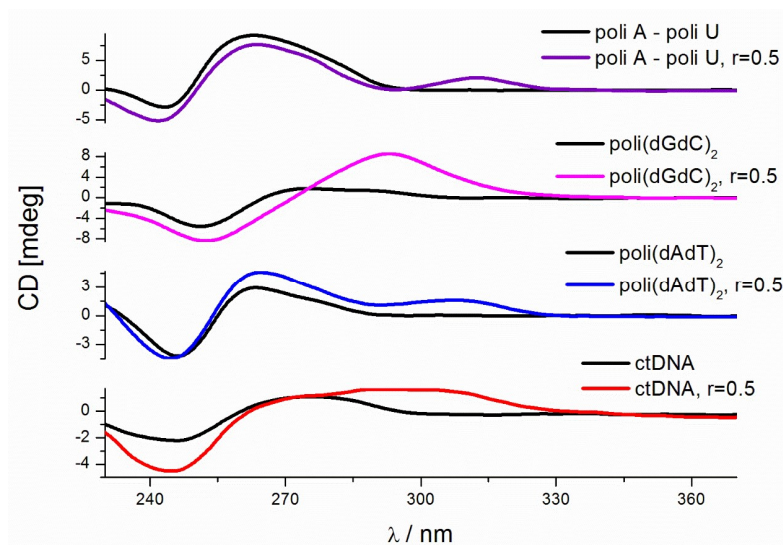


Slika 44. Utjecaj promjene koncentracije spoja **29b** ($r[\mathbf{29b}]/[\text{polinukleotid}]$) na CD spektre *ctDNA* ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) i poli A–poli U ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na $\text{pH} = 7$ (kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Pri $\text{pH} = 5,0$ u CD titracijama spoja **29b** s polinukleotidima zamjećene su slične promjene kao u neutralnim uvjetima, veliki porast CD signala polinukleotida praćen hipsokromnim pomakom (4-6 nm) koji je najizraženiji bio u CD titraciji s *ctDNA* (21 nm pri omjeru $r = 1,3$). Razlika od promjena pri $\text{pH} = 7,0$ jest da je negativni CD signal samog spoja pri istim omjerima bio veći od negativnih ICD signala nastalih u titraciji s polinukleotidima (Slika 45).



Slika 45. Utjecaj vezanja spoja **29b** na CD spektre *ctDNA* ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pri omjeru, $r[\mathbf{29b}]/[\text{polinukleotid}] = 0,5$ pri pH = 5,0 i pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).



Slika 46. Utjecaj vezanja spoja **28b** na CD spektre *ctDNA*, poli(dAdT)₂, poli(dGdC)₂ i poli A – poli U ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pri omjeru ($r[\mathbf{28b}]/[\text{polinukleotid}] = 0,5$ pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Spoj **28b** je pri pH = 5,0 imao potpuno drugačije promjene nego pri pH = 7,0. S *ctDNA* i alternirajućim dAdT i dGdC parovima baza zamjećeni su: porast CD signala polinukleotida praćeni vrlo malim batokromnim pomacima, značajni pozitivni ICD signali smješteni oko 300 nm (Slika 46). Jedino je uslijed vezanja **28b** na dGdC parove baza došlo do velikog batokromnog pomaka koji je na $r = 0,5$ iznosio 16 nm (Slika 46). U CD tiraciji sa poli A – poli U uočeno je malo smanjenje CD signala polinukleotida praćeno malim batokromnim pomakom i značajni pozitivni ICD signal oko 300 nm (Slika 46).

4.2.3.2.4. Zaključak o interakcijama spojeva **28b** i **29b** s nukleinskim kiselinama

Kod usporedbe rezultata temperaturnog mekšanja dvolančanih polinukleotida s rezultatima odgovarajućih fluorimetrijskih titracija treba naglasiti da su eksperimenti temperaturnog mekšanja izvedeni blizu ekvimolarnog omjera spoj/polinukleotid, što znači u uvjetima visokog

zasićenja polinukleotida s molekulama ispitivanog spoja. Nasuprot tome, fluorimetrijske titracije izvedene su u uvjetima velikog suviška polinukleotida u odnosu na ispitivani spoj.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da na vezanje spojeva **28b** i **29b** na polinukleotide utječe nekoliko faktora: 1) duljina i fleksibilnost poveznice između dvaju kromofora koja utječe na najvjerojatnije konformacije spojeva **28b** odnosno **29b**, 2) pH otopine o kojoj ovisi protonacijsko stanje **28b** odnosno **29b** i 3) struktura i sastav parova baza polinukleotida.

Spoj **29b** ima dovoljno dugu i fleksibilnu prenosnicu (glicinska poveznica) između fenantridina i pirola koja omogućuje povoljno preklapanje aromatskih površina pirolnog i fenantridinskog kromofora. Takvu najvjerojatniju konformaciju spoja **29b** pri oba ispitivana pH potvrđuju rezultati iz UV/Vis (veliki hipokromni efekt spoja **29b** u odnosu na referentne spojeve **GlyAlaP** i **GCP**) i CD mjerenja (bisignatni CD signal samog spoja **29b**). Takva konformacija kod koje je spoj **29b** najvećim dijelom prisutan u „zatvorenom“ (preklopljenom) obliku jako utječe i na njegovu interakciju s polinukleotidima.

Kod spoja **29b** određen je pri pH = 7,0 mali afinitet prema DNA i RNA nedovoljan za točno izračunavanje konstante stabilnosti, te pri pH = 5,0 visoki afinitet samo prema DNA i to prema dGdC parovima baza, kao i mala temperaturna stabilizacija samo dvolančane DNA pri pH = 5,0, te jako izraženi ICD signali koji nalikuju CD signalima samog spoja. Ti rezultati ukazuju na aglomeriranje uzduž okosnice polinukleotida kao na dominantan način vezanja ovog spoja na polinukleotide. Razlog jačem vezanju spoja **29b** na DNA pri pH = 5,0 je najvjerojatnije povezan sa stupnjem protoniranja samog spoja pri toj pH vrijednosti. Osim GCP jedinice, protoniran je i heterociklički dušik fenantridinskog prstena pa spoj ostvaruje jače interakcije s polinukleotidnom okosnicom iako je intramolekulski slijepljen (Poglavlje 4.2.3.1.4.). Nadalje, **29b** pri pH = 5,0 pokazuje ne samo selektivnost prema DNA u usporedbi s RNA, već i prema dGdC parovima baza u usporedbi s dAdT parovima baza. Takav veći afinitet prema dGdC polimeru mogao bi se objasniti razlikama u elektrostatskom potencijalu unutar većih utora dGdC polimera i dAdT polimera.¹⁵⁷ Negativniji elektrostatski potencijal unutar većeg utora dGdC polimera mogao bi osigurati bolju sredinu za vezanje pozitivno nabijenog intramolekulskog dimera u usporedbi s većim utorom dAdT polimera. Stoga spoj **29b** osim što aglomerira uzduž okosnice, najvjerojatnije ulazi i unutar hidrofobnog većeg utora poli(dGdC)₂. Na temelju UV/Vis (značajni hipokromni efekt pri pH = 7,0 i neznatni hipokromni efekt pri pH = 5,0 u odnosu na referentne spojeve **AlaP** i **GCP**) i CD spektara (umjesto bisignatnog CD signala prisutna su dva negativna CD signala pri pH = 7,0 i tri negativna CD signala pri pH = 5,0) može se zaključiti da spoj **28b** pri pH = 7,0 i pri pH = 5,0 zauzima različite konformacije.

Može se pretpostaviti da pri pH = 7,0 spoj **28b** zauzima takvu konformaciju kod koje pirol i fenantridin nisu međusobno preklopljeni, jer bi u tom slučaju spoj davao bisignatni CD signal, kao i kod **29b**. Jedna od mogućnosti je da pri pH = 7,0 GCP jedinica sa svojom djelomično protoniranom i djelomično neprotoniranom gvanidino skupinom ostvaruje interakciju s fenantridinskim aromatskim sustavom.

Pri pH = 5,0 ista takva interakcija bila bi nepovoljnija zbog pozitivno nabijenog heterocikličkog dušika fenantridina i posljedično elektron-siromašnijeg aromatskog sustava. Može se pretpostaviti da pri pH = 5,0 spoj **28b** zauzima pretežno "otvorenu" konformaciju kod koje je odbojna sila između pozitivno nabijene GCP jedinice i pozitivno nabijenog fenantridinskog sustava svedena na minimum. Potvrda za postojanje interakcije između GCP jedinice i fenantridinskog sustava pri pH = 7,0, kao i odsustvo te iste interakcije pri pH = 5,0 može se naći u rezultatima interakcija spoja **28b** s polinukleotidima.

