

# Asimetrična alilna dearomatizacija u sintezi potencijalnih kinaznih inhibitora

---

Radošević, Ela

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:796237>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Ela Radošević

# **Asimetrična alilna dearomatizacija u sintezi potencijalnih kinaznih inhibitora**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2020. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Fidelta d.o.o. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sanje Koštrun i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Martine Petrović-Hunjadi. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc Ines Primožič.

## Zahvale

*Na prvome mjestu velika hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Sanji Koštrun na mentorstvu, savjetima, uloženom trudu i vremenu prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Neposrednoj voditeljici dr. sc. Martini Petrović-Hunjadi neizmjereno hvala na trudu i strpljenju kojim mi je na samom početku objašnjavala sve nejasnoće, pokazivala tehnike i metode. Neizmjereno hvala na svim savjetima, brojim idejama, objašnjenjima i promišljanjima o samim metodama i sintetskim postupcima koji su pridonijeli izradi ovog diplomskog rada.*

*Nadalje, želim se zahvaliti Fidelti što su mi omogućili izradu eksperimentalnog djela ovog diplomskog rada, kao i kolegicama iz laboratorija 0.207 na podršci i ugodnoj atmosferi tokom izrade samoga rada.*

*Želim se zahvaliti i prof. dr. sc Ines Primožič na uloženoj trudu i vremenu prilikom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Mojim roditeljima, bratu i Ivanu najveća hvala na podršci, razumijevanju i motivaciji kroz sve ove godine. Hvala vam što ste uvijek uz mene.*

*Također, želim se zahvaliti svojim prijateljima, Antoniji, Nini, Paoli, Viktoriji, Nikolini i Mariu na podršci i svim zajedničkim trenutcima koji su ovo putovanje učinili zabavnijim, ugodnijim i sretnijim.*

# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Tirozin kinaze.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Biokemijski mehanizam kinaza .....</i>	2
2.1.2. <i>c-SRC-kinaza .....</i>	3
2.1.3. <i>Tirozin kinaza kao meta za istraživanje lijekova .....</i>	12
2.1.4. <i>Inhibitori protein kinaza i rezistencija na inhibitore.....</i>	13
2.1.4.1. <i>Nekovalentni inhibitori .....</i>	14
2.1.4.2. <i>Kovalentni inhibitori.....</i>	16
2.1.4.3. <i>Inhibitori SRC-kinaze.....</i>	17
2.1.4.4. <i>Nedostaci kinaznih inhibitora: selektivnost i rezistencija.....</i>	18
2.1.5. <i>Uvođenje sp<sup>3</sup> karaktera.....</i>	18
<b>2.2. Reakcije dearomatizacije .....</b>	<b>22</b>
2.2.1. <i>Katalitička asimetrična reakcija dearomatizacije indola.....</i>	22
2.2.2. <i>Iridijem katalizirana asimetrična alilna dearomatizacija indola.....</i>	26
2.2.3. <i>N-arilfosforamiditni ligand i Ir katalizator .....</i>	30
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Materijali i metode.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. Opis korištenih UPLC-MS/UV metoda i kiralni HPLC metoda .....</b>	<b>33</b>
3.2.1. <i>UPLC-MS/UV High pH (2 min).....</i>	34
3.2.2. <i>UPLC-MS/UV Low pH (2 min).....</i>	34
3.2.3. <i>UPLC-MS/UV High pH (8 min).....</i>	35
3.2.4. <i>UPLC-MS/UV Low pH (8 min).....</i>	36
3.2.5. <i>Kiralni HPLC.....</i>	36
<b>3.3. Računalne metode.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4. Priprava N-benzil-6-brom-4-vinil-1,3,4,9-tetrahidro-β-karbolina.....</b>	<b>38</b>
3.4.1. <i>Priprava 5-brom-1H-indol-3-karbaldehida (1).....</i>	38
3.4.2. <i>Priprava N-benzil-5-brom-1H-indol-3-metanamina (2) .....</i>	38

3.4.3. Priprava <i>N</i> -benzil-5-brom- <i>N</i> -(metil-but-2-en-oksikarbonil)-1 <i>H</i> -indol-3-metanamina (3)	39
3.4.4. Priprava <i>N</i> -benzil-5-brom- <i>N</i> -(4-hidroksi-but-2-enil)-1 <i>H</i> -indol-3-metanamina (4)	40
3.4.5. Priprava <i>N</i> -benzil-5-brom- <i>N</i> -[4-(metoksikarboniloksi)-but-2-enil]-1 <i>H</i> -indol-3-metanamina (5)	41
3.4.6. Priprava <i>N</i> -benzil-6-brom-4-vinil-1,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -karbolina (6)	42
<b>3.5. Priprava analoga Ponatiniba</b>	<b>43</b>
3.5.1. Priprava 3-[(trimetilsilil)etnil]imidazo[1,2- <i>b</i> ]piridazina (7)	43
3.5.2. Priprava 3-etnilimidazo[1,2- <i>b</i> ]piridazina (8)	43
3.5.3. Priprava <i>N</i> -benzil-6-(2-imidazo[1,2- <i>b</i> ]piridazin-3-il-etnil)-4-vinil-1,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -karbolina (9)	44
<b>3.6. Priprava analoga PP2</b>	<b>45</b>
3.6.1. Priprava <i>N</i> -benzil-6-brom-9-[(2-(trimetilsilil)etoksi)metil]-4-vinil-1,3,4-trihidro- $\beta$ -karbolina (10)	45
3.6.2. Priprava 7-(benzensulfonil)-5-jod-4-klor-5 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (11)	46
3.6.3. Priprava 7-(benzensulfonil)-5-fenil-4-klor-5 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (12)	46
3.6.4. Priprava 5-fenil-4-klor-5 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (13)	47
3.6.5. Priprava <i>N</i> -benzil-6-(5-fenil-4-klor-pirolo[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-7-il)-9-[(2-(trimetilsilil)etoksi)metil]-4-vinil-1,3,4-trihidro- $\beta$ -karbolina	48
3.6.6. Priprava 4-amin-5-fenil-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (14)	49
3.6.7. Pokušaj priprave 7-[ <i>N</i> -benzil-9-((2-trimetilsilil)etoksi)metil]-4-vinil-1,3,4-trihidro- $\beta$ -karbolin-6-il]-5-fenil-pirolo[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-4-amina (16)	49
<b>3.7. Priprava fosforamiditnog liganda</b>	<b>50</b>
3.7.1. Pregradnja – priprava <i>N</i> -benzhidrilanilina	50
3.7.2. Aktivacija <i>N</i> -benzhidrilanilina	51
3.7.3. Aktivacija binola	52
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Dizajn ciljnih molekula na strukturnim osnovama</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Retrosintetska analiza ciljnih molekula</b>	<b>62</b>
4.2.1. Retrosintetska analiza analoga ponatiniba	62
4.2.2. Retrosintetska analiza analoga PP2	62
4.2.3. Retrosintetska analiza fragmenta bogatog $sp^3$ hibridiziranim C-atomima	64
<b>4.3. Priprema fosforamiditnog liganda</b>	<b>66</b>
<b>4.4. Priprava fragmenta bogatog <math>sp^3</math> hibridiziranim C-atomima</b>	<b>69</b>
<b>4.5. Sinteza analoga Ponatiniba</b>	<b>71</b>
<b>4.6. Sinteza analoga PP2</b>	<b>72</b>

§ 5. ZAKLJUČAK .....	77
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI) .....	79
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	82
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS .....	XXI



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### Asimetrična alilna dearomatizacija u sintezi potencijalnih kinaznih inhibitora

Ela Radošević

SRC-kinaze su enzimi koji su uključeni u regulaciju mnogobrojnih staničnih funkcija, od rasta, diobe, metabolizma, pa do apoptoze stanica. U sklopu ovog diplomskog rada provedena je analiza literaturno dostupnih kristalnih struktura kompleksa poznatih inhibitora sa SRC-kinazom. Proučavanjem njihovih interakcija unutar aktivnog mjesta, metodom molekuskog uklapanja dizajnirani su njihovi analozi koji sadrže fragment bogat  $sp^3$  hibridiziranim ugljikovim atomima. Za sintezu su odabrani spojevi koji su imali najbolje rezultate u molekularnom uklapanju te je za njih provedena retrosintetska analiza. Nadalje, provedena je višestupanjska sinteza spoja *N*-benzil-6-brom-4-vinil-1,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -karbolina temeljena na reakciji asimetrične alilne dearomatizacije katalizirane iridijem. Zatim su sintetizirani fragmenti ponatiniba i PP2 liganda te je 3-etinilimidazo[1,2-*b*]piridazinski fragment ponatiniba uspješno povezan s  $sp^3$  bogatim fragmentom, dok sinteza analoga jednog od najaktivnijih inhibitora SRC kinaza, PP2 liganda, nije bila uspješna.

(84 stranice, 66 slika, 4 tablice, 41 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: CADA reakcija, kinazni inhibitori, racionalni dizajn, SRC-kinaza

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sanja Koštrun, v. zn. sur.  
Neposredni voditelj: dr. sc. Martina Petrović-Hunjadi  
Nastavnik: prof. dr. sc. Ines Primožič

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. prof. dr. sc. Željka Soldin

Zamjena: doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Datum diplomskog ispita: 27. studenoga 2020.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### Asymmetric allylic dearomatization reaction in potential kinase inhibitor synthesis

Ela Radošević

SRC-kinases are enzymes that are involved in many cellular functions, from cell growth, division and metabolism to cell apoptosis. In this diploma thesis analysis of literally available crystal structures of SRC-kinase with different inhibitors was performed. By studying interactions between active site and known inhibitors, by means of molecular docking method, new analogues that contain a fragment rich in  $sp^3$  hybridized carbon atoms were designed. Compounds with the best docking scores were chosen for the synthesis and the retrosynthetic analysis of selected compounds was successfully done. Furthermore, in this diploma thesis *N*-benzyl-6-bromo-4-vinyl-1,3,4,9-tetrahydro- $\beta$ -carboline was prepared in five steps relaying on iridium catalyzed asymmetric allyl dearomatization. Hinge binder fragments of ponatinib and PP2 ligand were synthesized and 3-ethynylimidazo[1,2-*b*]pyridazine fragment was successfully coupled to  $sp^3$  rich fragment. Synthesis of the PP2 analogue, one of the most active SRC-kinase inhibitors, was not successful.

(84 pages, 66 figures, 4 tables, 41 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: CADA synthesis, kinase inhibitors, SRC kinase, rational design

Mentor: Dr. Sanja Koštrun, Senior Research Associate

Assistant mentor: Dr. Martina Petrović-Hunjadi

Supervisor: Dr. Ines Primožič, Professor

Reviewers:

1. Dr. Ines Primožič, Professor
2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
3. Dr. Željka Soldin, Professor

Substitute: Dr. Ivan Kodrin, Assistant Professor

Date of exam: November 27, 2020

## § 1. UVOD

Protein kinaze su vrlo važna skupina enzima koji reguliraju većinu staničnih procesa poput metabolizma, transkripcije, rasta, diobe i apoptoze ili smrti stanice. Povećana aktivnost protein kinaza dovodi do poremećaja stanične proliferacije te je povezana s razvojem tumora. Budući da je reguliranje rada protein kinaza bitno za liječenje tumora, proteklih 20-ak godina protein kinaze su postale vrlo popularna biološka meta u istraživanju novih lijekova. Intenzivna istraživanja farmaceutske industrije te akademske zajednice rezultirala su velikim brojem inhibitora različitih kinaza od kojih je 30-tak odobreno za liječenje uglavnom onkoloških oboljenja. Općenito, prilikom istraživanja i razvoja kinaznih inhibitora, uz aktivnost i selektivnost bitno je da novi spojevi imaju dobra farmakokinetička svojstva te da su netoksični. Kod razvoja kinaznih inhibitora bitna je i otpornost na razvoj rezistencije.

Inhibitori kinaza uglavnom su planarni poli-aromatični spojevi koji se natječu sa ATP-om za vezno mjesto. U ljudskom kinomu ima 8 kinaznih grupa s više od 500 kinaza zbog čega je veliki izazov postići selektivnost.

Svrha ovog rada je dizajnirati i sintetizirati analoge poznatih inhibitora SRC-kinaza bogate  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima korištenjem asimetrične iridijem katalizirane reakcije dearomatizacije te ih povezati s tzv. „*hinge binder*“ fragmentima poznatih inhibitora SRC-kinaze, ponatiniba te PP2 liganda. „*Hinge binder*“ fragmenti su fragmenti koji ostvaruju interakcije s *hinge* regijom SRC-kinaze.

Na temelju analize dostupnih X-ray struktura SRC-kinaza i njihovih inhibitora dizajnirani su novi analozi s povećanim udjelom  $sp^3$  hibridiziranih ugljikovih atoma. Interakcije predloženih analoga unutar aktivnog mjesta SRC-kinaze istražene su metodom molekuskog uklapanja. Za dizajnirane analoge predložen je sintetski put koji se može podijeliti u dva dijela. Prvi dio sinteze odnosi se na pripremu fragmenata bogatih  $sp^3$  hibridiziranim atomima ugljika korištenjem iridijem-katalizirane asimetrične alilne dearomatizacije. Drugi dio sinteze odnosi se na povezivanje tih fragmenata s fragmentima koji ostvaruju interakcije s *hinge* regijom poznatih inhibitora SRC-kinaze poput Ponatiniba i 4-amino-5-(4-klorfenil)-7-(*tert*-butil)pirazolo[3,4-d]pirimidina (PP2 ligand).

## § 2. LITERATURNI PREGLED

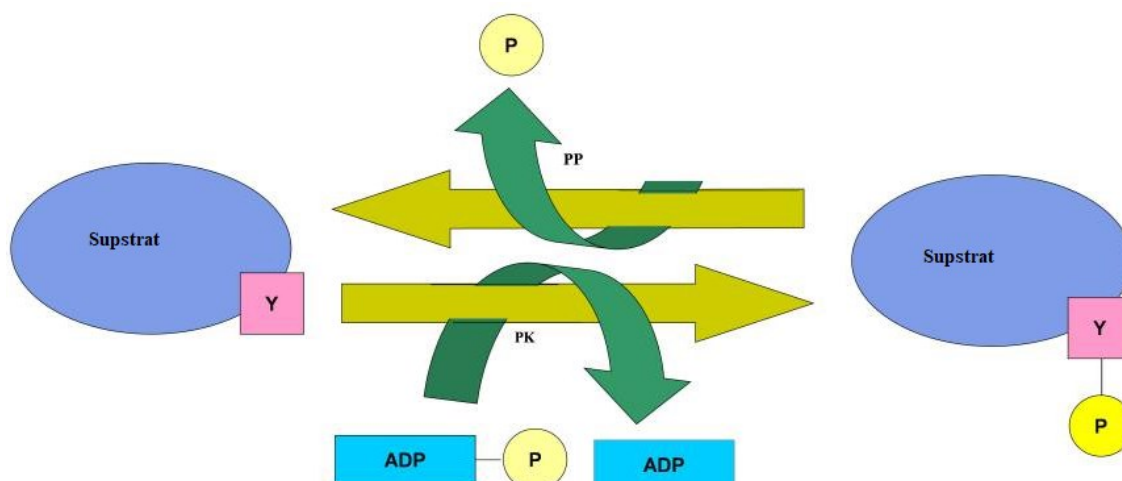
### 2.1. Tirozin kinaze

Tirozin kinaze su enzimi koji sudjeluju u regulaciji gotovo svih staničnih procesa poput metabolizma, transkripcije, rasta, diobe i apoptoze ili smrti stanice.<sup>2</sup> U stanicama je aktivnost tirozin kinaza strogo regulirana, a nepravilnosti u njihovom radu dovode do poremećaja stanične proliferacije i razvoja tumora. Inhibicija tirozin kinaza koristi se u liječenju tumora.<sup>2</sup> U ljudskom kinomu pronađeno je više od 90 tirozin-kinaza, od čega je 58 receptorskih, a 30 ne-receptorskih.<sup>3</sup> Receptorske kinaze su transmembranski receptori s kinaznom aktivnošću, a ne-receptorske kinaze su unutarstanični, citoplazmatski proteini.

#### 2.1.1. Biokemijski mehanizam kinaza

Protein kinaze su enzimi koji kataliziraju reakciju fosforilacije u kojoj dolazi do prijenosa  $\gamma$ -fosfata iz ATP-a na hidroksilnu skupinu supstrata poput proteina, šećera ili lipida. Za fosforilaciju, uz ATP, potreban je i dvovalentni kation, najčešće  $Mg^{2+}$ .(ref1) Fosforilacija proteina je najraširenija post-translacijska modifikacija u prijenosu signala. Nakon fosforilacije dolazi do promjene konformacije proteina što mijenja njegovu ulogu u stanici. Fosforilacija je reverzibilna te nakon nekog vremena, uz djelovanje enzima fosfataze, enzim se vraća u prvotno stanje.

Kinaze se mogu podijeliti prema tome fosforiliraju li serinsku, treoninsku ili tirozinsku hidroksilnu skupinu na proteinu supstratu. Na slici 1 shematski je prikazana fosforilacija bočnog ogranka tirozina.



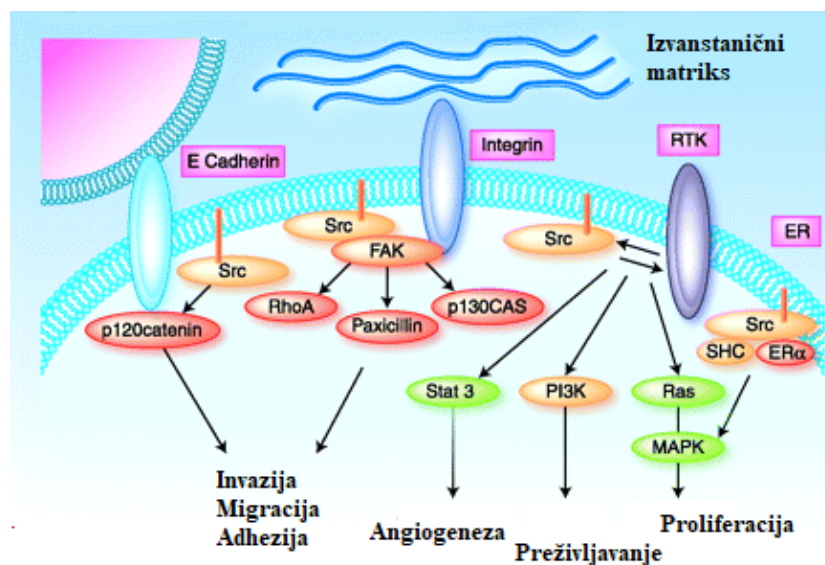
Slika 1. Shematski prikaz reakcije fosforilacija bočnog ogranka tirozina (Y) katalizirane protein kinazom (PK), odnosno defosforilacija protein fosfatazom (PP)

Preuzeto i prilagođeno prema ref 2

### 2.1.2. c-SRC-kinaza

Kinaza c-SRC (dalje u tekstu SRC) pripada skupini ne-receptorskih protein kinaza koja se često skraćeno naziva SFK (eng. *SRC Family Kinase*). Unutar te skupine nalaze se kinaze sa značajnom homologijom aminokiselinskog slijeda : Fyn, Yes, Yrk, Blk, Fgr, Hck, Lck, Lyn te enzimi iz Frk pod-obitelji – Frk/Rak i Iyk/Bsk.<sup>4</sup>

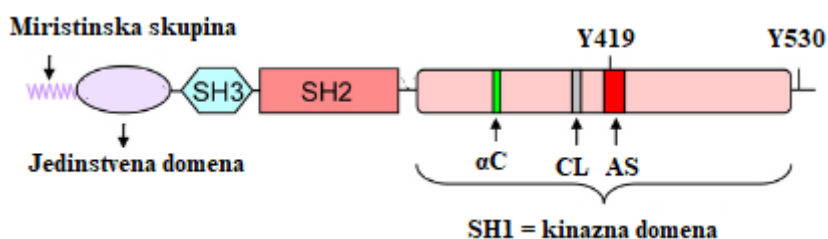
Kinaze iz SRC skupine pojavljuju se u gotovo svim stanicama kralježnjaka te sudjeluju u procesima vezanim za dijeljenje stanice. Uključene su i u rad živčanog sustava, imuni odgovor te reorganizaciju citoskeleta.<sup>1</sup> Uloga SRC-kinaza u staničnoj signalizaciji je poprilično složena (slika 2). SRC-kinaze su kontrolirane G-protein združenim receptorima (GPCR), antigen i Fc združenim receptorima, te steroidnim hormonskim receptorima. Ova skupina kinaza sudjeluje u staničnoj migraciji stupajući u interakciju s integrinima, ekadherinima, te FAK kinazom. SRC-kinaze imaju značajnu ulogu u nastanku raka dojke, prostate i pluća. Poznato je da se aktivacijom SRC-kinaza aktiviraju i signalni putevi poput RAS / RAF / MEK / ERK, put PI3K / AKT / mTOR, i STAT3 puta koji regulira ekspresiju c-Myc i ciklina D1. Pod utjecajem egzogenih ili endogenih kancerogenih čimbenika, kinaza postaje hiperaktivirana čime stanična proliferacija i diferencijacija postaju nekontrolirane te dovode do razvoja tumora.<sup>4,16</sup>



Slika 2 Unutarstanična funkcija SRC-kinaze

Preuzeto i prilagođeno prema ref 9

SRC-kinaza građena je od 536 aminokiselina koje su organizirane u nekoliko strukturnih jedinica. Na amino kraju nalazi se N-miristilglicin koji služi za sidrenje SRC-kinaze na membranu, a slijede ga jedinstvena domena, SH3 domena, SH2 domena, kinazna domena (SH1) te C-terminalni regulatorni segment (slika 3).<sup>1</sup>

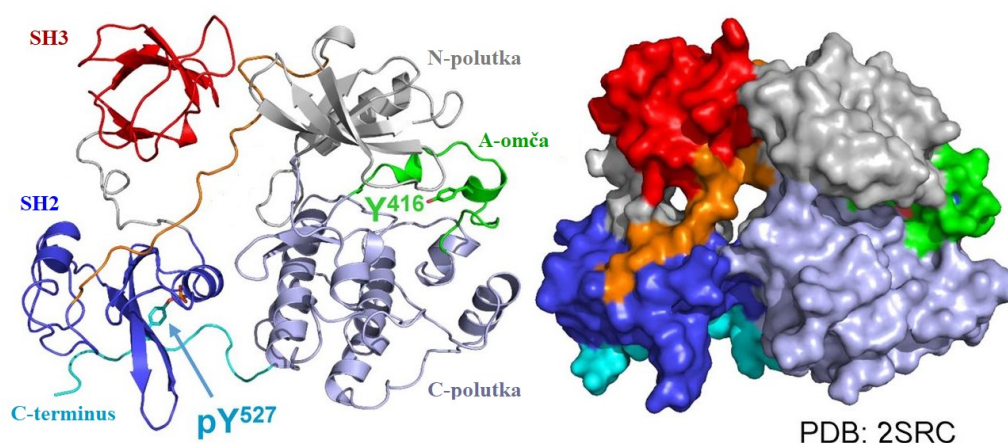


Slika 3 Organizacija SRC-kinaze. CL označava katalitičku omču (eng. Catalytic loop), AS označava aktivacijski segment (eng. Activation Segment)

Preuzeto i prilagođeno prema ref 1

SH3 domena sastoji se od oko 60 aminokiselina koje tvore  $\beta$ -bačvu koja se sastoji od pet antiparalelnih  $\beta$ -lanaca i dvije omče – RT i n-SRC omče. Te omče se nalaze na jednom od krajeva površine koja se sastoji od aromatskih i hidrofobnih bočnih ogranaka te zajedno čine mjesto za prepoznavanje prolinom bogatih PxxP motiva proteina-supstrata. Prolinom bogate PxxP sekvence mogu poprimiti konformaciju tip II poliprolinske zavojnice te one mogu stvarati interakcije s aromatskim bočnim ograncima SH3 domene. SH3 domena veže sekvence koje imaju lijeve zavojnice.

SH2 domena sastoji se od oko 100 aminokiselina koje tvore središnju trolančanu  $\beta$ -ploču koja sa svake strane ima po jednu  $\alpha$  zavojnicu ( $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ ). SH2 domena ima dva džepa za prepoznavanje: jedan koji koordinira fosfotirozin dok drugi koordinira jedan ili više hidrofobnih bočnih ogranaka koji se nalaze C-terminalno od fosfotirozina. Ljudska SH2 domena SRC-kinaze se intramolekulski veže na C-terminalni p-Tyr527<sup>a</sup> što rezultira inhibicijom protein kinazne aktivnosti. Aminokiselinski slijed C-terminalnog segmenta nije optimalan slijed kojeg SH2 podjedinica veže te kao posljedica toga, na mjesto intramolekulski vezanog p-Tyr527 može se vezati neki fosfoligand i aktivirati enzim. Tyr527 je jedno od najvažnijih regulatornih fosforilacijskih mjesta SRC-kinaze. U bazalnim uvjetima *in vivo*, 90 do 95% SRC-kinaza je fosforilirano na tom bočnom ogranaku, uglavnom intramolekulski vezanom za SH2 domenu.<sup>1</sup>

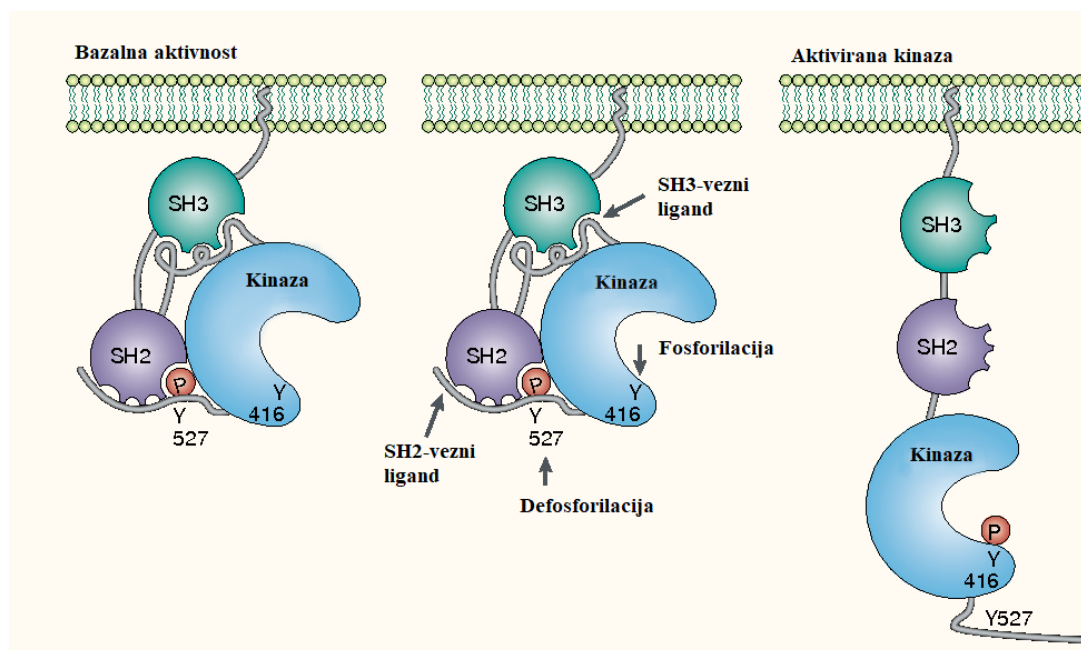


Slika 4. 3D struktura ljudske inaktivne SRC-kinaze, PDB ID: 2SRC

SH2 i SH3 domene imaju četiri važne funkcije. Prvo, ograničavaju aktivnost enzima putem intramolekulskih interakcija. Drugo, proteini koji sadrže SH2 i SH3 vezne partnere mogu intezreagirati s tim domenama i na taj način privući enzim na neku određenu staničnu lokaciju. Treće, pomicanjem tih domena dolazi do aktivacije enzima (slika 5), te posljednje, proteini koji sadrže SH2 i SH3 vezne partnere mogu biti supstrati za reakciju koja se odvija u kinaznoj domeni SRC-kinaze.<sup>1</sup>

---

<sup>a</sup> Kroz ovaj diplomski rad korišteno je obilježavanje za pileću SRC-kinazu. Kako bi se prešlo na obilježavanje za ljudsku SRC-kinazu potrebno je samo dodati 3 (Tyr527 pileći --> Tyr530 ljudski)

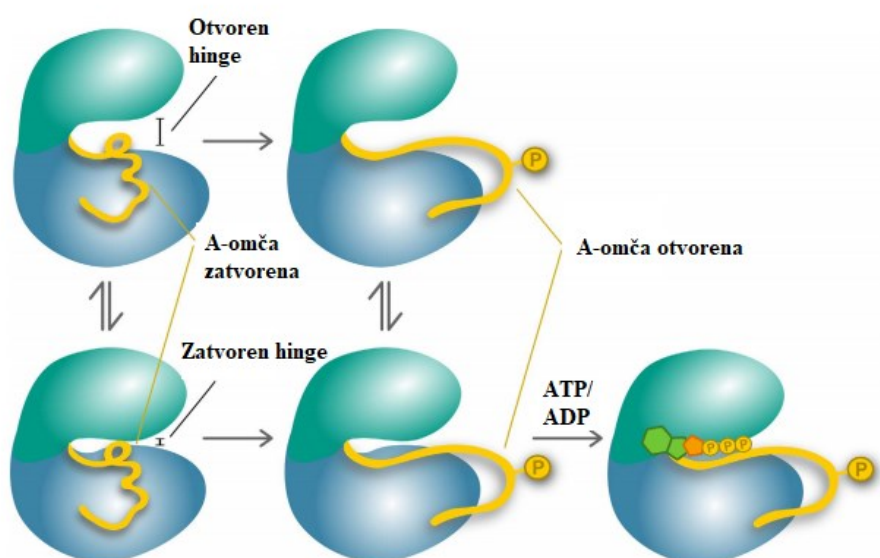


Slika 5. Aktivacija SRC kinaze

Preuzeto i prilagođeno prema ref 16.

Kinazna domena SRC-kinaze (ponekad se naziva i SH1 domena) sastoji se od dvije polutke. Mala polutka ili N-polutka gotovo svih protein kinaza sastoji se od peterolančane antiparalelne  $\beta$ -ploče ( $\beta 1$ - $\beta 5$ ) te regulatorne  $\alpha C$ -zavojnice. Velikom polutkom, odnosno C-polutkom dominiraju  $\alpha$ -zavojnice sa šest očuvanih segmenata ( $\alpha D$ - $\alpha I$ ) koje se pojavljuju u svim protein kinazama. Velika polutka sadrži još sedam kratkih  $\beta$  lanaca ( $\beta 6$ - $\beta 12$ ). Aktivno mjesto kinazne domene nalazi se u urezu između dvije polutke.

Postoje dvije glavne konformacijske promjene povezane sa svim protein kinazama, pa tako i sa SRC-kinazom. Jedna od njih uključuje promjenu iz inaktivne konformacije u katalitički aktivnu. Aktivacija često uključuje promjene u orijentaciji  $\alpha C$ -zavojnice u maloj polutci i aktivacijskog segmenta (A-omča) velike polutke.<sup>1</sup> Inaktivni enzim nalazi se u sporoj ravnoteži između konformacija u kojima je *hinge* regija otvorena odnosno zatvorena. Aktivacija (fosforilacija Tyr416) ne utječe na tu ravnotežu.<sup>10</sup> Otvorena konformacija enzima veže MgATP i protein supstrat, pri čemu prelazi u zatvorenu konformaciju tijekom katalitičkog procesa (slika 6).<sup>1</sup>



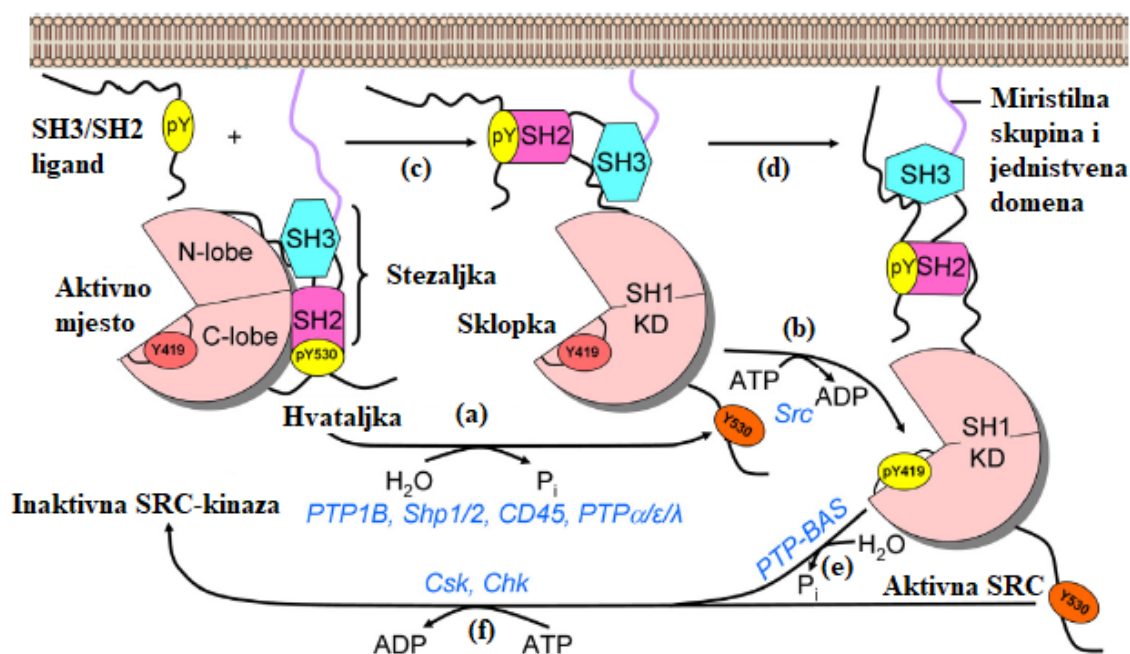
Slika 6 Konformacijske promjene u SRC-kinazi

Preuzeto i prilagođeno prema ref 10

Rana biokemijska istraživanja su ukazivala na to da SH2 i SH3 domene inhibiraju kinaznu aktivnost izravnim zagrađivanjem aktivnog mjesta. Proučavanjem 3D strukture SRC-kinaze pokazalo se da se te dvije domene nalaze iza aktivnog mjesta te da je SH2 domena koja se veže na inhibitorški pTyr527 udaljena 40 Å od aktivnog mjesta, odnosno inhibitorški efekti ovih domena su indirektni.<sup>1</sup>

Aktivnost SRC-kinaze regulirana je hvataljkom, stezaljkom i sklopkom (eng. *the latch, the clamp and the switch*; slika 7). SH2 domena se veže na pTyr527 na C-terminalnom repu i time stvara motiv hvataljke (eng. *latch*), koji stabilizira vezanje SH2 domene u velikoj polutci. SH3 domena ostvaruje interakcije s malom polutkom. Poveznica između SH2 i kinazne domene sadrži prolin na poziciji 246 koji je dio motiva koji se veže u SH3 domeni te na taj način povezuje SH3 domenu s malom polutkom kinazne domene. Poveznica nema standardnu PxxP sekvencu, ali bočni ogranci oko tog prolina tvore lijevu zavojnicu (poliprolin tip II).





Slika 7 Regulatorni aparat SRC-kinaze (eng. *The latch, the clamp and the switch*)

Preuzeto i prilagođeno prema ref 1

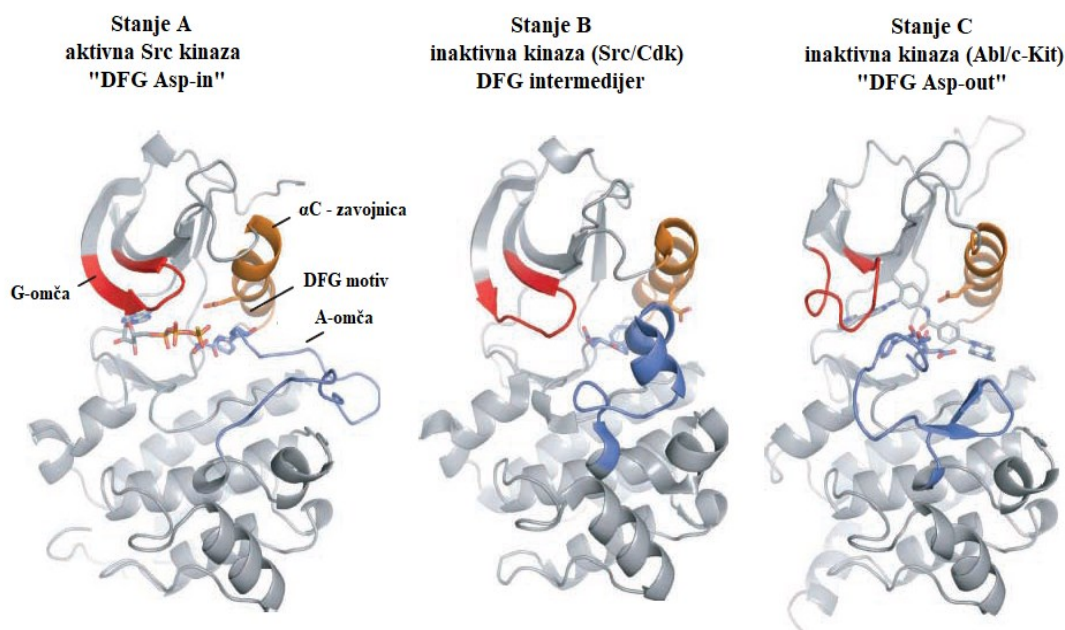
Motiv stezaljke (eng. *the clamp*) je skup SH2 i SH3 domena koji se nalazi iza kinazne domene i usklađeno djeluje. Kao rezultat pridruživanja SH2 i SH3 domene kinaznoj domeni,  $\alpha$ C zavojnica i Glu310 se izmiču i inaktiviraju enzim. U izmicanju sudjeluje i hidrofobna interakcija između Trp260 iz SH3 domene i Gln312  $\alpha$ C-zavojnice. Sklopka (eng. *the switch*) se odnosi na aktivacijsku omču kinazne domene. Još se naziva i A-omča (eng. *A-loop*) te promjena iz inaktivne u aktivnu konformaciju odvija se autofosforilacijom na Tyr416 koja je katalizirana partnerskom SRC molekulom. U fiziološkim uvjetima SRC-kinaza postoji u ravnoteži između stanja gdje je pTyr527 vezan i slobodan od SH2 domene, pri čemu je vezano stanje preferirano. Kada se pTyr527 izmakne iz fosfotirozinskog džepa SH2 domene dolazi do otvaranja i otpuštanja stezaljke koja zaključava katalitičku domenu u inaktivnoj konformaciji. Zatim se može odviti autofosforilacija na Tyr416 pomoću druge molekule SRC-kinaze.

Postoje četiri forme SRC-kinaze: nefosforilirana, Tyr527 fosforilirana, Tyr416 fosforilirana te Tyr527 i Tyr416 fosforilirana. SRC-kinaza fosforilirana na Tyr527 ne može biti autofosforilirana, prvo se mora defosforilirati. SRC-kinaza koja je autofosforilirana na Tyr416 može biti supstrat za reakciju fosforilacije na C-terminusu. Pokazano je da je dvostruko fosforilirana SRC-kinaza aktivna što pokazuje da aktivacija fosforilacijom na Tyr416 nadjačava

inhibitorski učinak fosforilacija na Tyr527.<sup>5</sup> Način na koji je SRC-kinaza građena dopušta regulaciju na nekoliko razina, intramolekulske interakcije održavaju inaktivno stanje, dok vanjske interakcije aktiviraju i stabiliziraju aktivnu konformaciju.

