

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2024.

Matej Ivanović

**SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA
MODIFICIRANIH NUKLEOZIDA URACILA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jasmine Lapić te uz pomoć prof. dr. sc. Senke Djaković.

Zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci kroz ove godine studiranja te prijateljima koji su strpljivo slušali moje pritužbe. Također, posebno zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Jasmini Lapić, za veliku pomoć i strpljenje, bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća. Također, hvala i drugim djelatnicima Laboratorija za organsku kemiju PBF-a, pogotovo prof. dr. sc. Senki Djaković, na zanimljivim i ugodnim razgovorima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA MODIFICIRANIH NUKLEOZIDA URACILA

Matej Ivanović, univ. bacc. ing. biotechn.
0125158422

Sažetak: Biokonjugati ferocena i pirimidinskih baza, zbog svojih elektrokemijskih svojstava i biološke aktivnosti, predstavljaju zanimljive spojeve u polju medicinske kemije. U ovom radu provedena je sinteza novih modificiranih nukleozida uracila, odnosno 1'-metoksikarbonilferocenoil-uracil derivata. Aciliranje se provodi s 1'-metoksikarbonilferocenoil kloridom pri različitim reakcijskim uvjetima. U reakcijama uz natrijev hidrid u dimetilformamidu nastaje isključivo *N1*-kopolat, dok u acetonitrilu uz trietilamin uočeno je nastajanje *N1/N3*-kopolata uz *N1*-kopolat, pri čemu na sam njihov međusobni udio utječe supstituent na C5-položaju uracila. Kao produkt reakcije nastaje *N1*-kopolata ili smjesa *N1*- i *N1-/N3*-kopolata. Strukture novosintetiziranih spojeva potvrđene su IR i NMR spektroskopijom.

Ključne riječi: ferocen, uracil, derivati uracila, spektralna analiza

Rad sadrži: 51 stranica, 30 slika, 7 shema, 5 tablica, 33 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jasmina Lapić

Pomoć pri izradi:

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Senka Djaković (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Jasmina Lapić (mentor)
3. prof. dr. sc. Valerije Vrčec, FBF (član)
4. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević (zamjenski član)

Datum obrane: 29. svibanj 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

THE SYNTHESIS AND SPECTRAL ANALYSIS OF MODIFIED URACIL NUCLEOSIDES

Matej Ivanović, univ. bacc. ing. biotechn.
0125158422

Abstract: Bioconjugates of ferrocene and pyrimidine bases, due to their electrochemical properties and biological activities, represent interesting compounds in the field of medicinal chemistry. In this study, the synthesis of new modified uracil nucleosides, namely 1'-methoxycarbonylferrocenoyl-uracil derivatives, was performed. Acylation was carried out with 1'-methoxycarbonylferrocenoyl chloride under various reaction conditions. In reactions using sodium hydride in dimethylformamide, exclusively *N1*-couplates are formed, while in acetonitrile with triethylamine, the formation of *N1/N3*-couplated along with *N1*-couplated was observed, where the substituent at the C5-position of uracil influences the ratio between them. The product of the reaction is either *N1*-couplate or a mixture of *N1*- and *N1/N3*-couplates. The structures of the newly synthesized compounds were confirmed by IR and NMR spectroscopy.

Keywords: ferrocene, uracil, uracil derivatives, spectral analysis

Thesis contains: 54 pages, 30 figures, 7 schemes, 5 tables, 33 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Jasmina Lapić, PhD, Associate Professor

Technical support and assistance:

Reviewers:

1. Senka Djaković, PhD, Full professor (president)
2. Jasmina Lapić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Valerije Vrček, PhD, Full professor, FBF (member)
4. Igor Stuparević, PhD, Associate professor (substitute)

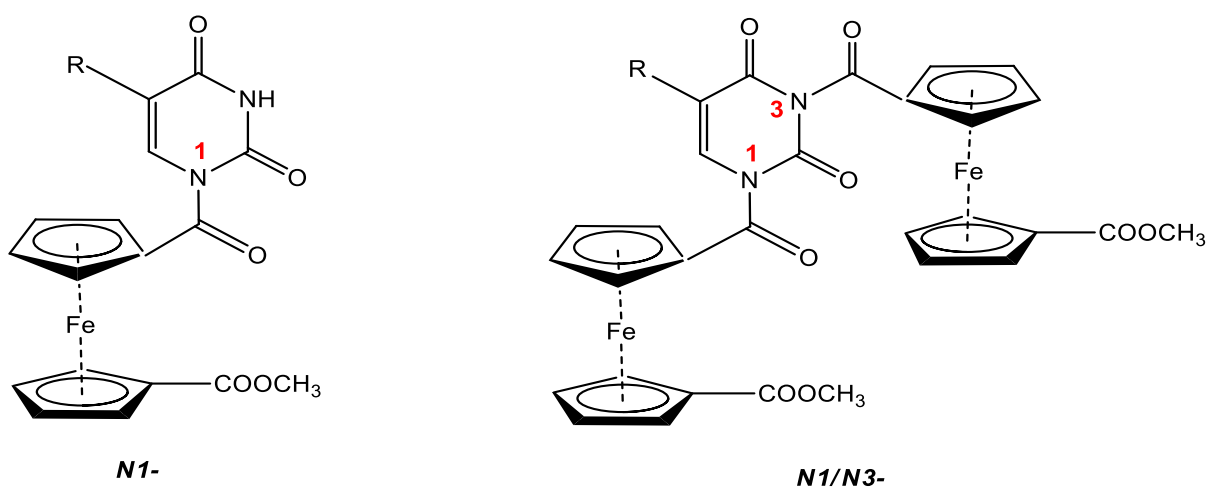
Thesis defended: 29. May 2024.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FEROCEN I FEROCENSKI DERIVATI.....	2
2.2. NUKLEOBAZE I DERIVATI NUKLEOBAZA	6
2.2.1. Analози uracila	8
2.3. FEROCENSKI DERIVATI NUKLEOBAZA	10
2.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH DERIVATA NUKLEOBAZA	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.2. METODE RADA	18
3.3. SCHEME ZA PRIPRAVU KOPULATA	21
3.3.1. Shema za pripravu 1'-metoksikarbonilferocenoil klorida (5)	21
3.3.2. Shema za pripravu 1'-metoksikarbonilferocenoil konjugata (6a-f i 7a-f)	22
3.4. PROTOKOLI ZA PRIPRAVU SPOJEVA.....	22
3.4.2. Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (2).....	23
3.4.3. Dimetil-ferocen-1,1'-dikarboksilat (3).....	23
3.4.4. 1'-Metoksikarbonilferocen-1-karboksilna kiselina (4).....	23
3.4.5. 1'-Metoksikarbonilferocen klorid (5)	23
3.4.6. 1'-Metoksikarbonilferocenoil-uracilni derivati (6a-f i 7a-f)	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA	30
4.1.1. Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (2).....	30
4.1.2. 1'-Metoksikarbonilferocenoil klorid (5).....	31
4.1.3. Sintaza 1'-metoksikarbonilferocenoil-N1-uracilnih derivata (6a-f) i 1'-metoksikarbonilferocenoil-N1/N3-uracilnih derivata (7a-f).....	32
4.1.4. Strukturna karakterizacija 1'-metoksikarbonilferocenoil-N1-uracilnih derivata (6a-f) i 1'-metoksikarbonilferocenoil-N1/N3-uracilnih derivata (7a-f).....	34
5. ZAKLJUČAK	42
6. LITERATURA	43

1. UVOD

Supstituirani analozi prirodnih nukleozida biološki su aktivni spojevi te pokazuju pozitivno djelovanje u sprječavanju diobe malignih stanica, dok neki pokazuju i antivirusna svojstva. (Ewald i sur., 2008). Organometalni derivati nukleobaza konjugati su koji sadrže metalocen i nukleobazu koji zbog svojih elektrofornih i bioaktivnih svojstava nalaze primjenu u medicinskoj i bioanalitičkoj kemiji (Kowalski, 2016). Ferocen je najpoznatiji i najbolje istražen metalocen, a njegovi derivati posjeduju različita biološka svojstva te su kao biološki aktivni spojevi zanimljivi u procesu istraživanja i razvoja novih lijekova (Chellan i Sadler, 2020). U prijašnjim istraživanjima u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost, HRZZ-IP-2016-06-1137: „Kvantokemijski dizajn, priprava i biološka svojstva organometalnih derivata nukleobaza” ispitano je nekoliko postupaka za pripravu *N*-ferocenoiliranih derivata nukleobaza, pri čemu karbonilna skupina povezuje heterociklički i organometalni dio. Rezultati istraživanja na uracilu i njegovim analogima ukazuju da u reakciji između nezaštićene baze i reaktanata za aciliranje nastaje *N1*- i/ili *N1/N3*-supstituiranih produkata što ovisi o uvjetima reakcije. Cilj ovog diplomskog rada priprava je organometalnih derivata nukleozida, biokonjugata 1'-metoksikarbonil ferocena i C5-supstituiranih derivata uracila s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (slika 1), te ispitivanje utjecaj esterske skupine u acilirajućem reagensu, 1'-metoksikarbonilferocenoil kloridu, na reakciju kopulacije. Za karakterizaciju strukture nastalih kopulata koristit će se IR, ^1H i ^{13}C NMR spektroskopija.



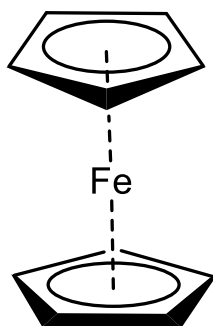
a; R = H, b; R = CH₃, c; R = F, d; R = Cl, e; R = Br, f; R = I

Slika 1. Biokonjugati 1'-metoksikarbonilferocenoila i C-5 derivata uracila

2. TEORIJSKI DIO

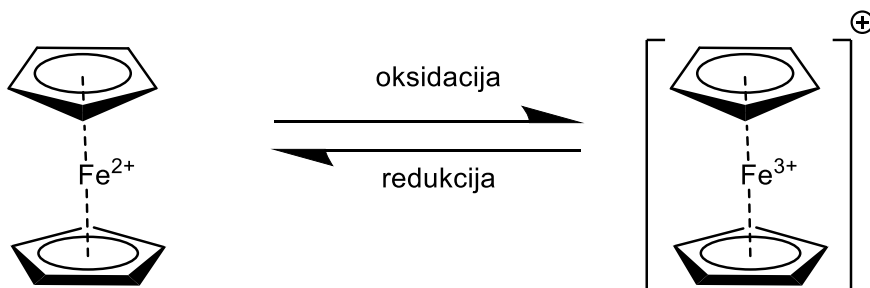
2.1. FEROCEN I FEROCENSKI DERIVATI

U proteklih nekoliko godina spojevi koji sadrže metal-ugljikove veze, poznati kao organometalni spojevi, privukli su značajnu pažnju znanstvenika zbog svoje jedinstvene kemijske strukture i bioloških aktivnosti. Ferocen, kemijska formula $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$, je najpoznatiji organometalni spoj koji pripada skupini metallocena koji sadrže karakterističnu „sendvič“ strukturu s dvije slobodno rotirajuće ciklopentadienilne jedinice koordinirane na središnji željezov atom Fe^{2+} , tvoreći tako stabilni kompleks (slika 2). Metalni centar jednako je udaljen od oba prstena, a sve su C–C veze jednake duljine. Istraživanja su pokazala kako su vodikovi atomi ciklopentadienilnih jedinica nagnuti prema željezu i tako se omogućuje bolje preklapanje orbitala željeza s π - orbitalama ciklopentadienilnih jedinica.



Slika 2. Struktura ferocena (Gritzner i Kuta, 1984)

Ferocen je otkriven 1951. godine i od tada se intenzivno istražuje radi svog aromatskog karaktera koji omogućuje funkcionalizaciju ciklopentadienilnih prstena. Stabilan je u vodi i na zraku, nije toksičan, lipofilan je te elektrokemijski aktivan pri čemu prikazuje reverzibilnu oksidaciju Fe^{2+} u Fe^{3+} (slika 3) (Gritzner i Kuta, 1984).



Slika 3. Prikaz oksidacijskih stanja željeza u ferocenu (Gritzner i Kuta, 1984)

Ferocen je posebno prepoznat kao siguran dodatak gorivima, ne uzrokujući onečišćenje okoliša ili opasnosti za zdravlje. Tvrdi se da, ako se koristi kao katalizator za

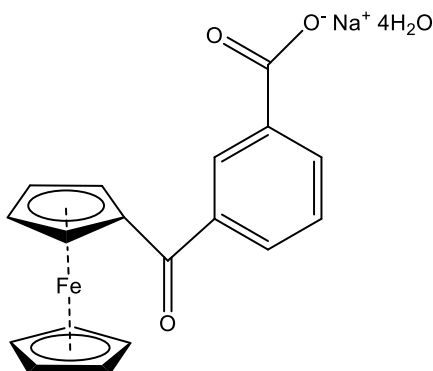
raketna goriva, može poboljšati brzinu izgaranja, smanjiti temperaturu ispušnih cijevi, može eliminirati dim, štedjeti energiju i smanjiti onečišćenje zraka (Gritzner i Kuta, 1984).

Zbog svog aromatskog karaktera i stabilnosti, ferocen je sličan benzenu, ali zamjenom benzena ferocenom u biološki aktivnim spojevima dolazi do promjene u kemijskim svojstvima te u biološkoj aktivnosti. Ferocen je čvrsti kristalinični spoj narančaste boje, koji posjeduje dijamagnetska svojstva. Njegova izražena stabilnost pri sobnoj temperaturi, otpornost na utjecaj zraka i vode te reverzibilne redoks karakteristike čine ga dobrim izborom kao polaznog materijala u sintezi razolikih ferocenil derivata čija biološka aktivnost se prepisuje redoks aktivnosti i sposobnosti stvaranja reaktivnih kisikovih oblika (engl. reactive oxygen species) (Singh i sur. 2019). Pojava mikroorganizama s rezistencijom na antibiotike velika je prijetnja ljudskom zdravlju te njihova pojava vodi k sve višim cijenama u zdravstvu. Rasprostranjenost takvih mikroorganizama smanjuje učinkovitost liječenja mnogih zaraznih bolesti. Stvaranje reaktivnih kisikovih oblika tijekom terapije s antibioticima, jedna je od novih strategija borbe protiv mikroorganizama. Reaktivni kisikovi oblici definiraju se kao vrlo reaktivne molekule koje sadrže kisik, poput superoksidnog aniona (O_2^-), vodikovog peroksida (H_2O_2) i hidroksilnih radikala (OH^\cdot). Aerobnim bakterijama potreban je kisik za respiraciju i oksidaciju nutrijenata potrebnih za stvaranje energije. Reaktivni kisikovi oblici stvaraju se endogeno, a njihovo stvaranje može se pospješiti egzogenim stresom. Stalno stvaranje i uklanjanje unutar staničnih reaktivnih kisikovih oblika ovisi o dobro uravnoteženom staničnom redoks sustavu. Oksidativni stres, koji uzrokuju reaktivni kisikovi oblici, može uzrokovati oštećenje makromolekula, poput proteina, DNA i lipida te tako uzrokovati promjene u biološkoj aktivnosti, poticati mutagenezu i naposljetku dovesti do stanične smrti. Kako bi se zaštitile od štetnih utjecaja reaktivnih kisikovih oblika, aerobne bakterije sadrže enzime, poput katalaza, koje mogu detoksicirati takve oblike, štoviše imaju i regulatorne mehanizme poput SOS regulona. Reguloni su grupe operona koje regulira zajednički regulacijski protein. Geni SOS regulona se eksprimiraju kada se DNA ošteti. Ti geni kodiraju za proteine uključene u popravak DNA. Stvaranje štetnih reaktivnih kisikovih oblika može doprinijeti staničnoj smrti bakterija uzrokovanih antibioticima. U metabolomičkoj analizi *E. Coli* koja je tretirana beta-laktamima i aminoglikozidima pokazalo se kako stanice pokazuju citotoksične promjene koje ukazuju na oksidativni stres (dvostruki lomovi u DNA, oksidacija nukleotida, visoka razina karboniliranih proteina). Zbog svojih antimikrobnih mogućnosti, reaktivni kisikovi oblici koriste se kao potencijalna antimikrobna strategija. Tretmani s visokim koncentracijama reaktivnih kisikovih oblika, rezultiraju moćnim i učinkovitim mikrobiocidnim alatom. Međutim, postoji opasnost radi potencijalnog toksičnog utjecaja na zdrave stanice i tkiva (Lam i sur., 2020).

Bioorganometalni spojevi povezuju organometalnu kemiju prijelaznih metala s biološki aktivnim molekulama u interdisciplinarno područje bioorganometalne kemije koja povezuje

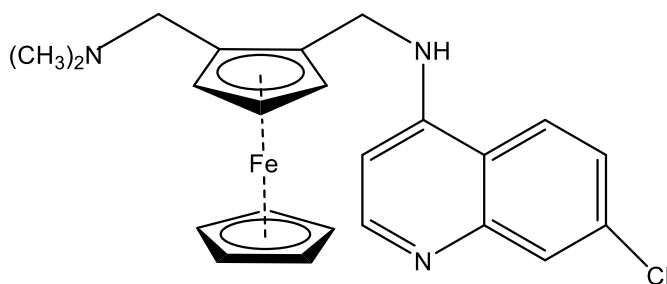
biologiju, biokemiju i kemiju s medicinom. Prednost ferocena nad ostalim metalocenima je to što sadrži atom željeza, dok neki drugi metaloceni sadrže teške metale. Željezo je esencijalni, netoksični element koji pomaže održavanju normalne funkcije tijela te je najzastupljeniji metal u ljudskom tijelu (Vessie, 2019). Najpoznatiji ferocenski kompleksi su feroceron, ferokin i ferocifen.

Feroceron (slika 4) je prvi ferocenski lijek dostupan na tržištu 70-ih godina prošlog stoljeća, a koristio se za liječenje deficijencije željeza. Korisnost ferocenilnih skupina nije ograničena samo na područje istraživanja protiv raka ili antibakterijskih sredstava, već i organometalni spojevi mogu djelovati i kao inhibitori enzima i kao antiparazitski i antifungalni agensi. Metaloceni, zbog svoje strukture imaju mogućnost ispunjavanja hidrofobne šupljine na način na koji to fenilna ili druga (hetero)aromska skupina ne može napraviti. Stoga lijekovi koji sadrže metalocene mogu biti moćniji inhibitori enzima od njihovih čisto organskih analoga (Patra i Gasser, 2017).