Promjene u CD spektrima pri pH = 7,0 (negativni ICD signali blizu 300 nm koji su slični, ali manjeg intenziteta nego CD signali samog spoja) kao i nedostatak stabilizacije DNA i RNA upućuju na aglomeriranje spoja **28b** uzduž okosnice polinukleotida. Jedino u slučaju alternirajućeg dAdT polinukleotida pri pH = 7,0 bio je vidljiv pozitivni ICD signal blizu 290 nm pri omjeru $r = 0,3$. Taj se omjer približno slaže i s vrijednošću n dobivenoj u titraciji s tim polinukleotidom. Na temelju tih rezultata može se pretpostaviti da se spoj **28b** najvjerojatnije veže u manji utor dAdT polinukleotida.

Rezultati svih mjerenja pri pH = 5,0 (pozitivni ICD signal blizu 300 nm, stabilizacija *ct*DNA, veća stabilizacija alternirajućeg AT polinukleotida od AT homopolinukleotida) upućuju na vezanje spoja **28b** u manji utor AT polinukleotida.¹⁵⁸ I s poli(dGdC)₂ dobiveni su rezultati (veliko gašenje intenziteta emisije **28b**, visoki omjer vrijednosti n , veliki ICD signali blizu 300 nm) koji upućuju na vezanje u manji utor tog polinukleotida. Pri pH = 5,0 spoj **28b** je pokazao nešto veći afinitet prema dvolančanim DNA nego prema dvolančanim RNA. Nadalje, pozitívni ICD signal blizu 300 nm i nedostatak stabilizacije poli A – poli U kao i dimenzije manjeg utora RNA (vrlo plitki i široki manji utor)¹⁵¹ upućuju na vezanje **28b** u veliki utor poli A – poli U.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada sintetizirane su i okarakterizirane dvije vrste potencijalno biološki aktivnih molekula: sulfonilni derivati purina i peptidni derivati fenantridina. Ovi spojevi pripadaju grupi „malih molekula“ i kao takvi imaju veće šanse zadovoljiti poznata Lipinski pravila opisuju poželjna svojstva neke molekule u procesu razvoja lijeka.

Strukture pripremljenih purinskih i fenantridinskih spojeva potvrđene su spektroskopskim metodama (FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR (APT, COMPLETE i DEPT), COSY, NOESY, HMQC, HMBC, masena spektrometrija te masena spektrometrija visoke rezolucije).

S ciljem pripreme spojeva s potencijalnim antitumorskim djelovanjem pripremljeni su *N*-sulfonilpurinski derivati (**2-7**) u kojima su povezana dva poznata farmakofora: purinska nukleobaza i *N*-sulfonilna skupina. Regioselektivnim sulfoniliranjem 6-klorpurina u Schotten-Baumann uvjetima najprije je sintetizirana serija 6-klor-9-sulfonilpurina. Pokazalo se da su ovi spojevi nestabilni u DMSO-otopini jer dolazi do pucanja N-SO₂ veze u položaju N9 te kao takvi nisu pogodni za planirana biološka ispitivanja. Zbog toga je, supstitucijom klora u C6 položaju, pripravljena serija 6-morfolino-9-sulfonilpurina (**8-11**). Prilikom prevođenja spojeva **6** i **7** u morfolinske derivate kao glavni produkti dobiveni su dimorfolinski derivati **12** i **15**. Kod spoja **6** došlo je do dodatne supstitucije klorova atoma na sulfonil-aromatskom supstituentu, a kod spoja **7** do dodatne adicije morfolina na dvostruku vezu *trans*- β -stirensulfonilnog supstituenta u N9 položaju. Alternativnim sintetskim putem pripremljeni su planirani monomorfolinski derivati **13** i **17**. Na taj način sintetizirana su i dva 6-bis(2-hidroksietil)amino-derivata 9-sulfonilpurina **19** i **21**. NMR studijom dokazano je da su 6-morfolino- i 6-bis(2-hidroksietil)amino-derivati 9-sulfonilpurina stabilni u otopini DMSO više od 72 sata što je dovoljno da bi se provela planirana biološka ispitivanja.

Antiproliferativni učinak ispitan je sa pripremljenim 6-morfolino- i 6-bis(2-hidroksietil)amino-derivatima purina na ne-tumorskoj staničnoj liniji (MDCK 1) kao i na pet tumorskih staničnih linija (Raji, HuT 78, K-562, CaCo-2 i HeLa).

Najjači citotoksični učinak pokazao je 6-morfolinski derivat **17** s *trans*- β -stirensulfonilnim supstituentom u N9 položaju purina, koji snažno zaustavlja proliferaciju Raji, K-562, HuT 78 i CaCo-2 tumorskih stanica, a pokazao je i srednje jako djelovanje na HeLa stanice. Spoj **17** predstavlja vodeću molekulu u istraživanju antitumorske aktivnosti ove serije spojeva.

Zanimljivi su i 6-morfolino-derivati **8**, **9** i **10** s tosilnim, naftilsulfonilnim, odnosno bifenilsulfonilnim supstituentom u N9 položaju purina. Ovi spojevi srednje jako inhibiraju rast

dviju staničnih linija limfoma, Raji i HuT 78 stanica. Istovremeno, znatno slabije ili zanemarivo djeluju na HeLa, CaCo-2 i MDCK 1 stanice. Osobito je zanimljiv spoj **10** jer pokazuje srednje jako antiproliferativno djelovanje na Raji, K-562 i HuT 78 stanice, dok uopće ne inhibira rast MDCK 1 stanica. Ispitana je i antiproliferativna aktivnost 6-morfolinopurina (**16**) i nukleobaze adenina (**XIX**) koji su pokazali izrazito slabo odnosno zanemarivo antiproliferativno djelovanje što dokazuje povoljan utjecaj supstituenata u C6 i N9 položaju na antitumorsku aktivnost.

Spojevi **10** i posebno **17** dobri su kandidati za daljnje istraživanje u kojem bi se malim sintetskim modifikacijama mogla poboljšati antitumorska aktivnost, ali i selektivnost u djelovanju purinskih derivata.

Ispitana je i sposobnost inhibicije enzima PNP novih 6-morfolino- i 6-bis(2-hidroksietil)amino-derivata purina. Enzim je izoliran iz dva soja bakterije *Helicobacter pylori* te iz bakterije *Escherichia coli*. 6-morfolino-derivati **8** i **18** pokazali su najbolje rezultate. Spoj **8** s tosilnim supstituentom u N9 položaju purina inhibira aktivnost *E. Coli* PNP za oko 60% te nešto slabije inhibira *HP* PNP-ref (oko 30%). Spoj **18** s mesilnim supstituentom u N9 položaju purina inhibira aktivnost *HP* PNP-ref za otprilike 50% te nešto slabije inhibira *HP* PNP-Zg. Sama baza 6-morfolinopurin (**16**) ima jako slabi utjecaj na oba tipa *H. pylori* PNP enzima, inhibira ih za oko 20% čime se naglašava utjecaj sulfonilnih supstituenata u N9 položaju purina na biološku aktivnost.

S ciljem pripreme fluorescentnih probi za DNA i RNA pripravljena je serija peptidnih derivata poznatog fluorofora fenantridina. Svi spojevi pripremljeni su iz početnog, alaninskog derivata fenantridina **22** koji je sintetiziran Negishijevom reakcijom. Peptidni lanac nadograđen je funkcionalizacijom N-terminalnog kraja **22**, koristeći klasične metode peptidne kemije (sinteza u otopini). Fenantridinska aminokiselina nadograđena je različitim strukturnim motivima, pa su tako sintetizirani gvanidinopirolni (**28-32**), gvanidinski (argininski; **36** i **37**), pirenski (**33** i **34**) i fluorenilni (**35**) derivati fenantridina. Gvanidinopirolni i argininski derivati prevedeni su u hidrokloridne soli (**28b-32b** odnosno **36c** i **37c**) čime se znatno poboljšala njihova topljivost u vodi što povećava mogućnost upotrebe ovih spojeva u biološki relevantnim uvjetima.

Kod spoja **28b** gvanidinopirolna jedinica direktno je spojena na fenantridinsku aminokiselinu, dok je kod spoja **29b** povezana preko glicinske jedinice koja daje određenu fleksibilnost molekuli. Ispitane su interakcije odabranih spojeva (gvanidinopirolni derivati **28b** i **29b**) s polinukleotidima pomoću spektrofotometrijskih (UV/Vis, CD, fluorimetrija) metoda u neutralnom i blago kiselom mediju. U blago kiselom mediju heterociklički dušik fenantridina je protoniran što može imati utjecaj na interakcije s polinukleotidima. Nadalje, glicinska poveznica znatno utječe na konformaciju molekule. Rezultati UV/Vis i CD mjerenja pri oba

pH ukazuju da se spoj **29b** najvjerojatnije nalazi u „zatvorenoj“ konformaciji gdje su fenantridinski i pirolni kromofor u intramolekularnoj π - π interakciji. Kod spoja **28b**, zbog rigidnije strukture, ovakva konformacija nije moguća. U neutralnom mediju fenantridin i gvanidinoipirrolna jedinica spoja **28b** su u određenoj interakciji, a u blago kiselom mediju spoj **28b** nalazi se pretežno u „otvorenoj“ konformaciji.