Za povratak u inaktivnu konformaciju fosfat aktivacijskog segmenta (pTyr416) defosforilira se pomoću PTB-BAS pri čemu intramolekularni SH2/SH3 vezni partneri mogu zamijeniti intermolekulske vezne partnere. Enzimi Csk (C-terminalna SRC-kinaza) i Chk (*Csk homology kinase*) kataliziraju fosforilaciju Tyr527, kako bi se mogla ponovno formirati hvataljka (eng. *the latch*). Oba enzima pripadaju obitelji SRC-kinaza, a razlikuju se po tome što im nedostaje N-terminalna miristinska skupina te fosforilacijsko mjesto na C-terminalnom regulatornom repu. Osim što inaktivira SRC katalitičkom fosforilacijom, Chk kinaza stvara nekovalentni inhibitorski kompleks sa SRC-kinazom, a može se i vezati na nefosforiliranu SRC-kinazu i spriječiti fosforilaciju aktivacijskog segmenta.<sup>1</sup>

Kinazna domena se sastoji od male amino-terminalne polutke te velike karboksil-terminalne polutke (eng. *small and large lobe*) povezane kratkim zglobovom (eng. *hinge region*) i između njih se nalazi urez koji služi kao vezno mjesto za molekulu ATP-a.<sup>1</sup>



*Slika 8 Kinazna domena SRC-kinaze/ konformacijske promjene unutar aktivnog mjesta SRC-kinaze*

*Preuzeto i prilagođeno prema ref 11*

Obje polutke mogu poprimiti cijeli niz raznih relativnih orijentacija otvarajući i zatvarajući aktivno mjesto enzima (slika 8). Mala polutka sadrži glicinom bogatu omču (G-omča, eng. *G-loop*; GQGCFG; u literaturi se još naziva i P-omča) koja može vezati fosfate ATP-a te je to najfleksibilniji dio male polutke koji se tijekom katalize preklapa preko adenina te pozicionira  $\gamma$ -fosfat ATP-a. Lanci  $\beta 1$  i  $\beta 2$  također interagiraju s adeninom iz ATP-a, ali i s malim inhibitorским molekulama. Lanac  $\beta 3$  u svojoj sekvenci sadrži bočni ogranak lizina (K295) koji sudjeluje u stvaranju solnog mosta s glutamatom iz  $\alpha C$ -zavojnice (E310). Stvaranje tog solnog mosta je preduvjet za stvaranje katalitički aktivnog veznog mjesta, a nastala konformacija naziva se i „ $\alpha C$ “ konformacija. Kada enzim nije aktivan ti bočni ogranci ne tvore solni most te se nalaze u takozvanoj „ $\alpha C-out$ “ konformaciji.<sup>1</sup>

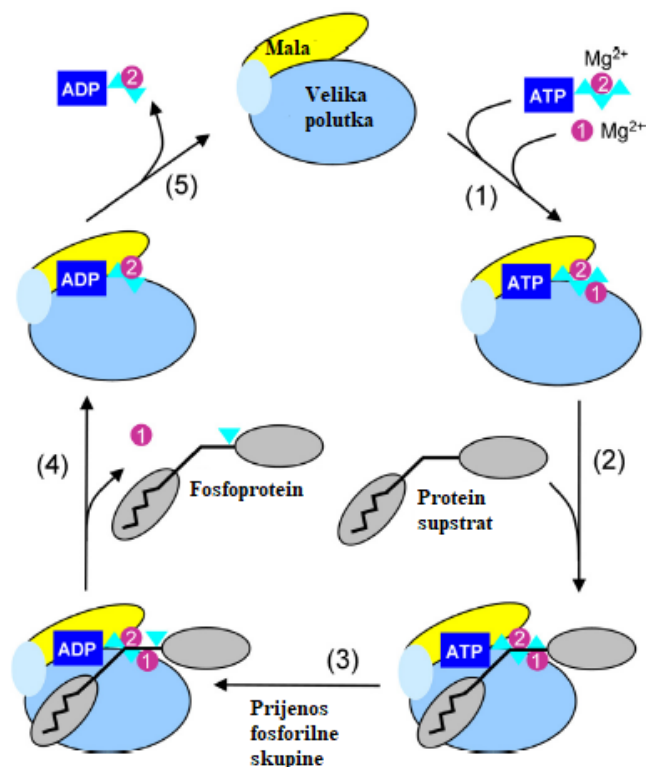
Velika polutka kinazne domene sadrži mobilni aktivacijski segment koji je izdužen kod aktivnog enzima, a skupljen kod inaktivnog enzima (slika 5). Prvi bočni ogranci koji tvore aktivacijski segment su aspartat, fenilalanin i glicin (DFG) i mogu biti u dvije različite konformacije. Kada se aspartat DFG motiva nalazi okrenut od aktivnog mjesta, segment poprima konformaciju „*DFG-out*“ te enzim nije aktivan. U aktivnom stanju aspartat se okreće prema ATP veznom mjestu, poprima „*DFG-in*“ konformaciju i tada može koordinirati  $Mg^{2+}$ . U ovom segmentu se nalazi i Tyr416 čija fosforilacija aktivira enzim, dok zadnjih osam aminokiselina u aktivacijskom segmentu služe za pozicioniranje proteina supstrata u aktivnome mjestu. Dvije hidrofobne interakcije dodatno stabiliziraju kinaznu domenu: interakcija između leucina (L308) iz  $\alpha C$ -zavojnice i izoleucina (I336) iz  $\beta 4$ -lanca stabiliziraju N-polutku, dok hidrofobna interakcija između leucina (L322) iz  $\alpha C$ - $\beta 4$ -omče i tirozina (Y376) s kraja  $\alpha E$ -zavojnice dodatno stabilizira interakcije između dvije polutke.<sup>1</sup> N-terminalno od *hinge* regije, duboko u ATP veznom džepu, nalazi se bitna aminokiselina koja se naziva „*gatekeeper*“. Ona regulira ulazak u stražnji džep kinaze. Kod SRC-kinaze taj bočni ogranak je Thr341. Upravo kod te aminokiseline dolazi do mutacija i razvoja rezistencije.<sup>6</sup>

U inaktivnoj SRC-kinazi, bočni ogranci aktivacijskog segmenta formiraju dvije kratke  $\alpha$ -zavojnice ( $\alpha AL1$  i  $\alpha AL2$ ) koje onemogućavaju nastajanje solnog mosta između Glu310 i Lys295 izmicanjem  $\alpha C$ -zavojnice te Tyr416 čine nedostupnim za reakciju. U aktivaciji SRC-kinaze sudjeluju razne elektrostatske interakcije. Kada je SRC-kinaza inaktivna, Glu310 stvara solni most s Arg409 (iz aktivacijskog segmenta) te Lys 295 stvara solni most s Asp404. Također, amino skupina Asn391 ostvaruje vodikovu vezu s s karboksilnom skupinom Asp386. Aktivacijom enzima dolazi do stvaranja solnog mosta Glu310-Lys295,  $\alpha C$ -zavojnica poprima

„ $\alpha$ C-in“ konformaciju, amino-skupina Asn391 ostvaruje vodikovu vezu s Asp404 te nakon što je Tyr416 fosforiliran, fosfat formira solni most s Arg385 katalitičke omče i Arg409 aktivacijskog segmenta. Poznavanje aktivnih i neaktivnih konformacija enzima može biti izuzetno korisno u dizajnu lijekova, a činjenica da kinaze poprimaju cijeli niz različitih neaktivnih konformacija omogućava dizajn selektivnijih i djelotvornijih lijekova, pogotovo ako se uzme u obzir činjenica da kinaze u fiziološkim uvjetima poprimaju manje aktivne konformacije.<sup>7</sup>

Bočni ogranci koji tvore aktivno mjesto dolaze iz obje polutke. Jedan od bitnijih motiva u aktivnom mjestu je K/E/D/D motiv. Lys295 (K od K/E/D/D) radi ionske parove s  $\alpha$ - i  $\beta$ -fosfatima ATP-a te stvara solni most s glutamatom (E310; E iz motiva) iz  $\alpha$ C-zavojnice. Asp386 (prvi D motiva) orijentira tirozilnu skupinu proteina supstrata. Ovaj bočni ogranak se nalazi u katalitičkoj omči, djeluje kao baza i uzima proton tirozinu kako bi se mogao odviti nukleofilni napad na  $\gamma$ -fosfat MgATPa. Drugi aspartat (D404) veže  $Mg^{2+}$  koji onda koordinira  $\beta$ - i  $\gamma$ - fosfat ATP-a. Ostatak aktivacijskog segmenta (A-omča) se izmiče iz katalitičkog centra da bi se protein supstrat mogao pozicionirati za katalizu.<sup>1</sup>

Kao što je već spomenuto, većini kinaza potrebni su dvovalentni kationi, najčešće  $Mg^{2+}$ . Jedan ulazi kao fiziološki supstrat, MgATP, dok je drugi u interakciji s enzim/metalni-nukleotid kompleksom pri čemu povećava katalitičku učinkovitost ( $k_{cat}/K_{MgATP}$ ). Kinetička istraživanja ustaljenog stanja SRC-kinaze su pokazala da je za učinkovit rad ovog enzima potrebno dodati magnezija u suvišku u odnosu na količinu koja je potrebna da se zasiti ATP. Zasićenje se postiže pri 5-8 mM, dok je za zasićenje ATP-a potrebno oko 1 mM  $MgCl_2$  koji se koristi kao izvor slobodnog  $Mg^{2+}$ . Također, pokazano je da u odsutnosti  $Mg^{2+}$  iona enzim nije aktivan.<sup>7</sup> Iako za SRC-kinazu nema dovoljno podataka za potvrdu točne uloge oba  $Mg^{2+}$  kationa, može se pretpostaviti da bi katalitički ciklus mogao biti sličan onome pretpostavljenom za druge protein kinaze. U prvom koraku dolazi do vezanja oba  $Mg^{2+}$  ( $Mg^{2+}(1)$  se odnosi na slobodni, dok  $Mg^{2+}(2)$  predstavlja kation vezan na ATP). U idućem koraku dolazi do vezanja proteina supstrata koji slijedi katalizirani prijenos fosfatne skupine na protein supstrat. Zatim se otpuštaju  $Mg^{2+}(1)$  i fosforilirani supstrat. U posljednjem, najspornijem koraku dolazi do otpuštanja drugog kationa (slika 9).<sup>1</sup>



Slika 9. Pretpostavljeni katalitički ciklus protein kinaza

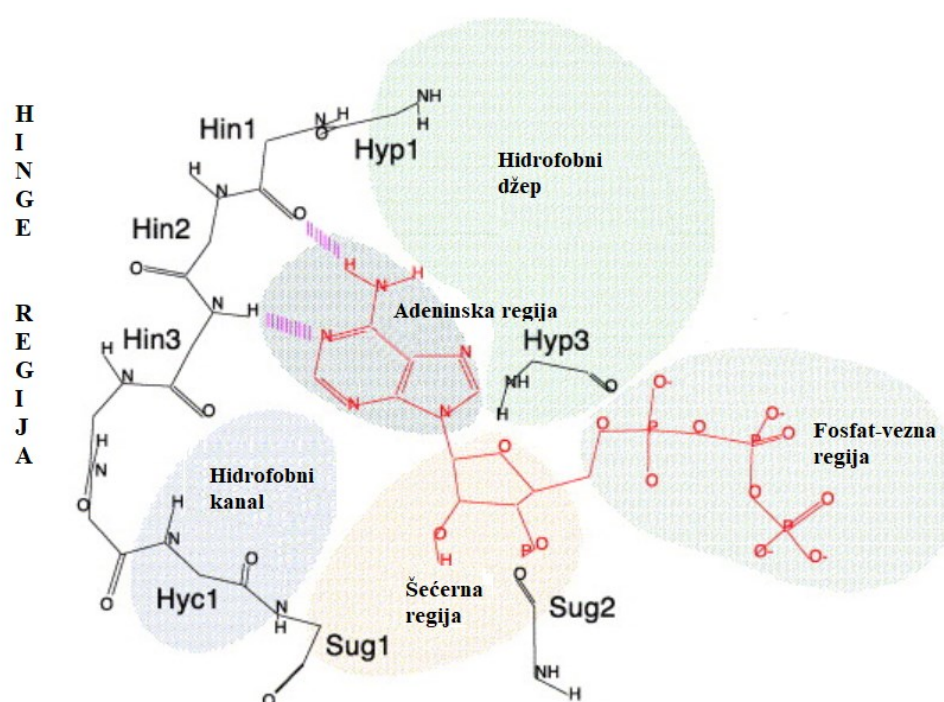
Preuzeto i prilagođeno prema ref 1

### 2.1.3. Tirozin kinaza kao meta za istraživanje lijekova

Nekontrolirani, autonomni rast stanica često je posljedica mutacija proteina koji sudjeluju u signalnim putovima. Velik broj izvanstaničnih signala se pojačava i prenosi unutar stanice pomoću protein kinaznih kaskada te su stoga kinaze česta meta za razvoj lijekova male molekulske mase u liječenju onkoloških oboljenja. S obzirom na broj kinaza u ljudskome kinomu, dizajn selektivnih inhibitora nije jednostavan zadatak. Iako postoje neki pokušaji sinteze alosteričkih inhibitora,<sup>11</sup> najčešće su istraživanja usmjerena na ATP mimetike.<sup>6</sup>

ATP se veže unutar dubokog ureza koji se nalazi između dvije polutke kinazne domene. U obitelji kinaza arhitektura aktivnog mjesta je značajno očuvana, ali regije u samoj blizini ATP-veznog mjesta se mogu dovoljno razlikovati za sintezu selektivnih inhibitora. Aktivno mjesto kinaza posjeduje nekoliko značajki koje se mogu iskoristiti za dizajn novih inhibitora. Prva od njih je adeninska regija. U toj hidrofobnoj regiji ostvaruju se dvije vrlo bitne vodikove veze između amino-skupina na položajima N-1 i N-6 adenina s amino-skupinama i karboksilnim skupinama iz okosnice enzima (aminokiselina *hinge* regije). Velik broj inhibitora također ostvaruje vodikove veze s istim bočnim ograncima. Aktivno mjesto SRC-kinaze sadrži i

šećernu regiju. To je dio u koji se smješta riboza ATP-a te kod većine kinaza to je hidrofilna regija. U neposrednoj blizini adeninske regije nalazi se hidrofobni džep. Sam ATP ne ostvaruje interakcije, ali većina inhibitora koristi mogućnost ostvarivanja interakcija u ovoj regiji. Nadalje, prema otapalu postoji otvor koji se naziva hidrofobni kanal. ATP ne ostvaruje interakcije, ali ova regija može poslužiti za postizanje veće selektivnosti novih inhibitora. Najizloženija regija otapalu je fosfat-vezna regija. Istraživanja su pokazala da interakcije u ovoj regiji nemaju velik utjecaj na afinitet enzima prema inhibitoru, ali također mogu poslužiti u optimizaciji za povećavanje selektivnosti. Fosfatne skupine ATP-a stvaraju interakcije s G-omčom, pozitivno nabijenim bočnim ograncima te s aspartatom iz DFG motiva (slika 10).<sup>13</sup>



*Slika 10 Značajke ATP-veznog mjesta protein kinaza*

*Preuzeto i prilagođeno prema ref 13*

#### 2.1.4. Inhibitori protein kinaza i rezistencija na inhibitore

Inhibitori kinaza male molekulske mase mogu se podijeliti na nekovalentne i kovalentne inhibitore. Najpoznatiji inhibitori SRC-kinaze, kao i indikacije za koje su odobreni navedeni su u tablici 1. Jedan od najaktivnijih inhibitora SRC-kinaza je PP2 ligand. Međutim, do sada nije odobren za liječenje te njegov najveći nedostatak je vrlo niska selektivnost.<sup>17</sup>

Tablica 1. Inhibitori SRC-kinaza<sup>1,6</sup>

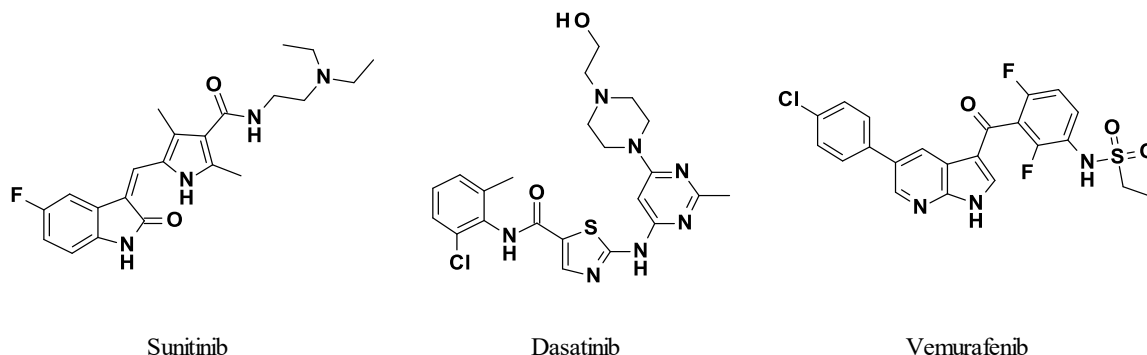
Inhibitor	Kinaze	Tip inhibitora	Indikacije za koje su odobreni	U kliničkoj fazi ispitivanja /indikacije
Bosutinib	BCR-Abl, SRC, Lyn, Hck, Kit, PDGFR	Tip-2	Ph <sup>+</sup> CML, ALL	Rak dojke, glioblastoma
Dasatinib	BCR-Abl, SRC, Lck, Fyn, Yes, PDGFR i druge	Tip-1	Ph <sup>+</sup> CML, ALL	Različiti tumori čvrstog tkiva, ALL
Ponatinib	BCR-Abl, PDGFR, VEGFR, enzimi iz SRC obitelji	Tip-1	CML, ALL	Različiti tumori čvrstog tkiva
Vandetanib	EGFR, VEGFR, RET, enzimi iz SRC obitelji	Tip-1	karcinom štitnjače	Različiti tumori čvrstog tkiva
Saracatinib	SRC, BCR-Abl			karcinom pluća, jajnika, osteosarkom..
PP2	SFK (Lck, Fyn, Hck)			

#### 2.1.4.1. Nekovalentni inhibitori

Nekovalentni inhibitori mogu se podijeliti prema mjestu vezanja, odnosno vežu li se ili ne vežu na *hinge* regiju kinaza. Razlikujemo tip-1, tip-1.5, tip-2 i tip-3 inhibitore.

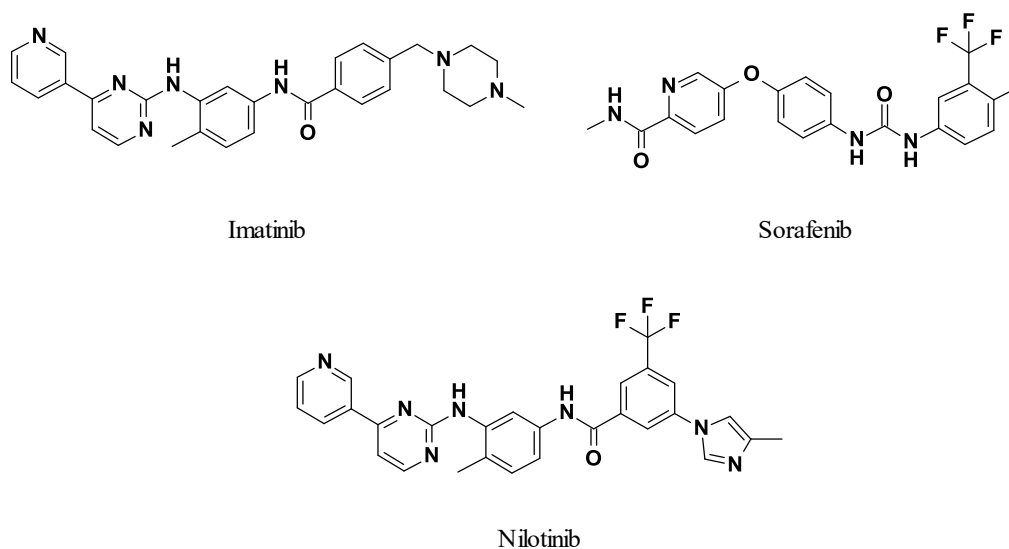
Inhibitori tip-1 i tip-1.5 su ATP kompetitivni inhibitori. Većina ih se veže za enzim u aktivnoj takozvanoj „*DFG-in*“ konformaciji. U toj konformaciji fenil-alanin (F iz DFG motiva) nalazi se zaklonjen u hidrofobnom džepu između dvije polutke i sudjeluje u stabilizaciji aktivacijskog segmenta, a aspartat (D iz DFG motiva) koordinira ATP. Za postizanje selektivnosti tip-1 inhibitora, koriste se modifikacije ovisne o veličini, obliku i polarnosti bočnog ogranka ključne aminokiseline (gatekeeper). Neki od odobrenih inhibitora tip-1 su erlotinib, dasatinib, sunitinib.

Inhibitori tip-1.5 vežu se u inaktivnu konformaciju enzima u kojoj DFG motiv poprima „*DFG-in*“ konformaciju koja je karakteristična za aktivne enzime, ali je  $\alpha$ C-zavojnica izmaknuta i poprima „ *$\alpha$ C-out*“ konformaciju. Primjer ovog tipa inhibitora je vemurafenib.



Slika 11. Primjeri odobrenih inhibitora tip-1 i tip-1.5

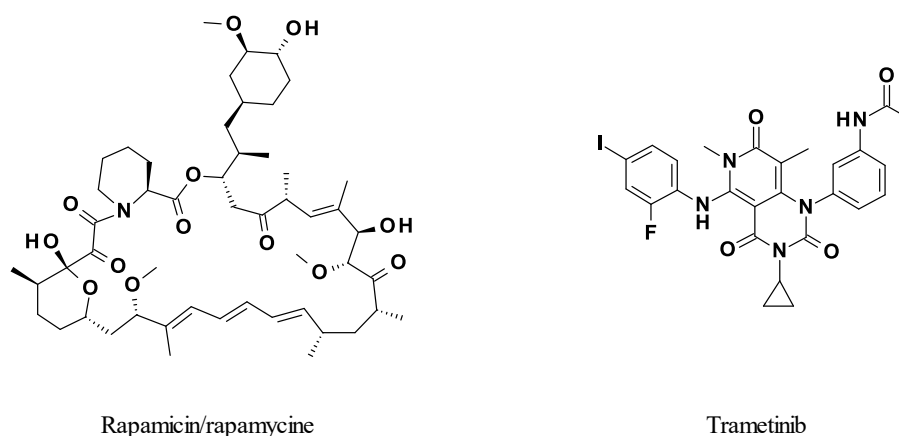
Tip-2 inhibitori vežu se za enzim u njegovoj inaktivnoj, takozvanoj „*DFG-out*“ konformaciji, ali i dalje ostvaruju interakcije s *hinge* regijom. Kao i prvi tip, ovi inhibitori su ATP kompetitivni. Prijelaz iz „*DFG-in*“ u „*DFG-out*“ konformaciju otvara dodatni hidrofobni džep uz ATP-vezno mjesto koje ovi inhibitori koriste kako bi zaključali enzim u njegovoj inaktivnoj konformaciji. Tip-2 inhibitori općenito su selektivniji od tip-1 inhibitora. Veća selektivnost tip-2 inhibitora može se pripisati činjenici da motivi poput  $\alpha$ C-zavojnice, aktivacijskog segmenta i G-omče u inaktivnom enzimu poprimaju mnoštvo različitih konformacija te pojedine kinaze imaju svoje preferirane konformacije. Neki od odobrenih tip-2 inhibitora kinaza su imatinib, nilotinib i sorafenib.<sup>6</sup>



Slika 12. Primjeri odobrenih inhibitora tipa-2



Tip-3 inhibitori su alosterički inhibitori. Oni se vežu na mjesta koja su udaljena od aktivnog mjesta i ne ostvaruju interakcije s *hinge* regijom. Oni se mogu, ali ne moraju vezati u kinaznu domenu protein kinaza. Inhibitori ovog tipa često se vežu u područja koja su odgovorna za ostvarivanje interakcija s drugim proteinima. Iz tog razloga vezna mjesta za tip-3 inhibitore su veća, ključne interakcije prostorno udaljenije, a sami inhibitori su molekule veće molekulske mase, poput makrocikličkog rapamycina. Većina ovih inhibitora spada u ATP nekompetitivne ili ATP akompetitivne, dok se nekolicina indirektno natječe s ATP molekulom jer se vežu u međusobno isključujućim konformacijama. Od svih navedenih, ovi inhibitori pokazuju najveću selektivnost, ponajviše jer ostvaruju interakcije s veznim mjestima i sudjeluju u narušavanju regulatornih interakcija karakterističnih za pojedine kinaze. Elementi izvan kinazne domene poput regulatornih domena i raznih N- i C-terminalnih elemenata doprinose raznovrsnosti struktura te u kombinaciji s različitim konformacijama G-omče, aktivacijskog segmenta i  $\alpha$ C-zavojnice u inaktivnom enzimu pružaju mogućnost dizajna vrlo selektivnih inhibitora. Najpoznatiji tip-3 inhibitori su sirolimus (rapamycin) i trametinib.<sup>6</sup>



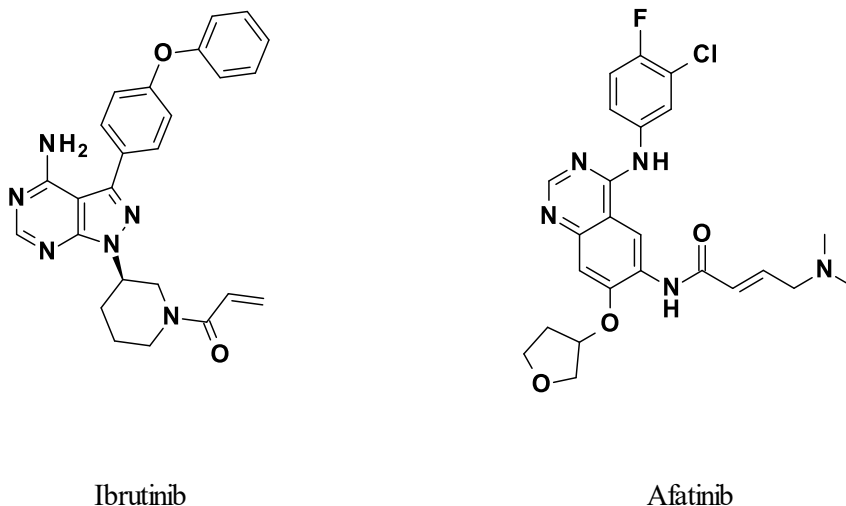
Slika 13. Alosterički ili tip-3 inhibitori

#### 2.1.4.2. Kovalentni inhibitori

Kovalentni inhibitori imaju razne elektrofilne funkcionalne skupine koje služe za kovalentno vezanje u aktivno mjesto kinaza ili za vezanje u neposrednoj blizini istog. Kovalentni inhibitori najčešće se vežu na Lys ili Cys u blizini ATP-veznog mjesta. Do sada je odobreno svega 5 kovalentnih inhibitora kinaza, a neki od njih su inhibitor Burton kinaze (BTK) irutinib te EFGR inhibitor afatinib.<sup>39</sup> Kovalentni inhibitori imaju mogućnost postizanja veće selektivnosti u odnosu na nekovalentne jer mogu ostvariti reakcije s neočuvanim cisteinskim bočnim ograncima kao i veće učinkovitosti zbog većeg afiniteta vezanja inhibitora na ciljani protein.

Također, zbog same prirode vezanja, kovalentni inhibitori mogu imati bolja farmakokinetička svojstva (dugotrajnija inhibicija).

Iako ovi inhibitori pokazuju učinkovitost u kliničkim istraživanjima često su toksični i uzrokuju niz nuspojava. Također kinaze mogu lako mutirati bočni ogranak cisteina koji nije ključan za aktivnost same kinaze, uzrokujući rezistenciju.<sup>6</sup>

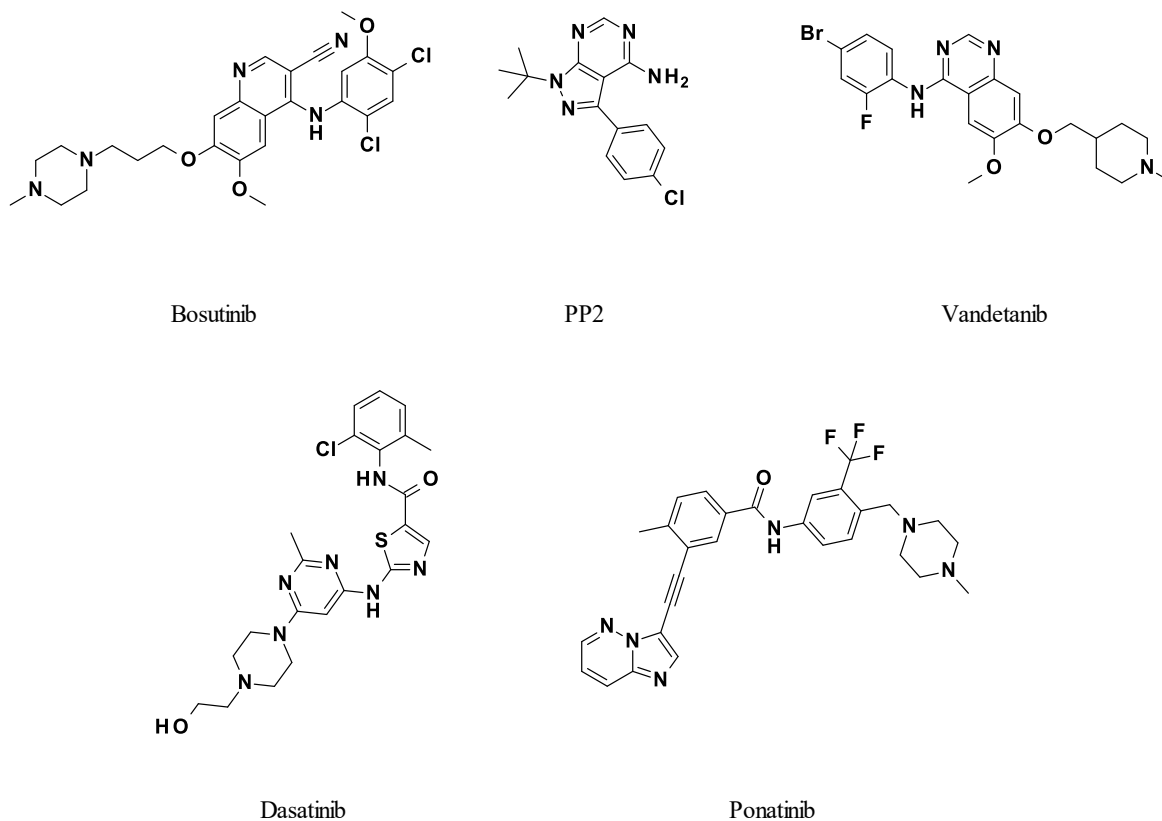


Slika 14. Kovalenti inhibitori

#### 2.1.4.3. Inhibitori SRC-kinaze

SRC-kinaza je prvi proto-onkogen koji je otkriven i identificiran. Pojam proto-onkogen opisuje stanični prekursor retrovirusnog transformirajućeg gena, kako bi se mogli razlikovati od onkogeni.<sup>16</sup> SRC-kinaza nije primarni pokretač tumorigeneze, ali je dio velikog broja procesa povezanih s dijeljenjem i preživljavanjem stanice. SRC se nalazi nizvodno od onkogenih pokretača (eng. *oncogenic driver*) poput EGFR, ErbB2 i BCR-Abl koji su uključeni u Ras/Raf/ERK signalni put za dijeljenje stanice.<sup>1</sup>

Do sada su odobrena, od strane FDA, četiri SRC/multikinazna inhibitora za različite maligne bolesti/onkološke indikacije - bosutinib, dasatinib, ponatinib i vandetanib (slika 15).<sup>13</sup> Većina ih je odobrena za liječenje kronične mijeloične leukemije (CML) s pozitivnim Philadelphia kromosomom (Ph<sup>+</sup>), dok za ostale indikacije još traju klinička ispitivanja. Saracatinib je pokazivao dobre rezultate u ispitivanjima na životinjama, ali za sada još nije odobren niti za jednu indikaciju.



Slika 15 Strukture Bosutiniba, Dasatiniba, Ponatiniba, Vandetaniba i PP2 liganda.

#### 2.1.4.4. Nedostaci kinaznih inhibitora: selektivnost i rezistencija

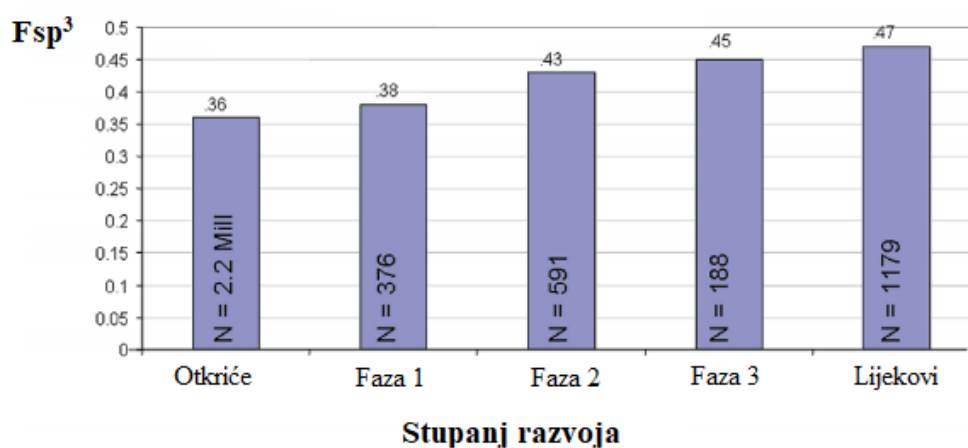
Razina selektivnosti inhibitora protein kinaza često je diskutirana tema. Idealno, inhibitor određene protein kinaze bi trebao inhibirati samo tu kinazu što je gotovo nemoguće jer se ljudski kinom sastoji od preko 500 različitih kinaza s vrlo visokom razinom homologije. Drugi problem kinaznih inhibitora je razvijanje rezistencije. Ona može biti rezultat smanjenja količine ciljanog proteina, mutacija koje onemogućavaju vezanje inhibitora na enzim te povećanog metabolizma inhibitora putem citokroma P450. Osim toga, rezistencija se može postići pomoću drugih kompenzacijskih mehanizama ili smanjenjem afiniteta kinaze prema inhibitoru.<sup>6</sup>

#### 2.1.5. Uvođenje $sp^3$ karaktera

Većina kinaznih inhibitora su planarni poliaromatski spojevi. Aromatski prsteni omogućavaju stvaranje  $\pi$ - $\pi$  interakcija, međutim njihova planarna struktura popunjava samo dio prostora aktivnog mjesta. Smanjenje broja aromatskih prstena te povećanje  $sp^3$  karaktera u razvoju inhibitora pruža mogućnost ostvarivanja dodatnih interakcija s enzimom koje nisu dostupne planarnim spojevima. Na taj se način može povećati komplementarnost enzima i liganda, a

samim time aktivnost i selektivnost. Nadalje, spojevi bogati  $sp^3$  karakterom često imaju bolja farmakokinetička svojstva i manju toksičnost.

Kako bi se ispitala tvrdnja da spojevi s većim udjelom zasićenih ugljikovih atoma imaju bolja farmakokinetička svojstva provedena je analiza spojeva registriranih u GVK BIO bazi.<sup>15</sup> U obzir su uzeti spojevi čija molarna masa ne prelazi 1000 Da, a registrirani su u bazi nakon 1980. godine. Za svaki spoj unutar pojedine faze u razvoju lijeka, od otkrića do stjecanja statusa lijeka, prvo su izračunate prosječne molarne mase, udio saturacije ( $F_{sp^3}$ ) te broj kiralnih centara, a zatim su međusobno uspoređeni. Udio saturacije ( $F_{sp^3}$ ) je deskriptor koji opisuje udio  $sp^3$  hibridiziranih ugljikovih atoma, a računa se kao kvocijent  $sp^3$  hibridiziranih C-atoma i ukupnog broja C-atoma u spoju. Prosječni udio saturacije ( $F_{sp^3}$ ) iznosi 0,36 za spojeve u početnoj fazi razvoja, dok za spojeve koji su u skupini lijekova on iznosi 0,47. Udio saturacije raste od faze do faze razvoja (slika 16). Trodimenzionalnost koja proizlazi iz većeg udjela  $sp^3$  ugljikovih atoma može rezultirati većom selektivnosti i manjim brojem nuspojava. Osim toga, molekule kandidati koji su imali veći udio  $sp^3$  hibridiziranih C-atoma imali su veću mogućnost bolje topljivosti i niže temperature tališta. Kandidati koji imaju odgovarajuće vrijednosti ovih svojstava imaju veću vjerojatnost da stignu do kliničkog razvoja.