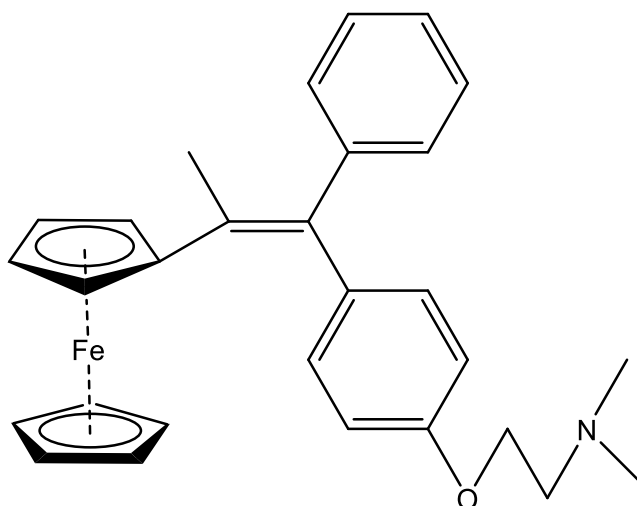
Slika 4. Struktura ferocerona (Patra i Gasser, 2017)

Ferokin (slika 5) je ferocenski derivat antimalarika klorokina. Ovaj spoj nalazi se u drugoj fazi kliničkih istraživanja. Biološka aktivnost ferokina temelji se na dva mehanizma, a to su stvaranje reaktivnih hidroksilnih radikala te nakupljanja u vakuolama parazita *Plasmodium falciparum*. Dokazano je kako je stvaranje hidroksilnih radikala inducirano ferokinom, dok se oni ne pojavljuju u slučaju klorokina. Također, ferokin, u odnosu na klorokin, ima bolju lipofilnost te elektrokemijsku aktivnost, što poboljšava biološku aktivnost ovog derivata (Biot i sur., 2018).



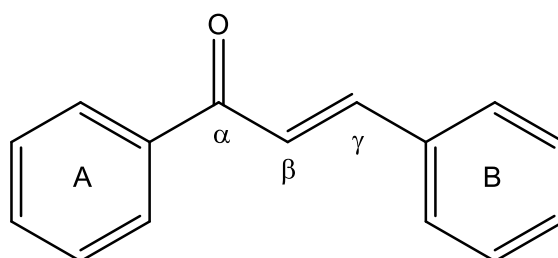
Slika 5. Struktura ferokina (Biot i sur.,2018)

Ferocifen (slika 6) je ferocenski derivat tamoksifena gdje je ferocenski prsten zamijenio fenilnu skupinu. Na stanicama raka dojke izazivaju nastajanje reaktivnih kisikovih oblika, a pokazuju i antiproliferativni učinak prema stanicama melanoma te su selektivni na zdrave stanice astrocita i melanocita. Mehanizam se temelji na tome da zbog redoks aktivnosti ferocenskog dijela molekule, mogu se oksidirati i stvoriti intermedijer koji je podložan napadu endogenih nukleofila (Jaouen i Vessieres, 2015).



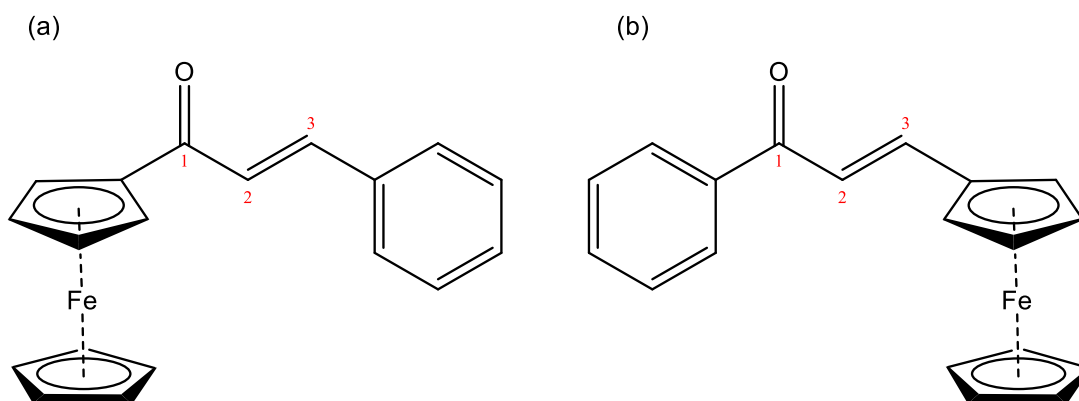
Slika 6. Struktura ferocifena (Jaouen i Vessieres, 2015)

Također postoje ferocenski derivati halkona. Halkoni su konjugirani sustavi, u kojima su dva aromatska prstena povezana s α,β -nezasićenim ketonom (slika 7). Mogu se pronaći u prirodi, a mogu se i sintetizirati. Općenito, halkoni su biološki aktivni spojevi koji, imaju antikancerogenu aktivnost prema stanicama raka dojke, inhibiraju određene enzime, antioksidansi su i posjeduju antimikrobna, protuupalna i antihepatotoksična svojstva. Oni služe kao prekursori za mnoge spojeve. (Alsina-Sánchez i sur., 2023).



Slika 7. Halkonski skelet s dva aromatska prstena, povezan sa α,β -nezasićenim ketonom (Alsina-Sánchez i sur., 2023)

Organometalni fragment može se uvesti u strukturu halkona kao prsten A ili kao prsten B. Takvi ferocenil halkoni podijeljeni su u dvije grupe koje se zovu sistem 1 i sistem 3. Ferocen kao prsten A odgovara sistemu 1, a ferocen kao prsten B odgovara sistemu 3 (slika 8).

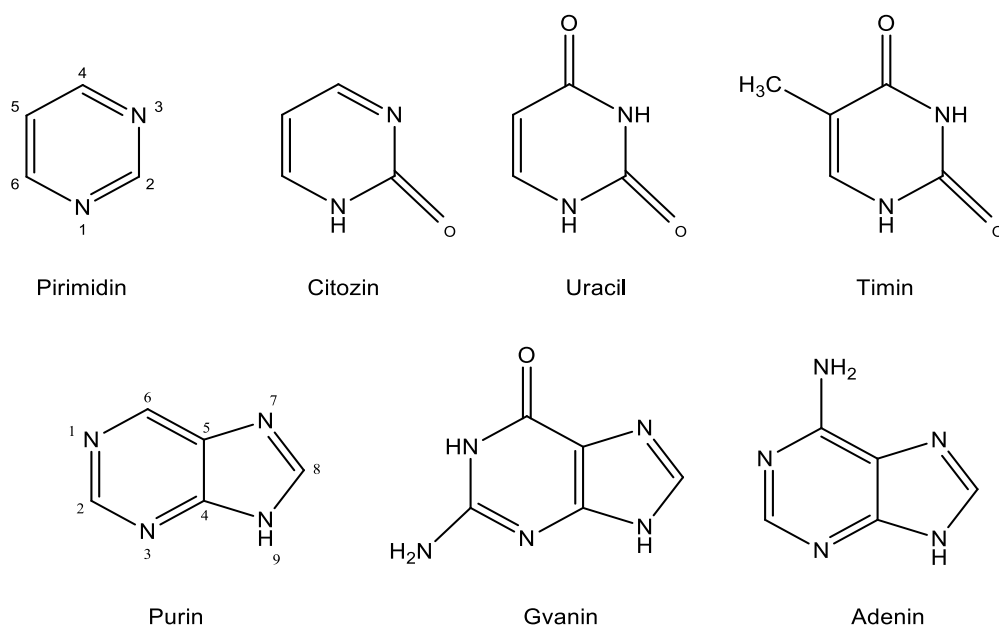


Slika 8. (a) Feroceniil halkoni sistema 1 i (b) feroceniil halkon sistema 3 (Alsina-Sánchez i sur., 2023)

Drugi aromatski supstituent također ima važnu ulogu za određivanje bioloških i kemijskih svojstava feroceniil halkona. Supstitucija s heterocikličkim spojevima pruža farmakološka i farmakokinetička svojstva te takvi spojevi predstavljaju dobre kandidate za daljnji razvoj kao potencijalni terapeutici. Supstitucija s heterocikličkim spojevima može utjecati na stupanj ionizacije spoja pri fiziološkom pH te tako utjecati na bazičnost i lipofilnost spoja. Sistem 1 feroceniil halkona pokazuje veću otpornost na oksidaciju u usporedbi sa sistemom 3. Međutim, feroceniil halkoni sistema 3 pokazali su bolju citotoksičnu aktivnost u odnosu na analoge sistema 1. Antikancerogena aktivnost derivata sistema 3 sugerira oksidativni mehanizam djelovanja (Alsina-Sánchez i sur., 2023).

2.2. NUKLEOBAZE I DERIVATI NUKLEOBAZA

Adenin, gvanin, uracil, timin i citozin prirodne su nukleobaze, oni su osnovni gradivni blokovi nukleinskih kiselina DNA i RNA. Vezani su na šećernu podjedinicu (2'-deoksiribožu u slučaju DNA ili na ribozu u slučaju RNA) pomoću *N*-glikozidne veze. Fosfatni esteri nukleozida su nukleotidi. Nukleotidi sudjeluju u biosintezi DNA i RNA, proizvodnji i prijenosu energije, djeluju kao intrastanični i interstanični prijenosni signali te sudjeluju u regulatornim kaskadama i u biosintezi proteina. Stvaranjem vodikovih veza između gvanina i citozina te adenina i timina nastaje dvostruka uzvojnica DNA. Citozin, uracil i timin pirimidinske su baze, a adenin i gvanin purinske baze (slika 9) (Pu i sur., 2018).



Slika 9. Pirimidin i purin te najvažnije baze (Pu i sur., 2018).

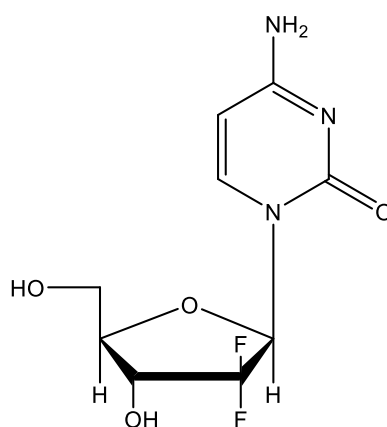
Purin kao takav, ne postoji u prirodi, no mnogi derivati purina nalaze se u prirodnim izvorima. Nastaju kao produkt metabolizma i kao produkt biotransformacija. Mokraćna kiselina i ksantini nastaju kao produkt metabolizma purina. Ksantanski alkaloidi, od kojih su najpoznatiji kafein i teobromin, posjeduju razna biološki aktivna svojstva zbog kojih imaju široku primjenu u medicini. Inhibiraju aktivnost fosfodiesteraza, pokazuju protuupalni učinak, antagonisti su adeninskih receptora. Derivati nukleobaza djeluju kao diuretici, stimulatori središnjeg živčanog sustava, imunomodulatori, a neki pokazuju i antitumorsku aktivnost (Singh i sur., 2018).

Pirimidini su alkaloidi koji također imaju antiparazitska, antihistaminska i antitumorska svojstva. Pokazuju *in vitro* aktivnost prema virusima, imaju anti-Hiv aktivnost, nailaze i na široku primjenu u kardiovaskularnoj medicini te su služili kao bitan alat u proučavanju strukture i funkcije kalcijevih kanala (Kappe, 1993).

Modifikacijom nukleobaza nastaju njihovi analozi koji mogu biti biološki aktivni. Nastali derivati imaju veliku primjenu u istraživanju lijekova te se koriste kao antivirusni lijekovi i kemoterapeutici. Analozi se mogu pripremiti *N*-alkiliranjem, metiliranjem, otvaranjem prstena, halogeniranjem, zaštitom hidroksilnih i amino skupina te raznim modifikacijama šećera i heterocikličke baze (Malthum i sur., 2017).

Jedan od poznatijih antitumorskih lijekova je gemcitabin, kemijski analog nukleozida deoksicitidina (slika 10). Na C2- atomu deoksicitidina, dva atoma vodika zamijenjena su s dva atoma fluora. Gemcitabin se koristi za liječenje raka gušterače, dojke i pluća. Međutim, unutar tijela, enzim citozinske deaminaze pretvara ga u 2',2'-difluorodeoksieuridin, neaktivni derivat. Brza metabolizacija enzimom i brzo izlučivanje putem bubrega smanjuju njegovu učinkovitost,

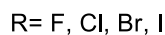
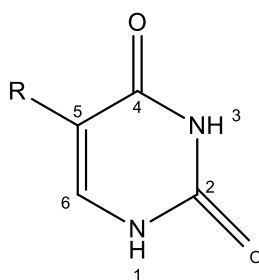
zbog čega se preporučuje uzimanje visokih doza gemcitabina, što može rezultirati gastrointestinalnom toksičnošću. Osim toga, mnogi karcinomi razvijaju otpornost na gemcitabin. Kako bi se poboljšala njegova citotoksična aktivnost i metabolička stabilnost, potrebne su inovativne tehnologije. Za rješavanje ovih nedostataka razvijeno je mnogo novih metoda, poput stvaranja prolijekova. Prolijek je biološki neaktivni oblik glavnog lijeka koji unutar tijela zahtijeva kemijsku transformaciju kako bi oslobodio lijek, često s poboljšanim oslobađanjem lijeka u usporedbi s originalnom molekulom. Gemcitabin, kao prolijek, unutar stanice pretvara se u difluorodeoksicitidin monofosfat pomoću enzima deoksicitidin kinaze. Taj monofosfat zatim se pretvara u dva aktivna metabolita: gemcitabin difosfat (dFdCDP) i gemcitabin trifosfat (dFdCTP). dFCTP natječe se s dCTP za ugradnju u DNA lanac. Kada se ugradi u lanac, DNA polimeraza staje i elongacija se zaustavlja (Singh, 2020).



Slika 10. Struktura gemcitabina (Singh,2020)

2.2.1. Analози uracila

Uracil je bezbojna, kristalna nukleobaza čiju strukturu čini heterociklički aromatski prsten s dvije keto skupine na C2- i C4- položaju. Uracil i njegovi derivati imaju važnu ulogu u istraživanju lijekova sa širokim spektrom biološke aktivnosti. Derivati uracila imaju antivirusna i antitumorska svojstva, a neki pokazuju i antimikrobno djelovanje. Analози uracila s halogenom supstitucijom na položaju C5- (slika 11) predstavljaju važnu klasu spojeva zbog njihove antiviralne i mutagene aktivnosti. Skupina na C5- položaju povoljna je za kemijske transformacije, a selektivnost antivirusnog djelovanja raste s povećanjem veličine supstituenata (Blewett i sur., 2001).



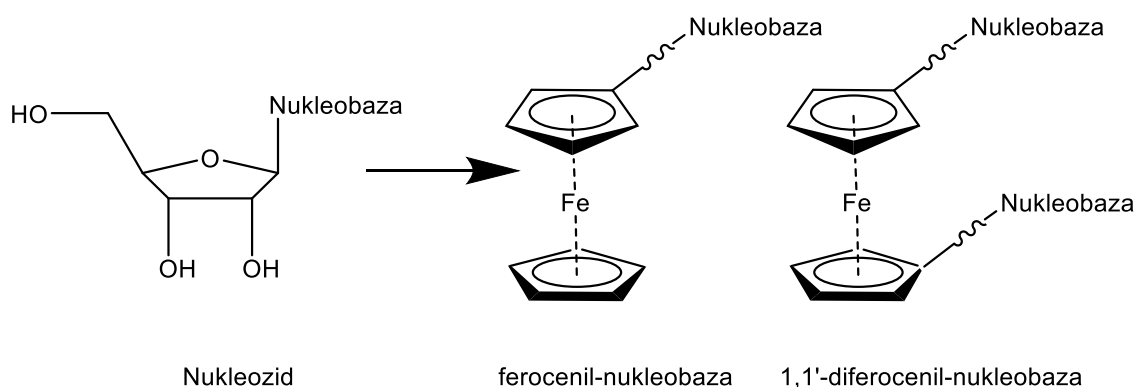
Slika 11. Struktura C5-supstituiranih derivata uracila (Blewett i sur., 2001)

Antivirusni potencijal derivata uracila temelji se na inhibiranju ključnog koraka u replikaciji virusa HIV-a, hepatitisa B i C te herpes virusa. Mehanizam se temelji na pretvorbi 5-fluorouracila u 2'-deoksi-5-fluorouridin-5'-dihidrogen fosfata nakon čega dolazi do inhibicije enzima timidilat sintaze, što kao rezultat blokira replikaciju i diobu stanica (Abdel-Mottaleb i Abdel-Mottaleb, 2016). 5-fluorouracil koristi se kao lijek za liječenje oboljelih od raka dojke i raka jetre. Budući da je 5-fluorouracil slabo toksičan, tek kada se metabolizira, primjećuje se njegova biološka aktivnost. Uz inhibiciju timidilat sintaze, razmatrano je još nekoliko mogućih mehanizama za citotoksično djelovanje 5-fluorouracila, a jedan od puteva uključuje aktivaciju 5-fluorouracila u ribonukleozid, 5-FUrd te njegovu naknadnu fosforilaciju i ugradnju u RNA. Osim toga, stupanj inhibicije procesiranja uzrokovan uključivanjem 5-fluorouracila u nuklearnu RNA korelirao je s gubitkom klonogenog preživljavanja. Kada su stanice koje sadrže 5-fluorouracil označenu preribosomsku RNA (prRNA) izložene bakterijskoj RNA polimerazi, dolazi do degradacije prRNA i formiranja dvostrukih lančanih RNA, uz povećanje stanične smrtnosti. Ugrađivanje 5-fluorouracila u tRNA, također doprinosi poboljšanju smrtnosti stanica bakterija i sisavaca. tRNA zamjene unutar antikodon regije bile su puno manje učinkovite u poticanju sinteze polipeptida, nego što su to bile netaknute tRNA molekule. Također je uključivanje 5-fluorouracila inhibiralo aktivnost tRNA metiltransferaze.

5-Bromouracil i 5-klorouracil povezani su s upalima zbog prisutnosti u upalnom tkivu. 5-klorouracil je sintetiziran 50-ih godina prošlog stoljeća. Rani su eksperimenti pokazali kako 5-klorodeoksiribonukleozid pokazuje antimikrobnu aktivnost prema bakteriji *E. Coli* tako da se ugrađuje u DNA. Oni također inhibiraju timidilat sintazu. Kada su stanice sisavaca izložene ovom spoju, osim njegove ugradnje u DNA, on također izaziva veću podložnost mutacijama (Morris, 1993).