Rezultati svih mjerenja upućuju na vezanje spoja **28b** u manji utor AT i GC polinukleotida te u veliki utor AU polinukleotida u blago kiselom mediju. Spoj **29b** pokazao je selektivnost prema dGdC parovima baza i najvjerojatnije se veže u veliki utor GC polinukleotida u blago kiselom mediju. U neutralnom mediju i **28b** i **29b** aglomeriraju uz fosfatnu okosnicu polinukleotida. Iznimka je interakcija **28b** s alternirajućim dAdT polinukleotidom gdje i u neutralnom mediju dolazi do vezanja spoja u manji utor polinukleotida.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se interakcije spojeva **28b** i **29b** mogu modificirati pomoću: 1) duljine i fleksibilnosti peptidne poveznice, 2) pH vrijednosti otopine o kojoj ovisi protonacijsko stanje ili dodatnim pozitivnim nabojima. Također, struktura i sastav parova baza polinukleotida utječu na način interakcije ispitanih spojeva.

6. LITERATURNI IZVORI

-
- ¹ C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy i P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23** (1997) 3–25.
- ² R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier, New York, 2004.
- ³ S. Hoelder, P. A. Clarke i P. Workman, *Mol. Oncol.* **6** (2012) 155–176.
- ⁴ V. Gabelica Marković, M. Mesić, S. Alihodžić i K. Kovačević, *Kem. Ind.* **60** (2011) 639–646.
- ⁵ I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545–552.
- ⁶ M. MacCoss i M. J. Robins u: *Chemistry of Antitumor Agents*, D. E. V. Wilman (Ed.) Blackie and Son, Glasgow, Scotland, 1990, str. 261.
- ⁷ R. K. Robins i G. D. Kirin u: *Chemistry of antitumor agents*, D. E. V. Wilman (Ed.) Blackie and Son, Glasgow, Scotland, 1990, str. 299.
- ⁸ R. K. Robins i G. R. Revankar u: *Antiviral drug development*, E. De Clercq i R. T. Walker (Eds.) Plenum, New York, 1988, str. 11.
- ⁹ E. de Clercq, *Design of Anti-AIDS Drugs*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990, str. 1–24.
- ¹⁰ a) B. Žinić, M. Žinić i I. Krizmanić (2003) *Synthesis of the Sulfonylpyrimidine derivatives with anticancer activity*, **EP 0 877 022 B1** (Bulletin 1003/16); b) Lj. Glavaš-Obrovac, I. Karner, B. Žinić i K. Pavelić, *Anticancer Res.* **21** (2001) 1979–1986; c) Lj. Glavaš-Obrovac, I. Karner, M. Štefanić, J. Kašnar-Šamprec i B. Žinić, *Il Farmaco* **60** (2005) 479–483; d) Lj. Glavaš-Obrovac, I. Karner, M. Pavlak, M. Radačić, J. Kašnar-Šamprec i B. Žinić, *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acid* **24** (2005) 557–569; e) 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; f) F. Supek, M. Kralj, M. Marjanović, L. Šuman, T. Šmuc, I. Krizmanić i B. Žinić, *Invest. New Drugs* **26** (2008) 97–110; g) J. Kašnar-Šamprec, I. Ratkaj, K. Mišković, M. Pavlak, M. Baus-Lončar, S. Kraljević Pavelić, Lj. Glavaš-Obrovac i B. Žinić, *Invest. New Drugs* **30** (2012) 981–990.
- ¹¹ J. Matić, L.-M. Tumir, M. Radić Stojković i I. Piantanida, *Curr. Protein Pept. Sci.* **17** (2016) 127–134.
- ¹² L.-M. Tumir, M. Radić Stojković i I. Piantanida, *Beilstein J. Org. Chem.* **10** (2014) 2930–2954.

-
- ¹³ S. Dinesh, G. Shikha, G. Bhavana, S. Nidhi i S. Dileep, *Journal of Pharmaceuticals and Scientific Innovation* **1** (2012) 29–34.
- ¹⁴ P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg i O. Buchardt, *Science* **254** (1991) 1497–1500
- ¹⁵ W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer Verlag, New York, NY, 1988.
- ¹⁶ T. W. Rall i E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* **232** (1958) 1065–1076.
- ¹⁷ M. Močibob i I. Weygand-Đurašević, *Kem. Ind.* **61** (2012) 554–556.
- ¹⁸ H. G. Wood, S. W. Ragsdale i E. Pezacka, *Trends Biochem. Sci.* **11** (1986) 14–18.
- ¹⁹ H. Rosemeyer, *Chem. Biodivers.* **1** (2004) 361–401.
- ²⁰ X. Yang, H. Sugiyama, S. Ikeda, I. Saito i A. H. Wang, *Biophys. J.* **75** (1998) 1163–1171.
- ²¹ S. Azam, N. Hadi, N. U. Khan i S. M. Hadi, *Med. Sci. Monit.* **9** (2003) BR325–330.
- ²² E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **31** (1898) 2550–2574.
- ²³ a) W. Traube, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **33** (1900) 1371–1383; b) 2010. Traube Purine Synthesis. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. 625:2789–2792.
- ²⁴ S. Ostrowski, *Jordan J. Chem.* **4** (2009) 1–15.
- ²⁵ J.H. Lister u: *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, D. J. Brown (Ed.), Wiley-Interscience, New York 1971.
- ²⁶ A. Yamazaki, I. Kumashiro i T. Takenishi, *J. Org. Chem.* **32** (1967) 3258–3260.
- ²⁷ a) J. Oró, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2** (1960) 407–412; b) J. Oró i A. P. Kimball, *Arch. Biochem. Biophys.* **94** (1961) 217–227; c) J. Oró i A. P. Kimball, *Arch. Biochem. Biophys.* **96** (1962) 293–313.
- ²⁸ a) J. P. Ferris i L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **88** (1966) 1074–1074; b) J. P. Ferris, J. E. Kuder i A. W. Catalano, *Science* **166** (1969) 765–766; c) J. Oro i J. S. Kamat, *Nature* **190** (1961) 442–443.
- ²⁹ a) R. A. Sanchez, J. P. Ferris i L. E. Orgel, *Science* **153** (1966) 72–73; b) R. A. Sanchez, J. P. Ferris i L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **30** (1967) 223–253; c) A. W. Schwartz i M. Goverde, *J. Mol. Evol.* **18** (1982) 351–353; d) A. B. Voet i A. W. Schwartz, *Bioorganic Chem.* **12** (1983) 8–17.
- ³⁰ H. Yamada i T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.* **20** (1972) 623–624.
- ³¹ R. Saladino, C. Crestini, F. Ciciriello, G. Costanzo i E. Di Mauro, *Origins Life Evol. Biosphere* **36** (2006) 523–531.
- ³² R. Saladino, U. Ciambecchini, C. Crestini, G. Costanzo, R. Negri i E. Di Mauro, *ChemBioChem* **4** (2003) 514–521.
- ³³ H. Bredereck, F. Effenberger i G. Rainer, *Liebigs Ann. Chem.* **673** (1964) 82–87.
- ³⁴ E. V. Aleksandrova i P. M. Kochergin, *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **45** (2009) 3–34.