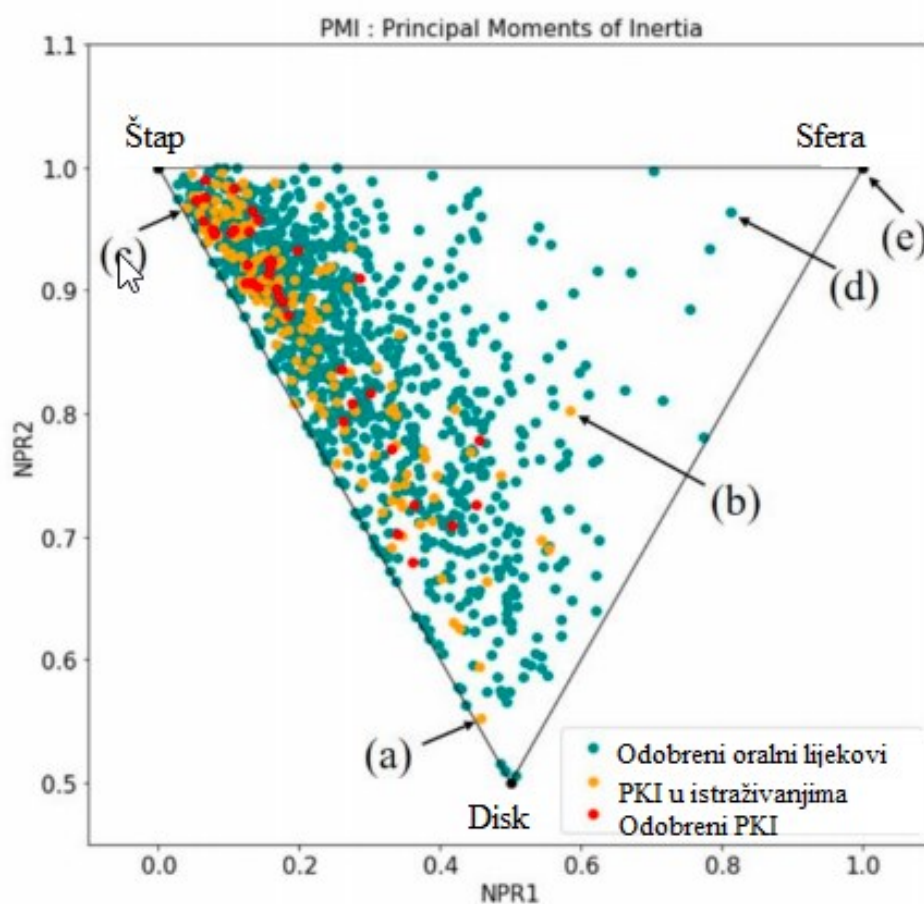


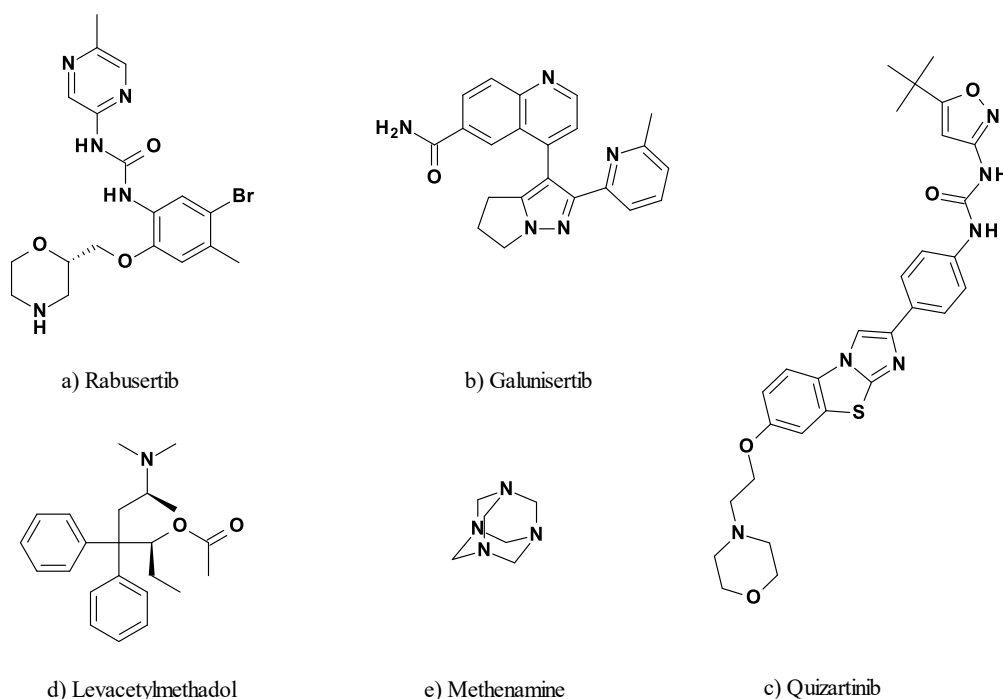
Slika 16 Prosječni udio saturacije unutar pojedine faze u razvoju

Preuzeto i prilagođeno prema ref 15

F. Carles i suradnici objavili su 2018. godine<sup>18</sup> detaljnu analizu inhibitora protein kinaza koji se nalaze na tržištu, ali i onih koji su još uvijek u različitim fazama kliničkih istraživanja. Koristeći PMI analizu (eng. *Principal Moment of Inertia analysis*; analiza vodećeg/glavnog momenta inercije) pokazali su da nove generacije inhibitora protein kinaza imaju veću

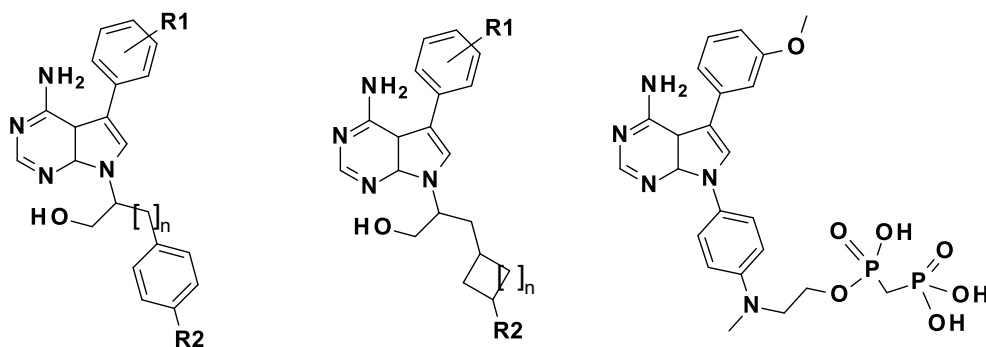
tendenciju poprimanja različitih molekularnih oblika. Na slici 17 prikazan je PMI graf koji vizualno prikazuje raspodjelu seta molekula na temelju trodimenzionalne strukture pri čemu se u svakom vrhu trokuta nalazi jedan od ekstrema. Eksteremi molekularnih oblika u ovom slučaju su štap (diacetlen), disk (benzen) i sfera (adamantan). Većina inhibitora protein kinaza nalazi se u štap vrhu, uz disk-štap stranicu (os), dok tip-2 inhibitori se nalaze najbliže štap vrhu zbog njihovog načina vezanja. Molekule najbliže ekstremima su rabusertib (a), galunisertib (b) i quizartinib (c) koji se još uvijek istražuju. Ovakav rezultat analize može upućivati na to da se nove generacije inhibitora protein kinaza odmiču od „disk-štap“ osi te ispituju nove molekularne oblike i moguće interackije u prostoru.





*Slika 17 Grafički prikaz analize glavnog momenta inercije spojeva koji su odobreni oralni lijekovi te inhibitori protein kinaza koji su odobreni te u različitim fazama istraživanja*  
*Preuzeto i prilagođeno prema ref 18*

Modifikacije i ugradnja većih skupina u poznate inhibitore protein kinaza česta je tema istraživačkih radova, posebice PP2 ligand zbog *tert*-butilne skupine na *N*-7 položaju pirolo-pirimidina. Pirolo-pirimidinski dio PP2 liganda dobro se smješta u adeninsku regiju aktivnog mjesta, dok je *tert*-butilna skupina okrenuta prema otapalu i zamjena te skupine pruža mogućnost ostvarivanja novih interakcija. Tako su do sada napravljene mnoge modifikacije PP2 liganda na *N*-7 položaju pirolo-pirazolne skupine, od ugradnje različitih heterocikličkih spojeva<sup>19</sup>, pa sve do ugradnje specifičnih skupina koje ciljaju određene stanice, poput onih za koštana oboljenja.<sup>20</sup>



*Slika 18 Do sada sintetizirani analozi PP2 liganda*

## 2.2. Reakcije dearomatizacije

Reakcije dearomatizacije omogućavaju sintezu kompleksnih 3D struktura poput spiro-spojeva, premoštenih spojeva te različitih bicikličkih sustava iz jednostavnih, komercijalno dostupnih aromatskih spojeva. Među poznatim reakcijama dearomatizacije su Birch redukcija, alkilacijska dearomatizacija, fotokemijska dearomatizacija, termalna dearomatizacija, oksidativna dearomatizacija, enzimaska dearomatizacija te dearomatizacija katalizirana prijelaznim metalima. Većina tih metoda nije naišla na širu upotrebu zbog nedostataka poput žestokih reakcijskih uvjeta, izostanka regioselektivnosti i stereoselektivnosti. Budući da prilikom reakcije dearomatizacije dolazi do nastanka kiralnih centara vrlo je bitno razvijati enantioselektive metode. Jedna od takvih metoda koja se ubrzano razvija posljednjih godina je katalitička asimetrična reakcija dearomatizacije (eng. *Catalytic Asymmetric Dearomatization reactions, CADA*).<sup>21</sup>

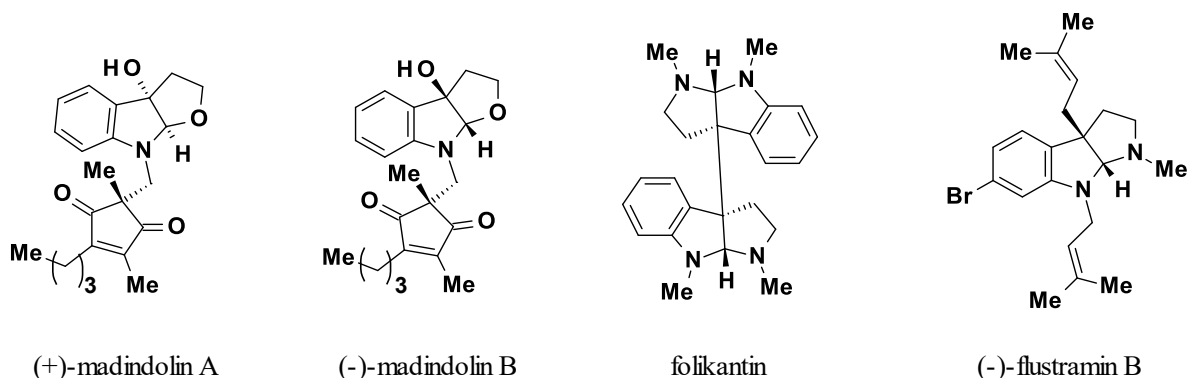
### 2.2.1. Katalitička asimetrična reakcija dearomatizacije indola

Asimetrična kataliza je vrsta reakcija koja se ističe po tome što je apsolutna konfiguracija produkta određena isključivo kiralnim katalizatorom što ju čini izvrsnom za sintezu prirodnih spojeva, njihovih enantiomera i diastereoizomera.

Detaljan pregled upotrebe katalitičke asimetrične dearomatizacije derivata indola kao ključnog koraka u sintezi prirodnih spojeva i njihovih derivata objavljen je 2019. godine.<sup>22</sup> U tom radu autori su kategorizirali strategije za stvaranje indolnog policikličkog sustava.

Tip I jedna je od najčešće korištenih strategija za sintezu indolnog policikločkog sustava. U ovom slučaju položaj C-3 indola djeluje kao nukleofil u Friedel-Crafts tipu reakcije, dok je elektrofil neka vanjska molekula (slika 18). Česti supstrati u ovom tipu su triptamin, triptofol i njihovi derivati. Do sada je velik broj spojeva sintetiziran koristeći ovu strategiju, a među prvima su diastereoizomeri manindolina (slika 19).

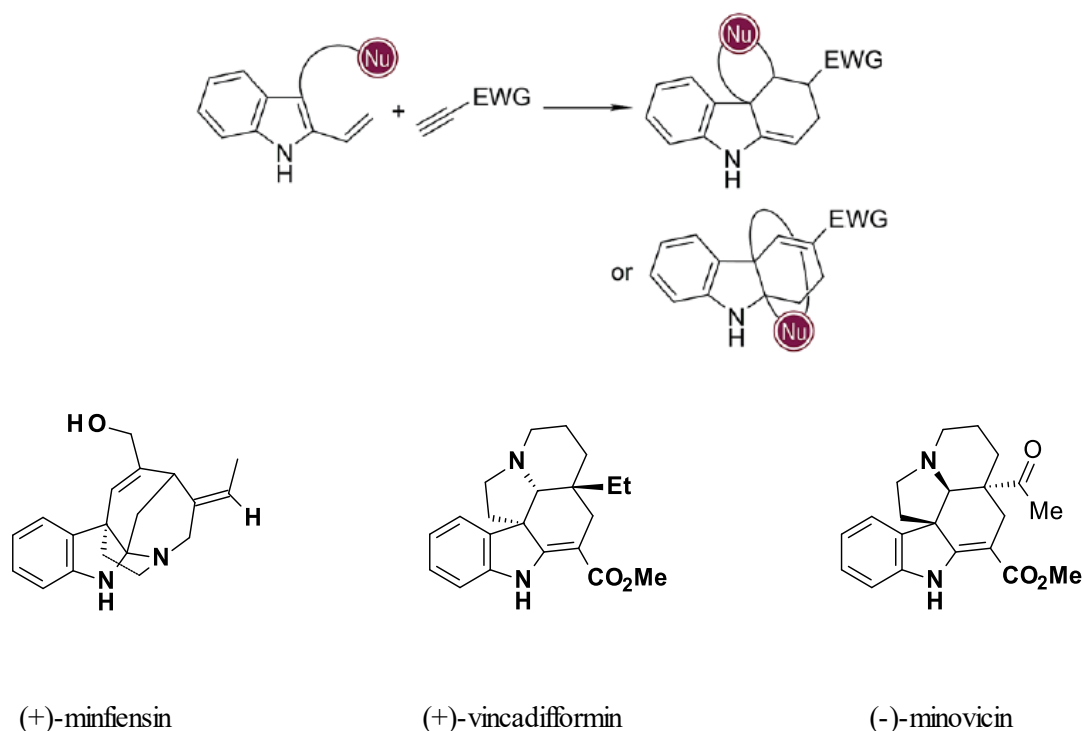




*Slika 19 Strategija za sintezu indolnog policikličkog sustava – Tip I, Spojevi čija sinteza u ključnom koraku koristi strategiju tipa I*

*Preuzeto i prilagođeno prema ref 22*

Tip II je Diels-Adler tip reakcije. U prisutnosti kiralnog imidazolidinonskog katalizatora derivati 2-viniltriptamina djeluju kao dieni u enantioselektivnoj Diels-Adler reakciji s nezasićenim aldehidom pri čemu nastaju tetraciklički spojevi sa spojenim ili premoštenim prstenima (slika 20).

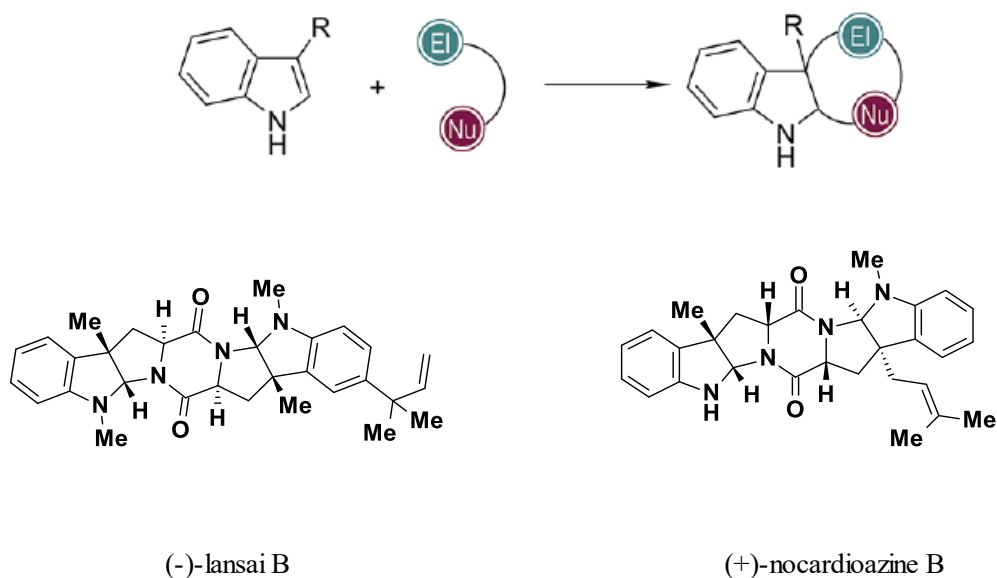


*Slika 20 Spojevi čija sinteza u ključnom koraku koristi strategiju tipa I*

*Preuzeto i prilagođeno prema ref 22*

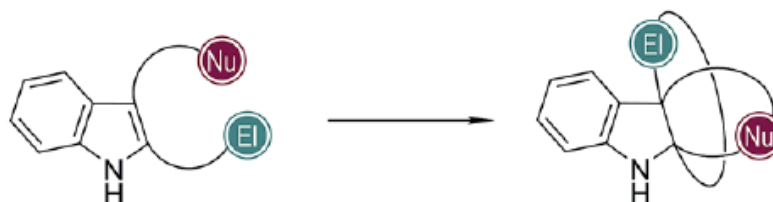


Ciklizacijska strategija tip III temelji se na reakciji između C-3 supstituiranog indolnog derivata i vanjskog amfifilnog reagensa. Nukleofilni C3-položaj indola reagira s elektrofilnim djelom supstrata, dok nukleofilni dio supstrata se veže na elektrofilni C-2 položaj pri čemu nastaju spojevi visoke molekularne kompleksnosti (slika 21). Najznačajniji primjer proizlazi iz sinteze (-)-lansai B i (+)-nocardiozin A i B.



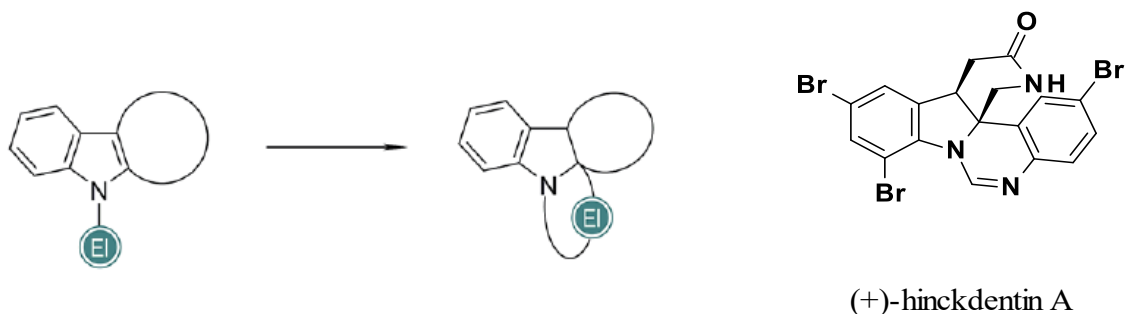
Slika 21 Spojevi čija sinteza u ključnom koraku koristi strategiju tipa III  
Preuzeto i prilagođeno prema ref 22

Tip IV strategija ciklizacije koristi se za pripravu spojeva s premoštenim tetracikličkim kosturima iz 2,3-disupstituiranih indola. Optimalno supstituirani derivati indola rezultirat će dvostukom ciklizacijom pri čemu nastaju kompleksni premošteni policiklički derivati indola (slika 22). Značajni primjeri uključuju (-)-aspidofilin A i već spomenuti (+)-minfiensin.



Slika 22  
Preuzeto iz ref 22

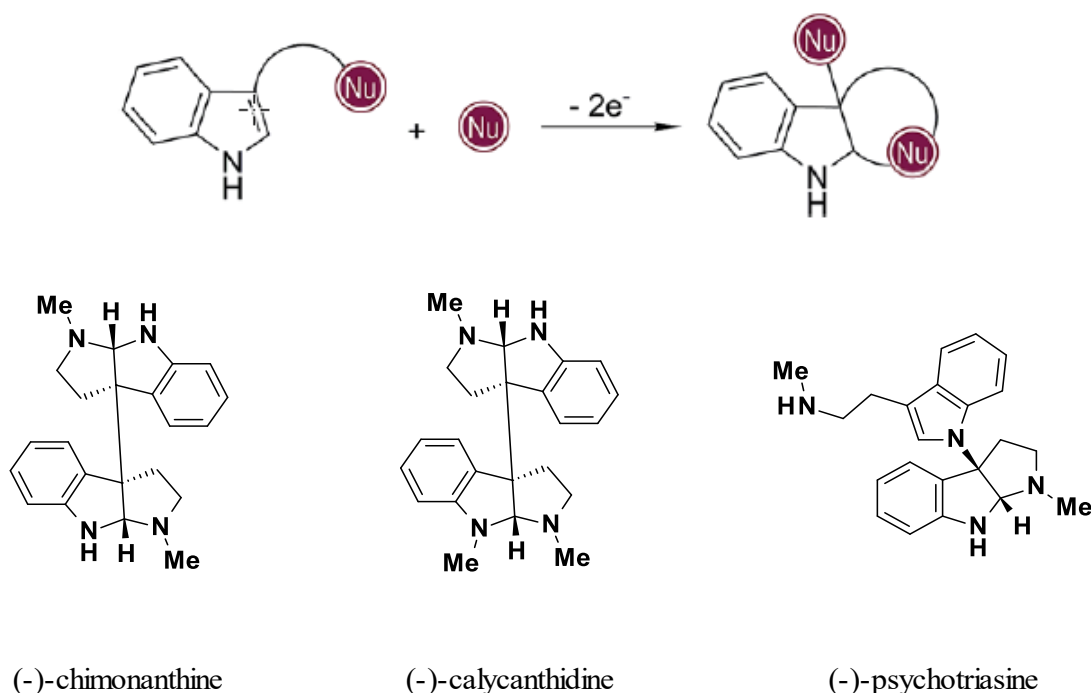
Ciklizacijska strategija tip V nije detaljno istražena, ali najznačajniji primjer je sinteza (-)-hinckdentina A (slika 23). Indolni derivat supstituiran elektrofilnom skupinom na dušiku podliježe paladijem kataliziranoj reakciji dearomatizacije nalik Heckovoj ciklizaciji (slika 23).



Slika 23 Spojevi čija sinteza u ključnom koraku koristi strategiju tipa V

Preuzeto i prilagođeno prema ref 22

Strategija ciklizacije tip IV je ciklizacija posredovana vidljivim svjetlom (slika 24). Ova metoda dopušta nastajanje radikala u blagim reakcijskim uvjetima. C-3 supstituirani derivat indola reagira s vanjskim nukleofilom u dvostupanjskoj jednoelektronskoj oksidaciji.<sup>22</sup>



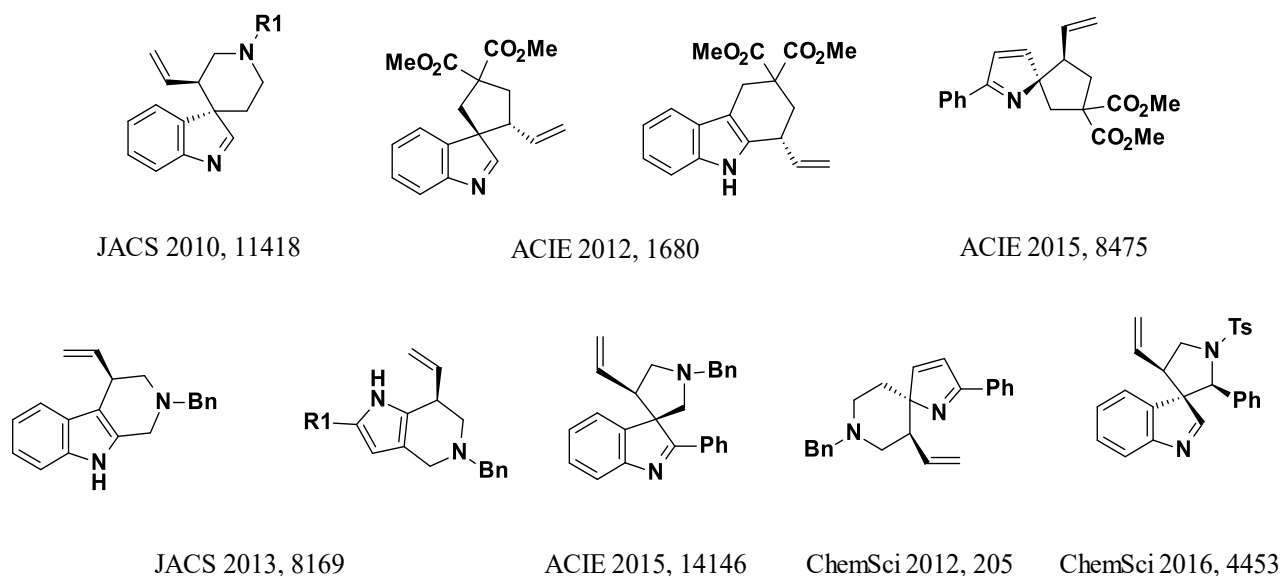
Slika 24 Spojevi čija sinteza u ključnom koraku koristi strategiju tipa VI

Preuzeto i prilagođeno prema ref 22

### 2.2.2. Iridijem katalizirana asimetrična alilna dearomatizacija indola

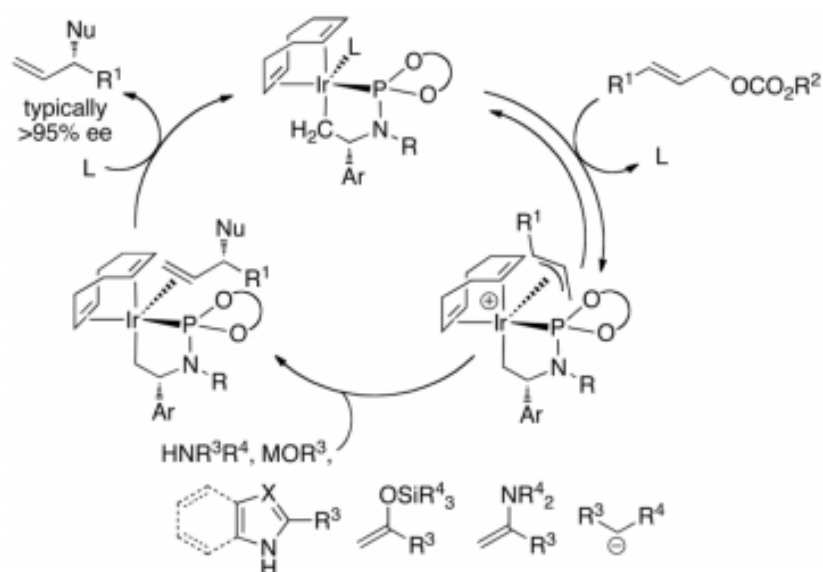
Prva reakcija alilne supstitucije katalizirane iridijem objavljena je 1997., a iste je godine objavljena i prva asimetrična inačica.<sup>27</sup> Do tada su većinom ispitivane reakcije alilne supstitucije katalizirane Pd kompleksima, a supstitucija se uglavnom odvijala na manje zasićenom dijelu molekule te su nastajali linearni, akiralni spojevi.<sup>26</sup> Korištenje drugih prijelaznih metala, poput Rh i Ir u reakcijama alilne supstitucije rezultirali su nastankom razgranatih, kiralnih produkata. Ispitivanja reakcijskog opsega alilne supstitucije pokazala su da je reakciju moguće provesti s različitim kisikovim, dušikovim i ugljikovim nukleofilima, s visokim iskorištenjima i selektivnošću.<sup>27</sup>

Tijekom prošlog desetljeća laboratorij profesora Shu-Li You-a postigao je velik napredak u razumijevanju iridijem katalizirane reakcije alilne supstitucije. Zahvaljujući njihovom radu razvijena je enantioselektivna metoda za pripremu različitih biciklo- i spiro-derivata indola i pirola korištenjem kiralnih iridijevih katalizatora dobivenih iz komercijalno dostupnog Ir prekursora i kiralnih fosforamiditinih liganada. Primjeri biciklo- i spiro- spojeva sintetirani reakcijom asimetrične dearomatizacije prikazane su na slici 25.



Slika 25 Primjeri različitih biciklo- i spiro- derivata indola i pirola

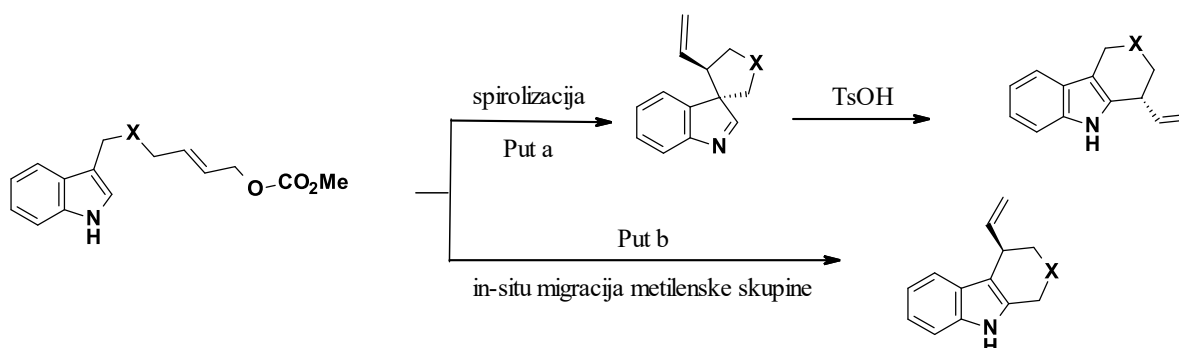
Mehanizam iridijem katalizirane alilne supstitucije prikazan je na slici 26. Katalitički ciklus započinje oksidativnom adicijom alilnog elektrofila na iridijev katalizator pri čemu nastaje alil-iridij intermedijer, a zatim taj organometalni kompleks reagira s nukleofilom. Mehanistička ispitivanja su pokazala da do nukleofilnog napada dolazi sa stražnje strane kompleksa. Disocijacija produkta s metalnog centra rezultira regeneracijom katalitički aktivne vrste.<sup>27</sup>



Slika 26. Katalitički ciklus iridijem katalizirane alilne supstitucije

Preuzeto i prilagođeno prema ref 27

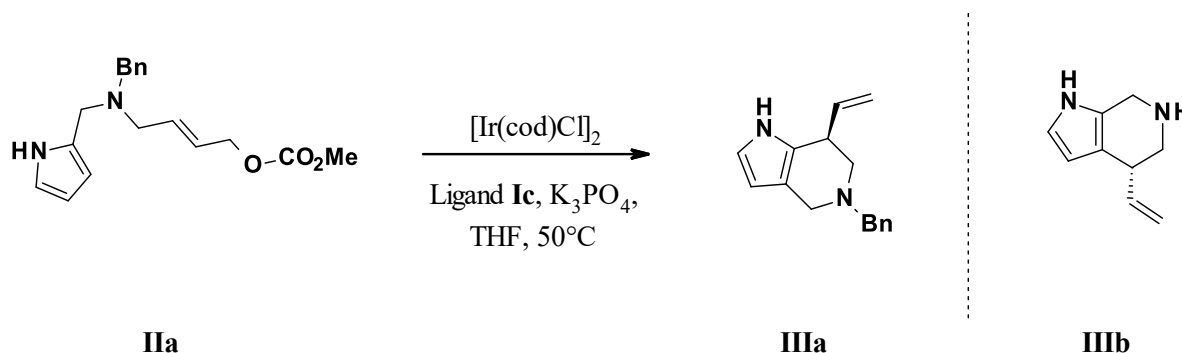
Derivati indola mogu biti supstrati za intramolekulsku alilnu dearomatizaciju pri čemu nastaju različiti heterociklički spojevi koji u svojoj strukturi sadrže kvaterni ugljikov atom. Općenito, reakcija se može odvijati na dva načina, kako je prikazano na slici 27. U prvom slučaju nastaje peteročlani spiro-indolinski produkt koji se može dalje prevesti u produkt u reakciji kataliziranoj kiselinom (TsOH). Pretpostavljalo se da alilna skupina ima veći migracijski potencijal od metilenske skupine. Povećavanjem migracijskog potencijala metilenske skupine otkriven je alternativni reakcijski put koji uključuje *in situ* migraciju. Dolazi do alkilacije indola na C-3 položaju koju slijedi migracija metilaminske skupine na C-2 položaj indola. Reakcije daje produkte dobro očuvane enantiomerne čistoće.<sup>23</sup>



Slika 27. Mogući reakcijski putevi za alkilaciju 3-indolil alil karbonata

Preuzeto i prilagođeno prema 23

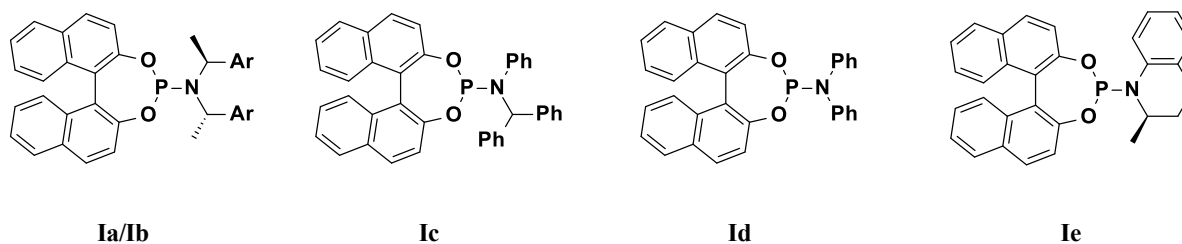
Alternativni reakcijski put otkriven je slučajno prilikom ispitivanja Ir-katalizirane alilne Friedel-Craftsove alkilacije 2-pirolil alilnog karbonata (**IIa**). U prisutnosti 2 mol % iridijevog katalizatora  $[\text{Ir}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ , 4 mol % liganda **Ia** (ligand prikazan na slici 29) i jednog ekvivalenta baze ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) u THF nije rezultirala očekivanim produktom **IIIb**, već je dobiven produkt **IIIa** koji je rezultat migracije s C-2 položaja na C-3 položaj pirola. Produkt **IIIa** je dobiven s dobrim iskorištenjem te vrlo dobrom enantiomernom čistoćom (88% ee) (slika 28).



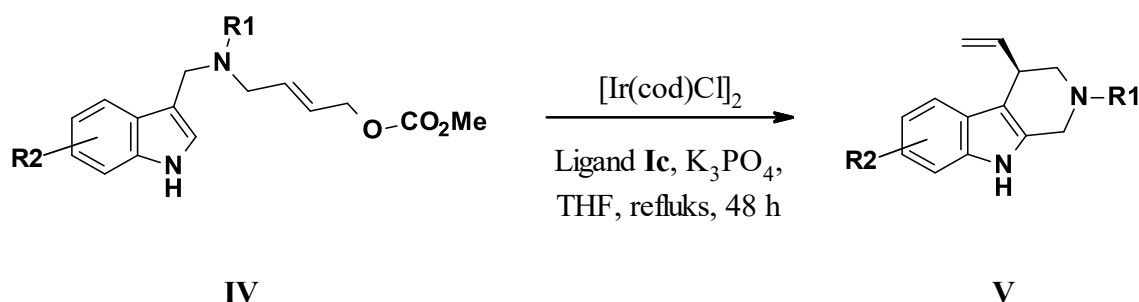
*Slika 28 Alkilacija 2-pirolil alilnog karbonata*

*Preuzeto i prilagođeno prema ref 23*

U svrhu poboljšanja iskorištenja reakcije i povećanja enantiomerne čistoće konačnih produkata provedena je optimizacija reakcijskih uvjeta. Ispitan je utjecaj različitih baza ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  i DBU) i liganada (**Ia-e**) te je pokazano da  $\text{K}_3\text{PO}_4$  kao baza i ligand **Ic** daju najbolje rezultate. Reaktant **IIa** u THF, uz dodatak 2 mol % iridijevog katalizatora i 4 mol % liganda **Ic** te jednog ekvivalenta baze ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) daje produkt **IIIa** s 80%tnim iskorištenjem u vrlo visokoj enantiomernoj čistoći (98%ee) (slika 28). Nakon optimizacije reakcijskih uvjeta ispitano je kako različite zaštitne skupine na bočnom lancu i različiti supstituenti na pirolu utječu na iskorištenje i enantiomernu čistoću konačnih produkata. Reaktanti koji sadrže različite zaštitne skupine na bočnom lancu daju odgovarajuće produkte s dobrim iskorištenjima (57-80%) i visoke enantiomerne čistoće (98%ee). Spojevi koji sadrže elektron-odvlačeće skupine, kao i elektron-donirajuće skupine na pirolu daju odgovarajuće produkte s dobrim do izvrsnim iskorištenjima (75-95%) i enantioselektivnošću (96-99%).

Slika 29 Ligandi; Ia Ar = Ph, Ib Ar = 2-MeO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>

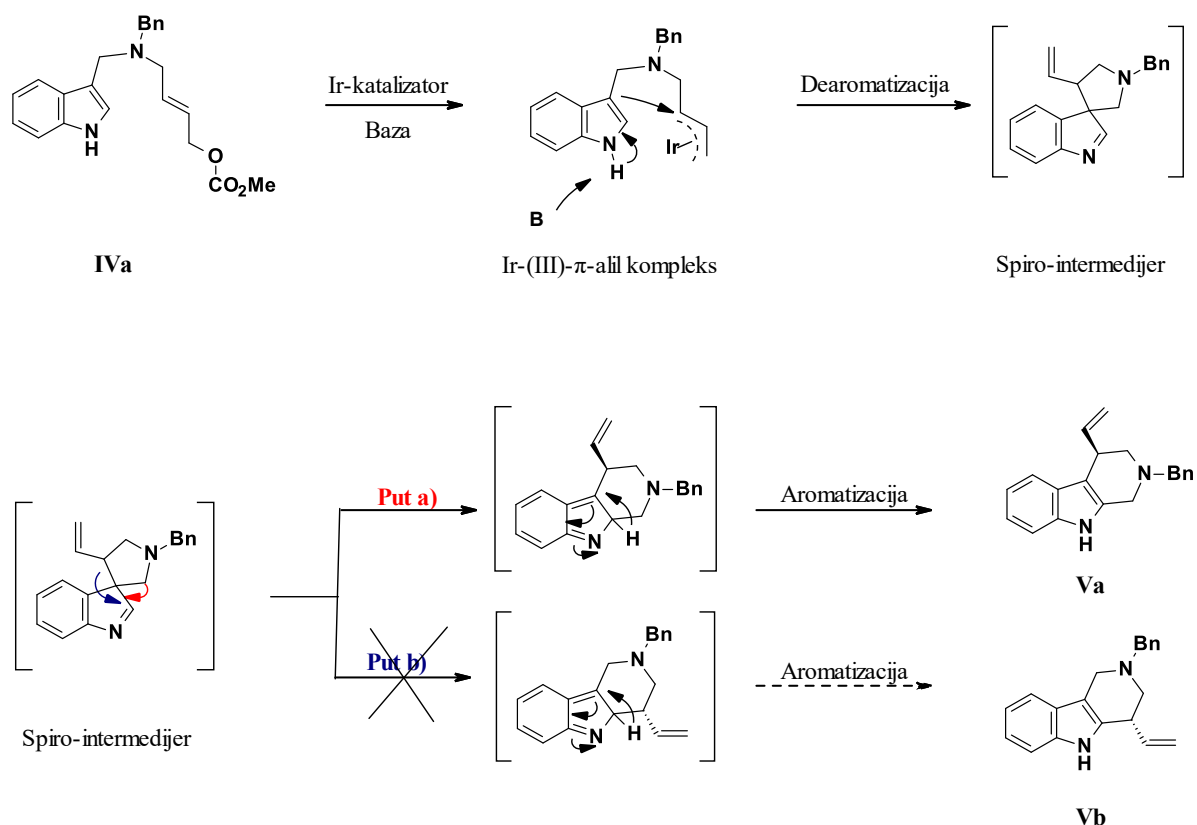
Nadalje, ispitana je mogućnost iste te reakcije, ali s 3-indolil alilnim karbonatima umjesto pirolima (slika 30). Optimalni uvjeti za provođenje reakcije bili su 2 mol% katalizatora [Ir(cod)Cl]<sub>2</sub>, 4 mol% liganda **Ic**, dva ekvivalenta baze (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) u THF na 70 °C. Ispitivanja opsega reakcije asimetrične dearomatizacije/migracije 3-indolil alilnog karbonata su pokazala da derivati sa različitim zaštitnim skupinama na dušiku bočnog lanca također daju odgovarajuće produkte u dobrom iskorištenju (63-80%) i dobre enantiomerne čistoće (88-96%). Derivati koji sadrže elektron odvlačeće i elektron donirajuće supstituente na indolnom prstenu daju odgovarajuće produkte s izvrsnim iskorištenjima (72–93%) te visokom enantiomernom čistoćom (94-96 %ee).<sup>23</sup>



Slika 30 Alkilacija 3-indolil alilnih karbonata

Preuzeto i prilagođeno prema ref 22

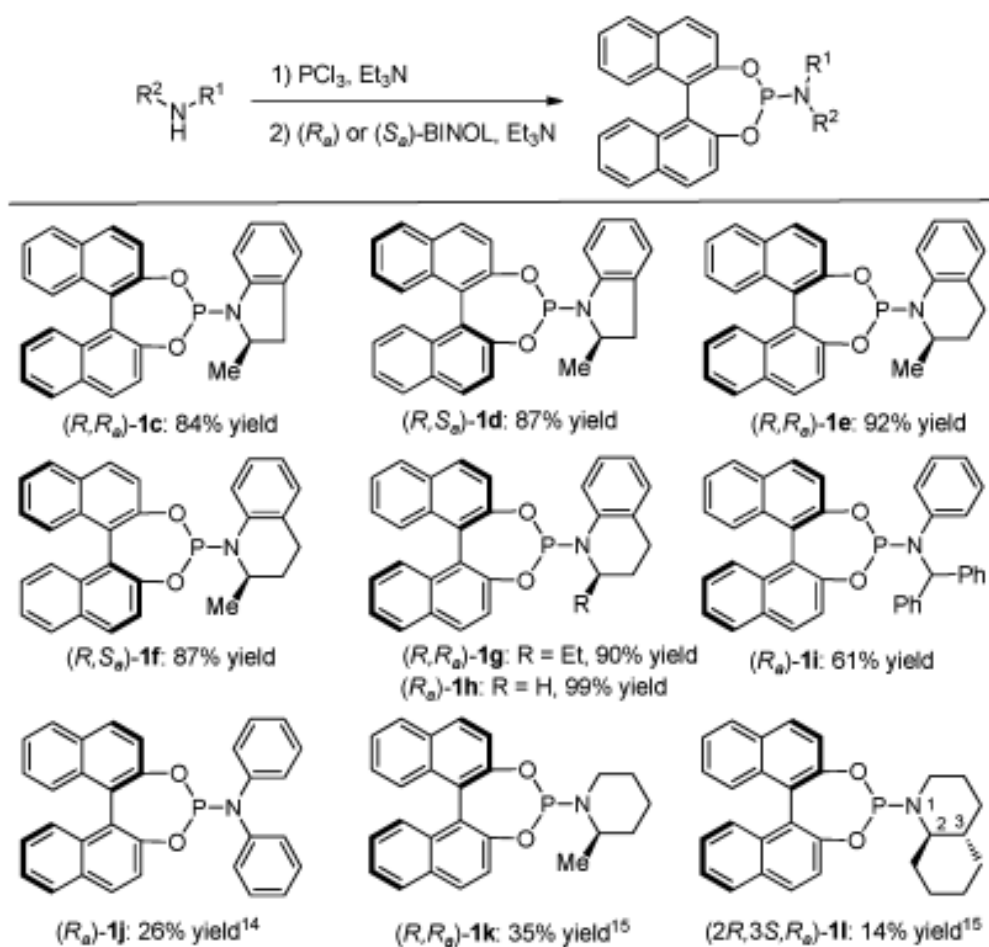
Iz podataka koji su dobiveni ispitivanjem reakcijskog opsega ove reakcije pretpostavljen je reakcijski put za supstrat **IVa** (slika 31). Nakon oksidativne adicije i nastanka Ir-(III)- $\pi$ -alil kompleksa dolazi do deprotonacije indola te nukleofilnog napada C-3 položaja na Ir-(III)- $\pi$ -alil kompleks prilikom čega nastaje ne-aromatski spiroindolinski intermedijer koji *in situ* prelazi u sljedeći intermedijer. Aromatizacija drugog intermedijera daje konačni produkt **Va**.<sup>23</sup>



Slika 31 Pretpostavljen reakcijski put za reakciju alkilacije 3-indolil alilnog karbonata

### 2.2.3. *N*-arilfosforamiditni ligand i Ir katalizator

Reakcija alilne dearomatizacije provodi se uz kiralni iridijev katalizator, koji se priprema iz iridijevog prekursora  $[\text{Ir}(\text{cod})\text{Cl}]_2$  i kiralnog fosforamiditnog liganda. Prva asimetrična alilna alkilacija katalizirana iridijem provedena je na alilnim acetatima uz oksazolinil-fosfinski ligand pri čemu su nastali željeni produkti visoke regio- i enantioselektivnosti što je potaknulo mnoga istraživanja katalitičkih sustava koji uključuju kiralne ligande.<sup>24</sup> U tome su se pokazali izuzetno uspješni fosforamiditni ligandi. Za bolje razumijevanje njihove uloge u katalizi sintetiziran je niz fosforamiditnih liganada (slika 31) te su primjenjeni u reakciji alilne alkilacije cimernog karbonata natrijevim dimetilmalonatom. Kako bi se ispitalo što točno utječe na enantio- i regio-selektivnost reakcije sintetizirani su različiti fosforamiditni ligandi. Neki od njih sintetizirani su iz enantiomerno čistih *R*-binola, dok su drugi sadržavali dijasteroizomer (*R,S*)-binol. Također, ispitan je i utjecaj kiralnosti supstituenta na dušiku. U tu svrhu korišteni su enantiomerno čisti i racemični amini, ali i akiralni amini (tako da konačni ligand posjeduje samo osnu kiralnost).