2.3. FEROCENSKI DERIVATI NUKLEOBAZA

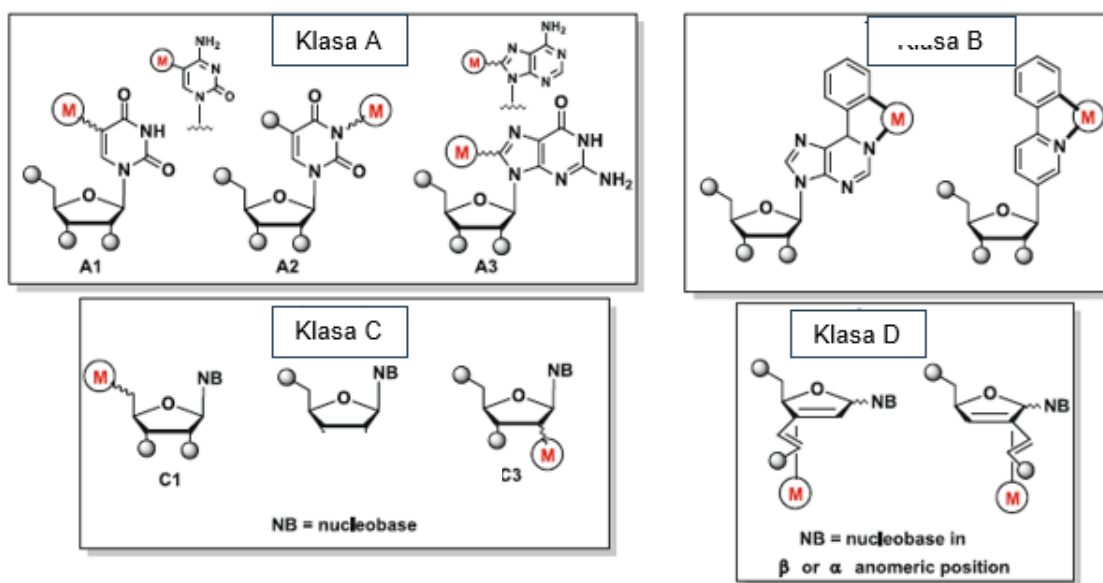
Od otkrića ferocena, ferocenilni je fragment vezan uz mnoge biološke spojeve, poput šećera, peptida i nukleozida. Ferocen se konjugira i s nukleobazama radi poboljšanja biološke aktivnosti i za razvoj novih terapeutika. U ferocenilnim derivatima nukleobaza, ferocenska podjedinica zamjenjuje šećerni dio u nukleozidu te je kovalentno povezana s različitim skupinama vezanih na nukleobazu. Funkcionalizacijom oba prstena ferocena mogu se pripraviti 1,1'-diferocenski derivati (slika 12). Nukleobaze mogu imati različitu biološku aktivnost, formiraju parove baza u RNA i DNA preko vodikovih veza i hidrofobnih interakcija te tako imaju antitumorsku i antivirusnu aktivnost. Ferocenski dio, zahvaljujući svojim elektrokemijskim svojstvima, može graditi strukturnu prenosnicu u biomolekulama. Zbog tih svojstava, takvi derivati imaju potencijalnu terapijsku primjenu te se koriste kao elektrokemijski i biokemijski senzori (Kowalski, 2016).



Slika 12. Osnovna struktura ferocenil- i 1,1'-diferocenil nukleobaza (Kowalski, 2016)

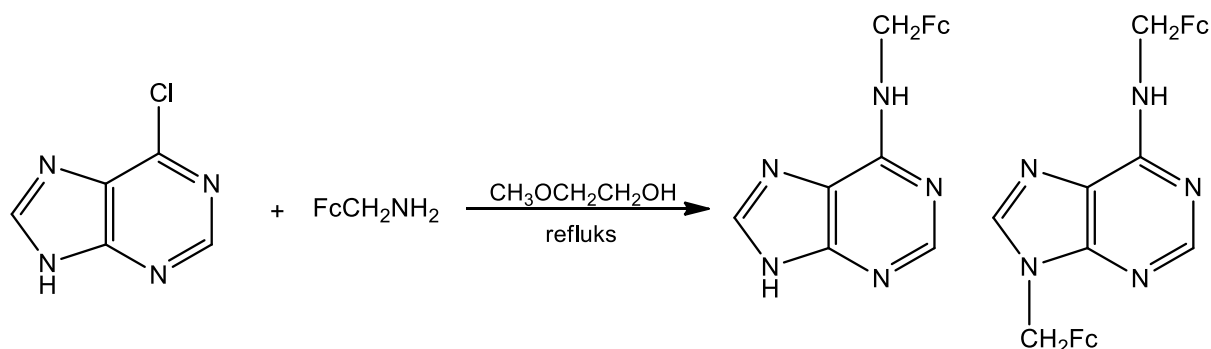
Organometalna derivatizacija nukleozida direktno utječe na njihovu molekularnu geometriju, dipolni moment, elektrostatski potencijal, topljivost u vodi. Ovisno o metalu koji se koristi u modifikaciji nukleozida, oni mogu poprimiti nova svojstva poput redoks aktivnosti, radioaktivnosti, jedinstvenog IR signala te sposobnosti ulaska u nove načine sparivanja baza. Ta nova svojstva omogućuju im korištenje kao potencijalnih novih lijekova te luminiscentne i IR probe. Postoji nekoliko klasa organometalnih derivata nukleozida (slika 13). Spojevi klase A predstavljaju konjugate u kojima se organometalni entitet M veže izravno ili putem veznika na C5- (klasa A1) i N3 (klasa A2) položaje pirimidinske baze ili na C8- (klasa A3) položaj purinske baze. Spojevi klase B predstavljaju slučajeve u kojima je visoko modificirana nukleobaza unesena, međutim komponenta šećera nukleozida ostaje nepromijenjena. U spojevima klase C1-, C2- i C3-, entitet M povezan je s ribozom na položajima C5'-, C3- i C2'-. U spojevima klase D, tri-karbonoil-željezo povezano je π -vezama s odgovarajuće

modificiranom ribozilnom komponentom nukleozida. Također, postoje derivati koji ne odgovaraju striktno ovim podjelama (Kowalski, 2021).



Slika 13. Organometalni nukleozidi klase A, B, C, D (Kowalski, 2021)

N-supstituirani ferocenilmetil-adenin bio je među prvim sintetiziranim derivatima ferocena s nukleobazama. Dobiven je reakcijom nukleofilne supstitucije klorpurina i metilaminoferocena. Nastala je smjesa imala dva produkta, većinski produkt *N*6-ferocenilmetil adenina i *N*6,9-diferocenilmetil-adenina (shema 1). Također je, na sličan način, sintetiziran i ferocenilaminoalkil-timinski derivat. On je u elektrokemijskim istraživanjima pokazao reverzibilnu jednoelektronsku oksidaciju i sposobnost vezanja na molekule DNA. Nakon toga, sintetizirali su se citozinski, timinski i uracilski derivati metilferocena, dok je reakcija s gvaninom bila neuspješna zbog loše topljivosti nukleobaze u vodi (Chen, 1980).

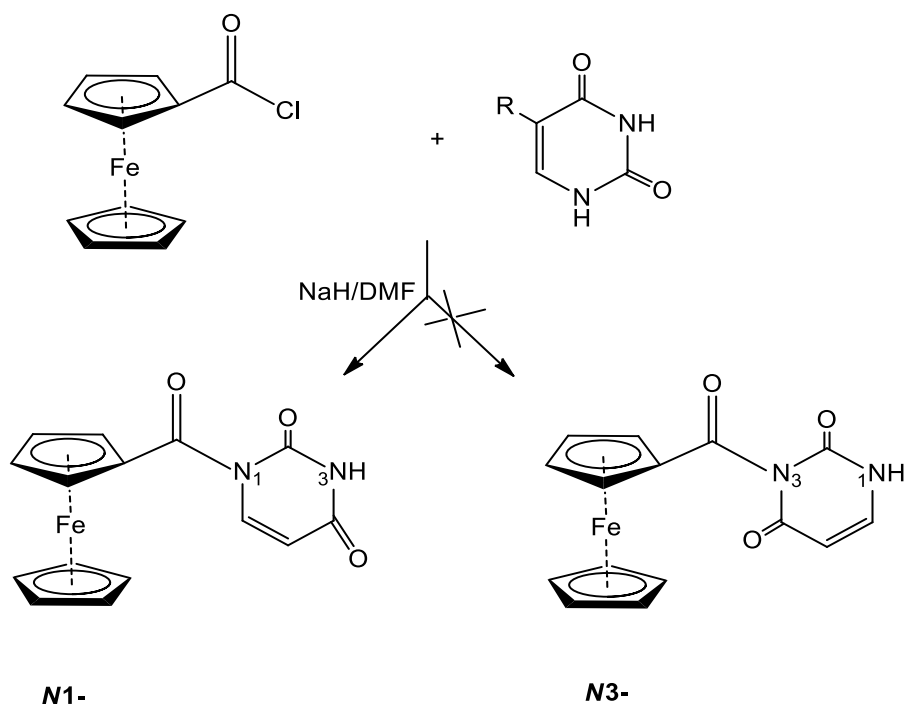


Shema 1. Reakcija derivata ferocena i derivata adenina (Chen, 1980)

Između organometalnog i heterocikličkog fragmenta, alkilna je poveznica postupno modificirana uvođenjem keto skupine. Tako nastaju ferocenoil-alkilirani derivati nukleobaza.

Propionilferocenil-adenin sintetiziran je reakcijom 3-brompropionilferocena i adenina u bazičnim uvjetima pri čemu je nastao *N9* izomer. Taj spoj podvrgnut je intenzivnom elektrokemijskom istraživanju kao supramolekulski sustav, sposoban vezati se na površinu uracilom modificirane elektrode. Primijećeno je formiranje vodikovih veza između adenina i uracila kao i prijenos elektrona s ferocenske podjedinice na površinu elektrode te iznimna stabilnost sustava.

Sintetizirani su konjugati ferocena s timinom, uracilom i 5-fluorouracilom, pri čemu je karbonilna skupina korištena kao razmaknica između ferocena i baze. Ta kopulacija nukleobaza i ferocenoil klorida (FcCOCl) ili ferocenoil-etil-karbonata (FcCOOEt) izvedena je uz korištenje deprotonirajućeg agensa natrijeva hidrida (NaH) u dimetilformamidu (DMF) (shema 2). Ovim postupkom, ferocen se regioselektivno vezao na *N1*-položaj pirimidinske nukleobaze bez potrebe zaštite *N3*-položaja nukleobaze. Redoks potencijali ferocenoil nukleobaza određeni su cikličkom voltametrijom i kvantno-kemijskom metodom. Eksperimentalne i izračunate vrijednosti redoks potencijala pokazuju kako su konjugati bolji oksidansi od roditeljskog ferocenskog sustava. Preliminarna ispitivanja pripremljenih konjugata pokazuju potencijalnu biološku aktivnost (Lapić i sur., 2015).

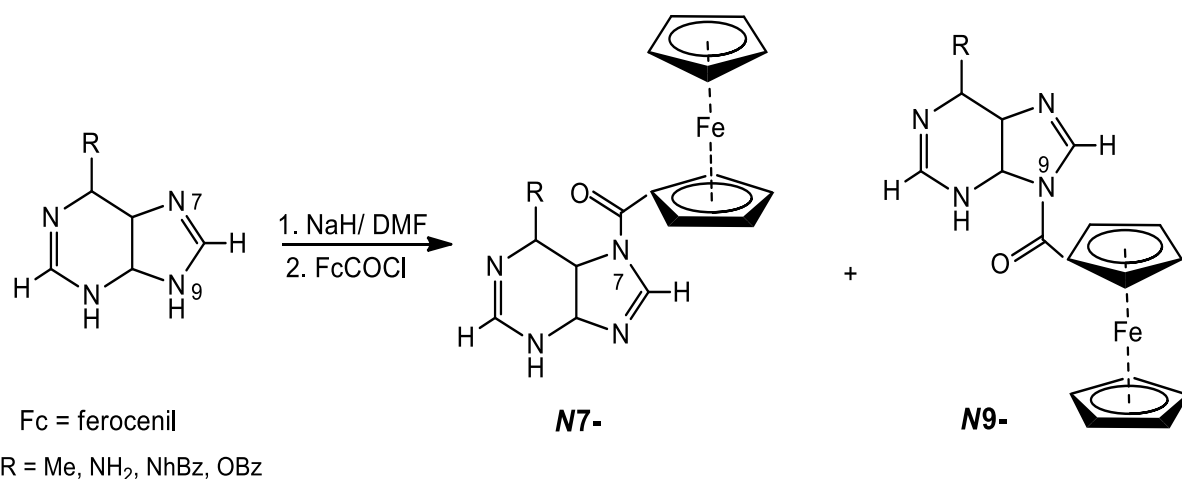


Shema 2. Regioselektivno *N1*-aciliranje pirimidinskih nukleobaza (Lapić i sur., 2015)

Ferocenski derivati nukleobaza mogu se stvoriti na različite načine, osim onih već navedenih. Ti derivati mogu se sintetizirati kroz reakcije kao što su Michaelova nukleofilna

adicija, Mitsunobu reakcija s trifenil fosfinom (PPh₃), paladijem katalizirane reakcije unakrsnog spajanja te bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija (CuAAC), gdje se uvodi triazolni prsten kao poveznica između dva fragmenta (Ewald i sur., 2008). Odabir određenog reakcijskog puta omogućuje prilagodbu svojstava kopolata i željenih funkcionalnih skupina u molekulskom mostu. Također, mogućnost naknadne kemijske transformacije omogućuje dodatnu prilagodbu svojstava dobivenih derivata (Chen, 1980).

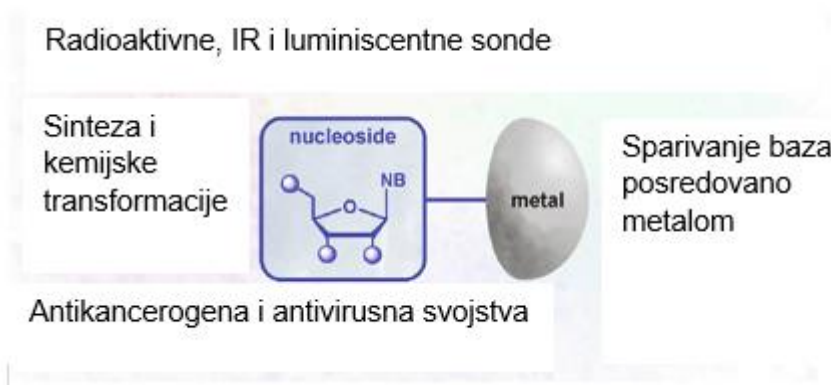
Toma i suradnici su u reakcijama adeninskog aniona sa supstitucijom na položaju N6 i ferocetil klorida pokazali kako dolazi do formiranja dva regioizomerna produkta, a to su N7 i N9 ferocetilirani adenini (shema 3), a nikada ne nastaju N1-, N3- ili N6- produkti. Koristeći različite supstituente na C-6 položaju purinskog prstena, može se utjecati na omjer izomera. Kada postoji nesupstituirani purin, regioselektivnost ovisi o elektrokemijskim svojstvima poput nukleofilnosti i elektrofilnosti. Regioselektivnost reakcije iznosi 60 % što ukazuje kako je formacija N7- i N9- izomera kompetitivni proces te kako se adeninski anion ponaša kao nukleofil s dva kompetitivna reakcijska centra na položajima N7- i N9-. N7- Atom je nukleofilniji od N9- atoma u svim sintetiziranim adeninskim derivatima, što znači kako je N-7 dušik u adeninskom prstenu reaktivniji. Međutim, dobiveno je više N9- produkata, što govori kako, osim intrinzične nukleofilnosti, omjer produkata ovisi o steričkom utjecaju supstituenta na N6- položaju s trendom povećanja omjera N9/N-7, s povećanjem veličine supstituenta. Pokazano je da kada na C6- položaju postoji samo vodikov atom, tada prevladava N-7 produkt (Toma i sur., 2022).



Shema 3. Sinteza ferocenskih derivata različito supstituiranih purinskih nukleobaza (Toma i sur., 2022)

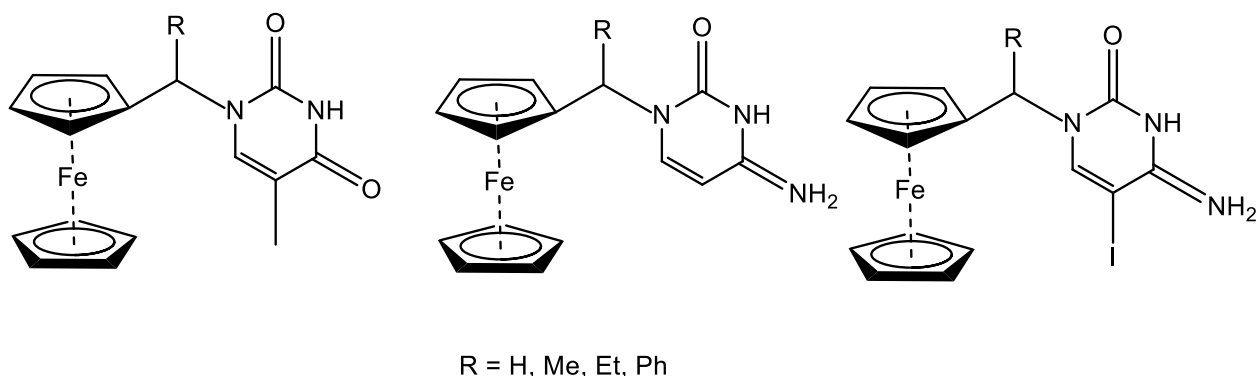
2.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH DERIVATA NUKLEOBAZA

Ferocenil-nukleobaze privlače sve veću pažnju istraživačke zajednice zbog njihove potencijalne primjene u biologiji i farmaciji (slika 14). Brojne publikacije detaljno opisuju sintezu ovih spojeva, elektrokemijsku analizu te karakterizaciju bioloških svojstava u *in vitro* i *in vivo* sustavima. *In vitro* biološka ispitivanja pokazala su raznovrsne aktivnosti ferocenskih nukleobaza, uključujući citotoksičnost prema tumorskim stanicama, antiparazitsko djelovanje, antibakterijsku aktivnost te sposobnost stvaranja reaktivnih vrsta kisika (ROS). Osim toga, neki od tih spojeva manifestirali su antitumorsku aktivnost i u *in vivo* modelima (Simenel i sur., 2009).



Slika 14. Prikaz svojstava i primjene derivata nukleozida u biologiji i farmaciji (Kowalski, 2021)

Jedan od istraživanih spojeva, *N1*-ferocenilmetil-timin, pokazao je značajnu inhibiciju rasta tumorskih stanica adenokarcinoma dojke i Lewisovog karcinoma pluća. Kombinacija tog spoja s ciklofosfamidom pokazala je sinergijsko inhibicijsko djelovanje na stanice Lewisovog karcinoma pluća u usporedbi sa samim ciklofosfamidom (slika 15) (Simenel i sur., 2009).

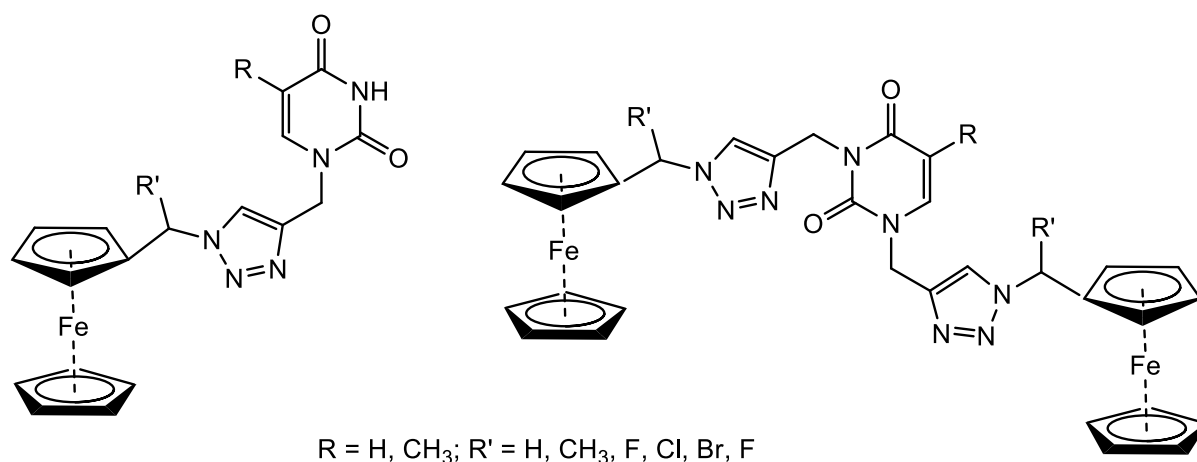


Slika 15. Ferocenski derivati timina, adenina, citozina i jodocitozina te njihova iskorištenja (Simenel i sur., 2009)

Istraživanja su proširena na ferocenske 1,2-nukleozidne analoge s hidroksialkilmnom skupinom. Ti spojevi ispitivani su kao citostatici *in vitro* na stanicama T-limfocitima i stanicama raka grlića maternice, pokazujući citotoksičnost prema tim stanicama (Nguyen i sur., 2014).