-
- ³⁵ A. Bendich, P. J. Russel Jr. i J. J. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **76** (1954) 6073–6077.
- ³⁶ O. A. Stasyuk, H. Szatyłowicz i T. M. Krygowski, *J. Org. Chem.* **77** (2012) 4035–4045
- ³⁷ N. K. Kochetkov, E. I. Budovskii, E. D. Sverdlov, N. A. Simukova, M. F. Turchinskii i V. N. Shibaev u *Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Part A, N. K. Kochetkov i E. I. Budovskii (Eds.), Plenum Press, London, New York, 1972, str. 121–182.
- ³⁸ A. Rossi, u *Nucleoside Analogues. Chemistry, Biology, and Medical Applications*, R. T. Walker, E. De Clercq i F. Eckstein (Eds.), Plenum Press, New York and London, 1979, str. 409–436.
- ³⁹ O. H. Nielsen, B. Vainer i J. Rask-Madsen, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15** (2001) 1699–1708.
- ⁴⁰ J. Lukenbill i M. Kalaycio, *Leukemia Research* **37** (2013) 986–994.
- ⁴¹ M. Leclerc, F. Suarez, M.-P. Noël, A. Vekhoff, X. Troussard, J.-F. Claisse, C. Thieblemont, F. Maloisel, Y. Beguin, J. Tamburini, C. Barbe i A. Delmer, *Ann. Hematol.* **94** (2015) 89–95.
- ⁴² a) A. K. Bakkestuen, L.-L. Gundersen, G. Langli, F. Liu i J. M. Nolsoe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10** (2000) 1207–1219; b) L.-L. Gundersen, J. Nissen-Meyer i B. Spilsberg, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 1383–1386.
- ⁴³ a) L. Havliček, J. Hanuš, J. Vesely, S. Leclerc, L. Meijer, G. Shaw i M. Strnad, *J. Med. Chem.* **40** (1997) 408–412; b) J.-L. Haesslein i N. Jullian, *Curr. Top. Med. Chem.* **2** (2002) 1037–1050.
- ⁴⁴ D. Hockova, M. Hocek, H. Dvořakova i I. Votruba, *Tetrahedron* **55** (1999) 11109–11118.
- ⁴⁵ M. Hocek, A. Holy, I. Votruba i H. Dvořakova, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 1817–1825.
- ⁴⁶ G. Andresen, L.-L. Gundersen, J. Nissen-Meyer, F. Rise i B. Spilsberg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12** (2002) 567–569.
- ⁴⁷ a) M. Díaz-Gavilán, J. A. Gómez-Vidal, F. Rodríguez-Serrano, J. A. Marchal, O. Caba, A. Aránega, M. A. Gallo, A. Espinosa i J. M. Campos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 1457–1460; b) N. Kode, L. Chen, D. Murthy, D. Adewumi i S. Phadtare, *Eur. J. Med. Chem.* **42** (2007) 327–333.
- ⁴⁸ a) M. Ikejiri, T. Ohshima, A. Fukushima, K. Shimotohno i T. Maruyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 4638–4641; b) M. Ikejiri, M. Saijo, S. Morikawa, S. Fukushi, T. Mizutani, I. Kurane i T. Maruyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17** (2007) 2470–2473; c) T. Maruyama, Y. Sato, Y. Oto, Y. Takahashi, R. Snoeck, G. Andrei, M. Witvrouw i E. De Clercq, *Chem. Pharm. Bull.*, **44** (1996) 2331–2334; d) J. G. Black, *Microbiology Principles & Explorations*, Prentice Hall Publishers; 1999; 4th ed., str. 351–354.
- ⁴⁹ a) E. De Clercq i H. J. Field, *British Journal of Pharmacology* **147** (2006) 1–11; b) E. De Clercq, *Journal of Clinical Virology* **30** (2004) 115–133.

-
- ⁵⁰ R. E. Jr. Parks i R. P. Agarwal u: *The Enzymes*, 3rd ed.; P. D. Boyer (Ed.), Academic Press: New York, 1972; str. 483–514.
- ⁵¹ M. Friedkin i H. M. Kalckar, *J. Biol. Chem.* **184** (1950) 461–464.
- ⁵² A.V. Toms, W. Wang, Y. Li, B. Ganem i S. E. Ealick, *Acta Cryst.* **61** (2005) 1449–1458.
- ⁵³ A. Bzowska, E. Kulikowska i D. Shugar, *Pharmacol. Ther.* **88** (2000) 349–425.
- ⁵⁴ C. E. Bugg, W. M. Carson i J. A. Montgomery, *Scientific American* **269** (1993) 92–98.
- ⁵⁵ M. Berg, P. Van der Veken, A. Goeminne, A. Haemers i K. Augustyns, *Curr. Med. Chem.* **17** (2010) 2456–2481.
- ⁵⁶ E. Berlin i B. Sjörgren, *Svensk Kem. Tid.* **53** (1941) 457–459.
- ⁵⁷ S. L. Ruskin, *US 2 407 686* 17 September 1946 [*CA* **41** (1947) 1393].
- ⁵⁸ a) I. Satoda, T. Fukui, Y. Matsuo i H. Okumura, *Yakugaku Kenkyu* **28** (1956) 621–632; b) *ibid.* 633–638; c) *ibid.* 639–642; d) H. Morishita, S. Nakano, I. Satoda, N. Yoshida, T. Fukui, Y. Matsuo i H. Okumura, *JP 59 535* 9 February 1959 [*CA* **54** (1960) 6767b]; e) Byk-Guldenwerke Chemische Fabrik A.-G. *Belg. 451,086* July 1943 [*CA* **42** (1948) 215c].
- ⁵⁹ Z. A. Martirosyan, V. I. Gunar i S. I. Zav'yalov, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* (1970) 1841–1844.
- ⁶⁰ S. Megati, S. Phadtare i J. Zemlicka, *J. Org. Chem.* **57** (1992) 2320–2327.
- ⁶¹ A. G. Beaman, W. Tautz i R. Duschinsky, *J. Med. Chem.* **9** (1966) 373–378.
- ⁶² W. T. Markiewicz, R. Kierzek i B. Hernes, *Nucleosides & Nucleotides* **6** (1987) 269–272.
- ⁶³ N. K. Kochetkov, E. I. Budovskii, E. D. Sverdlov, N. A. Simukova, M. F. Turchinskii i V. N. Shibaev u *Organic Chemistry of Nucleic Acids*, N. K. Kochetkov i E. I. Budovskii (Eds.), Plenum Press, London, New York, 1972, str. 121–182.
- ⁶⁴ B. Žinić, I. Krizmanić, D. Vikić-Topić, D. Srzić i M. Žinić, *Croat. Chem. Acta* **74** (2001) 399–414.
- ⁶⁵ R. Martínez i L. Chacón-García, *Curr. Med. Chem.* **12** (2005) 127–151.
- ⁶⁶ B.C. Baguley, *Anti-Cancer Drug Des* **6** (1991) 1–35.
- ⁶⁷ B. C. Baguley i M. Le Bret, *Biochemistry* **23** (1984) 937–943.
- ⁶⁸ H. Fritzsche, H. Triebel, J. B. Chaires, N. Dattagupta i D. M. Crothers, *Biochemistry* **21** (1982) 3940–3946.
- ⁶⁹ D. W. Wilson, D. Grier, R. Reimer, J. D. Bauman, J. F. Preston i E. J. Gabbay, *J. Med. Chem.* **19** (1976) 381–384.
- ⁷⁰ J. Gallego i G. Varani, *Acc. Chem. Res.* **34** (2001) 836–843.
- ⁷¹ D. L. Boger i J.-H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 11624–11625.

-
- ⁷² T. C. Jenkins, *Curr. Med. Chem.* **7** (2000) 99–115.
- ⁷³ C. R. Calladine, H. R. Drew, B. F. Luisi, A. A. Travers, *Understanding DNA*, Elsevier Ltd., 2004.
- ⁷⁴ W. D. Wilson, Y.-H. Wang, C. R. Krishnamoorthy i J. C. Smith, *Biochemistry* **24** (1985) 3991–3999.
- ⁷⁵ C. H. Browning, G. T. Morgan, J. V. M. Robb i L. P. Walls, *J. Pathol. Bacteriol.* **46** (1938) 203–204.
- ⁷⁶ <http://www.laprovvet.fr/Trypanosomoses.html>.
- ⁷⁷ I. Boibessot, C. M. Turner, D. G. Watson, E. Goldie, G. Connel, A. McIntosh, M. H. Grant i G. G. Skellern, *Acta Trop.* **84** (2002) 219–228.
- ⁷⁸ T. I. Watkins i G. Woolfe, *Nature* **169** (1952) 506–507
- ⁷⁹ a) H. Nishiwaki, M. Miura, K. Imai, R. Ono i K. Kawashima, *Cancer Res.* **34** (1974) 2699–2703; b) A. D. C. Parenty, L. V. Smith, K. M. Guthrie, D.-L. Long, J. Plumb, R. Brown i L. Cronin, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 4504–4506; c) I. Kock, D. Heber, M. Weide, U. Wolschendorf i B. Clement, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 2772–2777; d) A. Krasinski, Z. Radić, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, i H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 6686–6692.
- ⁸⁰ a) D. G. Simmons, J. G. Gray, K. E. Muse, J. F. Roberts i W. M. Colwell, *Am. J. Vet. Res.* **37** (1976) 69–73; b) R. V. Guntaka, B. W. Mahy i J. M. Bishop, H. E. Varmus, *Nature* **253** (1975) 507–511.
- ⁸¹ a) J. R. MacGregor i I. Johnson, *J. Mutat. Res.* **48** (1977) 103–107; b) J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki i B. Ames, *N. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72** (1975) 5135–5139; c) I. E. Mattern, *Mutation Res.* **38** (1976) 120–121.
- ⁸² J. Olmsted III i D. R. Kearns, *Biochemistry* **16** (1977) 3647–3654.
- ⁸³ J. Malikova, A. Zdarilova i A. Hlobilkova, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palack. Olomouc Czech Repub.* **150** (2006) 5–12.
- ⁸⁴ A. Pictet i H. J. Ankersmit, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **266** (1891) 138–153.
- ⁸⁵ G. T. Morgan i L. P. Walls, *J. Chem. Soc.* (1931) 2447–2456.
- ⁸⁶ P. De Mayo i W. Rigby, *Nature* **166** (1950) 1075–1075.
- ⁸⁷ P. Mamalis i V. Petrow, *J. Chem. Soc.* (1950) 703–711.
- ⁸⁸ P. A. Keller u: *Science of Synthesis*; D. Black (Ed.), Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, 2004, str. 1065–1095.
- ⁸⁹ M. Lysén, J. L. Kristensen, P. Vedsø i M. Begtrup, *Org. Lett.* **4** (2002) 257–259.

