

Dizajn i sinteza novih azaindolnih derivata kao mogućih inhibitora FYN kinaze

Križan, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:787739>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Helena Križan

**Dizajn i sinteza novih azaindolnih derivata kao mogućih
inhibitora FYN kinaze**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2024. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Selvita d.o.o. pod mentorstvom dr. sc. Dijane Pešić i neposrednim voditeljstvom Ele Radošević, mag. chem. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Ines Primožič.

Zahvale

Zahvaljujem se dr. sc. Dijani Pešić na ukazanom povjerenju, uloženom trudu i vremenu, pomoći i savjetima pri pisanju te velikoj pozitivnoj energiji i podršci.

Zahvaljujem se Eli Radošević, mag. chem. na prijedlogu teme, pomoći i savjetima tijekom izvođenja eksperimenata.

Zahvaljujem se Selviti d.o.o. na mogućnosti izrade diplomskog rada i ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ines Primožič na susretljivosti i stručnim savjetima pri pisanju diplomskog rada.

Zahvaljujem se obitelji i prijateljima na podršci i potpori tijekom cijelog studija i izrade ovog rada.

Hvala vam svima od srca!

Sadržaj

SAŽETAK.....	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Kinaze.....	3
2.1.1. <i>Struktura protein kinaza.....</i>	<i>4</i>
2.2. SRC obitelj protein kinaza	6
2.3. FYN kinaza	6
2.3.1. <i>Struktura FYN kinaze</i>	<i>6</i>
2.3.2. <i>Biološki značaj FYN kinaze.....</i>	<i>11</i>
2.4. Inhibitori protein kinaza	13
2.4.1. <i>Reverzibilni inhibitori protein kinaza</i>	<i>14</i>
2.4.2. <i>Kovalentni inhibitori protein kinaza</i>	<i>15</i>
2.4.3. <i>Otpornost na inhibitore/lijekove</i>	<i>16</i>
2.4.4. <i>Inhibitori SRC obitelji kinaza</i>	<i>17</i>
2.5. Kemija azaindola.....	20
2.6. Ullmanova reakcija	21
2.7. Fotoredoks reakcija	23
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. Materijali i metode.....	27
3.2. Priprava azaindolnih derivata	29
3.2.1. <i>Priprava N-(2,4-dimetoksibenzil)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-amina (1a).....</i>	<i>29</i>
3.2.2. <i>Priprava 4-klor-7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidina (1b)</i>	<i>29</i>
3.2.3. <i>Priprava N-(2,4-dimetoksibenzil)-7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-amina iz 1a i 1b (2).....</i>	<i>30</i>
3.2.4. <i>Priprava N-(2,4-dimetoksibenzil)-3-metoksi-N-(7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)propanamid (3).....</i>	<i>31</i>
3.2.5. <i>Priprava N-[7-(hidroksimetil)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il]-3-metoksipropanamida (4) i 3-metoksi-N-(7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)propanamida (5).....</i>	<i>32</i>
3.2.6. <i>Priprava 3-metoksi-N-(7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)propanamida (5).....</i>	<i>32</i>
3.2.7. <i>Priprava 3-metoksi-N-(7-(5-(trifluormetil)piridin-2-il)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)propanamida klasičnom Ullmanovom reakcijom i fotoredoks reakcijom (6)</i>	<i>33</i>
3.3. Računalne metode	35
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	38

4.1. Uvod	38
4.2. Računalne metode	40
4.2.1. Molekulska uklapanje u FYN kinaznu domenu	40
4.2.2. Fizikalno-kemijska svojstva azaindolnih produkata	44
4.2.3. Molekulska uklapanje produkta 6 u SRC, LCK, LYN	45
4.3. Priprava azaindolnih derivata	47
4.3.1. Uvođenje zaštite i amino skupine na 4-klor-7H-pirol[2,3-d]pirimidin (produkt 1a i 1b).....	47
4.3.2. Priprava zaštićenog amino derivata 7-azaindola (produkt 2)	49
4.3.3. Aciliranje zaštićenog amino derivata 7-azaindola (produkt 3)	50
4.3.4. Uklanjanje SEM i DMB zaštite s derivata 7-azaindola (produkt 5)	50
4.3.5. Priprava derivata 7-azaindola klasičnom Ullmanovom reakcijom (6).....	51
4.3.6. Priprava derivata 7-azaindola fotoredoks reakcijom (6)	52
§ 5. ZAKLJUČAK	55
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	56
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	59
§ 8. DODATAK.....	VIII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XIX



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Dizajn i sinteza novih azaindolnih derivata kao mogućih inhibitora FYN kinaze

Helena Križan

FYN kinaza je član obitelji SRC tirozin-kinaza, prepoznata kao prikladna meta za antitumorske lijekove te lijekove za neurodegenerativne bolesti, posebice Alzheimerovu bolest. Analizom literaturno dostupnih podataka o inhibitorima SRC obitelji kinaza racionalnim pristupom dizajnirani su, a zatim i sintetizirani, novi azaindolni derivati kao mogući inhibitori FYN kinaze. Na komercijano dostupan 4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin uvedeni su 2-(trimetoksisilil)etoksimetilna zaštitna skupina i (2,4-dimetoksifenil)metanamin. Potom je uslijedila acilacija pomoću 3-metoksipropanoil-klorida i deprotekcija u trifluorocenoj kiselini. Dobiveni azaindol poslužio je kao reaktant u Ullmanovoj reakciji, usporedno s fotoredoks reakcijom, koja se pokazala boljim pristupom. Pripravljene spojevi pročišćeni su dostupnim kromatografskim tehnikama i okarakterizirani analitičkim metodama (UPLC-UV/MS, 1D i 2D NMR). U računalnom dijelu rada molekulskim uklapanjem uspoređeno je vezanje produkata, ATP-a i staurosporina u FYN kinaznu domenu te produkta dobivenog u fotoredoks reakciji u nekoliko kinaza SRC obitelji.

(61+XIX stranica, 39+D13 slika, 4 tablica, 46 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: fotoredoks, FYN kinaza, inhibitori, racionalni dizajn, Ullmanova reakcija

Mentor: dr. sc. Dijana Pešić

Neposredni voditelj: Ela Radošević, mag. chem.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Ines Primožič

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
 2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 3. izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
- Zamjena: doc. dr. sc. Nikola Cindro

Datum diplomskog ispita: 25.10.2024.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

The design and synthesis of novel azaindole derivatives as possible inhibitors of FYN kinase

Helena Križan

FYN kinase is a member of the SRC family of tyrosine kinases and has been recognized as a suitable target for anticancer drugs as well as drugs for neurodegenerative diseases, especially Alzheimer's disease. By analyzing the available data on inhibitors of the SRC family of kinases using a rational approach, new azaindole derivatives were designed, and then synthesized, as possible inhibitors of FYN kinase. 2-(trimethoxysilyl)ethoxymethyl protective group and (2,4-dimethoxyphenyl)methanamine were introduced to the commercially available 4-chloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine. This was followed by acylation using 3-methoxypropionyl chloride and deprotection in trifluoroacetic acid. The resulting azaindole served as a reactant in the Ullmann reaction, in parallel with the photoredox reaction, which proved to be the better approach. The prepared compounds were purified using available chromatographic techniques and characterized by analytical methods (UPLC-UV/MS, 1D and 2D NMR). In the computational part, molecular docking was used to compare the binding of the products, ATP, and staurosporine to the FYN kinase domain, as well as the product obtained in photoredox reaction to several kinases of the SRC family.

(61+XIX pages, 39+D13 figures, 4 tables, 46 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: FYN kinase, inhibitors, photoredox, rational design, Ullman reaction

Mentor: Dr. Dijana Pešić, Senior Research Associate

Assistant mentor: Ela Radošević, mag. chem.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Ines Primožič, Professor

Reviewers:

1. Dr. Ines Primožič, Professor
 2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
 3. Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor
- Substitute: Dr. Nikola Cindro, Assistant Professor

Date of exam: 25.10.2024

§ 1. UVOD

Kinaze su važna skupina enzima koja regulira mnoge stanične i izvanstanične procese, poput staničnog ciklusa, sinteze proteina, diobe stanice,¹ proliferacije, diferencijacije, preživljenja,² apoptoze, metabolizma i transkripcije.^{3,4} Njihova povećana aktivnost povezana je s brojnim poremećajima, od upalnih bolesti, dijabetesa, infektivnih bolesti, kardiovaskularnih poremećaja,⁵ rasta i preživljenja stanica do raka.² Stoga su prepoznate kao atraktivne biološke mete za liječenje brojnih oboljenja.

FYN kinaza je član obitelji SRC nereceptorskih tirozin kinaza, uključena u brojne signalne puteve koji reguliraju sve od stanične adhezije i pokretljivosti, diferencijacije, proliferacije,⁶ eritropoeze,⁷ urođenog imunološkog odgovora, metastaza i otpornosti tumora na lijekove, pa sve do prijenosa signala između aksona i glija stanica, sazrijevanja oligodendrocita i mijelinizacije.^{8,9} Zahvaljujući tome prepoznata je kao prikladna meta za antitumorske lijekove te lijekove za neurodegenerativne bolesti, posebice Alzheimerovu bolest. No, FYN kinaza je zahtjevna meta zbog svoje homologije s drugim kinazama, te njeni inhibitori često nisu dovoljno specifični.⁸

Većina odobrenih i klinički naprednih inhibitora kinaza natječe se s ATP-om za isto vezno mjesto² te mnoge od njih čine „ATP-mimetici“ – derivati pirazolo[2,3-d]pirimidina, pirolo[2,3-d]pirimidina, pirido[2,3-d]pirimidina i kinolina.¹⁰

Cilj ovog rada je dizajn i sinteza analoga azaindola kao mogućih inhibitora FYN kinaze klasičnim metodama organske sinteze. Pregledom literature o inhibitorima SRC obitelji kinaza racionalnim pristupom dizajniran je 3-metoksi-*N*-(7-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidin-4-il)propanamid te je provedena sinteza iz komercijalno dostupnog 4-klor-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidina u šest sintetskih koraka. Uvedena je zaštitna skupina (SEM, engl. *2*-(trimethylsilyl)ethoxymethyl) na pirazolni dušik i amino skupina (koristeći dimetoksi-benzil amin, DMB (engl. *2,4*-dimethoxybenzyl), kao prekursor amino skupine) na pirimidinski prsten, potom je acilirana amino skupina i uklonjene su SEM i DMB zaštitne skupine. U nastavku istraživanja sintetiziran je 3-metoksi-*N*-(7-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidin-4-il)propanamid, pri čemu se usporedila učinkovitost nukleofilne aromatske supstitucije provedene Ullmanovom reakcijom i fotoredoks reakcijom. Tijek reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) i tekućinskom kromatografijom

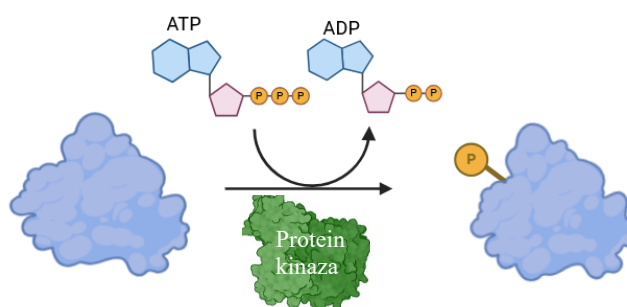
ultravisoke razlučivosti sa spektrometrom masa i UV detektorom (UPLC-MS/UV) te su spojevi okarakterizirani snimanjem NMR i UPLC-MS/UV spektara.

U računalnom dijelu ovog rada provedeno je molekulsko uklapanje sintetiziranih spojeva u kinaznu domenu FYN kinaze (PDB 2dq7) te je uspoređeno s vezanjem ATP-a i staurosporina. Također, molekulskim uklapanjem 3-metoksi-*N*-(7-(5-(trifluormetil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamida u nekoliko kinaznih domena iz SRC obitelji kinaza procijenjena je selektivnost vezanja prema FYN kinazi.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kinaze

Kinaze su enzimi koji prenose γ -fosfat adenozin trifosfata (ATP) na različite supstrate, poput lipida, šećera ili aminokiselina u procesu koji se naziva fosforilacija (slika 1). Fosforilacija ima važnu ulogu u prijenosu signala te regulaciji mnogih staničnih i izvanstaničnih procesa, poput regulacije staničnog ciklusa, sinteze proteina, diobe stanice,¹ proliferacije, diferencijacije, preživljenja,² apoptoze, metabolizma i transkripcije.^{3,4} Poznato je da je prekomjerna fosforilacija kod eukariota povezana s brojnim poremećajima, od upalnih bolesti, dijabetesa, infektivnih bolesti, kardiovaskularnih poremećaja,⁵ rasta i preživljenja stanica do raka.²

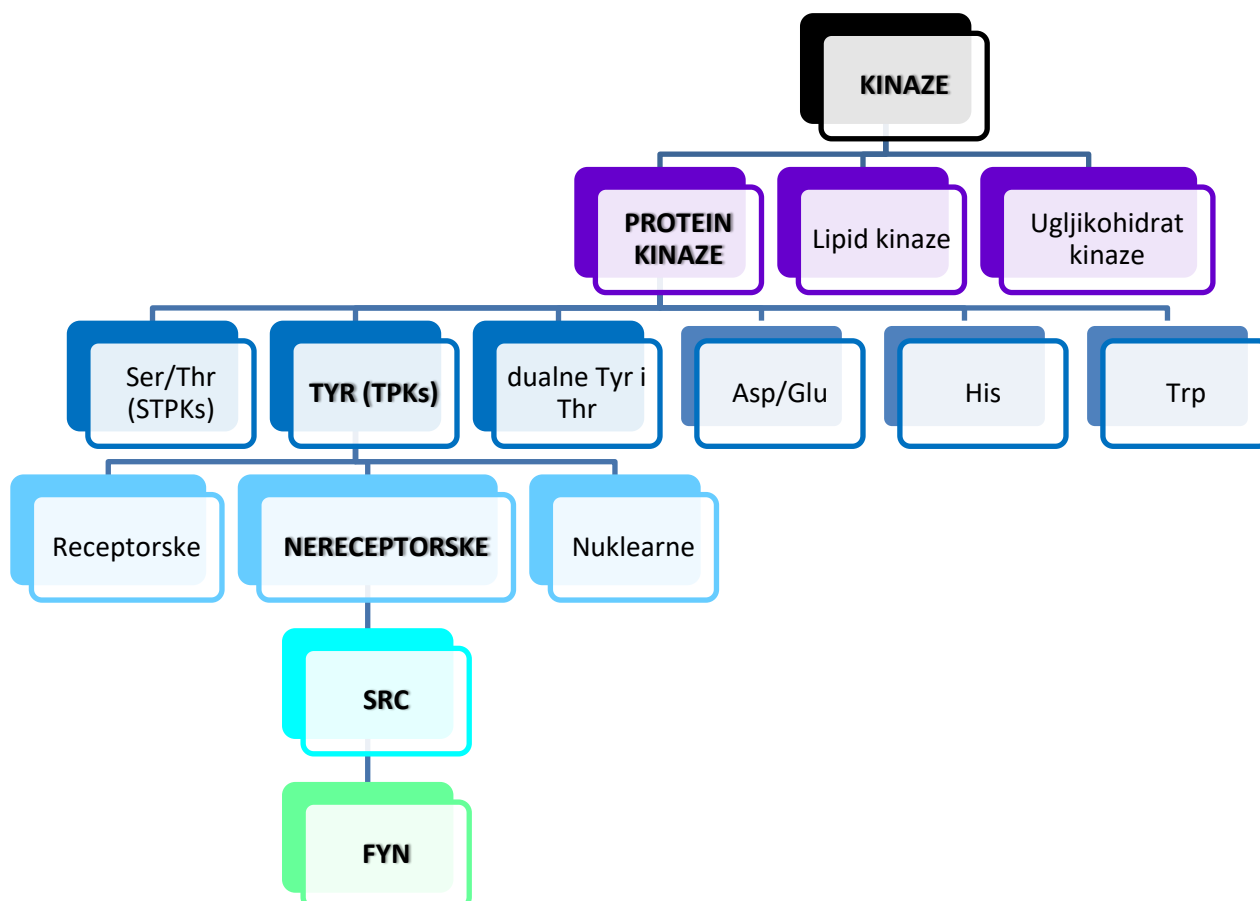


Slika 1. Općenita shema fosforilacije proteina. Za prikaz protein kinaze korištena je struktura SRC kinaze (PBD:2H8H). Napravljeno pomoću BioRender.com.

Osim fosforilacije, kinaze imaju i nekatalitičke uloge: sudjeluju u protein-protein interakcijama, alosteričkim efektima, relokaciji, substancičnom usmjeravanju i vezanju DNA.²

Općenito, kinaze se dijele prema supstratu kojeg fosforiliraju na: protein kinaze, lipid kinaze i ugljikohidrat kinaze.² Od njih protein kinaze su najbrojnije, te ljudski genom prema posljednjim podacima sadrži čak 568 gena protein kinaza,¹ koje se dalje dijele na obitelji tipičnih i atipičnih.^{1,2} Prema aminokiselinama koje fosforiliraju dijele se na: serinske (STPK), tirozinske (TPK) i kinaze dualne specifičnosti, koje fosforiliraju treonine/serine i tirozine,^{1,2} zatim aspartil/glutamil protein kinaze te histidin-specifične i triptofan-specifične protein kinaze (slika 2).¹¹ Većina protein kinaza pripada serin protein kinazama, što se i očituje u omjeru

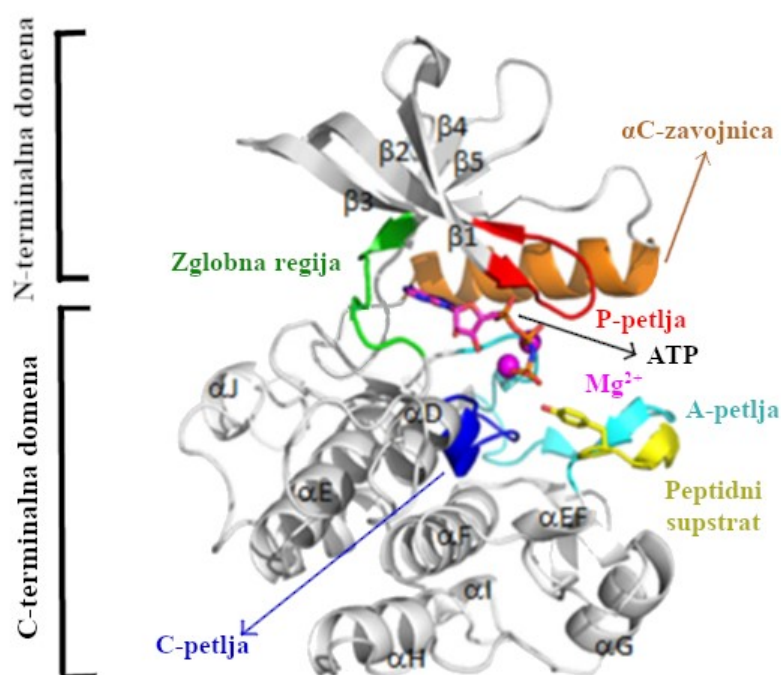
fosforilacije u stanici – pSer: pThr: pTyr = 1000:100:1. Iako je tek mali broj supstrata fosforiliran tirozin kinazama, one imaju važnu ulogu, posebice jer mutacije u tim genima često dovode do gubitka funkcije (engl. *loss of function*) ili dobivanja nove funkcije (engl. *gain of function*). Tirozin kinaze se mogu podijeliti u receptorske i nereceptorske,² u koje spadaju SRC, ABL, ACK, CSK, FAK, FES, JAK, SYK i TEC obitelji kinaza.¹¹



Slika 2. Podjela kinaza usmjerena prema FYN kinazi.¹¹

2.1.1. Struktura protein kinaza

Osnovna struktura protein kinaza je visoko konzervirana i katalitička domena se može podijeliti na dva režnja (slika 3).



Slika 3. Aktivna konformacija protein kinaza s prikazanim sekundarnim strukturama te označenim ključnim dijelovima.²

Manji N-terminalni režanj prvenstveno je sastavljen od β -ploča i odgovoran je za vezanje ATP-a. Veći C-terminalni režanj pretežno je građen od α -zavojnica i uključen je u vezanje supstrata. Režnjevi su povezani fleksibilnim zglobnim područjem, što omogućuje promjene konformacije tijekom katalize. Unutar katalitičke domene, ATP-vezujuća brazda nalazi se između N- i C-terminalnih reznjeva. Za aktivnost kinaza ključni su konzervirani sekvencijski motivi u ovom području, poput glicin-bogate petlje (P-petlja važna za koordiniranje fosfata ATP-a), katalitičke petlje (C-petlja, koja sadrži DFG motiv - konzervirani slijed aminokiselina: aspartat-fenilalanin-glicin, pri čemu aspartat koordinira magnezijeve ione važne za vezanje ATP-a i prijenos fosfata) i aktivacijskog segmenta (A-petlja koja sadrži fosforilacijska mjesta, koja kada su fosforilirana dovode do konformacijskih promjena važnih za ispravno pozicioniranje suptrata i katalitičkog dijela kinaze). A-petlja može poprimiti više konformacija, čime regulira pristup aktivnom mjestu i kontrolira stanje aktivnosti kinaze. Osim toga, mnoge kinaze sadrže regulatorne domene ili motive, poput SH2 i SH3 domena, koji olakšavaju specifične interakcije između proteina i moduliraju aktivnost kinaze kao odgovor na stanične signale.²

Za aktivnu konformaciju protein kinaza važni su: interakcija lizina iz β 3-ploče i glutamata iz α C-zavojnice (engl. *salt bridge*), “DFG-in” i “ α C-in” položaj te fosforiliran bočni ogranak regulatorne aminokiseline u A-petlji.²

2.2. SRC obitelj protein kinaza

SRC obitelj (SFKs, engl. *SRC family kinases*) nereceptorskih tirozin kinaza čine: SRC, YES, YRK, BLK, FGR, HCK, LCK, LYN i FYN kinaza.^{6,10} Uključene su u signalne puteve koji kontroliraju brojne ključne stanične funkcije, poput transkripcije gena, imunološkog odgovora, stanične adhezije, progresije staničnog ciklusa, stanične diferencijaciju, apoptoze, proliferacije i drugih.^{11,12} Članovi SRC obitelji su onkogeni i potiču napredak tumora kad su prekomjerno aktivirani ili eksprimirani.¹³⁻¹⁵ Također, abnormalan prijenos signala SKF ima ulogu u patogenezi kronične boli,¹⁶ osteoporoze, gubitka mase kostiju uzrokovane upalom, reumatoidnog artritisa, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti,¹⁰ preosjetljivosti na bol te otpornosti na djelovanje morfija.¹⁶

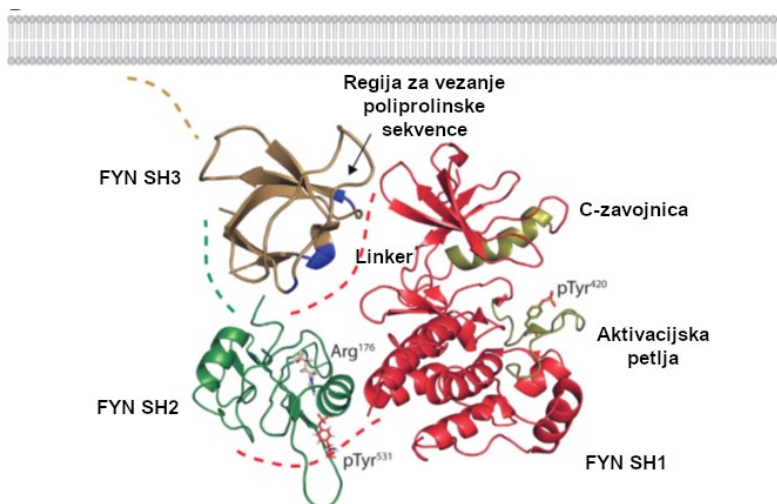
2.3. FYN kinaza

FYN kinaza je član obitelji SRC nereceptorskih tirozin kinaza, prekomjerno eksprimirana u nekolicini tumora kod ljudi, poput raka prostate, melanoma, glioma, raka gušterače i kronične mijelogenične leukemije.^{10,13}

FYN kinaza je uključena u brojne signalne puteve koji reguliraju sve od stanične adhezije i pokretljivosti, diferencijacije, proliferacije,⁶ eritropoeze,⁷ urođenog imunološkog odgovora, metastaza i otpornosti tumora na lijekove, pa sve do prijenosa signala između aksona i glija stanica, sazrijevanja oligodendrocita i mijelinizacije.^{8,9} Zahvaljujući tome prepoznata je kao prikladna meta za antitumorske lijekove te lijekove za neurodegenerativne bolesti, posebice Alzheimerovu bolest. No, FYN kinaza je zahtjevna meta zbog svoje homologije s drugim kinazama, te njeni inhibitori često nisu dovoljno specifični.⁸

2.3.1. Struktura FYN kinaze

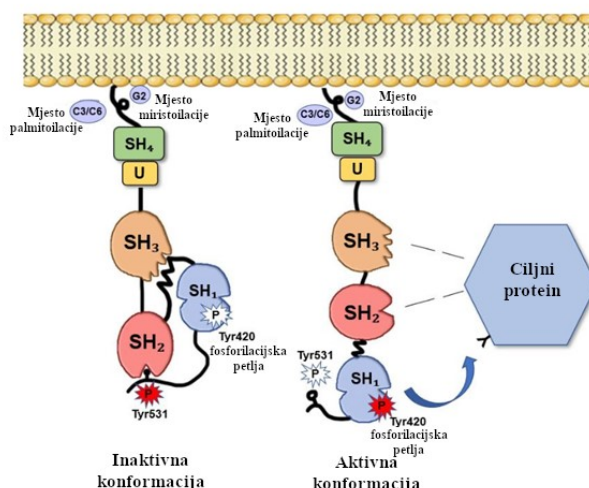
Skica strukture FYN kinaze temeljena na strukturi autoinhibirane SRC kinaze (budući da nije poznata kompletna struktura FYN kinaze) prikazana je na slici 4.¹⁷



Slika 4. Struktura domena i intramolekularne interakcije FYN kinaze. Vrpčasti prikaz relativnih pozicija SH3, SH2 i SH1 domena u inaktivnoj konformaciji FYN kinaze. Pozicije su temeljene na strukturi autoinhibirane SRC kinaze (PDB 2SRC), struktura kinazne domene i C-petlje i A-petlje (žuto) na strukturi FYN kinazne domene u kompleksu sa staurosporinom (PDB 2dq7) te SH3 domena (PDB 1nyg) i SH2 domena (PDB 1aot). Plavo označen dio SH3 domene ostvaruje interakciju s linkerskom regijom. Arg176 u SH2 domeni (zeleno) je očuvan kod članova SFK obitelji te je primarno mjesto interakcije s fosfotirozinom na supstratima. U inaktivnoj konformaciji, Arg176 je vezan na C-terminalni inhibitorni fosfotirozin pTyr531.

Takva konformacije sprječava vezanje supstrata na kinaznu domenu (crveno).¹⁷

Shematski prikaz strukture FYN kinaze u inaktivnoj i aktivnoj konformaciji prikazana je na slici 5.