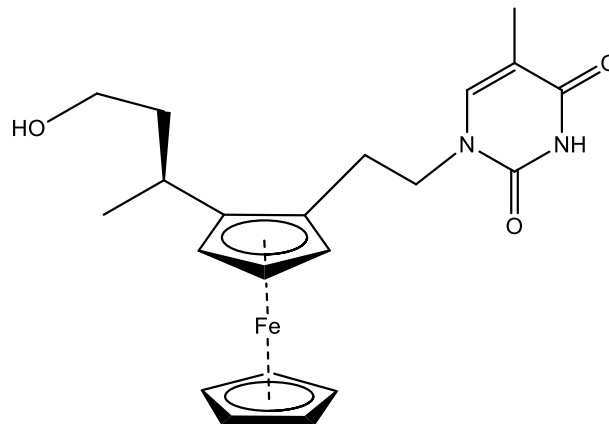
Sintetizirani su i ferocenski derivati purina i purinskih izostera s triazolnim prstenom kao poveznicom. Neki od ovih spojeva pokazali su dobru toksičnost prema stanicama kolorektalnog adenokarcinoma, ali istovremeno manifestirali su značajnu toksičnost prema stanicama humanih fibroblasta (Rep i sur., 2020).

Analize mono- i bis-ferocenilnih derivata uracila pokazale su bolju antiproliferativnu aktivnost bis-ferocenilnih spojeva u usporedbi s mono-supstituiranim analogama. Ovi spojevi selektivno su djelovali na stanicama kolorektalnog adenokarcinoma i Burkittova limfoma, uzrokujući indukciju reaktivnih kisikovih skupina, apoptoze i mitohondrijsku disfunkciju. Utjecaj biomolekule konjugirane s ferocenom i skupine u prenosnici između dva fragmenta, utječu na elektrokemijska i biološka svojstva derivata te su od velike važnosti u dizajnu novih molekula temeljenih na ferocenu. Elektronska struktura metalocena, skupine na molekulskom mostu te položaj supstitucije na heteroatomskom prstenu, utječu na elektrokemijsko ponašanje molekula te na različitu biološku aktivnost (slika 16) (Djaković i sur., 2021).



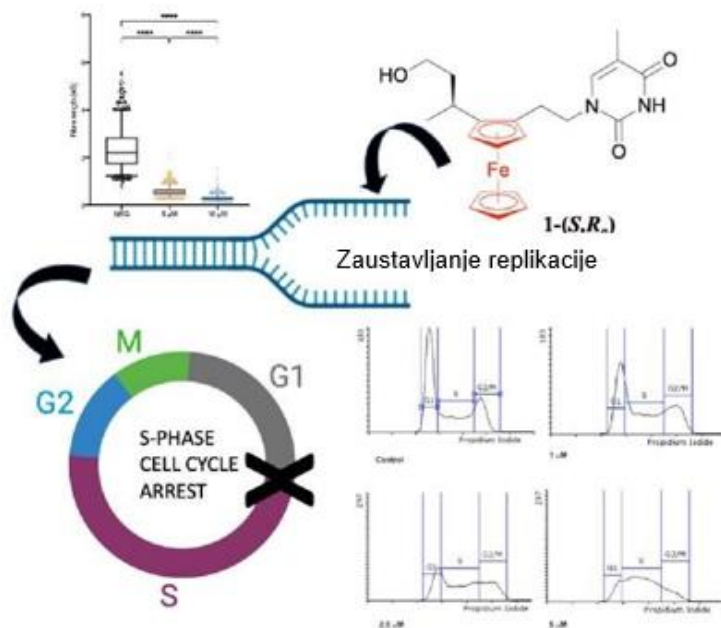
Slika 16. Prikaz strukture mono- i bis-ferocenskih derivata uracila s triazolnom poveznicom (Djaković i sur., 2021)

Rana i suradnici sintetizirali su ferocennukleozid 1-(*S,R_p*) punog imena (*S,R_p*)-1-[α -metil-(3-(hidroksi)propil)]-2-[(timinil)etil]-ferocen. (slika 17) koji se pokazao citotoksičnim prema stanicama dukalnog adenokarcinoma gušterače i to prema staničnim linijama koje su rezistentne prema gemcitabinu (Rana i sur., 2022).



Slika 17. Struktura ferocennukleozida 1-(S,R_p) (Rana i sur, 2021)

Biokemijska istraživanja pokazala su kako mehanizam djelovanja nukleozidnog analoga (1-(S,R_p)) uzrokuje indukciju lomova jednostrukog lanca DNA u novo sintetiziranoj DNA, što rezultira stresom replikacijske vilice, zadržavanjem u S-fazi i apoptozom (slika 18). U tim spojevima, petočlani ciklopentadienilni prsten ferocena djeluje kao bioizoster furanoznog prstena u nukleozidu. Razvijeni spoj sadrži timin i hidroksialkili dio povezan s ferocenom te je ustanovljeno kako su oba dijela potrebna za željenu citotoksičnost. Zbog svoje učinkovitosti i aktivnosti u stanicama koje su rezistentne na gemcitabin i novog načina djelovanja, 1-(S,R_p) je obećavajući kandidat za razvoj novih tretmana za liječenje dukalnog adenokarcinoma gušterače (Rama i sur, 2022)



Slika 18. Mehanizam djelovanja 1-(S,R_p) (Rama i sur, 2022)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Acetonitril (CH_3CN) ($t_v = 82\text{ }^\circ\text{C}$) i dioksan ($t_v = 101\text{ }^\circ\text{C}$) destiliraju se na bezvodnom magnezijevom sulfatu te prebace u tikvicu s molekulskim sitima (4 \AA) do upotrebe. Ostali kupovni reagensi i kemikalije korišteni su bez pročišćavanja. Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina i u bezvodnoj sredini. Od laboratorijskih uređaja korišteni su analitička vaga, IR spektrometar Bruker Alpha, spektrometar Varian INOVA i UV lampa.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada

NAZIV	FORMULA	PROIZVOĐAČ
2-klorbenzoil klorid	$\text{C}_7\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, SAD
Aluminijev klorid	AlCl_3	Sigma-Aldrich, SAD
Acetonitril	CH_3CN	Kemika, Hrvatska
Trietilamin	$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$	Thermo Fisher Scientific, SAD
Diklormetan	CH_2Cl_2	PBF, Hrvatska
Aceton	CH_3COCH_3	PBF, Hrvatska
Piridin	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$	Kemika, Hrvatska
Oksalil klorid	$\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$	Sigma-Aldrich, SAD
Dimetilformamid	$(\text{CH}_3)_2\text{NC}(\text{O})\text{H}$	Kemika, Hrvatska

Tablica 2. Popis korištenih nukleobaza

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	PROIZVOĐAČ
5-klorouracil, 98 %	$\text{C}_4\text{H}_3\text{ClN}_2\text{O}_2$	TCl, Japan
5-jodouracil, 97 %	$\text{C}_4\text{H}_3\text{IN}_2\text{O}_2$	Alfa Aesar, SAD
5-bromouracil, 98 %	$\text{C}_4\text{H}_3\text{BrN}_2\text{O}_2$	Alfa Aesar, SAD
5-fluorouracil, 97 %	$\text{C}_4\text{H}_3\text{FN}_2\text{O}_2$	TCl, Japan
Uracil, 98 %	$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$	TCl, Japan
Timin, 98 %	$\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$	TCl, Japan

3.2. METODE RADA

Reakcijski tijek pratio se metodom tankoslojne kromatografije (slika 19). Ta metoda služi za razdvajanje smjesa. Provodi se na pločama presvučenim slojem adsorbensa koji služi kao stacionarna faza. Nakon dodatka uzorka, ploča se stavlja u sustav otapala, odnosno u mobilnu fazu. Različiti analiti razdvajaju se različitom brzinom i tako se postiže separacija uzorka. Ta metoda može se koristiti za praćenje napretka reakcije, za identifikaciju spojeva prisutnih u uzorku te za određivanje čistoće uzorka. Separacija spojeva temelji se na razlici u polarnosti, polarniji spoj stupa u jače interakcije sa silika gelom te je njegova R_f vrijednost tada manja (Jumde i Gurnule, 2019). Tankoslojna kromatografija provedena je na pločama 60F-254 presvučenim slojem silika gela (Merck) u odgovarajućem sustavu otapala. Nakon provedene tankoslojne kromatografije svih reakcijskih smjesa u sustavu diklormetan:aceton = 10:0.2, izmjerene su R_f vrijednosti produkata na pločicama silika gela.



Slika 19. Tankoslojna kromatografija

Za pročišćavanje dobivenih produkata korištena je preparativna tankoslojna i kolonska kromatografija. Preparativna tankoslojna kromatografija (slika 20) provedena je na staklenim pločama prevučeni silika gelom, (Merk, Kisagel 60 HF25), a za mobilnu fazu korišten je sustav otapala diklormetan/aceton = 10:0.1.



Slika 20. Preparativna tankoslojna kromatografija

Kromatografija u koloni (slika 21) provedena je na silika gelu Fluka, 0.063–0.2 mm. Staklene kolone punjene su pod utjecajem gravitacijske sile, a kao eluens služio je sustav $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COCH}_3 = 10:0.1$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COCH}_3 = 10:0.2$ te čisti CH_2Cl_2 .



Slika 21. Kromatografija u koloni

Svi FTIR-spektri snimljeni su pomoću Brukerovog ALPHA-FT-IR-spektrofotometra i odgovarajućeg računalnog programa. Spektri $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ snimljeni su na spektrometru Bruker Avance od 300 i od 600 MHz. Princip rada nuklearne magnetske rezonancije bazira se na tome da ako se jezgra atoma smjesti u jako vanjsko magnetsko polje te bude izložena elektromagnetskom pulsu, ona će rezonirati na specifičnoj frekvenciji tog zračenja. Tako se dobiva spektar koji daje informacije o strukturi uzorka koji se promatra (Nemet, 2019). Svi uzorci otopljeni su u CDCl_3 i DMSO-d_6 i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici od 5 mm. Kemijski

pomaci (δ) u $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS, δ 0,0 ppm), a konstante sprege (J) u hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije asignirane su na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprege H–H.

Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

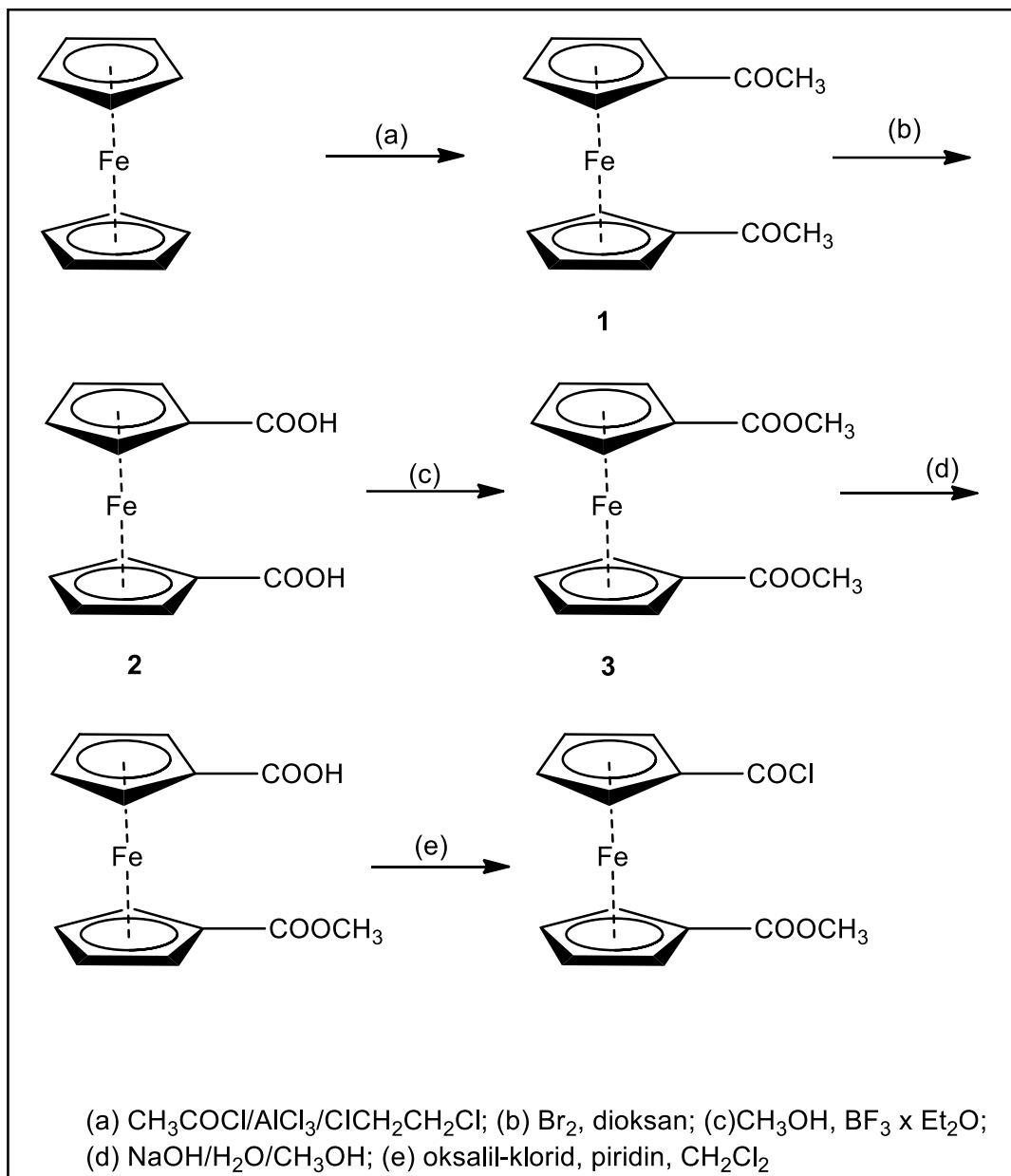
IR-spektri: ν = rastezanje (stretching), δ = deformacije (bending), j = jaka vrpca, sr = srednja vrpca, š = široka vrpca.

$^1\text{H-NMR}$ -spektri: s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet.

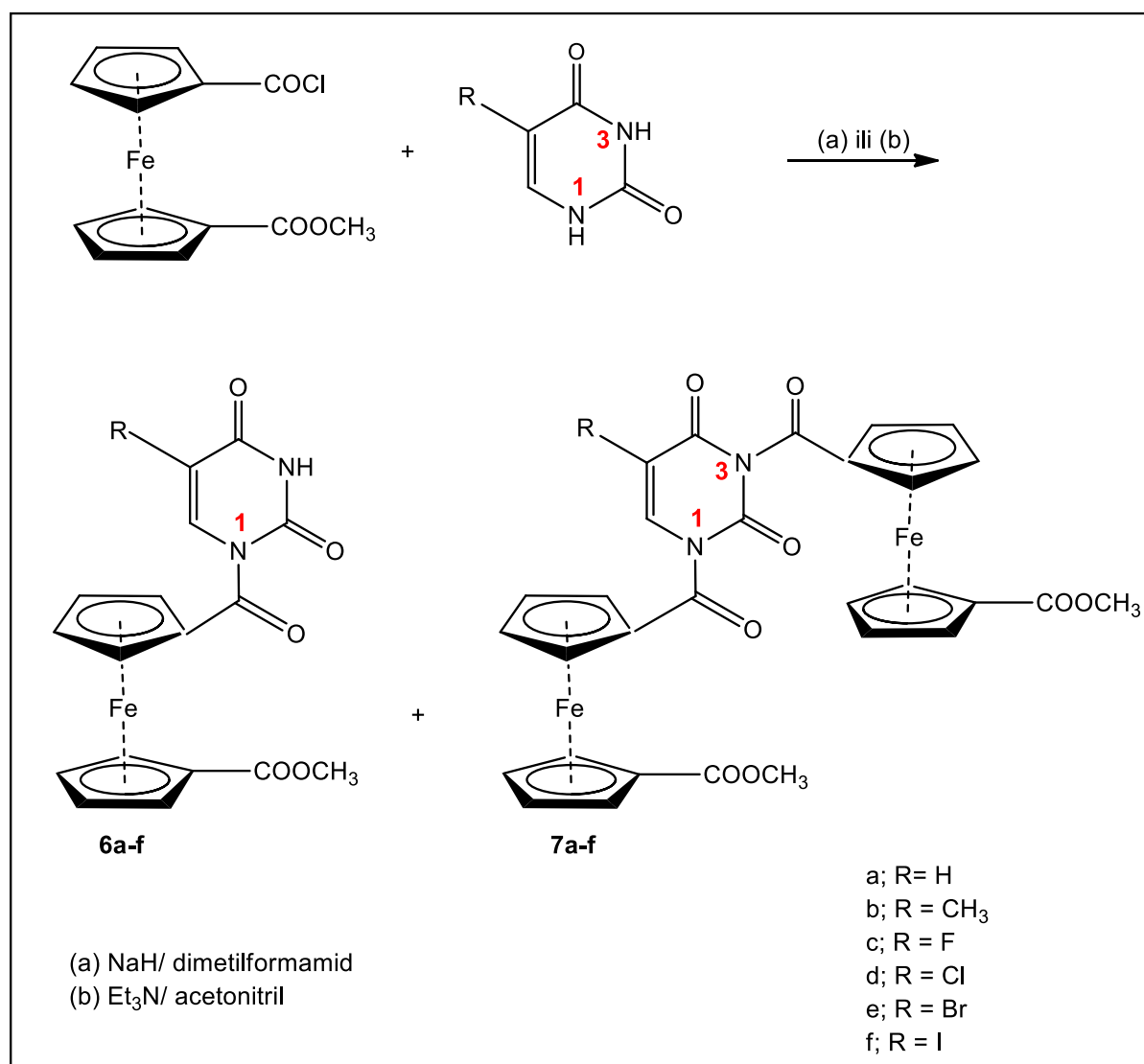
Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina (argon) i u bezvodnoj sredini.

3.3. SCHEMA ZA PRIPRAVU KOPULATA

3.3.1. Shema za pripravu 1'-metoksikarbonilferocenoil klorida (5)



3.3.2. Shema za pripravu 1'-metoksikarbonilferocenoil konjugata (**6a-f** i **7a-f**)



3.4. PROTOKOLI ZA PRIPRAVU SPOJEVA

3.4.1. 1,1'-Diacetilferocen (**1**)

Suspenziji aluminijeva klorida (17,2 g, 0,13 mol) u suhom diklormetanu (30 mL) dokapa se otopina acetil-klorida (10,7 mL, 0,15 mol) u istom otapalu (20 mL). Na taj način pripravljen Perrierov kompleks zagrije se do temperature vrenja te mu se preko lijevka za dokapavanje polako dokapa otopina ferocena (10 g, 0,054 mol) u suhom diklormetanu (40 mL). Nakon 5 sati refluxiranja, reakcijska se smjesa prebaci u čašu s ledom i askorbinskom kiselinom te se ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj dobro ispere 5 %-tnom otopinom NaHCO₃, 5 %-tnom otopinom KOH i zasićenom otopinom NaCl do neutralnog, a zatim osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suhog stanja pri čemu je dobiveno 12,9 g (88 %) narančastih kristala $t_f = 116-125$ °C.