-
- ⁹⁰ a) A. R. Katritzky i B. Yang, *J. Heterocycl. Chem.* **33** (1996) 607–610; b) A. R. Katritzky, W. Du, Y. Matsukawa, I. Ghiviriga i S. N. Denisenko, *J. Heterocycl. Chem.* **36** (1999) 927–932.
- ⁹¹ R. Leardini, A. Tundo, G. Zanardi i G. F. Pedulli, *Synthesis* (1985) 107–110.
- ⁹² W. R. Bowman, J. E. Lyon i G. J. Pritchard, *ARKIVOC* (2012) No. Vii, 210–227.
- ⁹³ M. E. Budén, V. B. Dorn, M. Gamba, A. B. Pierini i R. A. Rossi. *J. Org. Chem.* **75** (2010) 2206–2218.
- ⁹⁴ R. T. McBurney, A. M. Z. Slawin, L. A. Smart, Y. Yu i J. C. Walton, *Chem. Commun.* **47** (2011) 7974–7976.
- ⁹⁵ M. L. Read i L.-L. Gundersen, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 1311–1316.
- ⁹⁶ R. Pearson, S. Zhang, G. He, N. Edwards i G. Chen, *Beilstein J. Org. Chem.* **9** (2013) 891–899.
- ⁹⁷ Y. Li, J. Zhu, L. Zhang, Y. Wu i Y. Gong, *Chem. – Eur. J.* **19** (2013) 8294–8299.
- ⁹⁸ I. Deb i N. Yoshikai, *Org. Lett.* **15** (2013) 4254–4257.
- ⁹⁹ N. W. Luedtke, Q. Liu i Y. Tor, *Chem.–Eur. J.* **11** (2005) 495–508.
- ¹⁰⁰ T. I. Watkins, *J. Chem. Soc.* (1952) 3059–3064
- ¹⁰¹ H. Jacquemin-Sablon, M. Le Bret, A. Jacquemin-Sablon i C. Paoletti, *Biochemistry* **18** (1979) 128–134.
- ¹⁰² W. J. Firth, C. L. Watkins, D. E. Graves, i L. W. Yielding, *J. Heterocycl. Chem.* **20** (1983) 759–765.
- ¹⁰³ N. W. Luedtke, Q. Liu i Y. Tor, *Bioorg. Med. Chem.* **11** (2003) 5235–5247.
- ¹⁰⁴ a) C. Fraire, P. Lecoite i C. Paoletti, *Drug Metab. Dispos.* **8** (1981) 156–160; b) P. Lecoite, N. Bichet, C. Fraire i C. Paoletti, *Biochem. Pharmacol.* **30** (1981) 601–609.
- ¹⁰⁵ N. W. Luedtke i Y. Tor, *Biopolymers* **70** (2003) 103–119.
- ¹⁰⁶ C. Bailly, R. K. Arafa, F. A. Tanious, W. Laine, C. Tardy, A. Lansiaux, P. Colson, D. W. Boykin i W. D. Wilson, *Biochemistry* **44** (2005) 1941–1952.
- ¹⁰⁷ M. Radić Stojković, S. Miljanić, K. Mišković, L. Glavaš-Obrovac i I. Piantanida, *Mol. Biosyst.* **7** (2011) 1753–1765.
- ¹⁰⁸ G. Malojčić, I. Piantanida, M. Marinić, M. Žinić, M. Marjanović, M. Kralj, K. Pavelić i H.-J. Schneider, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 4373–4381.
- ¹⁰⁹ a) L.-M. Tumir, I. Piantanida, I. Juranović-Cindrić, T. Hrenar, Z. Meić i M. Žinić, *J. Phys. Org. Chem.* **16** (2003) 891–899; b) I. Juranović, Z. Meić, I. Piantanida, L.-M. Tumir i M. Žinić, *Chem. Commun.* (2002) 1432–1433.

-
- ¹¹⁰ a) M. Dukšič, D. Baretić, V. Čaplar i I. Piantanida, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 2671–2676; b) M. Dukšič, D. Baretić i I. Piantanida, *Acta Chim. Slov.* **59** (2012) 464–472.
- ¹¹¹ E. V. Anslyn i C. L. Hannon u: *Bioorganic chemistry frontiers*; H. Dugas (Ed.), Springer: Berlin, 1993; str. 193–256.
- ¹¹² Y. Inoue, S. Kuramitsu, K. Inoue, H. Kagamiyama, K. Hiromi, S. Tanase i Y. Morino, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 9673–9681.
- ¹¹³ R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott i K. M. Jones, *Data for biochemical research*, Clarendon Press, Oxford, 1959.
- ¹¹⁴ L.-J. Prins, D. N. Reinhoudt, P. Timmerman, *Angew. Chem.* **113** (2001) 2446–2492; *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 2383–2426.
- ¹¹⁵ a) M. Meot-Ner, *Chem. Rev.* **105** (2005) 213 – 284; b) G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, New York, 1997; c) J. Israelachvili, *Intermolecular & Surface Forces*, 2nd ed., Academic Press, London, 1992.
- ¹¹⁶ a) B. Widom, P. Bhimalapuram i K. Koga, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5** (2003) 3085–3093; b) L. R. Pratt i A. Pohorille, *Chem. Rev.* **102** (2002) 2671–2691; c) N. T. Southall, K. A. Dill i A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 521–533.
- ¹¹⁷ a) C. Schmuck i M. Heil, *Org. Biomol. Chem.* **1** (2003) 633 –636; b) C. Schmuck i M. Heil, *ChemBioChem* **4** (2003) 1232–1238.
- ¹¹⁸ C. Schmuck, P. Frey i M. Heil, *ChemBioChem* **6** (2005) 628–631.
- ¹¹⁹ a) C. Schmuck i L. Geiger, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 8898–8899; b) C. Schmuck i L. Geiger, *Curr. Org. Chem.* **7** (2003) 1485–1502; c) C. Schmuck i V. Bickert, *Org. Lett.* **5** (2003) 4579–4581; d) C. Schmuck i J. Lex, *Org. Lett.* **1** (1999) 1779–1781.
- ¹²⁰ a) C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **6** (2000) 709–718; b) C. Schmuck, *Chem. Commun.* (1999) 843–844.
- ¹²¹ C. Schmuck, M. Heil, J. Scheiber i K. Baumann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005) 7208–7212.
- ¹²² A. Scozzafava, A. Mastrolorenzo i C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11** (2001) 1675–1678.
- ¹²³ L.-K. Huang, Y.-C. Cherng, Y.-R. Cheng, J.-P. Jang, Y.-L. Chao i Y.-J. Cherng, *Tetrahedron* **63** (2007) 5323–5327.
- ¹²⁴ G.-R. Qu, J. Wu, Y.-Y. Wu, F. Zhang i H.-M. Guo, *Green Chem.*, **11** (2009) 760–762.
- ¹²⁵ C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm i U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* (2008) 324–329.
- ¹²⁶ Sinteza prekursora **26** i **27** bit će prikazana u zasebnoj publikaciji.