Slika 32. Priprema različitih fosforamiditnih liganada (preuzeto iz ref 24)

Pokazano je da reakcije u kojima su korišteni dijastereoizomeri binola imaju znatno manja iskorištenja (1f – 20%) i daju produkte manje enantiomerne čistoće (78%ee). Nadalje, kiralnost supstituenta na dušiku nije imala velik utjecaj na enantio- i regio-selektivnost, dok su sterički zahtjevniji ligandi davali produkte visoke enantiomerne čistoće, ali sa smanjenim prinostom (1i 42%, 1j – 61%). Ovakvi rezultati upućuju na to da je osna kiralnost binolnog fragmenta u molekuli većinski zaslužna za enantiomernu kontrolu u ovoj reakciji. Također, s ligandom 1h, koju posjeduje samo osnu kiralnost, a nije sterički zahtjevan, dobiveni su produkti s visokom iskorištenjem i enantiomernom čistoćom (95%, 95%ee) što upućuje na to da metilna skupina na  $\beta$  položaju od dušika nije nužna za ciklometalaciju. Nadalje, ovi rezultati upućuju na to da fenilna skupina na dušičnom dijelu molekule ima važnu ulogu u samoj reakciji.<sup>24</sup>



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Svi reagensi i otapala korišteni u sintezi komercijalno su dostupni i otapala bili su analitičke ili minimalno purum čistoće ( $\geq 95\%$ ) i upotrijebljeni su bez dodatnog pročišćavanja.

Reagensi korišteni u ovom radu navedeni su na sljedeći način: ime spoja (kratica/formula, proizvođač); *N,N*-dimetilformamid (DMF, Fisher Chemical), fosforil klorid ( $\text{POCl}_3$ , Merck), (Apollo Scientific, Combi-Blocks), toluen (Kemika), metanol (Kemika), etanol (EtOH, Lach-Ner), magnezijev sulfat ( $\text{MgSO}_4$ , Merck, Sigma Aldrich), natrijev tetrahidroborat ( $\text{NaBH}_4$ , Alfa Aeser), 1-fenilmetanamin (benzil-amin, Sigma Aldrich), tritilamin (Sigma Aldrich), 2-trifluoroetanol ( $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , Merck), (diacetoksijod)benzen (PIDA, Sigma Aldrich), natrijev cijanoborhidrid ( $\text{NaCNBH}_3$ , Combi Blocks), trietilamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ , TCI), tetrahidrofuran (THF, suhi, Lach Ner), etil-4-bromkrotonat (TCI), piridin (Kemika), metil-kloroformat (Sigma Aldrich), dietil-eter ( $\text{Et}_2\text{O}$ , Acros Organics), (4-bromfenil)hidrazin (Combi Blocks), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ , Lach Ner), trifluoroctena kiselina (TFA, Merck), *n*-propilamin (Sigma Aldrich), kalijev fosfat ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ , Acros Organics), (*R,R*)-Me-THQphos (L2, CAS: 1186392-43-7, Strem Chemical), benzilamin (Sigma Aldrich), fosforov triklorid ( $\text{PCl}_3$ , Merck), toluen (suhi, Acros Organics), binol (*R*-binol, Combi-Blocks), diizobutilaluminijev hidrid (DIBAL-H, u heksanu,  $1\text{ mol dm}^{-3}$ , Acros Organics), Rochelleova sol ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Merck), iridijev katalizator ( $[\text{Ir}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ , TCI), 4-klor-7*H*-pirolopirimidin (Combi Blocks), 4-metoksibenzilamin (Sigma Aldrich), kalijev karbonat ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Kemika), 1,4-dioksan (Kemika), 3-bromimidazo[1,2-*b*]piradazin (Combi Blocks), etinil(trimetil)silan (Fluorochem), paladijev katalizator ( $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ , Apollo Scientific), bakrov(I) jodid ( $\text{CuI}$ , Sigma Aldrich), dicikloheksilamin (Sigma Aldrich), *N*-bromsukcinimid (NBS, Combi Blocks), acetonitril (ACN, Alfa Aeser), 1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-amin (Sigma Aldrich), *N*-jodsukcinimid (NIS, Combi Blocks), 5-jod-4-klor-5*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin (Apollo Scientific), benzensulfonil klorid ( $\text{PhSO}_2\text{Cl}$ , Acros Organics), natrijev hidrid ( $\text{NaH}$ , TCI), fenilboronska kiselina (Combi Blocks), tetrabutilamonijev fluorid (TBAF u THF,  $1\text{ mol dm}^{-3}$ , Fluorochem), dimetil sulfoksid (DMSO, Kemika), 2-(trimetilsilil)etoksimetil klorid (SEM, Combi-Blocks), *trans*-1,2-cikloheksandiamin (TCI), tri-*tert*-butilfosfin ( $\text{P}(t\text{-Bu})_3$ , ABCR), natrijev izobutoksid (*i*-BuONa,

Acros Organics), 4-*tert*-butil-2-(4-*tert*-butil-2-piridil)pirimidin (Fluorochem), amonijak (NH<sub>3</sub>(aq), Lach-Ner) etil-acetat (EtOAc, Kemika), diklormetan (DCM, Kemika/Lach Ner), cikloheksan (Kemika/Lach Ner), deuterirani dimetil sulfoksid (DMSO-*d*<sub>6</sub>, Eurisotop), deuterirani kloroform (CDCl<sub>3</sub>, Eurisotop), deuterirani metanol (CD<sub>3</sub>OD, Eurisotop), natrijev sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Lach Ner).

Spojevi pripremljeni u okviru ovog diplomskog rada identificirani su spektroskopskim metodama (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS).

Tijek reakcije, sastav i čistoća sintetiziranih spojeva praćeni su pomoću tankoslojne kromatografije (TLC) i tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute s masenim detektorom (UPLC-MS/UV). TLC je provedena na TLC folijama (Silica Gel 60 F<sub>254</sub> aluminium sheets, Merck) uz detekciju UV lampom (254 nm). UPLC-MS/UV analize provedene su na Waters Acquity sustavu spregnutim s SQD spektroskopom masa. Korištene LC metode opisane su u odlomku 3.2.

Čišćenja spojeva provedena su korištenjem purifikacijskog sustava (Interchim, PuriFlash xs 520 Plus). Korištene su Interchim puriflash SiHC (4 g - 40 g; 15 μM - 25 μM) kolone. Sustavi otapala navedeni su u eksperimentalnim procedurama.

Sintetizirani spojevi identificirani su spektroskopijom nuklearne magnetske rezonance (NMR). <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker DPX 300 MHz (opremljen s RT 5 mm BBI probom), Bruker AV400 MHz (opremljen s RT 5mm BBO probom), Bruker DRX 500 MHz (opremljen s RT 5 mm SEI i TXI probama) i Bruker Avance III 600 MHz (opremljen s 5 mm RT BBI probom). Spektri su snimljeni pri 25 °C u deuteriranim otapalima. Relativni pomaci izraženi su u ppm prema tetrametilsilanu (TMS) kao unutarnjem standardu.

### 3.2. Opis korištenih UPLC-MS/UV metoda i kiralni HPLC metoda

UPLC analize su provedene na instrumentu Waters Acquity UPLC spregnutim sa SQD spektrometrom masa. Postavke instrumenta i metode korištene za analizu opisane su u daljnjem tekstu.

#### Uvjeti detektora:

UV detektor:

- PDA raspon: 210 – 340 nm (UV-TIC spektar je zbroj signala od 210 – 340 nm)
- akvizicija 40 Hz

MS detektor:

- ionizacijski mod: pozitivan i negativan alternirajući elektrosprej (ESI<sup>+</sup>/ESI<sup>-</sup>)
- raspon masa: 90 – 1000 AMU
- scan vrijeme: 0,15 s
- *interscan* kašnjenje: MS *interscan* - 0,02 s
- napon na kapilari: 3,00 kV; napon na stošcu (*cone*): 33,00 V; ekstraktor: 3,00 V
- RF leće: 0,2 V
- temperatura izvora (*source temperature*): 150 °C;
- desolvacijska temperatura: 350 °C;
- protok desolvacijskog plina: 750 L h<sup>-1</sup>;
- protok plina na stošcu (*cone gas flow*): 70 L h<sup>-1</sup>
- LM 1 rezolucija: 15,0; HM 1 rezolucija: 15,0

### 3.2.1. UPLC-MS/UV High pH (2 min)

Kolona: BEH-C18 kolona (1,7µm , 2,1 × 50 mm), Aquity

Temperatura: 25 °C

Mobilna faza: A (0,05 % v/v otopina amonijaka u vodi)

B (0,03 % v/v otopina amonijaka u ACN)

Protok: 0,9 mL/min

Injekcijski volumen: 2 µL

Diulent: ACN

Detektor: UV detektor, MS detektor

Trajanje analize: 2 min (+ 0,5 min za kondicioniranje kolone i + 0,5 min za ispiranje kolone koje nisu uključene u trajanje analize)

### 3.2.2. UPLC-MS/UV Low pH (2 min)

Kolona: BEH-C18 kolona (1,7µm , 2,1 × 50 mm), Aquity

Temperatura: 25 °C

Mobilna faza: A (0,1 % v/v otopina HCOOH u vodi)

B (0,1 % v/v otopina HCOOH u ACN)

Gradijent: 97 % A, 3 % B do 97 % B do 1,5 min

Protok: 0,9 mL/min

Injekcijski volumen: 2  $\mu$ L

Diulent: ACN

Detektor: UV detektor, MS detektor

Trajanje analize: 2 min (+ 0,5 min za kondicioniranje kolone i + 0,5 min za ispiranje kolone koje nisu uključene u trajanje analize)

Tablica 2. Gradijent UPLC metoda za dvominute metode pri visokom i niskom pH

Vrijeme/min	%A	%B
0	97	3
1,5	3	97
1,9	3	97
2,0	97	3

### 3.2.3. UPLC-MS/UV High pH (8 min)

Kolona: BEH-C18 kolona (1,7  $\mu$ m , 2,1  $\times$  100 mm), Aquity

Temperatura: 25 °C

Mobilna faza: A (0,05 % v/v otopina amonijaka u vodi)

B (0,03 % v/v otopina amonijaka u ACN)

Protok: 0,6 mL/min

Injekcijski volumen: 2  $\mu$ L

Diulent: ACN

Detektor: UV detektor, MS detektor

Trajanje analize: 8 min (+ 0,5 min za kondicioniranje kolone i + 0,5 min za ispiranje kolone koje nisu uključene u trajanje analize)

#### 3.2.4. UPLC-MS/UV Low pH (8 min)

Kolona: BEH-C18 kolona (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1  $\times$  100 mm), Aquity

Temperatura: 25 °C

Mobilna faza: A (0,1 % v/v otopina HCOOH u vodi)

B (0,1 % v/v otopina HCOOH u ACN)

Protok: 0,6 mL/min

Injekcijski volumen: 2  $\mu\text{L}$

Diulent: ACN

Detektor: UV detektor, MS detektor

Trajanje analize: 8 min (+ 0,5 min za kondicioniranje kolone i + 0,5 min za ispiranje kolone koje nisu uključene u trajanje analize)

Tablica 3. Gradijent UPLC metode za osmominutne metode pri visokom i niskom pH

Vrijeme/min	%A	%B
0	97	3
7	3	97
7,5	3	97
8	97	3

#### 3.2.5. Kiralni HPLC

Kiralni HPLC analize su provedene na instrumentu Agilent 1100. Postavke instrumenta i metode korištene za analizu opisane su u daljnjem tekstu.

##### Uvjeti detektora:

UV detektor:

- PDA raspon: 200 – 400 nm

- akvizicija 40 Hz

Kolona: Tablica 4.

Temperatura: 25 °C

Mobilna faza: A (n-heptan)

B (izopropanol)

Protok: Tablica 4.

Injekcijski volumen: Tablica 4.

Elucijski mod: izokratično 2% B

Detektor: UV detektor

Tablica 4. Varirani parametri u kiralnoj kromatografiji

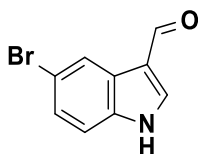
Metoda	Kolona	protok / mL min <sup>-1</sup>	injekcijski volumen / μL	λ / nm
I	Diacel Chiralpak IA 5 μm, 4,6 x 250 mm	1.5	25	210, 254, 270
II	Diacel Chiralpak IC 5 μm, 4,6 x 250 mm	0.5	25	230, 254, 270
III	Diacel Chiralpak IG 5 μm, 4,6 x 250 mm	0.5	20	230, 254, 271
IV	Diacel Chiralpak IG 5 μm, 4,6 x 250 mm	0.5	20	230, 254, 272
V	Diacel Chiralpak IG 5 μm, 4,6 x 250 mm	0.5	25	230, 254, 273

### 3.3. Računalne metode

Dostupne kristalne strukture preuzete su iz PDB baze proteinskih struktura (eng. *Protein Data Bank*). Za molekulsko uklapanje (engl. *docking*) analoga ponatiniba korištena je X-ray struktura ABL-kinaze (PDB ID: 3OXZ) u kojoj je DFG motiv okrenut prema van („*DFG-out*“ konformacija; tip II). Za uklapanje analoga PP2 liganda korištena je X-ray struktura SRC-kinaze u kojoj je DFG motiv okrenut prema unutra (PDB ID: 3GEQ) („*DFG-in*“ tip I). Molekulsko uklapanje liganada u enzime provedeno je pomoću programskog paketa Schrodinger, koristeći Glide docking protokol s velikom preciznošću (XP precision) te uz ograničenje stvaranja vodikovih veza (eng. *hinge H-bond constrain*). Ligand-protein vezne poze su dodatno minimizirane s fleksibilnim bočnim ograncima na udaljenosti od 5Å, te je vezna energija procijenjena MM-GBSA metodom koristeći OPLS3 polje sila. Za usporedbu dizajniranih spojeva korišten je parametar *Gscore* (eng. *Glide Score*), empirijska funkcija koja aproksimira slobodnu energiju vezanja liganda.<sup>28</sup>

### 3.4. Priprava *N*-benzil-6-brom-4-vinil-1,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -karbolina

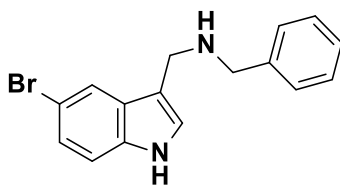
#### 3.4.1. Priprava 5-brom-1*H*-indol-3-karbaldehida (**1**)<sup>29</sup>

**1**

U suhu, dvogrlu tikvicu opremljenu lijevkom za dokapavanje i septumom, pod atmosferom argona na ledenoj kupelji pripremljena je otopina  $\text{POCl}_3$  (8,16 mmol) u DMF (2,55 mL) te je u nju dokapana otopina 5-bromindola (1,6 g, 8,16 mmol) u DMF (16 mL). Ledena kupelj je uklonjena i reakcijska smjesa miješana je na 35°C. Nakon sat vremena reakcijska smjesa je ohlađena, oprezno dokapana u smjesu vode i leda te je zaljučena do pH = 10 pomoću NaOH (1 mol  $\text{dm}^{-3}$ , ~ 40 mL). Nastali talog je odfiltriran, ispran destiliranom vodom i osušen pri 50 °C u vakuumskom sušioniku. Nakon sušenja dobiveno je 1,69 g ( $\eta = 92,4\%$ ) produkta **1** u obliku žutog praha. Sirovi produkt **1** je bez dodatnog pročišćavanja korišten u sljedećem reakcijskom koraku. NMR karakterizacija produkta (dodatak 1) odgovara podacima iz literature.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ /ppm: 12,30 (s, 1H), 9,27 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,22 (d, 1H,  $J = 1,9$  Hz), 7,49 (d, 1H,  $J = 8,8$  Hz), 7,39 (dd, 1H,  $J_1 = 8,8$  Hz,  $J_2 = 2,0$  Hz). UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t = 0,88$  min,  $m/z = 225.01$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 3.4.2. Priprava *N*-benzil-5-brom-1*H*-indol-3-metanamina (**2**)<sup>30</sup>

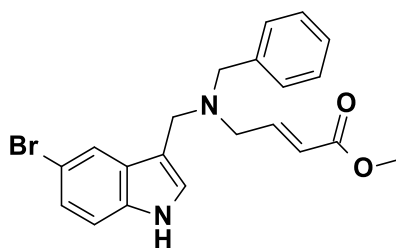
**2**

U otopinu spoja **1** (1,32 g, 5,91 mmol),  $\text{MgSO}_4$  (3,56 g, 29,5 mmol) i toluena (30 mL) dodan je benzilamin (1 mL, 8,86 mmol). Reakcijska smjesa je refluksirana preko noći. Nakon završetka reakcije otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je otopljen u metanolu (30 mL) te je dodan  $\text{NaBH}_4$  (0,34 g, 8,86 mmol) u manjim porcijama. Nakon 6 sati miješanja na sobnoj temperaturi reakcija je zaustavljena dodatkom vode (10 mL).

Metanol je uparen pod sniženim tlakom, a preostala vodena faza je ekstahirana s EtOAc ( $3 \times 20$  mL). Spojeni organski slojevi sušeni su bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a nakon filtriranja otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču te je dobiveno 2,02 g sirovog produkta **2** u obliku smeđeg viskoznog ulja koje je korišteno u sljedećem koraku bez dodatnog pročišćavanja. NMR karakterizacija produkta odgovara podacima iz literature.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ /ppm: 7,70 (s, 1H), 7,40-7,20 (m, 5H), 7,10 (s, 1H), 4,90 (s, 2H), 3,70 (s, 2H). UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t = 1,22$  min,  $m/z = 314,97$  [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.4.3. Priprava N-benzil-5-brom-N-(metil-but-2-en-oksikarbonil)-1H-indol-3-metanamina (**3**)<sup>30</sup>

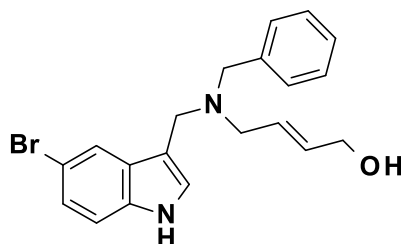


**3**

Otopina spoja **2** (2,02 g, 6,39 mmol) i Et<sub>3</sub>N (1,07 mL, 7,67 mmol) u suhom THF (75 mL) ohlađena je ledenom kupelji i dodan je etil-4-bromkrotonat (1,6 mL, 1,35 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču te je dobivena smjesa suspendirana u zasićenoj vodenoj otopini NaHCO<sub>3</sub>. Vodena faza je ekstahirana pomoću EtOAc ( $3 \times 50$  mL). Spojeni organski slojevi isprani su zasićenom otopinom NaCl (aq, 50 mL) te sušeni nad bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je brzom kolonskom kromatografijom (Interchim, 40 g 25  $\mu$ m SiO<sub>2</sub> kolona, slabi eluens: ciklohesan, jaki eluens: EtOAc, 0  $\rightarrow$  40 % jakog eluensa) pri čemu je dobiveno 1,47 g ( $\eta = 56$  %) produkta **3** u obliku smeđeg viskoznog ulja. NMR karakterizacija produkta odgovara podacima iz literature.

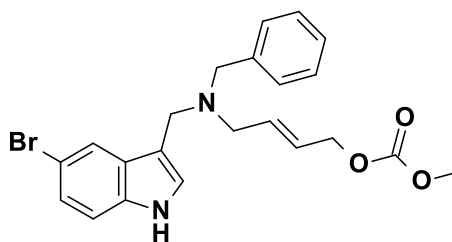
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ /ppm: 11,15 (s, 1H), 7,68 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz), 7,38-7,22 (m, 7H), 7,17 (dd, 1H,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,9$  Hz), 6,90 (dt, 1H,  $J_1 = 15,7$  Hz,  $J_2 = 5,8$  Hz), 6,09-6,01 (m, 1H), 3,69-3,61 (m, 5H), 3,57 (s, 2H), 3,19 (dd, 2H,  $J_1 = 5,9$  Hz,  $J_2 = 1,1$  Hz). UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t = 1,44$  min,  $m/z = 414,98$  [M+H]<sup>+</sup>



3.4.4. Priprava N-benzil-5-brom-N-(4-hidroksi-but-2-enil)-1H-indol-3-metanamina (**4**)<sup>30</sup>**4**

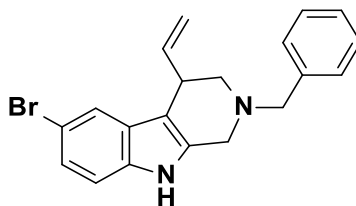
Otopina spoja **3** (1,47 g, 3,56 mmol) u suhom toluenu (40 mL) ohlađena je -78 °C pomoću otopine CO<sub>2</sub> u acetonu. Pod atmosferom argona, u otopinu je dokapan DIBAL-H (10 mL, 8,9 mmol) održavajući temperaturu ispod -70 °C. Nakon 2 sata miješanja na -70 °C, reakcija je zaustavljena dodatkom Rochelleove soli te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi preko noći. Vodena faza ekstrahirana je pomoću EtOAc (3×30 mL) te su spojeni organski slojevi isprani zasićenom otopinom NaCl (50 mL) i sušeni na bezvodnom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom te je dobiven sirovi produkt koji je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (Interchim, 25 g 15 μM SiO<sub>2</sub> kolona, slabi eluens: DCM, jaki eluens: DCM : MeOH = 10 : 1, 0 → 50 % jakog eluensa). Pročišćavanjem je dobiveno 1,21 g produkta **4** ( $\eta$  = 88 %) u obliku smeđeg viskoznog ulja. NMR karakterizacija produkta (dodatak 2) odgovara podacima iz literature.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ /ppm: 11,12 (s, 1H), 7,69 (d, 1H,  $J$  = 1,8 Hz), 7,37-7,21 (m, 7H), 7,17 (dd, 1H,  $J_1$  = 8,8 Hz,  $J_2$  = 2,0 Hz), 5,73-5,67 (m, 2H), 4,67 (t, 1H,  $J$  = 5,5 Hz), 3,97-3,91 (m, 2H), 3,63 (s, 2H), 3,51 (s, 2H), 3,02-2,96 (m, 2H). UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t$  = 1,25 min,  $m/z$  = 387,02 [M+H]<sup>+</sup>.

3.4.5. Priprava N-benzil-5-brom-N-[4-(metoksikarboniloksi)-but-2-enil]-1H-indol-3-metanamina (**5**)<sup>30</sup>**5**

U otopinu spoja **4** (1,21 g, 3,15 mmol) i piridina (0,51 mL, 6,3 mmol) u smjesi suhog etera i diklormetana (Et<sub>2</sub>O : DCM = 1 : 1, 15 mL) dokapana je otopina metil kloroformata (0,37 mL, 4,725 mmol) u eteru (1 mL) na 0°C. Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi preko noći. Reakcija je zaustavljena dodatkom vode (10 mL) i NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) te je vodena faza ekstrahirana s EtOAc. Spojeni organski slojevi isprani su zasićenom vodenom otopinom NaCl te su sušeni bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i filtrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom pri čemu je dobiveni sirovi produkt koji je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (Interchim, 25 g 15μM SiO<sub>2</sub> kolona, slabi eluens: DCM : EtOAc = 1 : 1, jaki eluens: DCM : EtOAc = 4 : 1, 0 → 20 % jakog eluensa). Pročišćavanjem je dobiveno 691 mg spoja **5** ( $\eta$  = 50 %) u obliku žutog viskozno ulja. NMR karakterizacija produkta (dodatak 3) odgovara podacima iz literature.

<sup>1</sup>H NMR (500 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ /ppm: 11,13 (bs, 1H), 7,67 (bs, 1H), 7,37-7,29 (m, 6H), 7,28-7,22 (m, 1H), 7,17 (dd, 1H,  $J_1$  = 8,7 Hz,  $J_2$  = 1,9 Hz), 5,93-5,85 (m, 1H), 5,79-5,71 (m, 1H), 4,59 (d, 2H,  $J$  = 6,3 Hz), 3,68 (bs, 3H), 3,63 (bs, 2H), 3,51 (bs, 2H), 3,02 (d, 2H,  $J$  = 6,3 Hz). UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t$  = 1,43 min,  $m/z$  = 445,01 [M+H]<sup>+</sup>.

3.4.6. Priprava N-benzil-6-brom-4-vinil-1,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -karbolina (**6**)<sup>23</sup>**6**

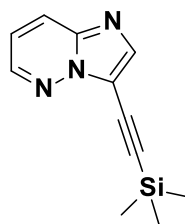
U suhoj Schlenk reakcijskoj posudi pod atmosferom argona u smjesi suhog THF (2 mL) i *n*-propilamina (1 mL) otopljeni su [Ir(cod)Cl]<sub>2</sub> (40 mg, 0,059 mmol) i (R,Ra)-Me-THQphos ligand (53 mg, 0,115 mmol). Nastala otopina miješana je sat vremena na 50°C nakon čega su otapala uklonjena pomoću vodne sisaljke te je dobiven Ir-ligand kompleks.

Otodina spoja **5** (517 mg, 1,17 mmol) u suhom THF (8 mL) i K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (500 mg, 2,35 mmol) pod strujom argona dodani su u Schlenk te je dobivena reakcijska smjesa miješana na 50°C preko noći. Reakcijska smjesa filtrirana je preko dijatomejske zemlje, a otapala su uparena na rotacijskom uparivaču pri čemu je dobiven sirovi produkt koji je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (Interchim, SiO<sub>2</sub> kolona, 12 g, 15 $\mu$ M, slabi eluens: cikloheksan, jaki eluens: cikloheksan : EtOAc = 2:1, 0  $\rightarrow$  20 % jakog eluensa). Pročišćavanjem je dobiveno 156 mg spoja **6** ( $\eta$  = 36 %) u obliku blijedo žute krutine. Snimljeni su <sup>1</sup>H (dodatak 4) i <sup>13</sup>C NMR te dvodimenzijски COSY, HSQC i HMBC spektar produkta **6**. NMR karakterizacija produkta odgovara podacima iz literature.

<sup>1</sup>H NMR **6** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 7,72 (bs, 1H), 7,64 (bs, 1H), 7,41-7,27 (m, 5H), 7,20 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,7 Hz, J<sub>2</sub> = 1,9 Hz), 7,16-7,12 (m, 1H), 5,96-5,87 (m, 1H), 5,27 (d, 1H, J = 17,4 Hz), 5,18-5,14 (m, 1H), 3,81-3,58 (m, 5H), 3,01-2,94 (m, 1H), 2,67-2,61 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR **6** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ /ppm: 39 (s), 51 (t), 57,5 (t), 63 (t), 78 (s), 110 (s), 113 (s), 113 (d), 116 (d), 122 (d), 124,5 (d), 128 (d), 129,2 (d), 129,5 (s), 129,7 (d), 134 (s), 135,2 (s), 138 (s), 140 (s). UPLC-MS/UV (2 min, high pH): R<sub>t</sub> = 1,49 min, m/z = 368,97 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.5. Priprava analoga Ponatiniba

#### 3.5.1. Priprava 3-[(trimetilsilil)etnil]imidazo[1,2-b]piridazina (**7**)<sup>31</sup>

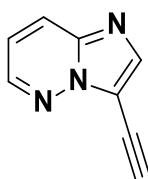


**7**

U smjesu 3-bromimidazo[1,2-b]piridazina (1 g, 5,05 mmol), CuI (34 mg, 0,176 mmol), etnil(trimetil)silana (1,4 mL, 10,1 mmol) i dicikloheksilamina (1,1 mL, 5,55 mmol) u acetonitrilu (10 mL) pod atmosferom argona dodan je Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (89 mg, 0,126 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na 80 °C. Reakcijska smjesa je prebačena u lijevak za odjeljivanje, dodana je smjesa vode i 25 % NH<sub>4</sub>OH<sub>(aq)</sub> (1/1, 30 mL) te je vodeni sloj ekstrahiran DCM (4×15 mL). Spojeni organski slojevi sušeni su bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i filtrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je izolirano 1,18 g sirovog produkta **7** koji je korišten u sljedećem koraku bez dodatnog pročišćavanja.

UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t = 1,09$  min,  $m/z = 216,09$  [M+H]<sup>+</sup>.

#### 3.5.2. Priprava 3-etnilimidazo[1,2-b]piridazina (**8**)<sup>31</sup>



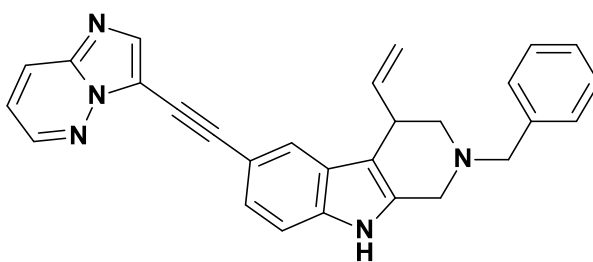
**8**

U otopinu spoja **7** (1,18 g, 5,47 mmol) u THF (30 mL) dodana je 1 mol dm<sup>-3</sup> otopina TBAF u THF (6,36 mL, 6,36 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 2 sata. Otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču te je dodana voda (50 mL). Vodeni sloj je ekstrahiran pomoću etil-acetata (3 × 25 mL). Spojeni organski slojevi isprani su zasićenom otopinom NaCl i sušeni su bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i filtrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je dobiven sirov produkt koji je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (Interchim, 25 g 15 μM SiO<sub>2</sub> kolona, slabi eluens; cikloheksan,

jaki eluens: EtOAc, 0 → 50 % jakog eluensa). Pročišćavanjem je dobiveno 310 mg spoja **8** ( $\eta = 39,6\%$ ) u obliku sive krutine. NMR karakterizacija produkta (dodatak 5) odgovara podacima iz literature.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 8,66 (dd, 1H,  $J_1 = 4,5$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz), 8,22 (dd, 1H,  $J_1 = 9,2$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz), 8,11 (s, 1H), 7,39-7,31 (m, 1H), 4,95 (bs, 1H), UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t = 0,58$  min,  $m/z = 144$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

3.5.3. Priprava *N*-benzil-6-(2-imidazo[1,2-*b*]piridazin-3-il-etinil)-4-vinil-1,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -karbolina (**9**)<sup>32</sup>



**9**

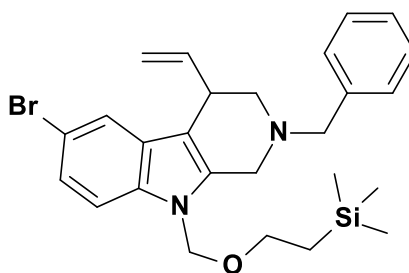
Pod atmosferom argona spojevi **6** (25 mg, 0,068 mmol) i **8** (49 mg, 0,340 mmol) su otopljeni u DMSO (1,5 mL) te je dodan  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,3 mL). Nakon što je nastala otopina propuhana argonom u nju su dodani CuI (5 mg, 0,027 mmol) i  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (10 mg, 0,0014 mmol). Reakcijska smjesa je miješana preko noći na  $95^\circ\text{C}$ . Reakcijska smjesa prebačena je u lijevak za odjeljivanje, dodani su  $\text{NaHCO}_3$  i  $\text{NH}_4\text{OH}$  te je vodeni sloj ekstahiran etil-acetatom. Spojevi organski slojevi isprani su zasićenom otopinom NaCl, sušeni bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i filtrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču te je dobiveni sirovi produkta pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (Interchim, 4 g  $15 \mu\text{M}$   $\text{SiO}_2$  kolona, slabi eluens: DCM, jaki eluens: DCM : MeOH = 10:1, 0 → 40% jakog eluensa). Pročišćavanjem je dobiveno 12,9 mg ( $\eta = 44\%$ ) produkta **9** u obliku narančaste krutine. Snimljeni su  $^1\text{H}$  (dodatak 6) i  $^{13}\text{C}$  NMR te dvodimenzijski COSY, HSQC i HMBC spektri produkta **9**.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 11,14 (s, 1H), 8,67 (dd, 1H,  $J_1 = 4,5$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz), 8,21 (dd, 1H,  $J_1 = 9,2$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz), 8,13 (m, 1H), 7,61 (bs, 1H), 7,40-7,32 (m, 6H), 7,30-7,26 (m, 1H), 7,24 (dd, 1H,  $J_1 = 8,2$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz), 5,96-5,89 (m, 1H), 5,33-5,29 (m, 1H), 5,11 (dd, 1H,  $J_1 = 10,0$  Hz,  $J_2 = 2,2$  Hz), 3,74 (q, 2H,  $J = 13,7$  Hz), 3,69-3,65 (m, 1H), 3,59 (q, 2H,  $J = 14,3$  Hz), 2,87 (dd, 1H,  $J_1 = 11,5$  Hz,  $J_2 = 5,0$  Hz), 2,61-2,57 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (500

MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ /ppm: 38 (d), 40 (t), 50 (t), 56,5 (t), 61,5 (t), 112 (d), 112,2 (s), 115,7 (s), 119 (d), 122 (d), 122,7 (s), 124 (d), 126,2 (d), 126,9 (s), 127,5 (d), 128,7 (d), 128,7 (s), 129,1 (s), 129,2 (d) 129,7 (s), 137,5 (d), 138,2 (s), 141,1 (d), 145,2 (s) UPLC-MS/UV (8 min, low pH):  $R_t = 3,31$  min,  $m/z = 430,49$  [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.6. Priprava analoga PP2

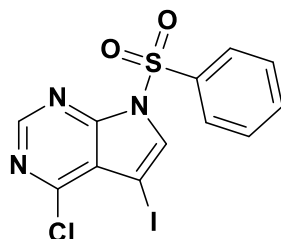
#### 3.6.1. Priprava N-benzil-6-brom-9-[(2-(trimetilsilil)etoksi)metil]-4-vinil-1,3,4-trihidro- $\beta$ -karbolina **10**<sup>33</sup>



**10**

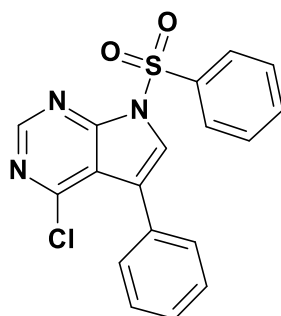
Otopina spoja **6** (100 mg, 0,272 mmol) u DMF (6 mL) ohlađena je ledenom kupelji te je pod atmosferom argona dodan NaH (10 mg, 0,436 mmol). Nakon dva sata miješanja na sobnoj temperaturi, reakcijska smjesa je ponovno ohlađena ledenom kupelji te je dokapan SEM-Cl (75  $\mu$ L, 0,408 mmol). Miješanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi te je nakon tri sata reakcija zaustavljena dodatkom vode (1 mL). Reakcijska smjesa prebačena je u lijevak za odjeljivanje, dodana je voda (60 mL) te je vodeni sloj ekstahiran etil-acetatom (3  $\times$  20 mL). Spojeni organski slojevi isprani su zasićenom otopinom NaCl te su sušeni bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i filtrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je dobiven sirovi produkt koji je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (Interchim, 4 g 15  $\mu$ M SiO<sub>2</sub> kolona, slabi eluens: cikloheksan, jaki eluens: EtOAc, 0  $\rightarrow$  40 % jakog eluensa). Pročišćavanjem je izolirano 46,6 mg spoja **10** ( $\eta = 34,5\%$ ) u obliku žutog viskoznog ulja te 34,6 mg početnog spoja **6**. Snimljen je <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **10** (dodatak 7).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  /ppm: 7,55-7,49 (m, 2H), 7,42-7,16 (m, 7H), 5,94-5,79 (m, 1H), 5,40 (s, 2H), 5,26 (d, 1H,  $J = 16,9$  Hz), 5,13-5,05 (m, 1H), 3,81-3,57 (m, 5H), 2,85-2,76 (m, 1H), 2,62-2,55 (m, 1H), 0,75 (t, 2H,  $J = 7,8$  Hz), -0,05- -0,16 (m, 9H). UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t = 1,82$  min,  $m/z = 499,13$  [M+H]<sup>+</sup>.