3.4.2. Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (2)

Otopini natrijeva hidroksida (49,05 g, 1,23 mol) u vodi (240 mL) ohlađenoj na 0°C dodaje se brom (18,3 mL, 0,35 mol) i dokapava se dioksan (148,2 mL, 1,73 mol) te se pri temperaturi 0-5°C u obrocima dodaje 1,1'-diacetilferocen (1) (12 g, 0,044 mol). Nakon pola sata miješanja, dodaje se vodena otopina natrijeva metabisulfita, Na₂S₂O₅ (17 g) te se reakcijska smjesa profiltrira i filtrat se zakiseli koncentriranom klorovodičnom kiselinom, HCl pri čemu se istaloži 11,8 g (90 %) narančastih kristala ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (2); $t_f > 250$ °C.

3.4.3. Dimetilferocen-1,1'-dikarboksilat (3)

Otopini kiseline (2) (6,83 g, 0,025 mol) u metanolu (142 mL) dodaje se svježe predestilirani bor trifluorid eterat, BF₃·Et₂O (14,2 mL). Nakon 7 sati refluksiranja, reakcijska se smjesa zaluži 5 %-tnom NaHCO₃ do pH~8-9, ekstrahira se s diklormetanom, ispere zasićenom otopinom natrijeva klorida, NaCl, osuši bezvodnim natrijevim sulfatom, Na₂SO₄ i upari do suhog stanja. Time se dobiva 6,10 g (81 %) narančastih kristala; $t_f = 108-110$ °C.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 1715 j (C=O, COOCH₃).

3.4.4. 1'-Metoksikarbonilferocen-1-karboksilna kiselina (4)

U otopinu (3) (6,10 g, 0,02 mol) u metanolu (82 mL) dodaje se otopina natrijeva hidroksida (808 mg, 0,02 mol) u vodi (2,7 mL). Nakon 50 minuta zagrijavanja, pri 80 °C, reakcijska se smjesa ekstrahira diklormetanom. Alkalna vodena faza zakiseli se koncentriranom HCl pri čemu se istaloži 2,5 g (43 %) narančastih kristala (4); $t_f = 145.8-146.7$ °C.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3120 š (OH, COOH), 1719 j (C=O, COOCH₃), 1682 sr (C=O, COOH).

3.4.5. 1'-Metoksikarbonilferocen klorid (5)

Suspenciji 1'-metoksikarbonilferocen-1-karboksilne kiseline (600 mg, 2,11 mmol) u diklormetanu (5 mL) dodaje se 0,72 mL oksalil klorida (8,44 mmol) i kap piridina. Smjesa se refluksira 4 h te se upari do suhog stanja. Sirovi produkt zagrijava se u petroleteru na 80°C tijekom 10 minuta. Zatim se organski sloj profiltrira preko vate te se upari do suhog stanja. Postupak se ponovi još dva puta pri čemu je dobiveno 470 mg (73 %) crvenih kristala, 1'-metoksikarbonilferocen klorida.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3104, 3089, 2955, 1755 (j, C=O), 1715 (j, C=O).

3.4.6. 1'-Metoksikarbonilferocenoil-uracil derivati (**6a-f** i **7a-f**)

Opći postupak A: Nukleobaze (0,202 mmol) suspendiraju se u 1 ml DMF-a te deprotoniraju dodatkom NaH (0,202 mmol) kroz sat vremena na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje. Nakon toga, reakcijskoj smjesi dodaje se prethodno pripremljen 1'-metoksikarbonilferocen klorid (**5**) (0,262 mmol). Dobivena reakcijska smjesa miješa se oko 60 min, a zatim neutralizira s 10 %-tnom limunskom kiselinom i ekstrahira diklometanom. Organski sloj ispire se vodom, a potom upari na rotacijskom vakuum uparivaču do suhog stanja. Pročišćavanjem produkta kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:acetone 10:1 te daljnjim uparavanjem dobiveni su kristali, *N1*-kopolat **6a-f** u iskorištenju od 40 % do 80 %.

Tablica 3. Rezultati provedenog eksperimenta *postupkom A*

Otapalo	<i>N1</i>	m (mg)	η (%)
DMF	6a ; R = H	48.24	73.3
	6b ; R = CH ₃	27.2	67.1
	6c ; R = F	52.02	65.4
	6d ; R = Cl	55.03	67.2
	6e ; R = Br	55.16	69.1
	6f ; R = I	59.21	66.5

Opći postupak B: Uracil i njegovi C5- supstituirani derivati (0,202 mmol) suspendiraju se u 1 mL CH₃CN i deprotoniraju dodatkom Et₃N. Aktivacija baze odvija se s Et₃N na sobnoj temperaturi kroz 60 minuta. Nakon toga dodan je pripremljeni 1'-metoksikarbonilferocen klorid (**5**) (0,262 mmol). Suspenzija se miješa narednih 60 minuta na sobnoj temperaturi te obradi kako je opisano u postupku pod A. Uparena reakcijska smjesa pročišćuje se na koloni sa sustavom diklormetan:acetone = 10:0.5. Razdvajanjem na koloni dobivena su dva produkta *N1*-kopolat **6a-f** i *N1/N3*-kopolat **7a-f**.

Tablica 4. Rezultati provedenog eksperimenta *postupkom B*

Otapalo	<i>N1</i>	m (mg)	η (%)	<i>N1/N3</i>	m (mg)	η (%)	<i>N1: N1/N3</i> 6 : 7
CH ₃ CN	6a ; R = H	35.7	43.0	7a ; R = H	27.3	20.1	72:28
	6b ; R = CH ₃	67.1	80.5	7b ; R = CH ₃	19.2	13.8	85:15
	6c ; R = F	42.7	48.4	7c ; R = F	35	25.4	63:37
	6d ; R = Cl	54.8	60.6	7d ; R = Cl	39.4	27.4	69:31
	6e ; R = Br	58.4	58.4	7e ; R = Br	53.1	34.6	63:37
	6f ; R = I	56.0	50.8	7f ; R = I	50.2	30.7	63:37

1'-Metoksikarbonil-*N1*-ferocenoil-uracil (6a): narančasto-crveni kristali, $R_F = 0,462$.

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3370 (sl., NH), 3020 (sl., CH aromatski), 2957 (sl., CH, alifatski), 1738 (j., C=O, ester), 1706 (j, C=O, amid), 1682 (j., amid I), 1445 (sr), 1414 (sr), 1186 (sr), 1106 (j.).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 298 K) δ/ppm : 11,51 (1H, s, NH), 5,73 (1H, d, H-C5), 7,99 (1H, d, H-C6), 4,84 (2H, s, CH-Fc), 4,74 (2H, s, CH-Fc), 4,84 (2H, s, CH-Fc), 4,74 (2H, s, CH-Fc), 3,61 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, 25 °C) δ/ppm : 173,58 (Fc-CO), 163,86 (C4), 149,88 (C2), 141,33 (C6), 102,9 (C5), 71,05 (Fc,Cq), 74,11 (C-Fc), 71,21 (C-Fc), 74,11 (C-Fc), 71,21 (C-Fc), 52,10 (COOCH₃)

1'-Metoksikarbonil-*N1*-ferocenoil-5-timin (6b): crveni kristali, $R_F = 0,470$.

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3377(š. sl., NH), 3074, 3040(sl., CH, aromatski), 2957(sl., CH, alifatski), 1740 (j., C=O, ester), 1710 (j, C=O, amid), 1573(j., amid).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 298 K) δ/ppm : 11,55 (1H, s, NH), 7,85 (1H, d, H-C6), 4,85 (2H, s, CH-Fc), 4,72 (2H, s, CH-Fc), 4,82 (2H, s, CH-Fc), 4,60 (2H, s, CH-Fc), 3,68 (3H, s, OCH₃), 1,87 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, 25 °C) δ/ppm : 172,90 (Fc-CO), 164,50 (C4), 149,90 (C2), 136,3 (C6), 102,9 (C5), 111,00 (Fc,Cq), 74,60 (C-Fc), 73,40 (C-Fc), 74,80 (C-Fc), 72,60 (C-Fc), 52,10 (COOCH₃), 12,4 (CH₃).

1'-Metoksikarbonil-N1-ferocenoil-5-fluorouracil (6c): crveni kristali, $R_F = 0,483$.

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\max} / \text{cm}^{-1}$: 3362, (sl., NH), 3022 (sl., CH aromatski), 2957 (sl., CH, alifatski), 1740 (j., C=O, ester), 1700 (j, C=O, amid), 1677 (j., amid I).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K) δ/ppm : 11,98 (1H, s, NH), 8,42 (1H, d, H6), 4,89 (2H, s, CH-Fc), 4,72 (2H, s, CH-Fc), 4,84 (2H, s, CH-Fc), 4,74 (2H, s, CH-Fc), 3,65 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 25 °C) δ/ppm : 172,73 (Fc-CO), 158,17 (C4), 148,62 (C2), 142,16 (C6), 139,83 (C5), 71,99 (Fc,Cq), 73,97 (C-Fc), 71,19 (C-Fc), 74,11 (C-Fc), 71,21 (C-Fc), 52,10 (COOCH₃)

1'-Metoksikarbonil-N1-ferocenoil-5-klorouracil (6d): tamnocrveni kristali, $R_F = 0,510$.

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\max} / \text{cm}^{-1}$: 3367, (sl., NH), 3020 (sl., CH aromatski), 2957 (sl., CH, alifatski), 1744 (j., C=O, ester), 1704 (j, C=O, amid), 1682 (j., amid I).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K) δ/ppm : 12,02 (1H, s, NH), 8,46 (1H, d, H-C6), 4,90 (2H, s, CH-Fc), 4,75 (2H, s, CH-Fc), 4,84 (2H, s, CH-Fc), 4,74 (2H, s, CH-Fc), 3,71 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 25 °C) δ/ppm : 171,94 (Fc-CO), 159,28 (C4), 148,56 (C2), 139,63 (C6), 108,75 (C5), 71,96 (Fc,Cq), 73,63 (C-Fc), 71,51 (C-Fc), 74,11 (C-Fc), 71,21 (C-Fc), 52,10 (COOCH₃).

1'-Metoksikarbonil-N1-ferocenoil-5-bromouracil (6e): crveni kristali, $R_F = 0,485$.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{\max} / \text{cm}^{-1}$: 3362, (sl., NH), 3027 (sl., CH aromatski), 1736 (j., C=O, ester), 1702 (j, C=O, amid), 1630 (j., amid I).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K) δ/ppm : 11,84 (1H, s, NH), 8,36 (1H, d, H-C6), 4,87 (2H, s, CH-Fc), 4,73 (2H, s, CH-Fc), 4,84 (2H, s, CH-Fc), 4,74 (2H, s, CH-Fc), 3,71 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 25 °C) δ/ppm : 172,24 (Fc-CO), 159,79 (C4), 149,23 (C2), 140,24 (C6), 97,88 (C5), 71,06 (Fc,Cq), 74,08 (C-Fc), 72,00 (C-Fc), 74,11 (C-Fc), 71,21 (C-Fc), 52,10 (COOCH₃).

1'-Metoksikarbonil-N1-ferocenoil-5-iodouracil (6f): tamnocrveni kristali, $R_F = 0,520$.

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\max} / \text{cm}^{-1}$: 3364, (sl., NH), 3023 (sl., CH aromatski), 1744 (j., C=O, ester), 1708 (j, C=O, amid), 1617 (j., amid I).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K) δ/ppm : 11,67 (1H, s, NH), 8,46 (1H, d, H-C6), 4,88 (2H, s, CH-Fc), 4,77 (2H, s, CH-Fc), 4,84 (2H, s, CH-Fc), 4,74 (2H, s, CH-Fc), 3,61 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 25 °C) δ /ppm: 172,47 (Fc-CO), 161,32 (C4), 149,62 (C2), 144,89 (C6), 72,50 (C5), 71,83 (Fc,Cq), 74,14 (C-Fc), 71,97 (C-Fc), 74,11 (C-Fc), 71,21 (C-Fc), 52,10 (COOCH₃).

1'-Metoksikarbonil-N1/N3-ferocenoil-uracil (7a): crveni kristali, $R_F = 0,610$.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹: 3020 (sl., CH aromatski), 2957 (sl., CH, alifatski), 1736 (j., C=O, ester), 1704 (j, C=O, amid), 1682 (j., amid I).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K, ppm): δ 8,17 (d, 1H, H6), 5,97 (d, 1H, H5), 4,93 4,88 (s, 2H, CH-Fc), 4,76 (s, 4H, CH-Fc), 4,71 (s, 4H, CH-Fc), 4,65 (s, 2H, CH-Fc), 4,32 (s, 4H, Fc-Cp), 3,68 (3H, s, OCH₃), 3,62 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 25 °C, ppm): δ 173,11 (C=O), 172,81 (C=O), 162,04 (C4), 148,38 (C2), 141,46 (C6), 102,59 (C5), 75,21, 74,31, 73,94, 70,79 (Cq, Fc), 75,23, 74,50, 72,97, 73,81, 73,30 72,47, 72,20, 71,90 (Fc-Cp), 52,30, (COOCH₃), 52,28 (COOCH₃).

1'-Metoksikarbonil-N1/N3-ferocenoil-5-timin (7b): narančasto-crveni kristali, $R_F = 0,540$.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹: 3074, 3040 (sl., CH, aromatski), 2957 (sl., CH, alifatski), 1704 (j, C=O), 1573 (j., amid), 1445 (sr), 1414 (sr), 1186 (sr), 1106 (j.).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K, ppm): δ 7,54 (1H, q, H6), 4,89 4,88 (s, 2H, CH-Fc), 4,76 (s, 4H, CH-Fc), 4,71 (s, 4H, CH-Fc), 4,65 (s, 2H, CH-Fc), 4,38 (s, 4H, Fc-Cp), 3,65 (3H, s, OCH₃), 3,60 (3H, s, OCH₃), 2,05 (d, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 25 °C, ppm): δ 172,60 (C=O), 172,59 (C=O), 161,75 (C4), 147,99 (C2), 134,75 (C6), 111,46 (C5), 75,12, 74,10, 72,94, 71,97 (Cq, Fc), 73,61 (2CH-Fc), (2CH-Fc), 72,31, 71,97 70,94 (Fc-Cp), 70,93 (Fc-Cp), 52,10 (COOCH₃), 51,89 (COOCH₃), 12,69 (CH₃).

1'-Metoksikarbonil-N1/N3-ferocenoil-5-fluorouracil (7c): crveni kristali, $R_F = 0,572$.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹: 3022 (sl., CH aromatski), 2957 (sl., CH, alifatski), 1704 (j., C=O), 1677 (j., amid I).

^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K, ppm): δ 7,81 (s, 1H, H6), 4,89 (s, 2H, CH-Fc), 4,76 (s, 4H, CH-Fc), 4,71 (s, 4H, CH-Fc), 4,65 (s, 2H, CH-Fc), 4,37 (s, 4H, Fc-Cp), 3,63 (3H, s, OCH₃), 3,58 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz, 25 °C, ppm): δ 170,99 (C=O), 170,44 (C=O), 155,26 (C4), 146,11 (C2), 123,1 (C6), 53,3 (C5), 75,12, 74,10, 72,94, 72,58 (Cq, Fc), 71,57 (2CH-Fc), 72,81, 72,30 71,47, 71,20, 70,62, 70,61 (Fc-Cp) 52,95 (COOCH₃), 52,75 (COOCH₃).

1'-Metoksikarbonil-N1/N3-ferocenoil-5-klorouracil (7d): crveni kristali, $R_F = 0,602$.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹: 3020 (sl., CH aromatski), 2957 (sl., CH, alifatski), 1714 (j., C=O), 1682 (j., amid I).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K, ppm): δ 8,66 (s, 1H, NH), 5,04 (s, 2H, CH-Fc), 4,76 (s, 4H, CH-Fc), 4,70 (s, 4H, CH-Fc), 4,68 (s, 2H, CH-Fc), 4,35 (s, 4H, Fc-Cp), 3,71 (3H, s, OCH₃), 3,63 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 25 °C, ppm): δ 172,16 (C=O), 171,70 (C=O), 158,25 (C4), 147,64 (C2), 138,39 (C6), 108,98 (C5), 75,31, 74,82, 73,91, 70,72 (Cq, Fc), 74,50, 74,28 (2CH-Fc), 73,81, 73,30 72,47, 69,92 (2CH-Fc), 52,23 (COOCH₃), 52,10 (COOCH₃).

1'-Metoksikarbonil-N1/N3-ferocenoil-5-bromouracil (7e): crveni kristali, $R_F = 0,593$.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹: 3027 (sl., CH aromatski), 1709 (j., C=O), 1628(j., amid I).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K, ppm): δ 8,03 (s, 1H, H6), 4,87 (s, 2H, CH-Fc), 4,77 (s, 4H, CH-Fc), 4,70 (s, 4H, CH-Fc), 4,61 (s, 2H, CH-Fc), 4,35 (s, 4H, Fc-Cp), 3,63 (3H, s, OCH₃), 3,61 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 25 °C, ppm): δ 171,29 (C=O), 171,19 (C=O), 157,51 (C4), 147,26 (C2), 138,34 (C6), 98,14 (C5), 75,21, 74,31, 73,94, 70,79 (Cq, Fc), 74,02, 73,65 (2CH-Fc) 73,81, 73,30 72,20, 71,08 (Fc-Cp), 52,35 (COOCH₃), 52,30 (COOCH₃).

1'-Metoksikarbonil-N1/N3-ferocenoil-5-iodouracil (7f): tamnocrveni kristali, $R_F = 0,605$.

IR (CH₂Cl₂) $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹: 3023 (sl., CH aromatski), 1710 (j., C=O), 1617 (j., amid I).