Slika 5. Struktura FYN kinaze u inaktivnoj i aktivnoj konformaciji. SH4 domena je zadužena za substaničnu lokalizaciju i vezanje na membranu. Sadrži Gyl2 koji je ključan za miristoilaciju te Cys3 i Cys6 koji su palmitoilirani te služe za vezanje na membranu. Potom slijedi “jedinstvena” regija (U) te SH3 domena i SH2 domena, koja je zadužena za vezanje pTyr i hidrofobnih sekvenci. SH1 domena je odgovorna za kinaznu aktivnost i sadrži Tyr420 koji je važan za aktivnost. Drugo važno mjesto regulacije aktivnosti je Tyr531.⁹

Na N-kraju nalazi se SH4 domena, zadužena za substaničnu lokalizaciju i vezanje na membranu, u kojoj se na Gly2 tijekom translacije veže miristinska skupina, koja služi kao sekvenca za usmjeravanje i sidrenje proteina u membranu. SH4 domena sadrži i neočuvanu regiju koja doprinosi različitim funkcijama članova SFK obitelji. U slučaju FYN kinaze, u ovoj regiji nalazi se „jedinstvena regija“ koja sadrži 2 cisteina (Cys) koji mogu biti reverzno palmitoilirani (slika 5), omogućujući time lokalizaciju FYN kinaze u lipidne splavove u plazma membrani.¹⁷

Nakon SH4 domene slijede SH3 i SH2 domene (engl. *SRC-homology regions 3 and 2*). SH3 domena uključuje konsenzus sekvencu XPXXPPPXXP koja omogućuje vezanje na supstrate bogate prolinom.⁹ Ova domena se sastoji od β -bačve (engl. *β -barrel*) koju čini pet antiparalelnih β -nabranih struktura i dvije petlje koje formiraju vezni džep za linearne supstrate bogate prolinom (slika 4). Poliprolinske sekvence interakcijskih partnera tvore zavojničke konformacije koje se vežu na bočne ogranke aromatskih aminokiselina SH3 domene.¹⁷

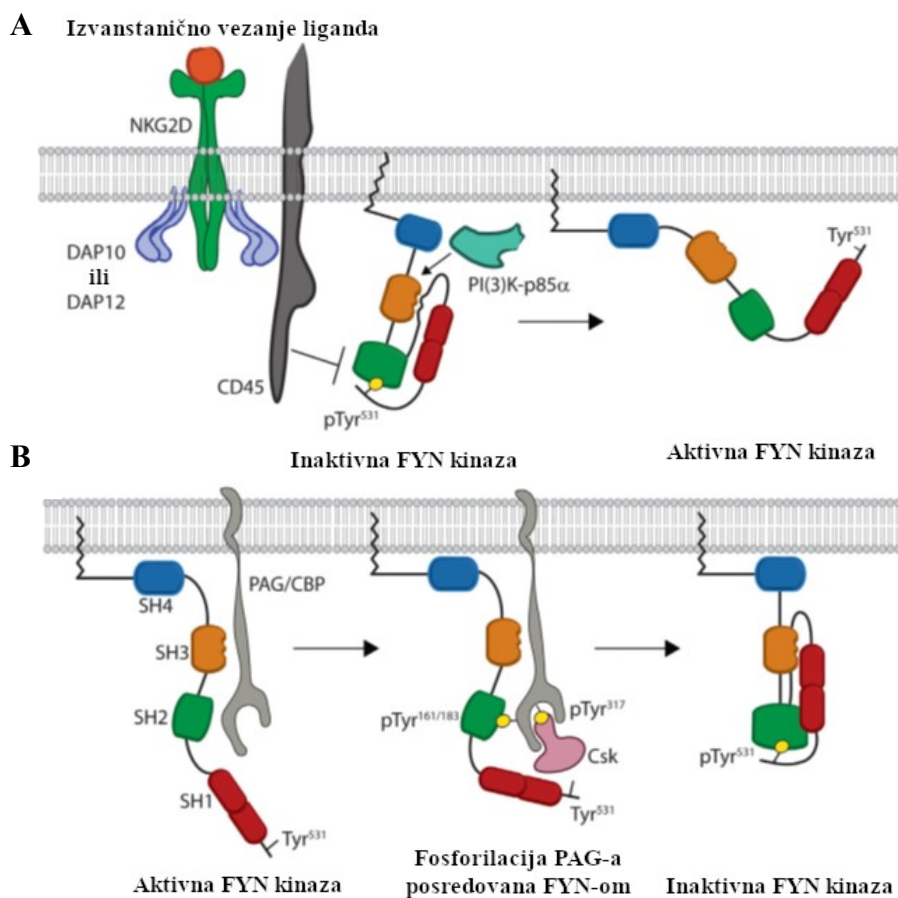
SH2 domena, s druge strane, veže se na pTyr bočne ogranke i hidrofobne sekvence na receptorima faktora rasta.⁹ Sadrži primarni vezni džep i regiju koja određuje specifičnost.¹⁷

SH1 domena sadrži regulatorne sekvence, uključujući C-petlju na N-terminalnom reznju i aktivacijsku petlju u C-terminalnom reznju, koje kontroliraju vezanje ATP-a i prijenos fosfata.¹⁷

Za aktivnost FYN kinaze ključno je vezanje liganada/supstrata na SH2 i/ili SH3 domenu te fosforilacija i defosforilacija ključnih tirozinskih bočnih ogranaka (Tyr420 i Tyr531).⁹

Kao i ostale kinaze, FYN kinaza može postojati u dvije konformacije (slike 5 i 6). U inaktivnoj, zatvorenoj konformaciji, SH2 domena ostvaruje interakciju s C-terminalnim p-Tyr, dok SH3 domena interagira s poliprolinskom zavojnicom u području linkera.

U aktivnoj, otvorenoj konformaciji, SH2 i SH3 domene su dostupne za interakciju sa supstratima, a kinazna domena fosforilira nizvodne efektore. Premještanjem SH3 i SH2 domena dalje od kinazne domene mijenja se helikalna konformacija aktivacijske petlje u C-terminalnom dijelu kinazne domene, što omogućuje autofosforilaciju aktivirajućeg Tyr420 u kinaznoj domeni FYN-a. Ovo stvara elektrostatičku interakciju koja pomiče C-zavojnicu N-terminalnog dijela u aktivan položaj, gdje može pomoći u postavljanju ATP-a za prijenos fosfata.¹⁷



Slika 6. Mehanizam aktivacije (A) i inaktivacije (B) FYN kinaze.¹⁷

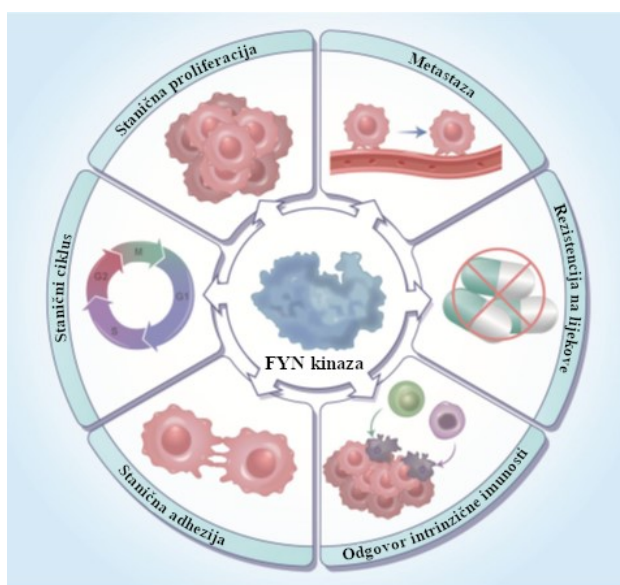
Shematski prikaz mehanizma aktivacije i inaktivacije FYN kinaze prikazan je na slici 6. FYN asocira s transmembranskim adapterom, fosfo-proteinom povezanom s lipidnim splavovima (PAG, engl. *phospho-protein-associated with glycosphingolipid-enriched domains*) i Csk-vezujućim proteinom (CBP, engl. *c-SRC kinase (Csk)-binding protein*). Ova interakcija posredovana je vezanjem SH3 domene FYN-a za prolinom bogatu regiju PAG-a te vodi do fosforilacije drugih tirozinskih ostataka, uključujući Tyr317 na PAG-u, što omogućava regrutaciju c-SRC kinaze (Csk). Asocijacija Csk-a s PAG-om omogućuje Csk-u da fosforilira C-terminalni inhibicijski Tyr531 FYN-a. To narušava interakciju s PAG/CBP-om i uzrokuje disocijaciju FYN-a od PAG-a, gdje FYN ostaje usidren u membrani kao neaktivna kinaza (slika 6B).

FYN ostaje u neaktivnoj konformaciji sve dok stanična aktivacija ne dovede do prekida intramolekularne veze. Aktivirana CD45 fosfataza uklanja fosfat s C-terminalnog inhibicijskog

tirozina Tyr531, što narušava intramolekularne interakcije SH2 domene s C-terminalnim p-Tyr i SH3 domene s poliprolinskom zavojnicom u linkerskoj regiji. Ove interakcije se također narušavaju vezanjem supstrata, kao što je PI(3)K-p85 α , na SH3 domenu FYN-a, što sprječava vezanje SH3 domene na linker regiju (slika 6A). Gubitak tih intramolekularnih interakcija uzrokuje da FYN preuzme otvoreniju konformaciju, u kojoj SH2 i SH3 domene mogu posredovati regrutaciji supstrata, dok kinazna domena posreduje u enzimskoj aktivnosti.¹⁷

2.3.2. Biološki značaj FYN kinaze

Glavna funkcija FYN kinaze je prijenos γ -fosfata na bočne ogranke tirozina ciljnih proteina. FYN je proto-onkogen koji potiče proliferaciju raka, inhibira apoptozu, potiče otpornost na lijekove kod tumora i metastaze (slika 7). FYN regulira stanični rast, preživljavanje, preuređenje citoskeleta, adheziju, pokretljivost, vođenje aksona, sinaptičku funkciju i stvaranje mijelina u središnjem živčanom sustavu, uz aktivaciju trombocita i signalizaciju T-staničnih receptora.¹⁸

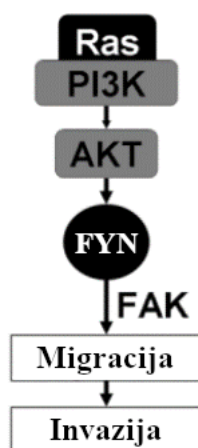


Slika 7. Biološke uloge FYN kinaze kod tumora izražene su uglavnom u intrinzičnoj imunosti, staničnom ciklusu, staničnoj adheziji, proliferaciji, metastazama i otpornosti na lijekove.¹⁸

FYN kinaza ključna je komponenta u Ras/Akt signalnom putu. Ras geni su među najčešće mutiranimima u humanim tumorima, a Ras aktivira PI3K/Akt signalni put što dovodi do indukcije

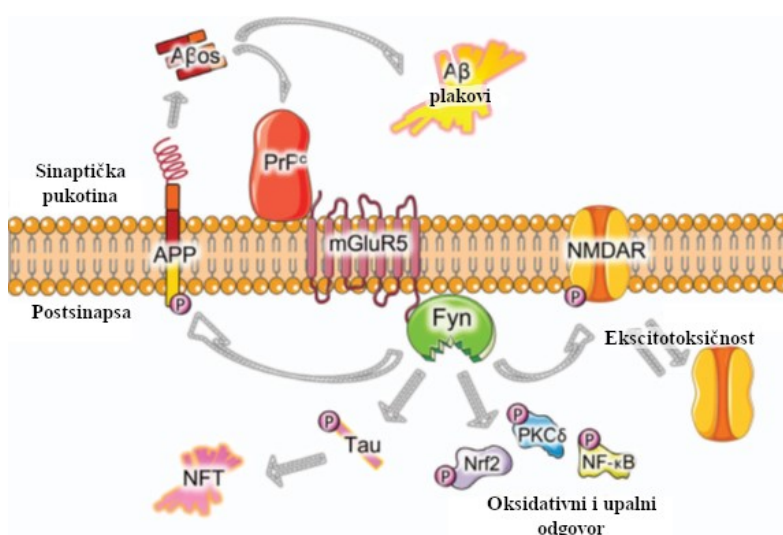
ekspresije i aktivacije FYN kinaze. Aktivna FYN kinaza aktivira FAK kinazu koja je važna za staničnu migraciju i proliferaciju (slika 8).

S obzirom na važnost Ras/Akt signalnog puta kod tumora, FYN je prepoznat kao prikladna meta za antitumorske lijekove, posebice jer je teško izravno djelovati usmjereno na Ras, a inhibicijom Akt-a javljaju se teške nuspojave.¹³



Slika 8. Signalni put indukcije FYN kinaze. Ekspresija FYN kinaze pokreće se Ras-om putem PI3K/Akt signalnog puta. Indukcija i aktivacija FYN kinaze je potrebna za aktivaciju FAK kinaze i povećanu migraciju/invazivnost.¹³

Osim toga, prepoznata je uloga FYN kinaze u patofiziologiji Alzheimerove bolesti.⁶ FYN fosforilira amiloidni prekursor protein (APP, engl. *amyloid precursor protein*) i dovodi do njegovog cijepanja, što rezultira nastajanjem β -amiloida ($A\beta$, engl. *β -amyloid*) koji potom tvori oligomere. $A\beta$ oligomeri se vežu na stanični prionski protein (PrPc, engl. *cellular prion protein*) te preko metabotropičnog glutamatnog receptora (mGluR5, engl. *the metabotropic glutamate receptor*) pokreće neuronski prijenos signala do FYN kinaze. Aktivacija FYN kinaze pak aktivira *N*-metil-D-aspartat receptore, koji su važni za mehanizme učenja i pamćenja, i uzrokuje gubitak dendritskih trnova te fosforilaciju Tau (slika 9).⁸



Slika 9. Pregled neurotoksične kaskade posredovane FYN kinazom na staničnoj razini kod Alzheimerove bolesti.⁸

Tau je odgovoran za lokalizaciju FYN kinaze u post-sinaptičku gustoću (PSD, engl. *post-synaptic density*), gdje ga pak FYN zauzvrat može fosforilirati. Pretjerana aktivacija Tau dovodi do taloženja neurofibrilarnih čvorova/zapetljaja (NFT, engl. *neurofibrillary tangles*), što je obilježje Alzheimerove bolesti i drugih oblika demencije.⁸

Pod oksidativnim ili upalnim podražajima, FYN može dodatno potaknuti oksidativni stres i upalni odgovor glia stanica što dovodi do karakterističnog gubitka dopaminergičnih neurona putem fosforilacije protein kinaze C δ (PKC δ) i drugih signalnih puteva kao što su MAPK, NF- κ B i Nrf2.⁸

Također, FYN sudjeluje u eritropoetinskom signalnom putu i signalnim putevima važnim u početnim fazama mijelinizacije tijekom razvoja mozga i regeneraciju mijelina u kroničnim demijelinizirajućim bolestima.⁸

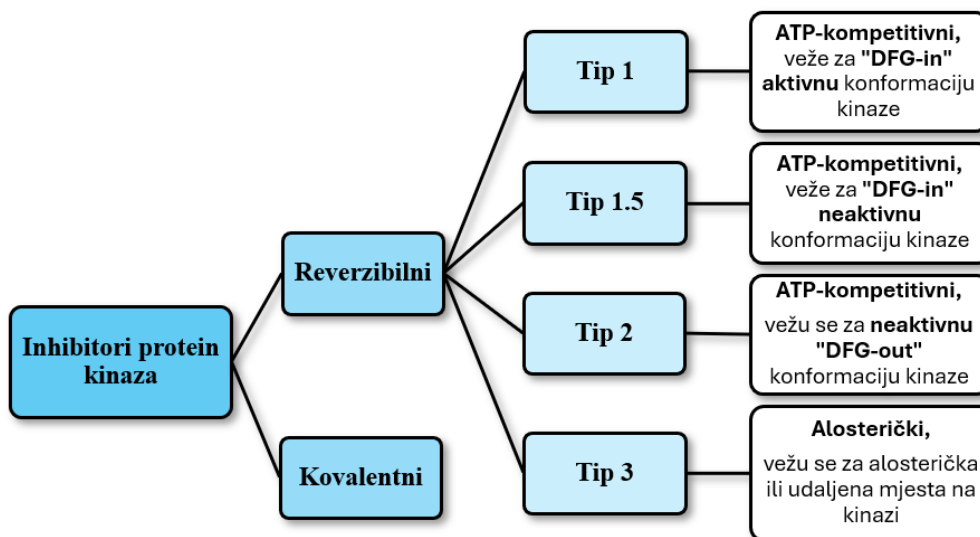
2.4. Inhibitori protein kinaza

Temelj razvoja inhibitora kinaza zasnivao se na nekoliko spojeva, uključujući prirodni spoj staurosporin i sintetičke tirfostine. Od kasnih 1980-ih, protein kinaze su u fokusu farmaceutske industrije kao potencijalne mete za lijekove, uglavnom za liječenje raka.

Većina odobrenih i klinički naprednih inhibitora kinaza usmjereno je na ATP-vezno mjesto, pokrivajući manje od 20 % cijelog kinoma. Mnogi od ovih „ATP-mimetika“ reagiraju s različitim kinazama zbog očuvanosti ATP-veznog mjesta, što rezultira promiskuitetnim profilima i potencijalnim toksičnostima.

Do sada je uspješno ciljano samo oko 80 od preko 500 protein kinaza u ljudskom kinomu, od čega se većina inhibitora koristi za liječenje raka, a mnogi ciljaju iste indikacije zbog razvoja rezistencije.

Inhibitori kinaza mogu se vezati kovalentno ili reverzibilno (slika 10), pri čemu su kovalentni inhibitori često potencijalno toksični.²



Slika 10. Podjela inhibitora protein kinaza prema načinu vezanja.

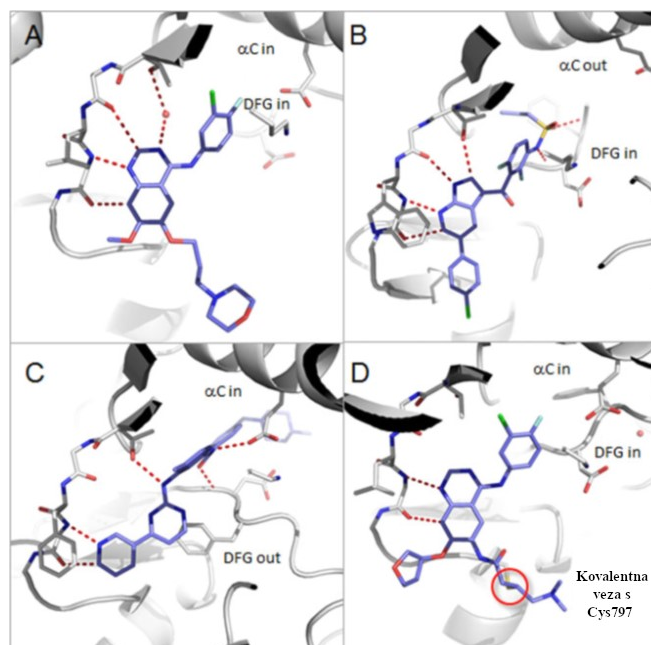
2.4.1. Reverzibilni inhibitori protein kinaza

Reverzibilni inhibitori mogu se klasificirati na temelju strukture inhibitor-kinaza kompleksa, što dovodi do tri glavne kategorije: reverzibilni inhibitori kinaza tipa 1 (i tipa 1.5), tipa 2 i tipa 3 (slika 11).²

Inhibitori tipa 1 vežu se na aktivnu konformaciju kinaze („DFG-in“ i „ α C-in“), a njihova selektivnost se postiže varijacijama u veličini, obliku i polaritetu aminokiseline koja služi kao „čuvar vrata“ (engl. *gatekeeper*).²

Inhibitori tipa 1.5 (podvrsta inhibitora 1) vežu se na „DFG-in“ inaktivnu konformaciju, za razliku od tipa 2 koji se vežu na „DFG-out“ inaktivnu konformaciju kinaze. Oba tipa inhibitora 1.5 i 2 smještaju se u dio džepa za vezanje adenina i tvore vodikove veze sa zglobnom regijom.¹⁹ Tranzicija iz "DFG-in" u "DFG-out" konformaciju izlaže dodatni hidrofobni džep u blizini ATP-veznog mjesta, što koriste inhibitori tipa 2 kako bi zaključali kinazu u inaktivnu konformaciju.²

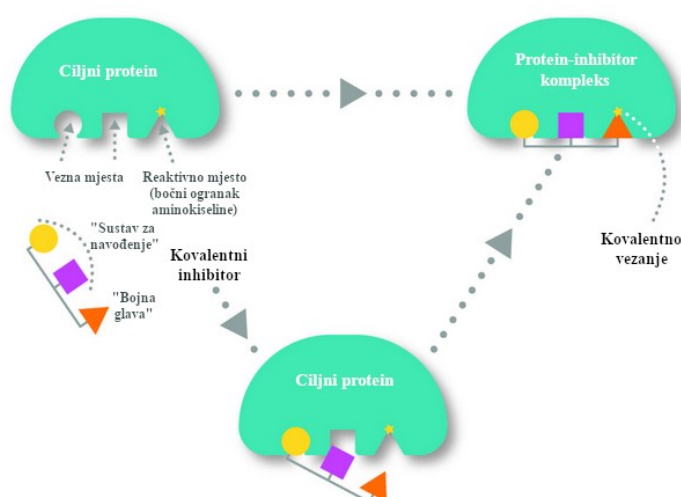
Inhibitori tipa 3 predstavljaju heterogenu skupinu inhibitora kinaza, koji su alosterički te se ne vežu u ATP-vezno mjesto i nemaju fizički kontakt sa zglobnom regijom. Alosterički inhibitori iskorištavaju specifična vezna mjesta i mehanizme regulacije koji su jedinstveni za određenu kinazu, čime postižu visoku selektivnost.²



Slika 11. Prikaz vezanja različitih tipova inhibitora kinaza. A) Reverzibilni inhibitor tip 1 (genfitinib vezan na EGFR, PDB 2ity); B) reverzibilni inhibitor tip 1.5 (vemurafenib vezan na B-Raf, PDB 3og7); C) reverzibilni inhibitor tip 2 (imatinib vezan na ABL, PDB 1iep); D) kovalentni inhibitor (afatinib vezan na EGFR, PDB 4g5j). Aktivacijska stanja α C-zavojnice i DFG-motiva su naznačena. Ligandi su prikazani plavim štapićima, a ključne polarne interakcije crvenim iscrtkanim linijama.²

2.4.2. Kovalentni inhibitori protein kinaza

Kovalentni inhibitori kinaza obično se sastoje od tri glavna modula: veznog modula i poveznice, koji čine „sustav za navođenje“ te modula "bojne glave" (engl. *warhead*; slika 12).^{2,20}



Slika 12. Shema vezanja kovalentnog inhibitora na ciljni protein.²⁰

Oni omogućuju kovalentno vezanje inhibitora obično na ključne aminokiseline poput lizina (Lys) ili cisteina (Cys) unutar ili u blizini ATP-veznih mjesta na ciljnoj kinazi. Lizin često sudjeluje u aktivnom mjestu kinaze, dok cistein može biti smješten u neposrednoj blizini ATP veznog mjesta, ali nije nužan za strukturu i aktivnost kinaze. Ovo omogućuje ciljanje tih aminokiselina bez značajnog utjecaja na funkciju same kinaze. Međutim, mutacija cisteina može spriječiti kovalentno vezanje inhibitora, čime se smanjuje njihova klinička učinkovitost. Budući da cistein nije esencijalan za strukturu i aktivnost kinaze, mutacije na ovom mjestu ne moraju utjecati na osnovnu funkcionalnost kinaze, ali mogu značajno utjecati na sposobnost inhibitora da se veže i inaktivira ciljnu kinazu.