-
- ¹²⁷ V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou i C. Zioudrou, *Synthesis* (1984) 572–574.
- ¹²⁸ T. Mossman, *J. Immunol. Methods* **65** (1983) 55–63.
- ¹²⁹ B. Žinić *et al.* EP 0 877 022 B1, 2003.
- ¹³⁰ G. A. Meshram i V. D. Patil, *Tetrahedron Lett.* **50** (2009) 1117–1121.
- ¹³¹ A. Brik, C.-Y. Wu, M. D. Best i C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **13** (2005) 4622–4626.
- ¹³² a) C. Schotten, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **17** (1884) 2544–2547; b) E. Baumann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **19** (1886) 3218–3222.
- ¹³³ M. Al-Ghorbani, B. A. Begum, Zabiulla, S. V. Mamatha i S. A. Khanum, *J. Chem. Pharm. Res.* **7** (2015) 281–301.
- ¹³⁴ B. M. Trost i M. T. Rudd, *Org. Lett.*, **24** (2003) 4599–4602.
- ¹³⁵ S. Tabanella, I. Valancogne i R. F. W. Jackson, *Org. Biomol. Chem.* **1** (2003), 4254–4261.
- ¹³⁶ D. Haas, J. M. Hammann, R. Greiner i P. Knochel, *ACS Catal.* **6** (2016) 1540–1552.
- ¹³⁷ A. O. King, N. Okukado i E. Negishi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1977) 683–684.
- ¹³⁸ C. A. G. N. Montalbetti i V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827–10852.
- ¹³⁹ E. Valeur i M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606–631.
- ¹⁴⁰ L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-faham, F. J. Ferrer, C. W. Zhang, Y. S. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, K. Klose, M. Beyermann i M. Bienert, *Angew. Chem., Int. Ed.* **41** (2002) 442–445.
- ¹⁴¹ G. Bains, A. B. Patel i V. Narayanaswami, *Molecules* **16** (2011) 7909–7935.
- ¹⁴² J. Duhamel, *Langmuir* **28** (2012) 6527–6538.
- ¹⁴³ I. V. Kurdyukova i A. A. Ishchenko, *Russ. Chem. Rev.* **81** (2012) 258–290.
- ¹⁴⁴ L. Hernandez-Folgado, D. Baretić, I. Piantanida, M. Marjanović, M. Kralj, T. Rehm i C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **16** (2010) 3036–3056.
- ¹⁴⁵ R. L. Jones i W. D. Wilson, *Biopolymers* **20** (1981) 141–154.
- ¹⁴⁶ N. W. Luedtke, Doktorska disertacija, Sveučilište u San Diegu, 2002.
- ¹⁴⁷ S. H. Gellman, T. S. Haque, L. F. Newcomb, *Biophys. J.* **71** (1996) 3523–3526.
- ¹⁴⁸ D. D. Perrin, *Dissociation constants of organic bases in aqueous solution*; Supplement; Butterworths: London, 1972.
- ¹⁴⁹ G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 660–672.; J.D. McGhee i P.H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **103** (1976) 679–684.
- ¹⁵⁰ B. S. Palm, I. Piantanida, M. Žinić i H. J. Schneider, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2** (2000), 385–392.
- ¹⁵¹ C. R. Cantor i P. R. Scimmel, *Biophysical Chemistry*, WH Freeman and Co., San Francisco, 1980, str. 1109–1181.

-
- ¹⁵² W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, L. Streckowski i D. Boykin, *Biochemistry* **32** (1993) 4098–4104.
- ¹⁵³ N. V. Hud i J. Plavec, *Biopolymers* **69** (2003) 144–159.
- ¹⁵⁴ A. Rodger i B. Norden, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*; Oxford University Press: New York, 1997.
- ¹⁵⁵ N. Berova, K. Nakanishi i R. W. Woody, *Circular Dichroism Principles and Applications*; Wiley-VCH: New York, 2000.
- ¹⁵⁶ M. Eriksson i B. Norden, *Methods in enzymology* **340** (2001) 68–98.
- ¹⁵⁷ R. Lavery i B. Pullman, *Nucleic Acids Res.* **9** (1981) 7041–7052.
- ¹⁵⁸ A. Y. Chen, C. Yu, B. Gatto i L. F. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** (1993) 8131–8135.

7. DODACI

POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLA:

A – adenin

Abs - apsorbancija

Ac – acetilna skupina

AcCoA – acetil-koenzim A

AcOEt – etil acetat

ADP – adenzin-5'-difosfat

Ala - alanin

Alk – alkilna skupina

AlaP – (S)-2-amino-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanska kiselina

AMP – adenzin-5'-monofosfat

APT – *engl.* attached proton test

Ar – aromatski supstituent

Arg – arginin

ATP – adenzin 5'-trifosfat

bs – *engl.* broad singlet (prošireni singlet)

Boc – *tert*-butiloksikarbonilna zaštitna skupina

Boc-Gly-OH – *N*-(*tert*-butoksikarbonil)glicin

Boc-GCP-OH – 5-((3-(*tert*-butoksikarbonil)gvanidino)karbonil)-1*H*-pirol-2-karboksilat

BuOH – butanol

cAMP – adenzin-3',5'-ciklički-monofosfat

C – citozin

CD – cirkularni dikroizam

CDK – ciklin-ovisna kinaza

COSY – *engl.* correlation spectroscopy

C_q – kvarterni ugljikov atom

dCK – deoksicitidin kinaza

ctDNA – *engl.* calf thymus DNA

d – dublet u NMR spektroskopiji

dd – dublet dubleta u NMR spektroskopiji

dGTP – 2'-deoksigvanozin-5'-trifosfat

DEPT – *engl.* distortionless enhancement by polarization transfer

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – *engl.* deoxyribonucleic acid (deoksiribonukleinska kiselina)

EB – etidij bromid

E. coli – *lat.* Escherichia coli

ESI – *engl.* electrospray ionization (ionizacija raspršenjem)

Et₃N – trietilamin

EtOH – etanol

FAD – flavin-adenin-dinukleotid

Fmoc – fluorenilmetiloksigkarbonilna zaštitna skupina

FTIR – *engl.* Fourier transform infrared

G – gvanin

GCP – gvanidinokarbonilpirolni supstituent

Gly – glicin

GlyAlaP – (*S*)-2-(2-aminoacetamido)-3-(6-metilfenantridin-8-il)propanska kiselina

Guan – gvanidinska skupina

HBTU – 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat

HeLa – stanice adenokarcinoma vrata maternice

HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonska kiselina

HIV – *engl.* human immunodeficiency virus

HIV-1 RRE – *engl.* HIV-1 Rev response element

HMBC – *engl.* heteronuclear multiple bond correlation

HMQC – *engl.* heteronuclear multiple-quantum correlation

HOBt – hidroksibenzotriazol

HP – *lat.* *Helicobacter pylori*

HRMS – *engl.* high resolution mass spectrometry

Hut 78 – limfom T-stanica

INT – intenzitet fluorescencije

iPrO• – izopropoksi radikal

IR – *engl.* infrared (infracrveno elektromagnetsko zračenje)

Jurkat – leukemija T-stanica

K-562 – kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi

Lys – lizin

m – *engl.* medium (jakost signala u IR spektroskopiji) ili multiplet u NMR spektroskopiji

M – mol dm⁻³

MALDI-TOF/TOF – matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja - analizator masa s vremenom leta

m⁷Guo – 7-metil gvanozin

MDCK – Madin-Darby epitelne stanice bubrega psa

MeOH – metanol

Ms – mesilna skupina

MS – masena spektrometrija

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

NAD – nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

NMR – *engl.* nuclear magnetic resonance (nuklearna magnetska rezonancija)

NOSEY – *engl.* nuclear Overhauser effect

o – orto položaj na benzenu

OLED – *engl.* organic light-emitting diode

p – para položaj na benzenu

Pbf – pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilna zaštitna skupina

Ph – fenilna skupina

Phen – Fenantridin

PNA – *engl.* peptide nucleic acid (peptidna nukleinska kiselina)

PNP – *engl.* purine nucleoside phosphorilase (purin nukleozid fosforilaza)

PrOH – propanol

Py – piren

Pyrr – pirol

q – kvartet u NMR spektroskopiji

Raji – stanice Burkittovog limfoma

R_f – *engl.* retention factor (faktor zadržavanja analita u kromatografiji)

RNA – *engl.* ribonucleic acid (ribonukleinska kiselina)

s – *engl.* strong (jakost signala u IR spektroskopiji) ili singlet u NMR spektroskopiji

SDS – natrijev dodecilsulfat

s. t. – sobna temperatura

stDNA – *engl.* salmon testes DNA

t – triplet u NMR spektroskopiji

T – timin

TBAF – tetrabutilamonijev fluorid

t-BuO• – *tert*-butoksi radikal

TLC – *engl.* thin layer chromatography (tankoslojna kromatografija)

TFA – *engl.* trifluoroacetic acid (trifluoroctena kiselina)

THF – tetrahidrofuran

T_m – temperatura mekšanja polinukleotida

Ts – tosilna skupina

t.t. – temperatura tališta

tRNA – *engl.* transfer ribonucleic acid

U – uracil

UV – *engl.* ultraviolet (ultraljubičasto elektromagnetsko zračenje)

UV/Vis – *engl.* ultraviolet/visible (ultraljubičasto/vidljivo elektromagnetsko zračenje)

vw – *engl.* very weak (jakost signala u IR spektroskopiji)

w – *engl.* weak (jakost signala u IR spektroskopiji)

δ – oznaka za kemijski pomak u NMR spektroskopiji

POPIS SLIKA:

Slika 1. Numeriranje purina I: a) prema IUPAC-u; b) trivijalno; str. 3

Slika 2. Shematski prikaz RNA, DNA i strukture nukleobaza; str. 4

Slika 3. Shematski prikaz građevne jedinice nukleinskih kiselina; str. 5

Slika 4. Strukture purinskih koenzima ATP, cAMP, NAD, FAD i AcCoA; str. 6

Slika 5. Poznati purinski analozi; str. 7

Slika 6. Nebularin i purinski derivati izolirani iz morskih organizama; str. 7

Slika 7. Strukture herbipolinskih derivata i skica biljke *Heterostemma brownii* (preuzeto iz referencije Rosemeyer¹⁹ i prerađeno); str. 8

Slika 8. Reaktivnost purinskih nukleobaza: a) aktivna mjesta za elektrofilne napade; b) aktivna mjesta za nukleofilne napade; str. 15

Slika 9. Biološki aktivni purinski analozi s citotoksičnim djelovanjem; str. 16

Slika 10. Načini vezanja malih molekula na polinukleotide: a) interkaliranje, b) vezanje u mali utor i c) elektrostatsko vezanje; str. 20

Slika 11. a) fenantridin; b) fenantren; str. 21

Slika 12. Fenantridinski tripanocidi: a) etidij bromid; b) izometamidij klorid; str.22

Slika 13. Shematski prikaz interkaliranja etidij bromida (preuzeto iz referencije Tumir i sur.¹² i prerađeno); str. 28

Slika 14. Karbamidni derivat EB (3,8-bis-urea-etilen-diamin-etidij) koji pokazuje manji afinitet prema DNA i veći afinitet prema HIV-1 RRE od EB; str. 30

Slika 15. a) utor-vežući gvanidino derivat 6-fenilfenantridina; b) poznati utor-vežući spoj furamidin; str. 31

Slika 16. a) mono-; b) bis-bigvanidni derivat 6-metilfenantridina; str. 31

Slika 17. Bis-fenantridinski derivat s triaminskom poveznicom; pH vrijednost kontrolira količinu naboja na molekuli; str. 32

Slika 18. Nukleobazni derivati fenantridina; str. 33

Slika 19. Peptidni derivati fenantridina; a) derivati s jednom fenantridinskom jedinicom (**AlaP** i **GlyAlaP**); b) i c) bis-fenantridinski derivati povezani različitim peptidnim poveznicama; str. 34

Slika 20. Gvanidinokarbonilpirolni strukturni motiv; str. 35

Slika 21. NOE efekti vidljivi u sprezanjima 6-klor-9-tosil-9*H*-purina (**2**); str. 83

Slika 22. NOESY spektar spoja **2**; str. 84

Slika 23. Dio uvećanog NOESY spektra spoja **2**; str. 85

Slika 24. Dio HMQC spektra spoja **2**; str. 85

Slika 25. ¹H NMR spektri spoja **3** u DMSO-u: a) svježa otopina; b) otopina stara 24 sata; c) otopina stara 48 sati; str. 86

Slika 26. ¹H NMR spektar otopine **3** stare šest sati; sivom bojom označeni su signali koji pripadaju produktu raspada spoja **3**; str. 87

Slika 27. ¹H NMR spektri u DMSO: a) 6-klorpurin; b) spoj **3** nakon 6 sati u otopini; c) spoj **3** nakon 24 sata u otopini; d) spoj **3** nakon 48 sati u otopini; str. 88

Slika 28. Dio HMQC spektra spoja **8**; str. 94

Slika 29. Izomeri HBTU reagensa; str. 103

Slika 30. ¹H NMR spektar alaninskog derivata fenantridina **22**; str. 111

Slika 31. Dio COSY spektra spoja **22**; sprezanje NH i CH – Ala; str. 112

Slika 32. Dio COSY spektra **22**; sprezanje CH₂ – Ala i CH – Ala te sprega CH₂ – Ala protona; str. 112

Slika 33. Aromatski dio COSY spektra spoja **22**; str. 114

Slika 34. Aromatski dio HMQC spektra spoja **22**; str. 114

Slika 35. UV/Vis spektri (ϵ u ovisnosti o λ) i strukture spojeva **28b** i **29b** te referentnih spojeva **AlaP**, **GlyAlaP** i **GCP** (pH = 7,0 i pH = 5,0; kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$); str. 117

Slika 36. Utjecaj promjene temperature na apsorpcijski spektar spoja **29b** ($c = 2,8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 7,0); str. 120

Slika 37. Ekscitacijski ($\lambda_{em} = 372$ nm, pH = 7,0 i $\lambda_{em} = 401$ nm, pH = 5,0) i emisijski spektri ($\lambda_{eks} = 252$ nm, pH = 5,0 i pH = 7,0) spoja **28b** ($c = 2,0 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³) u vodi (kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³); spektri su korigirani za intenzitet fluorescencije pufera; str. 120

Slika 38. Emisijski spektri spojeva **28b** i **29b** snimljeni u kakodilatnom puferu ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH = 5,0 i pH = 7,0); $\lambda_{eksc} = 252$ nm; $c(\mathbf{28b}, \mathbf{29b}) = 2 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³; str. 121

Slika 39. Utjecaj promjene temperature na emisijske spektre spojeva **28b** i **29b** ($c = 2 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³, kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³, pH = 7,0); str. 122

Slika 40. CD spektri spojeva **28b** i **29b** snimljeni u kakodilatnom puferu ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH = 5,0 i pH = 7,0); $c(\mathbf{28b}, \mathbf{29b}) = 1,5 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³; str. 124

Slika 41. a) Pad intenziteta fluorescentne emisije spoja **28b** ($c = 2,0 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³, $\lambda_{exc} = 300$ nm) prilikom titracije s *ctDNA* ($c = 2,0 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³); b) Ovisnost intenziteta emisije spoja **28b** o koncentraciji *ctDNA* na valnoj duljini maksimuma emisije, $\lambda_{max} = 372$ nm (pH = 7,0, kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³); str. 126

Slika 42. Promjene intenziteta emisije spoja **28b** ($c = 2 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³; $\lambda_{eks} = 300$ nm, pH = 5,0) prilikom titracija s *ctDNA*, poli A – poli U, poli(dAdT)₂ i poli(dGdC)₂; str. 128

Slika 43. Krivulje mekšanja *ctDNA*, poli dA – poli dT, poli(dAdT)₂ i kompleksa spoja **28b** – *ctDNA*, **28b** – poli dA – poli dT i **28b** – poli(dAdT)₂ pri omjeru $r_{(spoj)/(polinukleotid)} = 0,5$; pH = 5 (kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³); str. 130

Slika 44. Utjecaj promjene koncentracije spoja **29b** ($r[\mathbf{29b}]/[\text{polinukleotid}]$) na CD spektre *ctDNA* ($c = 3,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) i poli A–poli U ($c = 3,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) na pH = 7 (kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³); str. 132

Slika 45. Utjecaj vezanja spoja **29b** na CD spektre *ctDNA* ($c = 3,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) pri omjeru, $r[\mathbf{29b}]/[\text{polinukleotid}] = 0,5$ pri pH = 5,0 i pri pH = 7,0 (kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³); str. 132

Slika 46. Utjecaj vezanja spoja **28b** na CD spektre *ctDNA*, poli(dAdT)₂, poli(dGdC)₂ i poli A – poli U ($c = 3,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) pri omjeru ($r[\mathbf{28b}]/[\text{polinukleotid}]$) = 0,5 pri pH = 5,0 (kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³); str. 133

POPIS SHEMA:

- Shema 1.* Traubeova sinteza derivata purina **IV** i **VI**; str. 9
- Shema 2.* Sinteza kofeina **IX** Traubeovom metodom; str. 9
- Shema 3.* Sinteza purina **XII** iz imidazola **X**; str. 10
- Shema 4.* Sinteza purina **XIX** – **XXIII** tetramerizacijom vodikova cijanida **XIII**; str. 10
- Shema 5.* Sinteza purina **I** iz formamida **XXIV**; str. 11
- Shema 6.* Sinteza N7-supstituiranih purina **XXVII** iz alkil- ili arilaminoacetonitrila **XXV**; str. 11
- Shema 7.* Supstitucije na C6 položaju purina **XXVIII**; str. 12
- Shema 8.* Dobivanje 6-klorpurina **XXXV** iz hipoksantina **XXIII**; str. 13
- Shema 9.* Alkiliranje 6-klorpurina **XXXV**; str. 13
- Shema 10.* Tautomerni oblici purina; str. 14
- Shema 11.* Sinteza sulfonilnih derivata adenina **XIX**; str. 18
- Shema 12.* Ispitivanje stabilnosti sulfoniliranih spojeva na primjeru N⁶-benzoidadenina **XLII**; str. 19
- Shema 13.* Sinteza fenantridina **XLVI** Grignardovim reagensom; str. 23
- Shema 14.* Sinteza 6-arilfenantridina **XLIX** iz benzotriazolnih derivata **XLVII**; str. 24
- Shema 15.* Sinteza 6-arilfenantridina **LIII** iz diariliminskih prekursora **LII**; str. 24
- Shema 16.* Sinteza fenantridinskih derivata **LVII** iz 2-jodobenzil klorida **LIV** i anilina **LV**; str. 25
- Shema 17.* Sinteza fenantridinskih derivata **LIX** fotolizom oksim karbonata **LVIII**; str. 25
- Shema 18.* Sinteza fenantridina **LXII** kombinacijom mikrovalnog i ultraljubičastog zračenja; str. 26
- Shema 19.* Sinteza fenantridina **LXVIII** uz paladijev katalizator; str. 27
- Shema 20.* Sinteza fenantridina **LXXI** alkin[2+2+2]cikloadicijom kataliziranom rodijeve kompleksom; str. 27

- Shema 21.* Sinteza fenantridina **LXIV** uz željezo(III)acetilacetonat; str. 28
- Shema 22.* Schotten-Baumann reakcija dobivanja estera i amida; str. 80
- Shema 23.* Sinteza dimorfolinskog derivata **12** iz klor derivata **6**; str. 91
- Shema 24.* Sinteza dimorfolinskog derivata **15** iz klor derivata **7**; str. 91
- Shema 25.* Priprava 6- bis(2-hidroksietil)amino-derivata **19**; str. 95
- Shema 26.* Priprava 6- bis(2-hidroksietil)amino-derivata **21**; str. 95
- Shema 27.* Sinteza 8-jod-6-metilfenantridina **43**; str. 100
- Shema 28.* Priprava serin-jodida **45**; str. 101
- Shema 29.* Priprava spoja **22** Negishi “cross-coupling” reakcijom; str. 101
- Shema 30.* Shematski prikaz Negishijevog katalitičkog ciklusa; str. 102
- Shema 31.* Nastajanje peptidne veze bez aktivacije karboksilne skupine; str. 102
- Shema 32.* Mehanizam aktivacije karboksilne kiseline s HBTU¹³⁹; str. 103
- Shema 33.* Nastajanje gvanidiliranog nusprodukta; str. 104
- Shema 34.* Sinteza peptidnih derivata fenantridina **23-37**; str. 105
- Shema 35.* Priprava glicinskih derivata **23** i **24**; str. 106
- Shema 36.* Shematski prikaz pripreve hidrokloridnih soli gvanidinopirolnih derivata **28-32**; str. 110
- Shema 37.* Shematski prikaz pripreve hidrokloridnih soli argininskih derivata **36c** i **37c**; str. 110

POPIS TABLICA:

Tablica 1. Priprava 6-klorpurinskih derivata **2-7**; str. 81

Tablica 2. ^1H NMR pomaci vodikovih atoma purinske jezgre kod 6-klor-9-sulfonilpurinskih derivata **2-7**; str. 82

Tablica 3. ^{13}C NMR pomaci ugljikovih atoma 6-klorpurinskih derivata; str. 83

Tablica 4. Priprava 6-morfolinopurinskih derivata **8-11**; str. 90

Tablica 5. Priprava 6-morfolinopurinskih derivata **13, 17 i 18**; str. 92

Tablica 6. ^1H NMR pomaci vodikovih atoma 6-morfolinopurinskih derivata; str. 93

Tablica 7. ^{13}C NMR pomaci ugljikovih atoma 6-klorpurinskih derivata; str. 94

Tablica 8. IC_{50} (μM) vrijednosti uslijed djelovanja purinskih derivata nakon 72h; str. 96

Tablica 9. Utjecaj purinskih derivata na aktivnost *HP*-PNP-ref (spojevi su pripremljeni u koncentraciji 10 mM ili 1 mM^a, koncentracija testiranih spojeva u reakcijskoj smjesi je 0,1 mM u svim mjerenjima); str. 98

Tablica 10. Gvanidinopiroolni derivati **28-32**; str. 107

Tablica 11. Argininski derivati fenantridina **36 i 37**; str. 108

Tablica 12. Pirenski i fluorenilni derivati fenantridina **33-35**; str. 109

Tablica 13. Molarni ekstinkcijski koeficijenti i valne duljine maksimuma apsorpcije spojeva **28b i 29b** i referentnih spojeva^{109,119} **AlaP, GlyAlaP i GCP** snimljenih u kakodilatnom puferu ($c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\text{pH} = 5,0$ odnosno $\text{pH} = 7,0$; str. 116

Tablica 14. Molarni ekstinkcijski koeficijenti spojeva **28b i 29b** i referentnih spojeva **AlaP/ GlyAlaP i GCP** na $\lambda = 250 \text{ nm}$ i na $\lambda = 297 \text{ nm}$ (valne duljine maksimuma apsorpcije referentnih spojeva **AlaP/ GlyAlaP i GCP**) pri $\text{pH} = 7,0$ i pri $\text{pH} = 5,0$ i vrijednosti hipokromizma za derivate fenantridina, **28b i 29b** u odnosu na referentne monomere **AlaP/GlyAlaP i GCP**; str. 118

Tablica 15. Relativni intenziteti fluorescentne emisije I^a spojeva **28b i 29b** ($c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{eksc}} = 252 \text{ nm}$) snimljeni u kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,0$ i $\text{pH} = 5,0$; str. 121

Tablica 16. Konstante stabilnosti ($\log K_s$)^a i vrijednosti omjera n^b ([vezani **28b**, **29b**]/[polinukleotid]) izračunate na osnovu fluorimetrijskih titracija za komplekse spojeva **28b** i **29b** s dvolančanim polinukleotidima na na pH = 7,0 i pH = 5,0 (kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$); str. 127

Tablica 17. Promjene temperature mekšanja^a ($\Delta T_m/^\circ\text{C}$) dvolančanih DNA i RNA polinukleotida uslijed vezanja spojeva **28b** i **29b** pri različitim omjerima r^b ; pH = 7,0 (kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$); str. 129

8. ŽIVOTOPIS

Josipa Matić rođena je 21. listopada 1984. godine u Zadru. Osnovnu školu pohađala je u Šibeniku, a 1999. godine upisala je opću gimnaziju u Gimnaziji Antuna Vrančića u Šibeniku, gdje je 2003. godine maturirala. Iste godine upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2009. godine (smjer – Procesi i proizvodi, modul – Organski procesi i proizvodi), među 10% najboljih studenata na smjeru. Doktorski studij „Medicinska kemija“ Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci upisala je 2012. godine. Eksperimentalni dio doktorske disertacije pod naslovom „*N*-sulfonilpurini i peptidni derivati fenantridina – sinteza, interakcije s polinukleotidima i biološka ispitivanja“ izradila je u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Tijekom izrade doktorske disertacije dodatno se obrazovala na radionicama i stručnim skupovima u Republici Hrvatskoj i inozemstvu. Objavila je četiri znanstvena rada citirana u CC bazi podataka i jedan stručni rad. Članica je Hrvatskog kemijskog društva.

Znanstvene publikacije:

1. J. Matić, F. Šupljika, N. Tir, P. Piotrowski, C. Schmuck, M. Abramić, I. Piantanida, S. Tomić, RSC Adv. **6** (2016) 83044-83052, DOI: 10.1039/C6RA16966J;
2. V. Ključarić, R. Kobetić, J. Rinkovec, S. Kazazić, D. Gembarovski, D. Saftić, J. Matić, Ž. Ban, B. Žinić; Journal of Mass Spectrometry; Rad prihvaćen za objavljivanje; DOI: 10.1002/jms.3810;
3. J. Matić, L.-M. Tumir, M. Radić Stojković, I. Piantanida, Curr. Protein Pept. Sci. **17** (2016) 127–134, DOI: 10.2174/138920371702160209124439;
4. N. Župančić, Ž. Ban, J. Matić, D. Saftić, Lj. Glavaš-Obrovac, B. Žinić, Croat. Chem. Acta **88** (2015) 43–52, DOI: 10.5562/cca2531.

Stručne publikacije:

- L. Krstulović, D. Saftić, J. Matić, M. Bajić, B. Žinić, Kem. Ind. **64** (2015) 499– 512, DOI: 10.15255/KUI.2014.019.