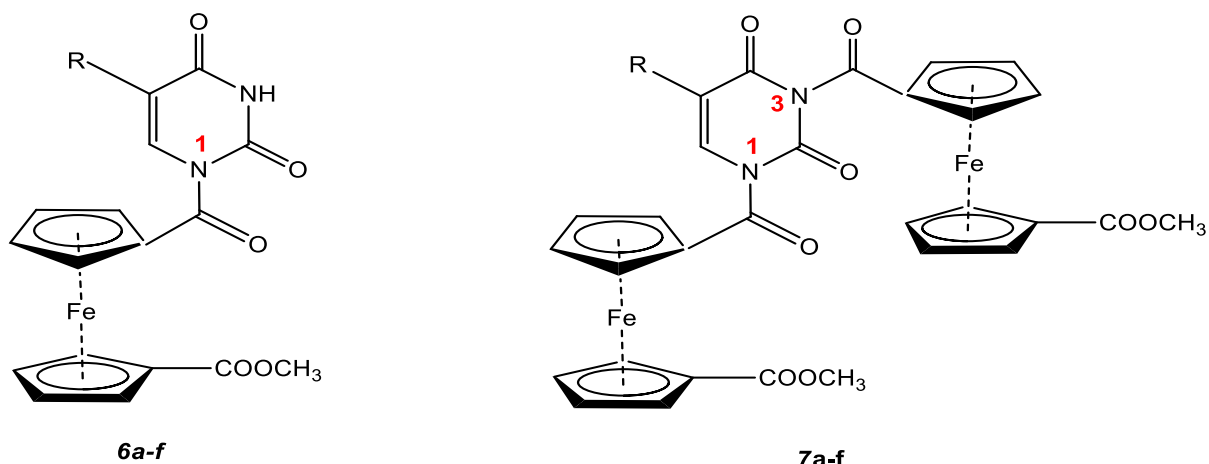
^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K, ppm): δ 8,13 (s, 1H, H6), 4,88 (s, 2H, CH-Fc), 4,76 (s, 4H, CH-Fc), 4,71 (s, 4H, CH-Fc), 4,65 (s, 2H, CH-Fc), 4,38 (s, 4H, Fc-Cp), 3,65 (3H, s, OCH₃), 3,60 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz, 25 °C, ppm): δ 171,07 (C=O), 170,74 (C=O), 157,94 (C4), 147,13 (C2), 142,96 (C6), 75,33 (C5), 75,21, 74,31, 73,94, 70,79 (Cq, Fc), 74,5, 74,32, 73,94, 73,30, 72,47, 71,52, 70,64, 70,79 (Cq, Fc), 52,10 (COOCH₃), 52,03 (COOCH₃).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Nukleozidi i nukleotidi imaju dugu tradiciju primjene u medicinskoj kemiji. Prirodni nukleozidi predstavljaju jedinstvenu start poziciju za razvoj lijekova zbog svoje uloge u brojnim biološkim procesima kao i činjenice da služe kao gradivni blokovi DNA i RNA molekula. Trenutno se na tržištu nalazi više od 30 analoga nukleozida koji se koriste za liječenje raznih bolesti, a mnogo više ih se nalazi u fazama pretkliničkih i kliničkih istraživanja. Nukleozidi se sastoje od šećerne podjedinice i nukleobaze, a nukleotidi uz to sadrže barem jednu fosfatnu skupinu. Pet najčešćih nukleozida uključenih u DNA i RNA te druge biološke procese su adenzin, guanozin, citozin, timidin i uridin. Zbog toga i mala promjena u njihovoj strukturi može imati značajne učinke. U idealnim situacijama analozi nukleozida imaju strukturu nalik na prirodne nukleozide tako da ih stanični enzimi mogu prepoznati, ali da zbog modifikacija u strukturi mogu omesti replikaciju i druge biološke procese. Kada se razmatra o modifikaciji nukleozidnog skeleta, postoji nekoliko potencijalnih lokacija za modifikaciju, a u to spadaju šećerna podjedinica, aromatska heterociklična nukleobaza, glikozidna veza između podjedinica te fosfatna skupina, ukoliko se radi o nukleotidima. Analози nukleozida imaju esencijalnu ulogu u liječenju bolesti, stoga razvoj novih analoga može dovesti do otkrivanja novih terapijskih proizvoda (Seley-Radtke i Yates, 2018). Organometalni derivati nukleobaza su konjugati koji sadrže povezani metalocen s nukleobazama i pripadaju skupini spojeva s antikancerogenim, antibiotskim i antivirusnim svojstvima. Ferocen je najpoznatiji i najbolje istražen metalocen, a njegovi derivati posjeduju različita biološka svojstva te su kao biološki aktivni spojevi zanimljivi u procesu istraživanja i razvoja novih lijekova (Kowalski, 2016).

Cilj ovog diplomskog rada priprava je organometalnih derivata nukleozida, biokonjugata 1'-metoksikarbonilferocena i C5-supstituiranih derivata uracila s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (slika 22). Karbonilna skupina uvedena kao „linker“ između organometalnog i heterocikličkog aromatskog sustava, osim što definira prostornu relaciju, omogućuje i elektronsku komunikaciju dvaju fragmenata ovih biokonjugata. S obzirom da su u Laboratoriju za organsku kemiju provedena istraživanja aciliranja uracila i njegovih derivata s ferocenoil kloridom, pri čemu je uočeno nastajanje *N1*-izomera ili smjese *N1*- i *N3*- izomera, čiji udio ovisi o reakcijskim uvjetima (Kuzman, 2020), cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj esterske skupine u acilirajućem reagentu, 1'-metoksikarbonilferocenoil kloridu (**5**), na reakciju kopulacije, ovisno o reakcijskim uvjetima s posebnim osvrtom na regioselektivnost reakcije. U prvom dijelu rada sintetizirao se supstrat za aciliranje, 1'-metoksikarbonilferocenoil klorid (**5**), koji se zatim kopulirao s uracilom i njegovim C5-derivatima pri različitim uvjetima; *postupak A*: *postupak A*: uporaba NaH kao deprotonirajuće baze u dimetilformamidu; *postupak B*: uporaba Et₃N kao deprotonirajuće baze u acetonitrilu.



a; R = H, b; R = CH₃, c; R = F, d; R = Cl, e; R = Br, f; R = I

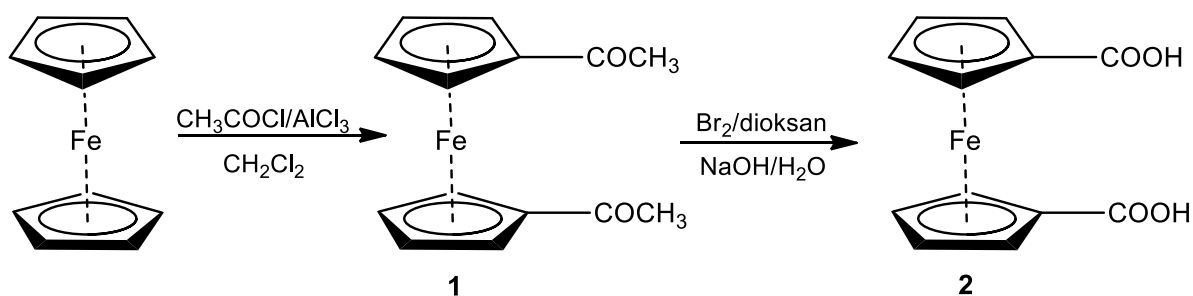
Slika 22. 1'-Metoksikarbonilferocenoil-5-supstituirani uracilni derivati **6a-f** i **7a-f**

U drugom dijelu dobiveni su se biokonjugati pročišćavali te se njihova struktura potvrdila korištenjem IR- i NMR- spektroskopije.

4.1. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA

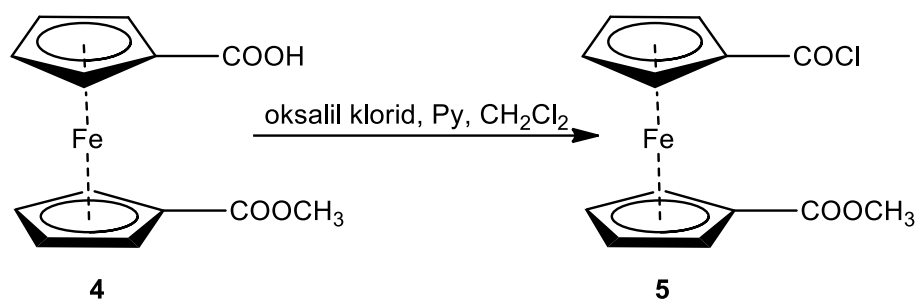
4.1.1. Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (**2**)

Prema opisanim literaturnim postupcima pripravljena je ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (**1**) oksidacijom 1,1'-diacetilferocena (**2**) s bromom, dok je 1,1'-diacetilferocen pripremljen reakcijom Perrierovog kompleksa s ferocenom u iskorištavanju od 87 % (shema 4).



Shema 4. Shema pripreme ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (**2**)

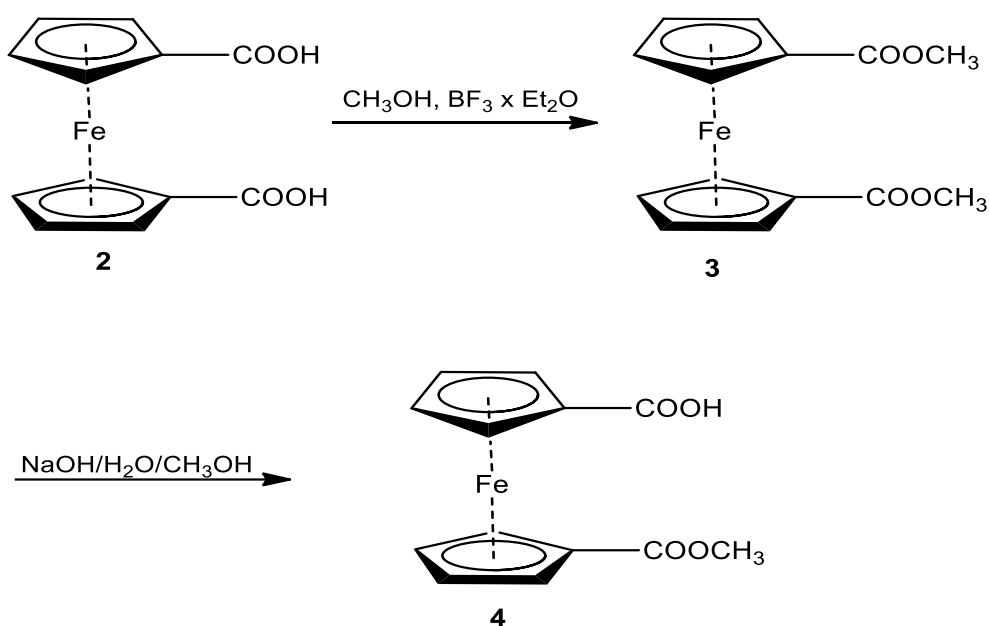
Esterifikacijom dikiseline (**2**) te djelomičnom hidrolizom nastalog estera (**3**) dobiva se ester-kiselina (**4**) u iskorištavanju reakcije od 68 %. Neizreagirani supstrat (**3**) ponovno se podvrgne istom postupku s ciljem dobivanja ester-kiseline (**4**) u što boljem iskorištenju (81 %) (shema 5). Struktura dobivenih spojeva potvrđena je IR i NMR spektroskopijom.



Shema 5. Shema pripreme 1'-metoksikarbonilferocen-1-karboksilne kiseline **4**

4.1.2. 1'-Metoksikarbonilferocenoil klorid (**5**)

U nastavku je pripravljen ključni intermedijer daljnjih reakcija, 1'-metoksi karbonilferocenoil klorid (**5**), u iskorištavanju od 78 % (shema 6). On nastaje u reakciji ester-kiseline i oksalil-klorida u suhom diklormetanu uz prisustvo piridina, a nakon uparavanja, sirovi produkt pročišćava se višestrukim zagrijavanjem u petroleteru te uparavanjem filtriranog produkta.

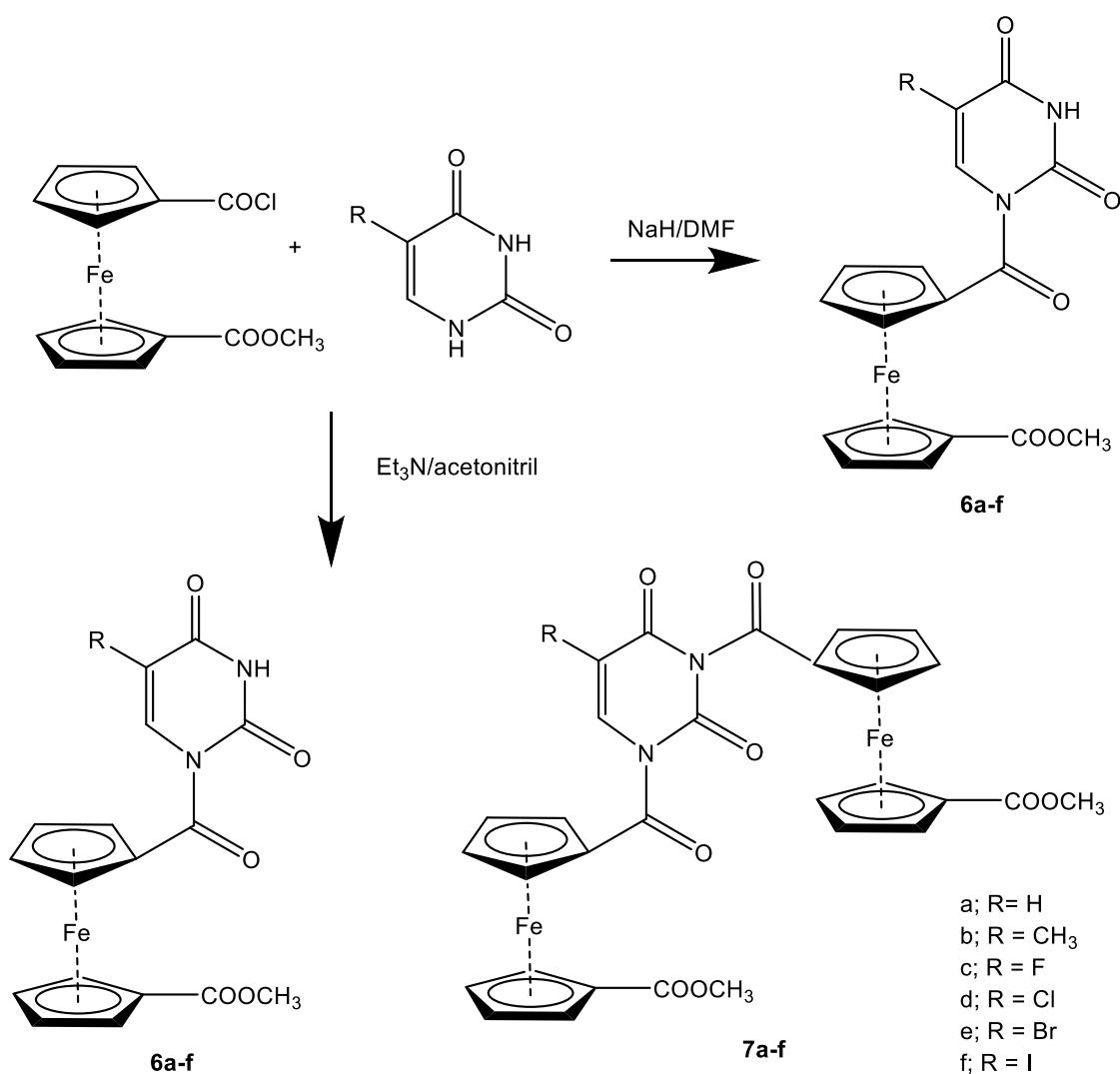


Shema 6. Shema pripreme 1'-metoksikarbonilferocenoil klorida (**5**)

U IR spektru ester-klorida (**5**) vidljiva je karakteristična vrpca za kiselinske kloride pri 1755 cm⁻¹ i apsorpcijska vrpca pri 1715 cm⁻¹, karakteristična za karbonilnu skupinu estera vezanog na 1'-ciklopentadienilni prsten ferocena.

4.1.3. Sinteza 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1*-uracilnih derivata (**6a-f**) i 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1/N3*-uracilnih derivata (**7a-f**)

Sljedeći dio istraživanja ovog rada posvećen je pripravi 1'-metoksikarbonilferocenoil-uracilnih derivata. U tu svrhu ispitana su dva otapala uz različite deprotonirajuće reagense, dimetilformamid uz natrijev hidrid i acetonitril uz trietilamin (shema 7). U reakcijama kopulacije uporabom natrijeva hidrida kao deprotonirajućih agenasa u dimetilformamidu nastaju 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1*-uracilni derivati (**6a-f**). U nastavku je ista reakcija kopulacije provedena uporabom trietilamina kao deprotonirajućih agenasa u acetonitrilu pri čemu nastaje smjesa dvaju kopulata, 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1*-uracilni derivati (**6a-f**) i 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1/N3*-uracilni derivati (**7a-f**).



Shema 7. Shema pripreme 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1*-uracilnih derivata (**6a-f**) i 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1/N3*-uracilnih derivata (**7a-f**)

Prvi stupanj sinteze započinje aktivacijom pirimidinske baze s deprotonirajućim reagensom u izabranom otapalu (acetonitril ili dimetilformamid) kroz 30 minuta, pri čemu nastaje sol pirimidinske baze. Deprotonirana baza, zbog negativnog naboja na dušikovom atomu, jak je nukleofil u reakciji kopulacije s acilirajućim agensima, što upućuje kako se reakcija kopulacije aktivirane nukleobaze i ester-klorida (**5**) odvija S_NAc mehanizmom. Sama reakcija odvija se prilično brzo uz jasnu promjenu boje iz narančasto-žute u tamnocrvenu, a tijekom reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Dobiveni produkt izolira se na način da se nakon završene reakcije, reakcijska smjesa neutralizira, ekstrahira diklormetanom i upari do suhog stanja. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na koloni silika gela uz eluens diklormetan/acetone 10:1. U reakcijama kopulacije, kada je korišten dimetilformamid uz NaH kao deprotonirajući reagens, nastaju jednoznačno *N1*-konjugati uz iskorištenje reakcije od 43 % do 80 % i može se zaključiti da su te reakcije regiospecifične. Samo iskorištenje reakcije slično je kao i kod reakcija uracila i njegovih 5-supstituiranih derivata s ferocenoil kloridom i može se zaključiti kako esterska skupina na drugom ciklopentenilnom prstenu nije znatno utjecala na tijek reakcije. U nastavku istraživanja korišten je suhi acetonitril kao otapalo uz trietilamin deprotonirajući reagens te je uočeno nastajanje *N1/N3*-kopulata **7a-f** uz *N1*-kopulat **6a-f**. Kopulati **6a-f** dobiveni su u iskorištavanju 48-80 % kao crveni kristali, a kopulati **7a-f** u iskorištavanju 14-35 % kao tamnocrveni kristali.