Ova sposobnost ciljanja specifičnih aminokiselina i formiranja kovalentnih veza čini kovalentne inhibitore moćnim alatima u terapiji, ali također naglašava potrebu za pažljivim dizajnom lijekova kako bi se izbjegla rezistencija uzrokovana mutacijama ciljnih aminokiselina.²

2.4.3. Otpornost na inhibitore/lijekove

Mehanizmi višestruke rezistencije (MDR, engl. *multidrug resistance*) na kemoterapijske lijekove su dobro proučeni i obuhvaćaju širok spektar promjena unutar stanica. Uključuju: smanjenu akumulaciju lijekova, promjene u razini ciljnih proteina, mutacije koje smanjuju vezivanje lijekova, hvatanje lijekova u kiselim vezikulama, pojačan metabolizam lijekova

putem citokroma P450 (CYP) oksidaza miješanih funkcija, povećanu toleranciju na oštećenje stanične DNA te smanjen prijenos signala u apoptozi.²

Rezistencija na lijekove poput inhibitora kinaza, može se pojaviti putem kompenzacijskih mehanizama ili smanjenjem afiniteta kinaza za njihove inhibitore.^{1,2} Jedan od najjednostavnijih načina na koji protein kinaze izbjegavaju inhibiciju je mutacija ključnih aminokiselina u njihovim katalitičkim domenama. Najčešća točkasta mutacija koja dovodi do rezistencije i relapsa utječe na „čuvara vrata“, čija veličina i oblik reguliraju svojstva hidrofobnog džepa smještenog na stražnjoj strani ATP-veznog mjesta.²

Gubitak afiniteta za inhibitor kinaze može biti posljedica steričkog neslaganja između inhibitora i mutiranog „čuvara vrata“ ili značajnog povećanja afiniteta za ATP, čime se smanjuje afinitet za inhibitore kinaza. Inhibitori koji ciljaju neaktivnu konformaciju protein kinaza su općenito skloniji mutacijama koje vode rezistenciji. U ovom slučaju, jedna mutacija može djelovati tako da uništi ključne interakcije i/ili destabilizira ciljanu konformaciju.²

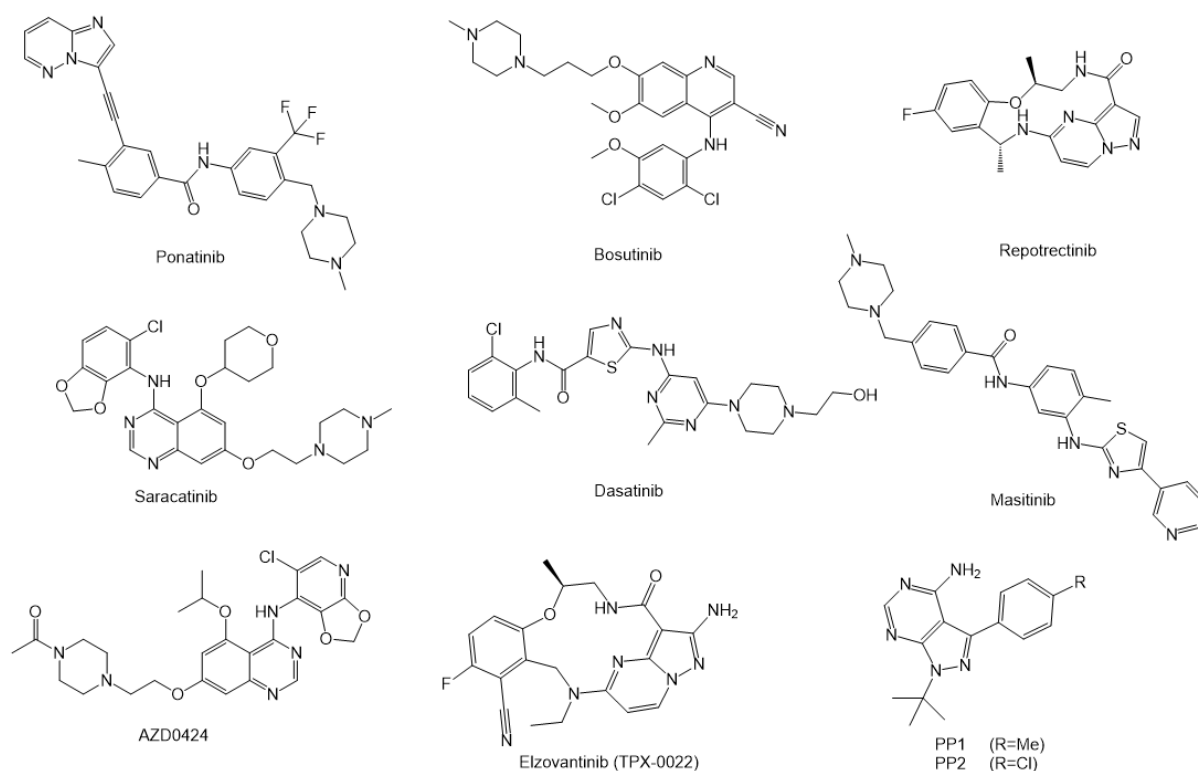
Dvije česte vrste aktivacijskih mutacija uključuju mutacije „čuvara vrata“ i A-petlje. Dok je mutacija „čuvara vrata“ dobro konzervirana, mutacije A-petlje su raznolike. Obje vrste mutacija mogu aktivirati kinazu. Aberantna aktivacija protein kinaza nastaje pomicanjem ravnoteže prema konstitutivnoj aktivnoj konformaciji, koja je vrlo slična kod svih protein kinaza i može se definirati DFG-motivom koji tvori tipičnu okret-ukosnica-okret (engl. *turn-hairpin-turn*) konformaciju u tijesnom kontaktu s C-petljom.²

Još uvijek je potrebno bolje razumijevanje kompenzacijskih mehanizama, mehanizama rezistencije i toksičnosti ciljanja te kako se ona prenosi s predkliničkih modela na ljude. Identifikacija visoko selektivnih inhibitora i aktivatora kinaza trebala bi dovesti do širenja kemijskog i biološkog prostora kinaza, kao i do poboljšanja razumijevanja njihovih terapijskih ograničenja i potencijala.²

2.4.4. Inhibitori SRC obitelji kinaza

Otkad je Uprava za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*) 2001. godine odobrila imatinib, inhibitor nekoliko tirozin kinaza, za liječenje kronične mijeloidne leukemije (CML, engl. *chronic myeloid leukemia*), porastao je broj inhibitora kinaza, uključujući inhibitore SRC obitelji kinaza (STKI, engl. *SRC tyrosine kinase inhibitor*, slika 13). U zadnjih dvadesetak godina odobrena su 3 dualna SRC/ABL inhibitora: dasatinib, bosutinib i ponatinib¹⁴ te su STKI u zadnjih 15 godina pokazali potencijal i za liječenje drugih oboljenja osim raka.¹²

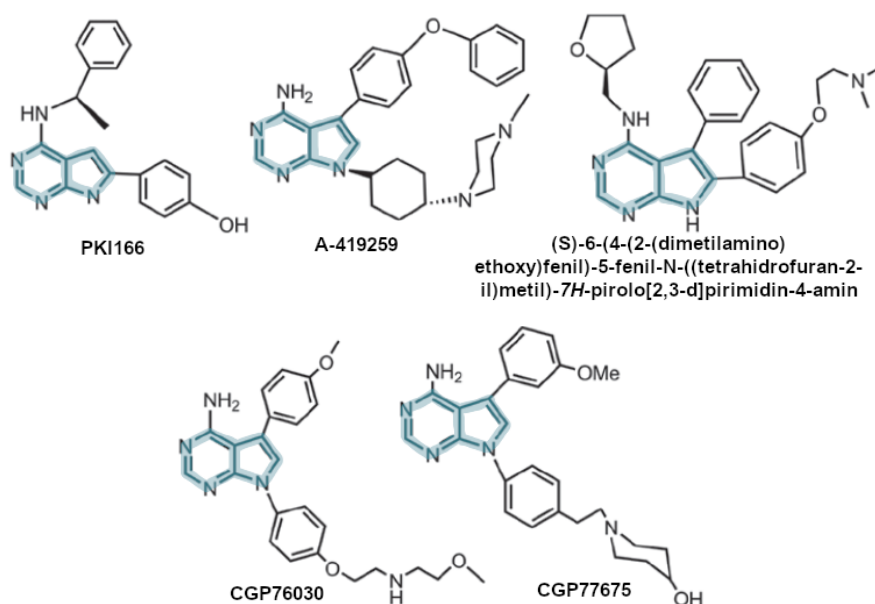
Na primjer, saracatinib, masitinib, i dasatinib se istražuju i kao potencijalni lijekovi za Alzheimerovu bolest.⁸



Slika 13. Prikaz inhibitora SRC obitelji kinaza (i drugih kinaza) koji su do sada odobreni ili su ušli u klinička testiranja.^{6,8,14,15,18}

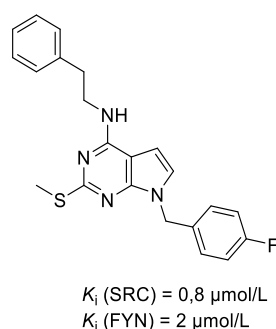
Derivati pirazolo[3,4-d]pirimidina PP1 i PP2 inhibiraju c-SRC, LCK i FYN te spadaju u tradicionalne analoge ATP-a. K tome, brojni SRC inhibitori uključuju heterocikličke analoge ATP-a poput pirazolo[2,3-d]pirimidina, pirolo[2,3-d]pirimidina, pirido[2,3-d]pirimidina i kinolina.¹⁰

Pirol[2,3-d]pirimidinska jezgra je deaza-izoster adenina, dušične baze prisutne u adenozin trifosfatu te je kao takva česta osnova ATP-kompetitivnih inhibitora (slika 14).²¹



Slika 14. Derivati pirolpirimidina kao inhibitori SRC obitelji kinaza.¹⁰

Musumeci *et al.* pripravili su seriju derivata pirol[2,3-*d*]pirimidina s potencijalnim inhibitornim djelovanjem na SRC tirozin kinazu.¹⁴ Sintetizirani spojevi testrani su *in vitro* na malom skupu kinaza (SRC, FYN, EGFR, KIT, FLT3, ABL, ABLT315I) te su pokazali određenu selektivnost prema c-SRC. Pokazalo se da 7-(4-fluorobenzil)-2-(metiltio)-*N*-fenetil-7H-pirol[2,3-*d*]pirimidin-4-amin dobro inhibira i FYN kinazu (slika 15).¹⁴



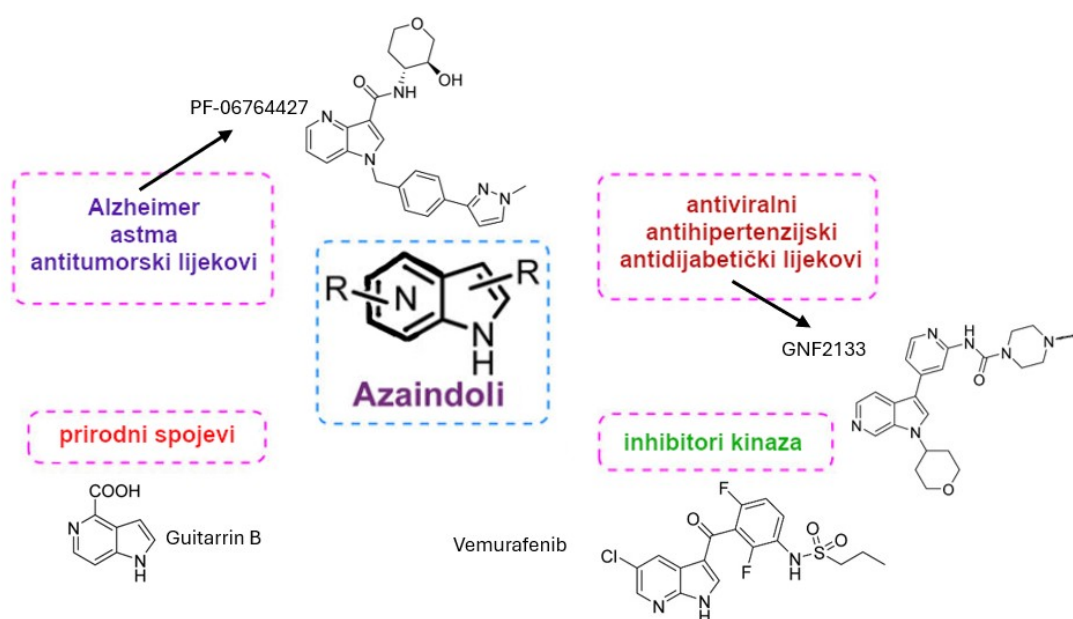
Slika 15. Struktura 7-(4-fluorobenzil)-2-(metiltio)-*N*-fenetil-7H-pirol[2,3-*d*]pirimidin-4-amin s istaknutim vrijednostima konstante inhibicije određene za SRC i FYN kinazu.

Često visoka strukturna homologija među kinazama predstavlja jedan od najvećih izazova u dizajnu selektivnih kompetitivnih inhibitora.⁸

2.5. Kemija azaindola

Azaindoli su heterociklički spojevi sastavljeni od kondenziranog bicikličkog sustava kojeg čine pirolni i piridinski prsten,⁵ što ih čini izvrsnim bioizosterima indolnih ili purinskih sustava.²² Prisutni su u prirodnim spojevima, biološki aktivnim molekulama i FDA odobrenim lijekovima za razne bolesti (slika 16).²³

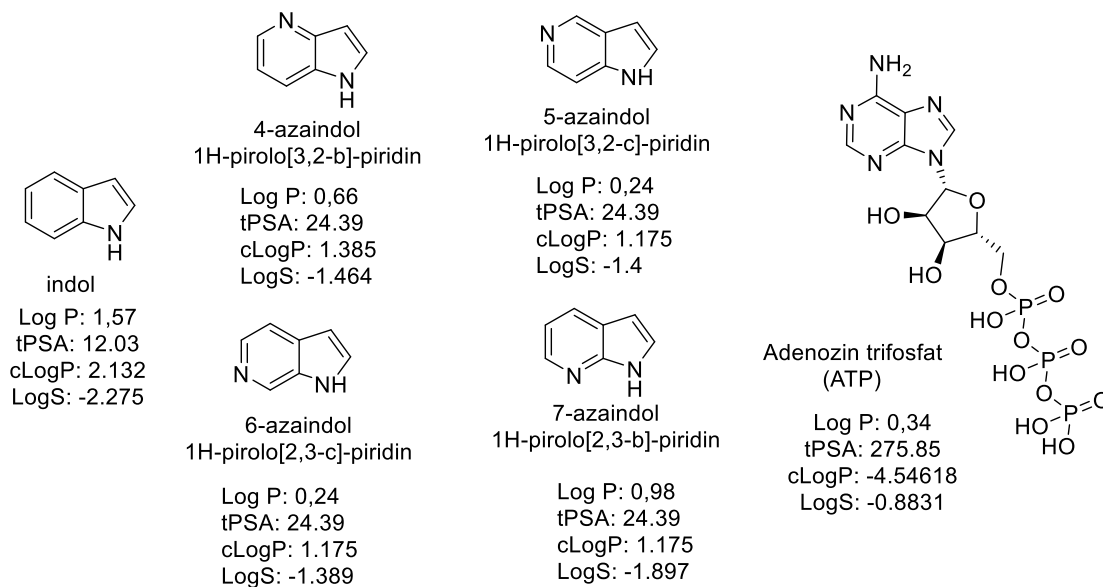
Među brojnim biološkim metama derivata azaindola, kinaze su česta meta od izbora jer dodatan dušik u azaindolnom strukturnom motivu povećava mogućnost smještanja u ATP aktivno mjesto koje zahtijeva dobro pozicionirane donore i akceptore vodikove veze.²²



Slika 16. Biološka/farmakološka djelovanja azaindola korisna su za liječenje raznih bolesti, poput Alzheimerove bolesti, astme izazvane alergenima, raka, HIV-a, infekcije influencom, dijabetesa i hipertenzije. Azaindolni motiv prisutan je u prirodnim spojevima i inhibitorima kinaza.¹²

Postoje četiri strukturna izomera, 4-, 5-, 6- i 7-azaindol. Kad se razmatra uporaba azaindola umjesto indola, 5-azaindol se čini kao dobar prvi izbor zbog svoje visoke homologije s glavnim metabolitima indola, 5-hidroksi indolima, prisutnim u brojnim biomolekulama poput serotonina i melatonina.²² No, 7-azaindoli se češće pojavljuju u biološki aktivnim spojevima te je do sada poznato preko 100 000 spojeva koji sadrže motiv 7-azaindola.^{22,23}

U literaturi je opisano više od 90 vrsta kinaza osjetljivo na inhibitore kinaza bazirane na 7-azaindolu, što je dovoljno za pokrivanje cijelog ljudskog kinoma. To upućuje da 7-azaindolni motiv može biti korisna polazišna točka u medicinskoj kemiji usmjerenoj na razne kinaze.²⁴



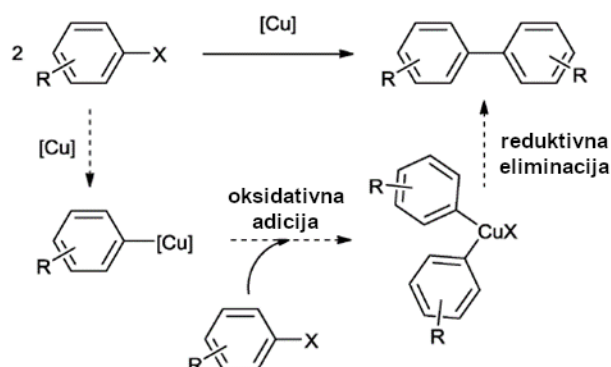
Slika 17. Strukture i kemijska svojstva indola, izomera azaindola i adenozin trifosfata. Strukture su nacrtane i određena su im fizikalno-kemijska svojstva u programu *ChemDraw* verzija 23.0.1.

U usporedbi s indolom, dodatan dušikov atom povećava topljivost u vodi, rezultira povoljnim fizikalno-kemijskim i apsorpcijskim, distribucijskim, metaboličkim i ekskrecijskim (ADME, engl. *absorption, distribution, metabolism, and excretion*) te farmakokinetičkim svojstvima (slika 17).²³ Svojstva 7-azaindola određena su svojstvima njegovih prstenova, piridin koji je siromašan π -elektronima te pirol koji je bogat π -elektronima. 7-azaindoli sudjeluju u reakcijama: *N*-alkilacije, glikozilacije te su skloni elektrofilnim napadima na položaju C3 (halogeniranje, nitriranje, acilacija itd.).⁵

2.6. Ullmanova reakcija

Klasičnom Ullmanovom reakcijom smatra se nastajanje biarila iz aril-halogenida uz bakrove spojeve kao katalizatore. Mehanizam kojim se reakcija odvija nije razjašnjen u potpunosti, te vjerojatno ovisi o supstratima, ligandima i samim uvjetima reakcije. Stoga je općenito prihvaćen mehanizam koji uključuje nastajanje organokupratnog intermedijera iz aril-

halogenida, potom oksidativnu adiciju drugog arila na organokupratni intermedijer te nastajanje konačnog produkta reduktivnom eliminacijom (slika 18).²⁵



Slika 18. Općenito prihvaćen mehanizam Ullmanove sinteze biarila iz aril-halogenida uključuje nastajanje organokupratnog intermedijera, oksidativnu adiciju i reduktivnu eliminaciju.²⁵

Zbog visoke energijske barijere koraka oksidativne adicije ovaj tip reakcija često zahtijeva visoku temperaturu, jake baze, dugo provođenje reakcije, stehiometrijske količine bakrovih spojeva, aromatske supstrate siromašne elektronima te polarna otapala s visokim vrelištem.²⁵

Uvođenje liganada omogućilo je blaže uvjete i provođenje reakcija na nešto nižim temperaturama (80-100 °C). Osim toga, ligandi doprinose topljivosti bakrovih vrsta te ubrzavaju reakciju, stvarajući povoljnije uvjete za nastajanje Cu monoamidatnog kompleksa nego biamidatnog. Uobičajeno se koriste bidentatni ligandi koji su *N*-donori ili miješani *N*- i *O*-donori te se često koriste ligandi s piridinskom jezgrom, sekundarnim ili tercijarnim aminima, karbonilnim ili imino skupinama, dok fosfinski ligandi nisu dovoljno učinkoviti. Korištenje raznih liganada povećalo je raspon reakcija u kojima se koristi Ullmanova reakcija, poput sinteza di-, triarilamina, arilamida, *N*-arilacija heterocikličkih spojeva i hidrazida, *O*-arilacija aromata i alifatskih alkohola, arilacija i vinilidacija fosforinih nukleofila.²⁵

Kao katalizator obično se koristi 5-10 mol % metalnog Cu, Cu(I) i Cu(II) soli ili oksida u odnosu na supstrat. Potrebne su veće količine bakra zbog loše topljivosti brojnih bakrovih spojeva, ali one dovode i do većih iskorištenja.²⁵

Aril-halogenidi se koriste kao supstrati Ullmanove reakcije te je poznato da im reaktivnost opada prema sljedećem poretku: I>Br>Cl. Povećanje reaktivnosti aril-klorida može se postići jakim elektron-odvlačućim supstituentima, *ortho*-koordinirajućim supstituentim ili dodatkom I⁻ iona.²⁵

Baze koje se koriste u Ullmanovoj reakciji su najčešće kalijev fosfat i karbonat te cezijev karbonat, dok organske baze (npr. amini) nisu prikladne u ovom tipu reakcije.

N, N-dimetil-formamid (DMF), dimetil-sulfoksid (DMSO) i toluen se najčešće koriste kao otapala te *N*-metil-2-pirolidon (NMP) za reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem. Reakcija se obično provodi u atmosferi dušika ili argona, što daje bolja iskorištenja.

S vremenom se povećao raspon pogodnih nukleofila za Ullmanovu reakciju te je sada moguće pripremiti *N*-, *O*-, *S*-, *P*- i *C*-arilne veze koje se mogu naći u brojnim bioaktivnim organskim spojevima i kemiji materijala.²⁵

Zanimljive primjene Ullmanove reakcije uključuju: sinteze heterocikličkih strukturnih motiva intermolekulskim, intramolekulskim ili tandem-domino-multikomponentnim procesima te primjena Ullmanove reakcije u uvjetima zelene kemije koja ima važnu ulogu u modernim istraživanjima (slika 19). U sklopu zelene kemije razmatra se korištenje vode i drugih ekološki prihvatljivih otapala te heterogenih sustava. Heterogeni sustavi omogućuju recikliranje i ponovno korištenje metalnih katalizatora. Također, dostupne su nanostrukture i nanoporozne krutine s velikim površinama koje omogućuju bolja iskorištenja u usporedbi s homogenim katalizatorima te su potrebne manje količine (Cu nanočestice 1-2 mol %).²⁵



Slika 19. Kataliza bakrovim spojevima je proširena na funkcionalizaciju nesupstituiranih arena, koji su jeftiniji i ekološki prihvatljiviji (nema halogeniranih nusprodukata) te je moguće koristiti zrak ili kisik kao oksidanse.²⁵

2.7. Fotoredoks reakcija

Nedavna postignuća u fotoredoks katalizi revolucionirala su organsku kemiju omogućujući aktivaciju malih molekula putem prijenosa jednog elektrona (SET, engl. *single electron transfer*) korištenjem metalnih kompleksa i organskih boja za pretvaranje vidljive svjetlosti u kemijsku energiju. Ova metoda usmjerava energiju fotona na posebno dizajnirane fotokatalizatore, koji nakon pobuđivanja mogu potaknuti supstrate, reagense ili sekundarne katalizatore da sudjeluju u jedinstvenim reakcijskim putevima koji nisu ostvarivi pod

toplinskim uvjetima. Primarni mehanizmi uključuju prijenos energije, organometalnu ekscitaciju, svjetlosno inducirani prijenos atoma i fotoredoks katalizu, omogućujući stvaranje reaktivnih intermedijera i stvaranje jedinstvenog reakcijskog okruženja gdje fotokatalizator djeluje i kao snažan oksidans i kao reducens. Modulacija oksidacijskog stanja prijelaznih metala pomoću fotoredoks katalizatora olakšava regeneraciju aktivnog katalizatora. Katalitički obrtaj se postiže putem nekoliko različitih mehanizama kao što su: (i) direktan prijenos jednog elektrona između katalizatora, (ii) oksidativnim/reduktivnim nastajanjem radikalske vrste koja ostvaruje interakciju s prijelaznim metalom, ili (iii) oksidativnim/reduktivnim nastajanjem radikalske vrste koja može sudjelovati u prijenosu jednog elektrona s metalnim katalizatorom.²⁶

Fotoredoks katalizatori često su polipiridilni kompleksi rutenija ili iridija, koji se mogu pobuditi vidljivom svjetlošću niske energije, selektivno usmjerenom na katalizator u odnosu na bilo koje organske supstrate u otopini. Nakon pobude, dolazi do prijenosa naboja metal-ligand (MLCT, engl. *metal-to ligand charge-transfer*) praćenog intersistemskim prijelazom (ISC, engl. *intersystem crossing*), koji osigurava dugoživiće tripletno pobuđeno stanje. Ova reaktivna vrsta posjeduje metal-centričnu prazninu (engl. *metal-centered vacancy*), koja može oksidirati prikladnog donora elektrona te π^* -centrični nesporeni spin (engl. *π^* -centered unpaired spin*), koji može reducirati prikladnog akceptora. Nakon početnog fotopobuđenog prijenosa jednog elektrona, odgovarajuće redoks-modificirano osnovno stanje može izvršiti suprotan prijenos jednog elektrona, čineći kompleks katalizatorom u oksidaciji i redukciji supstrata.²⁷

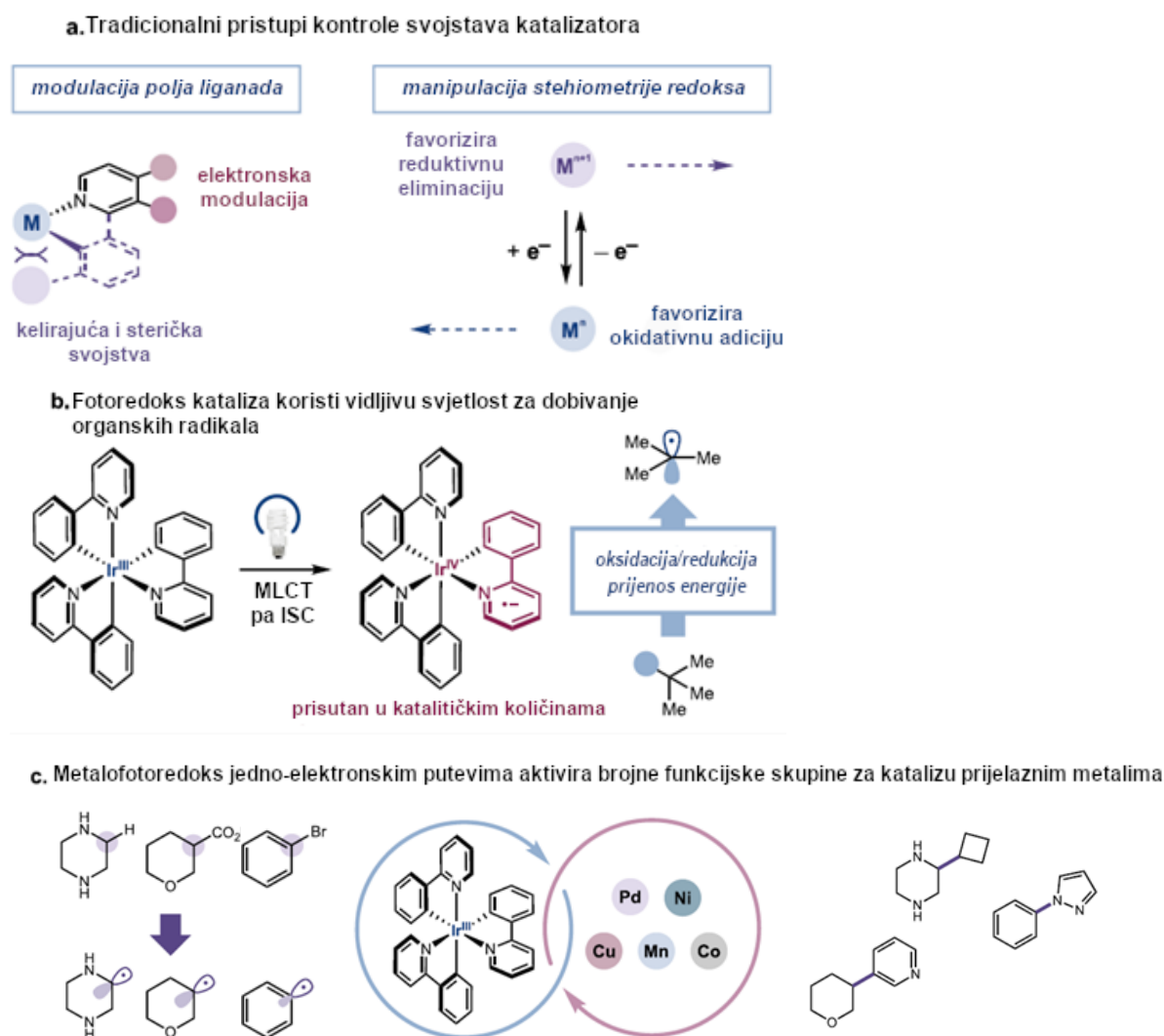
Prednost fotoredoks katalize je sposobnost pretvaranja supstrata s prirodnim funkcionalnim skupinama, poput karboksilnih kiselina, amina, alkohola i C–H veza, u visokovalentne intermedijere s otvorenom ljuskom (engl. *open shell*) koji brzo reagiraju s prijelaznim metalima. Kombinacija fotoredoks katalize s drugim katalitičkim načinima aktivacije, poput organokatalize, katalize prijelaznim metalima i katalize Lewisovim kiselinama, omogućuje nove formacije veza i poboljšanu reaktivnost.²⁶

Metalofotoredoks, koji kombinira fotoredoks katalizu s katalizom prijelaznim metalima, koristi različitu reaktivnost prijelaznih metala i njihovu sposobnost interakcije s raznim *coupling* partnerima, proširujući raspon mogućih kemijskih transformacija.²⁶ Metalofotoredoks kataliza pokazala je značajan potencijal u reakcijama kataliziranim niklom i bakrom, kao što su deoksigenativna C(sp³)-arilacija, dekarboksilativna C(sp³)-arilacija, dekarboksilativna C(sp³)-aminacija i prijenos vodikovih atoma (HAT) C(sp³)-trifluorometilacija. Na primjer, fotogenerirani supersililni radikali mogu tvoriti Cu(III) adukte nastale apstrakcijom halogena

- vezanjem radikala HARC (engl. *halogen abstraction - radical capture*) s aril-bromidima, *NH*-heteroarilima i solima bakra putem kinetički povoljnih koraka, dok kod toplinski kontroliranih procesa dolazi do visokobarijernog vezanja bakra s aril-halogenidom. Ova razlika u mehanizmu omogućuje veći opseg reakcija, razvoj katalizatora i korištenje raznovrsnijih supstrata.²⁸

Specifično, HARC Ullmann–Goldbergovo spajanje omogućuje korištenje aril-bromida umjesto manje dostupnih aril-jodida, *ortho*-supstituiranih aril-halogenida, jednostavnih soli bakra i eliminira potrebu za visokim temperaturama, smanjujući rizik od raspada u reakcijskoj smjesi. Također, moguće je smanjiti nusprodukte poput dehalogeniranih produkata i dimera kontroliranjem brzine miješanja i intenziteta svjetlosti. Sama učinkovitost ove metode uglavnom ovisi o oksidansu, bazi i intenzitetu svjetlosti.²⁸

Općenito, metalofotoredoks kombinira aktivaciju supstrata posredovanu prijelaznim metalima s reaktivnošću pobuđenog stanja fotoredoks kemije, omogućujući snažne reakcije, nove disocijacije i korištenje lako dostupnih početnih materijala (slika 20). Njezina popularnost proizlazi iz mogućnosti stvaranja visokovalentnih Cu(III) vrsta koje generiraju ugljik-heteroatom veze korištenjem vidljive svjetlosti, proširujući sintetske mogućnosti i pružajući blage reakcijske uvjete pogodne za raznolike molekule,²⁷ što je ključno za sintezu prirodnih i medicinski važnih spojeva.²⁶



Slika 20. Fotoredoks kataliza i kataliza prijelaznim metalima. A) za postizanje željene transformacije najčešće su modulirani ili polje liganda ili oksidacijsko stanje metala; B) fotoredoks katalizatori su često polipiridilni kompleksi rutenija ili iridija koji mogu biti selektivno eksitirani vidljivim svjetlom niske energije (organski supstrati obično ne apsorbiraju u tom dijelu spektra). Potom dolazi do prijenosa naboja s metala na ligand te međusistemskog prijelaza koji omogućuje nastajanje dugoživućeg eksitiranog tripletnog stanja; C) spajanje fotopobuđenog prijenosa jednog elektrona i prijenosa elektrona (ET, engl. *electron transfer*) u modifikaciji elektronske strukture metalnih katalizatora proširuje mogućnosti za katalizu u visokovalentnim i pobuđenim stanjima, posebno u odsutnosti stehiometrijskih jakih oksidansa ili svjetlosne iradijacije visoke energije.²⁷

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Svi reagensi i kemikalije korišteni u ovom radu komercijalno su dostupni te analitičke čistoće. Sva otapala korištena su bez dodatnog pročišćavanja. Tijekom izrade diplomskog rada korišteni su: 4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin (*Combi-Blocks*), natrijev hidrid (NaH, *TCl*), tetrahidrofuran (THF, *Lach-Ner*), (2,4-dimetoksifenil)metanamin (*Combi-Blocks*), *N*-etil-*N,N*-diizopropilamin (DIPEA, *Lach-Ner*), 1,4-dioksan (*Kemika*), dimetil-sulfoksid (DMSO, *Kemika*), 3-metoksipropanoil-klorid (*Enamine*), trifluoroctena kiselina (TFA, *Fluorochem*), diklormetan (DCM, *Lach-Ner*), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃, *Lach-Ner*), tetrabutilamonijev klorid (TBAF, *Fluorochem*), 7 molarni amonijak u etanolu (7M NH₃ u EtOH, *Thermo Scientific*), acetonitril (ACN, *Lach-Ner*), bakrov(II) acetilacetonat (Cu(acac)₂, *Aldrich*), supersilanol (*Sigma Aldrich*), 1,1,3,3-tetrametilvanidin (TMG, *Aldrich*), iridijev katalizator ([Ir(dFCF3ppy)₂-(5,5'-dCF3bpy)]PF₆, *Combi-Blocks*), 2-brom-5-(trifluormetil)piridin (*Aldrich*), bakrov(I) jodid (CuI, *Sigma Aldrich*), kalijev fosfat (K₃PO₄, *Acros Organics*), *trans*-1,2-diaminocikloheksan (*TCl*), etil-acetat (EtOAc, *Kemika*), cikloheksan (*Kemika*), tetrapropilamonijev bromid (*BDL pharm*), kalijev fluorid (KF, *Kemika*), aluminijev oksid (Al₂O₃, *Kemika*), 25 % otopina amonijaka (*Agram mol*), deuterirani dimetil-sulfoksid (DMSO-*d*₆, *Eurisotop*) i deuterirani kloroform (CDCl₃, *Eurisotop*).

Priprava spojeva **1a/1b-6** provedena je klasičnom organskom sintezom. Spoj **6** dodatno je pripremljen u uvjetima fotoredoks katalize za usporedbu. Fotoredoks reakcija provedena je u 20 mL vijali u fotoredoks reaktoru *PhotoRedOx Box (HepatoChem)* s plavom LED lampom snage 34 W (*Kessil*) uz miješanje 500 rpm, intenzitetom svjetla 35 % i 25 °C.

Tijek reakcija, sastav frakcija i kontrola čistoće sintetiziranih produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela 60 F₂₅₄ (*Merck*) uz detekciju UV lampom ($\lambda = 254$ nm). Za praćenje tijeka reakcija, identifikacije i čistoće spojeva korištena je tekućinska kromatografija ultravisoke razlučivosti sa spektrometrom masa i UV detektorom (ACQUITY UPLC spregnut sa SQD spektrometrom masa). Primijenjena je dvominutna metoda u kiselim uvjetima (eksperimentalni uvjeti dani u tablici 1.). Korišten je UV detektor s rasponom valnih duljina od 210 nm do 400 nm te kvadrupolni analizator masa (SQM).

Ionizacija je postignuta elektroraspršenjem (ESI) s pozitivnim i negativnim modom rada. Za vizualizaciju UPLC-MS/UV spektara korišten je *FractionLynx Browser 4.1*.

Tablica 1. Eksperimentalni uvjeti provedeni na ACQUITY UPLC-u spregnutom sa SQD spektrometrom masa tijekom 2-minutne metode u kiselim uvjetima

Kolona	BEH C18, 1,7 μ m, 50 mm \times 2,1 mm		
Protok	0,9 mL		
Temperatura	40 $^{\circ}$ C		
Mobilna faza 1	0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi		
Mobilna faza 2	0,1 % otopina mravlje kiseline u acetonitrilu		
Gradijent	Vrijeme (min)	% eluens 1	% eluens 2
	0	97	3
	1,5	3	97
	1,9	3	97
	1,91	97	3
	2,0	97	3

Sintetizirani spojevi pročišćeni su purifikacijskim sustavom PuriFlash xs 520 Plus (*Interchim*) na Interchim puriflash SiHC (4 - 12 g) kolonama uz različite sustave otapala.

Za identifikaciju sintetiziranih spojeva korištena je spektroskopija nuklearne magnetske rezonance (NMR). ^1H i COSY spektari snimani su u deuteriranom dimetil-sulfoksidu pri sobnoj temperaturi na NMR spektrometrima pri 400 ili 500 MHz (*Bruker AV 400 MHz* i *Bruker DRX 500 MHz*). Kemijski pomaci izraženi su u ppm prema tetrametilsilanu ((CH_3) $_4\text{Si}$, TMS) kao unutarnjem standardu. Za vizualizaciju spektara korišten je program *SpinWorks 4.2.7*.

3.2. Priprava azaindolnih derivata

3.2.1. Priprava *N*-(2,4-dimetoksibenzil)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (**1a**)

4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidina (200 mg, 1,3 mmol) otopljen je u 1,4-dioksanu (1 mL) te je dodana DIPEA (0,681 mL, 3,91 mmol) i (2,4-dimetoksifenil)metanamin (0,293 mL, 1,95 mmol). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na 60 °C te je tijekom reakcije praćen tankoslojnom kromatografijom u DCM. Nakon 18 sati miješanja pri 60 °C dodana je nova količina (2,4-dimetoksifenil)metanamina (0,293 mL, 1,95 mmol) i DIPEA (0,681 mL, 3,91 mmol). Reakcija se provodila još 3 h na 60 °C. Otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Sirovi produkt je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO₂ kolona, 4 g, 15 μm, u sustavu 0-5 % MeOH u DCM) pri čemu je dobiveno 389,5 mg smjese spoja **1a** čistoće 82 % prema UV/DAD detektoru.

UPLC-MS/UV: $R_t = 0,56$ min, m/z 285,39 [M+H]⁺, UV/DAD: 82 %

4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidina (200 mg, 1,3 mmol) je otopljen u DMSO (6 mL) te je dodan (2,4-dimetoksifenil)metanamin (0,587 mL, 3,9 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 1 sat na 85 °C. Otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Sirovi produkt je otopljen u DCM i MeOH, spojen sa smjesom opisanom gore te su otapala uparena. Dobiveni sirovi produkt je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO₂ kolona, 4 g, u sustavu DCM:MeOH:NH₄OH 90:9:1,5) pri čemu je dobivena bijela krutina (produkt **1a**, 345 mg, 1,21 mmol, $\eta = 46,6$ %).

UPLC-MS/UV: $R_t = 0,58$ min, m/z 285,22 [M+H]⁺, UV/DAD: 100 %

¹H NMR (produkt **1a**, 400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 11,46 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,63 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz), 7,09 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,05 (t, 1H, $J = 2,8$ Hz), 6,59 (s, 1H), 6,56 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz), 6,43 (dd, 1H, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz), 4,57 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz), 3,81 (s, 3H), 3,72 (s, 3H).

3.2.2. Priprava 4-klor-7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidina (**1b**)

Otopina 4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidina (1 g, 6,51 mmol) u THF-u (17,5 mL) ohlađena je u ledenoj kupelji na 0 °C. Pod atmosferom argona dodan je NaH (390,8 mg, 9,77 mmol) u malim

obrocima. Nakon pola sata u ledenoj kupelji u reakcijsku smjesu dodan je SEM-Cl (1,73 mL, 9,77 mmol) i reakcijska smjesa je miješana pri sobnoj temperaturi 1 sat. Reakcija je zaustavljena dodatkom vode (10 mL). Reakcijska smjesa prebačena je u lijevak za odjeljivanje, dodana je voda (50 mL) te je organski sloj ekstrahiran s EtOAc (3 × 30 mL). Spojeni organski slojevi su sušeni na bezvodnim Na₂SO₄ i profiltrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je dobiven sirovi produkt koji je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO₂ kolona, 12 g, 15 μm, u sustavu otapala EtOAc:cikloheksan = 3:1, 0 → 40 % EtOAc). Pročišćavanjem je dobivena bistra bezbojna uljasta tekućina (produkt **1b**, 1,064 g, 3,75 mmol, η = 57,6 %).

UPLC-MS/UV: R_t = 1,34 min, m/z 284,07 [M+H]⁺, UV/DAD: 100 %

3.2.3. Priprava *N*-(2,4-dimetoksibenzil)-7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina iz **1a** i **1b** (**2**)

Produkt **1a** (50 mg, 0,176 mmol) otopljen je u THF-u (1 mL) te hlađen u ledenoj kupelji na 0 °C. Pod atmosferom argona dodan je NaH (10,2 mg, 0,255 mmol) u malim obrocima. Nakon pola sata u ledenoj kupelji u reakcijsku smjesu dodan je SEM-Cl (0,0451 mL, 0,255 mmol) te je reakcijska smjesa miješana pri sobnoj temperaturi 1 sat. Reakcija je zaustavljena dodatkom vode (1 mL). Reakcijska smjesa prebačena je u lijevak za odjeljivanje, dodana je voda (10 mL) te je organski sloj ekstrahiran s EtOAc (3 × 10 mL). Spojeni organski slojevi sušeni su na bezvodnim Na₂SO₄ i profiltrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je dobiven sirovi produkt koji je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO₂ kolona, 4 g, 15 μm, u sustavu otapala DCM:MeOH:NH₄OH = 90:9:1,5). Pročišćavanjem je dobivena bijela krutina (produkt **2**, 26,1 mg, 0,063 mmol, η = 35,1 %).

UPLC-MS/UV: R_t = 1,02 min, m/z 415,28 [M+H]⁺, UV/DAD: 98 %

¹H NMR (produkt **2**, 500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 8,13 (s, 1H), 7,77 (t, 1H, J = 5,8 Hz), 7,23 (d, 1H, J = 3,6 Hz), 7,10 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 6,69 (br. s., 1H), 6,56 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 6,44 (dd, 1H, J_1 = 8,4 Hz, J_2 = 2,3 Hz), 5,47 (s, 2H), 4,58 (d, 2H, J = 5,8 Hz), 3,81 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,48 (t, 2H, J = 8,1 Hz), 0,81 (t, 2H, J = 8,1 Hz), -0,09 (s, 9H).

Produkt **1b** (805,3 mg, 2,48 mmol) otopljen je u DMSO (2,5 mL) te je dodan (2,4-dimetoksifenil)metanamin (0,827 mL, 4,97 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 1 sat na 85 °C te je prebačena u lijevak za odjeljivanje i razrijeđena vodom (15 mL). Slojevi su odijeljeni te je organski sloj ekstrahiran s EtOAc (3 × 20 mL). Spojeni organski slojevi isprani su zasićenom otopinom NaCl te sušeni na bezvodnom Na₂SO₄ i profiltrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je dobiven sirovi produkt koji je zatim pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO₂ kolona, 12 g, 15 μm, u sustavu otapala cikloheksan:EtOAc = 2:3, v/v). Pročišćavanjem je dobivena bijela krutina (produkt **2**, 853 mg, 2,06 mmol, $\eta = 72,6\%$).

UPLC-MS/UV: $R_t = 1,00$ min, m/z 415,27 [M+H]⁺, UV/DAD: 100 %

3.2.4. Priprava *N*-(2,4-dimetoksibenzil)-3-metoksi-*N*-(7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamid (**3**)

Produkt **2** (750 mg, 1,81 mmol) otopljen je u DCM-u (4 mL) te je dodan 3-metoksipropanoil-klorid (0,242 mL, 2,17 mmol) i NaHCO₃ (0,456 g, 5,42 mmol) pri 0 °C. Reakcijska smjesa je miješana 1 h na sobnoj temperature te zaustavljena dodatkom vode (2 mL). Slojevi su odijeljeni te je organski sloj ekstrahiran s DCM te je propušten kroz fazni separator. Otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Zatim je sirovi produkt pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO₂ kolona, 12 g, 15 μm, u sustavu otapala cikloheksan:EtOAc = 1:1). Pročišćavanjem je dobivena bistra bezbojna uljasta tekućina (produkt **3**, 584,2 mg, 1,17 mmol, $\eta = 51,6\%$).

UPLC-MS/UV: $R_t = 1,32$ min, m/z 501,63 [M+H]⁺, UV/DAD: 80 %

¹H NMR (produkt **3**, 400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 8,70 (s, 1H), 7,71 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz), 7,12 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 6,46 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz), 6,40-6,35 (m, 2H), 5,60 (s, 2H), 5,03 (s, 2H), 3,67 (s, 3H), 3,55-3,47 (m, 4H), 3,46 (s, 3H), 3,13 (s, 3H), 2,57 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz), 0,81-0,76 (m, 2H), -0,136 (s, 9H).

3.2.5. Priprava *N*-[7-(hidroksimetil)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il]-3-metoksipropanamida (**4**) i 3-metoksi-*N*-(7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamida (**5**)

Produkt **3** (430 mg, 0,862 mmol) otopljen je u DCM (4 mL) te je dodana TFA (1,98 mL, 25,9 mmol). Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi. Potom je pH reakcijske smjese namješten na 9 zasićenom otopinom NaHCO₃. Slojevi su odijeljeni te je organski sloj ekstrahiran s EtOAc (3×10 mL) i par kapi iPrOH, a potom je sušen na bezvodnom Na₂SO₄. Otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču. Sirovi produkt je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO₂ kolona, 4 g, 15 μm, u sustavu otapala DCM i DCM:MeOH:NH₄OH = 90:9:1, 0-50 %). Otapalo je upareno pri sniženom tlaku te je dobiveno 82,8 mg bijele krutine koju čine produkti **4** i **5** (produkt **4**: produkt **5** = 1:4).

UPLC-MS/UV: $R_t = 0,39$ min, m/z 221,08 [M+H]⁺, m/z 251,07 [M+H]⁺

¹H NMR (produkt **4**, 500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 10,69 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 7,47 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 6,78 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 6,59 (t, 1H), 5,57 (d, 2H, $J = 5,7$ Hz), 3,65 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz), 3,25 (s, 3H), 2,76 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz).

¹H NMR (produkt **5**, 500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 11,96 (s, 1H), 10,61 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,35 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 6,73 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 3,65 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz), 3,25 (s, 3H), 2,76 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz).

3.2.6. Priprava 3-metoksi-*N*-(7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamida (**5**)

Smjesa produkata **4** i **5** (47,1 mg) otopljena je u 7 M NH₃ u MeOH (5 mL). Reakcijska smjesa miješana je 1h. Otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom te je sirovi produkt pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO₂ kolona od 4 g, 15 μm, u sustavu otapala DCM i DCM:MeOH:NH₄OH (90:9:1) u rasponu 0 → 50 %) pri čemu je dobiven kristalični produkt (produkt **5**, 36,20 mg, 0,164 mmol).

UPLC-MS/UV: $R_t = 0,40$ min, m/z 221,00 [M+H]⁺, UV/DAD: 94 %

$^1\text{H NMR}$ (produkt **5**, 500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 11,96 (s, 1H), 10,61 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,35 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 6,73 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 3,65 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz), 3,25 (s, 3H), 2,76 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz).

3.2.7. *Priprava 3-metoksi-N-(7-(5-(trifluormetil)piridin-2-il)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)propanamida klasičnom Ullmanovom reakcijom i fotoredoks reakcijom (6)*

Produkt **5** (25,7 mg, 0,112 mmol) otopljen je u 1,4-dioksanu (4 mL). Pod atmosferom argona dodani su *trans*-1,2-diaminocikloheksan (2 μL , 0,011 mmol), 2-brom-5-(trifluormetil)piridin (110,3 mg, 0,488 mmol), CuI (6,2 mg, 0,0326 mmol) i K_3PO_4 (207,3 mg, 0,977 mmol). Reakcija je provođena na 100°C preko noći. Potom je reakcijska smjesa isprana otopinom NH_3 i organski sloj je ekstrahiran s EtOAc. Organski sloj je ispran vodom i zasićenom otopinom NaCl te su slojevi odijeljeni i organski je ekstrahiran i sušen na bezvodnim Na_2SO_4 . Potom je profiltriran i otapalo je upareno. Sirovi produkt je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO_2 kolona, 4 g, 15 μm , u sustavu otapala DCM i DCM:MeOH = 20:1 u rasponu 0 \rightarrow 50 %). Dobivene su bijele krutine (produkt **6** s nusproduktima, 8,4 mg; produkt **7**, 14,8 mg, 0,053 mmol, $\eta = 46,4$ %; produkt **8**, 1,2 mg, $2,83 \cdot 10^{-3}$ mmol, $\eta = 2,02$ %). Smjesa koja sadrži produkt **6** se dalje pročišći brzom kolonskom kromatografijom (SiO_2 kolona, 4 g, 15 μm , u sustavu otapala DCM i DCM:MeOH = 20:1 u rasponu 0 \rightarrow 50 %) te je dobivena bijela krutina (produkt **6**, 0,8 mg, $2,19 \cdot 10^{-3}$ mmol, $\eta = 1,82$ %).

UPLC-MS/UV (produkt **6**): $R_t = 1,14$ min, m/z 364,13 $[\text{M-H}]^-$, UV/DAD: 93 %

$^1\text{H NMR}$ (produkt **6**, 400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 10,93 (s, 1H), 9,04 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,95-8,93 (m, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,48 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz), 8,30 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 7,04 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 3,67 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz), 3,26 (s, 3H), 2,80 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz).

UPLC-MS/UV (produkt **7**): $R_t = 0,77$ min, m/z 279,90 $[\text{M+H}]^+$, UV/DAD: 98 %

$^1\text{H NMR}$ (produkt **7**, 400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 9,09 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,88 (s, 1H), 8,41 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz), 8,25 (s, 1H), 8,07 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz), 7,33 (s, 2H), 6,87 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz).

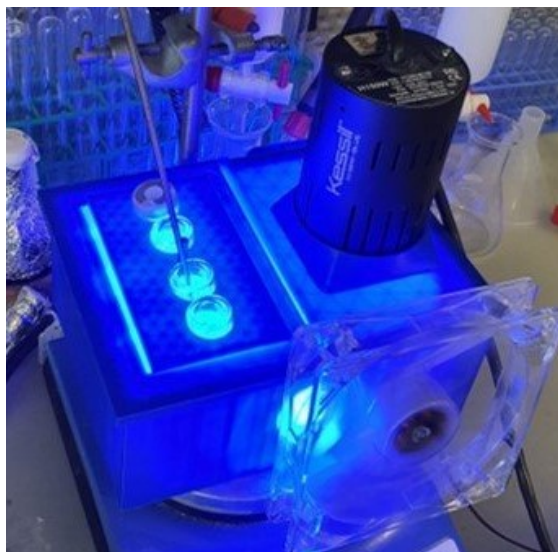
UPLC-MS/UV (produkt **8**): $R_t = 1,45$ min, m/z 425,05 $[M+H]^+$, UV/DAD: 70 %

1H NMR (produkt **8**, 400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 10,91 (br. s, 1H), 9,05 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,93-8,92 (m, 1H), 8,75 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,73-8,71 (m, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,46 (dd, 1H, $J_1 = 9,0$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz), 8,27 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 8,19 (dd, 1H, $J_1 = 9,0$ Hz, $J_2 = 2,5$), 7,43 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz).

Produkt **5** (36,2 mg, 0,16 mmol), $[Ir(dFCF_3ppy)_2(5,5-dCF_3bpy)](PF_6)$ (1,5 mg, 1,3 μ mol), 2-brom-5-(trifluorometil)piridin (92,8 mg, 0,41 mmol) i $Cu(acac)_2$ (6,4 mg, 0,025 mmol) dodani su u 20 mL vijalu te otopljeni u ACN (10 mL). Potom su dodani supersilanol (126 μ L, 0,4 mmol) i TMG (62 μ L, 0,48 mmol). Reakcijska smjesa je sonicirana te je pola smjese prebačeno u drugu vijalu gdje je dodan MeOH (1 mL). Septumi su probušeni iglom te su reakcijske smjese miješane tijekom noći pod plavom LED lampom u fotoreaktoru (slika 21). Tijek reakcija je praćen snimanjem UPLC-MS/UV spektra nakon čega je odlučeno spojiti reakcijske smjese. Potom su razrijeđene s EtOAc (5 mL) i pomiješane s KF (40 % mase na Al_2O_3 , 1g) i tetrapropilamonijevim bromidom (0,5 g, 1,88 mmol). Nakon 2 h smjesa je profiltrirana preko celita. Fitrat je ispran zasićenom otopinom NH_4Cl , vodom i zasićenom otopinom NaCl. Slojevi su odijeljeni te su organski slojevi sušeni nad $MgSO_4$, profiltrirani i otapalo je upareno. Sirovi produkt je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (SiO_2 kolona, 4 g, 15 μ m, u sustavu otapala DCM i DCM:MeOH = 20:1 u rasponu 0 \rightarrow 50 %) te je dobivena bijela krutina (produkt **6** s nusproduktima, 23,9 mg). Stoga je smjesa dalje pročišćena brzom kolonskom kromatografijom (SiO_2 kolona, 4 g, 15 μ m, u sustavu otapala DCM:MeOH: NH_4OH = 90:5:0,5 u rasponu 0 \rightarrow 50 % DCM i) te je dobivena bijela krutina (produkt **6**, 22,6 mg, 0,0619 mmol, $\eta = 38,7$ %).

UPLC-MS/UV (produkt **6**): $R_t = 1,08$ min, m/z 366,15 $[M+H]^+$, UV/DAD: 100 %

1H NMR (produkt **6**, 400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 10,94 (s, 1H), 9,05 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 8,96-8,94 (m, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,49 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz), 8,31 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 7,04 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 3,67 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz), 3,26 (s, 3H), 2,81 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz).



Slika 21. Fotoredoks reaktor *PhotoRedOx Box* s plavom LED lampom.²⁹

3.3. Računalne metode

Inicijalno molekulsko uklapanje produkta **6** u FYN kinaznu domenu (PDB 2dq7) temeljem kojeg je krenuto u sintezu derivata azaindola provedeno je pomoću programskog paketa *Schrödinger*, koristeći komercijalno dostupan *Glide docking protokol* (*Schrödinger*, SAD; podaci iz uklapanja korišteni uz dopuštenje Ele Radošević).

Kasnije je molekulsko uklapanje provedeno programima *Autodock Vina* verzija 1.2.5 (*Center for Computational Structural Biology, The Scripps Research Institute*, SAD) i *Catalophore* (*Innophore*, Austrija, SAD) koji rade na različitim principima. *AutoDock Vina* je svestran alat za molekulsko uklapanje liganada u širok spektar proteina te se primjenjuje u dizajnu lijekova. *Autodock Vina* temelji izračune na semi-empirijskom polju sila parametriziranom na temelju velikog broja poznatih protein-inhibitor kompleksa čija je konstanta inhibicije (K_i) poznata.³⁰ *Catalophore* je program specijaliziran za uklapanje molekula u aktivna mjesta enzima te se primjenjuje u dizajnu inhibitora enzima. *Catalophore* koristi 3D predloške (“katalofore”, engl. “*catalophores*”) definirane oblacima točaka fizikalno-kemijskih svojstava te ih kombinira s klasičnim bioinformatičkim pristupom i umjetnom inteligencijom.³¹

Za molekulsko uklapanje strukture liganada nacrtane su pomoću programa *ChemDraw* verzija 23.0.1 (*Reivity Signals*, SAD) te je provedena procedura koja je uključivala: minimizaciju energije u programu *Chem3D* verzija 23.0.1 (*Reivity Signals*, SAD), dodavanje Kollmanovih naboja i polarnih vodikovih atoma te detekcija korijena torzijskog drveta

("Torsion Tree" → "Detect root") u programu *AutoDockTools* verzija 1.5.7. (Center for Computational Structural Biology, The Scripps Research Institute, SAD). Također, provedena je *in silico* analiza fizikalno-kemijskih svojstava azaindolnih produkata **6**, **7** i **8** pomoću online alata (*Molinspiration*, Slovačka Republika).

Potom je provedena priprema receptora u programu *AutoDockTools*: uklonjene su vode i ligandi prisutni u kristalnim strukturama željenih proteina, provjereno je nedostaju li neki atomi te su po potrebi dodani polarni vodikovi atomi, a Kollmanovi naboji raspršeni su po bočnim ogranicima aminokiselina. Definirani su veličina i položaj 3D mreže (engl. *Gridbox*) s obzirom na receptor te je provedeno molekulsko uklapanje u programu *AutoDock Vina* koristeći sljedeće podatke u konfiguracijskoj datoteci (primjer za FYN):

```
receptor = FYN_2dq7.pdbqt
ligand = azaindol.pdbqt
out = out.pdbqt
center_x = -15.611
center_y = 18.417
center_z = -11.917
size_x = 90
size_y = 82
size_z = 98
exhaustiveness = 32
```

Za usporedbu, molekulsko uklapanje provedeno je i u programu *Catalophore*, gdje se prvo definiraju prisutne šupljine receptora te se željeni ligandi potom uklapaju u njih. Za ovaj program nije potrebna posebna priprema liganda ni receptora. Potrebno je samo ukloniti molekule vode te neželjene ligande iz strukture receptora.

Za analizu interakcija liganada i proteina korišten je program *Discovery Studio Visualizer 2024* (*Dassault Systèmes*, Francuska).

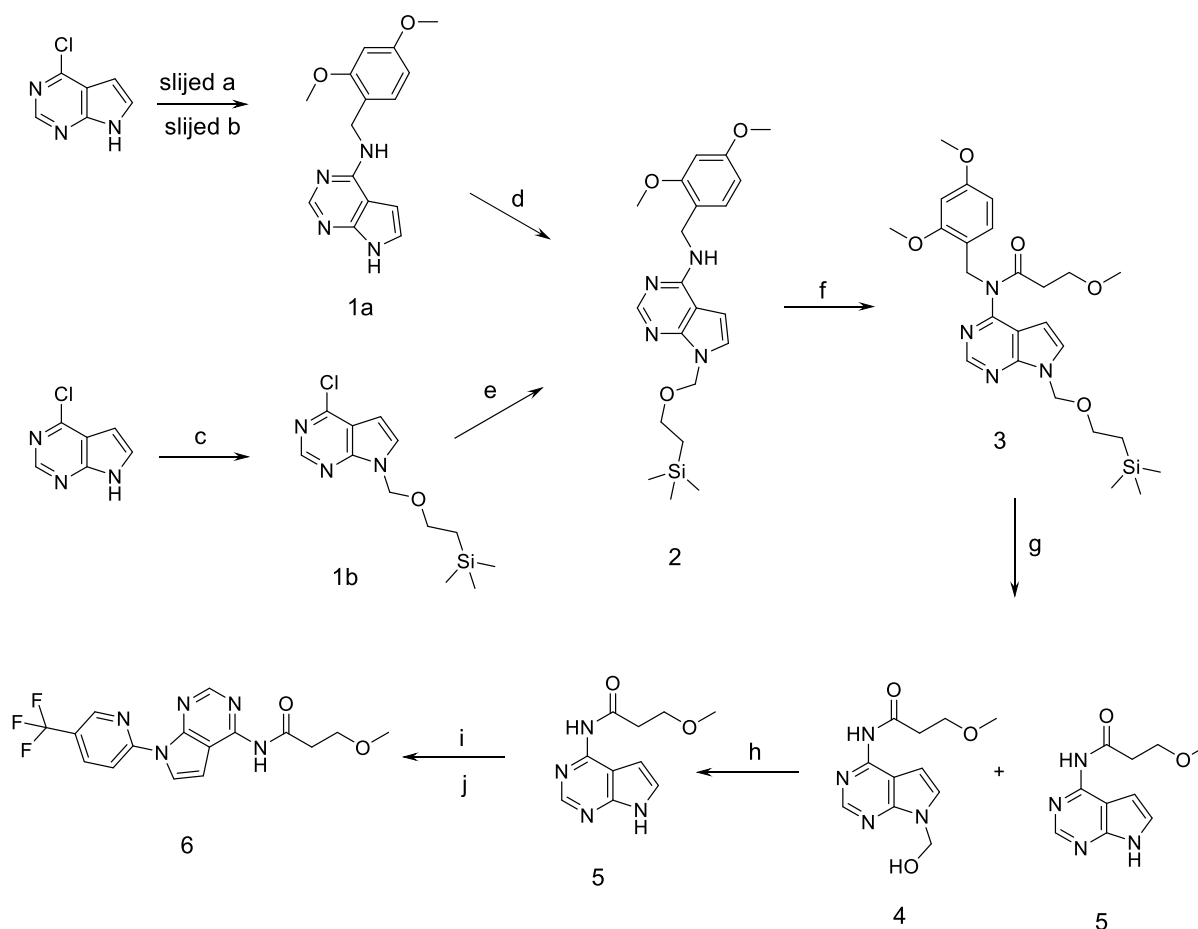
Kristalne strukture proteina preuzete su iz PDB baze struktura proteina (engl. *Protein Data Bank*). Za molekulsko uklapanje (engl. *docking*) azaindolnog produkta **6** korištena je kristalna struktura FYN kinazne domene u kompleksu sa staurosporinom (PDB 2dq7), kristalna struktura SRC kinaze s vezanim kovalentnim inhibitorom (*N*-{2-[(5-kloro-2-{[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]amino}pirimidin-4-il)amino]fenil}propanamidom, PDB 6ate), kristalna struktura LYN kinazne domene u kompleksu s *N*-(1H-indazol-6-il)-8-(piperidin-4-

iloksi)-6-propilkinazolin-2-aminom (PDB 5xy1), kristalna struktura LCK kinazne domene u kompleksu s 7-[(ciklopropilmetil)amino]-2-[(4-metoksifenil)amino]-5-metilpirazolo[1,5-a]pirimidin-3-karboksamidom (PDB 3ad6) i kristalna struktura JAK1 kinazne domene u kompleksu s inhibitornim proteinom SOCS1 (PDB 6c7y). Kako bi se *in-silico* utvrdila specifičnost azaindolnog liganda prema FYN kinazi, odabrano je još nekoliko kinazi korištenjem servera *Foldseek Search*. *Foldseek Search* temeljem unesene strukture (PDB 2dq7) pretražuje baze podataka na temelju strukture. Iz liste rezultata odabrane su kinaze različitog stupnja sličnosti poravnatih sekvenci (engl. *Seq. ID*): SRC kinaza (75,6 %), LCK kinaza (69,4 %) i LYN kinaza (66,4 %).³²

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

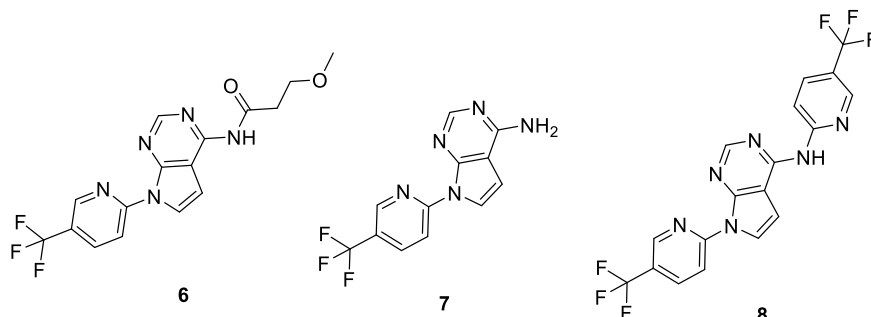
Pregledom literature o inhibitorima kinaza SRC obitelji, uočeno je da nisu poznati selektivni inhibitori FYN kinaze. Pregledom poznatih struktura inhibitora kinaza, 7-azaindol se pokazao kao dobra polazišna točka za dizajn potencijalnog inhibitora. Dizajniran je ciljani derivat 7-azaindola, 3-metoksi-*N*-(7-(5-(trifluormetil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamid (**6**) te je provedeno molekulsko uklapanje kako bi se utvrdilo postoji li vezanje u FYN kinaznu domenu. Također, provedeno je molekulsko uklapanje u nekoliko drugih kinaznih domena iz SRC obitelji kinaza kako bi se procijenila potencijalna selektivnost prema FYN kinazi. Provedeno je i *in-silico* određivanje fizikalno-kemijskih svojstava produkata kako bi se usporedila njihova svojstva te dobio uvid odgovaraju li farmakološkim svojstvima lijekova.



Slika 22. Shematski prikaz priprave 7-azaindolnog derivata. Reagensi i uvjeti: a) (2,4-dimetoksifenil)metanamin (1,5 eq.), DIPEA (3 eq.), 1,4-dioksan, 60 °C, preko noći; b) (2,4-dimetoksifenil)metanamin (3 eq.), DMSO, 85 °C, 1 h; c) SEM-Cl (1,5 eq.), NaH (1,5 eq.), THF, 0 - 25 °C, 1h; d) SEM-Cl (1,5 eq.), NaH (1,5 eq.), THF, 0 - 25 °C, 1h; e) (2,4-dimetoksifenil)metanamin (1,5 eq.), DMSO, 85 °C, 1 h; f) 3-metoksipropanoil-klorid (1,2 eq.), NaHCO₃ (3 eq.), DCM, 0 - 25 °C, 1h; g) TFA (30 eq.), DCM, 25 °C, preko noći; h) 7M NH₃ u MeOH, 1h, 25 °C; i) 2-brom-5-(trifluormetil)piridin (1,5 eq.), CuI (0,1 eq.), K₃PO₄ (3 eq.), *trans*-1,2-diaminocikloheksan (0,1 eq.), 1,4-dioksan, 100 °C, preko noći; j) 2-brom-5-(trifluormetil)piridin (2,5 eq.), [Ir(dFCF₃ppy)₂(5,5-dCF₃bpy)](PF₆) (0,8 mol %), Cu(acac)₂ (15 mol %), supersilanol (2,5 eq.), TMG (3 eq.), ACN, 25 °C, preko noći.

Potom je provedena priprava dizajniranog derivata 7-azaindola (**6**, slika 22), počevši od uvođenja zaštitne skupine na pirazolni dušik i uvođenja amino skupine na pirimidinski prsten komercijalno dostupnog 4-klor-7H-pirolo[2,3-d]pirimidina, acilacije amino skupine i uklanjanja SEM i DMB zaštitne skupine. U nastavku istraživanja sintetiziran je 3-metoksi-N-

(7-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamid, pri čemu se usporedila učinkovitost nukleofilne aromatske supstitucije provedene Ullmanovom reakcijom i fotoredoks reakcijom (slika 23).



Slika 23. Prikaz konačnih derivata 7-azaindola sintetiziranih Ullmanovom i fotoredoks reakcijom.

4.2. Računalne metode

4.2.1. Molekulsko uklapanje u FYN kinaznu domenu

Do sada je riješena samo jedna kristalna struktura kinazne domene FYN kinaze i to u kompleksu sa staurosporinom (PDB 2dq7)³³ te je ona korištena u ovom molekulskom uklapanju iako se većina parametara nalazi u „crvenom“ dijelu skale (engl. *wwPDB validation*). Staurosporin je indolokarbazolni alkaloid izoliran iz *S. staurosporeus* AM-2282³⁴ (sada *Lentzea albida*), snažan, ali nespecifičan ATP-kompetitivni inhibitor protein kinaza, posebice tirozin kinaza. Pokazalo se da ima snažno citotoksično djelovanje na tumorske stanice, no unatoč tome nema kliničku primjenu zbog svoje potentnosti i promiskuiteta.³

Provedeno je molekulsko uklapanje adenzin trifosfata, staurosporina, 3-metoksi-*N*-(7-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamida (produkta **6**), 7-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (produkta **7**) i *N*, 7-bis(5-(trifluorometil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (produkta **8**) u programima *AutoDock Vina* i *Catalophore*.

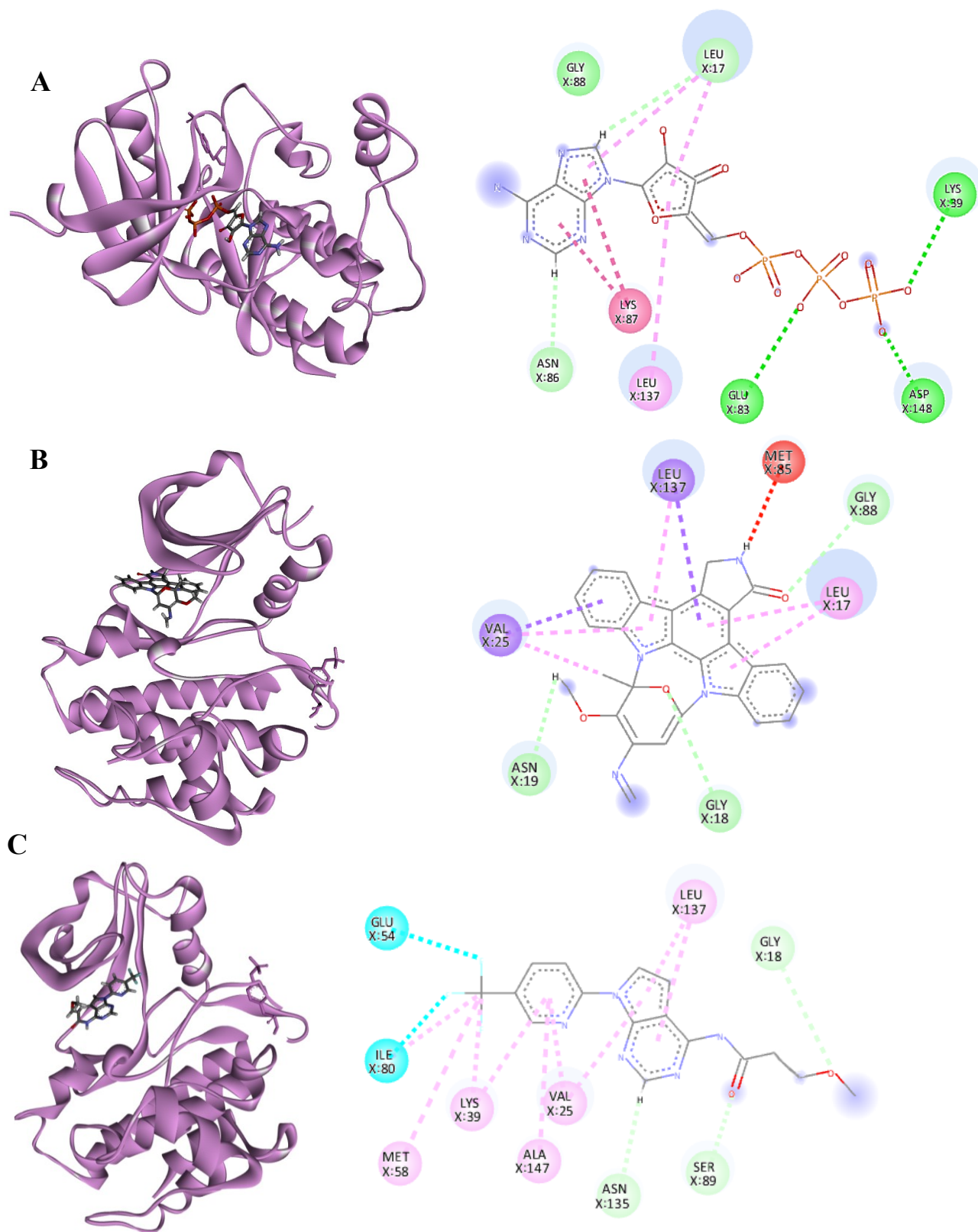
Tablica 2. Energije vezanja ATP-a, staurosporina, produkata **6**, **7** i **8** u kinaznu domenu FYN kinaze (PBD 2dq7) dobivene pomoću programa *AutoDock Vina* i *Catalophore*.

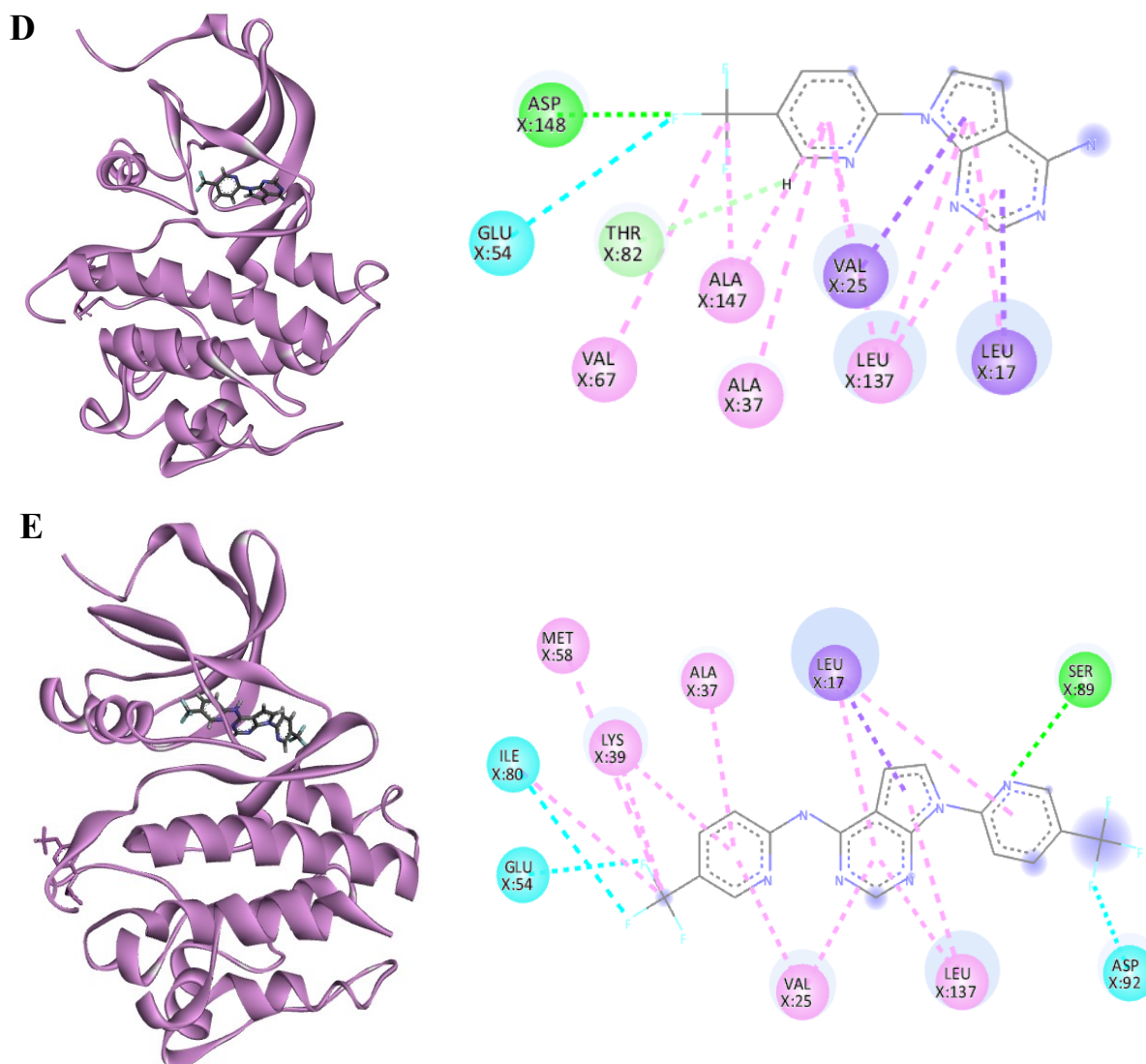
	<i>E</i> / kcal mol ⁻¹				
	ATP	Staurosporin	Produkt 6	Produkt 7	Produkt 8
<i>AutoDock Vina</i>	-7,192	-11,94	-7,445	-7,879	-8,664
	-6,642	-11,93	-7,308	-7,856	-8,639
	-6,589	-11,93	-6,84	-7,748	-8,63
	-6,58	-11,92	-6,783	-7,737	-8,627
<i>Catalophore</i>	-8,242	-10,74			
	-7,506	-10,214	-7,891	-7,838	-9,665
	-6,747	-9,489			

Molekulska uklapanja pomoću *AutoDock Vina* provedeno je četiri puta za svaki ligand te su iznosi najnižih energija vezanja prikazani u tablici 2. Vidljivo je da se sintetizirani spojevi **6-8** vežu malo snažnije od ATP-a, no značajno slabije od staurosporina.

Molekulska uklapanja pomoću *Catalophore* rezultira jednim ili više načina vezanja liganada te su odgovarajuće energije vezanja prikazane u tablici 2. Može se primijetiti da su energije vezanja spojeva **6** i **7** međusobno slične te slične energiji vezanja ATP-a, dok je energija vezanja spoja **8** dosta niža. Vezanje staurosporina je najpovoljnije, no dobivene

energije su nešto veće te bliže energiji spoja **8** nego u uklapanju pomoću *AutoDock Vina*. Načini vezanja liganada prikazani su na slici 24.





Slika 24. Prikaz uklopljenih liganada u FYN kinaznu domenu (lijevo) redom: ATP (A), staurosporin (B), produkt 6 (C), produkt 7 (D) i produkt 8 (E) te pripadajuće interakcije (desno) iscrtkanim linijama: vodikove veze (zeleno), amid- π (tamno ružičasto), alkil ili π -alkil (svijetlo ružičasto), halogenska (plavo), π - σ (ljubičasto) i nepovoljna donor-donor interakcija (crveno).

Kinoshita *et. al* riješili su strukturu FYN kinaze u kompleksu sa staurosporinom te pokazali da staurosporin ostvaruje 2 vodikove veze s karbonilnom okosnicom aminokiseline Glu342 i amidnom okosnicom aminokiseline Met344 u zglobnoj regiji koja je važna za vezanje adeninskog prstena ATP-a. U riboza-vezujućem džepu ostvaruje se još jedna vodikova veza sa bočnim ogrankom Ser348. Prisutna je i CH-O interakcija (Gly277) dobro definirana za kristalne

strukture s malim molekulama. Staurosporin dijelom svoje strukture u ravnini ostvaruje čak 8 hidrofobnih interakcija s: Leu276, Val284, Ala296, Gly347 i Leu390.³³

Molekulskim uklapanjem staurosporina (slika 24, **B**) doista su se pokazale interakcije s aminokiselinama: Leu276 (17), Met344 (85), Val284 (25) i Gly277 (18). Također vidljive su i vodikove veze s Asn278 (19) i Gly347 (88) te π -alkil interakcije s Leu396 (137).

Uklapanje ATP-a (slika 24, **A**) nije pokazalo vodikovu vezu s Met344, ali je s Glu342 (83), Lys 298 (39), Asp407 (148), Leu276 (17) i Asn345 (86) te amid- π interakcije s Lys346 (87), π -alkil s Leu396 (137) i Leu276 (17) i van der Waalsove interakcije s Gly347(88).

Produkt **6** uklopljen u FYN kinaznu domenu (slika 24, **C**) ostvaruje halogenske interakcije s aminokiselinama Glu313 (54) i Ile339 (80), alkilne s Met317 (58), Lys298 (39) i Ile339 (80) te π -alkil s Lys298 (39), Ala406 (147), Val284 (25), Asn394 (135), Ser348 (89), Leu396 (137) i Gly277 (18), dok produkt **7** (slika 24, **D**) ostvaruje halogensku interakciju s Glu313 (54), vodikove veze s Asp407 (148) i Thr341 (82), π - σ s Val284 (25) i Leu276 (17), alkilne s Val326 (67) i Ala406 (147) te π -alkil interakcije s Ala406 (147), Val284 (25), Leu276 (17), Val326 (67) i Ala296 (37). Produkt **8** (slika 24, **E**) ostvaruje vodikovu vezu sa Ser348 (89), halogensku s Ile339 (80), Glu313 (54) i Asp351 (92), π - σ s Leu276 (17), alkilne interakcije s Ile393 (80), Lys298 (39) i Met317 (58) te π -alkil interakcije s Lys298 (39), Ala296 (37), Val 284 (25), Leu276 (17) i Leu396 (137).

4.2.2. Fizikalno-kemijska svojstva azaindolnih produkata

Za predviđanje nekih od farmakoloških svojstava poput apsorpcije (tu još spadaju distribucija, metabolizam i izlučivanje; ADME), obično se primjenjuje “pravilo o 5” (engl. “*the rule of 5*”) temeljeno na distribuciji izračunatih svojstava među nekoliko tisuća lijekova.^{35–37} Pravilo nalaže da potencijalni lijek ima manje od 5 donora vodikove veze, manje od 10 akceptora vodikove veze, molarnu masu manju od 500 g/mol i da je izračunati ClogP manji od 5 ili MlogP manji od 4,15 (LogP je partijski koeficijent raspodjele otopljene tvari u *n*-oktanolu i vodi). Iznimke pravila su supstrati bioloških transportera.³⁷

Prema tablici 3 vidljivo je da svi pripremljeni azaindolni spojevi spadaju u skupinu molekula nalik lijekovima (engl. “*druglike molecule*”).

Tablica 3. Svojstva azaindolnih produkata određena online alatom (*Molinspiration*, Slovačka Republika) s naznačenim graničnim vrijednostima.

Kriteriji	Produkt 6	Produkt 7	Produkt 8	Granice
Molarna masa (g/mol)	365,31	279,23	424,31	<500
*miLogP	1,88	1,93	4,43	CLogP<5
Broj donora H veza	1	2	1	<5
Broj akceptora H veza	7	5	6	<10
Broj rotirajućih veza	6	2	5	<10

*miLogP je particijski koeficijent raspodjele otopljene tvari u *n*-oktanolu i vodi dobiven iz seta za treniranje s više od dvanaest tisuća uglavnom molekula sličnih lijekovima razvijenom u tvrtci *Molinspiration*.³⁸

Osim toga, provedeno je predviđanje bioaktivnosti pomoću istog online alata (*Molinspiration*, Slovačka Republika). Rezultati predviđanja ukazuju da bi produkt 6 mogao biti inhibitor kinaza te produkti 7 i 8 inhibitori kinaza, inhibitori enzima ili ligandi receptora spregnutih s G-proteinom (GPCR, engl. *G protein-coupled receptor*).³⁸

4.2.3. Molekulsko uklapanje produkta 6 u SRC, LCK, LYN

Za početak je provedeno molekulsko uklapanje u SH2, SH3 i kinaznu domenu FYN kinaze pri čemu je uočen trend slabijeg vezanja na SH2 i SH3 domene, što ukazuje da bi se spoj mogao bolje vezati na kinaznu domenu.

Potom, kako bi se pokazala selektivnost produkta 6 prema FYN kinazi provedeno je molekulsko uklapanje u kinazne domene SRC kinaza (75,6 %, PDB 6ate), LCK kinaza (69,4 %, PDB 3ad6) i LYN kinaza (66,4 %, PDB 5xy1), koje se razlikuju po svojoj sličnosti sekvenci.³²

Tablica 4. Energije vezanja produkta **6** u nekoliko kinaznih domena dobivene molekulskim uklapanjem pomoću programa *AutoDock Vina*.

E / kcal mol ⁻¹			
LYN	LCK	SRC	FYN
-8,593	-6,736	-5,935	-7,501
-7,388	-6,215	-5,899	-7,471
-7,029	-6,174	-5,842	-7,451
-7,008	-6,087	-5,76	-7,412
-6,987	-6,035	-5,662	-7,004
-6,961	-5,98	-5,605	-6,762
-6,848	-5,952	-5,605	-6,559
-6,798	-5,915	-5,534	-6,437
-6,767	-5,839	-5,459	-6,381

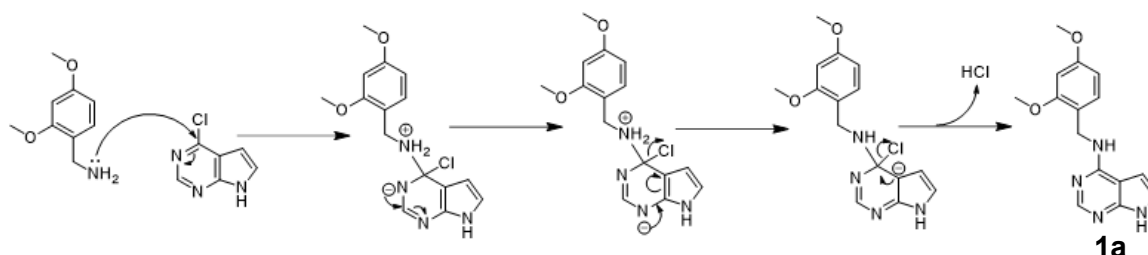
U tablici 4. vidljivo je da je vezanje u sve kinazne domene povoljno, no nešto bolje vezanje je u FYN i LYN (označen zeleno). Temeljem ovih rezultata, donekle je vidljiva selektivnost vezanja produkta **6** u FYN kinaznu domenu. No treba imati na umu da većina kristalnih struktura korištenih u ovom molekulskom uklapanju ima nekoliko parametara u „crvenom“ dijelu skale (engl. *wwPDB validation*).

Kako bi se utvrdila selektivnost pripravljenog liganda, potrebno je provesti *in vitro* testiranje na kinazama.

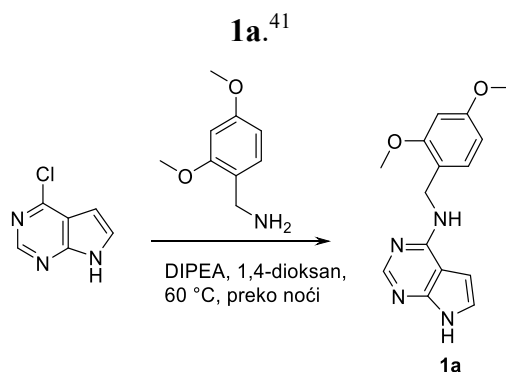
4.3. Priprava azaindolnih derivata

4.3.1. Uvođenje zaštite i amino skupine na 4-klor-7H-pirol[2,3-d]pirimidin (produkt **1a** i **1b**)

(2,4-dimetoksifenil)metanamin korišten je za uvođenje amino skupine na poziciju 4 azaindolne jezgre te su provedena dva sintetska postupka opisana na sličnim spojevima u literaturi.^{39,40} Amino skupina reagira kao nukleofil u nukleofilnoj aromatskoj supstituciji (S_NAr) sa 4-klor-7H-pirol[2,3-d]pirimidinom pri čemu nastaje produkt **1a** (slika 25).

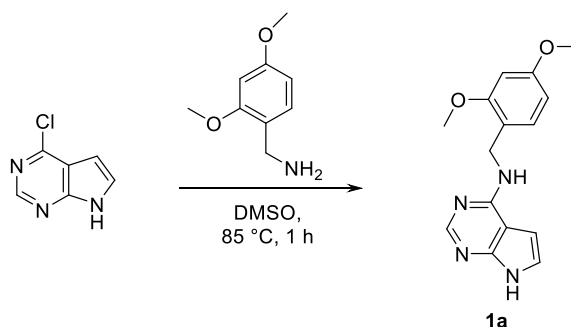


Slika 25. Predloženi mehanizam nukleofilne aromatske supstitucije u dobivanju produkta

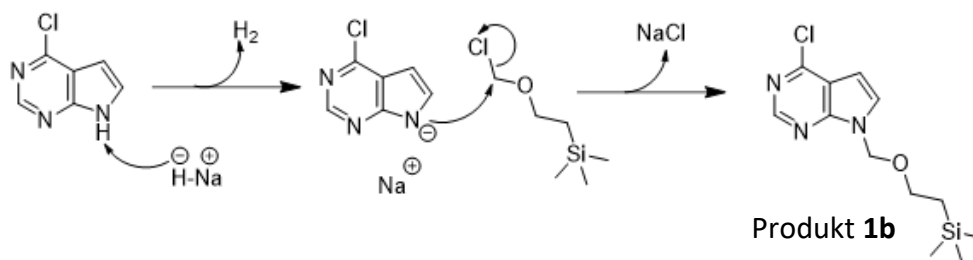


Slika 26. Priprava spoja **1a** preko noći.

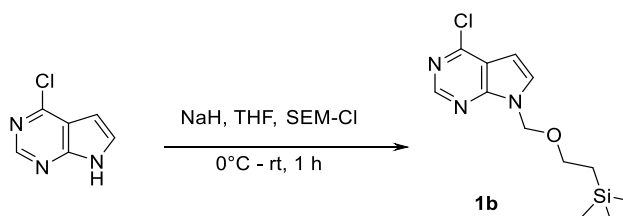
Reakcijom preko noći pri 60 °C, u kojoj su u otopinu 4-klor-7H-pirol[2,3-d]pirimidina u 1,4-dioksanu dodani DIPEA i (2,4-dimetoksifenil)metanamin, dobivena je smjesa koja sadrži produkt **1a** (slika 26).

Slika 27. Priprava spoja **1a** kroz 1 sat.

Reakcijom provedenom 1 sat pri 85 °C, u kojoj je u otopinu 4-klor-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidina u dimetil-sulfoksidu dodan (2,4-dimetoksifenil)metanamin, dobiven je produkt **1a** u iskorištenju 46,6 % (slika 27).

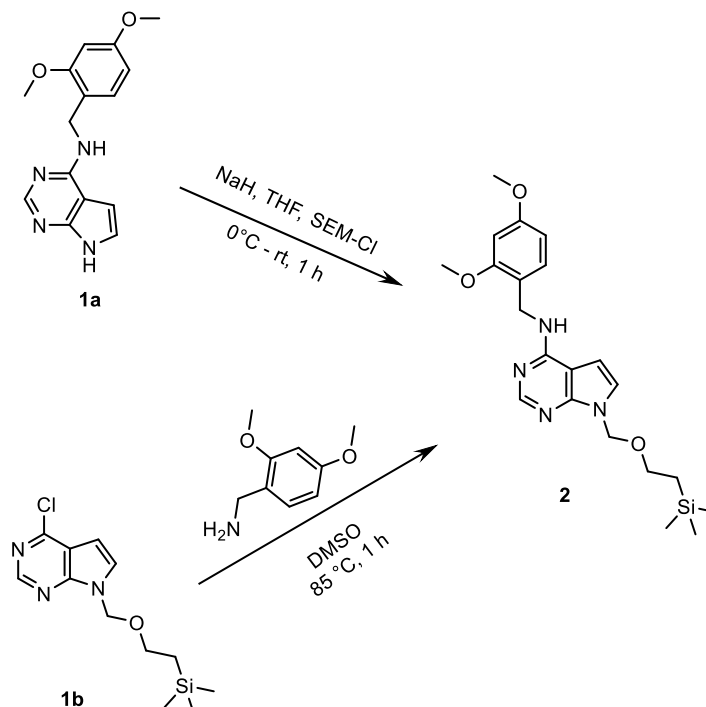
Slika 28. Predloženi mehanizam uvođenja 2-(trimetoksisilil)etoksimetilne (SEM) zaštitne skupine na 4-klor-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidin u dobivanju produkta **1b**.⁴²

Uvođenje 2-(trimetoksisilil)etoksimetilne (SEM) zaštitne skupine provedeno je prema literaturno opisanom postupku.⁴³ Dodatkom baze (natrijevog hidrida) u otopinu 4-klor-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidina u tetrahidrofuranu nastaje anion koji potom mehanizmom nukleofilne supstitucije reagira s 2-(trimetoksisilil)etoksimetil-kloridom (slika 28) pri čemu nastaje produkt **1b** u iskorištenju 57,6 % (slika 29).

Slika 29. Priprava spoja **1b**.

4.3.2. Priprava zaštićenog amino derivata 7-azaindola (produkt 2)

Pripravi produkta **2** pristupljeno je na dva načina tako što je variran redoslijed uvođenja 2-(trimetoksisilil)etoksimetilne zaštitne i amino skupine (slika 30).

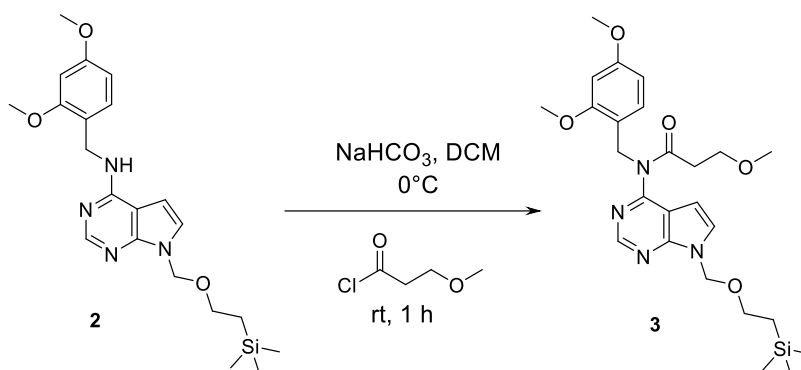


Slika 30. Priprava produkta **2** iz prethodno pripravljenih spojeva **1a** i **1b**.

Uvođenje 2-(trimetoksisilil)etoksimetilne (SEM) zaštitne skupine na spoj **1a** provedeno je prema gore opisanom postupku pri čemu je dobiven produkt **2** u iskorištenju 35,1 %.

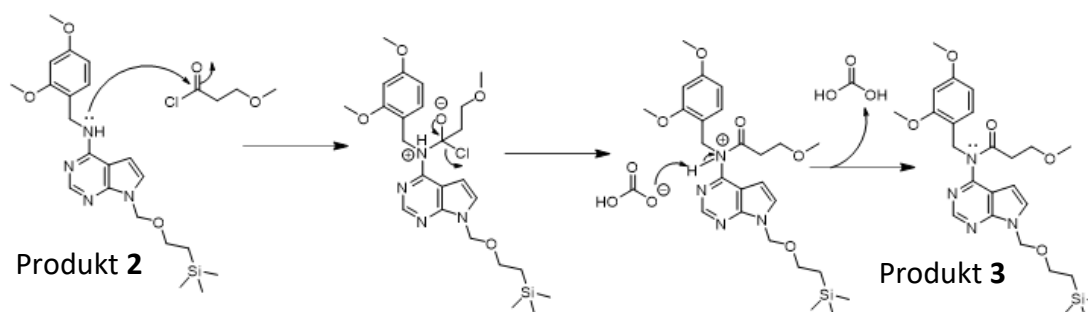
Reakcijom provedenom 1 sat pri 85 °C, u kojoj je u otopinu spoja **1b** u dimetil-sulfoksidu dodan (2,4-dimetoksifenil)metanamin, dobiven je produkt **2** u iskorištenju 72,6 %.

4.3.3. Aciliranje zaštićenog amino derivata 7-azaindola (produkt 3)



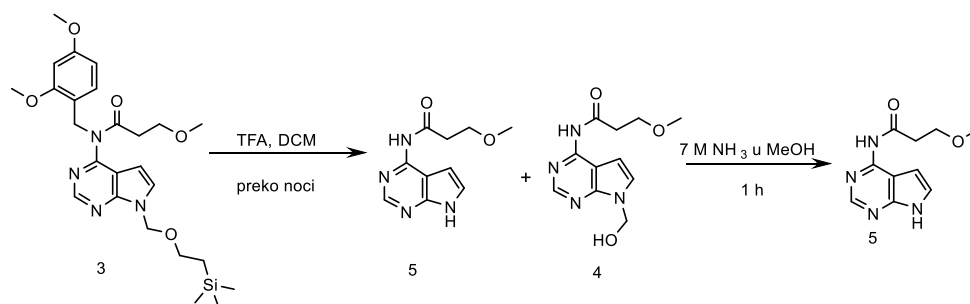
Slika 31. Priprava spoja 3 iz produkta 2.

Za pripravu amidne skupine na derivatu 7-azaindola, korišteni su acil-klorid (3-metoksipropanoil-klorid) i natrijev hidrogenkarbonat prema literaturno opisanom postupku na sličnim spojevima.⁴⁴ Produkt 3 nastaje adicijsko-eliminacijskim mehanizmom nukleofilne supstitucije na zaštićenom derivatu 7-azaindola (slika 32) kroz 1 sat pri sobnoj temperaturi u iskorištenju 51,6 % (slika 31).

Slika 32. Predloženi mehanizam acilacije amina u dobivanju produkta 3.⁴¹

4.3.4. Uklanjanje SEM i DMB zaštite s derivata 7-azaindola (produkt 5)

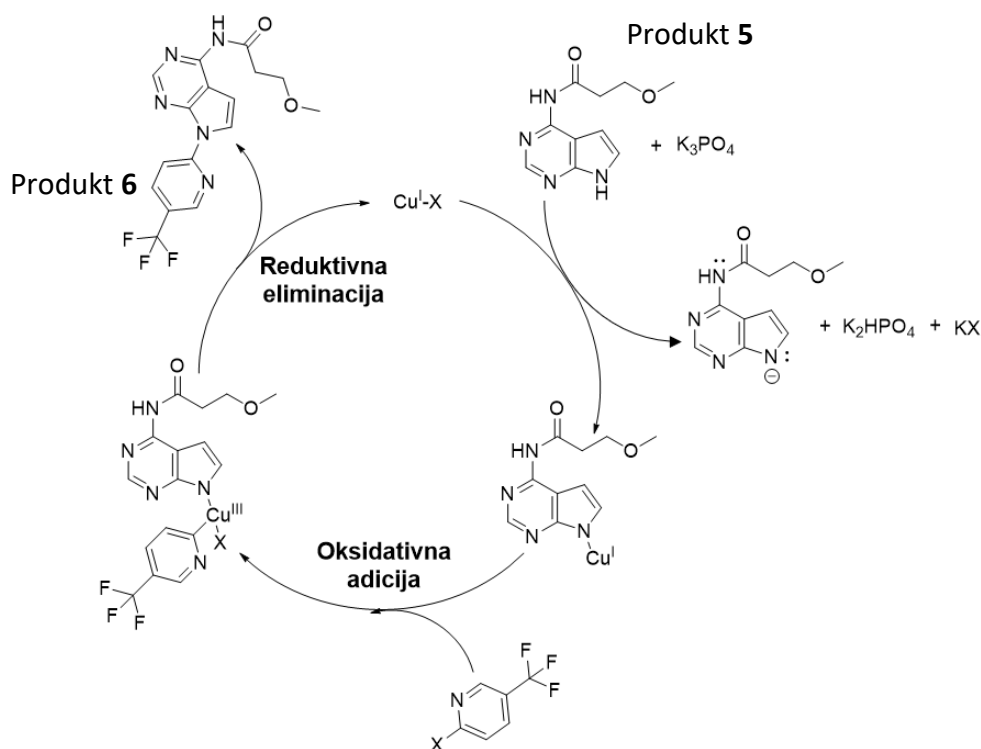
Trifluoroctena kiselina korištena je kao reagens koji uklanja i SEM i DMB zaštitu, no na dijelu produkta zaostala je hidroksimetilna skupina (produkt 4, oko 20 %), što je bilo primijećeno i u UPLC-MS/UV i ¹H NMR spektru.

Slika 33. Priprava produkta **5** iz produkta **3**.

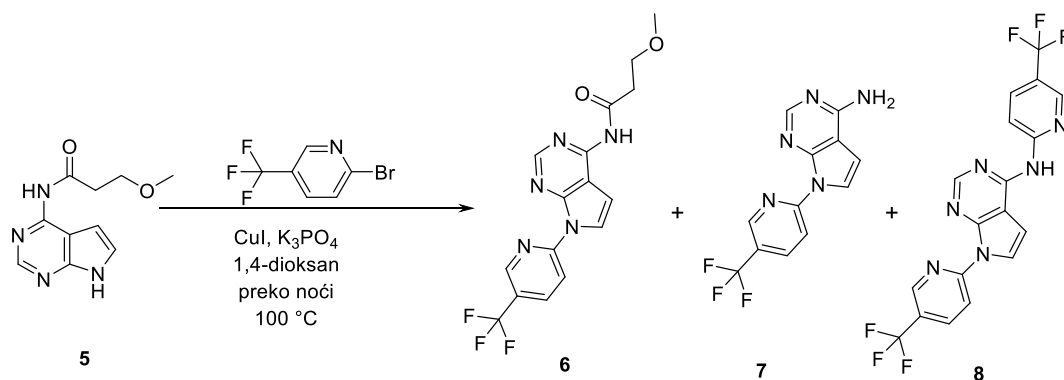
Kako bi se uklonila hidroksimetilna skupina, smjesa produkata je otopljena u 7 M otopini amonijaka u metanolu te miješan 1 sat na sobnoj temperaturi (slika 33). Nakon obrade reakcijske smjese i brzog pročišćavanja na stupcu dobivan je čisti produkt **5**.

4.3.5. Priprava derivata 7-azaindola klasičnom Ullmanovom reakcijom (**6**)

Stvaranje nove veze između pirolnog dušika i C2 piridina provedeno je Ullmanovom reakcijom (slika 35) prema literaturno opisanom postupku,⁴⁵ čiji je mehanizam prikazan na slici 34.

Slika 34. Predloženi mehanizam Ullmanove reakcije dobivanja derivata 7-azaindola **6**.⁴⁶

Kalijev fosfat korišten je kao baza u ovoj reakciji, gdje deprotonira pirolni dušik, koji potom reagira sa soli bakra(I). Kupratni intermedijer se oksidativno adira na aril-bromid (2-brom-5-(trifluormetil)piridin) te se reduktivnom eliminacijom dobivaju konačni produkti **6** (1,82 %), **7** (46,4 %) i **8** (2,02 %) te izlaze bakrovi ioni koje kompleksira *trans*-1,2-diaminocikloheksan.



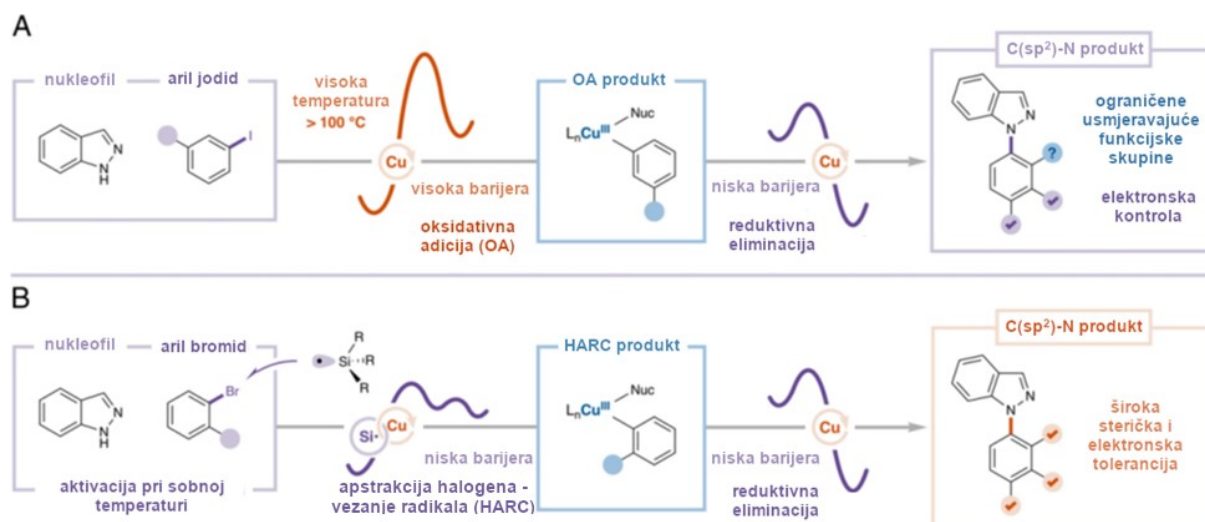
Slika 35. Priprava spojeva **6**, **7** i **8** iz produkta **5** Ullmanovom reakcijom.

Molekulski ion početnog 7-azaindola nije vidljiv u UPLC-MS/UV kromatogramu, a unatoč provođenju reakcije pri 100 °C preko noći, dobiveno je više produkata relativno niskih iskorištenja. Stoga je navedena reakcija odlučena isprobati u uvjetima fotoredoks reakcije.

4.3.6. Priprava derivata 7-azaindola fotoredoks reakcijom (**6**)

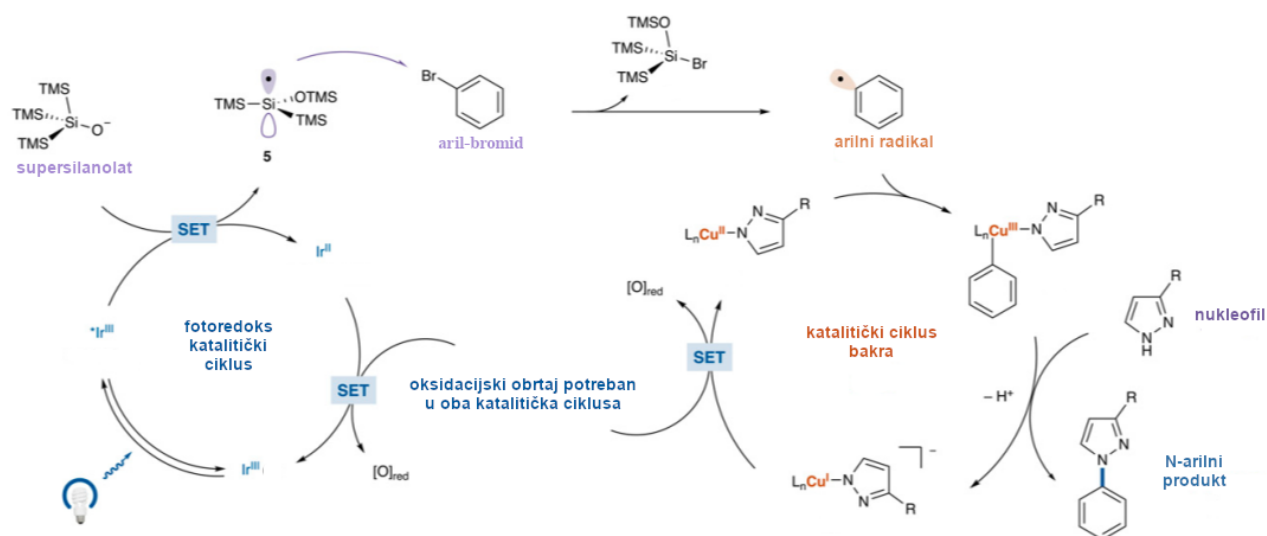
Nedostatak Ullman-Goldbergove reakcije je visoka energijska barijera u koraku oksidativne adicije. Iz tog razloga se reakcija često provodi pri visokim temperaturama, što pak ograničava opseg korištenja aril-bromida.

Predložen je alternativni HARC mehanizam Ullman-Goldbergove reakcije s niskom energijskom barijerom koja bi se mogla provesti pri sobnoj temperaturi te omogućiti korištenje sterički zahtjevnih bromarena i deaktiviranih prema oksidativnoj adiciji (slika 36).²⁸



Slika 36. Shema Ullman-Goldbergove reakcije prikazana “klasičnim” mehanizmom (A) i HARC mehanizmom (B).²⁸

Oksidacijsko-adicijska Cu(III) vrsta nastaje HARC mehanizmom uz korištenje fotogeneriranog supersilinovalnog radikala s aril-bromidom i *N*-heretoarilom i bakrovom soli (slika 37).²⁸

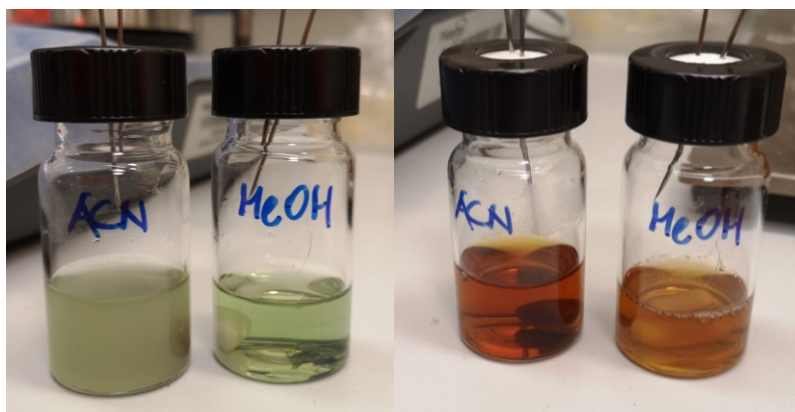


Slika 37. Mehanizam HARC Ullman-Goldbergove reakcije.²⁸

[Ir(dFCF3ppy)₂(5,5-dCF3bpy)](PF₆) se ekscitira vidljivom svjetlošću te iridij prelazi u pobuđeni *Ir(III), koji sudjeluje u prijenosu jednog elektrona sa supersilanolata, kojeg je deprotonirao 1,1,3,3-tetrametilgvanidin (TMG). Na supersilanolatnom radikalu dolazi do Brookove pregradnje u nukleofilni sililni radikal koji odvlači atom broma s 2-brom-5-(trifluormetil)piridina. Nastaju silil-bromid i arilni radikal, kojeg veže Cu(II)-amido kompleks

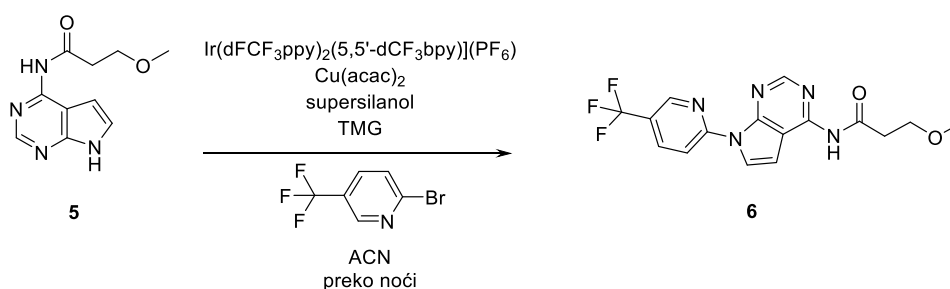
(spoja **5** i bakrovog(II) acetilacetonata) pri čemu nastaje Cu(III) kompleks iz kojeg reduktivnom eliminacijom nastaje *N*-arilni produkt (produkt **6**) i Cu(I)-amido kompleks. Kisik iz zraka regenerira aktivni fotokatalizator i Cu(II)-amido vrstu.

U ovom radu provedena je fotoredoks reakcija u dva različita otapala: acetonitrilu i smjesi acetonitrila i metanola (slika 38).



Slika 38. Vijale s reakcijskim smjesama u acetonitrilu (ACN) i smjesi acetonitrila i metanola (MeOH) prije (lijevo) i nakon (desno) provedenog fotoredoksa preko noći.

U smjesi acetonitrila i metanola dobivena je reakcijska smjesa neurednog profila te je ostalo neizreagirano spoja **5**. U acetonitrilu nije zaostalo neizreagirano spoja **5** i dobiveno je više produkta **6**. Za daljnju obradu, reakcijske smjese su spojene te je dobiven spoj **6** iskorištenja 38,7 % (slika 39).



Slika 39. Priprava spoja **6** iz produkta **5** fotoredoks reakcijom.

Fotoredoks reakcija rezultirala je nastankom jednog produkta u većem iskorištenju, nego u slučaju Ullmanove reakcije opisane u poglavlju 4.3.4, gdje su dobivena tri produkta dosta nižih iskorištenja (osim kod spoja **7**).

§ 5. ZAKLJUČAK

FYN kinaza je prepoznata kao prikladna meta za antitumorske lijekove te lijekove za neurodegenerativne bolesti, no do sada nisu poznati selektivni inhibitori FYN kinaze.

U sklopu ovog rada dizajniran je derivat azaindola kao mogućeg inhibitora FYN kinaze te je sintetiziran klasičnim metodama organske sinteze. U prvim koracima sinteze na komercijalno dostupni 4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin uvedene su SEM zaštitna skupina (produkt **1b** i produkt **2**) i amino skupina nukleofilnom aromatskom supstitucijom koristeći DMB amin (produkt **1a** i produkt **2**). Potom je uspješno pripremljen amid na azaindolu (produkt **3**) uz korištenje 3-metoksipropanoil-klorida. Uklanjanjem SEM i DMB zaštitnih skupina (produkt **4/5**) dobiven je prekursor za Ullmanovu reakciju. U nastavku je provedena Ullmanova reakcija s 2-brom-5-(trifluormetil)piridinom, pri čemu su dobivena tri produkta relativno niskih iskorištenja ($\eta(\mathbf{6}) = 1,82 \%$, $\eta(\mathbf{7}) = 46,4 \%$ i $\eta(\mathbf{8}) = 2,02 \%$). Za usporedbu, provedena je reakcija u fotoredoks uvjetima u dva sustava otapala, od kojih se čisti acetonitril pokazao boljim izborom od smjese acetonitrila i metanola. U konačnici fotoredoks reakcija rezultirala je jednim produktom u boljem iskorištenju nego klasično provedena Ullmanova reakcija ($\eta(\mathbf{6}) = 38,7 \%$).

Molekulsko uklapanje spojeva sintetiziranih u sklopu ovog rada ukazalo je na moguće dobro vezanje u kinaznu domenu FYN kinaze (PDB 2dq7) u usporedbi s vezanjem ATP-a i nešto slabije nego vezanje staurosporina. *In-silico* su predviđena svojstva koja zadovoljavaju farmakološke kriterije izražene kroz „pravilo o 5“ te potencijalno inhibitorno djelovanje na kinaze.

U daljnjem istraživanju potrebno je testirati pripravljene spojeve *in vitro* kako bi se eksperimentalno utvrdilo njihovo djelovanje kao inhibitora kinaza te selektivnost prema FYN kinazi. Također, potrebno je eksperimentalno utvrditi zadovoljavaju li njihova svojstva farmakološke kriterije.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACN – acetonitril (engl. *acetonitrile*)

ADME – apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje (engl. *absorption, distribution, metabolism, and excretion*)

ALK – kinaza anaplastičnog limfoma (engl. *anaplastic lymphoma kinase*)

APP – amiloidni prekursor protein (engl. *amyloid precursor protein*)

ATP – adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

A β – β -amiloid (engl. *β -amyloid*)

CBP – Csk-vezujući protein (engl. *c- SRC kinase (Csk)-binding protein*)

COSY – ¹H-¹H korelacijska spektroskopija (engl. *¹H-¹H Correlation Spectroscopy*)

CSK – c-SRC kinaza (engl. *c- SRC kinase*)

CYP – citokrom P450 (engl. *cytochrome P450*)

DCM – diklormetan (engl. *dichloromethane*)

DFG motiv – aspartat-fenilalanin-glicin

DIPEA – *N*-etil-*N*, *N*-diizopropilamin (engl. *N, N-diisopropylethylamine*)

DMB – dimetoksibenzil (engl. *dimethoxybenzyl*)

DMF – *N*, *N*-dimetil-formamid (engl. *dimethylformamide*)

DMSO – dimetil-sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)

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

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

ESI – elektroraspršenje (engl. *electrospray ionization*)

ET – prijenos elektrona (engl. *electron transfer*)

FAK – kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*)

FDA – Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

FGFR1 – receptor 1 faktora rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor receptor 1*)

HARC – apstrakcija halogena - vezanje radikala (engl. *halogen abstraction - radical capture*)

HAT – prijenos vodikovih atoma (engl. *hydrogen atom transfer*)

ISC – međusistemska prijelaz (engl. *intersystem crossing*)

LED – svjetleća dioda (engl. *light-emitting diode*)

MAPK – protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

- MDR – višestruka rezistencija (engl. *multidrug resistance*)
- MeOH – metanol (engl. *methanol*)
- mGluR5 – metabotropični glutamatni receptor (engl. *the metabotropic glutamate receptor*)
- MLCT – prijenos naboja metal-ligand (engl. *metal-to ligand charge-transfer*)
- NFT – neurofibrilarni čvorovi/zapetljaji (engl. *neurofibrillary tangles*)
- NF- κ B – nuklearni faktor κ B (engl. *nuclear factor κ B*)
- NMP – *N*-metil-2-pirolidon (engl. *N-methyl-2-pyrrolidone*)
- NMR – spektroskopija nuklearne magnetske rezonance (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*)
- NRF2 – faktor 2 povezan s nuklearnim faktorom E2 (engl. *nuclear factor E2-related factor 2*)
- PAG – fosfo-proteinom povezanom s lipidnim splavovima (engl. *phospho-protein-associated with glycosphingolipid-enriched domains*)
- PBD – proteinska baza podataka (engl. *Protein Data Bank*)
- PDGFR α – receptor α za faktor rasta porijeklom iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor receptor α*)
- PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)
- PKC δ – protein kinaza C- δ (engl. *protein kinase C- δ*)
- PP1 – 4-amino-5-(metilfenil)-7-(*t*-butil)pirazolo-(3,4-d)pirimidin (engl. *4-amino-5-(methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo-(3,4-d)pyrimidine*)
- PP2 – 4-amino-5-(klorfenil)-7-(*t*-butil)pirazolo-(3,4-d)pirimidin (engl. *4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo(3,4-d)pyrimidine*)
- PrPc – stanični prionski protein (engl. *cellular prion protein*)
- PSD – post-sinaptička gustoća (engl. *post-synaptic density*)
- SEM – 2-(trimetoksisilil)etoksimetil (engl. *2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl*)
- SET – prijenos jednog elektrona (engl. *single electron transfer*)
- SH2 – SRC homologija 2 (engl. *SRC Homology 2*)
- SH3 – SRC homologija 3 (engl. *SRC Homology 3*)
- TBAF – tetra-*n*-butilamonijev klorid (engl. *tetra-n-butylammonium fluoride*)
- TFA – trifluoroctena kiselina (engl. *trifluoroacetic acid*)
- THF – tetrahidrofuran (engl. *tetrahydrofuran*)
- TLC – tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*)
- TMG – 1,1,3,3-tetrametilgvanidin (engl. *1,1,3,3-tetramethylguanidine*)

TMS – tetrametilsilan (engl. *tetramethylsilane*)

TRK – kinaza receptora tropomiozina (engl. *tropomyosin receptor kinase*)

UPLC-MS – tekućinska kromatografija ultravisoke razlučivosti sa spektrometrom masa (engl. *Ultra-high performance liquid chromatography Mass Spectrometry*)

UV – ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

VEGFR2 – receptor 2 vaskularnog epidermalnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor receptor 2*)

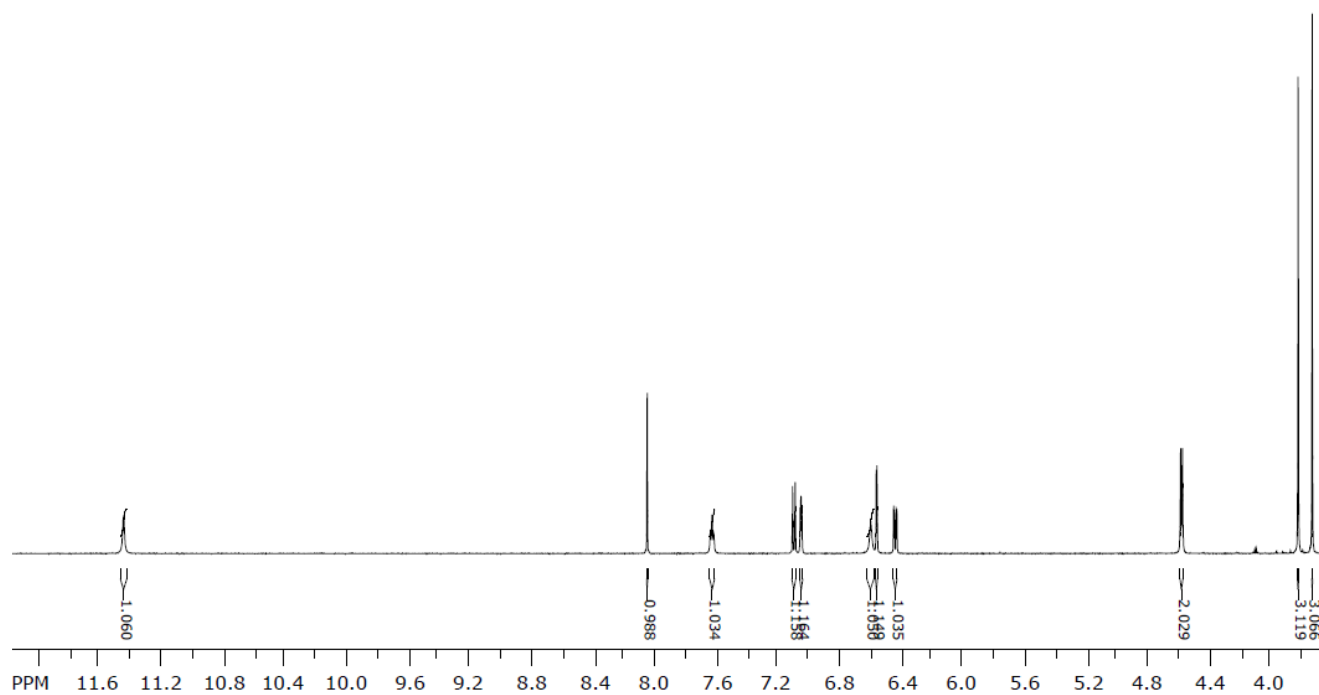
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. F. Ardito, M. Giuliani, D. Perrone, G. Troiano, L. Lo Muzio, *Int. J. Mol. Med.* **40** (2017) 271–280.
2. D. Fabbro, S.W. Cowan-Jacob, H. Moebitz, *Br. J. Pharmacol.* **172** (2015) 2675–2700.
3. S. Ōmura, Y. Asami, A. Crump, *J. Antibiot.* **71** (2018) 688–701.
4. L. Cipak, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022) 3560.
5. J.-Y. Mérour, B. Joseph, *Curr. Org. Chem.* **5** (2001) 471–506.
6. H.B. Nygaard, C.H. Van Dyck, S.M. Strittmatter, *Alzheimers Res. Ther.* **6** (2014) 8.
7. E. Beneduce, A. Matte, L. De Falco, S. Mbiandjeu, D. Chiabrando, E. Tolosano, E. Federti, S. Petrillo, N. Mohandas, A. Siciliano, W. Babu, V. Menon, S. Ghaffari, A. Iolascon, L. De Franceschi, *Am. J. Hematol.* **94** (2019) 10–20.
8. G. Marotta, F. Basagni, M. Rosini, A. Minarini, *Curr. Med. Chem.* **29** (2021) 4738–4755.
9. C. Matrone, F. Petrillo, R. Nasso, G. Ferretti, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 4444.
10. S. Dincer, K.T. Cetin, A. Onay-Besikci, S. Ölgen, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **28** (2013) 1080–1087.
11. P. Negi, R.S. Cheke, V.M. Patil, *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* **22** (2021).
12. J. Rivera-Torres, E.S. José, *Front. Pharmacol.* **10** (2019).
13. V. Yadav, M.F. Dennin, *Mol. Carcinog.* **50** (2011) 346–352.
14. F. Musumeci, C. Brullo, G. Grossi, L. Botta, P. Calandro, M. Chiariello, M. Kissova, E. Crespan, G. Maga, S. Schenone, *Eur. J. Med. Chem.* **127** (2017) 369–378.
15. S. Martellucci, L. Clementi, S. Sabetta, V. Mattei, L. Botta, A. Angelucci, *Cancers* **12** (2020).
16. M. M. Ge, Y.Q. Zhou, X.B. Tian, A. Manyande, Y. Tian, D. Ye, H. Yang, *Biomed. Pharmacother.* **125** (2020).
17. Z. J. Gerbec, M. S. Thakar, S. Malarkannan, *Front. Immunol.* **6** (2015).
18. S. F. Peng, Y. Fu, *J. Transl. Med.* **21** (2023).
19. R. Roskoski, *Pharmacol Res* **103** (2016) 26–48.

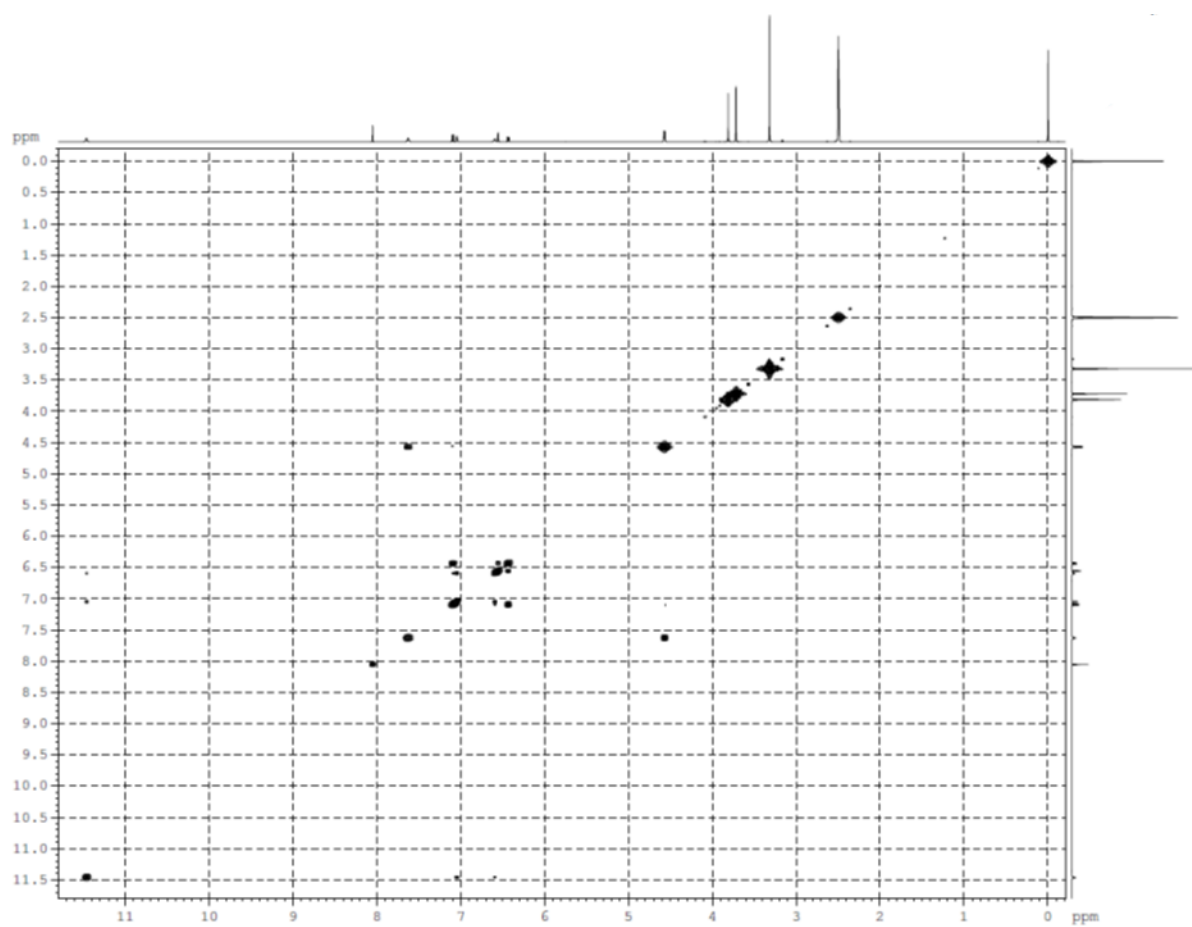
20. <https://www.cas.org/es-es/resources/cas-insights/rise-covalent-inhibitors-strategic-therapeutic-design> (datum pristupa 2. rujna 2024.)
21. F. Musumeci, M. Sanna, G. Grossi, C. Brullo, A. L. Fallacara, S. Schenone, *Curr. Med. Chem.* **24** (2017) 2059-2085.
22. J.Y. Mérour, F. Buron, K. Plé, P. Bonnet, S. Routier. *Molecules* **19** (2014) 19935–19979.
23. D.R. Motati, R. Amaradhi, T. Ganesh, *Bioorg. Med. Chem.* **28** (2020).
24. T. Irie, M. Sawa, *Chem. Pharm. Bull.* **66** (2018) 29–36.
25. C. Sambigiagio, S.P. Marsden, A.J. Blacker, P.C. McGowan, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 3525–3550.
26. M. H. Shaw, J. Twilton, D. W. C. MacMillan, *J. Org. Chem.* **81** (2016) 6898–6926.
27. A.Y. Chan, I.B. Perry, N.B. Bissonnette, B. F. Buksh, G. A. Edwards, L. I. Frye, O. L. Garry, M. N. Lavagnino, B. X. Li, Y. Liang, E. Mao, A. Millet, J. V. Oakley, N. L. Reed, H. A. Sakai, C. P. Seath, D. W. C. MacMillan, *Chem. Rev.* **122** (2022) 1485–1542.
28. M.N. Lavagnino, T. Liang, D.W.C. Macmillan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117** (2020) 21058-21064.
29. <https://www.createeducation.com/resource/photochemistry-research-apparatus-project-the-photoredox-box/> (datum pristupa 10. kolovoza 2024.)
30. B. Bertoša, A. Hloušek-Kasun, N. Mrnjavac, *Molekulska modeliranje biomolekula*, Prirodoslovno-matematički fakultet, interna skripta, Zagreb, 2020.
31. <https://innophore.com/technology/> (datum pristupa 14. listopada 2024.)
32. M. van Kempen, S.S. Kim, C. Tumescheit, M. Mirdita, J. Lee, C. L. M. Gilchrist, J. Söding, M. Steinegger, *Nat. Biotechnol.* **42** (2024) 243–246.
33. T. Kinoshita, M. Matsubara, H. Ishiguro, K. Okita, T. Tada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346** (2006) 840–844.
34. Z. Zhang, S. Yang, Z. Li, Y. Wu, J. Tang, M. Feng, S. Chen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **107** (2023) 5701–5714.
35. S. J. Teague, A. M. Davis, P. D. Leeson, T. Oprea, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 975–1014.
36. M. M. Hann, T. I. Oprea, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8** (2004) 255–263.

37. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46** (2001) 3-26.
38. <https://molinspiration.com/> (datum pristupa 15. kolovoza 2024.)
39. A. Jordan, S. Bedford, K. Burkhard, I. Yulf, K. Poullennec, *PYRROLOPYRIMIDINE COMPOUNDS*, WO 2009/037467 A1, 2009.
40. SEM Protection Mechanism (SEM-Cl + Strong Base)
http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/SEM_Protection/SEM_Protection_Strong_Base_Mech.htm (datum pristupa 1. rujna 2024.)
41. T. A. Wynn, B. L. Hodous, P. A. Boriack-Sjodin, E. A. Sickmier, J. E. J. Mills, A. S. Tasker, R. A. Copeland, *METTL3 MODULATORS*, WO 2021/081211 A1, 2021.
42. J.F. Blake, D. Dai, J. Haas, Y. Jiang, G. R. Lakowski, E. A. McFaddin, M. L. McKenney, A. T. Metcalf, D. A. Moreno, B. Prigaro, G. A. Ramann, L. Ren, *SUBSTITUTED PYRROLO[2,3-D]PYRIMIDINES COMPOUNDS AS RET KINASE INHIBITORS*, WO 2019/143977 A1, 2019.
43. L.G. ml. Wade. *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2017.
44. M. Ichikawa, A. Yokomizo, M. Itoh, N. Haginoya, K. Sugita, H. Usui, K. Terayama, A. Kanda, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 5207–5224.
45. H.S. Choi, Z. Wang, W. Richmond, X. He, K. Yang, T. Jiang, D. Karanewsky, X. J. Gu, V. Zhou, Y. Liu, J. Che, C. C. Lee, J. Caldwell, T. Kanazawa, I. Umemura, N. Matsuura, O. Ohmori, T. Honda, N. Gray, Y. He, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 2689–2692.
46. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/ullmann-reaction.shtml> (datum pristupa 10. srpnja 2024.)

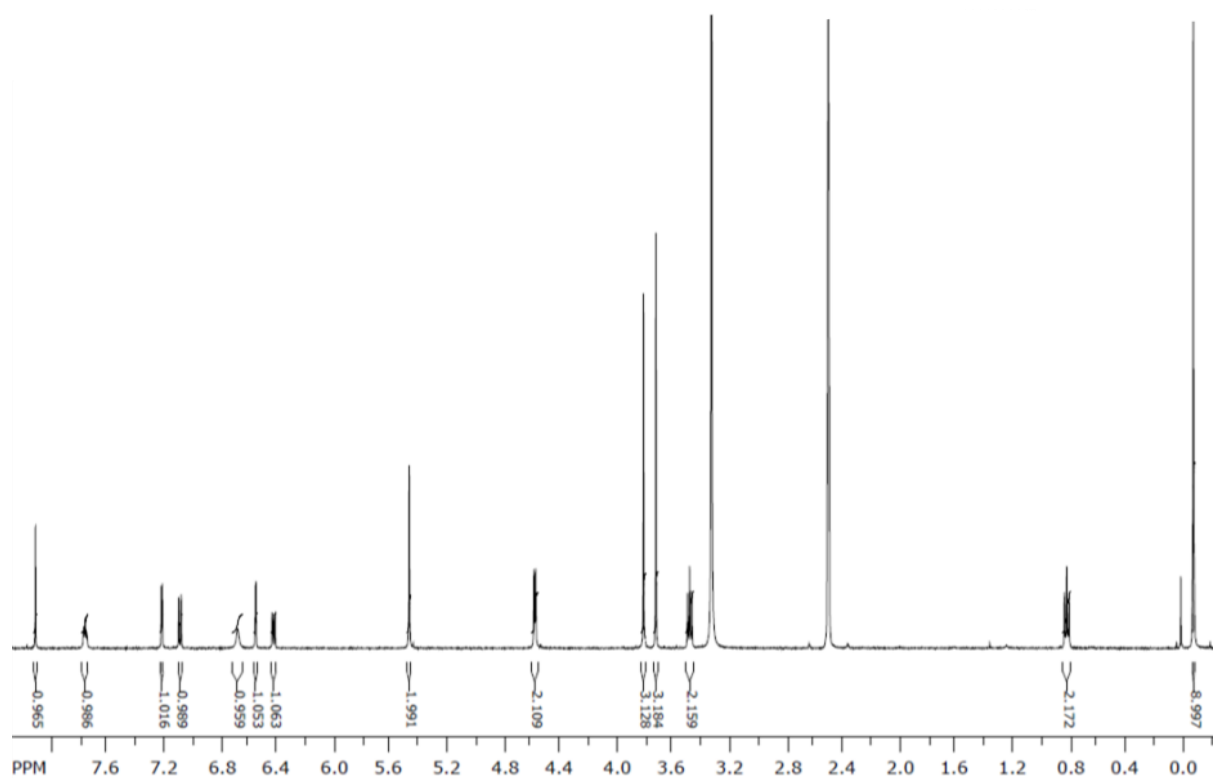
§ 8. DODATAK



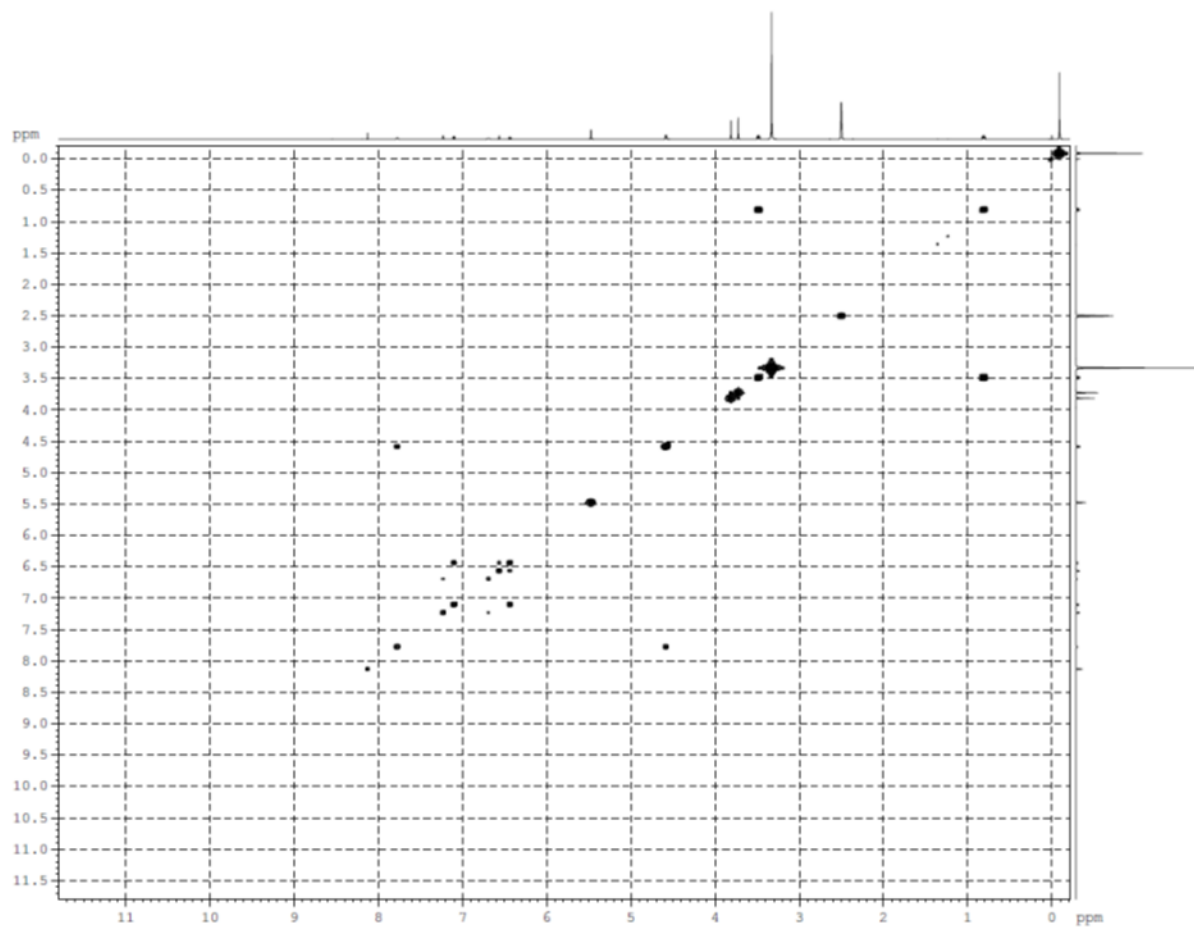
Slika D1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) spektar *N*-(2,4-dimetoksibenzil)-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (**1a**).



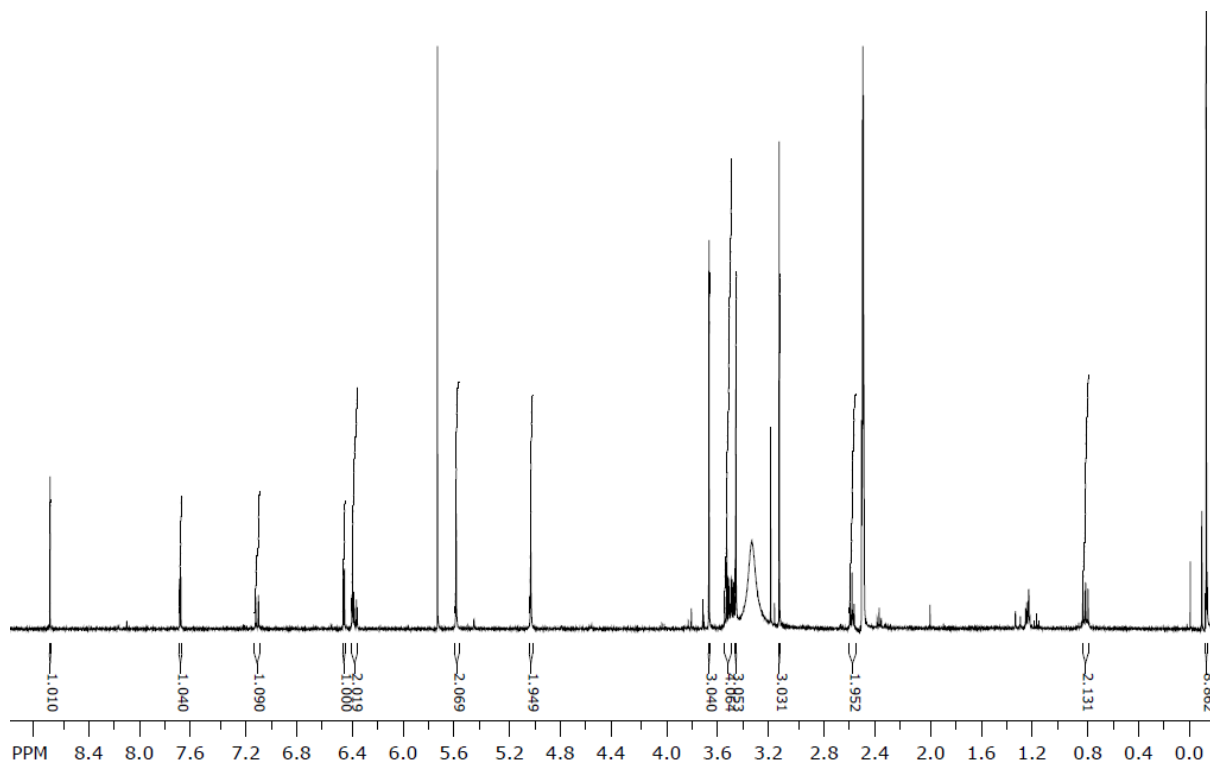
Slika D2. ^1H - ^1H COSY (400 MHz, DMSO- d_6) spektar *N*-(2,4-dimetoksibenzil)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (**1a**).



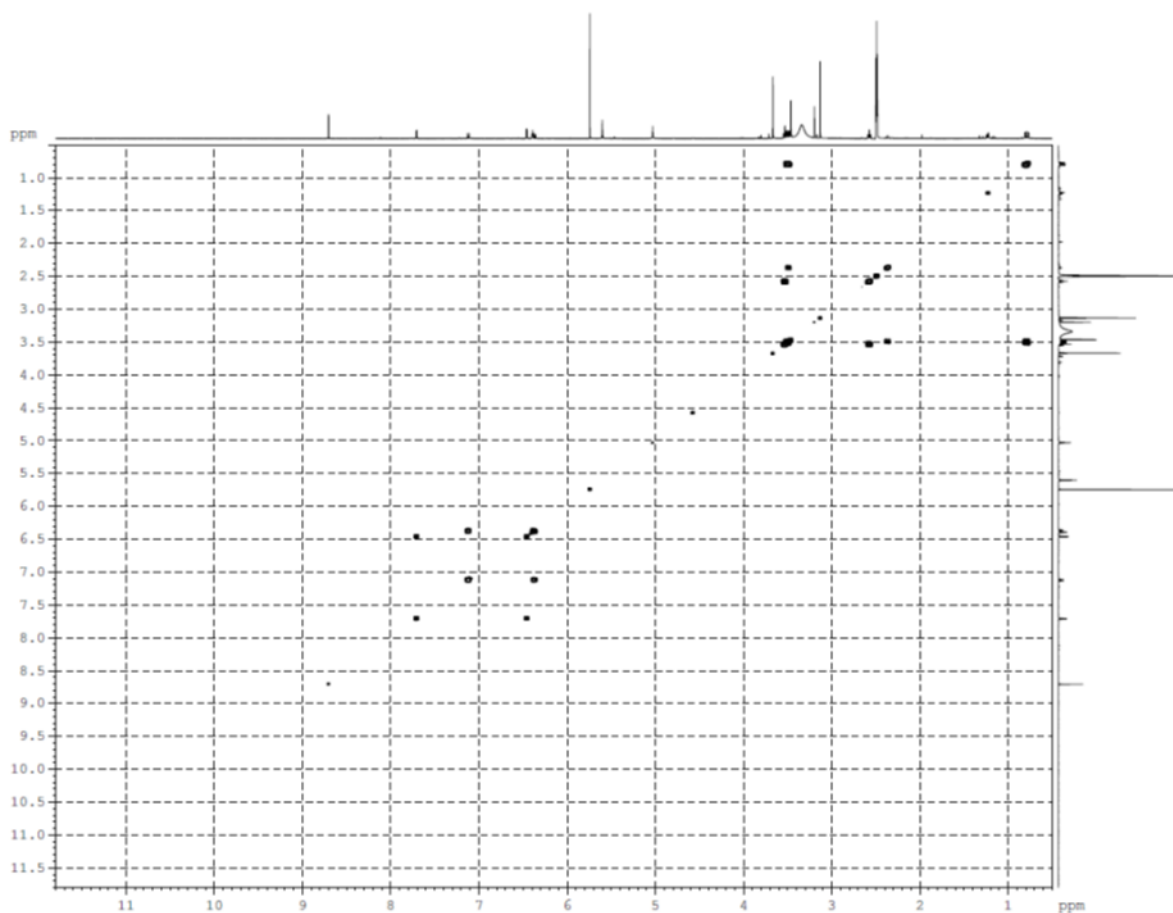
Slika D3. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) spektar *N*-(2,4-dimetoksibenzil)-7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7*H*-piolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (**2**).



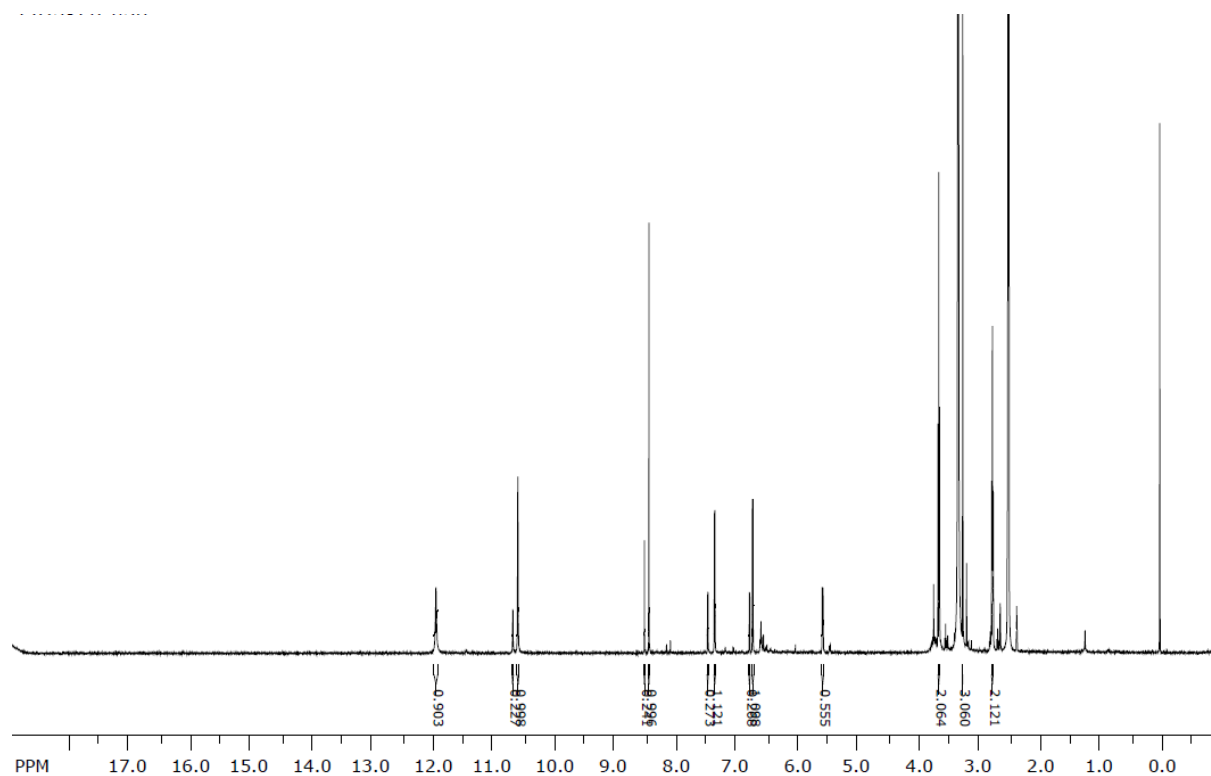
Slika D4. ^1H - ^1H COSY (500 MHz, DMSO- d_6) spektar *N*-(2,4-dimetoksibenzil)-7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (**2**).



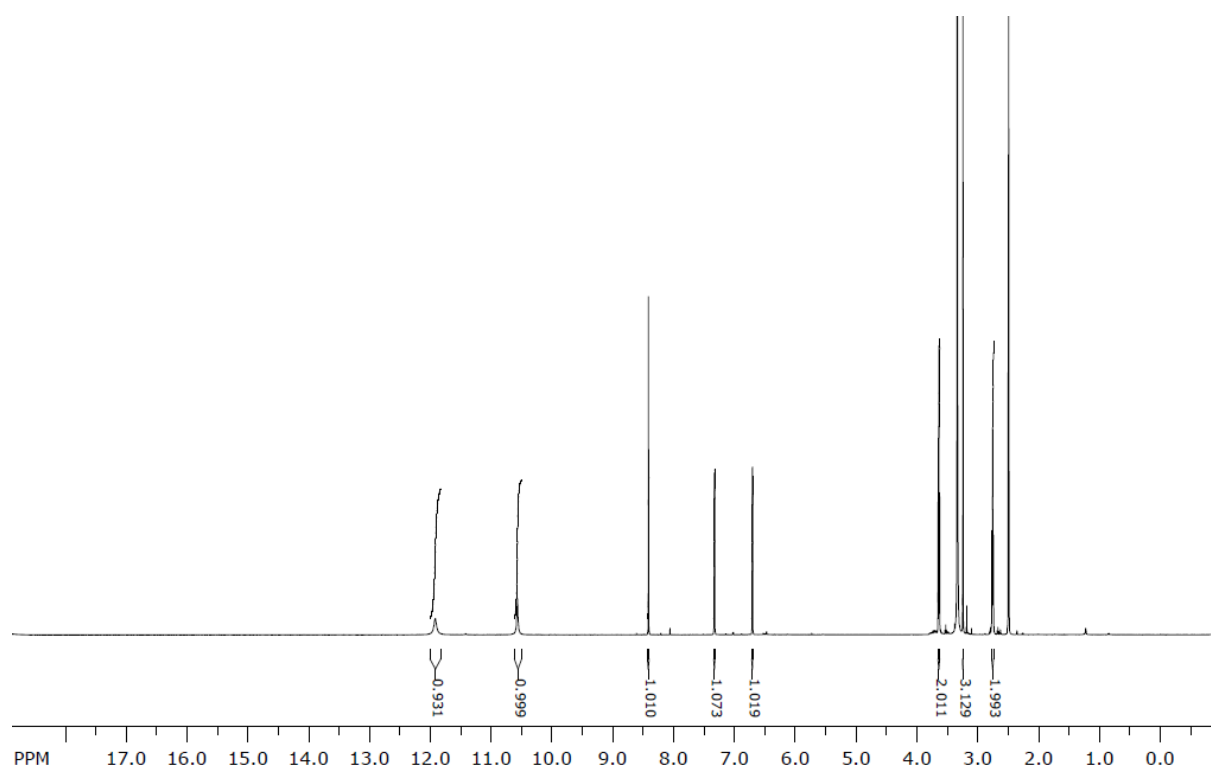
Slika D5. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) spektar *N*-(2,4-dimetoksibenzil)-3-metoksi-*N*-(7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamida (**3**).



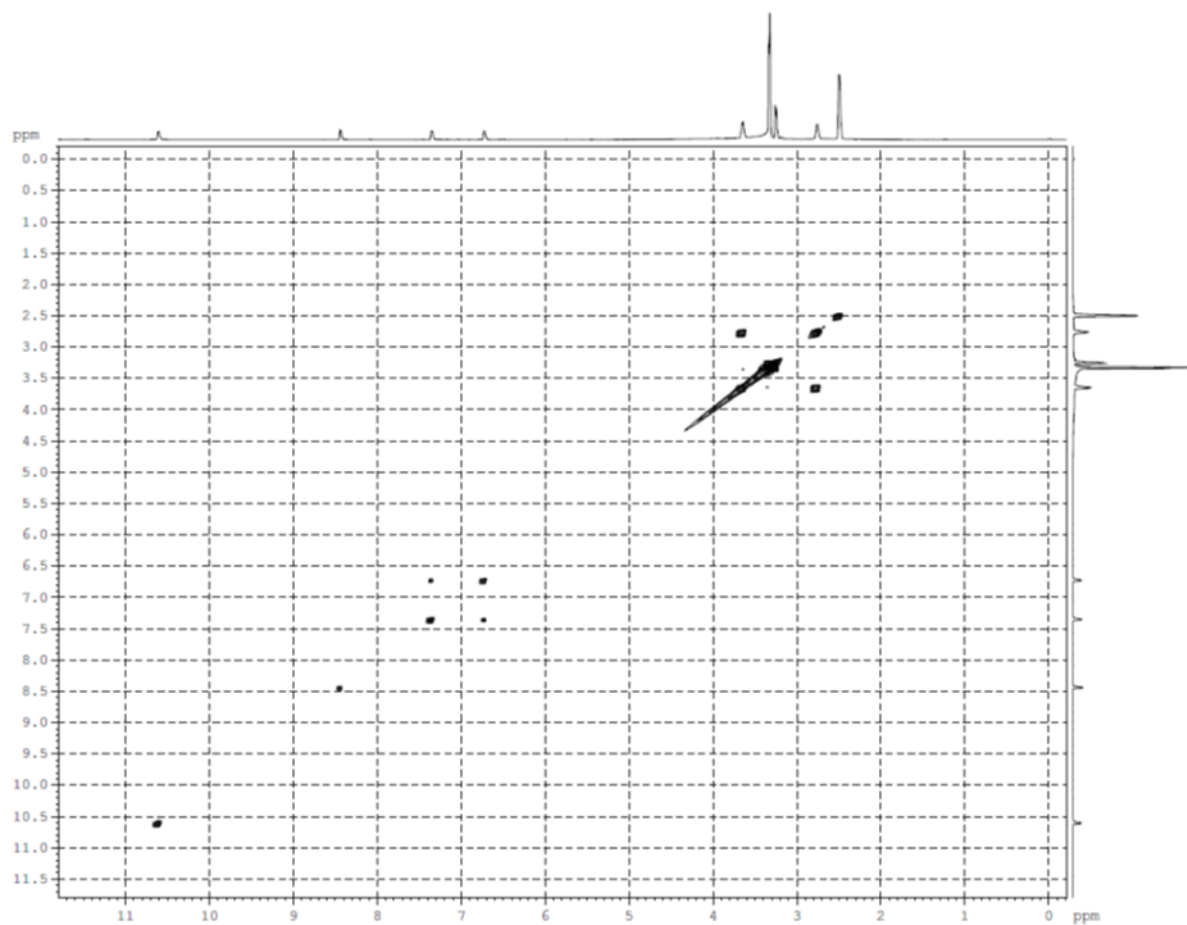
Slika D6. ^1H - ^1H COSY (400 MHz, DMSO-d_6) spektar N -(2,4-dimetoksibenzil)-3-metoksi- N -(7-((2-(trimetilsilil)etoksi)metil)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)propanamida (**3**).



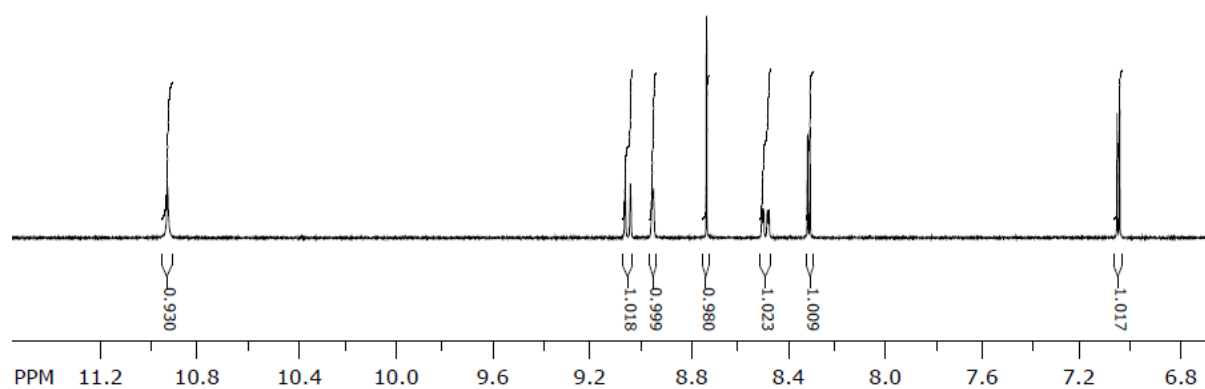
Slika D7. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) spektar *N*-[7-(hidroksimetil)-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-3-metoksipropanamida (**4**) i 3-metoksi-*N*-(7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidin-4-il)propanamida (**5**).



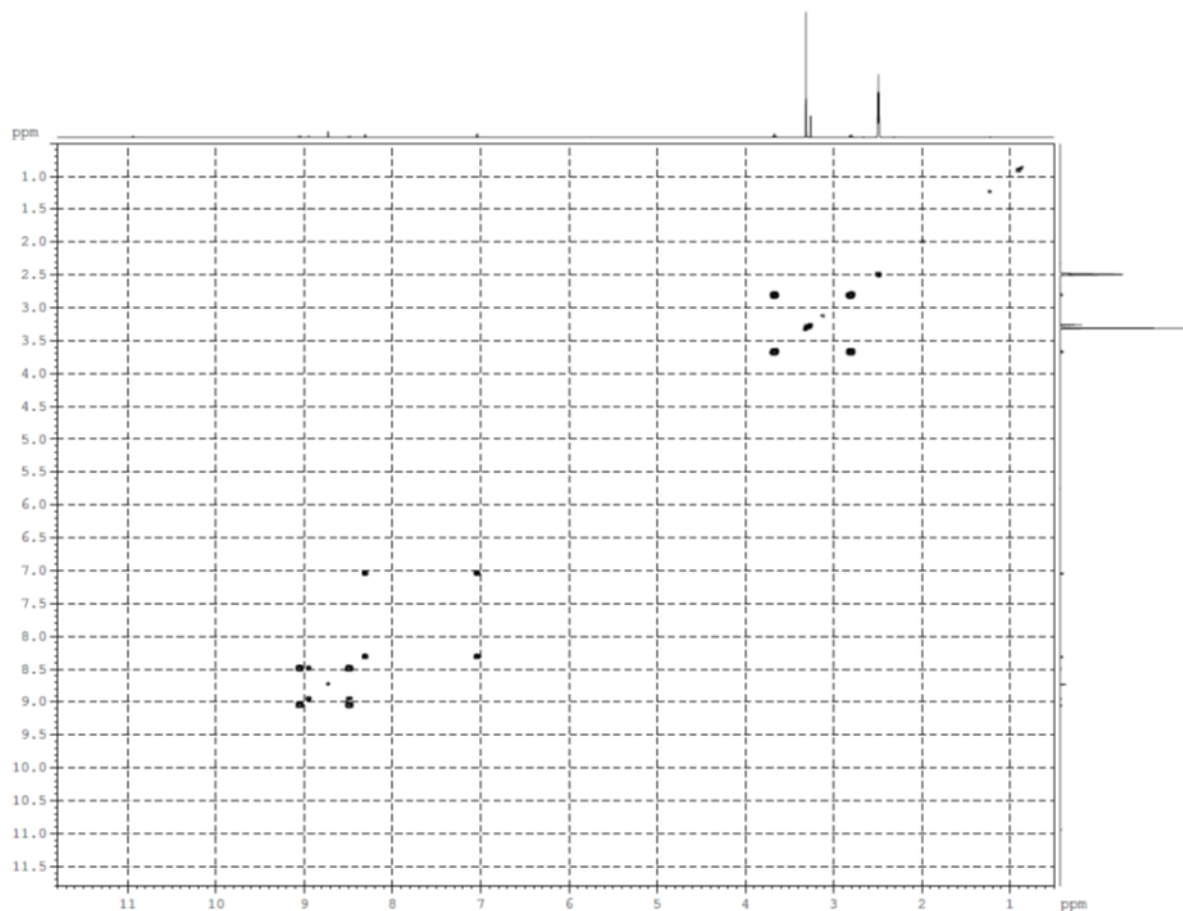
Slika D8. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) spektar 3-metoksi-*N*-(7*H*-piolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamida (**5**).



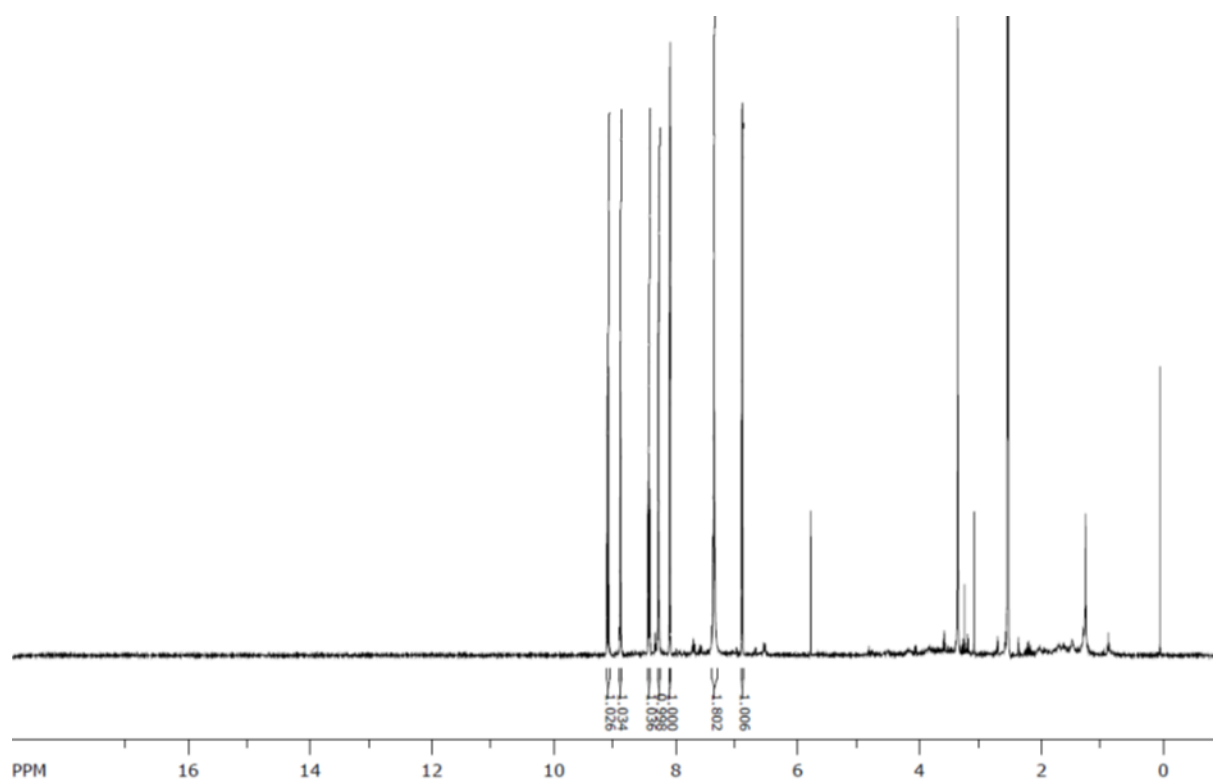
Slika D9. ^1H - ^1H COSY (400 MHz, DMSO- d_6) spektar 3-metoksi-*N*-(7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamida (**5**).



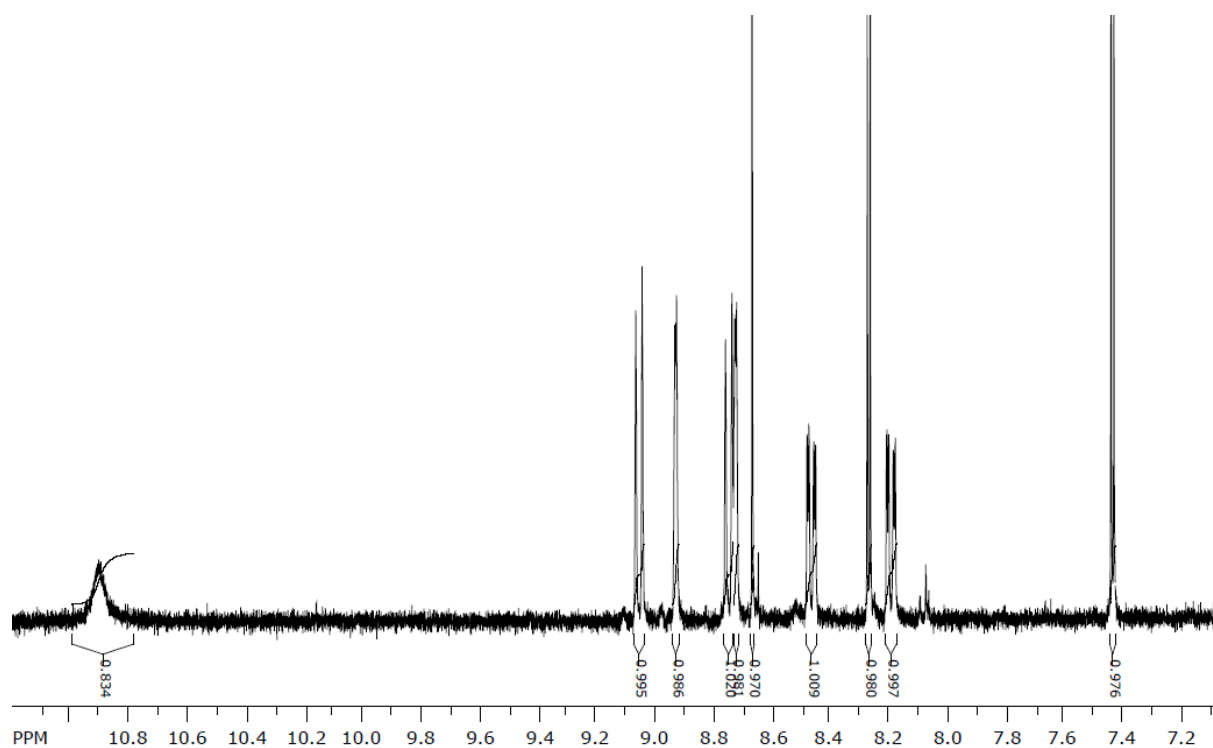
Slika D10. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) spektar 3-metoksi-*N*-(7-(5-(trifluormetil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamida (**6**).



Slika D11. ^1H - ^1H COSY (400 MHz, DMSO- d_6) spektar 3-metoksi-*N*-(7-(5-(trifluormetil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)propanamida (**6**).



Slika D12. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) spektar 7-(5-(trifluormetil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (**7**).



Slika D13. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) spektar *N*, 7-bis(5-(trifluormetil)piridin-2-il)-7*H*-pirolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (**8**).

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Helena Križan

Datum rođenja: 26.5.2000.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

- | | |
|-----------|--|
| 2007–2015 | Osnovna škola Antun Branka Šimića, Zagreb |
| 2015–2019 | V. gimnazija, Zagreb |
| 2019–2022 | Preddiplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb |
| 2022–2024 | Diplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, smjer: istraživački, grane: biokemija i organska kemija |
| 2023–2024 | Rad u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković kod dr. sc. Mihaele Matovina |
| 2024 | Rad u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu kod dr. sc. Beate Halassy |
| 2024 | CEEPUS Free Mover mobilnost, Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, Graz |

Nagrade i priznanja

- | | |
|------|---|
| 2024 | Rektorova nagrada za individualni znanstveni i umjetnički rad |
|------|---|

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- | | |
|------|------------------|
| 2022 | Women in science |
|------|------------------|