3.6.2. Priprava 7-(benzensulfonil)-5-jod-4-klor-5H-pirololo[2,3-d]pirimidina (**11**)<sup>34</sup>**11**

Otopina 5-jod-4-klor-5H-pirololo[2,3-d]-pirimidina (926 mg, 3,31 mmol) u suhom THF (35 mL) ohlađena je ledenom kupelji te je pod atmosferom argona dodan NaH (200 mg, 8,33 mmol). Nakon sat vremena miješanja na ledenoj kupelji, u reakcijsku smjesu dokapana je otopina benzensulfonil klorid (0,510 mL, 4 mmol) u suhom THF (5 mL). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi preko noći te je zaustavljena dodatkom vode (5 mL). Otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a ostatak je suspendiran u zasićenoj vodenoj otopini NaHCO<sub>3</sub> (80 mL). Vodeni sloj ekstahiran je pomoću EtOAc (3 × 60 mL). Spojeni organski slojevi isprani su zasićenom otopinom NaCl te su sušeni bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i filtrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je izolirano 1,30 g ( $\eta = 93,9\%$ ) sirovog produkta **10** u obliku bijele krutine koji je korišten kao takav u idućem koraku. NMR karakterizacija produkta (dodatak 8) odgovara podacima iz literature.

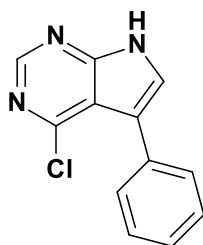
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ /ppm: 8,81 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,22-8,15 (m, 2H), 7,83-7,77 (m, 1H), 7,73-7,64 (m, 2H). UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t = 1,24$  min,  $m/z = 420,32$  [M+H]<sup>+</sup>.

3.6.3. Priprava 7-(benzensulfonil)-5-fenil-4-klor-5H-pirololo[2,3-d]-pirimidina (**12**)<sup>34</sup>**12**

U suhu troglu tikvicu (100 mL) opremljenu septumom i hladilom izvagani su spoj **11** (500 mg, 1,192 mmol), fenilboronska kiselina (188 mg, 1,55 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (210 mg, 3,57 mmol) te su otopljeni u smjesi toluena (20 mL), vode (6 mL) i etanola (3 mL). Nakon što je nastala otopina propuhana argonom u nju je dodan Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (84 mg, 0,1 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na 95 °C preko noći. Reakcijska smjesa prebačena je u lijevak za odjeljivanje, dodan je NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) te je vodeni sloj ekstrahiran etil-acetatom (3 × 25 mL). Spojeni organski slojevi isprani su zasićenom otopinom NaCl, sušeni bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i filtrirani. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je dobiven sirovi produkt koji je pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (Interchim, 12 g 15 μM SiO<sub>2</sub> kolona, slabi eluens: cikloheksan, jaki eluens: EtOAc, 0 → 20 % jakog eluensa). Pročišćavanjem je dobiveno 262,5 mg ( $\eta$  = 59,5%) produkta **12** u obliku bijele krutine. NMR karakterizacija produkta (dodatak 9) odgovara podacima iz literature.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  /ppm: 8,85 (s, 1H), 8,28-8,21 (m, 2H), 8,16 (s, 1H), 7,85-7,77 (m, 1H), 7,75-7,65 (m, 2H), 7,62-7,56 (m, 2H), 7,51-7,42 (m, 3H). UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t$  = 1,37 min,  $m/z$  = 370,06 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 3.6.4. Priprava 5-fenil-4-klor-5H-pirololo[2,3-*d*]-pirimidina (**13**)<sup>34</sup>



### 13

U otopinu spoja **12** (263 mg, 0,71 mmol) u THF (2 mL) dodana je 1 mol dm<sup>-3</sup> otopina TBAF u THF (0,71 mL, 0,71 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 1 h na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa prebačena je u lijevak za odjeljivanje, dodan je NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) te je vodeni sloj ekstrahiran etil-acetatom (3 × 10 mL). Spojeni organski slojevi isprani su zasićenom otopinom NaCl, sušeni su bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i filtrirani. Otapalo je otpareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču te je dobiven sirovi produkt pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (Interchim, 12 g 15 μM SiO<sub>2</sub>, slabi eluens: cikloheksan, jaki eluens: EtOAc

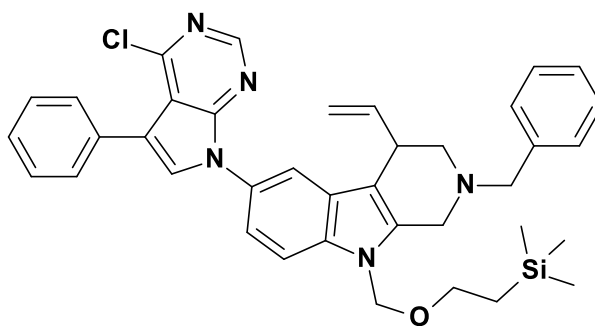


kolona, 0 → 50 % jakog eluensa). Pročišćavanjem je izolirano 135 mg ( $\eta = 83\%$ ) spoja **13** u obliku bijele krutine. NMR karakterizacija produkta (dodatak 10) odgovara podacima iz literature.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 10,37-10,11 (m, 1H), 8,71 (s, 1H), 7,59-7,51 (m, 2H), 7,49-7,36 (m, 4H), UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t = 0,94$  min,  $m/z = 230,41$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

3.6.5. Priprava *N*-benzil-6-(5-fenil-4-klor-pirololo[2,3-*d*]pirimidin-7-il)-9-[(2-(trimetilsilil)etoksi)metil]-4-vinil-1,3,4-trihidro- $\beta$ -karbolina

Sinteza spoja **15** nije bila uspješna. Za formiranje C-N veze isprobano je nekoliko metoda koje uključuju bakar i paladij kao katalizatore.



**15**

Metoda I (Ullmann)<sup>33</sup>:

U otopinu spojeva **10** (10 mg, 0,02 mmol) i **13** (6 mg, 0,024 mmol) u 1,4-dioksanu (0,2 mL) dodan je  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (9 mg, 0,04 mmol) te je dobivena suspenzija propuhana argonom. Pod atmosferom argona dodani su *trans*-1,2-ciklohesandiamin ( $> 1 \mu\text{L}$ , 0,002 mmol) i  $\text{CuI}$  ( $> 1$  mg, 0,002 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na  $110^\circ\text{C}$  18 sati. Nakon analize reakcijske smjese UPLC-MS/UV-om utvrđeno je da nije došlo do nastanka željenog produkta **15**.

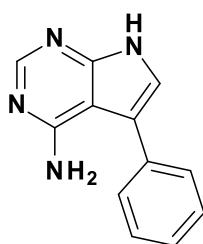
Metoda III (Ullmann)<sup>35</sup>

U otopinu spojeva **10** (10 mg, 0,02 mmol) i **13** (6 mg, 0,024 mmol) u 1,4-dioksanu (0,2 mL) dodan je  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (9 mg, 0,04 mmol) te je dobivena suspenzija propuhana argonom. Pod atmosferom argona dodani su 4,4'-di-*tert*-butil-2,2'-bipiridin ( $> 1 \mu\text{L}$ , 0,002 mmol) i  $\text{CuI}$  ( $> 1$  mg, 0,002 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na  $110^\circ\text{C}$  18 sati. Nakon analize reakcijske smjese UPLC-MS/UV-om utvrđeno je da nije došlo do nastanka željenog produkta **15**.

Metoda II (Buchwald)<sup>36</sup>:

Otopina spojeva **10** (10 mg, 0,02 mmol) i **13** (6 mg, 0,024 mmol) u toluenu (0,2 mL) propuhana je argonom. Pod atmosferom argona dodani su tri-*tert*-butilfosfin ( $>1 \mu\text{L}$ , 0,001 mmol),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  ( $>1 \text{ mg}$ , 0,001 mmol) te natrijev *tert*-butoksid (2,36 mg, 0,024 mmol). Reakcijska smjesa je refluksirana 48 sati. Nakon analize reakcijske smjese UPLC-MS/UV-om utvrđeno je da nije došlo do nastanka željenog produkta **15**.

### 3.6.6. Priprava 4-amin-5-fenil-7H-pirol[2,3-d]pirimidina **14**<sup>34</sup>

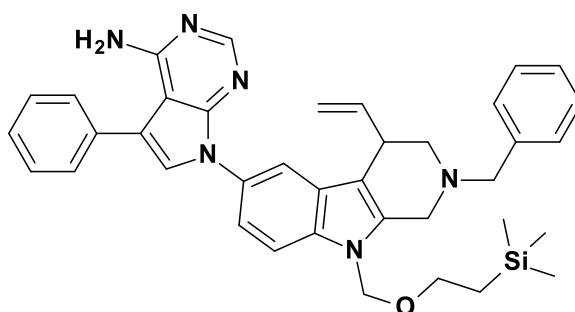


**14**

Otopina spoja **13** (110 mg, mmol) u smjesi 1,4-dioksana i 25 % vodene otopine  $\text{NH}_3$  (3/1, 4 mL) refluksirana je 3 dana. Zatim je dodana nova porcija 25 % vodene otopine  $\text{NH}_3$  (1,5 mL) te je refluksiranje nastavljeno slijedeća 4 dana. Otapalo je otpareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je izolirano 111 mg sirovog produkta u obliku bijele krutine koji je korišten kao takav u sljedećem koraku.

UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t = 0,73 \text{ min}$ ,  $m/z = 211,08 [\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 3.6.7. Pokušaj priprave 7-[N-benzil-9-((2-trimetilsilil)etoksi)metil]-4-vinil-1,3,4, trihidro- $\beta$ -karbolin-6-il]-5-fenil-pirol[2,3-d]pirimidin-4-amina (**16**)



**16**

Metoda I (Ullman)<sup>35</sup>:

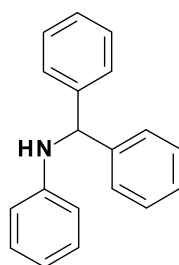
U otopinu spojeva **10** (17 mg, 0,035 mmol) i **14** (10 mg, 0,045 mmol) u 1,4-dioksanu (0,3 mL) dodan je  $K_3PO_4$  (15 mg, 0,07 mmol) te je dobivena suspenzija propuhana argonom. Pod atmosferom argona dodani su *trans*-1,2-ciklohesandiamin ( $>1 \mu L$ , 0,0035 mmol) i CuI ( $>1$  mg, 0,0035 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na  $110^\circ C$  48 sati. Nakon analize reakcijske smjese UPLC-MS/UV-om utvrđeno je da nije došlo do nastanka željenog produkta **16**.

Metoda II (Ullman)<sup>35</sup>:

U otopinu spojeva **10** (10 mg, 0,02 mmol) i **14** (6 mg, 0,024 mmol) u 1,4-dioksanu (0,3 mL) dodan je  $K_3PO_4$  (9 mg, 0,04 mmol) te je dobivena suspenzija propuhana argonom. Pod atmosferom argona dodani su 4,4'-di-*tert*-butil-2,2'-bipiridin ( $>1 \mu L$ , 0,0035 mmol) i CuI ( $>1$  mg, 0,0035 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na  $110^\circ C$  18 sati. Nakon analize reakcijske smjese UPLC-MS/UV-om utvrđeno je da nije došlo do nastanka željenog produkta **16**.

### 3.7. Priprava fosforamiditnog liganda

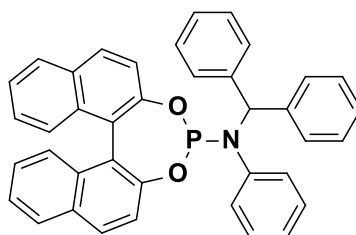
#### 3.7.1. Pregradnja – priprava *N*-benzhidrilanilina<sup>37</sup>



U okrugloj tikvici otopljen je tritil-amin (500 mg, 1,928 mmol) u trifluoro-etanolu ( $CF_3CH_2OH$ , 15 mL). Zatim je u reakcijsku smjesu pri  $0^\circ C$  dodana PIDA (0,810 g, 2,515 mmol). Reakcijska smjesa je miješana dva sata nakon čega je dodan  $NaCNBH_3$  (0,61 g, 9,69 mmol) te je nastavljeno miješanje još dva sata. Reakcija je prekinuta dodatkom  $NaHCO_3$ , reakcijska smjesa prebačena je u lijevak za odjeljivanje te je vodeni sloj ekstahiran pomoću etil-acetata. Spojeni organski slojevi isprani su zasićenom otopinom NaCl te su sušeni na  $Na_2SO_4$ . Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču pri čemu je nastalo 896 mg sirovog produkta koji je zatim pročišćen brzom kolonskom kromatografijom (Interchim,  $SiO_2$  kolona, 12 g  $15 \mu M$   $SiO_2$  kolona, slabi eluens: cikloheksan, jaki eluens: EtOAc,  $0 \rightarrow 0\%$  jakog eluensa). Pročišćavanjem je dobiveno 181,6 mg *N*-benzhidrilanilina ( $\eta = 36,3\%$ ). NMR karakterizacija produkta (dodatak 11) odgovara podacima iz literature.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 7,43-7,36 (m, 4H), 7,35-7,27 (m, 4H), 7,25-7,17 (m, 2H), 7,04-6,96 (m, 2H), 6,67-6,61 (m, 2H), 6,53-6,46 (m, 1H), 6,39 (d, 1H,  $J = 6,9$  Hz), 5,61 (d, 1H,  $J = 7,0$  Hz), UPLC-MS/UV (2 min, high pH):  $R_t$  (A1) = 1,39 min,  $m/z = 258,12$  [M+H] $^+$ ,  $R_t$  (A2) = 1,39 min,  $m/z = 258,08$  [M+H] $^+$

### 3.7.2. Aktivacija N-benzhidrilanilina



L1

#### Metoda I<sup>24</sup>:

U trogloj tikvici opremljenoj termometrom, lijevkom za dokapavanje i septumom otopljen je  $\text{PCl}_3$  (70  $\mu\text{L}$ , 0,011 mmol) u suhom toluenu (4 mL). Cijeli sustav je bio pod atmosferom argona te do dokapana otopina *N*-benzhidrilanilina (182 mg, 0,7002 mmol) i  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,170 mL, 1,173 mmol) u toluenu (2 mL) na 0 °C. Reakcijska smjesa je miješana sat vremena na 0°C, a zatim je zagrijana na 80°C. Nakon 6 sati miješanja reakcijska smjesa ohlađena je na sobnu temperaturu i miješana preko noći. Smjesa je ohlađena na -78 °C pomoću tekućeg dušika te je u reakcijsku smjesu dokapana otopina (R)-BINOL (183,4 mg, 0,64 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,32 mL) u THF (0,6 mL) i toluenu (3 mL). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 48 sati.

#### Metoda II<sup>38</sup>:

U mikrovalnoj vijali napravljena je otopina spoja A1 (0,100 g, 0,39 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (98,9  $\mu\text{L}$ , 1,84 mmol) u THF (2,5 mL). U reakcijsku smjesu na 0°C dodan je  $\text{PCl}_3$  (33,7  $\mu\text{L}$ , 0,39 mmol) te je smjesa refluksirana preko noći.

### 3.7.3. Aktivacija binola

Metoda I<sup>39</sup>:

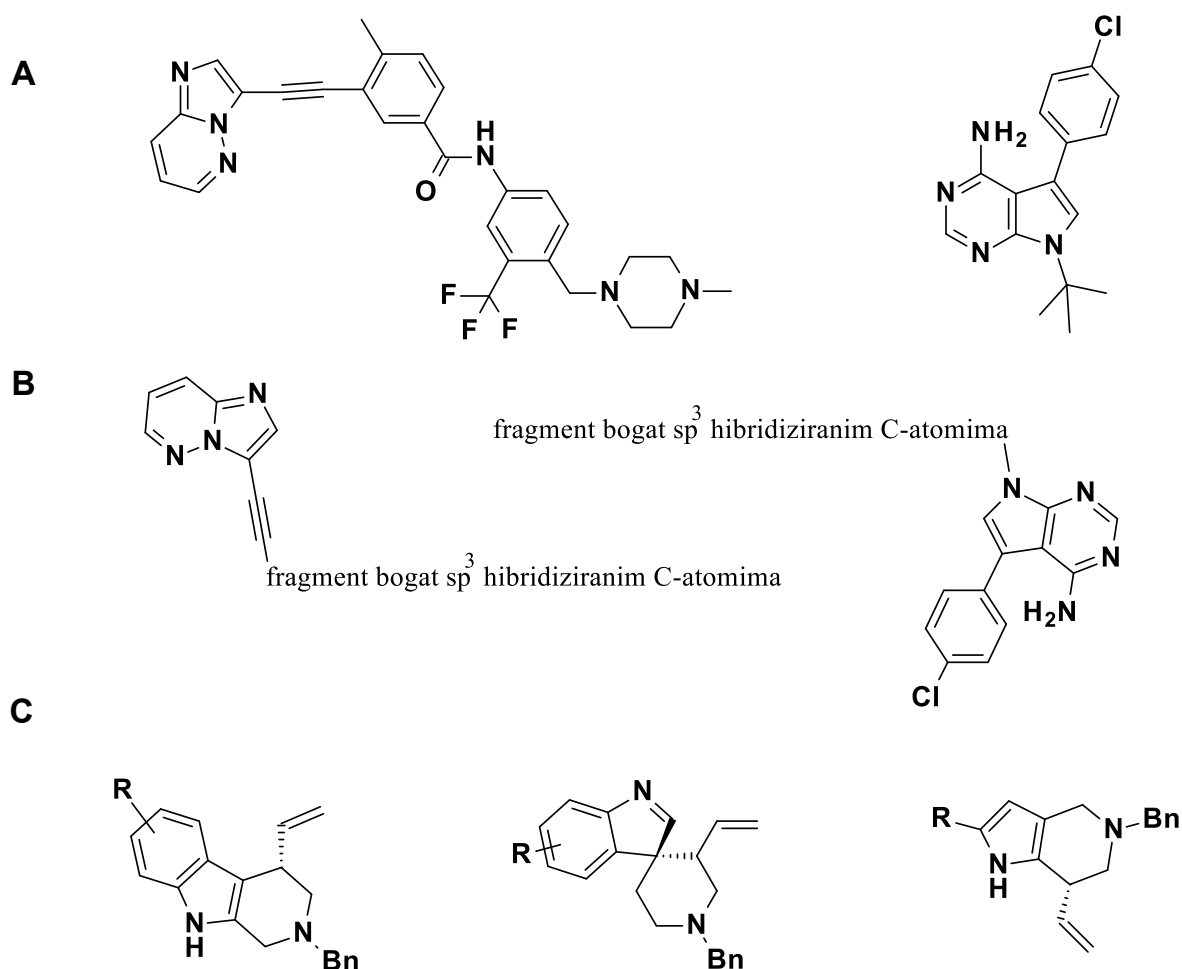
U otopinu (R)-BINOL (110 mg, 0,39 mmol) u toluenu (2 mL) dokapan je PCl<sub>3</sub> (0,44 mL, 5,02 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 24 sata na 76 °C. Reakcijska smjesa razrijeđena je toluenom i višak PCl<sub>3</sub> je uklonjen uparivanjem pomoću argona. U reakcijsku smjesu dodana je otopina *N*-benzhidrilanilina (0,100 g, 0,386 mmol) i Et<sub>3</sub>N (0,108 mL, 0,77 mmol) u suhom THF (2 mL) na 0°C. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi preko noći.

Metoda II<sup>40</sup>:

U otopinu (R)-BINOL (110 mg, 0,39 mmol) i Et<sub>3</sub>N (96,5 mL) u THF (2 mL) u atmosferi argona dokapan je PCl<sub>3</sub> (0,108 mL, 5,02 mmol) na 0 °C. Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi preko noći. U reakcijsku smjesu dodan je toluen, a višak PCl<sub>3</sub> je uklonjen uparivanjem pomoću argona. Zatim je u reakcijsku smjesu dodana otopina *N*-benzhidrilanilina (0,100 g, 0,386 mmol) i Et<sub>3</sub>N (60 µL) u THF (2 mL) te je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 48 h.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

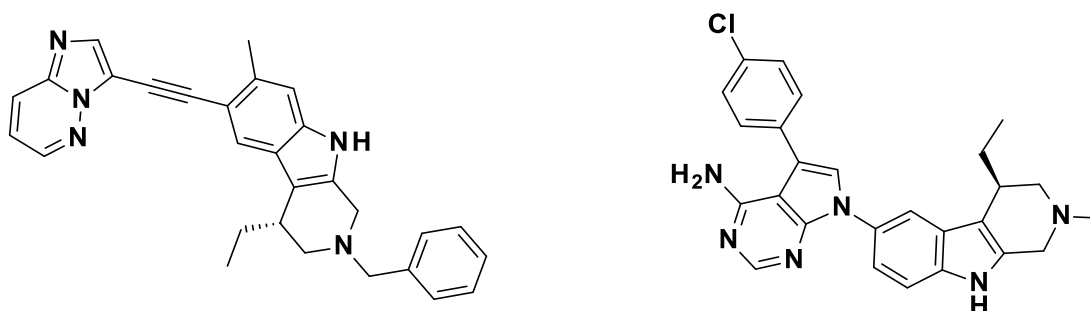
Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti analoge indola bogate  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima korištenjem asimetrične iridijem katalizirane reakcije dearomatizacije te ih povezati s fragmentima koji ostvaruju interakcije s *hinge* regijom SRC-kinaza poznatih inhibitora SRC-kinaze, ponatiniba te PP2 liganda.



Slika 33 (A) Poznati inhibitori SRC-kinaze ponatinib i PP2 ligand, (B) motiv ponatiniba i PP2 liganda koji ostvaruju interakcije s *hinge* regijom, (C) literaturno opisani fragmenti bogati  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima pripremljeni asimetričnom iridijem kataliziranom reakcijom dearomatizacije

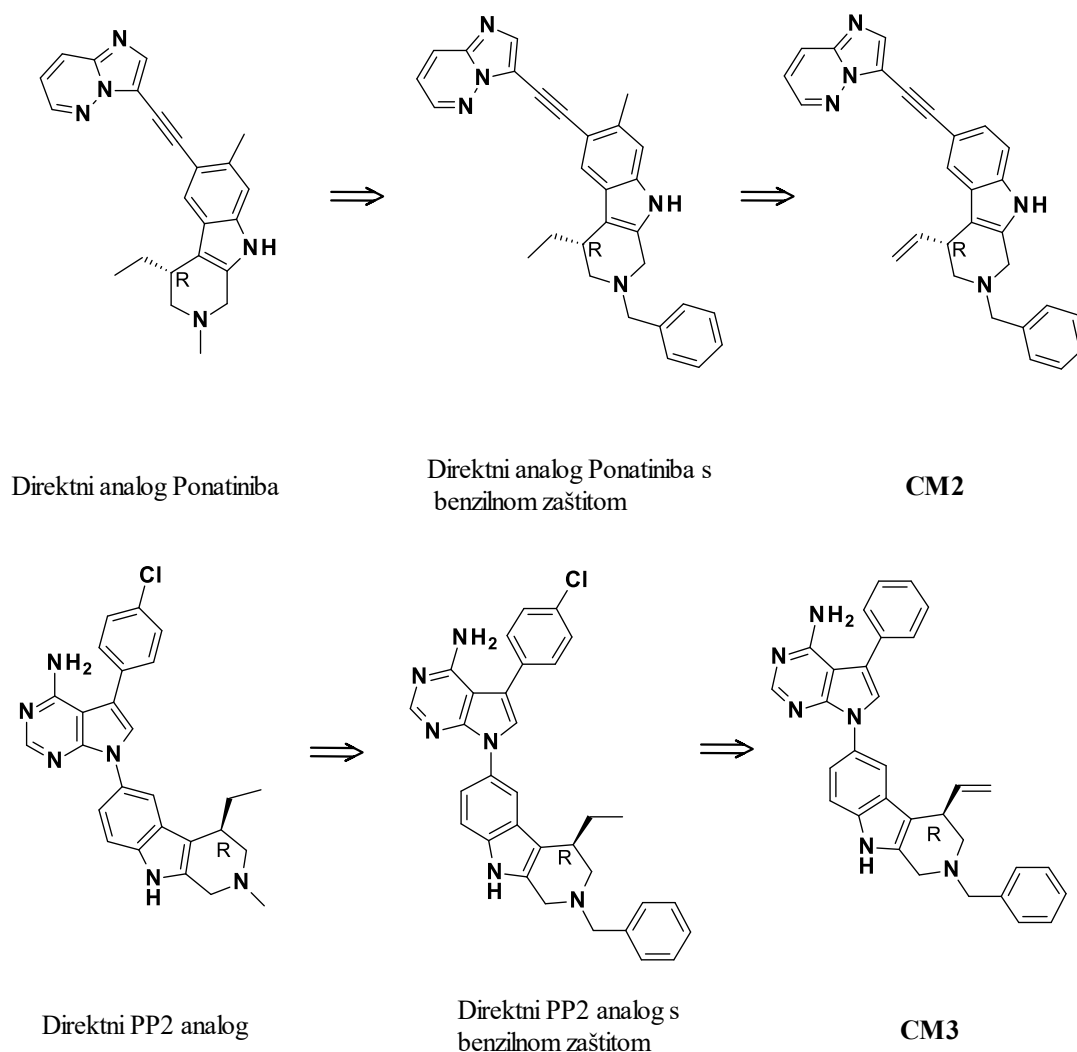
Na temelju analize interakcija ponatiniba s ABL- kinazom i SRC-kinazom te PP2 liganda sa SRC-kinazom dizajnirani su analozi ponatiniba i PP2 liganda bogati  $sp^3$  hibridiziranim C-

atomima te su uklopljeni u aktivno mjesto SRC-kinaze kako je opisano u slijedećem poglavlju. Molekule s najboljom procijenjenom energijom vezanja (eng. *docking score*) prikazane su na slici 34.



Slika 34 Dizajnirani analozi s najboljom procijenjenom energijom vezanja.

Budući da je do sada objavljen opseg iridijem katalizirane reakcije dearomatizacije indola malen, za ovu inicijalnu fazu istraživanja molekule sa slike 34 dodatno su modificirane kako bi se pojednostavila sinteza u svrhu ispitivanja utjecaja uvođenja  $sp^3$  karaktera na aktivnost. S tim je ciljem kod analoga ponatiniba uklonjena metilna skupina s indolnog prstena te je zadržana dvostruka veza na piperidinu, a kod analoga PP2 liganda uz zadržavanje dvostruke veze na piperidinu, *N*-Me skupina zamijenjena je benzilnom (slika 35). Navedene modifikacije dale su ciljane molekule **CM2** i **CM3** koje imaju isti indolni fragment čija je sinteza opisana u literaturi.

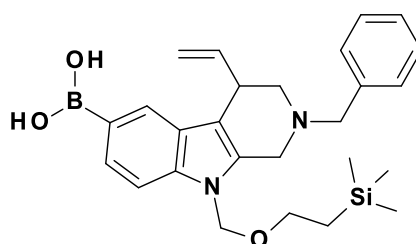


Slika 35 Pojednostavljenje direktnih analoga

Sama sinteza podijeljena je u dva djela. Prvi dio odnosi se na sintezu fragmenta bogatog  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima pomoću iridijem katalizirane reakcije asimetrične dearomatizacije opisane u literaturi. Drugi dio sinteze odnosi se na pripremu mimetika adenina (eng. *hinge binder*) i povezivanje s pripremljenim  $sp^3$  bogatim fragmentom.

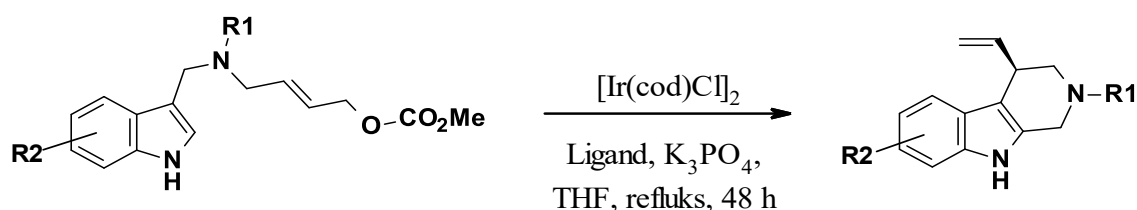
U sklopu ovog diplomskog rada uspješno je pripremljena **CM2**, dok kod pripreme **CM3** povezivanje  $sp^3$  bogatog indolnog fragmenta i fragmenta koji se veže na *hinge* regiju SRC-kinaze korištenjem Pd i Cu- katalizirane aminacije nije bilo uspješno. Pokušaj optimizacije Ullman reakcije nije bio uspješan te se kao alternativa nameće Chan-Lam reakcija za čije je provođenje potrebno indolni fragment prevesti u boronsku kiselinu. Također, mogla bi se razmotriti mogućnost diskonekcije unutar pirol-pirimidinskog prstena.





Slika 36 Indolni fragment preveden u boronsku kiselinu koji bi bio potreban za Chan-Lam reakciju

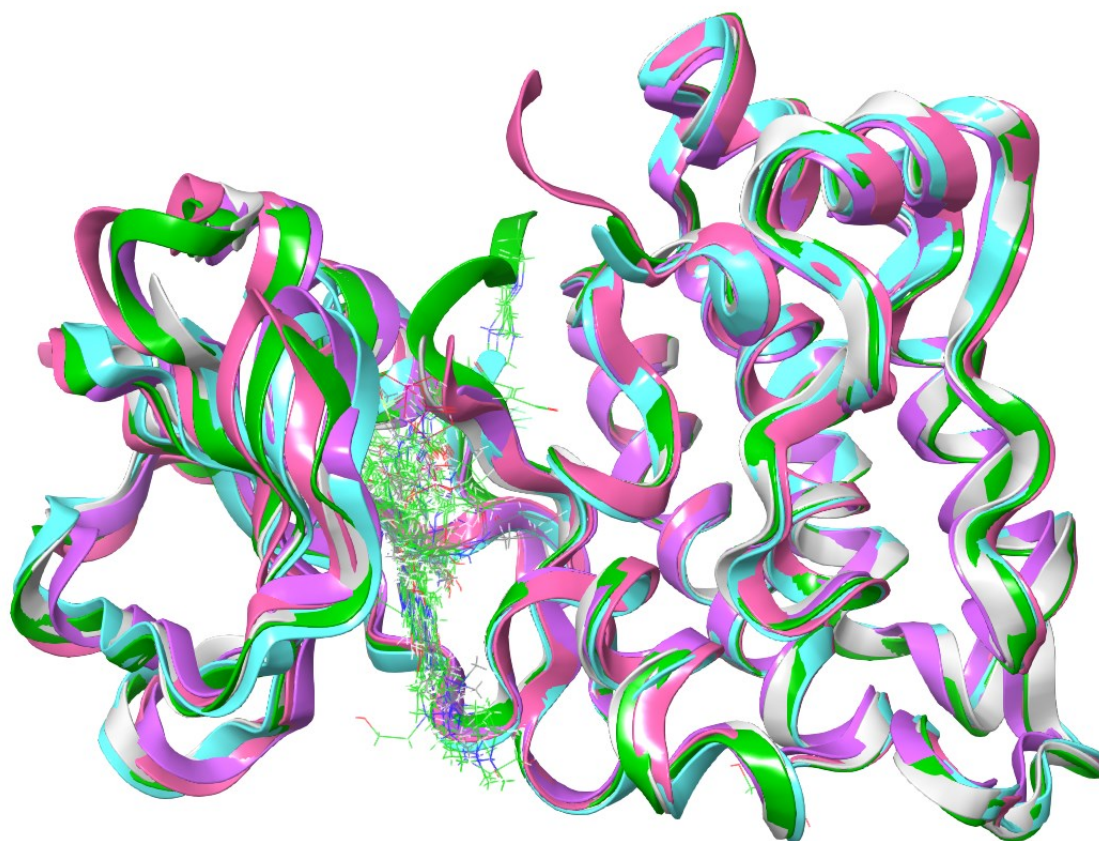
Pripremljena **CM2** molekula bit će testirana *in vitro* te ukoliko se pokaže aktivnom, u sljedećoj fazi istraživanja trebalo bi proširiti opseg iridijem katalizirane reakcije asimetrične dearomatizacije ispitivanjem utjecaja različitih substituenata (R1) na dušiku bočnog lanca (*N*-Boc, *N*-Me, *N*-SO<sub>2</sub>Me) te elektron-siromašnih substituenata (R2) na indolnom prstenu (CO<sub>2</sub>Me, NO<sub>2</sub>, itd.).



Slika 37 Shematski prikaz iridijem katalizirane reakcije asimetrične dearomatizacije. R1 = CO<sub>2</sub>Me, NO<sub>2</sub>, R2 = *N*-Boc, *N*-Me, *N*-SO<sub>2</sub>Me

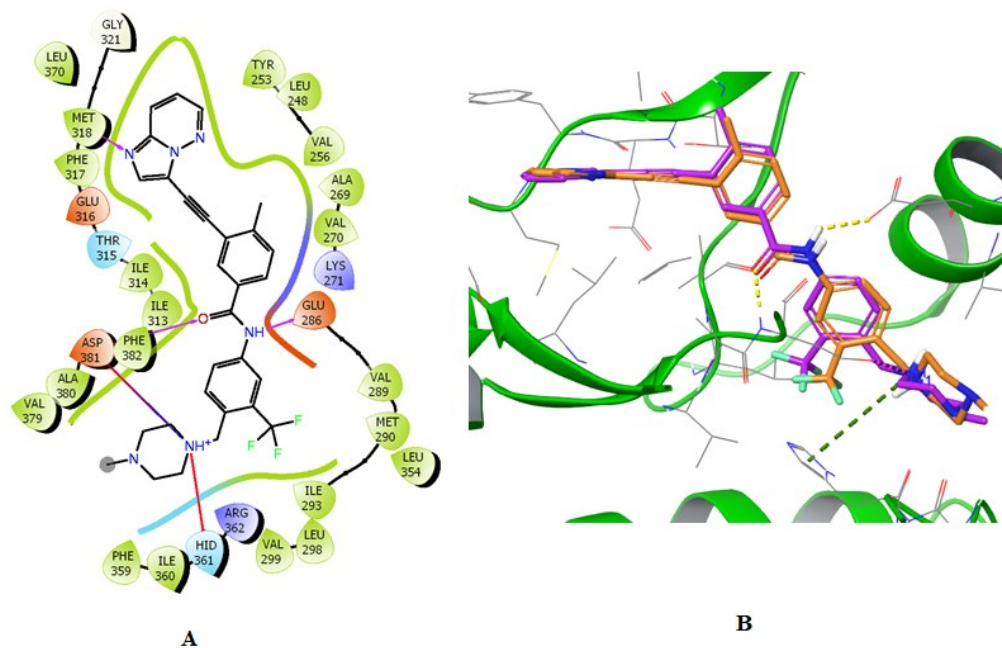
#### 4.1. Dizajn ciljnih molekula na strukturnim osnovama

Dizajn ciljnih molekula temeljen je na analizi dostupnih X-ray struktura SRC-kinaza. U PDB bazi podataka (eng. *Protein Dana Bank*) trenutno su dostupne 44 X-ray strukture te je njihovo preklapanje prikazano na slici 38. Većina struktura se dobro preklapa, s tim da se najveće razlike vide između „*DFG-in*“ i „*DFG-out*“ konformacija te u pomacima G-omče. Različiti ligandi u potpunosti ispunjavaju aktivno mjesto na način da s obje strane postoje skupine koje izlaze prema otapalu.



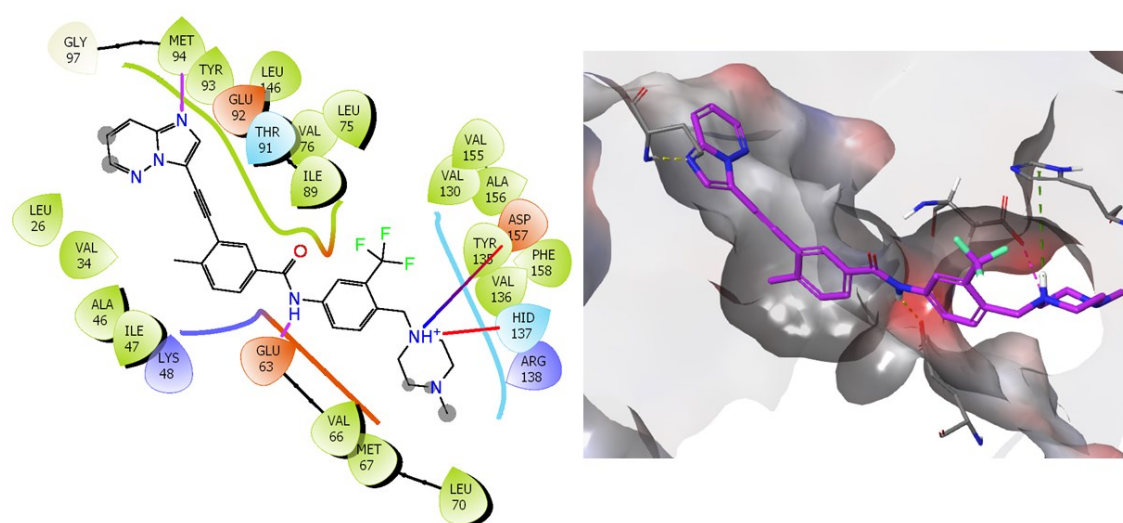
*Slika 38 Preklopljene dostupne X-ray strukture kinaza i pripadajućih liganda*

U sklopu ovog diplomskog rada planirana je kondenzacija fragmenta bogatog  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima s adenino-mimetičkim fragmentima već poznatih inhibitora ponatiniba i PP2 liganda. Kako bi se analizirale interakcije između proteina i liganada korištene su ko-kristalne SRC-kinaze s PP2 ( PDB ID: 3GEQ) te s ATP-om (PDB ID: 6F3F) te ABL-kinaze ko-kristalizirane s ponatinibom (PDB ID: 3OXZ). S obzirom na to da ne postoji ko-kristalna struktura SRC-kinaze s ponatinibom, korištena je ko-kristalna struktura SRC-kinaze s imatinibom (PDB ID: 2OIQ) za eksperimente molekularnog uklapanja.