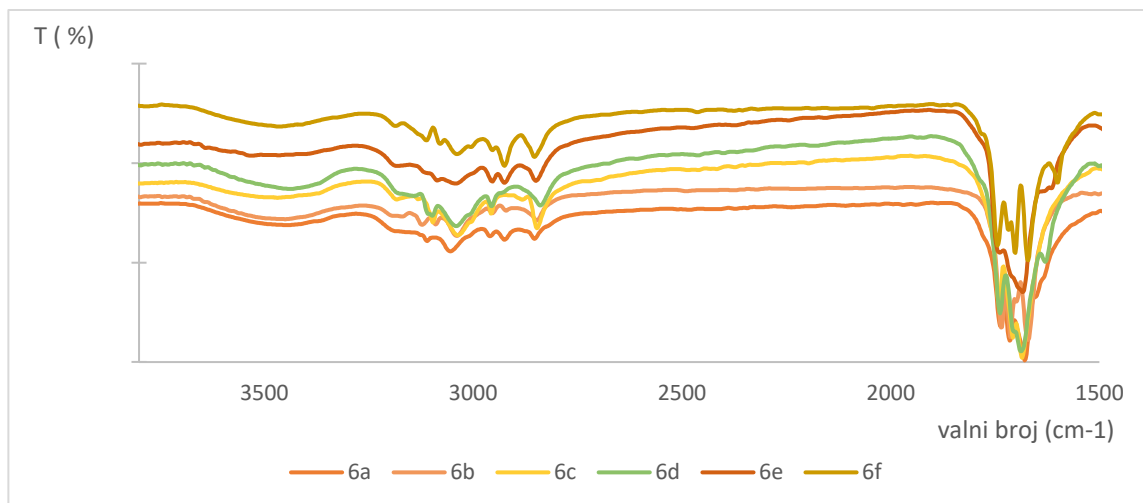
Tablica 5. Usporedba rezultata kopulacije 1'-metoksikarbonilferocenoil-klorida s C-5-derivatima uracila s rezultatima kopulacije ferocenoil-klorida i C-5-derivata uracila

	1'-Metoksikarbonilferocenoil-uracil derivati			Ferocenoil-uracil derivati (Kuzman, 2020)		
	<i>N1</i>	<i>N1/N3</i>	Odnos <i>N1:N1/N3</i>	<i>N1</i>	<i>N1/N3</i>	Odnos <i>N1:N1/N3</i>
R = H	43 %	20 %	72:28	43 %	27 %	60:40
R = CH ₃	80 %	14 %	85:15	59 %	22 %	74:26
R = F	49 %	25 %	63:37	48 %	32 %	59:41
R = Cl	61 %	27 %	69:31	23 %	35 %	50:50
R = Br	58 %	35 %	63:37	35 %	30 %	52:48
R = I	51 %	31 %	63:37	34 %	32 %	54:46

Uspoređujući iskorištenja i međusobni udio dobivenih *N1* i *N1/N3* kopulata u reakciji 1'-metoksikarbonilferocenoil klorida s C5-derivatima uracila s rezultatima dobivenim u reakciji ferocenoil klorida pri istim uvjetima (tablica 5), primjećuje se kako nastaje više *N1*-kopulata u odnosu na *N1/N3* kopulat i uz veće iskorištenje dobivenih produkata. Najveći udio *N1* produkta dobiven je u reakciji s timinom što može biti posljedica elektrodonorske metilne skupine na položaju C5- baze. U reakcijama 1'-metoksikarbonilferocenoil klorida s 5-fluoro/kloro/bromo/jodo-uracilom odnos *N1*:-*N1/N3*-konjugata pomiče se prema *N1/N3*-konjugatu u odnosu na reakciju s uracilom. Iako i dalje prevladava *N1*-konjugat, nastaje više *N1/N3*-konjugata u odnosu na osnovnu reakciju, što bi se moglo prepisati elektron akceptorskom karakteru halogenih elemenata. Veličina halogenih elemenata nema prevelik utjecaj na odnos *N1*- i *N1/N3*-konjugata i oni ostaju prilično konzistentni za sve reakcije. Slijedom gore navedenog, može se zaključiti kako metoksi skupina vezana na ferocenu nije utjecala na sam tijek reakcije, odnosno nastajanja *N1*- i *N1/N3*-kopulata. Međutim, već udio *N1*-produkta u ovim reakcijama u odnosu na reakciju ferocenoil klorida s derivatima uracila može se pripisati steričkim smetnjama same skupine pri reakciji kopulacije dviju ferocenskih podjedinica na nukleobazu.

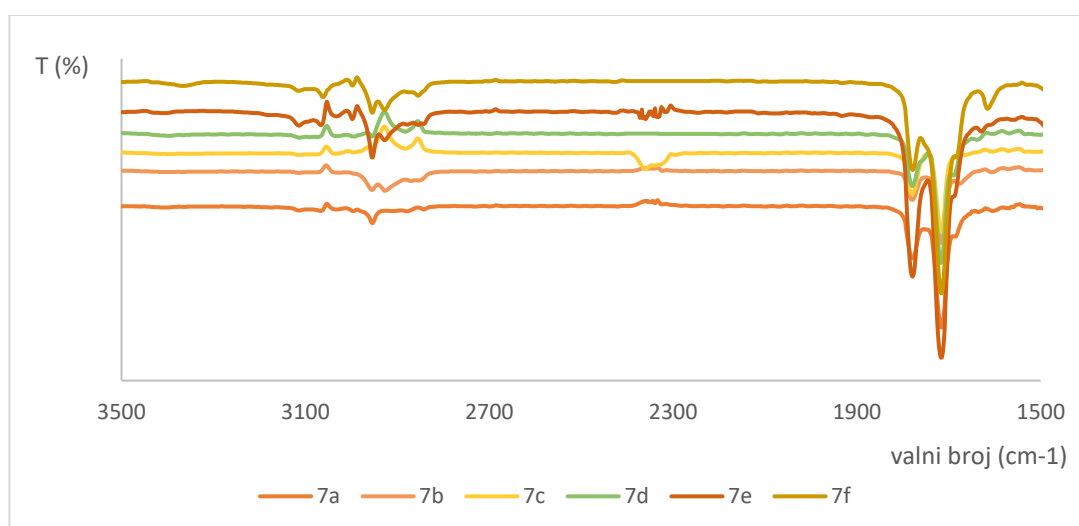
4.1.4. Strukturna karakterizacija 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1*-uracilnih derivata (**6a-f**) i 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1/N3*-uracilnih derivata (**7a-f**)

Svim sintetiziranim ferocenskim biokonjugatima nakon pročišćavanja, struktura je potvrđena IR-, ¹H i ¹³C-NMR spektroskopijom. U IR spektrima kopulata **6a-f** snimljenim kao KBr pastile, zabilježene su apsorpcijske vrpce koje odgovaraju isteznim frekvencijama NH-skupini pri 3370 cm⁻¹ te apsorpcijska vrpca oko 1740 cm⁻¹ koja je dokaz karbonilne skupine metilnog estera. U svim spektrima zabilježena je dodatna apsorpcijska vrpca jakog intenziteta oko 1680 cm⁻¹ što potvrđuje prisutnost karbonilne skupine koja služi kao poveznica ferocena i baze i karbonilnih amidnih skupina nukleobaze. Amidna skupina dodatno je dokazana apsorpcijskom vrpcom oko 1670 cm⁻¹ (slika 23).



Slika 23. IR spektar spojeva **6a-f**

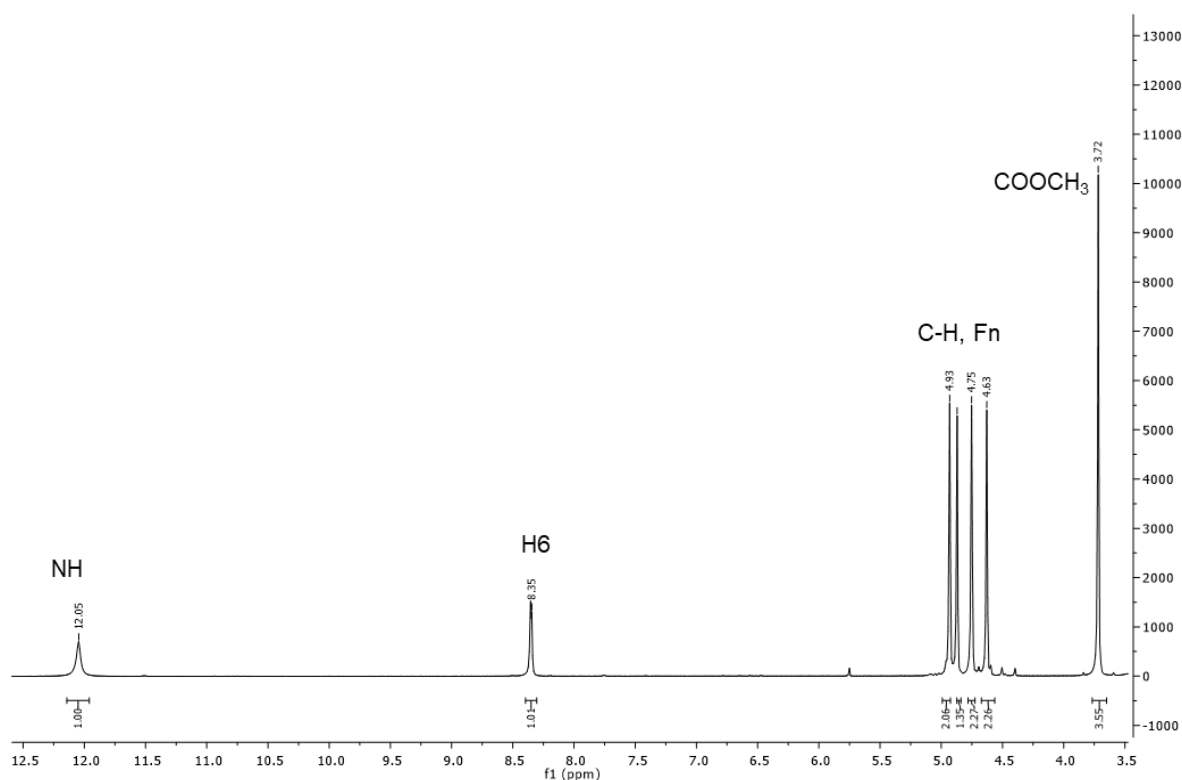
U IR spektrima spojeva **7a-f** snimljenih kao diklormetanske otopine, izostaje apsorpcijska vrpca za NH skupinu što ukazuje na disupstituciju baze, odnosno vezivanje ferocena na oba dušikova atoma. Apsorpcijska vrpca karakteristična za karbonilnu skupinu, zabilježena je oko 1740 cm^{-1} i dokaz je karbonilne skupine metilnog estera, dok je amidna karbonilna skupina, koja služi kao linker, potvrđena apsorpcijskom vrpcom pri 1700 cm^{-1} . U kopolatima zabilježena je apsorpcijska vrpca jakog intenziteta oko 1670 cm^{-1} što ukazuje na prisutnost amidne karbonilne skupine same nukleobaze. Odsutnost apsorpcijske vrpce u svim snimljenim spektrima kopolata, pri 1755 cm^{-1} , koja se pripisuje kiselinskom kloridu, potvrđuje uspješnost provedene kopolacije (slika 24).



Slika 24. IR spektar spojeva **7a-f**

NMR spektri svih derivata snimljeni su u DMSO-u pri 298 K u NMR cjevčici od 5 mm. U $^1\text{H-NMR}$ spektru spojeva **6a-f** vidljiv je signal oko δ 12 ppm koji potvrđuje prisutnost protona

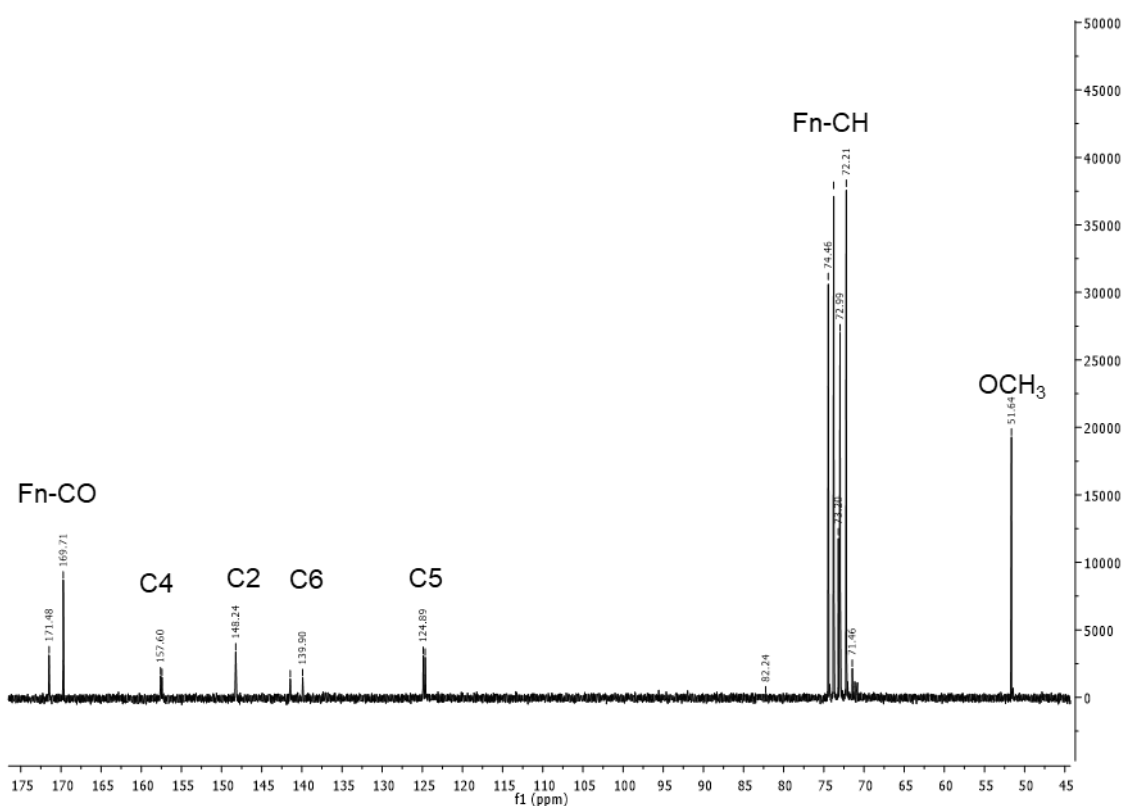
nesupstituirane amidne skupine baze (N3-) i signal u području od δ 7,99 do 8,46 ppm, koji odgovara kemijskom pomaku protona na položaju C6-pirimidinskog prstena. U spektru uracilnog derivata **6a** asigniran je dodatni signal koji je vidljiv kao dublet pri δ 5,73 ppm, koji odgovara protonu na položaju C5- nukleobaze, dok u spektrima ostalih derivata izostaje taj signal, zbog supstituenta vezanog na položaju 5 nukleobaze. U spektru derivata **6b** asigniran je signal pri δ 1,87 ppm koji ukazuje na prisutnost tri protona metilne skupine vezane na položaju 5- timina. U $^1\text{H-NMR}$ spektrima, iz kemijskih je pomaka potvrđena prisutnost ferocenske podjedinice, odnosno četiri signala u području od δ 4,90 do δ 4,60 ppm pripisuju se CH skupinama ciklopentadielnih prstena koji odgovaraju heteroanularno supstituiranom ferocenskom derivatu. U spektrima je asigniran i jedan singlet pri δ 3,68 ppm, koji se pripisuje metoksi skupini estera, koja je vezana na 1'-prstenu ferocena (slika 25).



Slika 25. ^1H NMR spektar 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N*1-5-flouracila (**6c**)

U ^{13}C NMR spektru spojeva **6a-e** vidljiv je signal oko δ 172 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine, koji je poveznica ferocena i nukleobaze. Signali oko δ 160 i 150 ppm pripisani su karbonilnim ugljikovim atomima pirimidinskog prstena C2-, i C4-, dok signal oko δ 140 ppm C6- pripisuje se ugljikovom atomu pirimidinske podjedinice. Signal

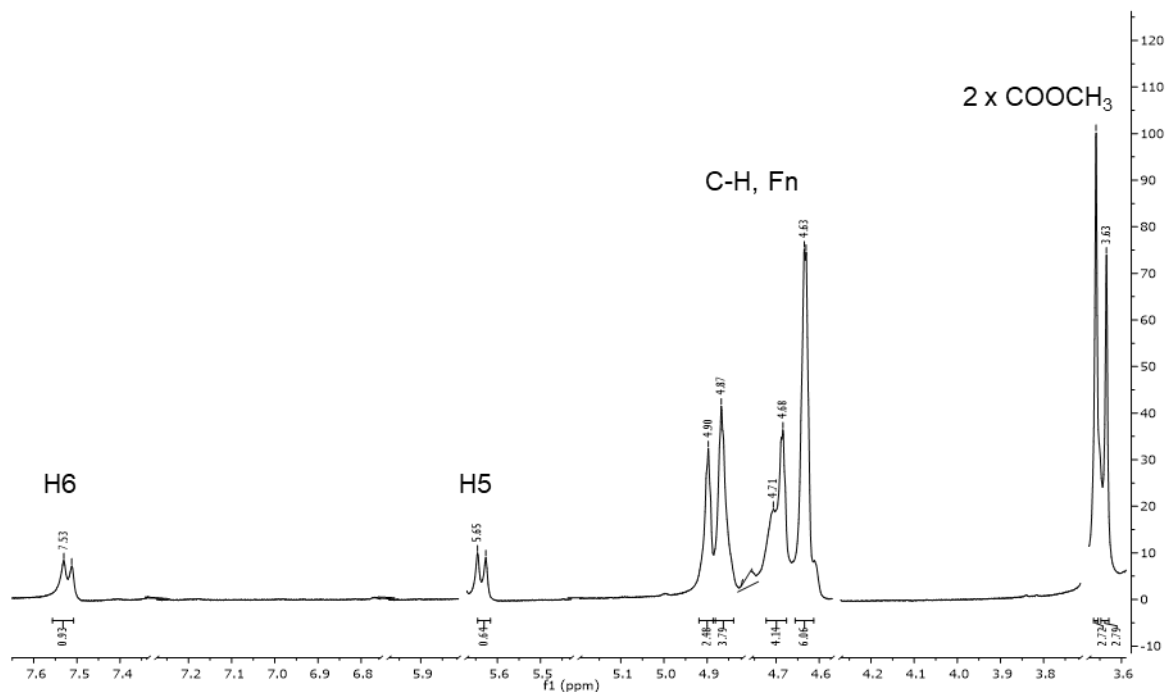
koji potvrđuje prisutnost C5- ugljikovog atoma, asigniran je u području od δ 70 do 130 ppm, ovisno o supstituentu na tom ugljikovom atomu. U području od δ 75 i 70 ppm asignirano je 6 signala od čega se dva pripisuju kvaternim ugljikovim atomima, a četiri ferocenskim ugljikovim atomima prstena, što potvrđuje supstituciju na oba ciklopentadienilna prstena. U spektru derivata, **6b** ugljik metilne skupine timina potvrđen je signalom pri 12,4 ppm, dok je u svim spektrima, metoksi skupina estera vezanog na 1'-prstenu ferocena potvrđena signalom pri 52.1 ppm (slika 26).