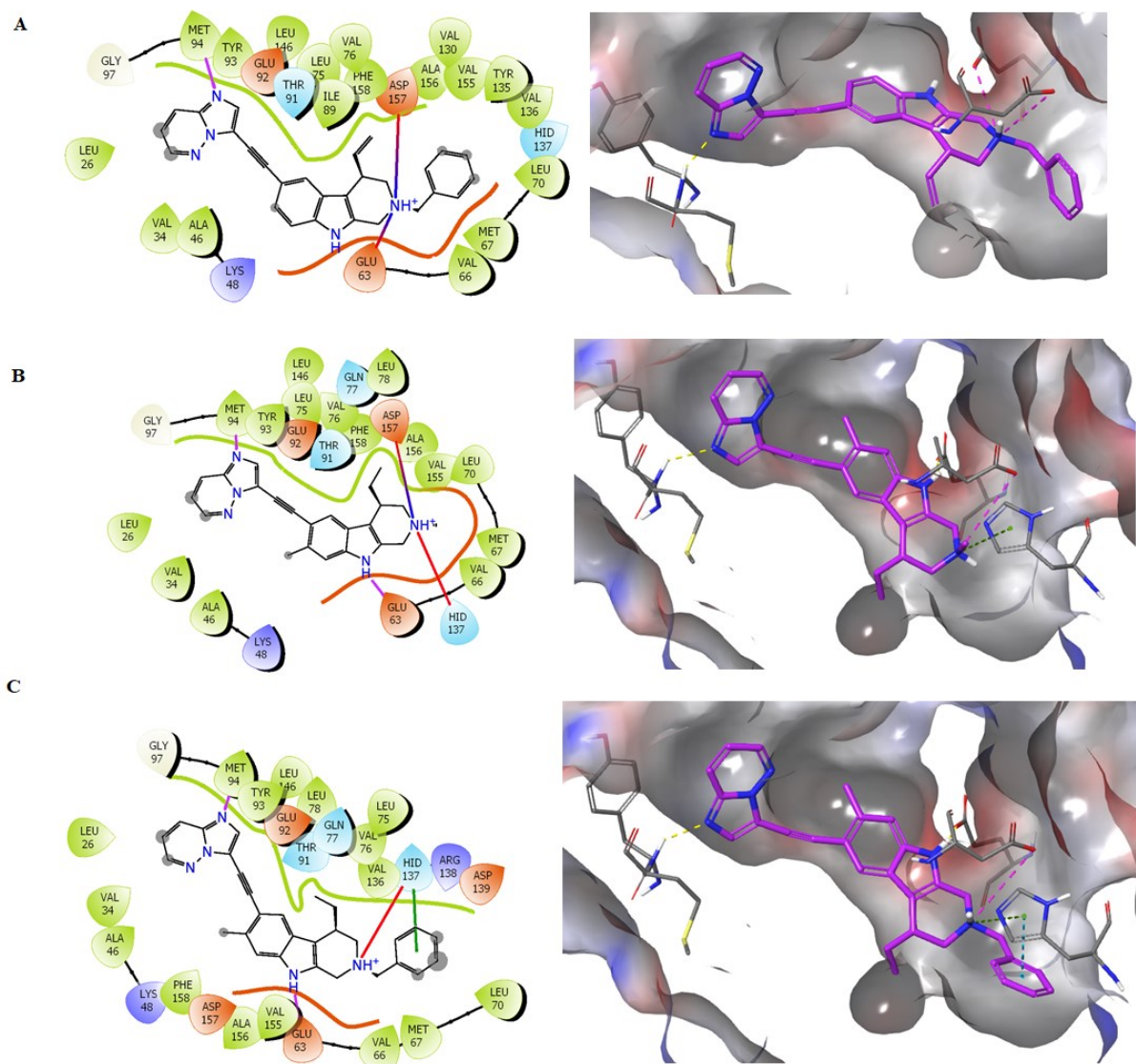
Slika 39 (A) prikaz interakcija ponatiniba i aktivnog mjesta ABL-kinaze, (B) ponatinib preklapljen s imatinibom

Na slici 39 prikazan je ponatinib uklopljen u aktivno mjesto ABL-kinaze (A; PDB ID: 3OXZ) te preklapanje s imatinibom, dok na slici 40 je prikazan ponatinib uklopljen u aktivno mjesto SRC-kinaze (PDB ID: 2OIQ) kao i interakcije koje se ostvaruju. Ponatinib se veže u aktivno mjesto u „DFG-out“ konformaciji, jednako kao i imatinib. Ponatinib ostvaruje vodikove veze s Met94, Glu63 te Asp157, dok s His137 ostvaruje  $\pi$ - $\pi$  (*stacking*) interakciju. Njegov rezultat uklapanja iznosio je -10.8 (eng. *docking score*, *Gscore* = -10.8).



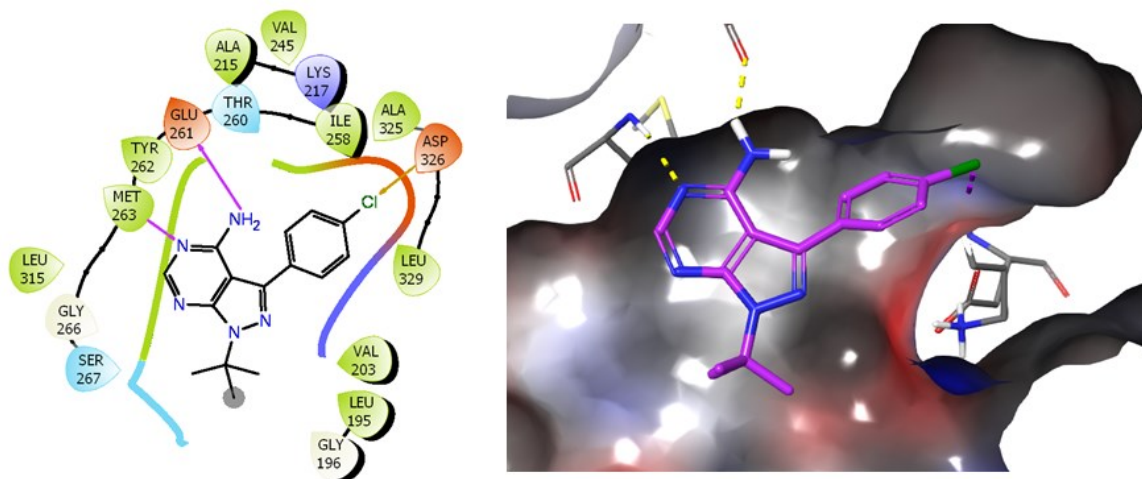
Slika 40 Shematski prikaz interakcija između aktivnog mjesta SRC-kinaze (PDB ID: 2OIQ) i ponatiniba

Na temelju analize interakcija ponatiniba s ABL- kinazom i SRC-kinazom dizajnirani su analozi s fragmentima bogatim  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima te uklopljeni u aktivno mjesto SRC-kinaze (PDB ID: 2OIQ). Dizajnirani i uklopljeni analozi prikazani su na slici 41. Analog ponatiniba A ostvaruje vodikove veze s dušikom iz okosnice Met94, Glu63 i Asp157 te je njegov *Gscore* iznosio -7.2. Analog ponatiniba B ostvaruje iste vodikove veze kao i analog A, uz dodatak vodikove veze s His137 te je njegov *Gscore* iznosio -7.9. Analog ponatiniba C ostvaruje vodikove veze s Met94, Glu 63 i His137 kao i prethodni analog, dok osim navedenih, ostvaruje i  $\pi$ - $\pi$  interakciju s istim tim histidinom.



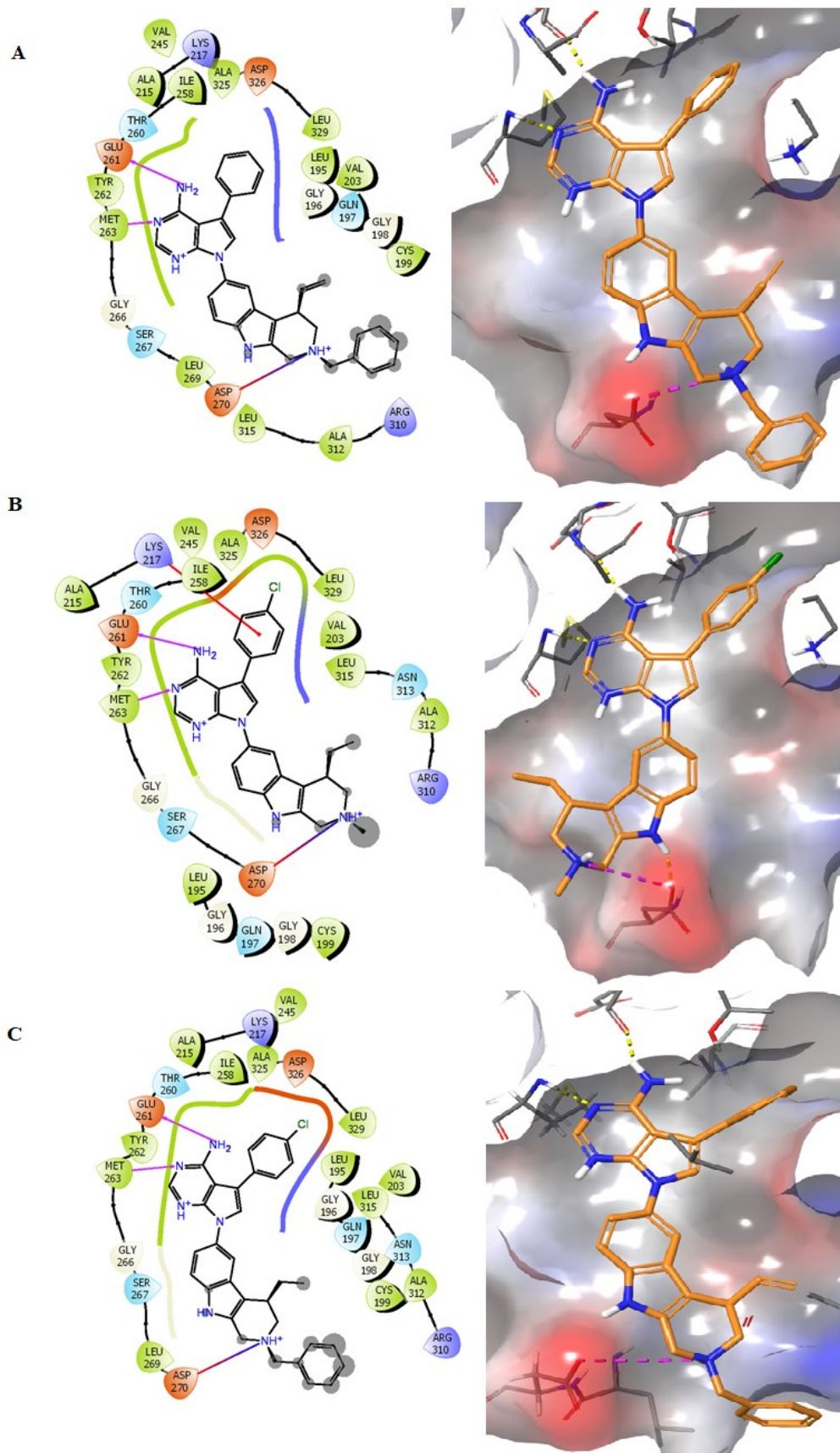
Slika 41 Analози ponatiniba uklopljeni u aktivno mjesto SRC-kinaze (PDB ID: 2OIQ)

Vežanje PP2 liganda u aktivno mjesto SRC-kinaze prikazano je na slici 42. PP2 se veže u aktivno mjesto u „*DFG-in*“ konformaciji te stvara dvije vodikove veze s aminokiselinama iz zgloba (*hinge* regije) – Met263 (Met341) i Glu261 (Glu339). Između klora i Asp326 se ostvaruje halogena veza. Klor-fenilna skupina popunjava hidrofobni džep dok je *tert*-butilna skupina okrenuta prema otapalu te je pogodna za zamjenu s fragmentima bogatim  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima. *Gscore* za PP2 u aktivno mjesto SRC-kinaze iznosi -8,8.



Slika 42 Shematski prikaz interakcija između PP2 i aktivnog mjesta SRC-kinaze (PDB ID: 6F3F)

Strukture predloženih analoga PP2 liganda, kao i njihove interakcije s aktivnim mjestom SRC-kinaze prikazani su na slici 43. U sva tri slučaja očuvana je interakcija s Met263 (341) i Glu261 (339) te je ostvarena nova interakcija s Asp270 u kanalu koji je otvoren prema otapalu. Analog A uklopljen je s rezultatom *Gscore* = -6,4, analog B s rezultatom *Gscore* = -7,5, a analog C s rezultatom *Gscore* = -6,7.

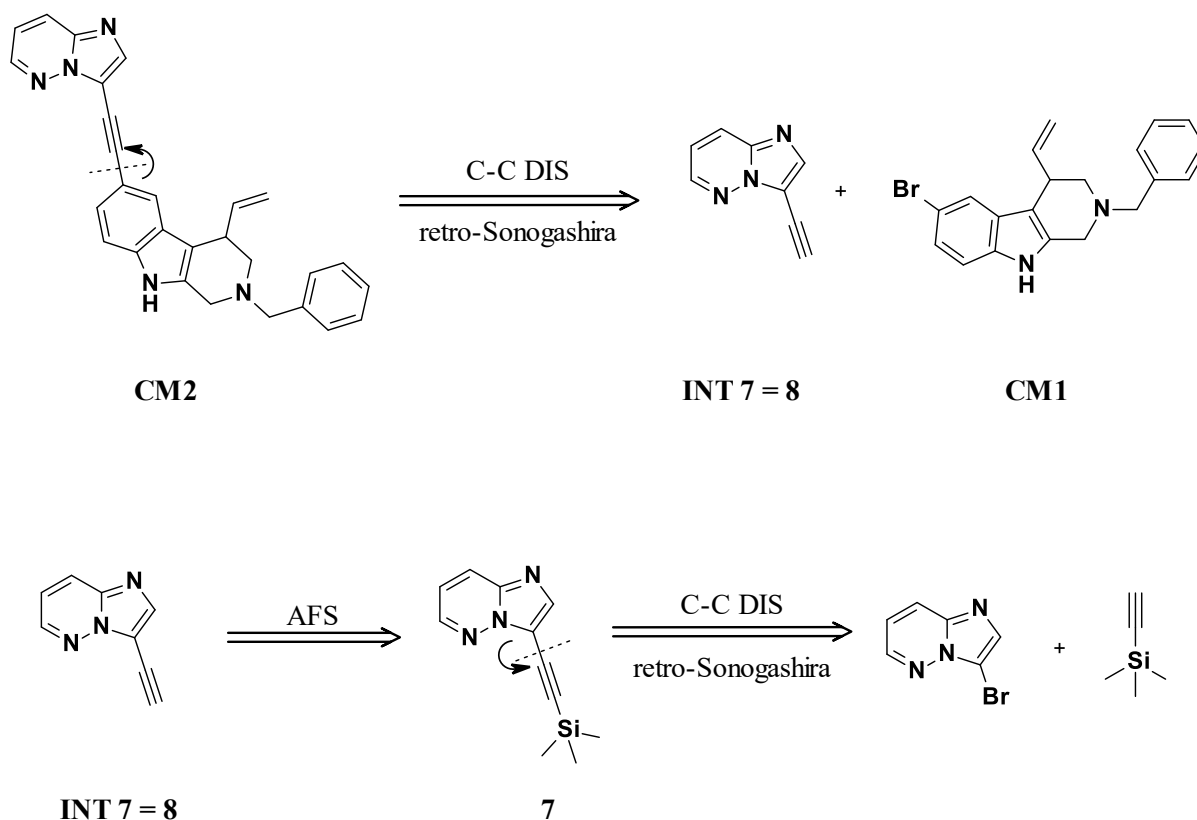


Slika 43 Analizi PP2 uklopljeni u aktivno mjesto SRC-kinaze (PDB ID: 3F6F)

## 4.2. Retrosintetska analiza ciljnih molekula

### 4.2.1. Retrosintetska analiza analoga ponatiniba

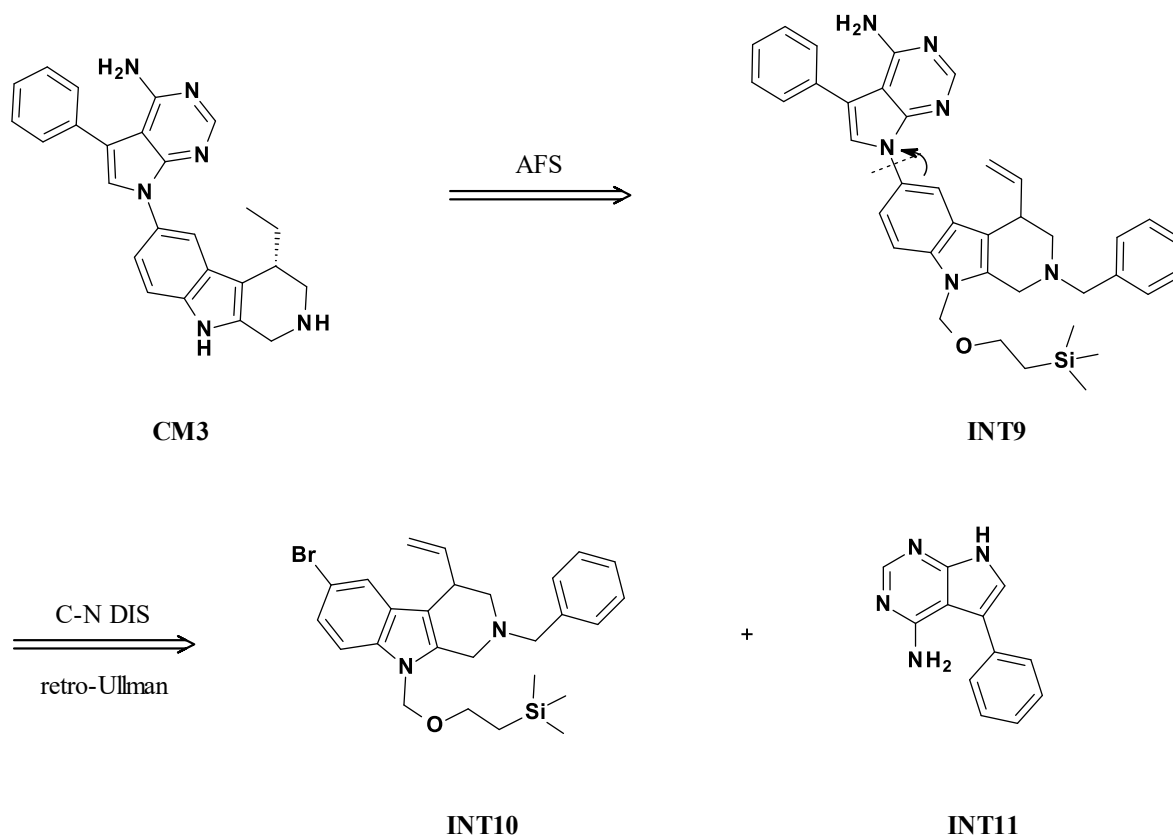
Diskonekcija ciljne molekule **CM2** temeljena je na Sonogashira reakciji te daje fragment bogat  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima (**CM1**) i odgovarajući alkin (**INT7**) koji nisu komercijalno dostupni, ali su njihove sinteze opisane u literaturi te jednostavno provedive. Retrosintetskom analizom **INT7** dolazi se do spoja **INT8** (**7**) koji se lako priprema Sonogashira reakcijom iz komercijalno dostupnog 3-bromimidazo[1,2-b]piridazina i etinil(trimetil)silana (slika 44).



Slika 44. Shematski prikaz retrosintetske analize analoga ponatiniba

### 4.2.2. Retrosintetska analiza analoga PP2

Retrosintetska analiza treće ciljne molekule (**CM3**) prikazana je na slici 45. Ciljna molekula **CM3** može se pripremiti iz međuspoja **INT9** redukcijom dvostruke veze i skidanjem zaštitnih grupa s indolnog i piperidinskog prstena. Diskonekcijom C-N veze između indola i pirimido-pirola nastaje zaštićeni fragment bogat  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima (**INT10**) i intermedijer (**INT11**).

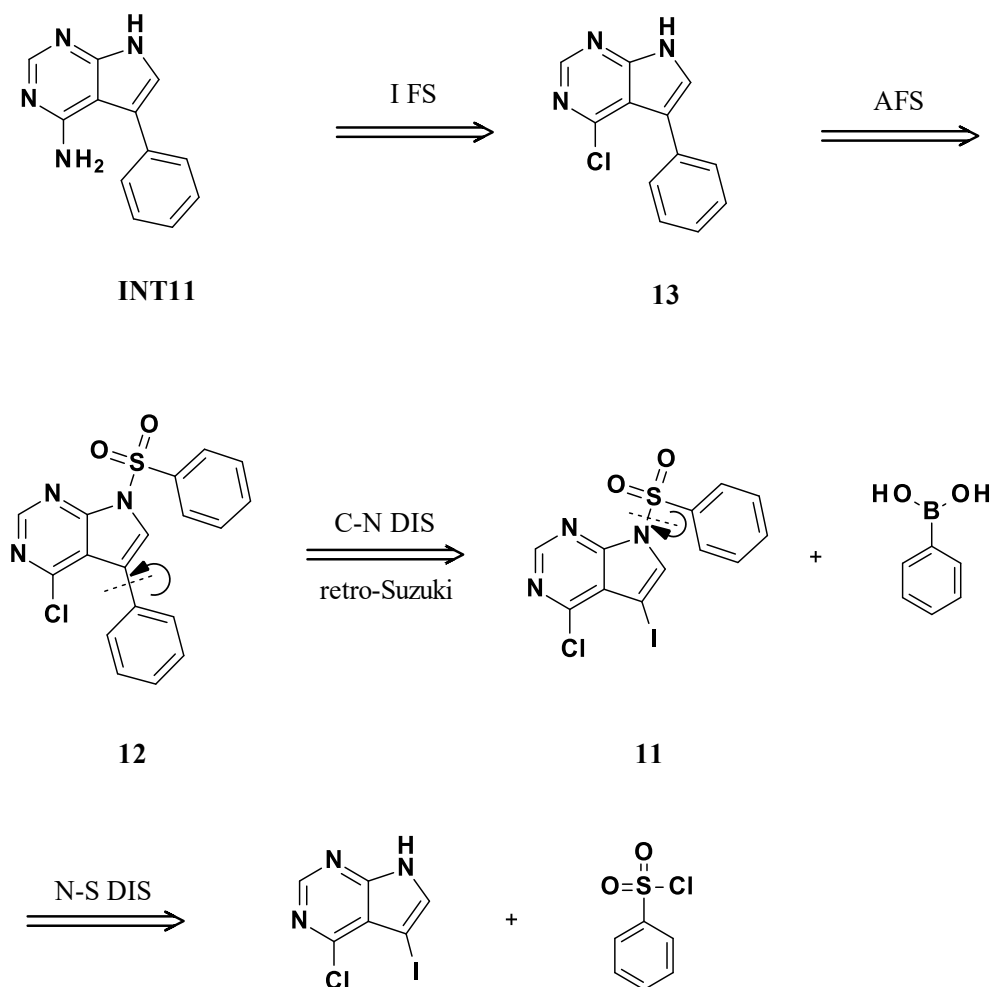


*Slika 45 Shematski prikaz retrosintetske analize **CM3** do ciljnih molekula sljedeće generacije **INT10** i **INT11***

Uzimajući u obzir reakcijske uvjete formiranja C-N veze, i činjenicu da se intermedijer **INT10** može pripremiti iz **CM1** trebalo je odabrati zaštitnu grupu za N1-indol stabilnu u bazičnim uvjetima. Zbog jednostavnog uvođenja i blagih uvjeta skidanja odabrana je trimetilsilil etoksimetil (SEM) zaštitna skupina.

Daljna retrosintetska analiza intermedijera **INT11** vodi do jeftinog, komercijalno dostupnog pirimido-pirazola 5-jod-4-klor-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidina (slika 46).



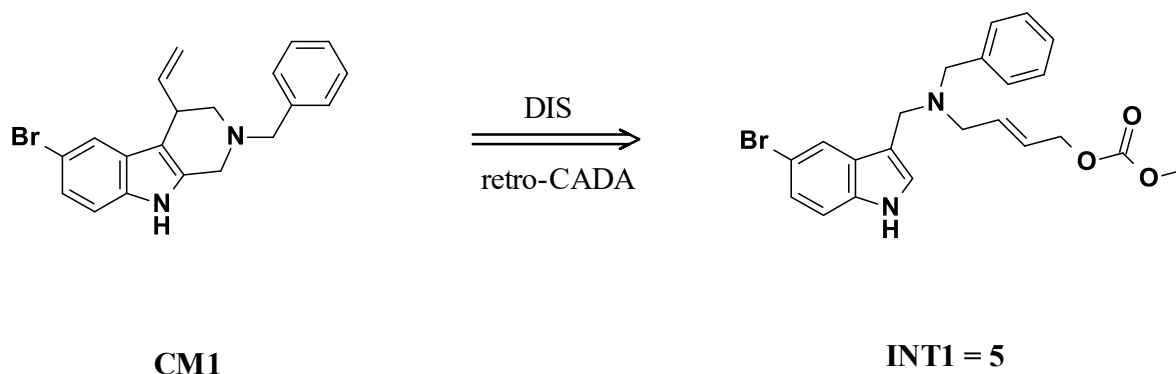


Slika 46 Shematski prikaz retrosintetske analize spoja INT11

#### 4.2.3. Retrosintetska analiza fragmenta bogatog $sp^3$ hibridiziranim C-atomima

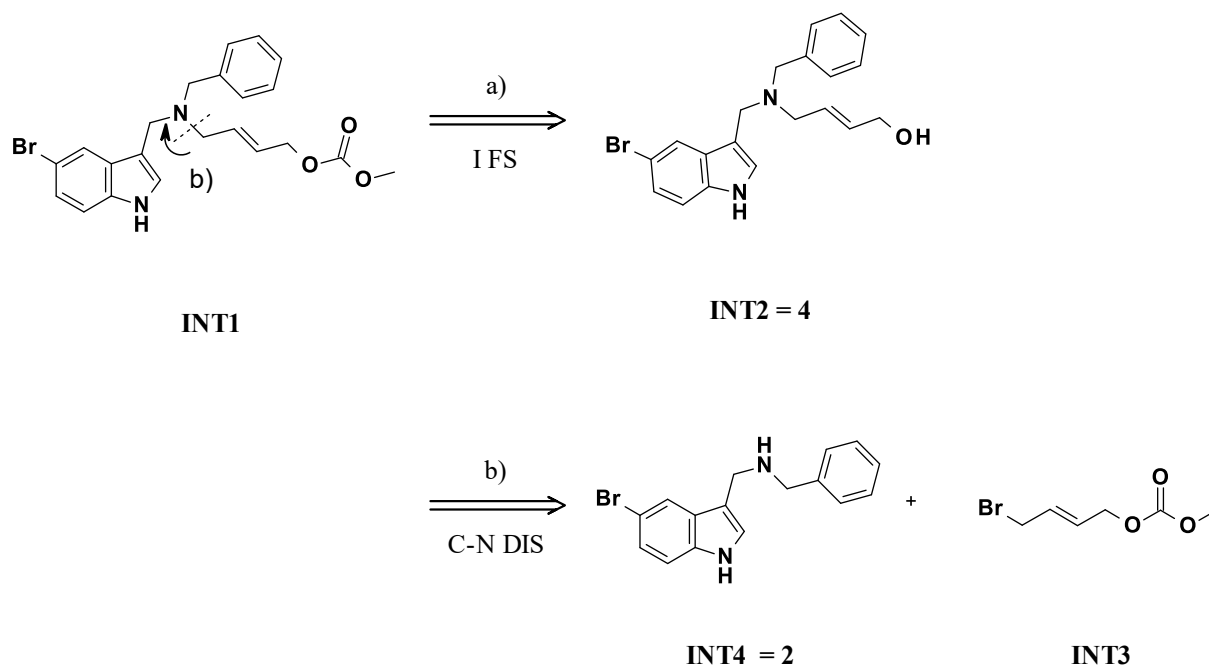
Za pripremu obje ciljne molekule potreban je fragment bogat  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima. Njegovu asimetričnu sintezu opisala je grupa profesora You-a 2013. godine.<sup>23</sup>

Shematski prikaz retrosintetske analize prve ciljne molekule (CM1) prikazana je na slici 47 te slici 48. Prva diskonekcija ciljne molekule CM1 temeljena je na Ir-kataliziranoj asimetričnoj alilnoj dearomatizaciji te vodi do ciljne molekule druge generacije (INT1) koja nije komercijalno dostupna te je provedena njena retrosinteza do jednostavnijih, komercijalno dostupnih reagensa.



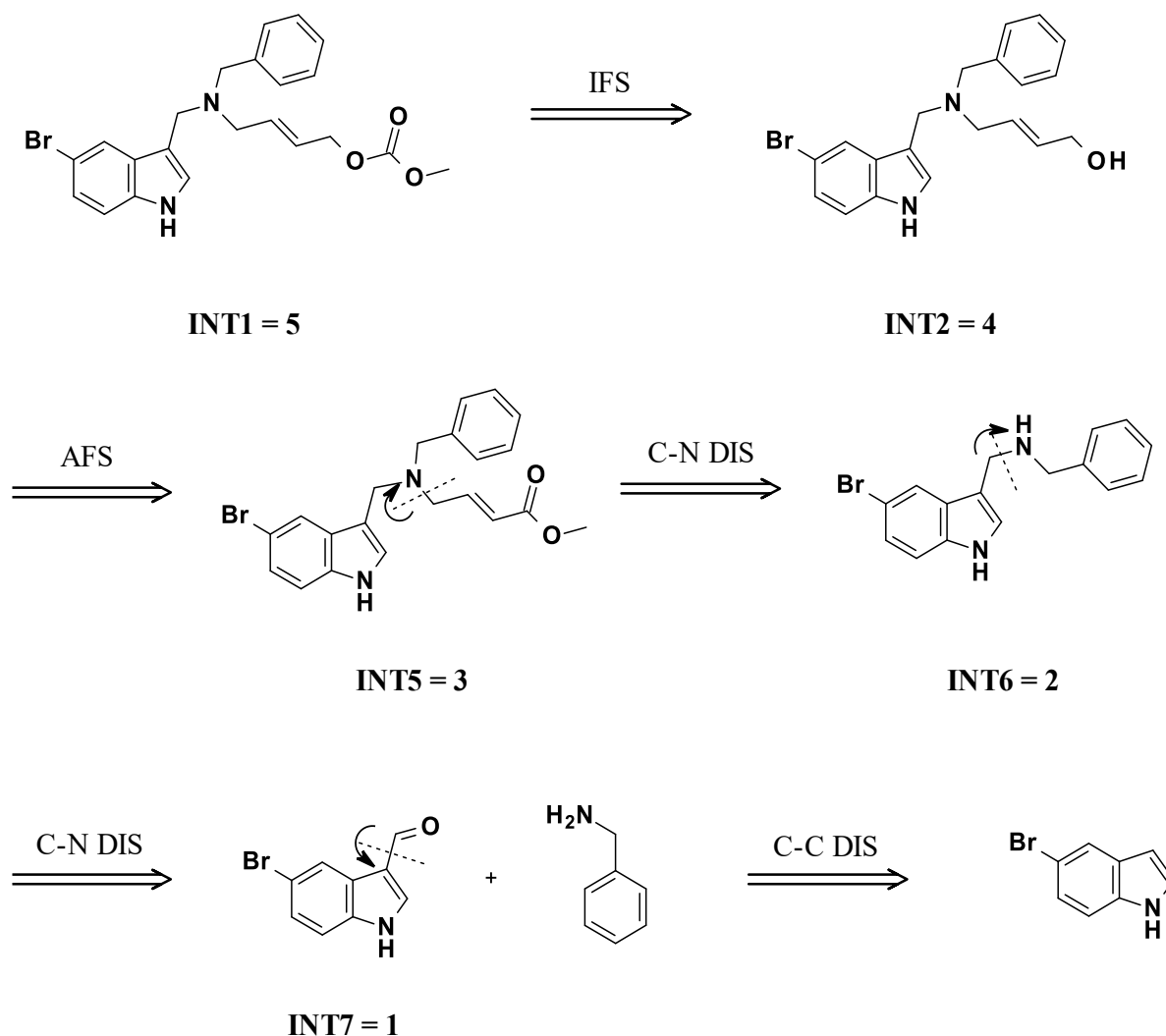
*Slika 47. Shematski prikaz retrosintetske analize fragmenta bogatog  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima*

Sinteza intermedijera 1 (**INT1**) opisana je u literaturi na dva načina koja su prikazana na slici 48. Prvi način temelji se na interkonverziji funkcionalne skupine bočnog lanca (a), dok drugi pristup pretpostavlja C-N diskonekciju koja daje **INT4** i **INT3** (b) koji nisu komercijalno dostupni. Sinteza **INT3** tehnički je dosta zahtjevna jer u strukturi **INT3** nema kromofora što otežava praćenje kemijske reakcije i izolaciju.



*Slika 48. Retosintetska analiza intermedijera 1 (**INT1**)*

Zbog jednostavnije sinteze, u konačnici je odabran sintetski put koji uključuje izgradnju potrebnog bočnog lanca kroz interkonverziju funkcionalne skupine (slika 49).

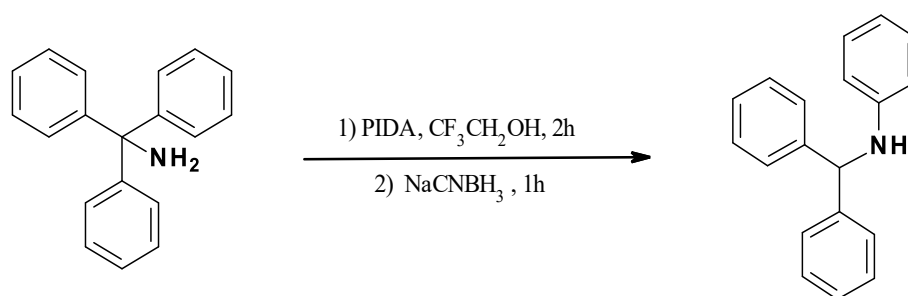


Slika 49. Shematski prikaz retrosintetske INT1 do jednostavnijih i komercijalno dostupnih spojeva.

### 4.3. Priprema fosforamiditnog liganda

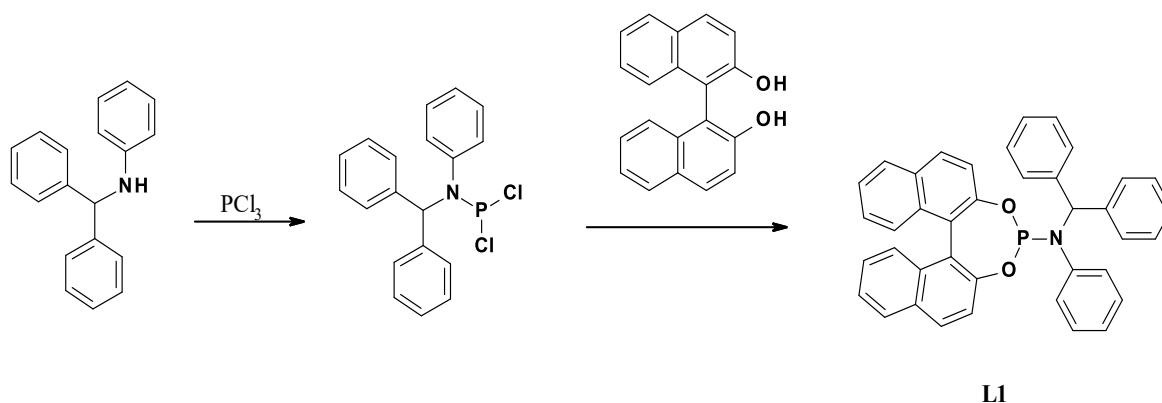
Enantioselektivna sinteza ciljne molekule **CM1** opisana je u literaturi u iskorištenju od 74% te enantiomernom suvišku od 94%.<sup>23</sup> Visoka enantiomerna čistoća postignuta je korištenjem fosforamiditnog liganda **L1** koji nije komercijalno dostupan, ali je njegova priprema opisana u nekoliko radova i patenata.<sup>24, 38-40</sup>

U prvom koraku sinteze, *N*-benzil-hidrilanilin pripremljen je oksidativnom pregradnjom tritil-amina pomoću (diacetoksijod)benzena, a zatim je međuprodukt reduciran pomoću natrij cijanoborhidrida do konačnog produkta (slika 50). Reakcija je rezultirala nastankom traženog spoja s iskorištenjem od 36%.



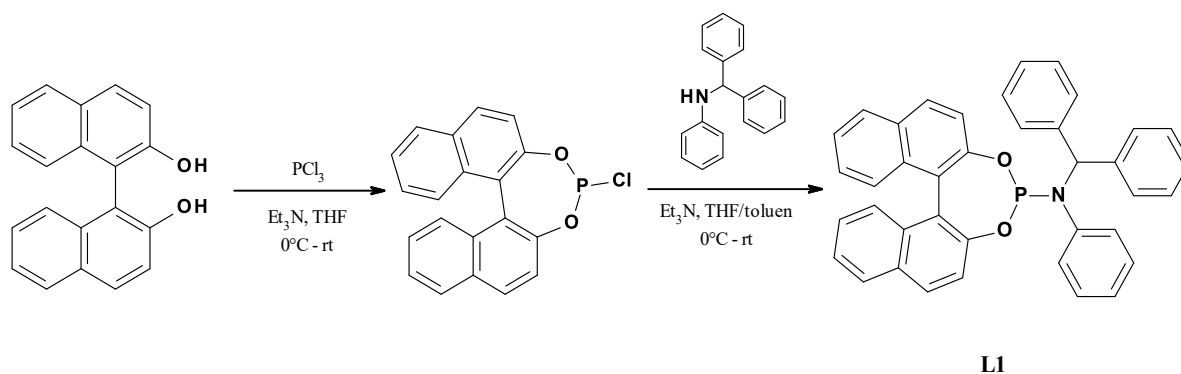
Slika 50. Oksidativna pregradnja tritil amina.

U sljedećem koraku, oslanjajući se na eksperimentalni postupak opisan u literaturi (slika 51)<sup>24</sup> *N*-benzil-hidrilanilin refluksiran je u toluenu uz jedan ekvivalent  $\text{PCl}_3$  6 sati, a zatim je reakcijska smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon hlađenja na  $-78^\circ\text{C}$  dodana je otopina (R)-BINOL- a u smjesi THF-a i toluena uz  $\text{Et}_3\text{N}$  kao bazu. Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 48 sati, ali prema UPLC/MS-UV analizi nije nastao željeni produkt. U kromatogramu su uočeni samo signali početnih reagensa te signal koji ukazuje na aktiviranje BINOL-a.



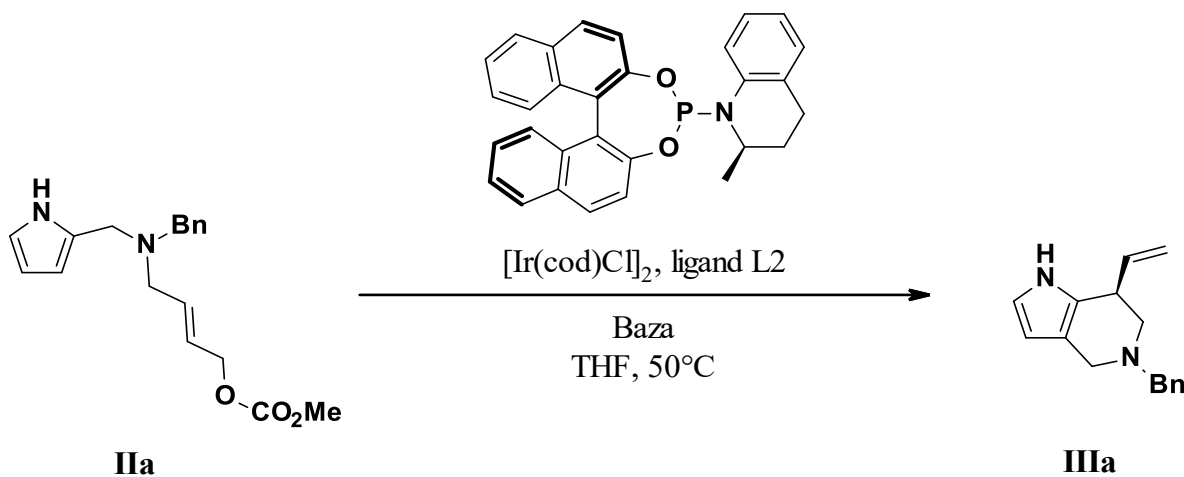
Slika 51. Reakcijska shema pripreme fosforamiditnog liganda

Također, provedene su reakcije prema literaturi<sup>39,40</sup> u kojoj autori prvo prevode BINOL u BINOL-fosfoklorid koji u sljedećem stupnju reagira s *N*-benzil-hidrilanilinom i daje željeni ligand **L1** (slika 52). U tom je slučaju pripremljena otopina BINOL-a miješana na  $-78^\circ\text{C}$  te nakon 24 h miješanja, alikvot reakcijske smjese je pomiješan sa metanolom i analiziran UPLC-MS/UV-om. Budući da je u kromatogramu uočen molekularni ion metil-fosforamidita, u reakcijsku smjesu dodana je otopina *N*-benzil-hidrilanilina u smjesi toluena i THF-a te je miješanje nastavljeno. Prema UPLC-MS/UV analizi, željeni produkt nije uočen.



*Slika 52 Priprema liganda putem aktivacije binola*

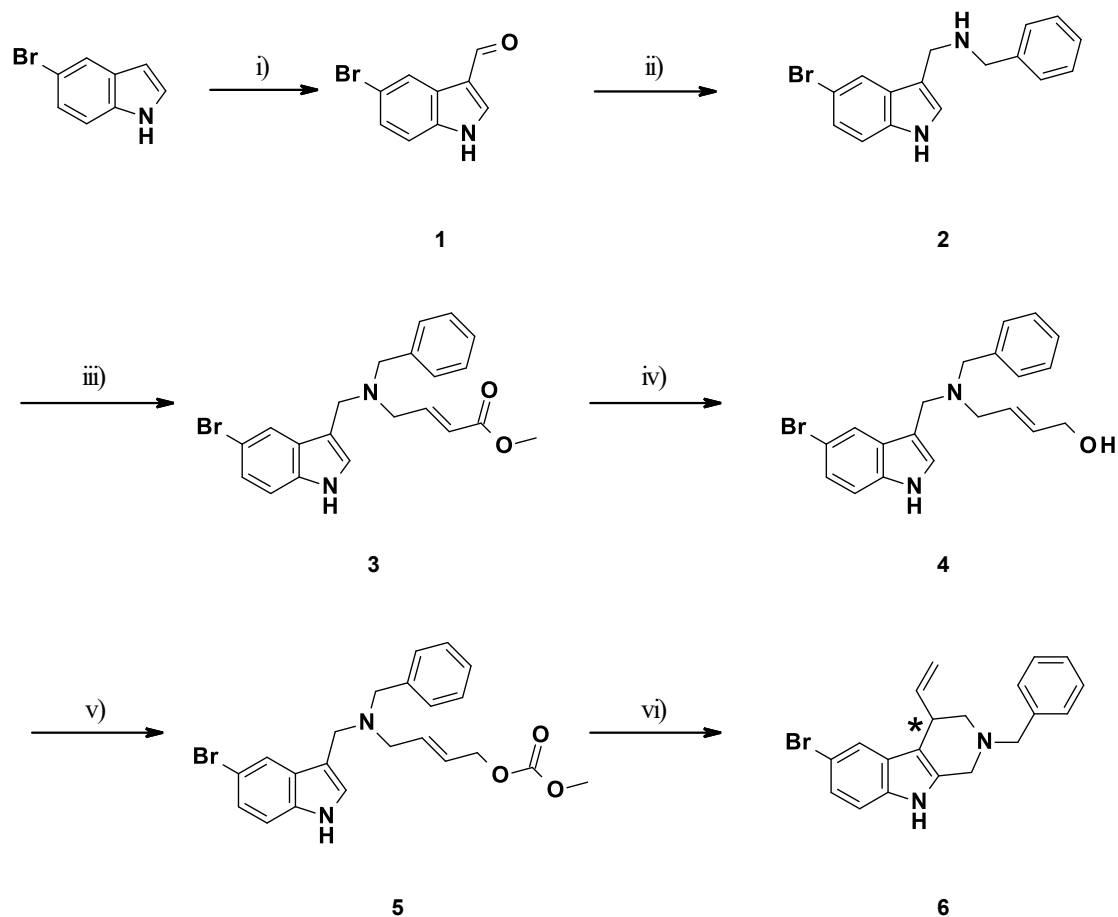
Budući da ponavljanje literaturnih procedura za sintezu liganda **L1** nije bilo uspješno, u Ir-kataliziranoj asimetričnoj alilaciji korišten je komercijalno dostupan ligand *(R,R)*-MeTHQphos (**L2**). U literaturi, taj se ligand pokazao vrlo uspješnim u sintezi strukturno sličnog, pirololo-piperidina **IIIa** u enantiomernom suvišku od 94% (slika 53).<sup>24</sup>



*Slika 53 Reakcijska shema pripreve alilacije 2-pirolil alilnog karbonata korištenjem liganda L2*

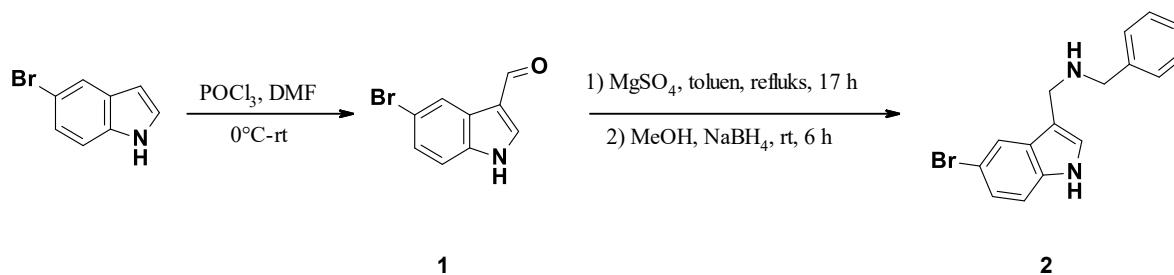
#### 4.4. Priprava fragmenta bogatog $sp^3$ hibridiziranim C-atomima

Sintetski postupak pripreve fragmenta bogatog  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima (CM1) prikazan je na slici 54, a temeljen je na literaturnim podacima.<sup>30</sup>



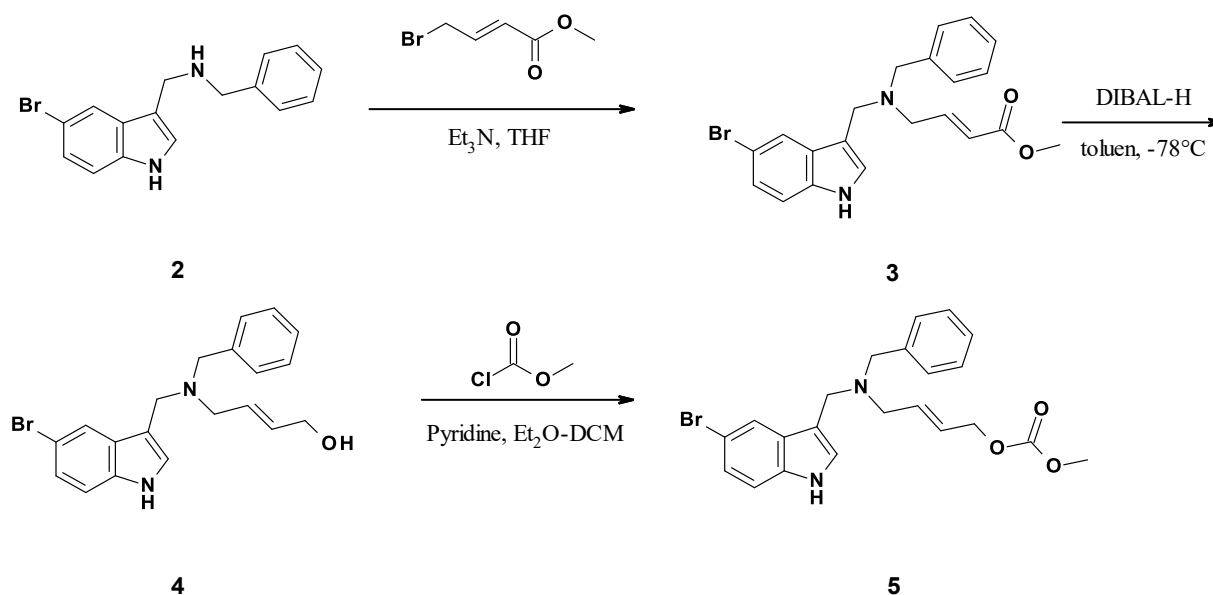
Slika 54 Shematski prikaz sinteze fragmenta bogatog  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima; i)  $POCl_3$ , DMF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$  - RT; ii) 1)  $MgSO_4$ , toluen, refluks, 17 h, 2) MeOH,  $NaBH_4$ , rt, 6 h; iii) etil-4-bromkrotonat,  $Et_3N$ , THF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$  - RT, 12 h; iv) DIBAL-H, toluen, atmosfera Ar,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 90 min, rt, 12 h; v) metilkloroformat, piridin,  $Et_2O$  - DCM,  $0\text{ }^\circ\text{C}$  - RT, 12 h; vi)  $[Ir(cod)Cl]_2$ , L2,  $K_3PO_4$ , THF, atmosfera Ar  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 48 h

U prvom koraku komercijalno dostupan 5-bromindol preveden je u spoj **1** Vilsmeier-Haackovom formilacijom s vrlo dobrim prinosom od 92%.<sup>29</sup> U drugom koraku provedena je reduktivna aminacija (slika 55).



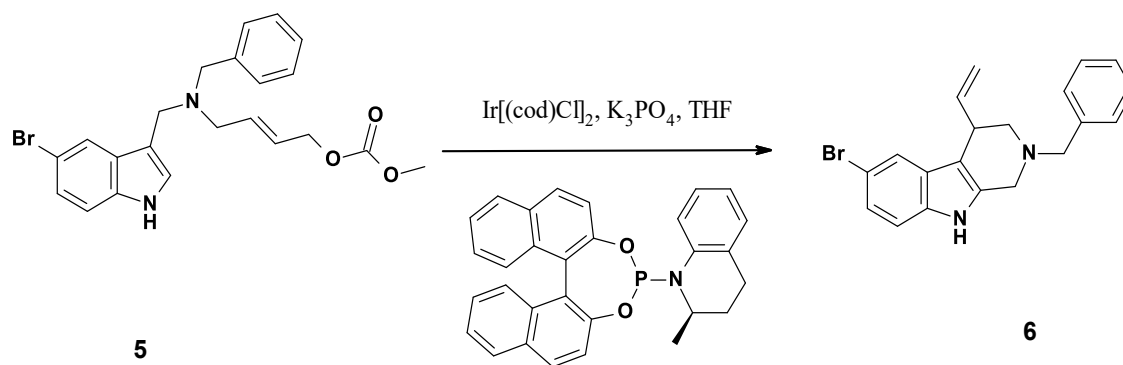
Slika 55 Uvođenje benzilne zaštitne skupine na bočni lanac indolnog fragmenta

Prvo dolazi do kondenzacije aldehidne skupine na C3 položaju indola s aminom pri čemu prvo nastaje imin koji je zatim reduciran u sekundarni amin **2**.



Slika 56 Shematski prikaz priprave alil-karbonata

Alkiliranjem amina korištenjem bromkrotonata u THF-u uz trietil amin kao bazu dobiven je  $\alpha,\beta$ -nezasićeni ester **3** koji je reduciran pomoću DIBAL-H do odgovarajućeg alilnog alkohola **4**. Nadalje, spoj **4** je preveden u karbonat **5** korištenjem metil kloroformata u smjesi diklormetana i dietil etera uz piridin kao bazu. Spojevi **3** - **5** očišćeni su kolonskom kromatografijom te su njihovi spektroskopski podaci (NMR) odgovarali podacima iz literature. Prinosi u reakcijama priprave spojeva **2** - **5** su usporedivi sa literaturnim podacima, a cjelokupna sinteza lako je provediva (slika 56).<sup>29,30</sup>



Slika 57 Reakcijska shema iridijem katalizirane asimetrične alilne dearomatizacije

You i suradnici<sup>22</sup> pripremili su spoj **6** korištenjem [Ir(cod)Cl]<sub>2</sub> i liganda **L1** u THF-u uz K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> kao bazu s prinosom od 74 % u enantiomernom suvišku od 94 %. Budući da je sinteza liganda **L1** bila neuspješna, za sintezu spoja **6** korišten je komercijalno dostupan ligand **L2** (slika 57). Prema UPLC-MS/UV analizi nakon 48 sati konverzija karbonata u **5** u spoj **6** bila je potpuna, te je nakon obrade reakcijske smjese spoj **6** izoliran kolonskom kromatografijom u iskorištenju od 36%. NMR podaci spoja **6** odgovarali su literaturnim podacima.

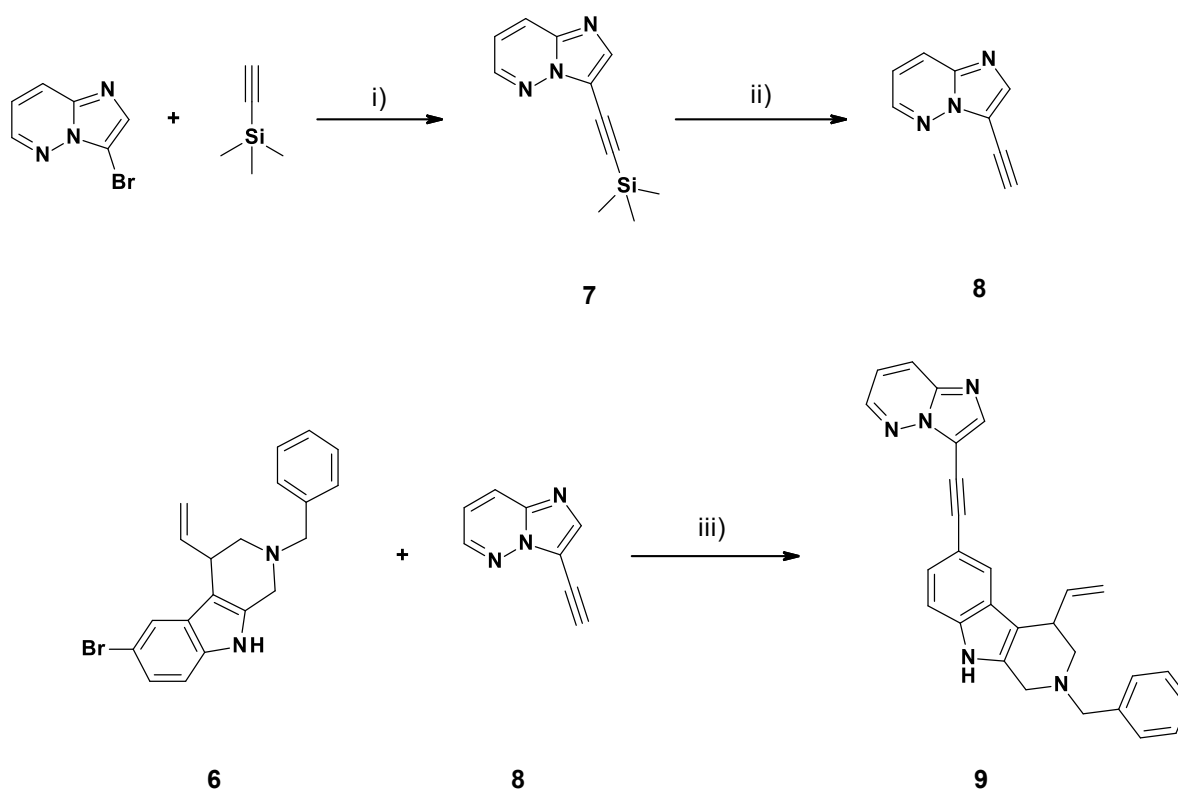
Spoj **6** podvrgnut je analizi pomoću kiralne tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti kako bi se mogla odrediti enantiomerna čistoća dobivenog spoja. Potpuno ponavljanje literaturnih uvjeta<sup>24</sup> nije bilo moguće. U eksperimentima opisanim u literaturi korištena je Phenomenex Lux (5 μm, 4,6 × 250 mm) kolona, dok za potrebe ovog rada korištene su Diacel Chiralpak IA, IB, IC te IG (5 μm, 4,6 × 250 mm) kolone. U svrhu određivanja enantiomerne čistoće spoja **6** isprobano je nekoliko različitih metoda na reverznoj i normalnoj fazi, no jasna separacija enantiomera nije postignuta. Postignuta je djelomična separacija, no kod većine upotrebljenih metoda signali su razvučeni te njihovo integriranje je otežano. U dodatku 12 prikazan je kromatogram metode IV. U njemu je vidljivo da glavni signal koji se nalazi na  $R_t = 44.77$  min je jako razvučen jednako kao i sporedni signal na  $R_t = 54.84$  min. To je jedina metoda u kojoj je dobivena separacija signala, ali nije pogodna za integraciju, a posljedično tome i određivanje enantiomerne čistoće.

#### 4.5. Sinteza analoga Ponatiniba

Nakon što je sintetiziran fragment bogat  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima (**CM1**, spoj **6**), bilo je potrebno napraviti kondenzaciju s tzv. „hinge binder“ skupinama. Kao prva opcija odabran je analog ponatiniba koji sadrži imidazo[1,2-b]piridazinski fragment koji je povezan trostrukom



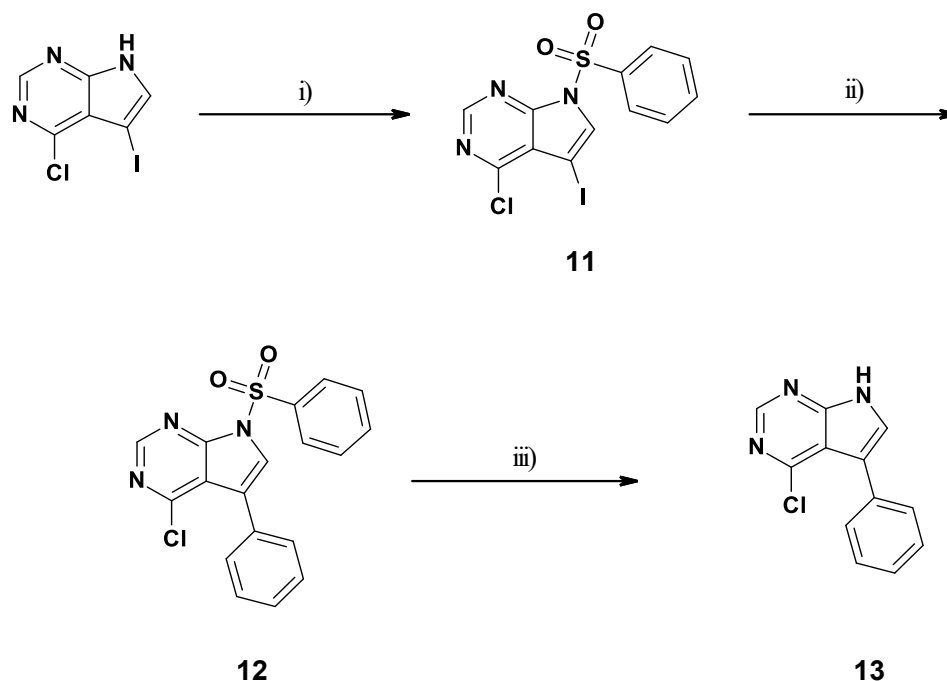
vezom na fragment bogat  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima. On je odabran jer je imao dobar rezultat u računalnom uklapanju ( $G_{score} = -7,2$ ). Sinteza ciljne molekule podijeljena je u dva dijela (slika 58). U prvom koraku bilo je potrebno provesti Sonogashira reakciju između 3-bromimidazo[1,2-b]piridazina i etinil(trimetil)silana nakon čega je bilo potrebno ukloniti trimetil-sililnu zaštitu. Spoj **8** dobiven je s 40% iskorištenjem. Na posljétku, provedena je još jedna Sonogashira reakcija, između spoja **6** i spoja **8** te je dobiven spoj **9** s iskorištenjem od 44%.



Slika 58 Shematski prikaz sinteze analoga ponatiniba; i)  $PdCl_2(PPh_3)_2$ ,  $CuI$ ,  $Et_3N$ , dicikloheksilamin,  $ACN$ , atmosfera argona,  $80\text{ }^\circ C$ , 12 h; ii)  $TBAF/THF$ ,  $rt$ , 2h; iii)  $PdCl_2(PPh_3)_2$ ,  $CuI$ ,  $Et_3N$ , dicikloheksilamin,  $DMSO$ , atmosfera argona,  $95\text{ }^\circ C$ , 17 h.

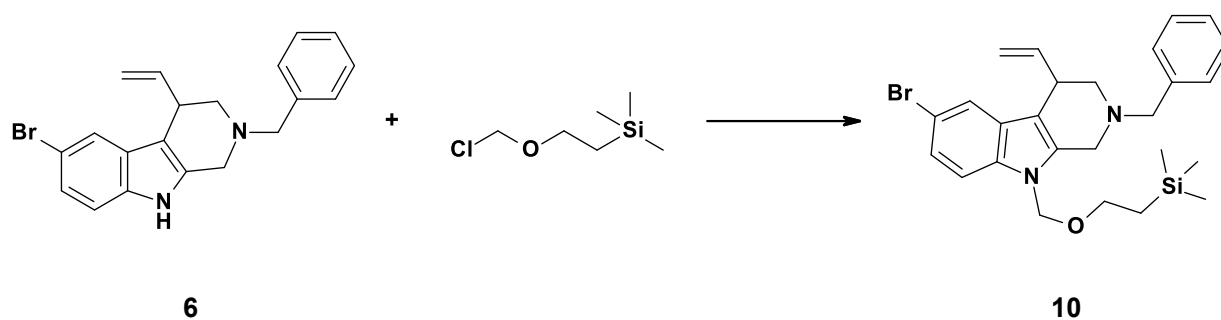
#### 4.6. Sinteza analoga PP2

Druga ciljna molekula odabrana za sintezu u sklopu ovog diplomskog rada je analog već poznatog inhibitora PP2. On je odabran jer je imao dobar rezultat u računalnom uklapanju ( $G_{score} = -6,4$ ).



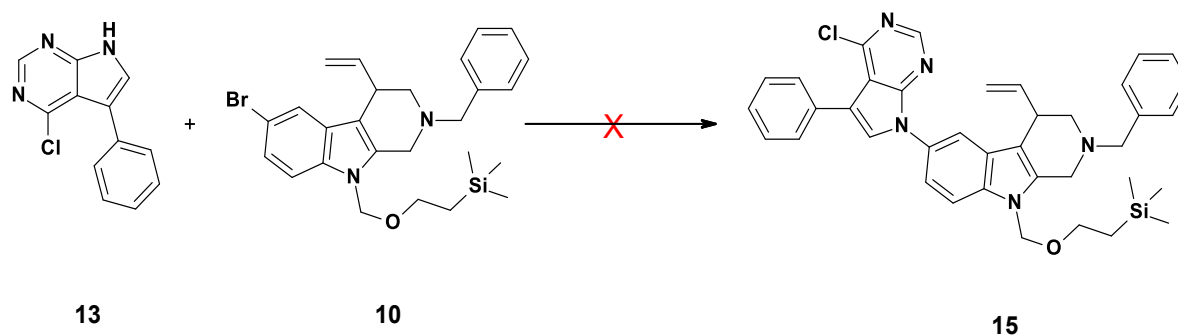
*Slika 59 Shematski prikaz sinteze fragmenta 13 koji ostvaruje interakcije s hinge regijom; i) PhSO<sub>2</sub>Cl, NaH, THF, 0°C-rt, 15h; ii) fenilboronska kiselina, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, toluen, etanol, voda, atmosfera argona, 95°C, 12 h; iii) 1M TBAF u THF, THF, rt, 1h*

Sinteza pirolo-pirazolo fragmenta temeljena je na literarno opisanoj proceduri iz komercijalno dostupnog, jeftinog 3-jod-4-klor-pirolo-pirazola.<sup>34</sup> Kako bi se mogla provesti Suzuki reakcija prvo je bilo potrebno uvesti zaštitnu skupinu na dušik te je dobiven spoj **11**. Uklanjanjem zaštitne skupine dobiven je spoj **13** (slika 59).



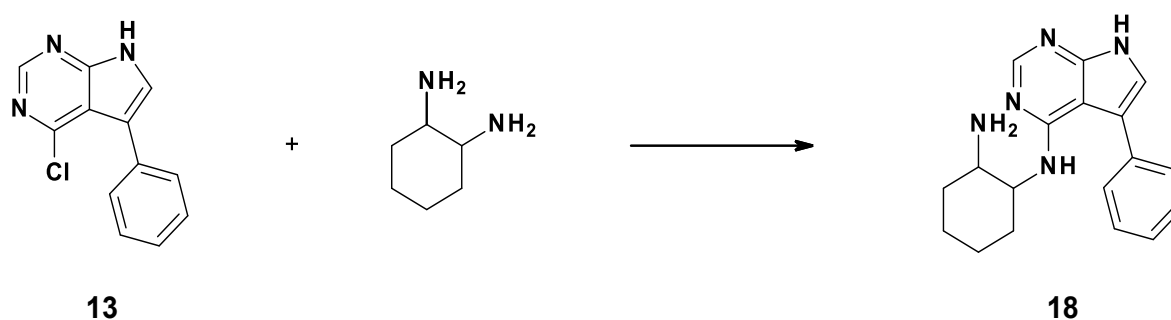
*Slika 60 Uvođenje SEM zaštitne skupine na fragment bogat sp<sup>3</sup> hibridiziranim C-atomima*

Prije kondenzacije spoja **6** i spoja **13** bilo je potrebno uvesti zaštitnu skupinu na indolni dušik spoja **6** (slika 60). Uvedena je SEM zaštitna skupina kako ne bi dolazilo do sporednih, neželjenih reakcija. SEM zaštitna skupina je odabrana jer je stabilna u bazičnim uvjetima te zbog jednostavnog uvođenja i blagih uvjeta skidanja.



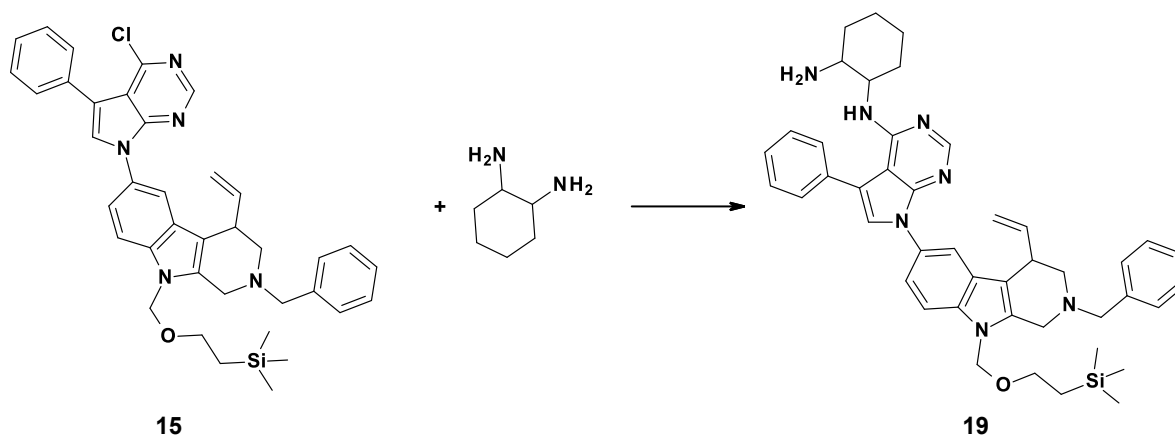
Slika 61 Reakcijski uvjeti Buchwaldova aminacije  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{P}(\text{t-Bu})_3$ ,  $\text{t-BuONa}$ , toluen,  $110^\circ\text{C}$ , 48 h, reakcijski uvjeti Ullman reakcije  $\text{CuI}$ , *trans*-1,2-ciklohesandiamin,  $110^\circ\text{C}$ , 1,4-dioksan

Prva strategija povezivanja fragmenta koji ostvaruje interakcije s *hinge* regijom **13** i zaštićenog fragmenta bogatog  $sp^3$  hibridiziranim C-atomima **10** temeljila se na paladijem kataliziranoj Buchwald aminaciji (slika 61). Reakcija je provedena korištenjem  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , tri-*tert*-butilfosfina i *t*-BuONa u toluenu na  $110^\circ\text{C}$ . Nakon 48 h miješanja na  $110^\circ\text{C}$  UPLC-MS/UV analiza alikvota reakcijske smjese pokazala je da željeni produkt nije nastao. Budući da su prema UPLC-MS/UV analizi u reakcijskom smjesi bili su prisutni isključivo početni spojevi **10** i **13** Buchwald aminacija je napuštena, a kao alternativa, spojevi **10** i **13** izloženi su bakrom kataliziranoj Ullman reakciji. Uz katalizator bakrov (I) jodid, kao ligand korišten je *trans*-1,2-ciklohesandiamin, a reakcija je provedena u 1,4-dioksanu. Nakon 24 h miješanja na  $110^\circ\text{C}$  alikvot reakcijske smjese analiziran je UPLC-MS/UV-om.



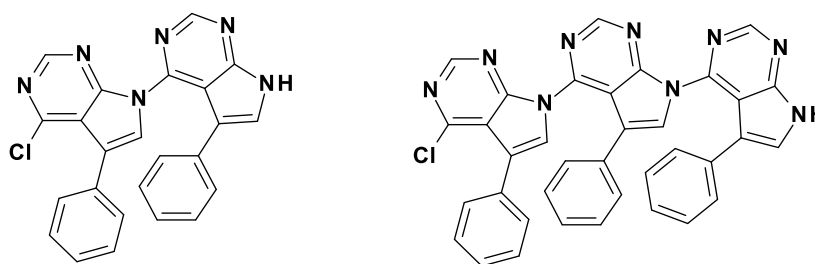
Slika 62 Shematski prikaz nastajanja neželjenog produkta **18**.

Analiza je ukazivala na formiranje neželjenih spojeva **18** i **19**. Spoj **18** može nastati reakcijom aromatske nukleofilne susptitucije između liganda i spoja **13** (slika 62), a reakcijom sa spojem **15** daje neželjeni spoj **19** (slika 63).



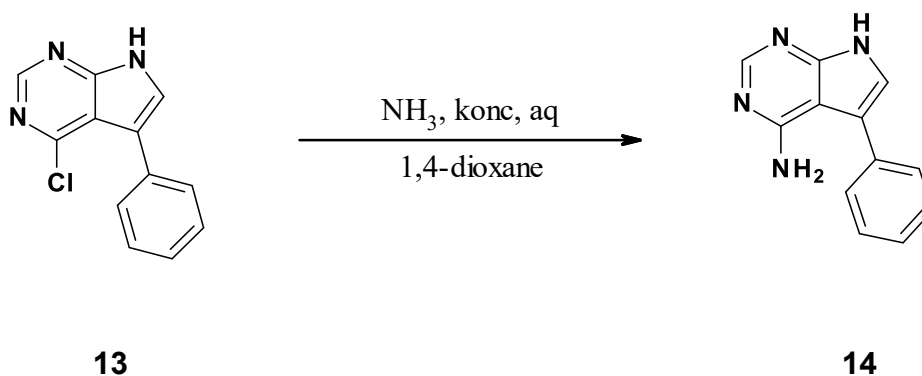
Slika 63 Shematski prikaz nastajanja neželjenog produkta 19.

S namjerom da se spriječi SNAr reakcija na fragmentu koji ostvaruje interakcije s *hinge* regijom 13, ligand *trans*-1,2-ciklohesandiamin zamijenjen je 4,4'-di-*tert*-butil-2,2'-bipiridinom. Nakon miješanja na 110°C 24 sata UPLC-MS/UV analiza je ukazivala je na polimerizaciju fragmenata koji ostvaruju interakciju s *hinge* regijom (slika 64).



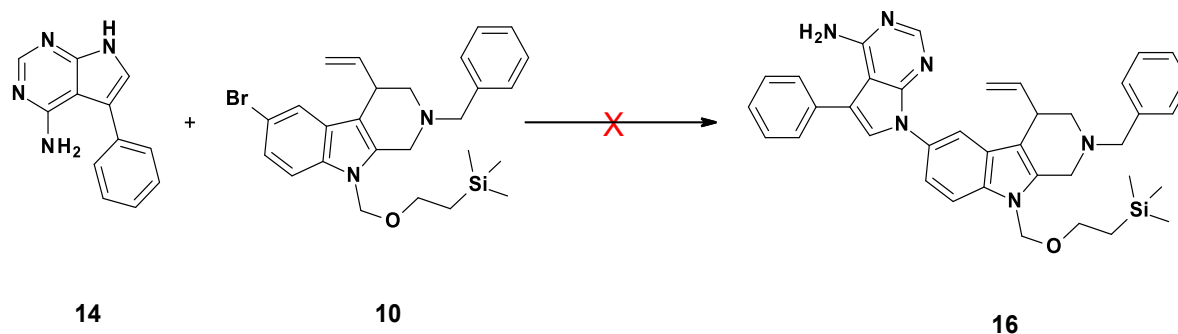
Slika 64 Polimerizacija fragmenata koji ostvaruju interakcije s *hinge* regijom (13)/ nusprodukti Ullmanove reakcije

Da bi se uklonio mogući negativni utjecaj klora, spoj 13 je preveden u amin 14 (slika 65) koji izložen bakrom kataliziranoj Ullman reakciji.



Slika 65 Prevođenje u amin; NH<sub>3</sub>, 1,4-dioksan, 7 dana

Miješanjem reakcijskih smjesa u 1,4-dioksanu uz  $K_3PO_4$  kao bazu te *trans*-1,2-ciklohesandiamin ili *trans*-1,2-ciklohesandiamin kao ligand na 110 °C nakon 48 sati željeni produkt **16** nije formiran.



Slika 66 Reakcijski uvjeti provedenih Ullman reakcija: CuI, *trans*-1,2-ciklohesandiamin ili 4,4'-di-*tert*-butil-2,2'-bipiridin, 1,4-dioksan, 110 °C, 48 h

## § 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada strukturnom analizom kompleksa poznatih inhibitora i SRC-kinaze dizajnirani su analozi inhibitora bogati  $sp^3$  hibridiziranim ugljikovim atomima. Zadržan je fragment koji ostvaruje interakcije s *hinge* regijom zbog ostvarivanja ključnih interakcija s kinazom, dok je ostatak molekule zamijenjen  $sp^3$  bogatim tetrahidro- $\beta$ -karbolinom. Interakcije predloženih ciljnih molekula sa SRC-kinazom istražene su metodom molekuskog uklapanja. Za sintezu su odabrani analog ponatiniba (**CM2**) i analog PP2 liganda (**CM3**) jer su imali dobar *Gscore* (**CM2**, *Gscore* = -7,2; **CM3**, *Gscore* = -6,4) te je retrosintetskom analizom utvrđeno da postoje literaturno dostupni podaci potrebni za njihovu sintezu.

Sinteza fragmenta bogatog  $sp^3$  hibridiziranim ugljikovim atomima, **CM1** (spoj **6**), provedena je u pet koraka. Sinteza je temeljena na reakciji asimetrične alilne dearomatizacije katalizirane iridijem. Prema literaturi ova reakcija je bila najuspješnija uz ligand **L1**, ali s obzirom na to da nije komercijalno dostupan te njegova sinteza nije bila uspješna, korišten je ligand **L2**. Određivanje enantiomerne čistoće **CM1** spoja nije bilo uspješno. Iako je isprobano nekoliko analitičkih metoda, nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi enantiomernu čistoću. Za određivanje enantiomerne čistoće budućih spojeva potrebno je razviti pogodnu metodu za kiralnu separaciju te sintetizirati racemat koji bi služio kao standard za usporedbu.

Sinteza fragmenta ponatiniba koji ostvaruje interakcije s *hinge* regijom uspješno je provedena u dva koraka te je fragment uspješno kondenziran s tetrahidro- $\beta$ -karbolinskim fragmentom paladijem kataliziranom Sonogashira reakcijom pri čemu je dobivena ciljna molekula **CM2** (spoj **9**).

Sinteza fragmenta PP2 liganda koji ostvaruje interakcije s *hinge* regijom uspješno je provedena u četiri koraka. Povezivanje s tetrahidro- $\beta$ -karbolinskim fragmentom temeljeno na Ullmannovoj i Buchwaldovoj reakciji nije bilo uspješno te je potrebna daljnja optimizacija reakcijskih uvjeta. Također, potrebno je razmotriti druge mogućnosti, poput Chan-Lam reakcije za koju je potrebna sinteza boronske kiseline tetrahidro- $\beta$ -karbolinskog fragmenta ili mogućnost diskonekcije unutar pirolo-pirimidinskog prstena PP2 liganda.

**Ciljnu molekulu CM2** potrebno je testirati u *in vitro* eseju inhibicije SRC-kinaze te sukladno s dobivenim rezultatima planirati nove analoge. Za sintezu novih analoga potrebno je

---

proširiti domet reakcije, razmotriti uvođenje različitih zaštitnih skupina na bočni lanac 3-indolil alilnih karbonata prilikom pripreve kao i njihovo uklanjanje u ključnim koracima.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

ee - enantiomerna čistoća/enantiomerni suvišak

(R,Ra)-Me-THQphos - Ligand L2 - (2R)-1-(11bR)-(binafto[2,1-d:1',2'-f][1,3,2] dioksafosfepin-4-il)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidrokinolin

ACN - acetonitril

ADP - adenzin difosfat

AFS - adicija funkcionalne skupine

A-omča - aktivacijski segment

Arg - arginin

Asp/D - aspartat

ATP - adenzin trifosfat

bs - široki singlet (eng. *Broad singlet*)

CADA - katalitička asimetrična reakcija dearomatizacije

CDCl<sub>3</sub> - deuterirani kloroform

CM - ciljna molekula

CML - kronična mijeloična leukemija

Cys - cistein

d - dublet

DBU - 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en

DCM - diklormetan

DFG - aspartat, fenilalanin, glicin

DIBAL-H - diizobutilaluminijev hidrid

DIS - diskonekcija

DMF - *N,N*-dimetilformamid

DMSO - dimetilsulfokid

DMSO-*d*<sub>6</sub> - deuterirani dimetil sulfoksid

Et<sub>3</sub>N - trietilamin

EtOAc - etil-acetat

EtOH - etanol



FDA - Američka Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*)  
Fsp<sup>3</sup> - udio zasićenosti sp<sup>3</sup> hibridiziranim C-atomima  
Gln - glutamin  
Glu/E - glutamat  
Gly/G - glicin  
G-omča - glicinom bogata omča  
Hinge regija - zglobna regija, strukturni motiv unutar aktivnog mjesta SRC-kinaze  
His - histidin  
HPLC - tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*)  
IFS - interkonverzija funkcionalne skupine  
Ile/I - izoleucin  
Leu/L - leucin  
Lys/K - lizin  
Met - metionin,  
min - minuta  
MS - masena spektroskopija  
NBS - *N*-bromsukcinimid  
NMR - nuklearna magnetska rezonanca  
P(/Bu)<sub>3</sub> - tri-tert-butilfosfin  
PDB – baza podataka proteinskih kristalnih struktura (eng. *Protein Data Bank*)  
Ph+ - Philadelphia kromosomom  
Phe/F - fenilalanin  
PIDA - (diacetoksijod)benzen  
PMI - vodeći moment inercije (eng. *Principal Moment of Inertia*)  
PP2 - 4-amino-5-(4-klorfenil)-7-(*tert*-butil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidin  
q - kvartet  
R<sub>t</sub> - vrijeme retencije  
s - singlet  
SEMCl - 2-(trimetilsilil)etoksimetil klorid  
SFK - obitelj SRC-kinaza (eng. *Src Family Kinase*)  
SQD - eng. Single quadruple detection

TBAF - tetrabutil amonijev fluorid

TFA - trifluoroacetna kiselina

THF - tetrahidrofur

Thr - treonin

TLC - tankoslojna kromatografija

Trp - triptofan

Tyr/Y - tirozin

UPLC- tekućinska kromatografija ultravisoke učinkovitosti

(eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*)

UV - ultraljubičasto (eng. *Ultraviolet*)

X-ray - rentgenske zrake

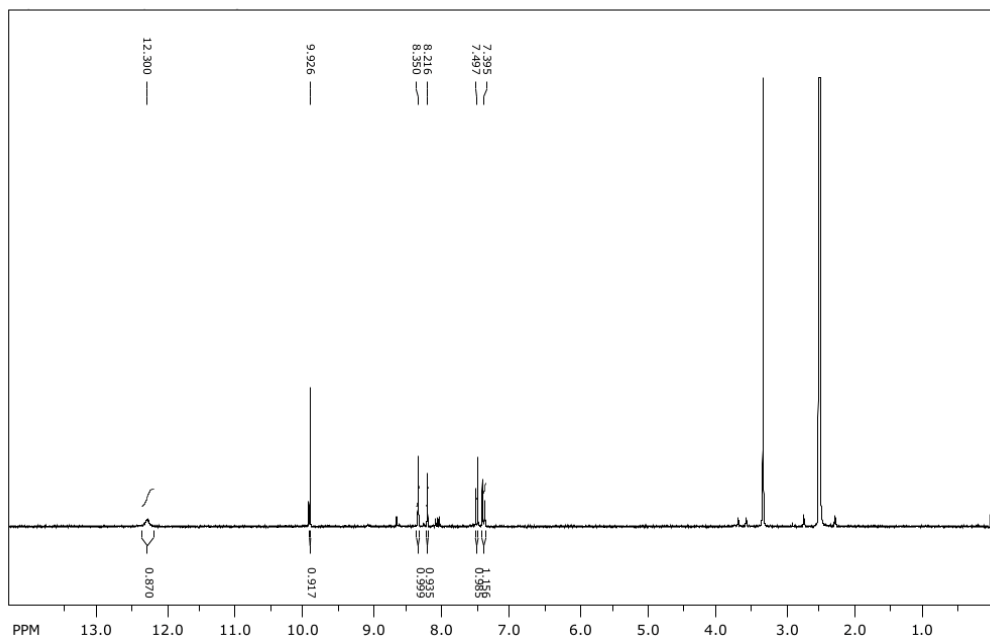
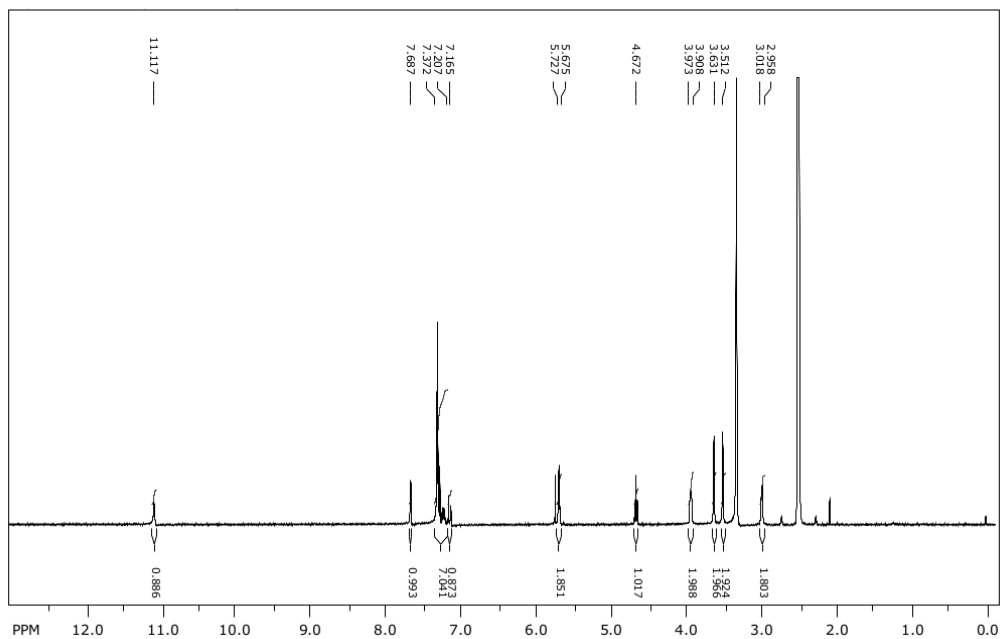
## § 7. LITERATURNI IZVORI

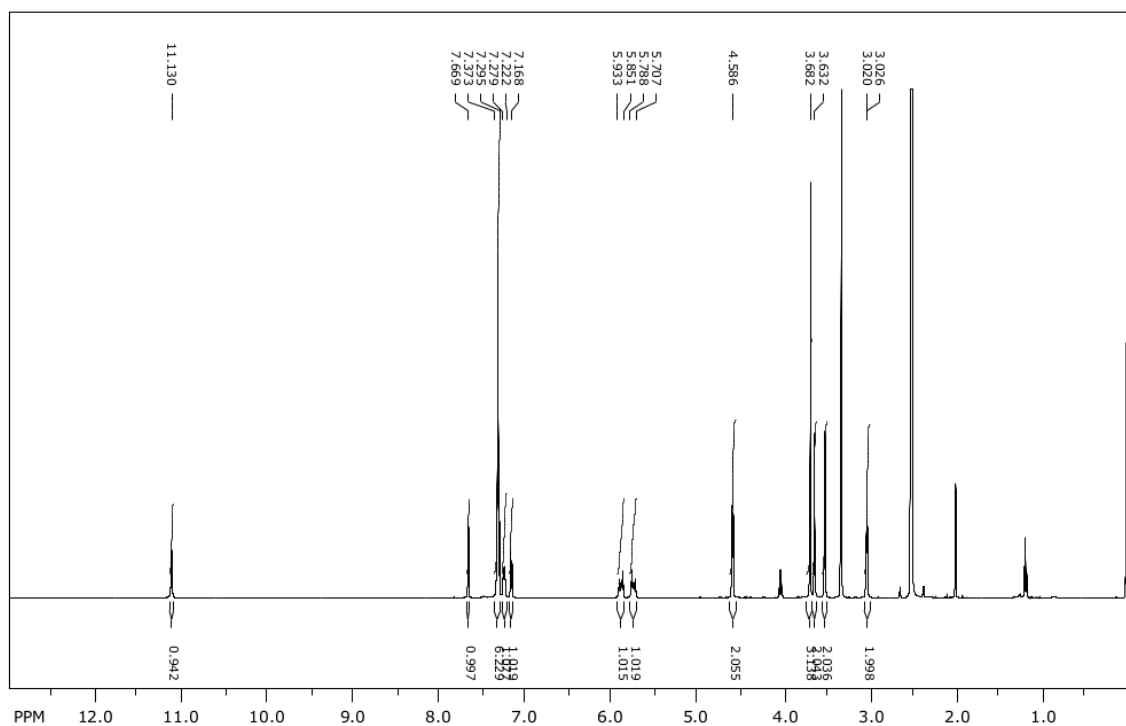
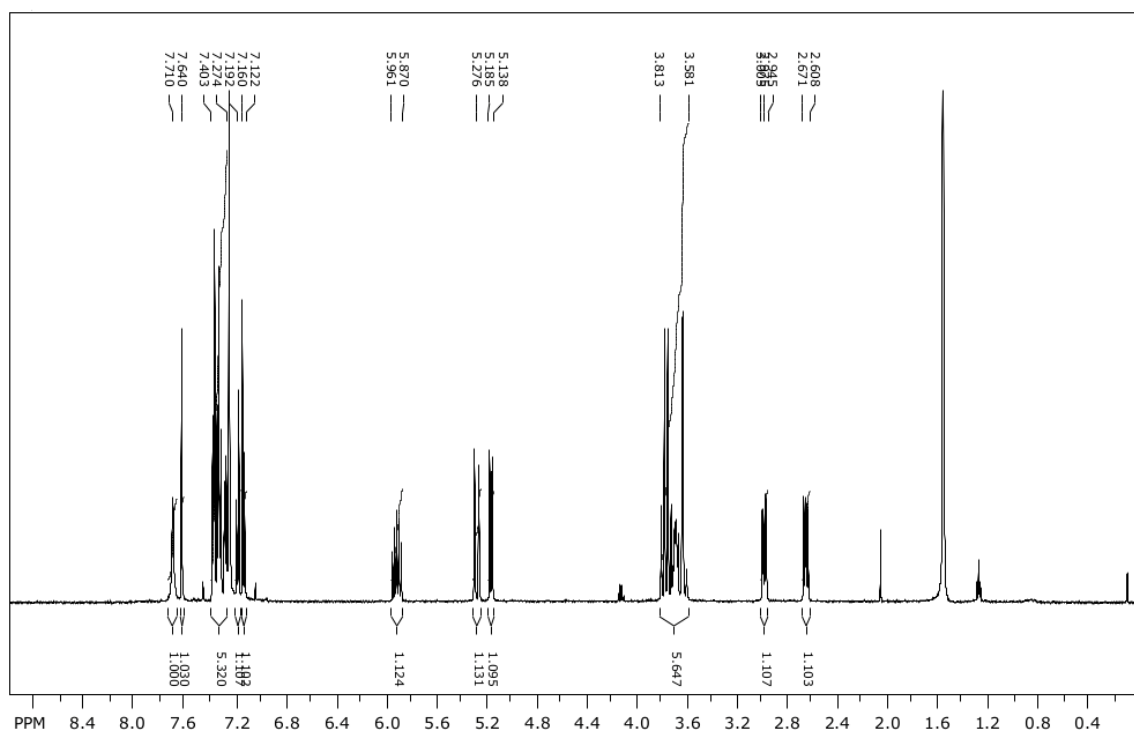
1. R. Roskoski Jr., *Pharmacol. Res.* **94** (2015) 9–25.
2. M. K. Paul, A.K. Mukhopadhyay, *Int J Med Sci.* **1** (2004) 101–115.
3. G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science* **298** (2002) 1912–934.
4. S. M. Thomas, J. S. Brugge, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** (1997) 513–609.
5. G. Sun, A. K Sharma, R. JA Budde, *Oncogene* **17** (1998), 1587–1595.
6. D. Fabbro, S. W. Cowan-Jacob, H. Moebitz, *Br. J. Pharmacol* **172** (2015) 2675–2700.
7. Y. Liu, N. S. Gray, *Nat. Chem. Biol.* **2** (2006) 358–364.
8. G. Sun, R. J. A. Budde, *Biochemistry* **36** (1997), 2139–2146.
9. E. L. Mayer, I. E. Krop, *Clin. Cancer Res* **16** (14) (2010) 3526–3532.
10. E. Pucheta-Martínez, G. Saladino, M. A. Morando, J. Martínez-Torrecuadrada, M. Lelli, L. Sutto, N. D’Amelio, F. L. Gervasio, *Sci. Rep* **6** (2016) 24235.
11. M. A. Seeliger, P. Ranjitkar, C. Kasap, Y. Shan, D. E. Shaw, N. P. Shah, J. Kuriyan, D. J. Maly, *Cancer Res.* **69** (2009), 2384–2392.
12. X. Lu, J. B. Smaill, K. Ding, *Angew. Chem. Int. Ed.* **59** (2020) 13764–13776.
13. D. Fabbro, S. Ruetz, E. Buchdunger, S. W. Cowan-Jacob, G. Fendrich, J. Liebetanz, J. Mestan, T. O’Reilly, P. Traxler, B. Chaudhuri, H. Fretz, J. Zimmermann, T. Meyer, G. Caravatti, P. Furet, P. W. Manley, *Pharmacol. Ther.* **93** (2002) 79–98.
14. W. Jeong, J. H. Doroshov, S. Kummar, *Curr Probl Cancer.* **37** (2013) 110–144.
15. F. Lovering, J. Bikker, C. Humblet, *J. Med. Chem.* **52** (2009) 6752–6756.
16. G. S. Martin, *Mol. Cell. Bio.* **2** (2001) 467–475.
17. J. H. Hanke, J. P. Gardner, R. L. Dow, P.S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok, P. A. Connelly, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 695–701.
18. F. Carles, S. Bourg, C. Meyer, P. Bonnet, *Molecules* **23** (2018), 908–926.
19. E. Altmann, M. Missbach, J. Green, M. Šušta, H.-A. Wangenknecht, L. Widler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11** (2001) 853–856.
20. R. Sundaramoorthi, W. C. Shakespeare, T. P. Keenan, C. A Metcalf, Y. Wang, U. Mani, M. Taylor, S. Liu, R. S. Bohacek, S. S. Narula, D. C. Dalgarno, M. R. van Schravandijk,

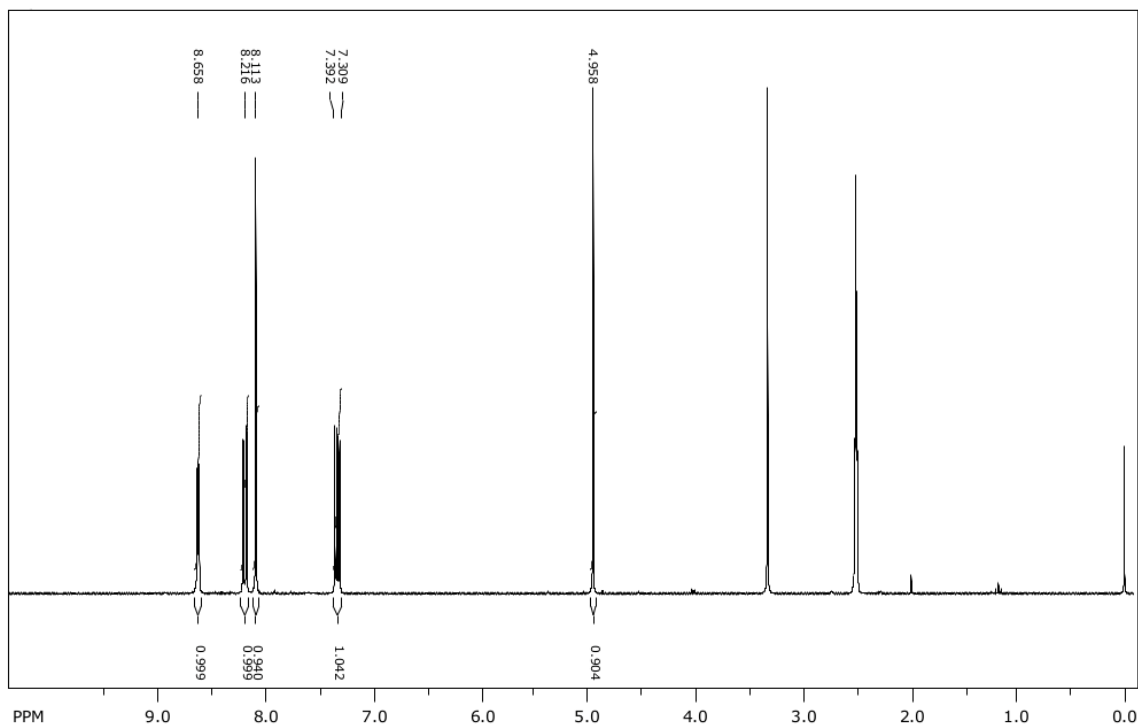
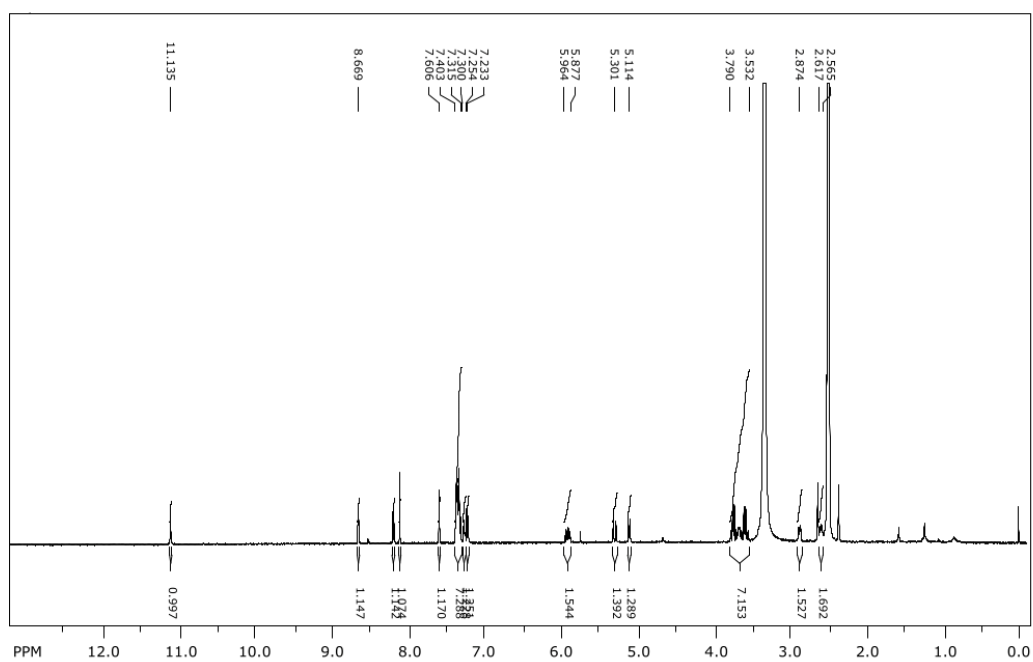
- S. M. Violette, S. Liou, S. Adams, M. K. Ram, J. A. Keats, M. Weigele, T. K. Sawyer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13** (2003) 3063–3066.
21. S-Li You, *Asymmetric Dearomatization Reactions*, John Wiley&Sons INC., Hoboken, New Jersey, 2016.
  22. C. Zheng, S-Li You, *Nat. Prod. Rep.* **36** (2019) 1589–1605.
  23. C.-X. Zhuo, Q.-F. Wu, Q. Zhao, Q.-L. Xu, S-L. You, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 8169–8172.
  24. W.-B Liu, C. Zheng, C.-X. Zhuo, L.-X Dai, S.-L You, *J. Am Chem, Soc.* **134** (2012) 4812–4821.
  25. J.-J- Lie, E. J. Corey, *Name reactions in heterocyclic chemistry*, John Wiley&Sons INC., Hoboken, New Jersey, 2005, str. 469–480.
  26. J. Stęckigt, A. P. Antonchick, F. Wu, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **50** (2011) 8538–8564.
  27. J. F. Hartwig and L. M. Stanley, *Acc Chem Res.* **43** (2010) 1461–1475.
  28. Schrödinger Release 2020-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020
  29. J. M. McCall, D. L. Romero, R. C. Kelly, *Heterocyclic Compounds For Thr Inhibition Of PASK*, U. S. Patent 119046, 2012.
  30. M. Bandini, A. Melloni, F. Piccinelli, R. Sinisi, S. Tommasi, A. Umani-Ronchi, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 1424–1425.
  31. W.-S. Huang, C. A. Metcalf, R. Sundaramoorthi, Y. Wang, D. Zou, R. M. Thomas, X. Zhu, L. Cai, D. Wen, S. Liu, J. Romero, J. Qi, I. Chen, G. Banda, S. P. Lentini, S. Das, Q. Xu, J. Keats, F. Wang, S. Wardwell, Y. Ning, J. T. Snodgrass, M. I. Broudy, K. Russian, T. Zhou, L. Commodore, N. I. Narasimhan, Q. K. Mohemmad, J. Iuliucci, V. M. Rivera, D. C. Dalgarno, T. K. Sawyer, T. Clackson, W. C. Shakespeare, *J. Med. Chem.* **53** (2010) 4701–4719.
  32. G. Chen, T. D. Cushing, B. Fisher, X. He, K. Li, Z. Li, L. R. McGee, V. Pattaropong, P. Faulder, J. L. Seganish, Y. Shin, Z. Wang, W. Liu, *Alkynyl Alcohols as Kinase Inhibitors*, U. S. Patent 003803, 2009 (WO2009158011).
  33. C. L Branch, W. N. Chan, A. Johns, C. N. Johnson, D. J. Nash, R. Novelli, J.-P. Pilleux, R. A. Porter, R. E. A. Stead, G. Stemp, *Preparation of aroylazoles and aroylazines as orexin receptor antagonists*, WO2003002561, 2002.

34. M. Weigele, D. C. Dalgarno, G. P. Luke, T. K. Sawyer, R. Bohacek, W. C. Shakespeare, R. Sundara Moorthi, Y. Wang, C. A. Metcalf, B. Chi Vu, H. N. Kawahata, *Novel Heterocycles*, WO 01/44258 A1, 2001.
35. R. V. Urbonas, V. Poskus, J. Bucevicius, J. Dodonova, S. Tumkevicius, *Synlett* **24** (2013) 1383–1386.
36. A. Pahram, T. Grossmann, J. Kroeber, *Materials for organic electroluminescent devices*, WO/2017/186760, 2017.
37. K. Murai, T. Kobayashi, M. Miyoshi, H. Fujioka, *Org. Lett.* **20** (2018) 2333–2337.
38. G. L. Hoang, Z.-D. Yang, S. M. Smith, R. Pal, J. L. Miska, D. E. Pérez, L. S. W. Pelter, X. C. Zeng, J. M. Takacs, *Org Lett.* **17** (2015) 940–943.
39. H. Bernsmann, M. van den Berg, R. Hoen, A. J. Minnaard, G. Mehler, M. T. Reetz, J. G. De Vries, B. L. Feringa, *J. Org. Chem.* **70** (2005) 943–951.
40. W.-J. Tang, Y.-Y. Huang, Y.-M. He, Q.-H. Fan, *Tetrahedron: Asymmetry* **17** (2006) 536–543.
41. S. Rao, D. Gurbani, G. Du, R. A. Everley, C. M. Browne, A. Chaikuad, L. Tan, M. Schroder, S. Gondi, S. B. Ficarro, T. Sim, N. D. Kim, M. J. Berberich, S. Knapp, J. A. Marto, K. D. Westover, P. K. Sorger, N. S. Gray, *Cell Chem. Biol.* **26** (2019) 818–829.

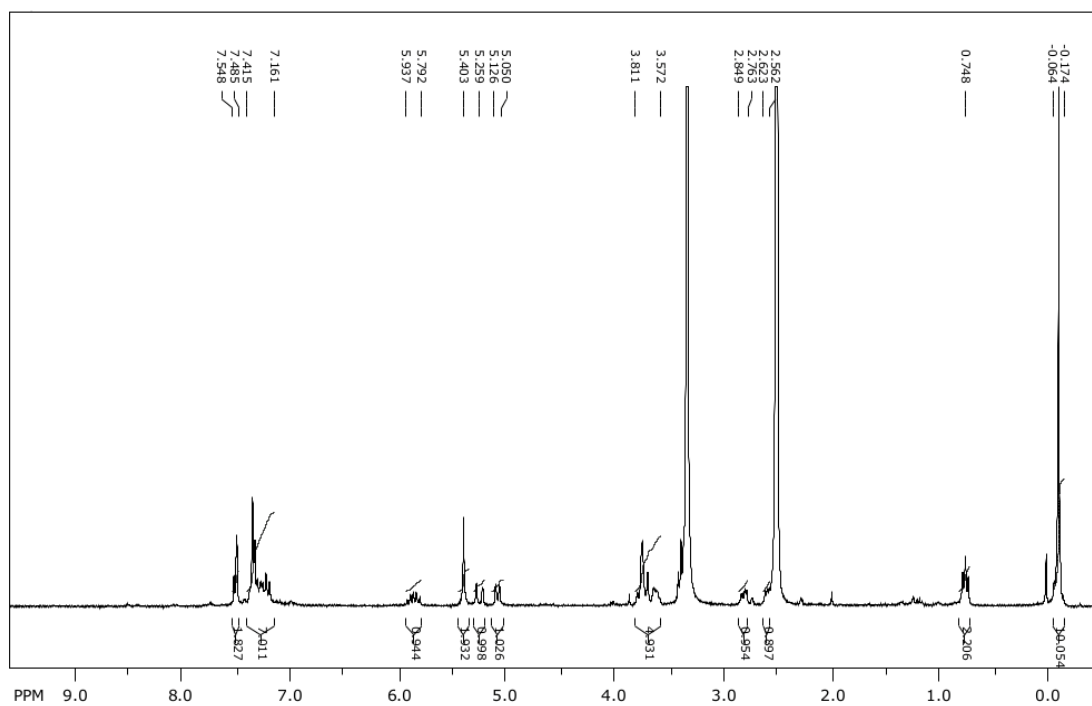
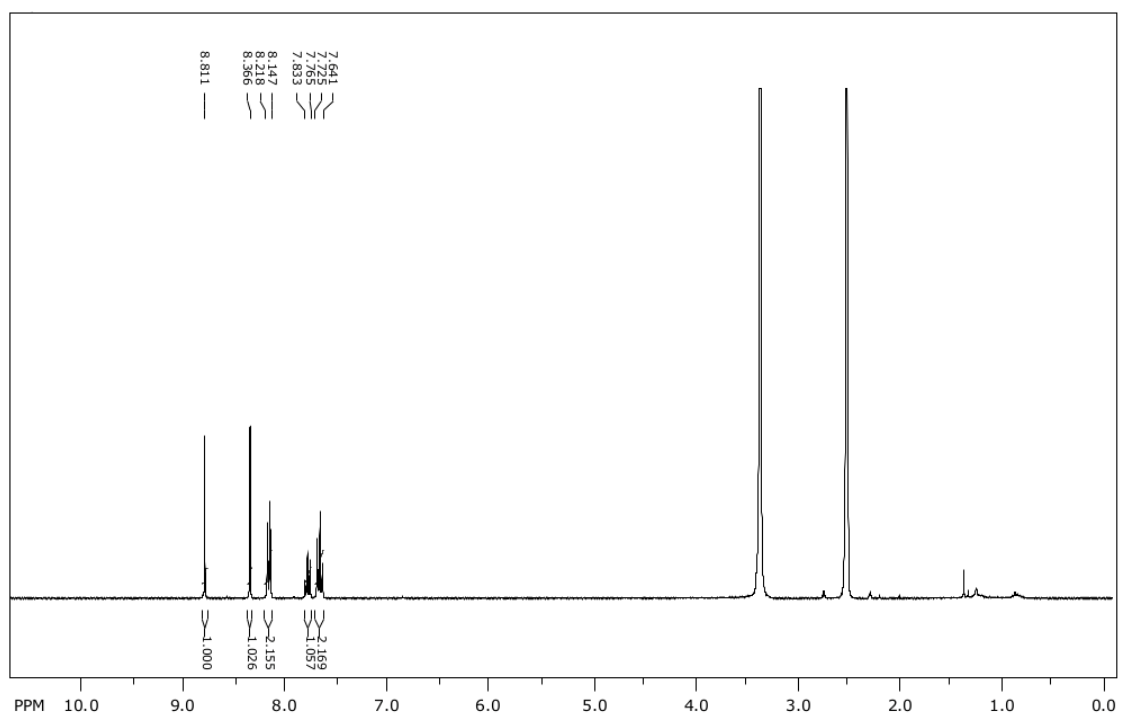
## § 8. DODATAK

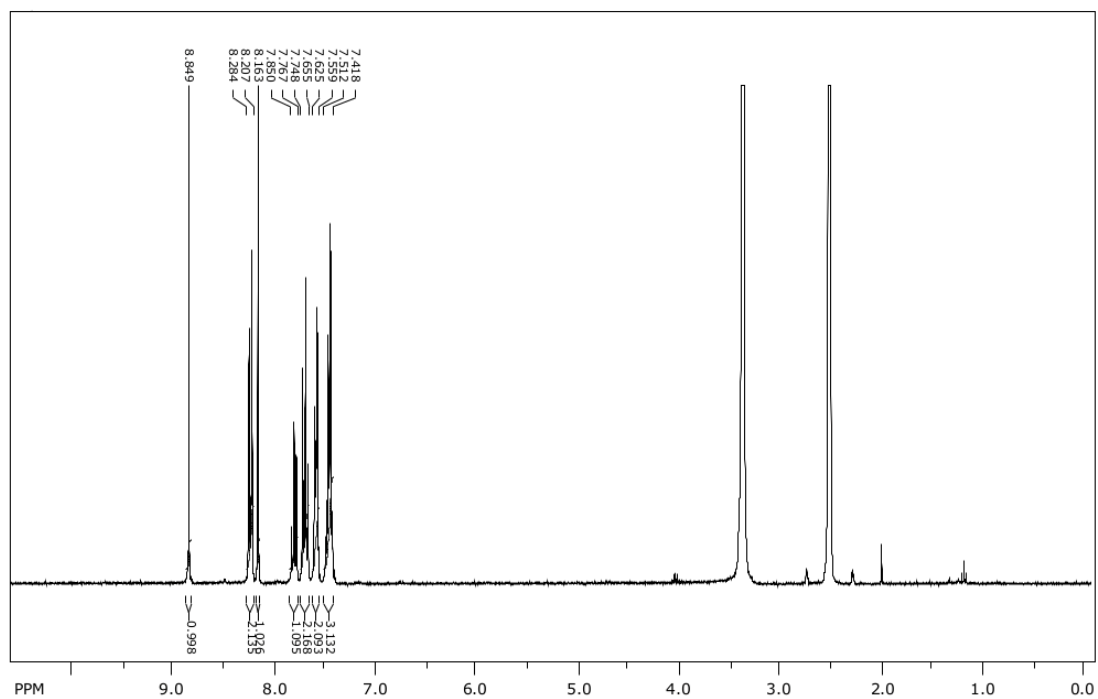
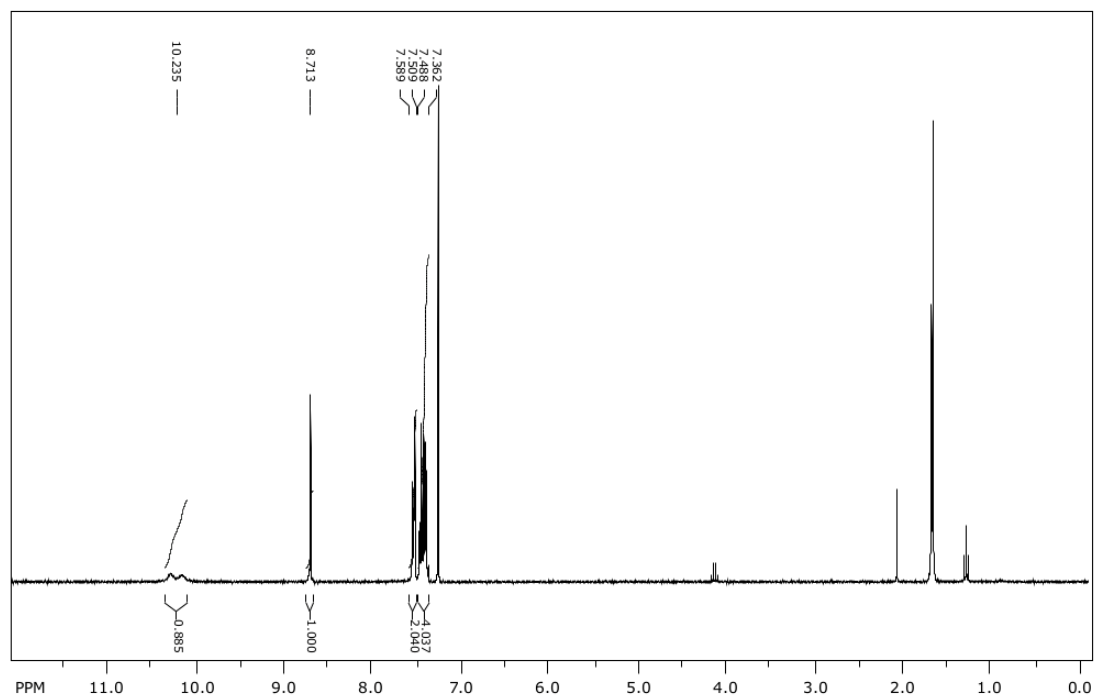
Dodatak 1:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 1Dodatak 2:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 4

Dodatak 3:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 5Dodatak 4:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 6

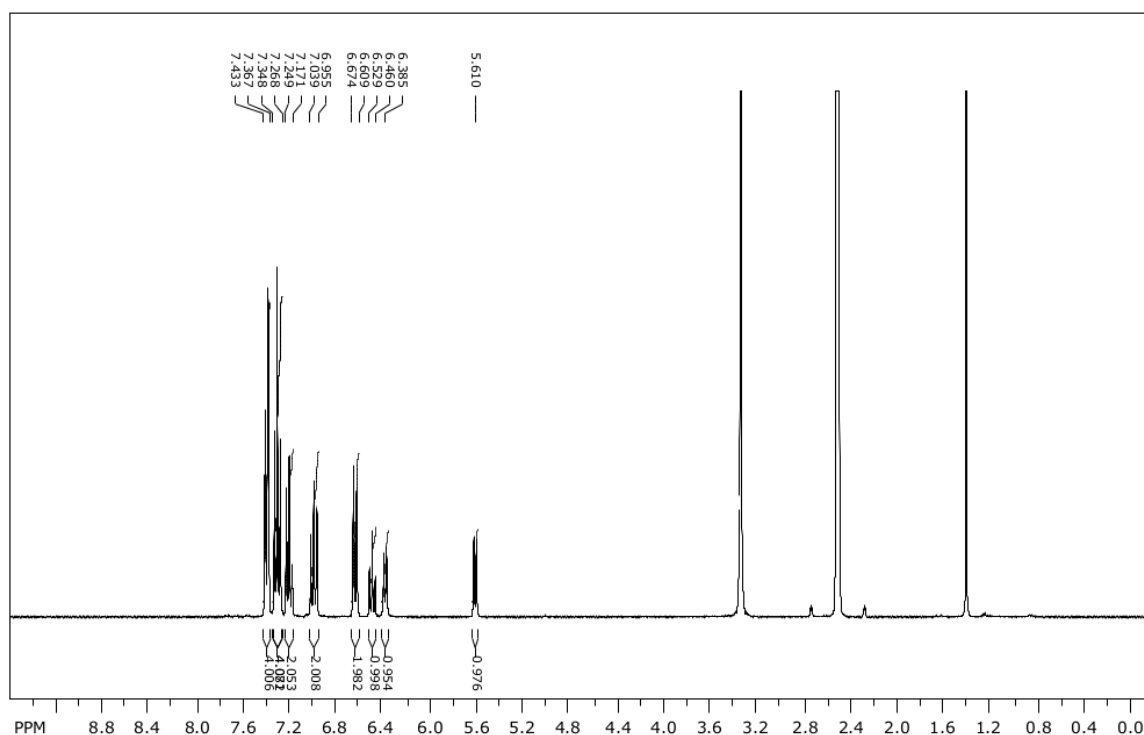
Dodatak 5:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 8Dodatak 6:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 9



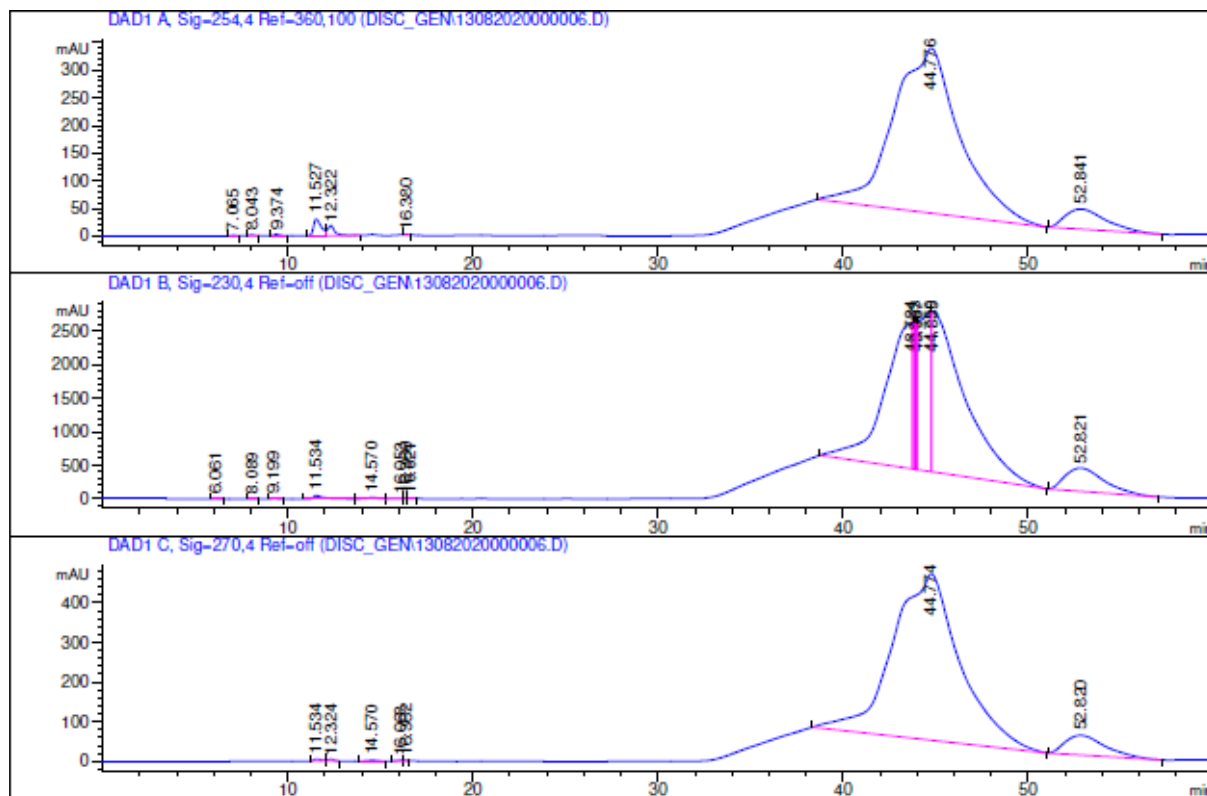
Dodatak 7:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **10**Dodatak 8:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **11**

Dodatak 9:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **12**Dodatak 10:  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **13**

Dodatak 11: <sup>1</sup>H NMR spektar *N*-benzhidrilanilina



Dodatak 11: Kromatogram metode IV u kiralnoj kromatografiji



## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ela Radošević

Datum rođenja: 28.11.1994.

Mjesto rođenja: Bjelovar

### Obrazovanje

2001–2009 Treća osnovna škola Bjelovar, Bjelovar

2009–2013 Prirodoslovno-matematička gimnazija Bjelovar, Bjelovar

2013–2018 Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu,  
preddiplomski sveučilišni studij Kemija

2018–2020 Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, diplomski  
sveučilišni studij Kemija, smjer: istraživački, grane: fizikalna i organska  
kemija