Slika 26. ¹³C NMR spektar 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N*1-floruracila (**6c**)

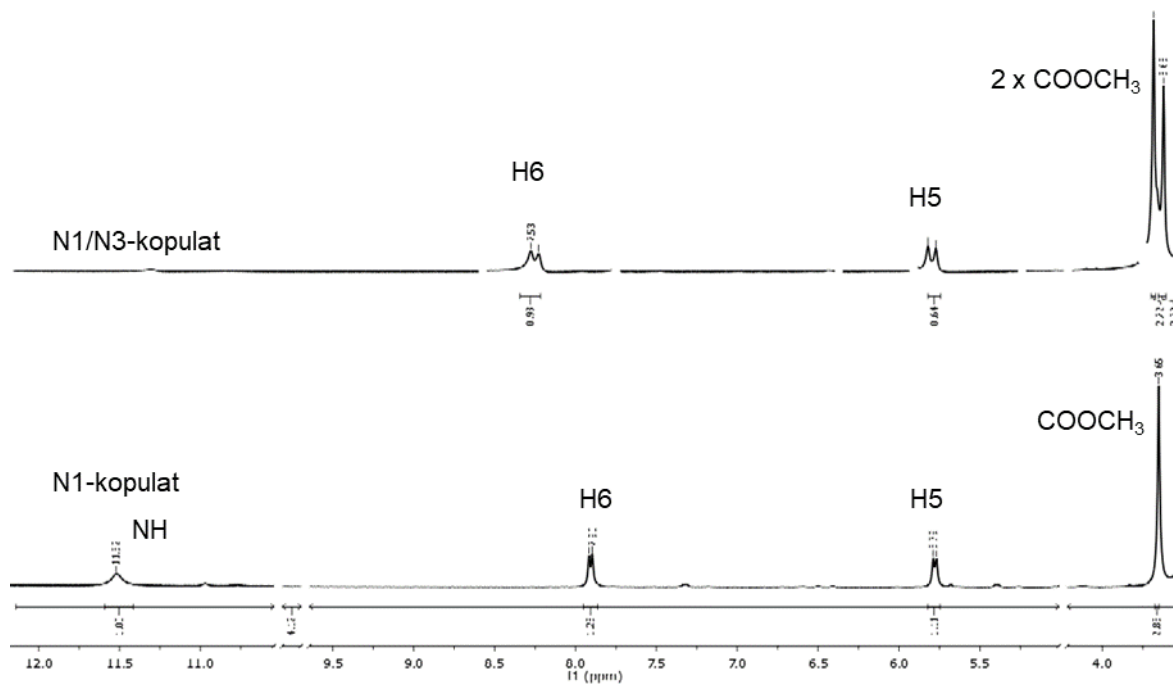
U ¹H-NMR spektru biskopulata **7a-f** snimljenom u DMSO-u izostaje signal oko 12 ppm što ukazuje kako je došlo do supstitucije na oba dušikova atoma pirimidinskog prstena. Protoni na C6-položaju asignirani su na sličnim kemijskim pomacima kao i kod kopulata **6a-e**. Također, u spektru uracilnog derivata **7a** asigniran je signal za proton u C5-položaju pri δ 5.65 ppm kao dublet, a u spektru derivata **7b** signal pri δ 1.80 ppm, kao triplet intenziteta 3H koji potvrđuje metilnu skupinu timina. U ¹H-NMR spektrima vidljiva su četiri signala u području od δ 4,90 do 4,60 ppm ukupnog intenziteta 16H koji su pripisani ferocenskim protonima ciklopentadienilnih

jezgara, što ukazuje na supstituciju dvije ferocenske podjedinice na pirimidinski prsten (slika 27).



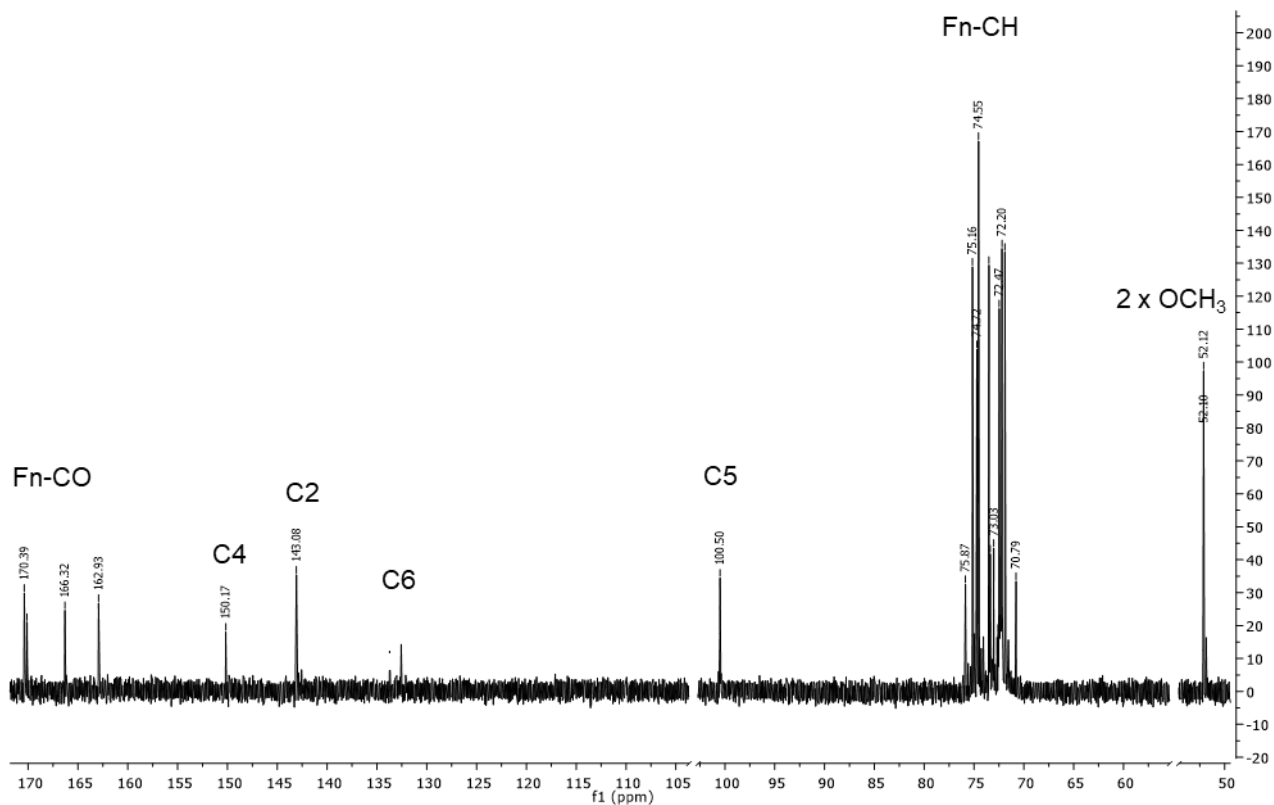
Slika 27. ^1H NMR spektri 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N*1/*N*3-uracila (**7a**)

U svim spektrima, kemijski pomaci za protone metoksi skupine vezane na ferocenu u položaju 1' asignirani su u području oko δ 3 ppm i to kao dva singleta inteziteta 3H što dodatno potvrđuje prisutnost dviju ferocenskih podjedinica u kopulatima **7a-f** (slika 28).



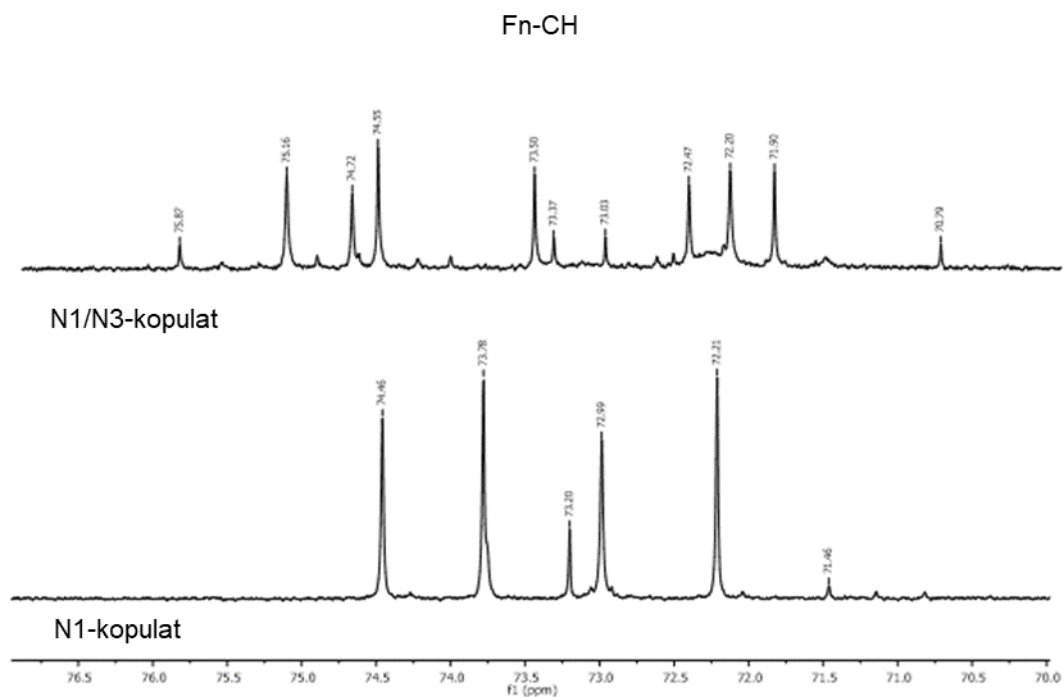
Slika 28. Dio ^1H NMR spektra kopulata **N1-kopulat (6a)** i **N1/N3-kopulat (7a)**

U ^{13}C NMR spektru spojeva **7a-f** vidljiva su dva signala pri δ 170 ppm koji se pripisuju ugljikovom atomu karbnilne skupine, koji je poveznica ferocena i baze. Signali pri δ 164,5 i 149,9 ppm pripisani su karbnilnim ugljikovim atomima pirimidinskog prstena (C2-, C4-), a pri 140 ppm ugljikovom atomu C6-. Signal C5- ugljikovog atoma zabilježen je ovisno o supstituentu u području δ 125 ppm, za spoj **7b** pri δ 70 ppm (slika 29).



Slika 29. ^{13}C NMR spektar 1'-metoksikarbonilferrocenil-*N1/N3*-uracila (**7a**)

Ferocenskim ugljikovim atomima pripisani su kemijski pomaci od δ 78 do 70 ppm pri čemu su u svim spektrima vidljiva 4 kvaterna ugljikova atoma, što upućuje na prisutnost dvije ferocenske podjedinice u samim kopulatima i heteroanualnu supstituciju na samom ferocenu. Dva signala asignirana u području oko δ 52 ppm potvrđuju prisutnost dviju metoksi skupina estera vezanog na 1'-prstenu ferocena, odnosno vezivanje dvije ferocenske podjedinice na *N1*- i *N3*- položaju baze (slika 30).



Slika 30. Dio ^{13}C spektra *N1*-kopulat (**6a**) i *N1/N3*-kopulat (**7a**) u području od δ 78 do 70 ppm

Na temelju provedene reakcije kopulacije ester-klorida (**5**) i nezaštićene nukleobaze uz NaH, kao deprotonirajućeg sredstva, DMF kao otapala te provedene spektralne analize svih dobivenih produkata, može se uočiti nastajanje isključivo samo *N1*-regioizomera bez uporabe zaštite *N3*- položaja baze. U reakcijama provedenim u acetonitilu s trietilaminom kao deprotonirajućom bazom, dobiveni su *N1*- i *N1/N3*- biokonjugati.

5. ZAKLJUČAK

1. Višestupanjskom sintezom pripremljen je intermedijar 1'-metoksikarbonilferocenoil klorid (**5**) koji je u reakciji s uracilom i njegovim 5-supstituiranim derivatima preveden u monokonjugate 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1*-uracil derivate **6a-f** i biskonjugate 1'-metoksikarbonilferocenoil-*N1/N3*-uracil derivate **7a-f**.
2. U reakcijama ester-klorida i nezasićene nukleobaze uz natrijev hidrid kao deprotonirajućeg reagensa u dimetilformamidu, nastaje isključivo *N1*-izomer što ukazuje na regiselektivnost ove reakcije.
3. U reakcijama provedenim u acetonitrilu uz trietilamin uočeno je nastajanje *N1/N3*-kopolata **7a-f** uz *N1*-kopolata **6a-f**. Najveći udio *N1*-bikonjugata dobiven je u reakciji s timinom što može biti posljedica elektrodonorske skupine na položaju C5-nukleobaze, dok se u prisutnosti elektronakceptorske skupine povećava udio biskonjugata.
4. Metoksi skupina estera vezanog na 1'-prstenu ferocena nije utjecala na sam tijek reakcije, odnosno nastajanja *N1*- i *N1/N3*-kopolata. Veći udio *N1*-produkta može se pripisati steričkim smetnjama same skupine pri reakciji kopulacije dviju ferocenskih podjedinica na nukleobazu.
5. Strukture svih priređenih spojeva potvrđene su FTIR, ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom. Na osnovu kemijskih pomaka u spektrima spojeva, potvrđena je supstitucija pirimidinske baze s jednom ferocenskom podjedinicom u spojevima **6a-f**, dok je kod spojeva **7a-f** potvrđena supstitucija dviju ferocenskih podjedinica na nukleobazu.

6. LITERATURA

Abdel-Mottaleb Y, Abdel-Mottaleb MSA (2016) Molecular modeling studies of some uracil and new deoxyuridine derivatives. *J Chem* **2016**. <https://doi.org/10.1155/2016/5134732>

Alsina-Sánchez ÁM, Montalvo-Vázquez S, Grafals-Ruiz N, Acosta C, Ormé EM, Rodríguez I, i sur. (2023) Synthesis of Novel Heterocyclic Ferrocenyl Chalcones and Their Biological Evaluation. *ACS Omega* **8**, 34377–34387. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01830>

Biot C, Nosten F, Fraisse L, Ter-Minassian D, Khalife J, Dive D (2011) The antimalarial ferroquine: from bench to clinic. *Parasite* **18**, 207–214. <https://doi.org/10.1051/PARASITE/2011183207>

Blewett S, McGuigan C, Barucki H, Andrei G, Snoeck R, Clercq E De, i sur. (2001) Bicyclic furo pyrimidine nucleosides with aryloxyphenyl and halophenyl substituted side chains as potent and selective varicella-zoster virus inhibitors. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **20**, 1063–1066. <https://doi.org/10.1081/NCN-100002492>

Chellan P, Sadler PJ (2020) Enhancing the Activity of Drugs by Conjugation to Organometallic Fragments. *Chem - Eur J* **26**, 8676–8688. <https://doi.org/10.1002/CHEM.201904699>

Chen SC (1980) The syntheses and mass spectra of some *N*-substituted ferrocenylmethyl adenines. *J Organomet Chem* **202**, 183–189. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)90515-1](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)90515-1)

Djaković S, Glavaš-Obrovac L, Lapić J, Maračić S, Kirchofer J, Knežević M, i sur. (2021) Synthesis and biological evaluations of mono- and bis-ferrocene uracil derivatives. *Appl Organomet Chem* **35**, e6052. <https://doi.org/10.1002/AOC.6052>

Ewald B, Sampath D, Plunkett W (2008) Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* **27**, 6522–6537. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.316>

Gritzner G, Kůta J (1984) Recommendations on reporting electrode potentials in nonaqueous solvents: IUPAC commission on electrochemistry. *Electrochim Acta* **29**, 869–873. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(84\)80027-4](https://doi.org/10.1016/0013-4686(84)80027-4)

Jaouen G, Vessières A, Top S (2015) Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chem Soc Rev* **44**, 8802–8817. <https://doi.org/10.1039/C5CS00486A>

Jumde MH, Gurnule WB (2019) An Overview of Thin Layer Chromatography. *Int J Technol Manag* **9**, 2846–2853. <https://doi.org/10.10089/IJMTE.2019.V9I01.18.27737>

- Kappe CO (1993) 100 years of the biginelli dihydropyrimidine synthesis. *Tetrahedron* **49**, 6937–6963. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)87971-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87971-0)
- Kowalski K (2016) Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and applications. *Coord Chem Rev* **317**, 132–156. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.02.008>
- Kowalski K (2021) Organometallic nucleosides—Synthesis, transformations, and applications. *Coord Chem Rev* **432**, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213705>
- Kozarac A (2021) Praćenje udjela produkata u reakciji N-ferrocenoiliranja C-5 derivata uracila uporabom 1H-NMR spektroskopije (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Kuzman I (2020). N-ferrocenoiliranje C-5 derivata uracila (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Lam PL, Wong RSM, Lam KH, Hung LK, Wong MM, Yung LH, i sur. (2020) The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. *Chem Biol Interact* **320**, 109023. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2020.109023>
- Lapić J, Havaić V, Šakić D, Sanković K, Djaković S, Vrček V (2015) Ferrocenoyl-Substituted Pyrimidine Nucleobases: An Experimental and Computational Study of Regioselective Acylation of Uracil, Thymine, and 5-Fluorouracil. *European J Org Chem* **2015**, 5424–5431. <https://doi.org/10.1002/EJOC.201500647>
- Malthum S, Polkam N, Allaka TR, Chepuri K, Anireddy JS (2017) Synthesis, characterization and biological evaluation of purine nucleoside analogues. *Tetrahedron Lett* **58**, 4166–4168. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2017.09.041>
- Morris SM (1993) The genetic toxicology of 5-fluoropyrimidines and 5-chlorouracil. *Mutat Res* **297**, 39–51. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(93\)90006-9](https://doi.org/10.1016/0165-1110(93)90006-9)
- Nemet M (2019) Nuklearna magnetska rezonancija u medicini (diplomski rad), Odjel za fiziku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Nguyen H V, Sallustrau A, Balzarini J, Bedford MR, Eden JC, Georgousi N, i sur. (2014) Organometallic nucleoside analogues with ferrocenyl linker groups: Synthesis and cancer cell line studies. *J Med Chem* **57**, 5817–5822. <https://doi.org/10.1021/jm500246h>
- Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* **1**, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0066>

Pu F, Ren J, Qu X (2018) Nucleobases, nucleosides, and nucleotides: versatile biomolecules for generating functional nanomaterials. *Chem Soc Rev* **47**, 1285–1306. <https://doi.org/10.1039/C7CS00673J>

Rana M, Perotti A, Bisset LM, Smith JD, Lamden E, Khan Z i sur (2022) A ferrocene-containing nucleoside analogue targets DNA replication in pancreatic cancer cells. *Metallomics*. **2022** Jul <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfac041>

Rep V, Piškor M, Šimek H, Mišetić P, Grbčić P, Padovan J, i sur. (2020) Purine and Purine Isostere Derivatives of Ferrocene: An Evaluation of ADME, Antitumor and Electrochemical Properties. *Molecules* **25**, 1570. <https://doi.org/10.3390/molecules25071570>

Seley-Radtke K, Yates M (2018) The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Research* **154**, 66-86 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.004>.

Simenel AA, Morozova EA, Snegur L V, Zykova SI, Kachala V V, Ostrovskaya LA, i sur. (2009) Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo. *Appl Organomet Chem* **23**, 219–224. <https://doi.org/10.1002/AOC.1500>

Singh A (2020) A review on gemcitabine modification, *Materials Today: Proceedings* **37**, 3301-3304, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.118>

Singh A, Lumb I, Mehra V, Kumar V (2019) Ferrocene-appended pharmacophores: an exciting approach for modulating the biological potential of organic scaffolds. *Dalton Trans* **48**, 2840–2860. <https://doi.org/10.1039/C8DT03440K>

Singh N, Shreshtha AK, Thakur MS, Patra S (2018) Xanthine scaffold: scope and potential in drug development. *Heliyon* **4**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00829>

Toma M, Zubčić G, Lapić J, Djaković S, Šakić D, Vrček V (2022) Ferrocenoyl-adenines: substituent effects on regioselective acylation. *Beilstein J Org Chem* **18**, 1270–1277. <https://doi.org/10.3762/bjoc.18.133>

Vessieres A (2019) Iron Compounds as Anticancer Agents. U Casini A, Vessières A, Meier-Menches SM (ured.) *Metal-based Anticancer Agents*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, str 62-90. <https://doi.org/10.1039/9781788016452-00062>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Matej Ivanović izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis