

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA HEINDLER

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA HEINDLER

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH POTENCIALNIH
ZAVIRALCEV PROTEINA KRAS**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW POTENTIAL PROTEIN KRAS
INHIBITORS**

Ljubljana, 2014

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravljala na Katedri za farmakologijo in terapevtsko kemijo, Oddelek za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo v Barceloni pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca in somentorstvom prof. dr. Marie Dolors Pujol Dilmé, Ph.D. Spektroskopske meritve smo opravili na Fakulteti za farmacijo in Fakulteti za kemijo v Barceloni ter na Raziskovalnem združenju Univerze v Orleansu v Franciji.

Na tem mestu bi se rada zahvalila prof. dr. Stanislavu Gobcu za vse podane nasvete, potrpežljivost in strokovno podporo ter prof. dr. M. Dolors Pujol Dilmé za vsakodnevno pomoč pri raziskovalnem delu, spodbudo in vso deljeno znanje. Prav tako se zahvaljujem MDP ekipi- Vanessi za seznanitev z raziskovalnim delom v kemiji ter Loreni in Arturu za vsakodnevne razlage ter vzdrževanje pozitivne atmosfere v laboratoriju. Najlepša hvala tudi mojim staršem, ostalim članom družine ter prijateljem, ki so me podpirali tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca in somentorstvom prof. dr. M. Dolors Pujol Dilmé, Ph.D.

Nina Heindler

Ljubljana, 2014

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe

Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec

Somentor: prof. dr. Maria Dolors Pujol Dilmé, Ph.D

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	RAK	1
1.2	KANCEROGENI DEJAVNIKI	2
1.3	BENIGNI IN MALIGNI TUMORJI	2
1.4	ZNAČILNOSTI RAKASTIH CELIC	2
1.5	INVAZIVNOST IN METASTAZIRANJE	4
1.6	CELIČNI CIKEL	5
1.6.1	<i>Celični cikel in RAK</i>	<i>8</i>
1.7	KRAS	8
1.8	METODE ZDRAVLJENJA RAKA	12
1.9	DRUŽINA PIROLOPIRIMIDINOV	14
2	NAČRT DELA	16
3	MATERIALI IN METODE	18
4	EKSPERIMENTALNO DELO	20
4.1	SINTEZA 6-KLORO-N-METILPIRIMIDIN-4-AMINA	20
4.2	SINTEZA 5-JODO-6-KLORO-N-METILPIRIMIDIN-4-AMINA	21
4.3	SINTEZA 5-ALKINILPIRIMIDINOV	22
4.4	SINTEZA 4-AMINIRANIH PIROLOPIRIMIDINOV	26
4.4.1	<i>S primarnim in sekundarnim aminom</i>	<i>31</i>
4.4.1.1	Z dietilaminom	31
4.4.1.2	Z dietilaminoetilaminom	31
4.4.1.3	S piperidinom	32
4.4.1.4	S 4-metilpiperidinom	35
4.4.1.5	S pirolidinom	37
4.4.1.6	S cikloheksilaminom	37
4.4.2	<i>Z anilini</i>	<i>38</i>
4.4.2.1	Z anilinom	38
4.4.2.2	S 4-nitroanilinom	39
4.4.2.3	S 4-bromoanilinom	41
4.4.2.4	S 4-kloroanilinom	42
4.4.2.5	S 4-fluoroanilinom	42
4.4.2.6	S 4-aminobenzonitrilom (s 4- cianoanilinom)	43
4.4.2.7	S 4-metoksianilinom (s p-anisidinom)	44
4.4.2.8	S 4-metilanilinom	44
4.4.3	<i>S hidrazinom</i>	<i>44</i>
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	46
5.1	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	47
5.1.1	<i>SINTEZA 6-KLORO-N-METILPIRIMIDIN-4-AMINA</i>	<i>48</i>
5.1.2	<i>JODIRANJE 6-KLORO-4-METILAMINOPIRIMIDINA</i>	<i>48</i>
5.1.3	<i>SINTEZA 5-ALKINILPIRIMIDINOV</i>	<i>49</i>
5.1.4	<i>»ONE-POT« SINTEZA 4-AMINIRANIH-6-ARILPIROLO[2,3-d]PIRIMIDINOV</i>	<i>50</i>
6	SKLEP	56
7	VIRI	57

POVZETEK

Rak predstavlja skupino bolezni, katerim je skupna nenadzorovana rast gensko poškodovanih celic. V današnjem svetu sta zanj značilni visoka incidenca ter visoka umrljivost. Prav zaradi slednjega si prizadevamo odkriti učinkovita zdravila za različne tipe rakavih obolenj, glede na bolj specifičen vzrok bolezni. Eden možnih vzrokov nastanka raka je tudi mutacija gena za protein KRAS, ki je v družini RAS najpogostejša. KRAS protein je zaradi tega postal zanimiv kot tarča pri načrtovanju novih protitumorskih učinkovin. Vloga normalnega proteina je prenašanje signalov od membranskih receptorjev v celično jedro, ti signali pa z nadaljnjo kaskado reakcij vplivajo na potek celične delitve. Naša želja je bila pripraviti potencialne inhibitorje KRAS proteina, saj mutacija KRAS povzroči njegovo konstantno aktivnost in s tem nenadzorovano delitev celic. Pri delu smo izhajali iz že bolj raziskanih purinov, ki so dokazali aktivnost napram proteinu KRAS. Te smo strukturno modificirali tako, da smo iz purinskega ogrodja odvzeli en dušik in tako dobili pirolpirimidine.

Sinteza je potekala v štirih stopnjah. Sprva smo v treh stopnjah iz komercialnega produkta sintetizirali štiri različne izhodne spojine- alkinilpirimidine, nato pa le-te v enem koraku pod vplivom mikrovalov ciklizirali in nanje pripeli ustrezne substituentne. Kot reagente smo uporabili amine in aniline ter tako pridobili različne analoge pirolpirimidinov.

Sintetizirali smo 20 novih potencialnih inhibitorjev proteina KRAS. Potrdili smo, da z uporabo mikrovalov uspešno zmanjšamo stroške in čas sinteze, saj reakcija poteče v odsotnosti katalizatorja, ciklizacijo in substitucijo alkinilpirimidina pa opravimo v enem samem koraku. Reakcija v dveh primerih ni potekla, saj 4-metoksianilin ter 4-metilanilin ne omogočata nukleofilnega napada na izhodno spojino. Ostale pridobljene spojine pa lahko predstavljajo temelj za nadaljnje sinteze morebitnih protitumorskih učinkovin.

Ključne besede: protitumorske učinkovine, KRAS protein, celični cikel, zaviralci KRAS proteina, pirolpirimidini, »one-pot« sinteza

ABSTRACT

Cancer represents a group of diseases characterized by the uncontrolled growth of genetically damaged cells and is nowadays showing high incidence and high mortality. Therefore we are trying to discover effective drugs for different types of cancer, depending on the more specific cause of the disease. One of the possible causes of cancer is the mutation of gene that codes the protein KRAS, which is the most common type in RAS family. KRAS protein has become an attractive target for the design of new anti-cancer agents. The role of a normal protein is transmitting signals from membrane receptors to the cell nucleus. These signals influence the course of cell division via further cascades of reactions. Our aim was to prepare potential inhibitors of KRAS protein because KRAS mutation causes its constant activity and thus indirectly uncontrolled cell division. Our work derived from the already well explored purines, which have shown activity against KRAS protein. The purine scaffold was structurally modified taking out one of the purine's nitrogens and thereby pyrrolopyrimidines were obtained.

The synthesis was carried out in four steps. Initially, four different starting compounds-alkynyl pyrimidines- were synthesized in three steps from the commercial product. Those were then cyclized and accordingly substituted in one step with the use of microwaves. Amines and anilines were used as reagents to obtain the various analogs of pyrrolopyrimidines.

20 new potential inhibitors of protein KRAS were synthesized. Cost and time of the synthesis were effectively reduced by the use of microwaves, since the reaction did not require a metal-catalyst assistance and a cyclization and a substitution of alkynyl pyrimidine were performed in a single step. The reaction did not occur using 4-methoxyaniline and 4-methylaniline as they do not allow nucleophilic attack on the starting compound. Other synthesized compounds may form the basis for further synthesis of potential anti-cancer agents.

Key words: anti-cancer agents, KRAS protein, cell cycle, KRAS inhibitors, pyrrolopyrimidines, »one-pot« synthesis

SEZNAM OKRAJŠAV

ATR	zmanjššan popolni odboj (attenuated total reflection)
BINAP	bis(difenilfosfino)binaftalen
CDK	od ciklina odvisna kinaza (cyclin-dependent kinase)
CIP	protein, ki interagira z od ciklina odvisnimi kinazami (CDK-interacting protein)
CKI	zaviralec od ciklina odvisne kinaze (cyclin-dependent kinases inhibitor)
Cq	kvarterni ogljik
d	dublet
dd	dublet dubleta
DME	dimetoksietan
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EGFR	receptor za epidermalni rastni dejavnik (epidermal growth factor receptor)
ESI	eletrorazpršilna ionizacija
GAP	GTP-azo aktivirajoči protein
GDP	gvanozin difosfat
GEF	gvanin nukleotid izmenjujoči dejavnik (guanine nucleotide exchange factor)
GRB 2	protein 2, ki veže receptor za rastni dejavnik (growth factor receptor-bound protein 2)
GSK	glikogen sintaza kinaza (glycogen synthase kinase)
GTP	gvanozin trifosfat
HER 2	humani epidermalni receptor 2 za rastni dejavnik (human epidermal growth factor receptor 2)
HRAS	Harveyev sarkom na podgani (Harvey rat sarcoma)

HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti (high resolution mass spectrometry)
INK4	zaviralec kinaze CDK4 (inhibitor of CDK4)
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
KIP	protein, ki interagira s kinazami (kinase-interacting protein)
KRAS	Kirstenov sarkom na podgani (Kirsten rat sarcoma)
m	multiplet
MS	masna spektroskopija
Mr	molekulska masa
MV	mikrovalovi
NIS	N-jodosukcinimid
NMR	nuklearna magnetna resonanca
NRAS	nevroblastomski sarkom na podgani (neuroblastoma rat sarcoma)
pRb	retinoblastomski protein
RalGDS	Ral gvanin nukleotid izmenjujoči dejavnik
s	singlet
SHC	transformirajoči protein 1 vsebujoč domeno, homologno Src (Src homology 2 domain-containing)
t	triplet
t-BuOK	kalijev terc-butoksid
TGF	transformirajoči rastni dejavnik (transforming growth factor)
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	trimetilsilan
UV	ultravijolično
VEGF	žilni endotelni rastni dejavnik (vascular endothelial growth factor)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)
δ	kemijski premik
v	frekvenca
λ	valovna dolžina

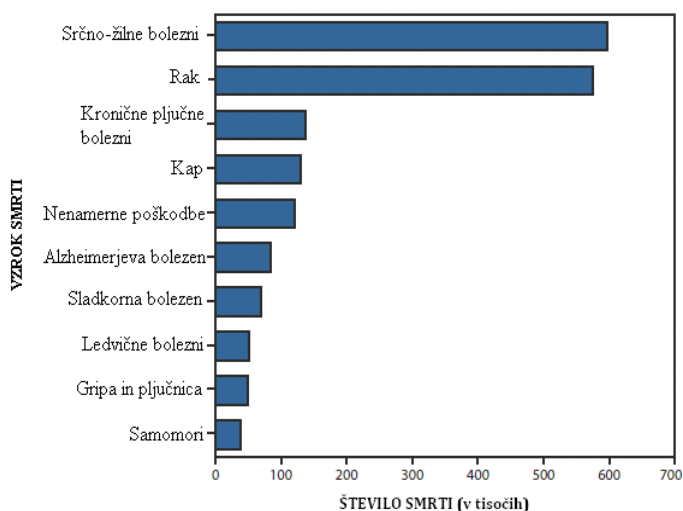
1 UVOD

1.1 RAK

Dandanes se soočamo z vse več različnimi boleznimi, za katere še vedno nimamo aktivnega zdravila. Med te bolezni prištevamo tudi rak. Rak je tip bolezni, za katero je značilna nenormalna oz. nenadzorovana rast celic brez kontaktne inhibicije. Pri tem celice tvorijo skupke oz. tumorje v zdravem tkivu, ki se lahko razširijo na druge organe. Ta proces se imenuje metastaziranje in lahko prizadene kateri koli del telesa. [1]

Najpogostejši tipi raka v Sloveniji so rak kože, debelega črevesja in danke, pljuč, prostate in dojk; pri moškem delu populacije izstopa pljučni rak, vse več se pojavlja tudi rak prostate, pri ženskem pa prevladuje rak dojk. [1] Leta 2010 so v Sloveniji zabeležili 12896 ljudi obolelih za rakom, od tega pa jih je umrla skoraj polovica, to je 5900 bolnikov. [2] Zadnji statistični podatki (GLOBOCAN 2012) kažejo, da je bilo v letu 2012 kar 14,1 milijonov primerov raka na svetu, od katerih se je 8,2 milijona končala s smrtjo. [3]

Pojem rak združuje več kot 100 različnih bolezni v eno skupino bolezni z enakim končnim izidom- prizadetost normalnih bioloških funkcij tkiva ali organa. Rak, ki ni zdravljen, lahko povzroči resne bolezenske motnje in končno tudi smrt. [4] Okrog 23% vseh zabeleženih smrti povzroči rak. Tako je ta bolezen po smrtnosti na drugem mestu, pred njo so le srčno-žilne bolezni (Slika 1). [5,6]



Slika 1: Razporeditev skupin bolezni glede na smrtnost v letu 2010 (povzeto po [7]).

Po nekaterih zadnjih podatkih smrtnost, povzročena z rakom, pada, še posebej v primeru raka črevesja. [8]

1.2 KANCEROGENI DEJAVNIKI

Kancerogene dejavnike lahko razdelimo v dve skupini. V prvo skupino spadajo genetski dejavniki posameznika, v drugo skupino pa zunanji dejavniki oz. dejavniki okolja: 1-fizikalni dejavniki kot je na primer izpostavljenost sevanju, 2-kemični dejavniki, kot so nevarne snovi, zastrupitve, nikotin, onesnaženost zraka ter pa 3-biološki dejavniki, kot so virusne in bakterijske infekcije. [9] Pomembno vlogo seveda igra tudi posameznikov način življenja, kamor spada prekomerno uživanje alkohola, neuravnovešena prehrana ter na splošno nezdravo življenje. [10, 11]

1.3 BENIGNI IN MALIGNI TUMORJI

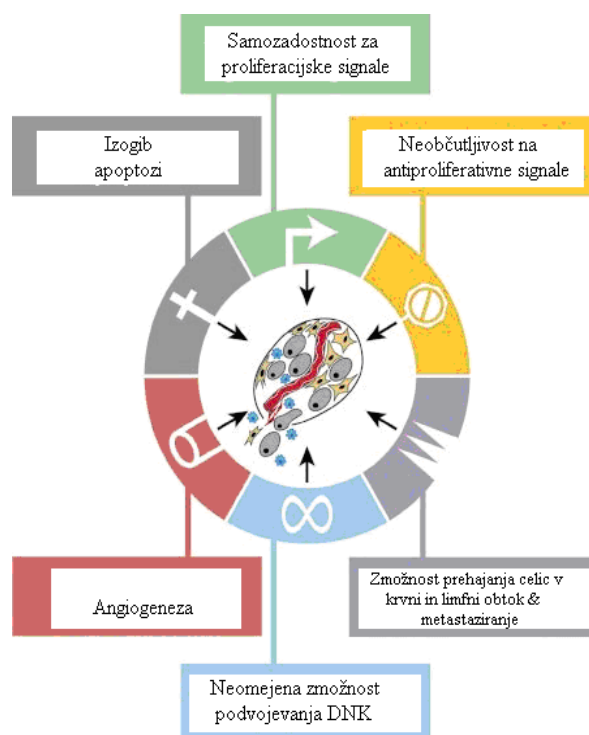
Poznani sta dve vrsti tumorjev: benigni in maligni tumorji. Benigni tumorji so skupki benignih celic, katere se lahko odstrani in se ponavadi ne pojavijo več oz. se celice ne razširijo na druga tkiva in organe. Nevarni so le v primeru, če pritiskajo na sosednja tkiva. Maligni tumorji so precej nevarnejši, saj gre za rakaste tumorje. Lahko se jih odstrani, vendar je velika verjetnost ponovnega pojava takšnih celic. Maligne celice se lahko razširijo na druge organe in tako tvorijo sekundarne tumorje. [12]

1.4 ZNAČILNOSTI RAKASTIH CELIC

Delovanje kancerogenih dejavnikov privede do sprememb v izražanju genov (na primer genov, ki kodirajo zaporedje aminokislin proteina, ki je udeležen pri procesu proliferacije celice) in direktnih mutacij na genetskem zapisu celice, ki se ob delitvi celic prenašajo na hčerinske celice. Mutacije se tako med delitvijo in replikacijo DNK začno nalagati ter povzročijo povečano izražanje protoonkogenov in zmanjšano delovanje tumorskih supresorskih genov. [1] Tako celice pridobijo serijo skupnih značilnosti (v preteklosti so opisali 6 glavnih značilnosti, v zadnjem času pa navajajo še 2 dodatni), kot so (Slika 2):

1. *Samozadostnost za proliferacijske signale*, ki jo iztržijo s spodbujanjem nastanka rastnih dejavnikov ter s spremembo izražanja receptorjev za rastne dejavnike in s spremembo znotrajcelične signalizacije (nastanek onkogenov iz protoonkogenov);
2. *Neobčutljivost na antiproliferativne signale*, tj. z zavrto sintezo retinoblastomskega proteina (pRb) ali podaljševanjem telomer;
3. *Izogib apoptozi*- mutacije na proapoptotičnih genih;
4. *Neomejena zmožnost podvojevanja DNK*, kar pomeni nekontrolirano delitev celic s pomočjo aktivacije telomeraz ter deaktivacijo pRb in tumorje zaviralnega gena p53 ter tako kopičenje mutacij;
5. *Angiogeneza*- celice proizvajajo angiogene dejavnike, kot je VEGF;
6. *Zmožnost prehajanja celic v krvni in limfni obtok in metastaziranje*: s pomočjo delovanja proteaz, ki jih tvorijo tumorske celice, le-te vstopijo v notranjost ožilja in kasneje potujejo po njem do drugih organov. [1, 13, 14]

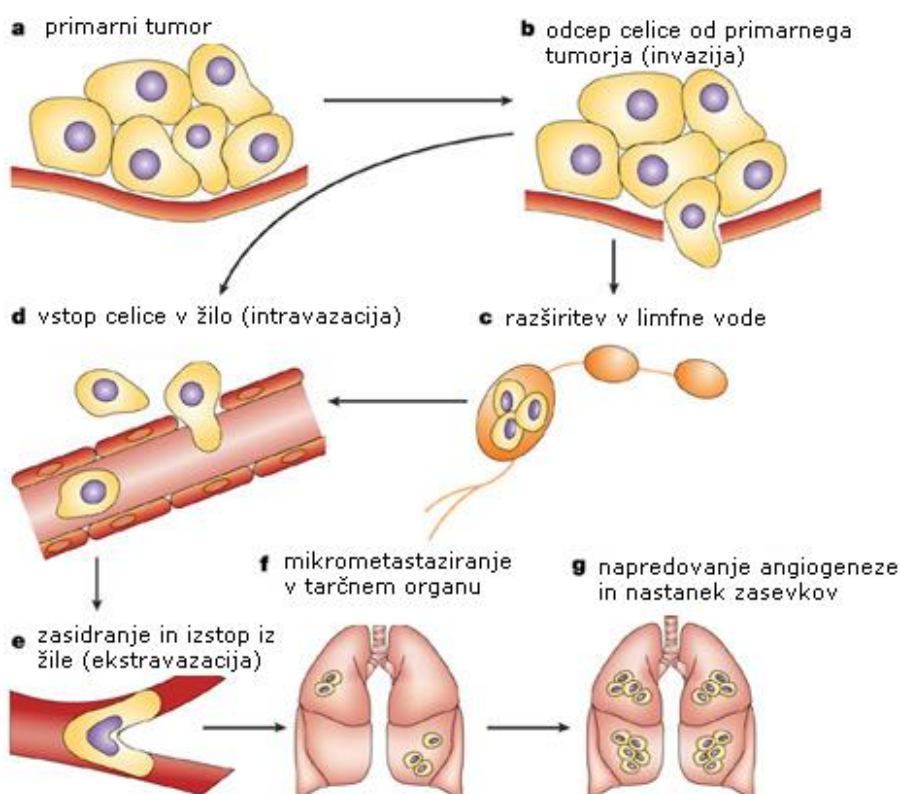
Navajajo tudi sposobnost spremembe metabolizma tumorskih celic ter izogibanje imunskemu odzivu in tako uničenju. [13]



Slika 2: Značilnosti tumorskih celic (povzeto po [14]).

1.5 INVAZIVNOST IN METASTAZIRANJE

Invazivnost je lastnost rakaste celice, ki jo le-ta pridobi zaradi rasti celic v skupke in posledično pritiskov ter učinkov presnovkov te rakaste mase na okolico. Proces invazivnosti je zapleten in poteka v več korakih. Najprej se celica odcepi od tumorja ter se veže na zunajcelični matriks in ga razgradi. Nato migrira do bližnje žile ali limfnih vodov, kjer se preko celičnih receptorjev pripne na bazalno membrano ter začne sproščati encime, ki povzročijo razgradnjo membrane in omogočijo vstop celice v žilo. V naslednjem koraku- metastaziranju, se celice, ki preživijo v notranjosti ožilja, širijo po žilah do organa, ki lahko podpre njihovo preživetje. Tam se celice zasidrajo na notranjo površino žile, povzročijo preoblikovanje strukture membrane, izstopijo iz žile in migrirajo do tarčnega organa, kjer povzročijo nastanek sekundarnega tumorja. (Slika 3). [15, 16]



Slika 3: Proces metastaziranja (povzeto po [17]).

1.6 CELIČNI CIKEL

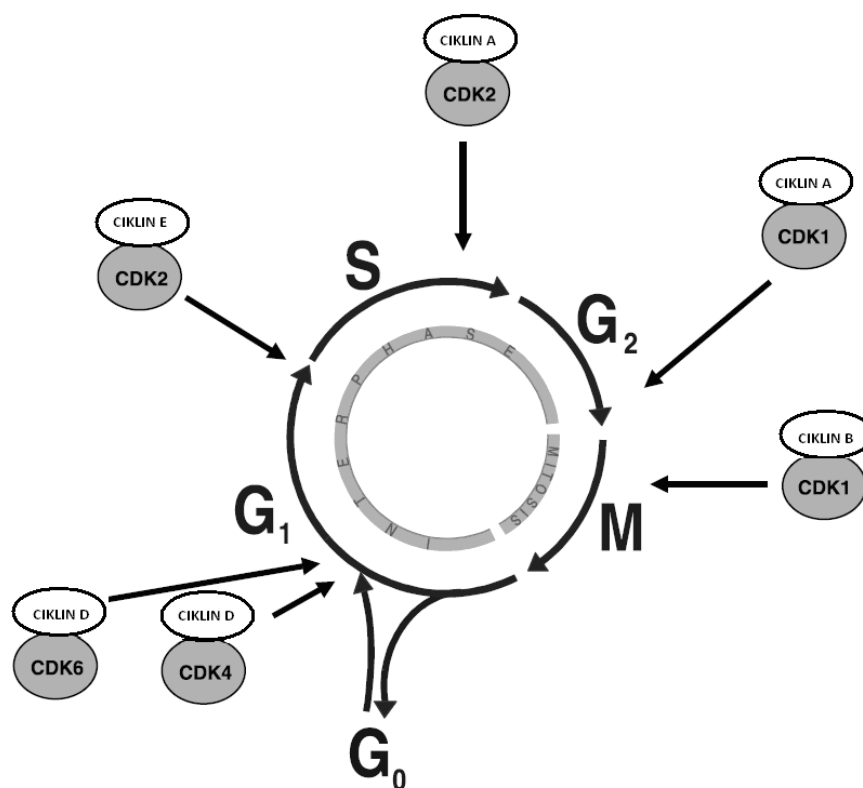
Proces celične reprodukcije se imenuje celični cikel. V tem procesu tako iz ene starševske nastaneta dve hčerinski celici, ki sta zelo podobni starševski celici in sta sami sposobni ponovitve tega procesa. Da pride do delitve celice, se mora podvojiti genom ter celotna celična masa, kromosomi ter ostale celične komponente pa se morajo natančno ločiti in razdeliti. Ti elementi tako celični cikel razdelijo v 4 faze (Slika 4).

- G1: celica raste in se pripravlja na naslednjo fazo (pripravlja kromosome na podvajanje)
- S: faza sinteze DNK; celica podvoji svoj genetski material in centrosoma
- G2: celica raste in se s sintezo določenih proteinov pripravlja na naslednjo fazo (mitozo)
- M: mitoza oz. celična delitev, tj. delitev kromosomov, jedra ter citoplazme (citokineza). Fazo mitoze ponovno razdelimo na 4 faze: profaza, metafaza, anafaza in telofaza, v slednji se končno razpolovi citoplazma in nastaneta dve hčerinski celici. [18, 19]

Poleg faz G1, S, G2 in M, obstaja še dodatna faza G0, kamor vstopijo celice, ki izstopijo iz celične delitve (bodisi zaradi odsotnosti mitotičnih signalov ali protimitotične signalizacije). To je tako imenovana faza mirovanja oz. počivanja. Nekatere celice, ki so v fazi G0, se na zunanje signale odzovejo, se reaktivirajo, vstopijo v S fazo ter tako ponovno izvršijo celilčno delitev. Rakaste celice ponavadi ne vstopajo v fazo G0, tako rastejo nekontrolirano in brez diferenciacije. [18, 19]

Potek celičnega cikla je odvisen od aktivnosti različnih proteinov, kot so ciklini, CDK- od ciklina odvisne kinaze, CDK zaviralci ter nekateri transkripcijski faktorji. [20] Ključnega pomena so CDK, ki pa za svojo aktivacijo potrebujejo vezavo ciklinov. Od ciklina odvisne kinaze spadajo v družino serin/treonin protein kinaz, heterodimernih kompleksov. [18, 21] V celičnem ciklu so aktivne najmanj štiri: v fazi G1 CDK4, CDK6 in CDK2, v fazi S CDK2, v fazah G2 in S pa CDK1. CDK so prisotne ves čas, aktivirajo pa se le ob vezavi določenega ciklina, slednji se tekom celičnega cikla, po aktivaciji določene CDK, razgradijo in po potrebi ponovno nastanejo. Ko se CDK aktivira, povzroči fosforilacijo izbranih proteinov in tako vodi celico iz ene faze v drugo. [19, 20, 21]. Različni pari ciklin-CDK so aktivni v vsaki fazi celičnega cikla.

Po stimulaciji ravnih faktorjev se sintetizirajo trije tipi ciklina D (D1, D2 in D3), ki se vežejo na CDK4 in CDK6, kar popelje celico v fazo G₁-tako se celica pripravi na podvojevanje dednega materiala. Z aktivacijo kompleksov ciklin D-CDK4 in ciklin D-CDK6, se inaktivira protein pRb, kar povzroči sintezo in ekspresijo ciklina E. Ta se veže na CDK2, njun kompleks pa regulira vstop celice iz faze G₁ v fazo S. V fazi S se ciklin E razgradi, CDK2 pa se veže s ciklinom A, s čimer se celični cikel nadaljuje s fazo G₂. V tej fazi nastane kompleks ciklina A s CDK1, ki celici omogoči vstop v fazo mitoze. V zadnji fazi, torej v fazi M, se ciklin A razgradi, M fazo pa regulira kompleks ciklin B-CDK1. [19, 22]



Slika 4: Prikaz poteka celičnega cikla (povzeto po [19]).

Prav tako pomembna skupina proteinov, udeleženih v celičnem ciklu, je skupina CDK zaviralcev (CKI). Ti vplivajo na aktivnost kompleksov CDK-ciklin, predvsem v fazi G₁ in se večinoma aktivirajo preko antiproliferativnih signalov. [19] Razdelimo jih na dve družini. Prva so zaviralci kinaze 4 (INK4), ki vključujejo p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} in p19^{INK4d} ter se vežejo samo na CDK4 ali CDK6, s tem pa preprečijo njuno vezavo s ciklinom D. [19, 23] Druga družina so tako imenovani CIP/KIP (proteini, ki interagirajo s

CDK/ proteini, zaviralci kinaze), ki so aktivni tekom celotnega celičnega cikla. Obsegajo proteine p21^{cip/waf1}, p27^{kip1} in p57^{kip2}, ti se vežejo na kompleks ciklin E-CDK2 in ciklin B-CDK1 ter ju inaktivirajo. Ekspresija in aktivacija proteina p21 je odvisna od tumorje zaviralnega proteina p53, proteina p27 in p57 pa od rastnega faktorja TGFβ. [19]

Že zgoraj omenjeni tumorje zaviralni protein, ki ima zelo pomembno vlogo v regulaciji sinteze DNK, se imenuje protein retinoblastom (pRb). Njegova funkcija je preprečevanje izražanja genov, ki so odgovorni za rast in proliferacijo celic. Normalno je pRb hipofosforiliran in vezan na transkripcijski faktor E2F. [20] E2F je heterodimerni transkripcijski faktor, ki aktivira gene, potrebne za vstop celice v S fazo celičnega cikla. Torej, kadar je E2F neaktiven oz. je nanj vezan pRb, slednji, ter tako celoten kompleks, deluje kot zaviralec rasti celice, tako celica ostane v fazi G1 in se ne deli. [23, 24] Ko je celica pripravljena na fazo S, kompleks ciklin D-CDK4/6 fosforilira pRb ter inaktivira njegovo zaviralno delovanje. Protein pRb se sprostí iz kompleksa z E2F, tako E2F pospeši transkripcijo genov, ki so potrebni za nadaljevanje celičnega cikla. Med njimi je tudi transkripcija gena za ciklin E, ko le-ta nastane, se veže s CDK2. Poleg tega, da kompleks CDK4/6-ciklin D fosforilira proteine, kot je pRb, v celičnem ciklu sodeluje tudi tako, da odstrani p21 in p27 s kompleksa CDK2-ciklin E ter tako omogoči njegovo aktivnost in vstop celice v fazo S. [19]

Celični cikel je reguliran s tako imenovanimi kontrolnimi točkami, ki so ključnega pomena v fazi podvojevanja genoma in ločevanja kromosomov. V njih sodelujejo vsi zgoraj naštetí in opisani proteini ter transkripcijski faktorji. Poznane so kontrolne točke na prehodu iz faze G1 v fazo S, iz faze G2 v fazo M in po koncu mitoze. V vsaki posamezni kontrolni točki se preveri, ali je celica pripravljena na naslednjo fazo celičnega cikla. [19] Ob napaki na DNK oz. nepravilni podvojitvi verige se sproži hiter proces aktivacije tumorje zaviralnega gena p53, ki pospeši prepisovanje genov, kot je na primer gen za protein p21. Tako se poveča ekspresija p21, slednji pa se veže na kompleks CDK2-ciklin E ali CDK1-ciklin B ter ju tako inaktivira. Tako celica ne more vstopiti bodisi v S fazo celičnega cikla, bodisi v fazo mitoze. [23] Celični cikel se ustavi za toliko časa, dokler napaka na DNK ni popravljena. Če celica ni sposobna odpraviti napake in obnoviti verige, nastopi programirana celična smrt ali apoptoza. [20, 25]

1.6.1 Celični cikel in RAK

Dve skupini genov sta zelo pomembni, če ob razvoju celice pride do njihovih sprememb oz. mutacij. To so protoonkogeni in tumorje zaviralni geni. Če pride do genetskih sprememb na protoonkogenih, lahko ob nastanku takoimenovanih onkogenov, pride do pospešene proliferacije celic. Mutacija tumorje zaviralnega gena (kot sta na primer pRb in p53) pa povzroči nepravilno delovanje produkta tega gena, torej izgubo funkcije proteina, ki v normalnem stanju deluje zaviralno na celični cikel. Tako celica raste in proliferira brez kontrole. [19, 25]

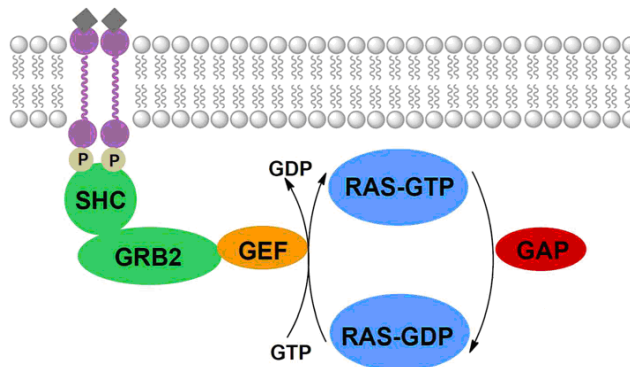
1.7 KRAS

Družina RAS proteinov igra pomembno vlogo v koraku celične signalizacije pri procesu celične rasti, proliferacije in preživetja. Pri približno 30% vseh človeških malignih sprememb so dokazali mutacije RAS družine. [26]

RAS proteini so nizkomolekularne GTPaze, locirane na notranji membrani celice, ki delujejo kot molekulska stikala. Zunajcelične signale preko membranskih receptorjev pretvarjajo v znotrajcelične signale, kjer se iz neaktivne konformacije z vezanim GDP pretvarjajo v aktivno konformacijo z vezanim GTP in tako sprožijo nadaljnje kaskade reakcij znotraj celice. [27, 28] Poznamo tri glavne podskupine te družine: H-RAS, N-RAS in K-RAS. [26, 28]

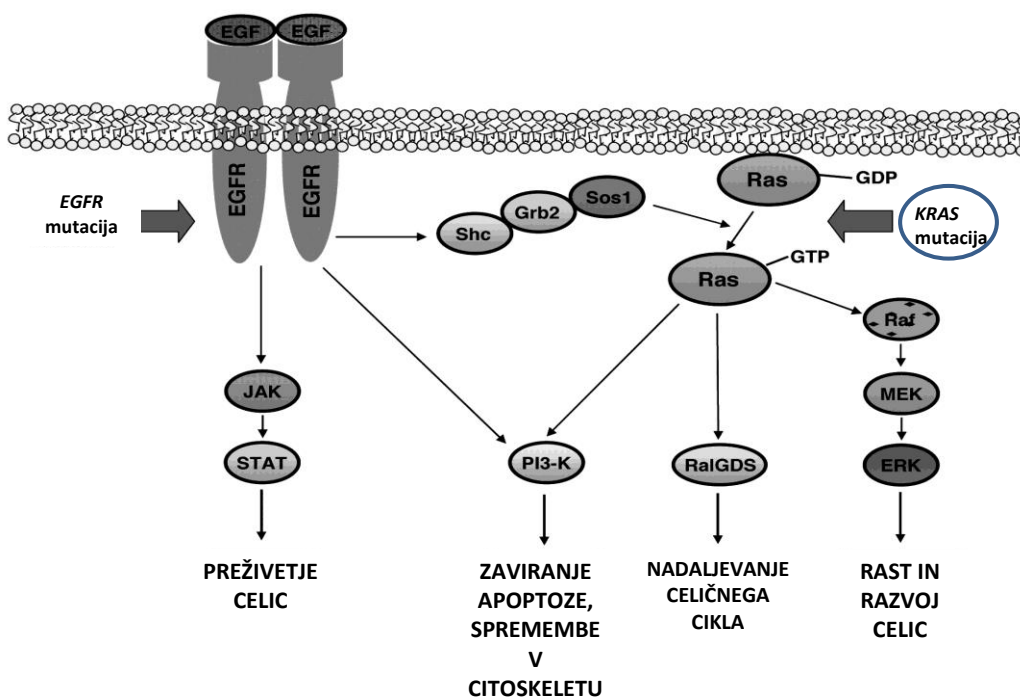
Tako kot pri ostalih RAS podskupinah, tudi aktivacija in deaktivacija KRAS obsega kompleksno zasnovano pot (Slika 5). Ob vezavi rastnega faktorja na tirozinski kinazni receptor EGFR, pride do oligomerizacije le-tega. To povzroči kinazno aktivnost in tako transfosforilacijo homodimera receptorja. [26] Nadaljnja vezava adaptorskega proteina SHC (SH2) omogoči, da adaptorski protein GRB2 prepozna SH2 domeno EGF receptorja in se veže nanjo. [27] GRB2 se nato s svojo SH3 domeno veže na GEF, gvanin nukleotid izmenjevalni faktor. Ta reagira z RAS ter tako povzroči njegovo konformacijsko spremembo in zamenjavo vezanega GDP na RAS za GTP. To pomeni aktivacijo RAS proteina in sproženje kaskade nadaljnjih reakcij. Deaktivacija K-Ras poteka obratno, s hidrolizo GTP v GDP. Kljub temu, da RAS proteini posedujejo GTPazno aktivnost, je pretvorba razmeroma počasna, zato je pospešena s strani GTPaza-aktivacijskega proteina

GAP. Ta z odcepom terminalnega fosfata z GTP slednjega pretvori v GDP in tako zaustavi aktivnost KRAS ter tako tudi RAS stimulirano celično signalizacijo. [28]



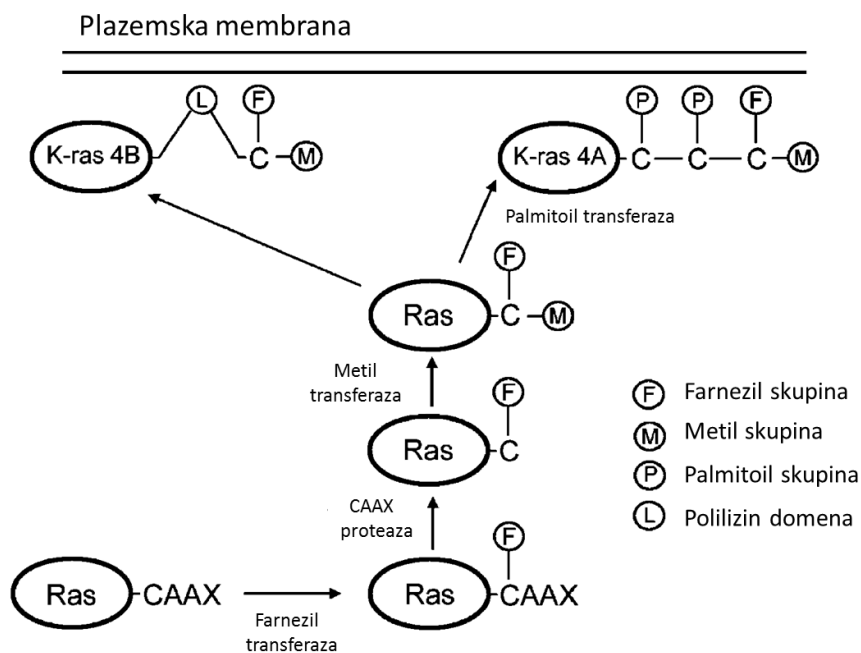
Slika 5: RAS signalizacija (povzeto po [26]).

Aktivacija KRAS torej prevede signale do efektorskih proteinov, ki so Raf kinaze, PI3 kinaze, Ral gvanin nukleotid cepitveni stimulator RalGDS in fosfolipaze C ϵ . Raf kinaza fosforilira kinazo MAP- kinaza, ki se aktivira ob mitotskih signalih, ta pa dalje ERK, ki se aktivira preko zunajceličnih signalov. Slednji aktivira transkripcijske faktorje, med drugim tudi ELK1, ki regulira izražanje genov, odgovornih za kontrolo poteka celičnega cikla. [29] PI3 kinazna pot vodi preko aktivacije AKT, protein kinaze B, ki poveča prepisovanje genov, ki sodelujejo pri preživetju celic, ter aktivira mnoge transkripcijske faktorje. RalGDS lahko deluje zaviralno preko RAL1, ki preko svoje poti inhibira FOX transkripcijske faktorje, ali pa stimulatивно preko JNK, kjer poveča prepisovanje genov, odgovornih za preživetje celic in potek celičnega cikla. [26] Če pride do aktivacije fosfolipaze ϵ (PLC ϵ), se aktivira protein kinaza C ter tudi prehajanje kalcija iz znotrajceličnih zalog. [30] Vse te kaskade reakcij privedejo do celične proliferacije, stopnjevanja celičnega cikla, povečane transkripcije oz. genskega prepisovanja in tako celične rasti in preživetja celic (Slika 6). [26]



Slika 6: Signalne poti proteinov, kodiranih z EGFR in KRAS geni (povzeto po [31]).

RAS proteini v dolžino povezujejo 188 ali 189 aminokislin, vendar morajo biti za svoje delovanje locirani na membrani, poleg receptorjev. Ker so po svoji strukturi to majhne in zelo hidrofilne molekule, se morajo po nastanku strukturno modificirati. To je štiri-stopenjski proces, kjer protein pridobi lipofilne karakteristike, tako da se lahko lokalizira na membrani. [27] Modifikacija strukture poteka na CAAX okvirju, delu proteina RAS, kjer C predstavlja cistein, A izoleucin in X serin ali metionin. Tiolna skupina cisteina se najprej farnezilira s pomočjo farnezil transferaze. Farnezil je veriga petnajstih ogljikovih atomov. V naslednjem koraku poteče hidroliza CAAX dela, kjer se odcepi AAX del, nato pa na karboksilni skupini cisteina poteče karboksimetilacija s pomočjo specifične transferaze. Zadnja stopnja je palmitoilacija ostankov tiolnih skupin cisteina. Palmitoil transferaza opravi ta proces na vseh skupinah RAS proteinov, prav tako na KRAS tip 4A, ne pa na KRAS tip 4B. S takšno strukturo protein obsega dovolj hidrofobnih komponent, da z membrano tvori stabilne nepolarne vezi. [26, 27]



Slika 7: Strukturna modifikacija RAS proteina (povzeto po [27]).

Točkovne mutacije KRAS protoonkogenega, najpogosteje na kodonih 12, 13 in 61, s substitucijo aminokislin povzročijo zmanjšano GTPazno aktivnost KRAS. [32, 33] Prav tako lahko zmanjšajo aktivnost GAP, tj. odpravijo GTP hidrolizo, bodisi s steričnimi ovirami in tako neuspešno signalizacijo, bodisi z oviranjem dostopa molekulam vode, ki so potrebne za izvedbo hidrolize. Tako KRAS ostane v aktivnem stanju, kar pomeni nadaljnjo celično signalizacijo in aktivacijo efektorskih poti, ki vodijo v proliferacijo, rast in preživetje celic ter tako nastanek rakastega tkiva. [34]

KRAS mutacije prav tako povezujejo z nefunkcionalnostjo apoptoze, ki bi jo želeli sprožiti s kemoterapijo. Tako se na primer pacienti oboleli za rakom debelega črevesja, z mutacijami na KRAS genu, lahko ne odzivajo na dodano terapijo. [35]

Dokazano je, da je KRAS najbolj pogosta mutirana Ras izoforma. Pri raku trebušne slinavke je pogostost mutacije K-Ras kar 90%, pri raku debelega črevesja do 45%, pri pljučnem raku pa do 35%. Ravno zato je KRAS postal zelo pomembna tarča pri odkrivanju možnih alternativ zdravljenja raka. [30]

V iskanju spojine, ki bi učinkovito omejila KRAS signalizacijo, je preko različnih idej o različnih tarčah nastalo kar nekaj zdravil. Tarče lahko opredelimo kot:

- EGF receptor: poznamo na primer biološko zdravilo oz. monoklonsko protitelo cetuksimab, ki blokira EGF receptor ter tako prepreči signalizacijo v notranjost

celice. Ob mutaciji KRAS to zdravilo ni učinkovito, saj zaradi mutacije na genu KRAS signalizacija za nenadzorovano rast celice vseeno poteka. [36]

- KRAS/GEF povezava.
- Proces strukturne modulacije po genskem prevajanju in sintezi KRAS proteina, kjer so tarče lahko farnezil transferaza, CAAX endopeptidaza, metiltransferaza ali palmitoil transferaza.
- Efektorski proteini KRAS poti. [37]
- Ekspresija KRAS proteina s pomočjo »antisense« oligonukleotidov.
- Mutiran KRAS protein preko imunoloških pristopov ali sinteze proteinov. [38]

Pomembna spojine pa so lonafarnib in tipifarnib, ki sta zaviralca farnezil transferaze, deltarasin, ki prav tako omejuje proces sidranja KRAS proteina na membrano, vendar deluje na protein PDE δ , ki je soudeležen pri tem procesu, salirasib, ki s KRAS tekmuje za vezavo na protein galectin, lociran na membrani, ter vemurafenib, zaviralec proteina RAF. [37]

1.8 METODE ZDRAVLJENJA RAKA

Zdravljenje raka obsega čas od postavitve diagnoze do končne točke, kjer naj bi bil rak tudi dokončno odstranjen. Ker se razrast tumorskih celic lahko ponovi, je potrebno skrbno spremljanje zdravstvenega stanja pacienta. Po biopsiji tumorskih celic in patološkem izvidu lahko onkolog opredeli malignost in tip raka. Zdravljenje določenega tipa raka določi onkolog in je tako seveda odvisno od same vrste raka, velikosti tumorja, mesta nastanka ter razširjenosti oz. stadija. Histološka klasifikacija in prisotnost določenih bioloških markerjev je lahko koristna tudi za diagnozo in individualizirano zdravljenje.

Trenutno razpoložljive možnosti za zdravljenje raka, so naslednje:

- Kirurgija
- Radioterapija
- Kemoterapija
- Imunoterapija
- Gensko zdravljenje
- Hormonsko zdravljenje [38]

Ponavadi pridejo v poštev različne kombinacije zdravljenja. [39]

Kirurški pristop ima prednosti in slabosti. Je hiter in učinkovit, vendar omejen v primeru metastaz in vprašljiv v primeru nepopolne odstranitve tumorja. Gre za fizično odstranitev primarnega tumorja ter nekaj okoliškega zdravega tkiva za preprečitev lokalne ponovitve rasti tumorskih celic. [39, 40]

Pri radioterapiji gre za obsevanje rakastega tkiva z ionizirajočim sevanjem (x-ray in gamma-ray žarki) s ciljem poškodovati ali uničiti tumorske celice. Nevarnost oz. slabost radioterapije je poškodba zdravega tkiva in tako tudi uničenje zdravih celic. Je zelo uporabljena metoda, bodisi samostojno, bodisi v kombinaciji z drugimi tehnikami zdravljenja. [39, 40]

Cilj imunoterapije je spodbuditi pacientov imunski sistem k zavrnitvi tumorskih celic. Gre za pripravo monoklonskih protiteles in nato njihovo ciljanje na antigene, prisotne na površini celic. Znani in učinkoviti monoklonski telesci sta na primer trastuzumab in cetuksimab, prvi učinkovit pri HER2 pozitivnem raku prsi, slednji pa usmerjen proti EGF receptorju. [41] Pomanjkljivost te terapije je, da se lahko uporablja le na rakastih masah, torej trdnih oblikah raka, ter da ni samozadostna in se mora vedno uporabiti v kombinaciji z drugo vrsto zdravljenja. [42]

Gensko zdravljenje temelji na vnosu nepoškodovanega genskega materiala direktno, s pomočjo virusov, liposomov ipd. Vnesen material lahko nadomesti mutiran gen, direktno popravi napako ali pa služi za direktno sintezo proteinov, potrebnih za zdravljenje. Stremi k ciljanem in specifičnemu zdravljenju, vendar se večinoma uporablja v kombinaciji z radioterapijo in kemoterapijo. [43]

Kemoterapija je ponavadi daljša in zahtevna terapija, saj se izvaja v ciklih z različnimi odmerki oz. intervalno. Večkrat se uporablja skupaj z radioterapijo ali kirurško odstranitvijo. Cilj kemoterapije je doseči remisijo (ti. zazdravitev), stanje ko bolezen miruje, ali pa manj pogosto ozdravitev, ki je tako rekoč preprečitev ponovitve bolezni. [39] Glavna tarča terapije je DNK (poskuša se zavreti podvojevanje in prepisovanje DNK), ostale tarče pa so še receptorji, geni, encimi, tubularni sistemi ipd. Problem kemoterapije je neselektivnost, saj prizadene tudi zdrave celice, ki se hitro delijo, kot so na primer epitelne celice gastrointestinalnega trakta, celice lasnega folikla ter krvotvorne celice. [44] Protitumorne učinkovine lahko razdelimo na različne skupine:

- Zaviralci sinteze DNK: alkilirajoče učinkovine (klorambucil)

citotoksični antibiotiki- interkalatorji (daunorubicin, doksorubicin)

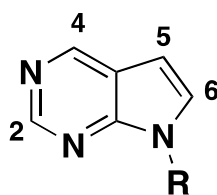
antifolati (metotreksat)

antimetaboliti (analogi pirimidina- 5-flurouracil, analogi purina- 6-merkaptopurin)

- Zaviralci topoizomeraze (irinotekan)
- Zaviralci mitoze oz. zaviralci sinteze mikrotubulov (vinka alkaloidi, paklitaksel)
- Kortikosteroidi [39, 42]

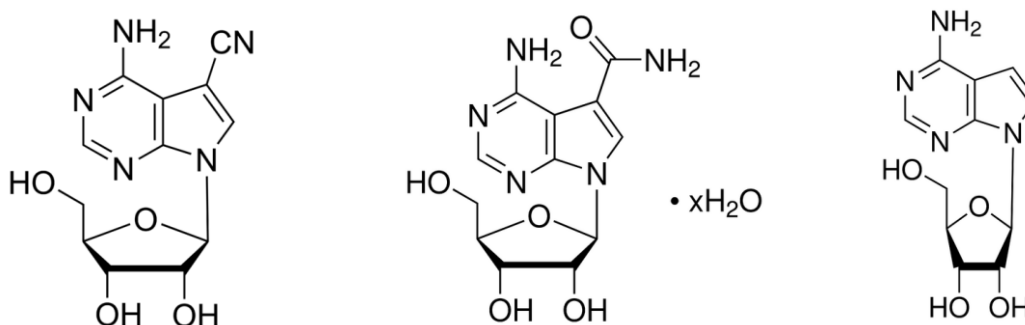
1.9 DRUŽINA PIROLOPIRIMIDINOV

Pirolopirimidini, poznani tudi kot 7-deazopurini, so heterociklični sistemi s pirolom in pirimidinskim obročem, ki sta med seboj povezana na α, β -poziciji.



Slika 8: Deazopurini.

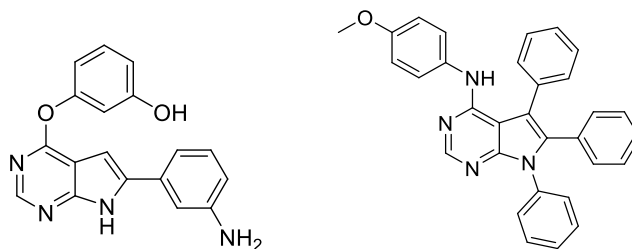
Ta družina spojin je družina pomembnih heterociklov, ki se nahajajo tudi v naravi kot nukleozidni antibiotiki, to so na primer tojokamicin, sangivamicin ali tubercidin. [45]



Slika 9: Tojokamicin, sangivamicin hidrat in tubercidin.

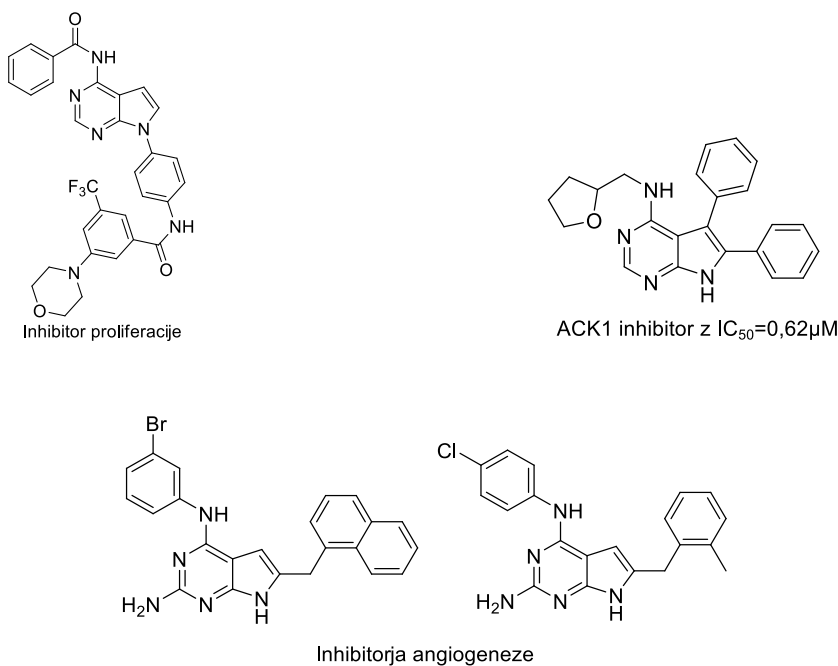
Tako na področju kemije obstaja veliko zanimanje za sintezo pirolopirimidinov. Na podlagi njihove biološke aktivnosti so sintetizirali nekaj spojin z različnimi

karakteristikami, kot so zaviralec GSK-3 β (TWS119) [46], antifungiki [47] ter druge spojine s protivnetnim in analgetičnim delovanjem. [45]



Slika 10: Primera pirolopirimidinov (TWS 119 ter spojina s protiglivičnim delovanjem na *Candida albicans*).

Poznani so tudi pirolopirimidini z dokazanim delovanjem proti tumorskim celicam. [45, 48, 49, 50]

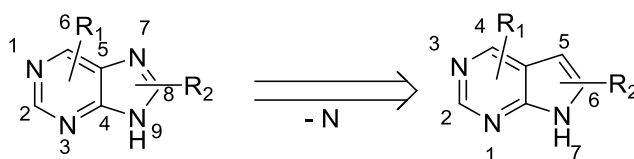


Slika 11: Primeri pirolopirimidinov.

Sintezne metode za pripravo pirolopirimidinov so še v odkrivanju. Lahko izhajamo iz pirola ali pa pirimidina. Če izhajamo iz pirolskega obroča, moramo najprej nanj pripeti želene substituentne in kasneje spojino ciklizirati, kot je to storila skupina Rashada. Pot, ki izhaja iz pirimidina, zahteva ravno obraten postopek (najprej ciklizacija in kasneje substitucija), vendar do sedaj še ni bila realizirana. [45]

2 NAČRT DELA

Izhajamo iz purinov, ki so zaviralci sinteze purinskih baz ter zaviralci CDK ter KRAS. S farmakomodulacijo purina odstranimo dušik na 7. mestu, tako da pridobimo pirolo[2,3-*d*]pirimidine oz. deazopurine, ki so do sedaj še dokaj nepoznani in so potencialne antitumorne učinkovine z zaviralnim delovanjem bodisi na CDK, bodisi na KRAS.



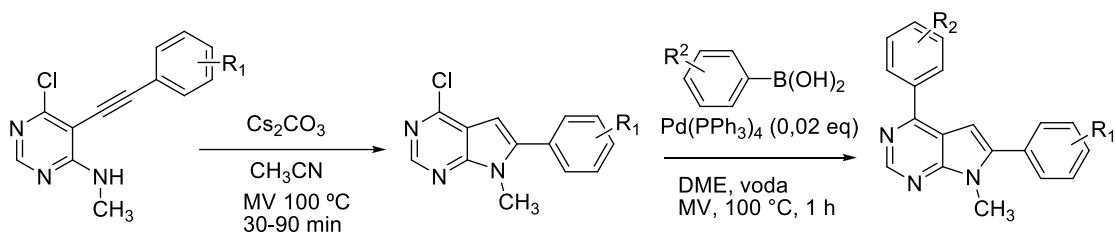
Slika 12: Načrtovanje piropirimidinov iz purinov.

Cilj našega eksperimentalnega dela je najhitreje ciklizirati izhodno spojino, tj. različne 5-alkinilpirimidine, ter tako pridobiti kar nekaj le-teh za nadaljnje pripenjanje določenih substituentov in ciklizacijo. Na podlagi tega, bomo za sintezno pot izbrali pirimidin kot začetno spojino, natančneje komercialni produkt 2,4-dikloropirimidin.

Najprej bomo opravili tristopenjsko sintezo, katera vključuje tudi reakcije, pri katerih uporabimo mikrovalove. S to sintezo bomo pridobili določeno količino izhodne spojine, ki jo bomo v naslednjem koraku substituirali in ciklizirali.

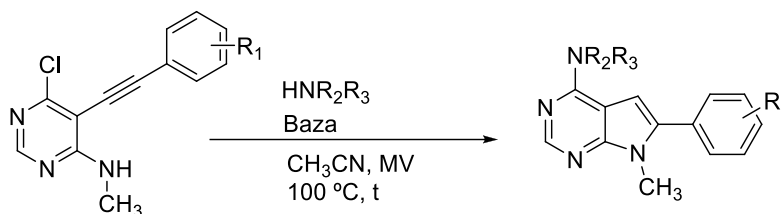
V našem projektu želimo pripraviti piropirimidine po do sedaj še nepoznani sintezni poti. Tako bomo najprej na 4,6-dikloropirimidinu izvedli nukleofilno substitucijo z metilaminom na mestu C-4, nato pa bomo na mesto C-5 z iodizacijo pripeli jod. Iz pridobljene spojine bomo sintetizirali različne 5-alkinilpirimidine s Sonogashira reakcijo alkinilacije z uporabo komercialnih alkinilbenzenov. Slednje bomo na koncu ciklizirali do piropirimidinov in nanje pripeli različne substituenta (na 4. mesto piropirimidinskega heterocikla).

Znana je že sinteza piropirimidinov iz 5-alkinipirimidina v dveh korakih. Sprva ciklizacija z uporabo mikrovalovnega reaktorja ter v drugi stopnji arilacija Suzuki-Miyaura na C-4 mestu z aril bromovo kislino v prisotnosti katalizatorja in ligandov (Slika 13). [51]



Slika 13: Shema priprave pirolpirimidinov v dveh korakih.

Naš cilj je tudi optimizacija stopenj sinteze ter s pomočjo »one pot« sinteze tako skrajšati celotno sintezno pot za en korak.



Slika 14: Priprava pirolpirimidinov v enem samem koraku.

V okviru te magistrske naloge bomo tako poskušali pridobiti več različno substituiranih pirolpirimidinov. Smo v prvih stopnjah poznavanja KRAS modela, tako lahko te spojine kažejo aktivnost proti KRAS.

3 MATERIALI IN METODE

Eksperimentalni del naloge smo izvedli na Fakulteti za farmacijo na Univerzi v Barceloni (Katedra za farmakologijo in terapevtsko kemijo, Oddelek za farmacevtsko kemijo). Pri izvedbi eksperimentalnega dela smo uporabili reagente znamke Sigma Aldrich in topila proizvajalcev Carlo Erba in Merck. Topili tetrahidrofuran in trietilamin, potrebni za izvedbo reakcij, smo hranili pod argonom nad molekularnimi siti. Vsi produkti imajo komercialno kakovost za sintezo. Uporabljena topila so analitske čistoče oz. kakovosti ali pa so bila očiščena pred uporabo.

Za izvedbo reakcij smo uporabili mikrovalovno napravo CEM discover, katere delovanje se nadzoruje s Synergy programsko opremo, notranjo temperaturo pa zaganava IR senzor. Moč reaktorja smo nastavili na 200 W, pritisk v reaktorju pa omejili navzgor na največ 180-200 PSI, kar ustreza pribl. 12-13 bar. Sistem se ohlaja s tokom dušika. Vse reakcije smo izvedli pri temperaturi 100°C.

Potek reakcij smo spremljali s tankoplastno kromatografijo, pri kateri smo uporabili silika gel 60 F₂₅₄ nanešen na aluminijeve plošče proizvajalca Merck. Lise na kromatogramih smo opazovali pod UV lučjo valovne dolžine $\lambda = 254$ nm ter 365 nm.

Spojine smo ločili in očistili s kolonsko kromatografijo. Ob pripravi normalne oz. manual kolone smo uporabili steklene kolone različnih velikosti in silika gel Merck 60 (40-60 μ m). Pri kromatografiji z avtomatsko kolono smo uporabili sistem CombiFlash Rf, ki je opremljen z UV-vis detektorjem (PN 68-5230-008) ter kolumne s silika gelom RediSep Rf od 4 do 12 gramov.

Spektri jedrske magnetne resonance (NMR) ¹H in ¹³C so bili izvedeni na Bruker 250 MHz (¹³C, 63 MHz), Varian Gemini-300 (75.5 MHz), Varian Gemini-400 (100 MHz) in Bruker 400 MHz (100 MHz). Uporabljena so bila topila: devteriran kloroform (CDCl₃), devteriran dimetilsulfoksid (DMSO) in devteriran aceton, odvisno od topnosti produkta v posameznem topilu. Kemijski premiki so bili izraženi v ppm, kot interni standard pa smo pri vseh spektrih uporabili tetrametilsilan (TMS). Za risanje spojin smo uporabili program Chem Draw, za reševanje spektrov pa program MestReNova LITE.

Infrardečo spektroskopijo smo izvedli na spektrofotometru FT-IR Perkin Elmer model *Spectrum RX I*.

Temperature tališča smo izmerili z aparatom Gallenkamp modela MFB.595.010M, opremljenim z zunanjim termometrom.

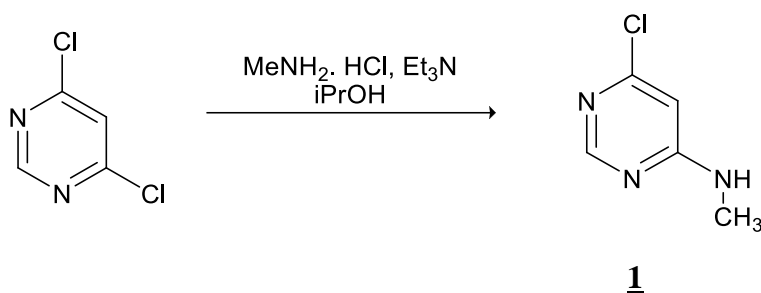
Mikrodestilacijo smo opravili z aparatom znamke Büchi GKR-50, z vrtečimi se krogli.

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Hewlett-Packard HP-5988A, izvedeni z ESI elektrosprejem. Spektri visoke ločljive masne spektrometrije so bili posneti na Maxis Bruker 4G (Raziskovalno združenje Univerze v Orleansu, Francija) ter na LC/MSD-TOF (2006, Agilent technologies) na Fakulteti za kemijo, Univerza v Barceloni.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 SINTEZA 6-KLORO-N-METILPIRIMIDIN-4-AMINA

Reakcija:



Sintezni postopek:

V suho bučko smo natehtali 200 mg 4,6-dikloropirimidina (1,34 mmol) in 108,8 mg metilamin hidroklorida (1,61 mmol) ter ju raztopili v 1,3 mL izopropanola. Nato smo s pipeto dodali 0,22 mL trietilamina (1,61 mmol). V tako pripravljeno bučko smo dodali magnetno mešalo ter jo opremili s povratnim hladilnikom. Reakcijo smo pustili mešati pri temperaturi refluxa izopropanola (82° C). Potek reakcije smo spremljali s pomočjo tankoplastne kromatografije. Po 12-ih urah smo reakcijo ustavili, ohladili ter topilo odparili pod znižanim tlakom. Preostanku smo dodali 15 mL vode ter opravili ekstrakcijo z etil acetatom (3 x 15 mL). Organske faze smo združili, jih sprali z NH₄Cl (10 mL) in sušili s sušilnim sredstvom Na₂SO₄. Slednjega smo odfiltrirali ter topilo pod znižanim tlakom odparili. Produkt **1** smo očistili z avtomatsko kolonsko kromatografijo z mobilno fazo mešanice heksana in etil acetata.

6-kloro-N-metilpirimidin-4-amin (1)

Rezultati

Izgled: bela trdna snov

Mr: 143,57

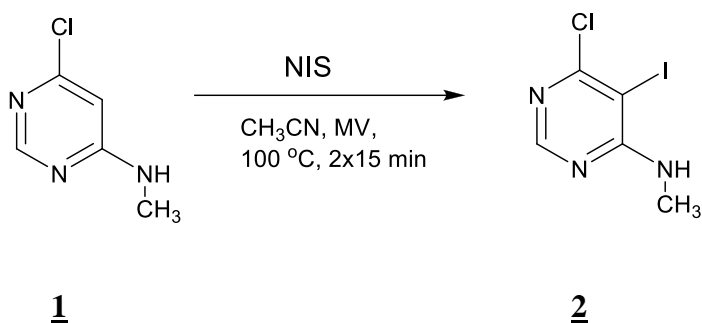
Izkoristek reakcije: 78%

Retencijski faktor (TLC): 0,22 (diklorometan : etil acetat = 6 : 4)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2.92 (d, *J* = 4.3 Hz, 3H), 5.87 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 8.31 (s, 1H).

4.2 SINTEZA 5-JODO-6-KLORO-N-METILPIRIMIDIN-4-AMINA

Reakcija:



Sintezni postopek:

V posebno epruveto za reakcije v mikrovalovni pečici smo natehtali 200 mg produkta **1** (1,39 mmol) ter 940,2 mg N-jodosukcinimida (4,17 mmol). Dodali smo 4 mL acetonitrila ter epruveto opremili z magnetnim mešalom. Tako pripravljeno epruveto smo tesno zaprli ter reakcijo pustili mešati 15 min na 100 °C v mikrovalovnem reaktorju. Po petnajstih minutah smo potek reakcije preverili s pomočjo tankoplastne kromatografije (CH₂Cl₂ : etil acetat = 6 : 4), v epruveto dodali dodatne 3 ekvivalente NIS (940,2 mg, 4,17 mmol) ter reakcijo ponovno pustili mešati pod mikrovalovi 15 minut pri 100 °C. Po koncu reakcije smo reakcijski zmesi dodali 25 mL etil acetata ter le-to organsko fazo spirali z nasičeno raztopino Na₂S₂O₃ (2 x 25 mL) ter z 10% raztopino NaOH (2 x 25 mL). Opravili smo ekstrakcijo vodne faze z etil acetatom (25 mL) ter organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, ga odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt **2** smo po potrebi prekrystalizirali iz etanola (20 mL).

5-jodo-6-kloro-N-metilpirimidin-4-amin (**2**)

Rezultati

Izgled: blede rumeni kristali

Mr: 269,47

Izkoristek reakcije: 99 %

Retencijski faktor (TLC): 0,50 (diklorometan : etil acetat = 6 : 4)

Temperatura tališča: 146-148 °C

MS (ESI): m/z = 270 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 270) za C₅H₆ClIN₃: izračunan 269.9289; izmerjen 269.9291.

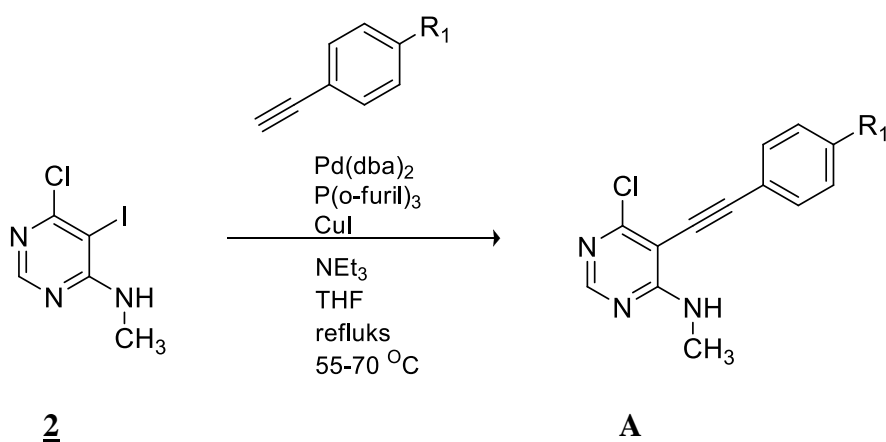
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.06 (d, J = 4.9 Hz, 3H), 5.64 (s, 1H), 8.24 (s, 1H).

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 29.45, 79.6, 157.3, 162.2, 163.0.

IR (ATR diamant) ν : 3292, 2936, 1557, 1499, 1389, 1326, 1263, 1237, 1179, 1122, 1080, 1001, 888, 762 cm^{-1} .

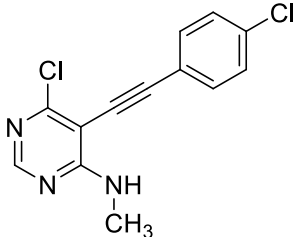
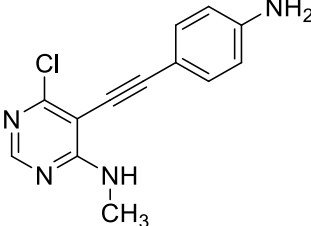
4.3 SINTEZA 5-ALKINILPIRIMIDINOV

Reakcija [51]:



Preglednica I: Podaja strukturo posamezne spojine z oznako A.

Oznaka produkta A	R_1	Formula produkta A
<u>3</u>	H	
<u>4</u>	F	

<u>5</u>	Cl	
<u>6</u>	NH ₂	

Splošen sintezni postopek I (Sonogashira coupling):

Tetrahydrofuran in trietilamin, shranjena nad molekularnimi siti ter neprodušno zaprta, smo najprej prepihali z argonom. Bučko, pripravljeno za reakcijo ter opremljeno z magnetnim mešalom, smo pod argonom trikrat prežarčili. Ko se je bučka ohladila, smo pod tokom argona vanjo spravili stehtan produkt 2 (1.0 mmol), Pd(dba)₂ (0.03 mmol), tri(2-furil)fosfin (0.06 mmol) in CuI (0.04 mmol) ter dodali THF in trietilamin. Na koncu smo dodali še določen alkin. Reakcijo smo pustili mešati 24 ur pri temperaturi 55-70°C. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes ohladili ter jo razredčili z 15 mL nasičene vodne raztopine NH₄Cl ter vodno fazo ekstrahirali z etil acetatom (3 x 20 mL). Združene organske faze smo sušili z Na₂SO₄, filtrirali ter topilo uparili na rotavaporju. Produkt smo po potrebi očistili s kolonsko kromatografijo.

5-(feniletinil)-6-kloro-N-metilpirimidin-4-amin (3)

Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku I, začevši s 5-jodo-6-kloro-N-metilpirimidin-4-aminom, produktom 2 (350 mg, 1.3 mmol). Temu smo dodali 22,4 mg Pd(dba)₂ (39 μmol), 18,1 mg tri(2-furil)fosfina (78 μmol) in 10 mg CuI (52 μmol), ter 2,6 mL THF in 9 mL trietilamina. Na koncu smo z injekcijo dodali še fenilaceten (0,29 mL, 2.6 mmol). Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (heksan : diklorometan : aceton = 8 : 1 : 1).

Rezultati

Izgled: bela trdna snov

Mr: 243,69

Izkoristek reakcije: 93 %

Retencijski faktor (TLC): 0,28 (heksan : CH₂Cl₂ : aceton = 8 : 1 : 1)

Temperatura tališča: 113-115 °C

MS (ESI): m/z = 244 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 244) za C₁₃H₁₁ClN₃: izračunan 244.0636, izmerjen 244.0637.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.12 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 5.76 (s, 1H), 7.34-7.44 (m, 3H), 7.51-7.60 (m, 2H), 8.35 (s, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 28.6, 79.6, 101.0, 102.3, 122.0, 128.7, 129.5, 131.8, 156.2, 159.2, 163.0.

IR (ATR diamant) v: 3397, 1564, 1490.1392, 1274, 1230, 1138, 1088, 906, 848, 749, 684 cm⁻¹.

5-((4-fluorofenil)etnil)-6-kloro-N-metilpirimidin-4-amin (4)

Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku I, pri katerem smo začeli z jodiranim pirimidinom, produktom **2** (300 mg, 1.11 mmol), mu dodali 19,3 mg Pd(dba)₂ (33.3 μmol), 15,6 mg tri(2-furil)fosfina (66.6 μmol) in 8,6 mg CuI (44.4 μmol), ter 2,3 mL THF in 7,8 mL trietilamina. Na koncu smo dodali še 1-etnil-4-fluorobenzenom (0,26 mL, 2.22 mmol). Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (heksan : diklorometan : aceton = 8 : 1 : 1).

Rezultati

Izgled: bela trdna snov

Mr: 261,68

Izkoristek reakcije: 98 %

Retencijski faktor (TLC): 0,15 (heksan : CH₂Cl₂ : aceton = 8 : 1 : 1)

Temperatura tališča: 168-170 °C

MS (ESI): m/z = 262[M+H]⁺

HRMS (m/z = 262) za C₁₃H₉ClFN₃: izračunan 262.0542, izmerjen 262.0545.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.13 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H, NCH₃), 5.70 (s, 1H, NH), 7.09 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-Ar), 7.54 (dd, *J* = 8.8, 5.3 Hz, 2H, H-Ar), 8.36 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 28.5 (CH₃), 79.3 (Cq), 100.7 (Cq), 101.1 (Cq), 116.0 (d, *J* = 22 Hz, 2CH), 118.1 (d, *J* = 3 Hz, Cq), 133.8 (d, *J* = 9 Hz, 2CH), 156.3 (CH), 159.2 (Cq), 162.9 (Cq), 163.2 (d, *J* = 251 Hz, Cq).

IR (ATR diamant) v: 3407, 1567, 1506, 1396, 1279, 1229, 1160, 1136, 1088, 906, 858, 837, 811, 778, 732, 658, 617 cm⁻¹.

5-((4-klorofenil)etnil)-6-kloro-N-metilpirimidin-4-amin (5)

Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku I. Začeli smo z iodiranim pirimidinom, produktom **2** (300 mg, 1.11 mmol), mu dodali 19,3 mg Pd(dba)₂ (33.3 μmol), 15,6 mg tri(2-furil)fosfina (66.6 μmol) in 8,6 mg CuI (44.4 μmol), ter 2,3 mL THF in 7,8 mL trietilamina. Na koncu smo dodali še 1-etnil-4-klorobenzenom (0,29 mL, 2.22 mmol). Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (heksan : diklorometan : aceton = 8 : 1 : 1).

Rezultati

Izgled: rjava trdna snov

Mr: 277,02

Izkoristek reakcije: 90 %

Retencijski faktor (TLC): 0,19 (heksan : CH₂Cl₂ : aceton = 8 : 1 : 1)

Temperatura tališča: 167-169 °C

MS (ESI): m/z = 278[M+H]⁺

HRMS (m/z = 278) za C₁₃H₉Cl₂N₃ [M+H]⁺: izračunan 278.0246, izmerjen 278.0251.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.13 (d, *J* = 5.0, 3H, NCH₃), 5.70 (s, 1H, NH), 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H, H-Ar), 7.48 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-Ar), 8.36 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 28.5 (CH₃), 80.6 (Cq), 100.6 (Cq), 101.0 (Cq), 120.5 (Cq), 129.0 (2CH), 132.9 (2CH), 135.6 (Cq), 156.4 (CH), 159.4 (Cq), 162.9 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 3413, 3050, 2922, 1568, 1489, 1395, 1348, 1279, 1233, 1199, 1137, 1086, 1017, 906, 848, 827, 801, 778, 698, 627 cm⁻¹.

5-((4-aminofenil)etnil)-6-kloro-N-metilpirimidin-4-amin (6)

Reakcijo smo izvedli po splošnem sinteznem postopku I, začenši z iodiranim pirimidinom, produktom **2** (100 mg, 0,37 mmol), mu dodali 6,4 mg Pd(dba)₂ (11,1 μmol), 5,2 mg tri(2-furil)fosfina (22,2 μmol) in 2,8 mg CuI (14,8 μmol), ter 0,74 mL THF in 2,60 mL

trietilamina. Na koncu smo dodali stehtan 4-etinilanilin (86,9 mg, 0,74 mmol). Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (heksan : diklorometan : aceton = 8 : 1 : 1).

Rezultati

Izgled: rjava oljnata tekočina

Mr: 258,71

Izkoristek reakcije: 95 %

Retencijski faktor (TLC): 0,53 (etil acetat : heksan = 8 : 2)

MS (ESI): $m/z = 259 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 259$) za $C_{13}H_{11}ClN_4 [M+H]^+$: izračunan 259.0745, izmerjen 259.0740.

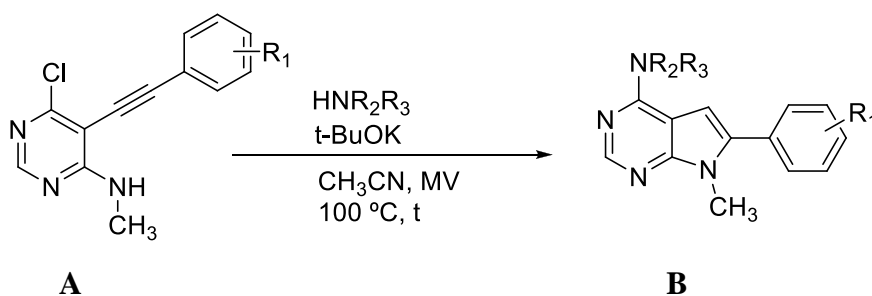
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.09 (d, $J = 5.0$, 3H, NCH_3), 3.96 (s, 2H, NH_2), 5.76 (s, 1H, NH), 6.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-Ar), 7.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-Ar), 8.31 (s, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 28.4 (CH_3), 77.4 (Cq), 101.6 (Cq), 103.5 (Cq), 110.7 (Cq), 114.6 (2CH), 133.1 (2CH), 147.8 (Cq), 155.5 (CH), 158.3 (Cq), 162.8.

IR (ATR diamant) ν : 3483, 3386, 3258, 2098, 1588, 1510, 1437, 1390, 1360, 1278, 1238, 1215, 1176, 1123, 1080, 1002, 957, 888, 856, 828, 762, 668, 645 cm^{-1} .

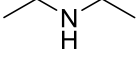
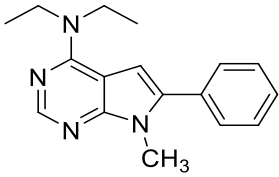
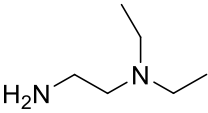
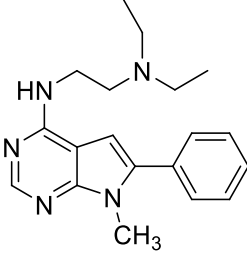
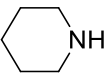
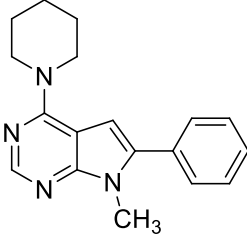
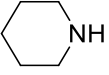
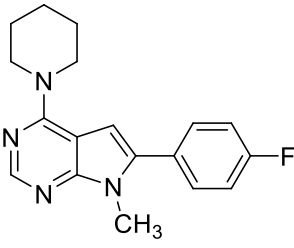
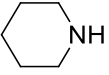
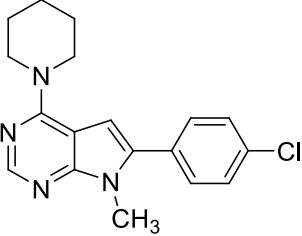
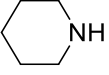
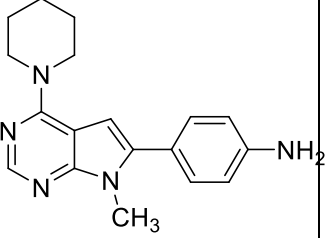
4.4 SINTEZA 4-AMINIRANIH PIROLOPIRIMIDINOV

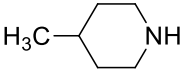
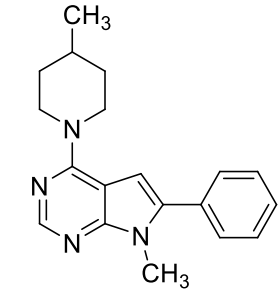
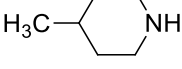
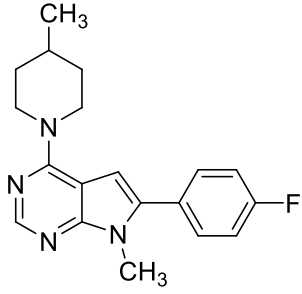
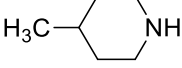
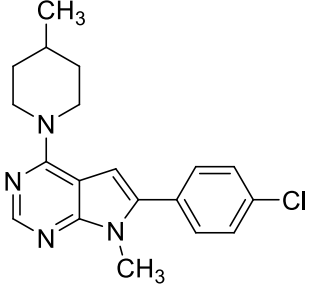

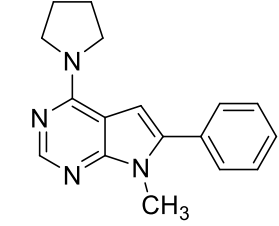
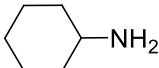
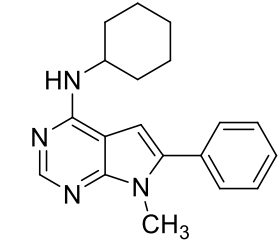
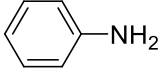
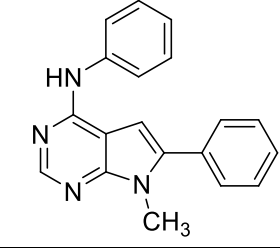
Reakcija:

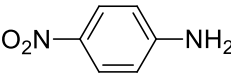
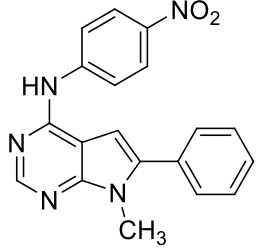
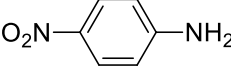
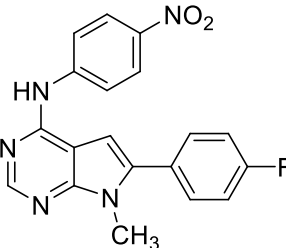
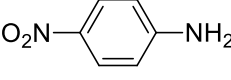
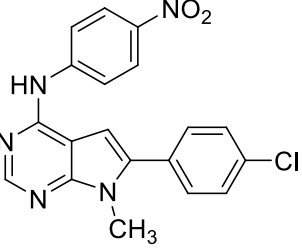
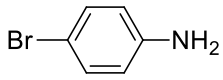
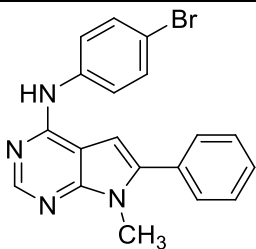
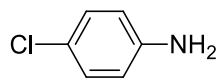
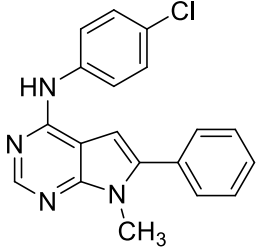
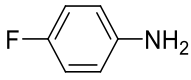
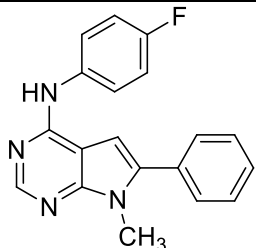


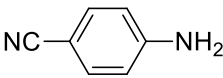
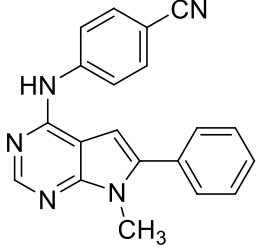
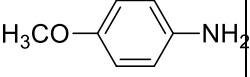
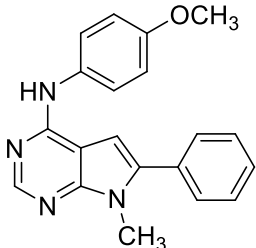
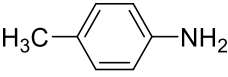
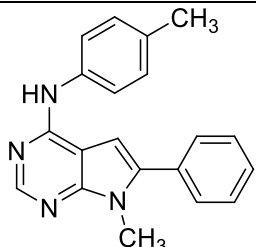
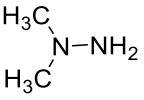
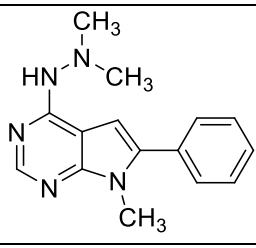
Preglednica II: Podaja strukturo posameznega produkta B.

Oznaka produkta B	R_1	Čas t (min)	HNR_2R_3	Končna struktura produkta B	Izkoristek (%)

<u>7</u>	H	60			33
<u>8</u>	H	60			27
<u>9</u>	H	5			84
<u>10</u>	F	5			76
<u>11</u>	Cl	5			95
<u>12</u>	NH ₂	5			79

<u>13</u>	H	5			99
<u>14</u>	F	5			71
<u>15</u>	Cl	5			99
<u>16</u>	H	30			81
<u>17</u>	H	30			76
<u>18</u>	H	20			35

<u>19</u>	H	5			91
<u>20</u>	F	5			55
<u>21</u>	Cl	5			82
<u>22</u>	H	20			23
<u>23</u>	H	20			31
<u>24</u>	H	20			27

<u>25</u>	H	10			63
<u>26</u>	H	20			-
<u>27</u>	H	20			-
<u>28</u>	H	5			38

Splošni sintezni postopek II:

V epruveto, namenjeno reakcijam v mikrovalovnem reaktorju, smo natehtali alkin (1.0 mmol), amin ali anilin (2.0 mmol) in kalijev terc-butoksid (1.0 mmol) ter pripravljeno raztopili v 3-4 mL acetonitrila. Epruveto smo neprodušno zaprli in reakcijo mešali v mikrovalovnem reaktorju pri 100°C X minut (Preglednica II). Po končani reakciji smo reakcijsko zmes ohladili ter ji dodali mešanico etil acetata ter dietil etra (1 : 1, 30 mL). Nato smo zmes spirali z vodo (3 x 10 mL) ter zbrane vodne faze ekstrahirali s 15 mL etil acetata. Organsko fazo smo na koncu spirali še z raztopino NaCl (brine, > 5 %, 10 mL) ter fazi natančno ločili. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Produkt reakcije smo očistili s kolonsko kromatografijo.

Rezultati spojin 7-28

4.4.1 S primarnim in sekundarnim aminom

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 42 μ L dietilamina (0.41 mmol) ali 58 μ L N,N-dietiletilendiamina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkta smo očistili s pomočjo avtomatske kolone (heksan/etil acetat).

4.4.1.1 Z dietilaminom

N,N-dietil-6-fenil-7-metil-7H-pirol[2,3-d]pirimidin-4-amina (**7**)

Izgled: rjava oljnata tekočina

Mr: 280,17

Izkoristek reakcije: 33 %

Retencijski faktor (TLC): 0,24 (heksan: etil acetat = 6 : 4)

MS (ESI): $m/z = 281 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 281$) za $C_{17}H_{20}N_4 [M+H]^+$: izračunan 281.1761, izmerjen 281.1766.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, $2CH_3$), 3.77 (s, 3H, CH_3), 3.78 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, $2CH_2$), 6.47 (s, 1H, H_5), 7.39-7.52 (m, 5H, H-Ar), 8.36 (s, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 13.8 ($2CH_3$), 30.2 (CH_3), 43.5 ($2CH_2$), 101.1 (CH), 102.4 (Cq), 128.2 (CH), 128.7 ($2CH$), 129.2 ($2CH$), 132.3 (Cq), 137.1 (Cq), 151.5 (CH), 152.5 (Cq), 155.9 (Cq).

IR (ATR diamant) ν : 2973, 2928, 1566, 1507, 1487, 1447, 1376, 1360, 1315, 1294, 1247, 1135, 1075, 1048, 1016, 909, 845, 778, 750, 728, 699, 639, 628 cm^{-1} .

4.4.1.2 Z dietilaminoetilaminom

*N*¹,*N*¹-dietil-*N*²-(6-fenil-7-metil-7H-pirol[2,3-d]pirimidin-4-il)etan-1,2-diamina (**8**)

Izgled: rjava oljnata tekočina

Mr: 323,21

Izkoristek reakcije: 27 %

Retencijski faktor (TLC): 0,22 (heksan: etil acetat = 6 : 4)

MS (ESI): $m/z = 324 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 324$) za $C_{19}H_{25}N_5 [M+H]^+$: izračunan 324.2183, izmerjen 324.2185.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.06 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, $2CH_3$), 2.62 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, $2CH_2$), 2.77 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, CH_2), 3.67 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, CH_3), 6.42 (s, 1H, H_5), 7.37-7.54 (m, 5H, H-Ar), 8.38 (s, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 11.8 ($2CH_3$), 29.8 (CH_2), 30.1 (CH_3), 46.9 ($2CH_2$), 51.7 (CH_2), 97.4 (CH), 103.5 (Cq), 128.2 (CH), 128.8 ($2CH$), 129.1 ($2CH$), 132.3 (Cq), 138.0 (Cq), 152.1 (CH), 156.1 (Cq), 156.3 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 3287, 2965, 2925, 1595, 1562, 1468, 1380, 1340, 1304, 1211, 1113, 1071, 1013, 915, 758, 699, 632 cm^{-1} .

4.4.1.3 S piperidinom

6-fenil-7-metil-4-(piperidin-1-il)-7H-pirolol[2,3-d]pirimidina (9)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 41 μL piperidina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s pomočjo avtomatske kolone (heksan/etil acetat).

Izgled: svetlo rjava trdna snov

Mr: 292,38

Izkoristek reakcije: 83 %

Retencijski faktor (TLC): 0,19 (heksan: etil acetat = 6 : 4)

Temperatura tališča: 102-105°C

MS (ESI): $m/z = 293 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 293$) za $C_{18}H_{20}N_4 [M+H]^+$: izračunan 293.1761, izmerjen 293.1764.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.62-1.79 (m, 6H, $3CH_2$), 3.77 (s, 3H, CH_3), 3.87-3.97 (m, 4H, $2CH_2$), 6.51 (s, 1H, H_5), 7.30-7.53 (m, 5H, H-Ar), 8.37 (s, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 24.9 (CH_2), 26.1 ($2CH_2$), 30.1 (CH_3), 47.2 ($2CH_2$), 100.1 (CH), 103.3 (Cq), 128.2 (CH), 128.7 ($2CH$), 129.1 ($2CH$), 132.2 (Cq), 137.2 (Cq), 151.3 (CH), 152.9 (Cq), 156.8 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 2939, 2851, 1562, 1543, 1459, 1444, 1385, 1337, 1314, 1274, 1257, 1135, 1078, 1016, 994, 950, 914, 853, 825, 787, 764, 730, 697, 627 cm^{-1} .

6-(4-fluorofenil)-7-metil-4-(piperidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (10)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **4** (0.19 mmol), 21,4 mg t-BuOK (0.19 mmol), dodali 38 μL piperidina (0.38 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s pomočjo avtomatske kolone (heksan/etil acetat).

Izgled: umazano bela trdna snov

Mr: 310,37

Izkoristek reakcije: 76 %

Retencijski faktor (TLC): 0,22 (heksan: etil acetat = 6 : 4)

Temperatura tališča: 136-139°C

MS (ESI): m/z = 311 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 311) za C₁₈H₁₉FN₄ [M+H]⁺: izračunan 311.1667, izmerjen 311.1669.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.65-1.77 (m, 6H, 3CH₂), 3.73 (s, 3H, CH₃), 3.84-3.95 (m, 4H, 2CH₂), 6.47 (s, 1H, H₅), 7.07-7.19 (m, 2H, H-Ar), 7.38-7.49 (m, 2H, H-Ar), 8.36 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 24.9 (CH₂), 26.1 (2CH₂), 30.0 (CH₃), 47.2 (2CH₂), 100.8 (CH), 103.2 (Cq), 115.8 (d, $J = 22$ Hz, 2CH), 128.3 (d, $J = 3$ Hz, Cq), 130.9 (d, $J = 8$ Hz, 2CH), 136.1 (Cq), 151.4 (CH), 152.8 (Cq), 156.8 (Cq), 162.8 (d, $J = 248$ Hz, Cq).

IR (ATR diamant) v: 2939, 2854, 1562, 1542, 1494, 1460, 1444, 1385, 1336, 1314, 1271, 1256, 1219, 1159, 1136, 1098, 1076, 1011, 993, 947, 912, 838, 814, 785, 744, 726, 624 cm^{-1} .

6-(4-klorofenil)-7-metil-4-(piperidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (11)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **5** (0.18 mmol), 20,2 mg t-BuOK (0.18 mmol), dodali 40 μL piperidina (0.36 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s pomočjo avtomatske kolone (heksan/etil acetat).

Izgled: sivo-rjava trdna snov

Mr: 326,82

Izkoristek reakcije: 95 %

Retencijski faktor (TLC): 0,24 (heksan: etil acetat = 6 : 4)

Temperatura tališča: 115-118°C

MS (ESI): $m/z = 327 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 327$) za $C_{18}H_{19}ClN_4 [M+H]^+$: izračunan 327.1371, izmerjen 327.1374.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.62-1.74 (m, 6H, 3CH₂), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.88-3.94 (m, 4H, 2CH₂), 6.50 (s, 1H, H₅), 7.43 (s, 4H, H-Ar), 8.36 (s, 1H, H₂).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 24.9 (CH₂), 26.1 (2CH₂), 30.2 (CH₃), 47.2 (2CH₂), 101.1 (CH), 103.3 (Cq), 129.0 (2CH), 130.3 (2CH), 130.6 (Cq), 134.4 (Cq), 135.9 (Cq), 151.5 (CH), 153.0 (Cq), 156.8 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 2924, 2850, 1559, 1476, 1442, 1384, 1315, 1274, 1255, 1088, 1012, 992, 913, 838, 764, 736, 684, 622 cm^{-1} .

4-(7-metil-4-(piperidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-6-il)anilin (12)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **6** (0.19 mmol), 21,7 mg t-BuOK (0.19 mmol), dodali 38 μ L piperidina (0.39 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s pomočjo avtomatske kolone (heksan/etil acetat).

Izgled: sivo-rjava trdna snov

Mr: 307,39

Izkoristek reakcije: 79 %

Retencijski faktor (TLC): 0,29 (heksan: etil acetat = 2 : 8)

Temperatura tališča: 208-212°C

MS (ESI): $m/z = 308 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 308$) za $C_{18}H_{21}N_5 [M+H]^+$: izračunan 308.1870, izmerjen 308.1873.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.66-1.78 (m, 6H, 3CH₂), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.86 (s, 2H, NH₂), 3.89-3.94 (m, 4H, 2CH₂), 6.42 (s, 1H, H₅), 6.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-Ar), 7.29 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-Ar), 8.37 (s, 1H, H₂).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 25.0 (CH₂), 26.1 (2CH₂), 30.0 (CH₃), 47.2 (2CH₂), 99.5 (CH), 103.4 (Cq), 115.1 (2CH), 122.1 (Cq), 130.3 (2CH), 137.7 (Cq), 146.7 (Cq), 150.9 (CH), 152.6 (Cq), 156.6 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 3437, 3326, 3210, 2920, 2848, 1647, 1612, 1562, 1493, 1457, 1444, 1390, 1358, 1335, 1314, 1266, 1175, 1063, 1024, 988, 916, 853, 824, 790, 756, 719, 687 cm^{-1} .

4.4.1.4 S 4-metilpiperidinom

6-fenil-7-metil-4-(4-metilpiperidin-1-il)-7H-piolo[2,3-d]pirimidin (13)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 49 μ L 4-metilpiperidina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s pomočjo avtomatske kolone (heksan/etil acetat).

Izgled: sivo-rjava oljnata tekočina

Mr: 306,40

Izkoristek reakcije: 99 %

Retencijski faktor (TLC): 0,28 (heksan: etil acetat = 6 : 4)

MS (ESI): m/z = 307 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 307) za C₁₉H₂₂N₄ [M+H]⁺: izračunan 307.1917, izmerjen 307.1922.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃), 1.24-1.32 (m, 2H, CH₂), 1.66-1.73 (m, 1H, CH), 1.77-1.79 (m, 2H, CH₂), 3.08 (t, *J* = 13.2 Hz, 2H, CH₂), 3.76 (s, 3H, CH₃), 4.75 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H, CH₂), 6.51 (s, 1H, H₅), 7.36-7.51 (m, 5H, H-Ar), 8.36 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 22.0 (CH₃), 30.1 (CH₃), 31.4 (CH), 34.3 (2CH₂), 46.5 (2CH₂), 100.7 (CH), 103.4 (Cq), 128.2 (CH), 128.7 (2CH), 129.1 (2CH), 132.1 (Cq), 137.2 (Cq), 151.3 (CH), 152.9 (Cq), 156.8 (Cq).

IR (ATR diamant) ν : 2917, 2848, 2189, 1562, 1484, 1452, 1388, 1306, 1253, 1216, 1072, 1015, 971, 913, 849, 777, 748, 729, 698, 627 cm⁻¹.

6-(4-fluorofenil)-7-metil-4-(4-metilpiperidin-1-il)-7H-piolo[2,3-d]pirimidin (14)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **4** (0.19 mmol), 21,4 mg t-BuOK (0.19 mmol), dodali 45 μ L 4-metilpiperidina (0.38 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH₂Cl₂ : aceton = 9 : 1).

Izgled: zelena oljnata tekočina

Mr: 324,40

Izkoristek reakcije: 71 %

Retencijski faktor (TLC): 0,35 (CH₂Cl₂ : aceton = 9 : 1)

MS (ESI): m/z = 325 [M+H]⁺

HRMS ($m/z = 325$) za $C_{19}H_{22}N_4$ $[M+H]^+$: izračunan 325.1823, izmerjen 325.1828.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 0.97 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.28-1.34 (m, 2H, CH_2), 1.66-1.72 (m, 1H, CH), 1.74-1.80 (m, 2H, CH_2), 3.08 (t, $J = 13.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.74 (s, 3H, CH_3), 4.75 (d, $J = 13.4$ Hz, 2H, CH_2), 6.48 (s, 1H, H_5), 7.15 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-Ar), 7.46 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-Ar), 8.36 (s, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 22.0 (CH_3), 30.0 (CH_3), 31.4 (CH), 34.3 ($2CH_2$), 46.5 ($2CH_2$), 100.8 (CH), 103.3 (Cq), 115.9 (d, $J = 22$ Hz, 2CH), 128.3 (d, $J = 4$ Hz, Cq), 130.9 (d, $J = 8$ Hz, 2CH), 136.1 (Cq), 151.4 (CH), 152.9 (Cq), 156.8 (Cq), 162.8 (d, $J = 249$ Hz, Cq).

IR (ATR diamant) ν : 2920, 2849, 1564, 1493, 1454, 1377, 1336, 1308, 1254, 1223, 1158, 1071, 971, 913, 839, 818, 763 cm^{-1} .

6-(4-klorofenil)-7-metil-4-(4-metilpiperidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (15)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **5** (0.18 mmol), 20,2 mg t-BuOK (0.18 mmol), dodali 43 μ L 4-metilpiperidina (0.36 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH_2Cl_2 /aceton od 98:2 do 8:2).

Izgled: rjava oljnata tekočina

Mr: 340,85

Izkoristek reakcije: 99 %

Retencijski faktor (TLC): 0,38 (CH_2Cl_2 : aceton = 9 : 1)

MS (ESI): $m/z = 341$ $[M+H]^+$

HRMS ($m/z = 341$) za $C_{19}H_{21}ClN_4$ $[M+H]^+$: izračunan 341.1528, izmerjen 341.1532.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.26-1.30 (m, 2H, CH_2), 1.66-1.71 (m, 1H, CH), 1.74-1.79 (m, 2H, CH_2), 3.08 (t, $J = 13.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.74 (s, 3H, CH_3), 4.74 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H, CH_2), 6.50 (s, 1H, H_5), 7.42 (s, 4H, H-Ar), 8.36 (s, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 22.0 (CH_3), 30.1 (CH), 31.4 (CH_3), 34.3 ($2CH_2$), 46.5 ($2CH_2$), 101.1 (CH), 103.3 (Cq), 129.0 (2CH), 130.2 (2CH), 130.6 (Cq), 134.3 (Cq), 135.9 (Cq), 151.5 (CH), 153.1 (Cq), 156.8 (Cq).

IR (ATR diamant) ν : 2952, 2919, 2849, 1563, 1480, 1454, 1308, 1254, 1091, 971, 833, 762 cm^{-1} .

4.4.1.5 S pirolidinom

6-fenil-7-metil-4-(pirolidin-1-il)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (16)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 34 μ L pirolidina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (etil acetat).

Izgled: bela trdna snov

Mr: 278,35

Izkoristek reakcije: 81%

Retencijski faktor (TLC): 0,20 (etil acetat)

Temperatura tališča: 125-127 ° C

MS (ESI): $m/z = 279 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 279$) za $C_{17}H_{19}N_4[M+H]^+$: izračunan 279.1604, izmerjen 279.1603.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 2.00-2.07 (m, 4H, 2CH₂), 3.78 (s, 3H, CH₃), 3.81-3.87 (m, 4H, 2CH₂), 6.58 (s, 1H, H₅), 7.35-7.51 (m, 5H, H-Ar), 8.36 (s, 1H, H₂).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 25.5 (2CH₂), 30.1 (CH₃), 48.0 (2CH₂), 100.8 (CH), 103.7 (Cq), 128.1 (CH), 128.8 (2CH), 129.0 (2CH), 132.4 (Cq), 136.8 (Cq), 151.9 (CH), 152.0 (Cq), 155.2 (Cq).

IR (ATR diamant) ν : 2964, 2922, 2874, 1571, 1548, 1505, 1479, 1455, 1385, 1344, 1330, 1307, 1257, 1223, 1126, 1074, 1028, 1014, 950, 926, 840, 777, 751, 738 cm^{-1} .

4.4.1.6 S cikloheksilaminom

N-cikloheksil-6-fenil-7-metil-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-amin (17)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 47 μ L cikloheksilamina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili z avtomatsko kolono (etil acetat/MeOH).

Izgled: rumena trdna snov

Mr: 306,40

Izkoristek reakcije: 76%

Retencijski faktor (TLC): 0,14 (etil acetat)

Temperatura tališča: 210-212° C

MS (ESI): $m/z = 307 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 307$) za $C_{19}H_{23}N_4[M+H]^+$: izračunan 307.1917, izmerjen 307.1914.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.20-1.33 (m, 3H, H_{ax}), 1.40-1.54 (m, 2H, H_{ax}), 1.62-1.72 (m, 1H, H_{eq}), 1.74-1.84 (m, 2H, H_{eq}), 2.10-2.18 (m, 2H, H_{eq}), 3.78 (s, 3H, CH_3), 4.06-4.21 (m, 1H, CH_{alk}), 4.84-5.00 (m, 1H, NH), 6.36 (s, 1H, H_5), 7.38-7.53 (s, 5H, H-Ar), 8.37 (s, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 25.1 ($2CH_2$), 25.8 (CH_2), 30.1 (CH_3), 33.9 ($2CH_2$), 49.8 (CH), 97.3 (CH), 103.0 (Cq), 128.3 (CH), 128.8 ($2CH$), 129.1 ($2CH$), 132.2 (Cq), 138.1 (Cq), 151.7 (CH), 152.1 (Cq), 155.6 (Cq).

IR (ATR diamant) ν : 3247, 3192, 3165, 3114, 3034, 2925, 2850, 1602, 1566, 1546, 1523, 1505, 1470, 1443, 1404, 1383, 1357, 1337, 1310, 1250, 1207, 1110, 1072, 1012, 907, 896, 769, 740 cm^{-1} .

4.4.2 Z anilini

4.4.2.1 Z anilinom

N,6-difenil-7-metil-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-amin (**18**)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg *t*-BuOK (0.21 mmol), dodali 37,4 μ L anilina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH_2Cl_2 /aceton od 98:2 do 9:1).

Izgled: trdna snov umazano bele barve

Mr: 300,36

Izkoristek reakcije: 35%

Retencijski faktor (TLC): 0,15 (CH_2Cl_2 : aceton = 9 : 1)

Temperatura tališča: 212-214° C

MS (ESI): $m/z = 301 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 301$) za $C_{19}H_{17}N_4[M+H]^+$: izračunan 301.1448, izmerjen 301.1446.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.81 (s, 3H, CH₃), 6.16 (s, 1H, H₅), 7.09 (m, 1H, NH), 7.14-7.18 (m, 1H, H-Ar), 7.35-7.48 (m, 7H, H-Ar), 7.57-7.64 (m, 2H, H-Ar), 8.50 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 30.2 (CH₃), 97.8 (CH), 104.0 (Cq), 122.4 (2CH), 124.4 (CH), 128.5 (CH), 128.8 (2CH), 129.1 (2CH), 129.2 (2CH), 131.9 (Cq), 138.9 (Cq), 139.1 (Cq), 151.6 (CH), 152.5 (Cq), 154.0 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 2918, 2849, 1600, 1581, 1563, 1537, 1491, 1469, 1450, 1434, 1404, 1352, 1341, 1306, 1244, 1222, 1212, 1074, 1012, 920, 801, 780, 755, 735 cm⁻¹.

4.4.2.2 S 4-nitroanilinom

6-fenil-7-metil-N-(4-nitrofenil)-7H-pirolol[2,3-d]pirimidin-4-amin (**19**)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 56,7 mg 4-nitroanilina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH₂Cl₂/aceton od 98:2 do 8:2).

Izgled: rumenkasta trdna snov

Mr: 345,35

Izkoristek reakcije: 91%

Retencijski faktor (TLC): 0,22 (CH₂Cl₂ : aceton = 98 : 2)

Temperatura tališča: 240-242° C

MS (ESI): m/z = 346 -[M+H]⁺

HRMS (m/z = 346) za C₁₉H₁₅N₅O₂[M+H]⁺: izračunan 346.1299, izmerjen 346.1304.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.80 (s, 3H, CH₃), 7.03 (s, 1H, H₅), 7.47-7.52 (m, 1H, H-Ar), 7.54-7.59 (m, 2H, H-Ar), 7.65-7.69 (m, 2H, H-Ar), 8.25 (s, 4H, H-Ar), 8.52 (s, 1H, H₂), 10.08 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 29.7 (CH₃), 98.0 (CH), 105.0 (Cq), 118.7 (2CH), 124.9 (2CH), 128.5 (CH), 128.7 (2CH), 128.9 (2CH), 131.3 (Cq), 138.9 (Cq), 140.7 (Cq), 147.0 (Cq), 150.5 (CH), 151.8 (Cq), 152.1 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 3119, 2922, 2852, 1628, 1590, 1563, 1493, 1469, 1416, 1382, 1311, 1298, 1254, 1226, 1181, 1113, 1079, 1026, 1005, 946, 914, 848, 810, 773, 742, 694, 660, 652, 614 cm⁻¹.

6-(4-fluorofenil)-7-metil-N-(4-nitrofenil)-7H-pirol[2,3-d]pirimidin-4-amin (20)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **4** (0.19 mmol), 21,4 mg t-BuOK (0.19 mmol), dodali 52,8 mg 4-nitroanilin (0.38 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH₂Cl₂/aceton od 98:2 do 8:2).

Izgled: rumenkasta trdna snov

Mr: 363,35

Izkoristek reakcije: 50%

Retencijski faktor (TLC): 0,19 (CH₂Cl₂ : aceton = 98 : 2)

Temperatura tališča: 265-267° C

MS (ESI): m/z = 364 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 364) za C₁₉H₁₄FN₅O₂[M+H]⁺: izračunan 364.1204, izmerjen 364.1209.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.78 (s, 3H, CH₃), 7.01 (s, 1H, H₅), 7.37-7.43 (m, 2H, H-Ar), 7.69-7.74 (m, 2H, H-Ar), 8.25 (s, 4H, H-Ar), 8.52 (s, 1H, H₂), 10.08 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 30.2 (CH₃), 98.7 (CH), 105.4 (Cq), 116.4 (d, J = 22 Hz, 2CH), 119.2 (2CH), 125.4 (2CH), 128.2 (d, J = 3 Hz, 2CH), 131.4 (d, J = 8 Hz, 2CH), 132.1 (Cq), 139.8 (d, J = 284 Hz, Cq), 147.5 (Cq), 151.0 (CH), 152.2 (Cq), 152.6 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 3119, 2920, 2851, 1628, 1590, 1564, 1495, 1467, 1413, 1382, 1312, 1224, 1181, 1165, 1113, 1019, 948, 913, 838, 812, 763, 749, 688, 647, 624 cm⁻¹.

6-(4-klorofenil)-7-metil-N-(4-nitrofenil)-7H-pirol[2,3-d]pirimidin-4-amin (21)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **5** (0.18 mmol), 20,2 mg t-BuOK (0.18 mmol), dodali 49,7 mg 4-nitroanilina (0.36 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH₂Cl₂/aceton od 98:2 do 9:1).

Izgled: oranžna trdna snov

Mr: 379,80

Izkoristek reakcije: 82%

Retencijski faktor (TLC): 0,23 (CH₂Cl₂ : aceton = 98 : 2)

Temperatura tališča: 295-297° C

MS (ESI): m/z = 380 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 380) za C₁₉H₁₄ClN₅O₂[M+H]⁺: izračunan 380.0909, izmerjen 380.0910.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.80 (s, 3H, CH₃), 7.05 (s, 1H, H₅), 7.60-7.64 (m, 2H, H-Ar), 7.68-7.72 (m, 2H, H-Ar), 8.22-8.28 (m, 4H, H-Ar), 8.52 (s, 1H, H₂), 10.10 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 29.9 (CH₃), 98.5 (CH), 105.0 (Cq), 118.7 (2CH), 125.0 (2CH), 129.0 (2CH), 130.2 (Cq), 130.5 (2CH), 133.4 (Cq), 137.6 (Cq), 140.8 (Cq), 147.0 (Cq), 150.7 (CH), 151.9 (Cq), 152.2 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 3377, 2920, 2850, 1737, 1621, 1593, 1559, 1504, 1465, 1402, 1375, 1350, 1312, 1260, 1178, 1111, 1090, 1017, 1008, 907, 859, 847, 830, 772, 751, 726, 713, 689, 640 cm⁻¹.

4.4.2.3 S 4-bromoanilinom

N-(4-bromofenil)-6-fenil-7-metil-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4amin (**22**)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 70,6 mg 4-bromoanilina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH₂Cl₂/aceton od 98:2 do 8:2).

Izgled: bela trdna snov

Mr: 379,25

Izkoristek reakcije: 23%

Retencijski faktor (TLC): 0,38 (heksan : etil acetat = 6 : 4)

Temperatura tališča: 230-232° C

MS (ESI): m/z = 379 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 379) za C₁₉H₁₆BrN₄[M+H]⁺: izračunan 379.0553, izmerjen 379.0555.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.82 (s, 3H, CH₃), 6.26 (s, 1H, H₅), 6.95 (s, 1H, NH), 7.41-7.51 (m, 7H, H-Ar), 7.55 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-Ar), 8.51 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 30.2 (CH₃), 97.3 (CH), 104.2 (Cq), 116.6 (Cq), 123.2 (2CH), 128.7 (CH), 128.9 (2CH), 129.2 (2CH), 131.8 (Cq), 132.1 (2CH), 138.4 (Cq), 139.4 (Cq), 151.4 (CH), 152.5 (Cq), 153.4 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 3172, 3100, 3059, 2997, 2915, 1621, 1575, 1561, 1546, 1524, 1487, 1455, 1443, 1379, 1356, 1335, 1302, 1243, 1223, 1073, 1031, 1009, 909, 820, 807, 795, 772, 712, 700 cm⁻¹.

4.4.2.4 S 4-kloroanilinom

6-fenil-N-(4-klorofenil)-7-metil-7H-pirol[2,3-d]pirimidin-4-amin (**23**)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 52,3 mg 4-kloroanilina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH₂Cl₂/aceton od 98:2 do 8:2).

Izgled: rumena trdna snov

Mr: 334,80

Izkoristek reakcije: 31%

Retencijski faktor (TLC): 0,23 (CH₂Cl₂ : aceton = 9 : 1)

Temperatura tališča: 211-213° C

MS (ESI): m/z = 335 [M+H]⁺

HRMS (m/z = 335) za C₁₉H₁₆ClN₄[M+H]⁺: izračunan 335.1058, izmerjen 335.1055.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.81 (s, 3H, CH₃), 6.24 (s, 1H, NH), 7.04 (s, 1H, H₅), 7.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-Ar), 7.42-7.49 (m, 5H, H-Ar), 7.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-Ar), 8.50 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 30.2 (CH₃), 97.4 (CH), 116.6 (Cq), 123.1 (2CH), 128.7 (CH), 128.9 (2CH), 129.1 (Cq), 129.2 (2CH), 129.2 (2CH), 131.8 (Cq), 137.8 (Cq), 139.3 (Cq), 151.4 (CH), 152.5 (Cq), 153.5 (Cq).

IR (ATR diamant) v: 2919, 2850, 1619, 1578, 1563, 1548, 1490, 1470, 1456, 1443, 1380, 1356, 1337, 1304, 1243, 1223, 1099, 1085, 1030, 1012, 909, 823, 808, 797, 779, 701 cm⁻¹.

4.4.2.5 S 4-fluoroanilinom

6-fenil-N-(4-fluorofenil)-7-metil-7H-pirol[2,3-d]pirimidin-4-ilamin (**24**)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 38,9 μL 4-fluoroanilina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH₂Cl₂ : aceton = 9 : 1).

Izgled: bela trdna snov

Mr: 318,35

Izkoristek reakcije: 27%

Retencijski faktor (TLC): 0,17 (CH₂Cl₂ : aceton = 9 : 1)

Temperatura tališča: 201-203° C

MS (ESI): $m/z = 319 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 319$) za $C_{19}H_{16}FN_4 [M+H]^+$: izračunan 319.1354, izmerjen 319.1352.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.80 (s, 3H, CH_3), 6.08 (s, 1H, H_5), 7.08 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-Ar), 7.37-7.50 (m, 5H, H-Ar), 7.54 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H, H-Ar), 7.55 (s, 1H, NH), 8.47 (s, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 30.2 (CH_3), 97.7 (CH), 103.7 (Cq), 115.9 (d, $J = 23$ Hz, 2CH), 124.8 (d, $J = 8$ Hz, 2CH), 128.5 (CH), 128.9 (2CH), 129.2 (2CH), 131.8 (Cq), 135.1 (d, $J = 3$ Hz, Cq), 139.0 (Cq), 151.5 (CH), 152.5 (Cq), 154.2 (Cq), 160.0 (d, $J = 244$ Hz, Cq).

IR (ATR diamant) ν : 3152, 2911, 2873, 1603, 1569, 1538, 1504, 1491, 1434, 1404, 1352, 1339, 1304, 1240, 1215, 1152, 1091, 1012, 918, 838, 796, 778, 755, 741, 711 cm^{-1} .

4.4.2.6 S 4-aminobenzonitrilom (s 4- cianoanilinom)

4-((6-fenil-7-metil-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)benzonitril (25)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 48,5 mg 4-aminobenzonitrila (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (CH_2Cl_2 /aceton od 98:2 do 8:2).

Izgled: rumena trdna snov

Mr: 325,37

Izkoristek reakcije: 63%

Retencijski faktor (TLC): 0,16 (CH_2Cl_2 : aceton = 98 : 2)

Temperatura tališča: 251-253° C

MS (ESI): $m/z = 326 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 326$) za $C_{20}H_{16}N_5 [M+H]^+$: izračunan 326.1400, izmerjen 326.1398.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.85 (s, 3H, CH_3), 6.46 (s, 1H, H_5), 7.11 (s, 1H, NH), 7.43-7.54 (m, 5H, H-Ar), 7.64 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-Ar), 7.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-Ar), 8.58 (s, 1H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 30.3 (CH_3), 96.5 (CH), 105.1 (Cq), 105.4 (Cq), 119.5 (Cq), 119.8 (2CH), 128.9 (CH), 129.0 (2CH), 129.2 (2CH), 131.5 (Cq), 133.4 (2CH), 140.3 (Cq), 143.7 (Cq), 151.1 (CH), 152.3 (Cq), 152.5 (Cq).

IR (ATR diamant) ν : 3362, 2215, 1617, 1602, 1559, 1543, 1518, 1505, 1461, 1446, 1414, 1374, 1355, 1343, 1316, 1279, 1253, 1226, 1173, 1024, 904, 837, 778, 756, 703 cm^{-1} .

4.4.2.7 S 4-metoksianilinom (s p-anisidinom)

6-fenil-7-metil-N-(4-metoksifenil)-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)amin (**26**)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 50,5 mg p-anisidina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s pomočjo avtomatske kolone (MeOH).

Izkoristek reakcije: 0%

4.4.2.8 S 4-metilanilinom

N,6-difenil-N,7-dimetil-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-amin (**27**)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 37,4 μL N-metilanilina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili avtomatsko kolono (heksan/etil acetat).

Izkoristek reakcije: 0%

4.4.3 S hidrazinom

4-(2,2,-diometilhidrazinil)-6-fenil-7-metil-7H-pirololo[2,3-d]pirimidin (**28**)

Po splošnem sinteznem postopku II smo natehtali 50 mg alkina **3** (0.21 mmol), 23 mg t-BuOK (0.21 mmol), dodali 31,2 μL N,N-dimetilhidrazina (0.41 mmol) ter 3 mL acetonitrila. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (etil acetat : MeOH = 95 : 5).

Izgled: svetlo rumena trdna snov

Mr: 267,33

Izkoristek reakcije: 38%

Retencijski faktor (TLC): 0,23 (etil acetat : MeOH = 95 : 5)

Temperatura tališča: 181-183° C

MS (ESI): $m/z = 268 [M+H]^+$

HRMS ($m/z = 268$) za $C_{15}H_{18}N_5[M+H]^+$: izračunan 268.1557, izmerjen 268.1553.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 2.67 (s, 6H, 2 CH_3), 3.80 (s, 3H, CH_3), 5.98 (s, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, H₅), 7.41-7.55 (m, 5H, H-Ar), 8.31 (s, 1H, H₂).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 30.1 (CH_3), 48.5 (2 CH_3), 101.2 (CH), 102.5 (Cq), 128.2 (CH), 128.8 (2CH), 129.2 (2CH), 132.4 (Cq), 138.2 (Cq), 151.5 (CH), 153.0 (Cq), 156.8 (Cq).

IR (ATR diamant) ν : 3188, 3045, 2954, 2918, 2855, 1584, 1488, 1446, 1434, 1341, 1302, 1159, 1009, 909, 876, 785, 760, 742, 701 cm^{-1} .

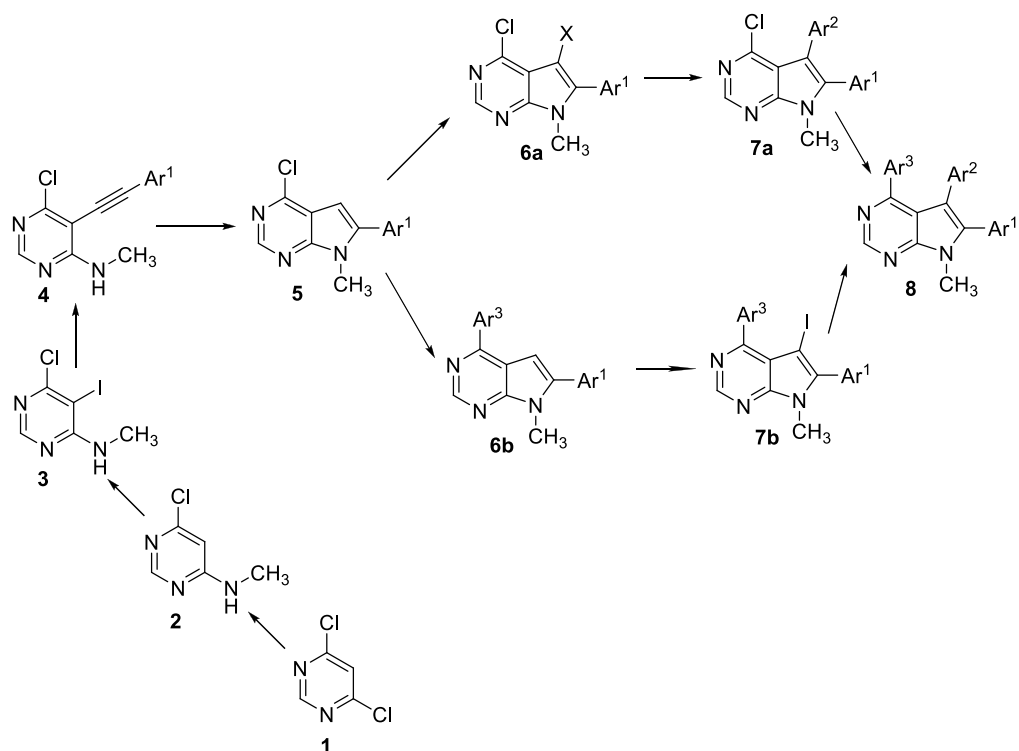
5 REZULTATI IN RAZPRAVA

Moje laboratorijsko delo je nadaljevanje eksperimentalnega dela doktorantke Vanesse Prieur. Do začetka njenega dela so bile objavljene sintezne poti do 2,4,7-triarilpirolo[2,3-*d*]pirimidinov ter 2,6,8-triarilpurinov. Sama je želela razviti učinkovito sintezno pot do heterocikličnih sistemov, pirolpirimidinov z različnimi substituentami, ter se odločila pripraviti različne 4,5,6-triarilpirolo[2,3-*d*]pirimidine, saj sinteza teh še ni bila objavljena. [45]

Naša sintezna pot je tako temeljila na objavljenih dognanjih večih raziskovalcev. Kopecky in njegova skupina je objavila sintezo 4,5,6-triarilpirolo[2,3-*d*]pirimidiov iz 4,6-diamino-5-iodopirimidina preko intramolekularne Heckove reakcije, katalizirane s paladijem. [52] Raziskovalna skupina Carpita-e je pokazala sintezno pot do indolov preko intramolekularne ciklizacije 2-alkinilanilinov, ki je potekala pri 200°C. [53] Pri iskanju uspešne sintezne poti do TWS119, zaviralca glikogen sintaze kinaze-3 β , ki je po strukturi prav tako pirolpirimidin, pa sta Maysundari in Fujii prikazala intramolekularno ciklizacijo 5-alkinil-4-aminopirimidina, za katero je potrebna baza ter temperatura 180°C. [54] Prav s pomočjo slednjih sinteznih postopkov smo v naši skupini pripravili ustrezno substituirane pirolpirimidine.

V. Prieur je sintezni postopek pričela s komercialnim reagentom 4,6-dikloropirimidinom ter nato v sedmih stopnjah sinteze prišla do 4,5,6-triarilpirolo[2,3-*d*]pirimidinov (Slika 15):

1. nukleofilna substitucija z metilaminom na C-4,
2. elektrofilno jodiranje na C-5,
3. Sonogashira coupling alkinilacija,
4. intramolekularna ciklizacija,
5. halogeniranje na 5.mestu bicikličnega obroča/ arilacija na 4. mestu,
6. pripenjanje arilne skupine na 5.mestu/ jodiranje na 5.mestu,
7. arilacija bodisi na 4.mestu, bodisi na 5.mestu.



Slika 15: Sintezni poti do triarilpirolopirimidinov (povzeto po [45]).

Intramolekularno ciklizacijo je opravila v mikrovalovnem reaktorju v prisotnosti baze Cs_2CO_3 in CuI kot katalizatorja. V nadaljnjih reakcijah je poskusila z odpravljanjem katalizatorja in zniževanjem temperature. Z odpravo katalizatorja ter znižanjem temperature na 100°C je ugotovila, da reakcija poteče še lažje oz. z višjimi izkoristki v 30-90 minutah pod vplivom mikrovalov. Produkti so bili čisti, tako da nadaljnje čiščenje ni bilo potrebno. [45]

Tako smo v naslednjem koraku pripravili različne 4-aminirane-6-arilpirolo[2,3-*d*]pirimidine ter hkrati optimizirali sintezni postopek, ki ga je uporabila V. Prieur.

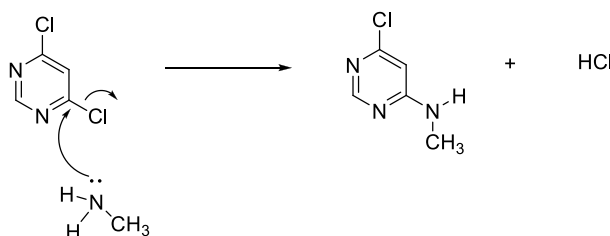
5.1 Komentar sinteznim postopkom

Izhodne reagente, ustrezne 5-alkinilpirimidine, smo pripravili s Sonogashira alkinilacijo 6-kloro-4-metilamino-5-jodopirimidina z uporabo ustreznih komercialnih alkinilbenzenov.

Najprej smo tako morali pripraviti 6-kloro-4-metilamino-5-jodopirimidin, začenši s 4,6-dikloropirimidinom.

5.1.1 SINTEZA 6-KLORO-N-METILPIRIMIDIN-4-AMINA

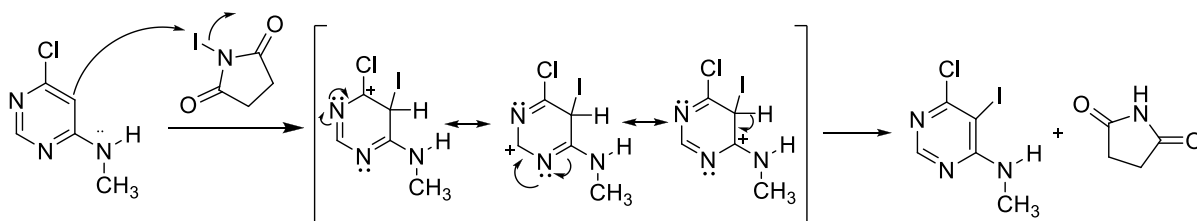
Produkt **1** smo pripravili iz komercialnega produkta 4,6-dikloropirimidina z metilaminom v izopropanolu. Izopropanol smo po končani reakciji odparili pod znižanim tlakom, saj je kot alkohol s krajšo alkilno verigo topen tako v vodi kot v organskem topilu. S tem smo preprečili izgube produkta tekom ekstrakcije. Mehanizem reakcije je nukleofilna substitucija, kjer amino skupina metilamina nastopa kot nukleofil ter napade C-4 atom, pri tem pa izstopa HCl. Z dodatkom trietilamina smo nevtralizirali slednjo kislino.



Slika 16: Mehanizem nukleofilne substitucije in nastanka 4-metilaminopirimidina.

5.1.2 JODIRANJE 6-KLORO-4-METILAMINOPIRIMIDINA

Produkt druge stopnje sinteze smo pripravili z jodiranjem produkta **1**. Gre za elektrofilno jodiranje s pomočjo N-jodosukcinimida, ki predstavlja donor joda.



Slika 17: Mehanizem jodiranja 6-kloro-4-metilaminopirimidina.

Ko se jod veže na sp² hibridiziran C-5, dejansko poteče adicija elektrofila na eno od aromatičnih dvojnih vezi. Nastane intermediat oz. karbokation, ki je resonančno stabiliziran, C-5 pa postane sp³ hibridiziran. Gre za neugodno reakcijo, ki poteka dokaj počasi, saj se podre aromatičnost obroča, nastane σ -kompleks. Druga stopnja reakcije je eliminacija protona, ki je energetsko ugodnejša, saj reagira stabiliziran intermediat. Reakcija poteče na C-5 mestu in ne na C-2, to nam dokazujejo resonančne strukture σ -kompleksa, saj v primeru vezave na C-2 pozitiven naboj na dušikovem atomu pirimidina ne daje stabilne strukture.

Sprva smo reakcijo pustili mešati v mikrovalovnem reaktorju 15 minut, nakar smo dodali dodatne 3 ekvivalente NIS in reakcijo mešali še 15 minut. Po nekaj opravljenih reakcijah smo po spremljanju poteka reakcije s TLC ugotovili, da če reakcijsko zmes pred mešanjem v reaktorju dodobra premešamo, drugih 15 minut ni potrebnih. S tem smo skrajšali čas reakcije ter zmanjšali porabo NIS, torej stroške. Prav tako smo v prvih nekaj poskusih za čiščenje spojine opravili rekristalizacijo, vendar smo v nadaljnje ugotovili, da H¹ spekter pokaže spojino čisto. Tako smo rekristalizacijo opustili in s tem zmanjšali morebitne izgube produkta.

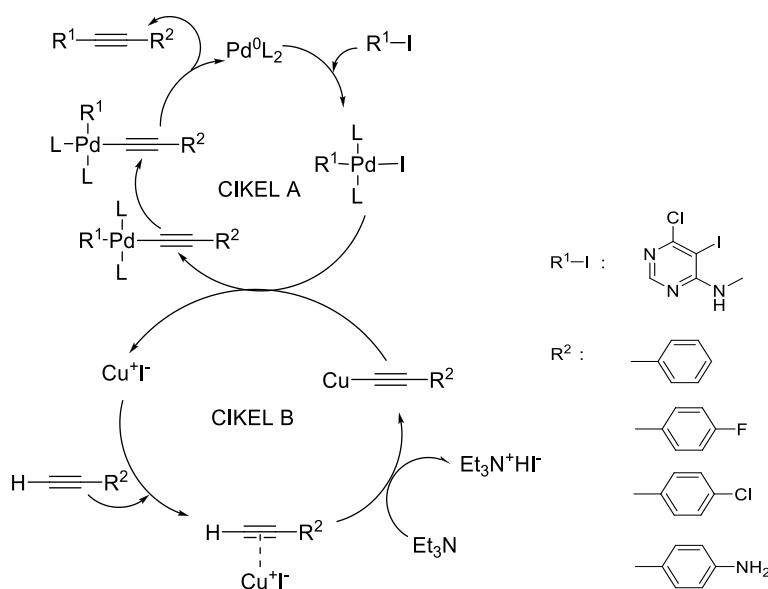
Po končani reakciji smo organsko fazo reakcijske zmesi spirali z Na₂S₂O₃ ter NaOH. Z Na₂S₂O₃ smo eliminirali prebiten jod, z NaOH pa preostali sukcinimid.

5.1.3 SINTEZA 5-ALKINILPIRIMIDINOV

5-alkinilpirimidine smo pripravili s Sonogashira pripajanjem, ki je reakcija tvorbe ogljik-ogljik vezi med organohalidi in terminalnimi alkinimi. [51] Gre za kemoselektivno reakcijo, tako izkoristek reakcije ni odvisen od elektronskega stanja 4-substituiranih aril alkinov. [45] Pri reakciji smo uporabili bis(dibenzilidenaceton)paladij (0) (Pd(dba)₂) kot katalizator, CuI kot ko-katalizator, tri(2-furil)fosfin kot ligand oz. za povečanje učinkovitosti reakcije, ter trietilamin (Et₃N) kot bazo in sotpilo, ki nevtralizira HI, ki izhaja.

Mehanizem reakcije Sonogashira do sedaj še ni popolnoma znan, vendar dosedanja dognanja kažejo na to, da se pri oksidativni adiciji organohalida na Pd (0) tvori Pd (II) kompleks. Med tem terminalni alkin in Cu kot ko-katalizator prav tako tvorita kompleks, nakar poteče transmetalacija, kar pomeni, da anion terminalnega alkina izpodrine halid v

Pd kompleksu in se tvori CuX , v našem primeru CuI . Nazadnje poteče reduktivna eliminacija, odstrani se Pd iz kompleksa in nastane končni spojeni produkt ter nova ogljik-ogljik vez (Slika 19). [55]



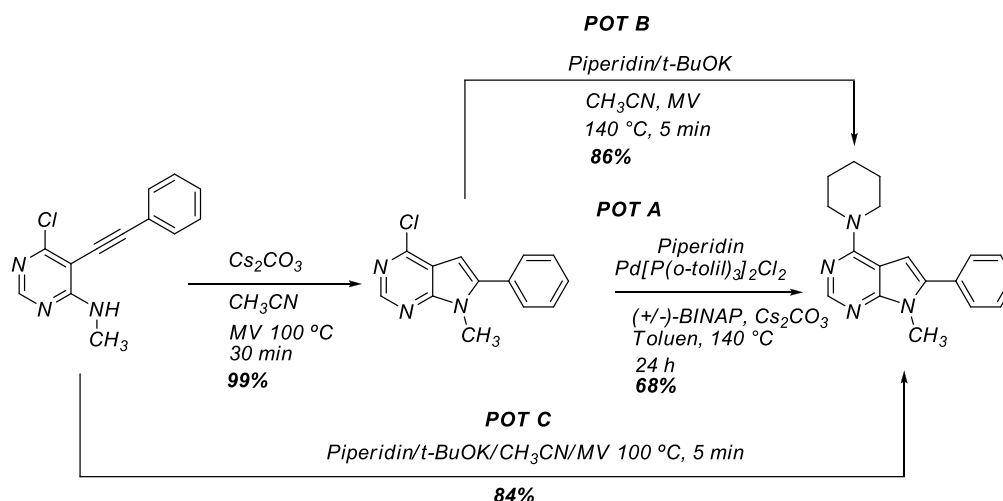
Slika 18: Mehanizem Sonogashira pripajanja (povzeto po [55]).

Reakcijo smo izvedli v anaerobnih pogojih- v inertni atmosferi argona. Če je CuI v stiku z zrakom, bakrov acetilid ne vstopa v reakcijo z arilhalidom, vendar poteče oksidativno spajanje dveh molekul bakrovega acetilida (»homocoupling«) in tako nastaja nezaželen stranski produkt reakcije. [56]

5.1.4 »ONE-POT« SINTEZA 4-AMINIRANIH-6-ARILPIROLO[2,3-*d*]PIRIMIDINOV

4-aminopirolopirimidine smo poskusili sintetizirati v več poskusih, kjer smo spreminjali temperaturo od sobne do $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali uporabili mikrovalove. S tem smo poskušali zmanjšati število stopenj sinteze in skrajšati reakcijski čas. Najprej smo alkinilpirimidine ciklizirali do pirolo[2,3-*d*]pirimidinov, nato pa na 4. mestu pirimidinskega obroča opravili aminacijo po dveh različnih poteh. Ko smo pirolo[2,3-*d*]pirimidinu dodali piperidin kot amin, katalizator $\text{Pd}[\text{P}(\text{o-tolil})_3]_2\text{Cl}_2$, cezijev karbonat ter BINAP in reakcijo pustili mešati 24 ur

na 140 °C, nam je cross coupling reakcija dala izkoristek 68% (pot A). Z uporabo mikrovalov ter zamenjavo baze za močnejšo (t-BuOK), smo pri isti temperaturi zmanjšali reakcijski čas na 5 minut ter zvišali izkoristek reakcije na 86%. Tako je bil skupen izkoristek reakcije po poti A 67%, po poti B pa 85%. Nato smo poskusili s sintezo aminiranega pirolpirimidina direktno iz alkinil pirimidina z namenom zmanjšanja števila stopenj sinteze, s tem skrajšanja reakcijskega časa ter stroškov sinteze. Ugotovili smo, da direktna reakcija ciklizacije in aminiranja z uporabo mikrovalov, zamenjavo cezijevega karbonata za t-BuOK, v 5 minutah pri 100 °C (M), da izkoristek 84%. Tako smo s to reakcijo prišli do 4-aminiranih-6-arilpirolo[2,3-*d*]pirimidinov iz alkinil pirimidinov v eni sami stopnji, brez uporabe katalizatorjev in z zadovoljivimi izkoristki. Prav tako smo pridobili na čistosti produkta v primerjavi z konvencionalnimi metodami (Slika 19).



Slika 19: Shema aminiranja 4-kloropirolo[2,3-*d*]pirimidinov.

Reakcijo s piperidinom smo najprej izvedli v 60 minutah (izkoristek 85%), nato pa še v 5 minutah (izkoristek 84%). S tem smo ugotovili, da daljši reakcijski čas ne vpliva znatno na izkoristek reakcije. Prav tako smo poskušali z višanjem temperature, kjer temperature do 120 °C niso kazale sprememb, temperature, višje od 140 °C pa so pokazale nižje izkoristke na račun tvorjenja stranskih produktov.

Da bi optimizirali pogoje reakcije, smo poizkusili izpeljati sintezo z različnimi topili različnih lastnosti, kot so dimetilsulfoksid (DMSO), metanol, dimetilformamid (DMF) in

acetonitril. DMF in acetonitril sta se izkazala za najbolj primerna, vendar smo za izvajanje reakcij izbrali acetonitril, saj je v nasprotju z DMF netopen v vodi ter ima nižje vrelišče (82 °C) in so tako njegove lastnosti najprimernejše za nadaljevanje postopkov sinteze. DMF lahko zaostaja v reakcijski zmesi in tako tudi povzroči izgube produkta.

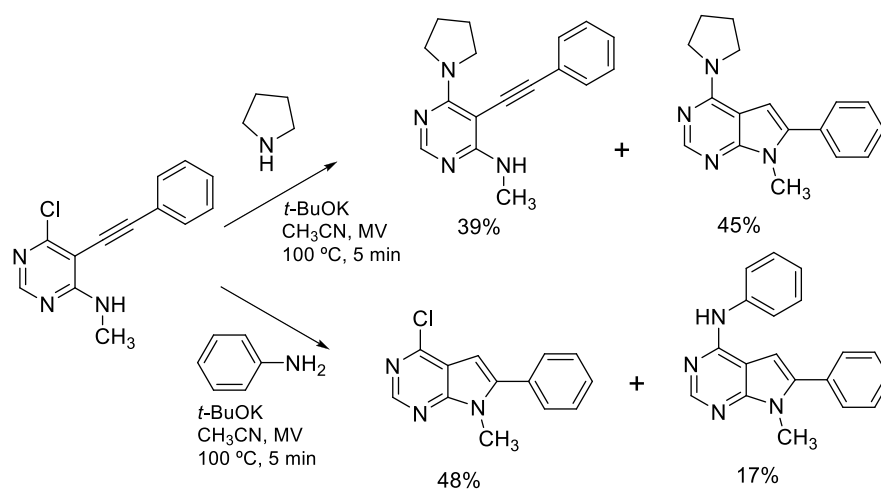
Prav tako smo poskusili izvesti reakcijo ob prisotnosti različnih baz. Ob uporabi NaH ali NaNH_2 do intramolekularne ciklizacije ni prišlo tudi po daljših reakcijskih časih, cezijev karbonat daje zadostne rezultate, vendar ga moramo dodati v presežku. Najboljše izkoristke smo opazili pri uporabi 1 ekvivalenta *t*-BuOK.

Rezultati so pokazali, da ima substituenta na C-6 mestu morda dobršen vpliv na reaktivnost, saj pri reakcijah s substituentama fenil in *p*-klorofenil dobimo precej višje izkoristke kot pri reakcijah s *p*-fluorofenilom in *p*-nitrofenilom. Slednjih rezultatov ne moremo z gotovostjo potrditi, saj smo z vsemi omenjenimi substituentami opravili samo eno paralelo oz. reakcijo s samo enim skupnim reagentom, tj. piperidinom. Problem je bil v uporabi (4-aminofenil)etinilpirimidina, saj je bil v tekočem stanju, tehtanje smolnato tekoče snovi pa je bilo zato težavno. Če bi hoteli potrditi naše domneve, bi morali pripraviti večje količine 4-aminofeniletinilpirimidina, da bi bilo tehtanje tako lažje, mi pa smo razpolagali z nekaj 100 mg spojine. Sklepamo, da amino skupina kot elektron donor destabilizira sistem in tako zmanjša možnost intramolekularne ciklizacije spojine. Kljub malce bolj problematični sintezi takih pirolopirimidinov, bi bila 4-aminofenil skupina zelo zanimivo izhodišče za pripravo spojin s potencialno biološko aktivnostjo. Na tržišču obstaja zdravilo sorafenib, ki je derivat sečnine in se že uporablja pri zdravljenju raka ledvic, jeter ter ščitnice. Na podlagi tega bi lahko iz naših spojin pripravili derivate sečnine in jih biološko ovrednotili.

Reakcija s cikloalkilamini kot so piperidin, 4-metilpiperidin in pirolidin, je potekla brez težav, prav tako s cikloheksilaminom. Pri reakcijah z necikličnimi alkil amini, kot na primer dietilaminom in dietilaminoetilaminom pa smo kljub daljšem reakcijskem času dobili nižje izkoristke. Sklepamo, da so temu vzrok fizikalne lastnosti reagentov, saj so ti amini precej bolj hlapljivi, prav tako pa v prisotnosti ostalih reagentov v reakcijski zmesi lahko pride do njihovega oksidativnega razpada. Alkilhidrazin je sicer reagiral malce boljše kot sami alkil amini, vendar je bil pridobljen produkt tako bolj polaren in sama izolacija/čiščenje produkta je bilo zato težavnejše.

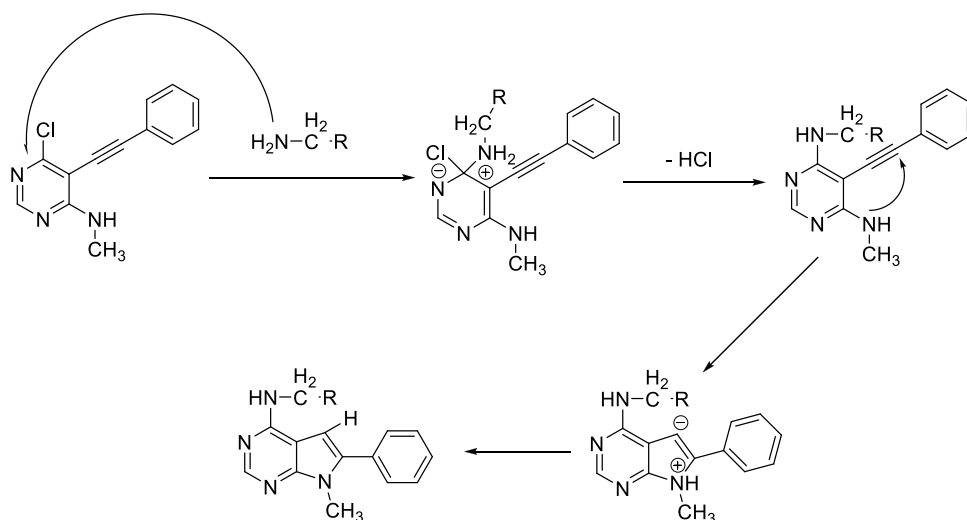
Reakcijo smo poskusili izvesti tudi z različno substituiranimi anilini. V primerjavi s samim anilinom, dajeta 4-nitroanilin in 4-cianoanilin precej boljše rezultate. Nitro in ciano skupina sta elektron akceptorski skupini, ki v bazičnih pogojih stabilizirata nastanek aniona na amino skupini anilina in tako izboljšata nukleofilni napad na C-6 mesto etinilpirimidina. V nasprotju z nitro in ciano skupino dajejo halogenirani anilini (na C-4 mestu) slabše rezultate kot sam anilin. Razlog je verjetno v topnosti, saj so halogenirani anilini bolj lipofilni. V primeru 4-metoksi- in 4-metilanilina je H^1 NMR spekter pokazal prisotnost izhodne spojine ter intermediata (cikliziranega, vendar nesubstituiranega) pirolpirimidina, kar kaže na to, da elektron donorske skupine destabilizirajo strukturo aniona in do nukleofilnega napada ne pride.

Rezultati, ki smo jih dobili z NMR spektrom produktov reakcij s 4-metoksi- in 4-metilanilinom, so nas napeljali na nadaljnje raziskovanje samega poteka reakcije. Še enkrat smo opravili reakciji 5-(feniletinil)-6-kloro-N-metilpirimidin-4-amina s pirolidinom in anilinom pod enakimi pogoji (t -BuOK, 100 °C MV, CH_3CN), vendar ju tokrat pustili mešati le 5 minut. Ta reaktanta smo izbrali ravno zato, ker smo v prvem poskusu izvedli reakciji v 30-ih minutah (pirolidin) in 20-ih minutah (anilin), pri drugih reaktantih pa ugotovili, da reakcija poteče skoraj takoj, tj. v 5-ih minutah. Po 5 minutah mešanja izhodne spojine s pirolidinom smo po analizi H^1 spektra ugotovili, da imamo prisotno mešanico substituirane izhodne spojine (39%) in substituirane ter ciklizirane- končne spojine (45%). V primeru druge reakcije, z anilinom, smo ugotovili prisotnost mešanice cikliziranega produkta (48%) ter končnega produkta (17%) (Slika 20).



Slika 20: Dva mehanizma reakcije alkinilpirimidinov v bazičnem mediju.

S pridobljenimi rezultati lahko potrdimo, da v primeru alkil aminov, v prvi stopnji poteče aminiranje (nukleofilna substitucija) ter v drugi intramolekularna ciklizacija (Slika 21). V nasprotju z anilini pa sistem najprej ciklizira, šele v drugi stopnji pa poteče N-arilacija.



Slika 21: Mehanizem tandem reakcije v primeru reakcije z alkilaminom- 1. nukleofilna aromatska substitucija in 2. intramolekularna ciklizacija.

Pri reakcijah z alkilamini prednostno poteče nukleofilna substitucija, saj je alkilamin boljši nukleofil kot amino skupina alkinilpirimidina. V primeru anilina sta si amino skupini glede nukleofilnosti precej podobni, amino skupina alkinilpirimidina je celo manj reaktivna in tako termodinamsko hitreje reagira. Tako reakcije z anilini stremijo k intramolekularni ciklizaciji, zato je mehanizem reakcije ravno obraten.

Nukleofilna substitucija prednostno poteče na C-6 mestu pirimidinskega obroča in ne na C-4 mestu fenilnega obroča, saj je v nasprotju s pirimidinom fenilni obroč bogat z elektrofilni (vsi ogljikovi atomi so bogati z elektrofilni) in zato ni naklonjen nukleofilni substituciji. Pirimidin ima zmanjšano gostoto π elektronov, tako je na ogljikovih atomih zmanjšana elektronska gostota in so tako naklonjeni nukleofilnim substitucijam.

V prvih poskusih izvedbe celotne sinteze smo sprva pripravili 6-kloropirimidin-4-amin ter s potekom sinteze nadaljevali z le-tem. Ustavilo se je pri 4. stopnji, saj do intramolekularne

ciklizacije ni prišlo, ker je amino skupina prešibek nukleofil. Tako smo se na podlagi te ugotovitve odločili poskusiti pripraviti 6-kloro-N-metilpirimidin-4-amin po že prej opisanem poteku. Metilamino skupina je tako boljši nukleofil za napad na trojno vez in ciklizacija poteče brez problema.

6 SKLEP

V sklopu te magistrske naloge smo uspeli sintetizirati 20 novih 4-amino-6-arilpirolo[2,3-*d*]pirimidinov, ki so potencialni zaviralci proteina KRAS. Razvili smo učinkovito »one-pot« sintezo 4-alkilamino- ali 4-arilaminopirolopirimidinov iz alkinilpirimidinov, ki smo jih prej pripravili s trostopenjsko sintezo iz 4,6-dikloropirimidina. Ugotovili smo, da reakcija ne poteče samo v primeru 4-metoksi- in 4-metilanilina, saj zaradi destabilizacije sistema do nukleofilne aromatske substitucije ne pride.

Dosegli smo zastavljen cilj optimizacije prej preverjene sinteze v naši delovni skupini. Optimizacija sinteze je bila možna brez uporabe katalizatorja. Uporaba mikrovalov je opazno zmanjšala reakcijske čase, zvišala izkoristke reakcij ter precej znižala stroške sinteze (ekonomičnost zaradi učinkovitosti reakcij v odsotnosti katalizatorja). Z enostopenjsko sintezo pirolopirimidinov iz alkilpirimidinov smo dokazali preprost postopek, z blagimi reakcijskimi pogoji, precejšnjo učinkovitostjo reakcije (>87%) ter visoko čistostjo produktov (>99%). Postopek bi bil primeren tudi za razvoj na industrijskem nivoju.

Zanimivo je izpostaviti, da narava amina določa zaporedje korakov sinteze (vpliva na sam mehanizem reakcije): intramolekularno ciklizacijo in nukleofilno aromatsko substitucijo (S_NAr). Pri uporabi alkilaminov reakcija najprej poteka z zamenjavo amina s klorom, nato pa z zapiranjem obroča. To zaporedje dogodkov je pri uporabi anilinov ravno obratno-najprej poteče ciklizacija in šele nato substitucija.

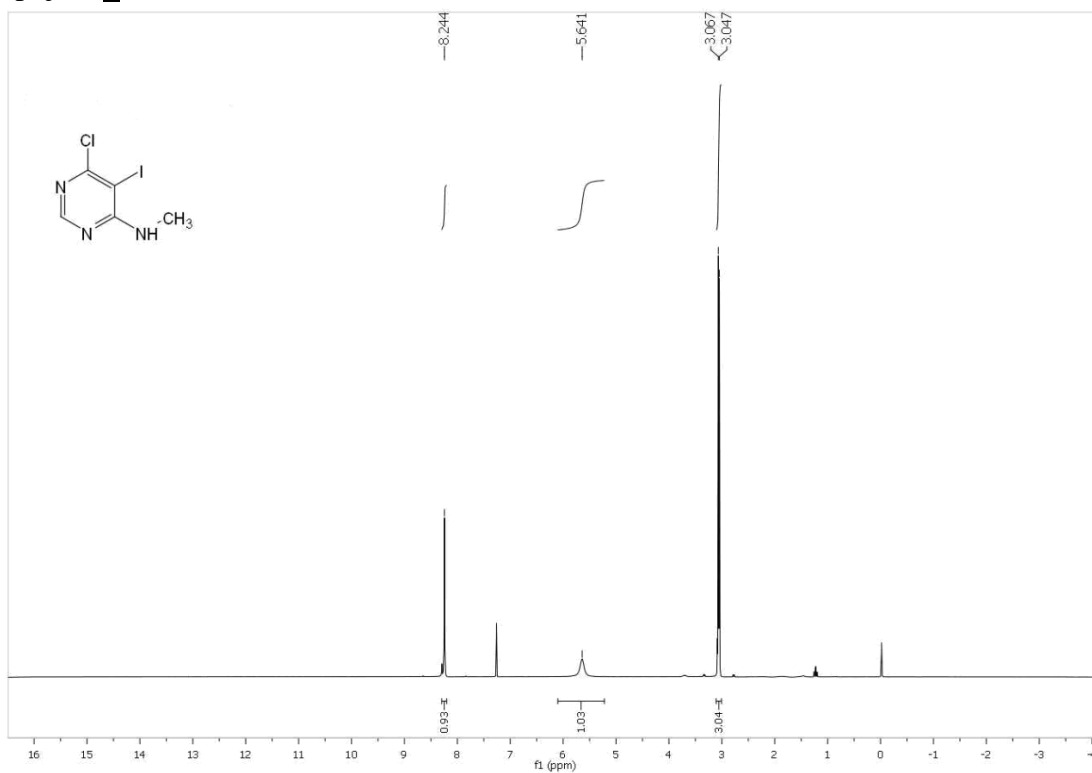
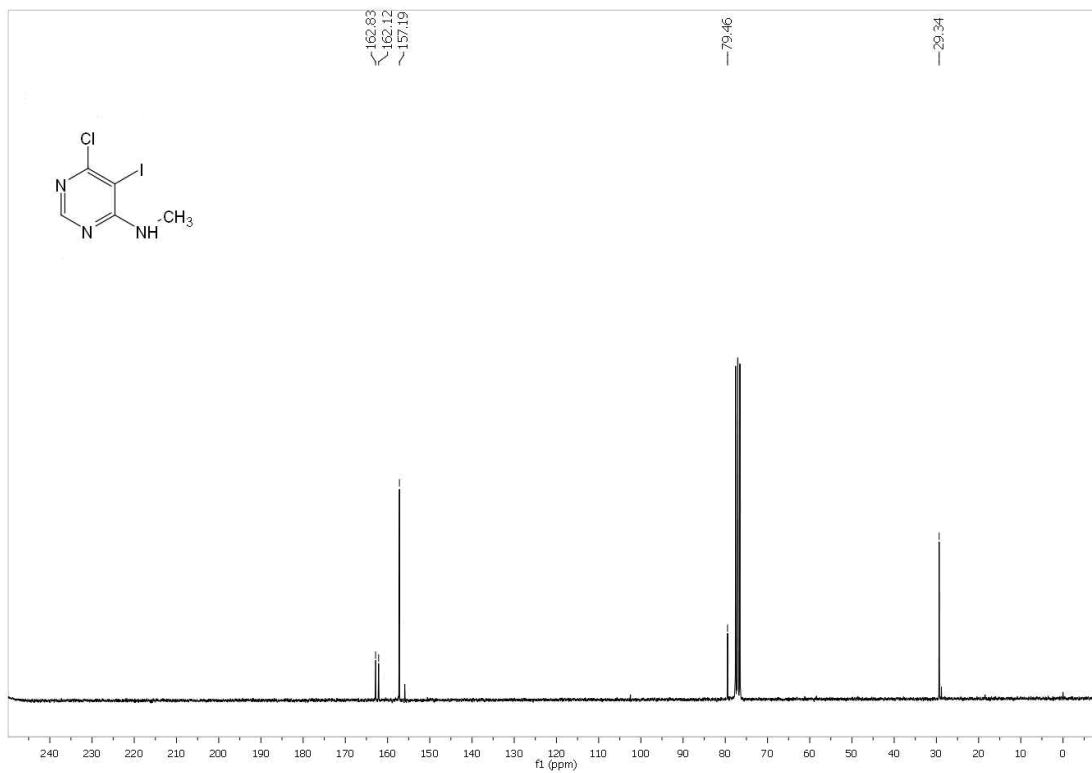
Spojine, pridobljene tekom te magistrske naloge, so lahko tudi izhodišče za naprej. Iz njih bi lahko pripravili različne sečninske derivate, ki bi prav tako lahko bile nove učinkovine pri zdravljenju raka.

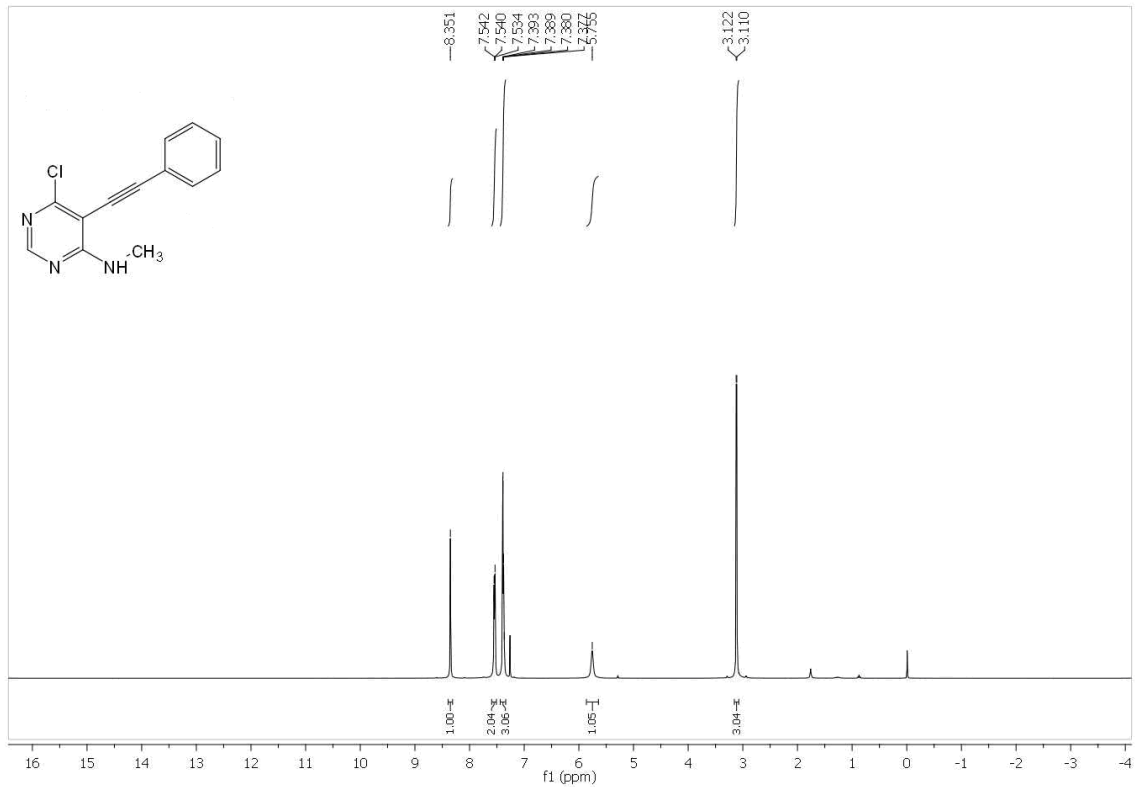
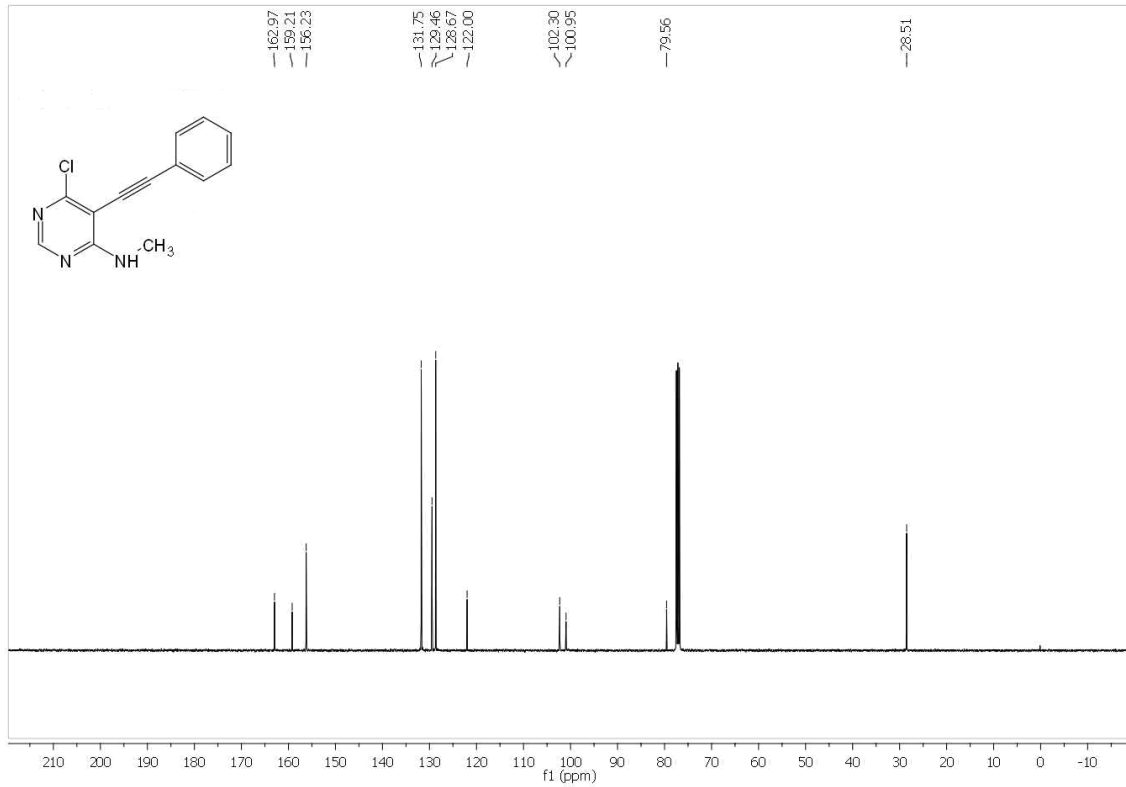
7 VIRI

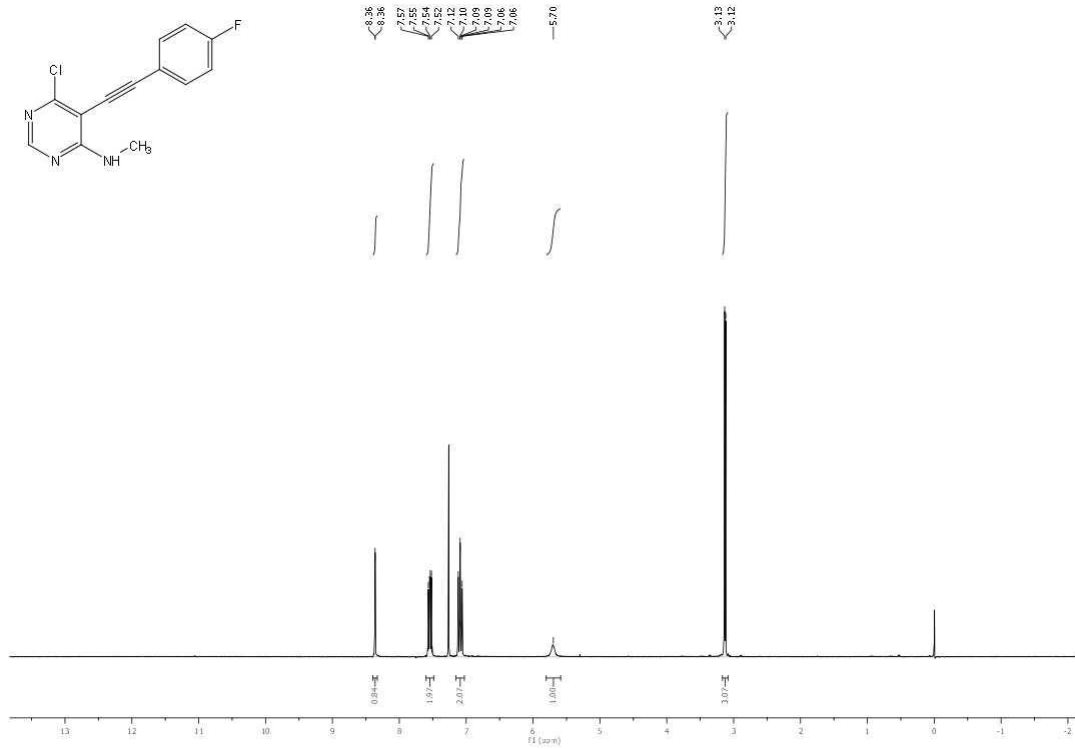
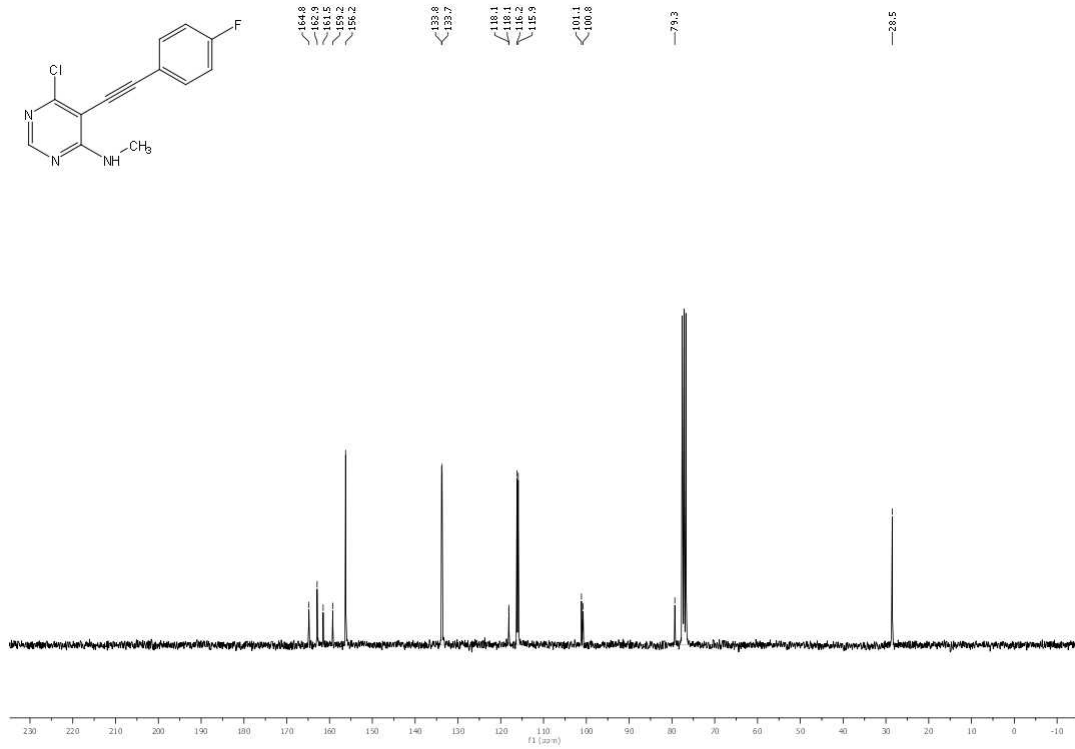
1. Novaković, S. et al. Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Mladinska knjiga, 2009: 24-49.
2. Rak v Sloveniji 2010. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2013. (dostopno na <http://www.onko-i.si/rrs>)
3. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, WHO (Citirano februar 2014)
4. Weinberg, R. A. The biology of cancer, 2nd ed.; Garland Science, Taylor & Francis group, 2013: 31-66.
5. Heron, M. Deaths: Leading Causes for 2010. *National Vital Statistics Reports* 2013; 62.
6. Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. Cancer statistics 2013. *A Cancer Journal for Clinicians* 2013; 63: 11-30.
7. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6208a8.htm>, Centers for Disease Control and Prevention (Citirano maj 2014)
8. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Murray, T.; Thun, J. M. Cancer statistics 2008. *A Cancer Journal for Clinicians* 2008; 58: 71-96.
9. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, WHO (Citirano februar 2014)
10. Danaei, G.; Hoom, S. V.; Lopez, A. D.; Murray, C. J. L.; Ezzati, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 2005; 366: 1784-93.
11. <http://www.learner.org/courses/biology/units/cancer/index.html>, Rediscovering Biology (Citirano februar 2014)
12. <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>, National Cancer Institute (Citirano februar 2014)
13. Douglas, H.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
14. Douglas, H.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000; 100: 57-70.
15. Albini, A.; Iwamoto, Y.; Kleinman, H. K., et al. A rapid in vitro Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells. *Cancer Research* 1987; 47: 3239-3245.
16. Aznavoorian, S.; Murphy, N. A.; Stetler-Stevenson, G. W.; Liotta, A. L. Molecular Aspects of Tumor Cell Invasion and Metastasis. *Cancer* 1993; 71: 1368-1383.
17. Steeg, P. S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 55-63.
18. Malumbres, M.; Barbacid, M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature reviews cancer* 2001; 1: 222-231.
19. Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 2003; 36: 131-149.
20. Rastogi, N.; Mishra, D. P. Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. *Cell Division* 2012; 7: 26-36.
21. Pines, J. Cyclins and cyclin dependent kinases: A biochemical view. *Biochemical Journal* 1995; 308: 697-711.

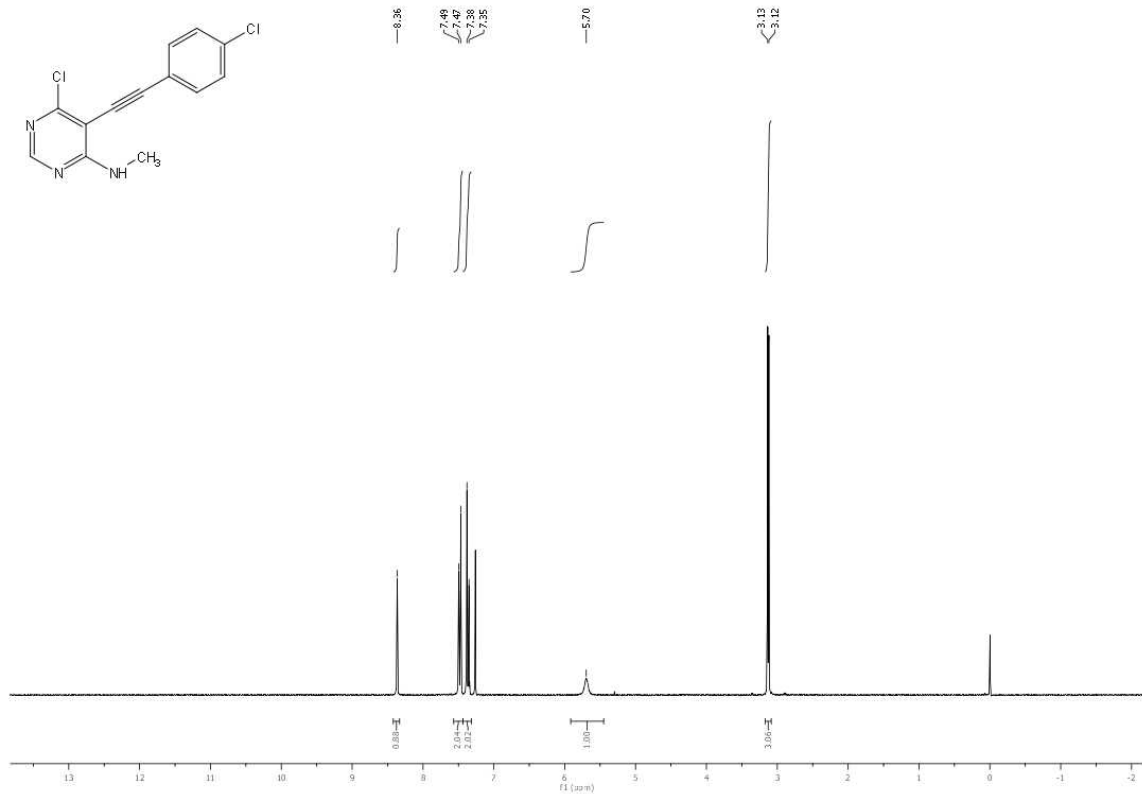
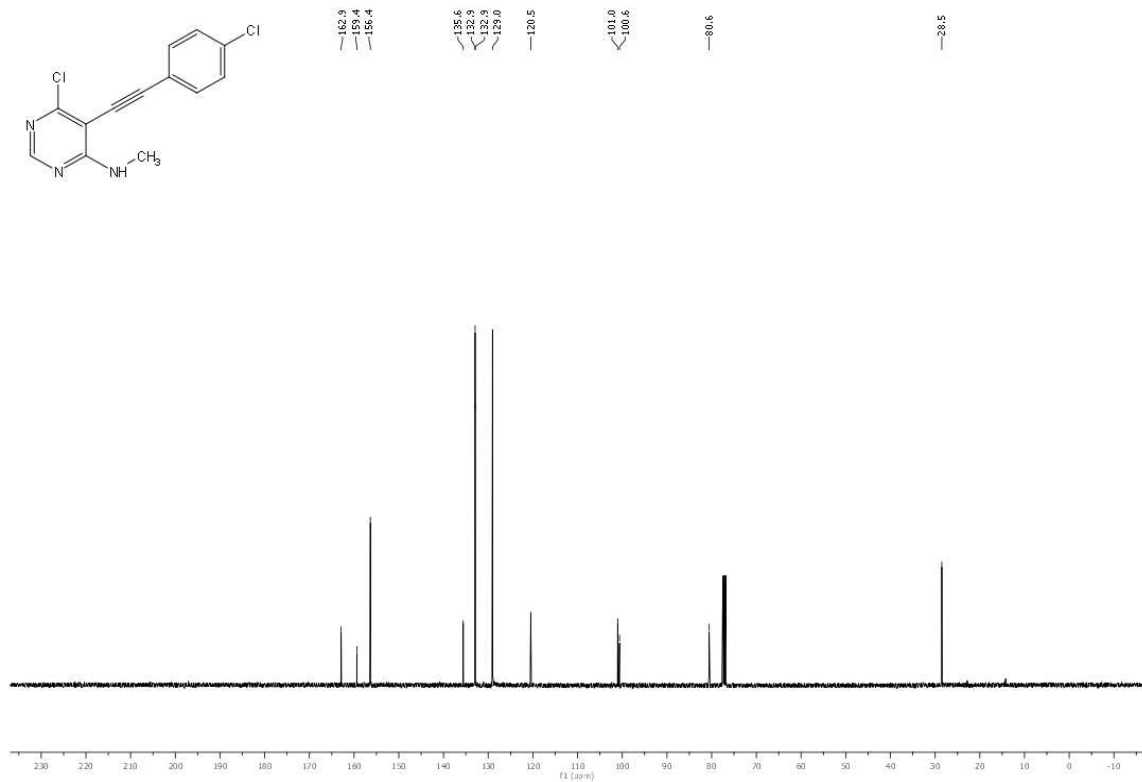
22. Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews cancer* 2009; 9: 153-166.
23. Sherr, J. C. Cancer cell cycle. *Science* 1996; 274: 1671-1677.
24. Weinberg, A. R. The Retinoblastoma Protein and the Cell Cycle Control. *Cell* 1995; 81: 323-330.
25. Massagué, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004; 432: 298-306.
26. Wang, Y.; Kaiser, C. E.; Frett, B.; Li, H. Targeting Mutant KRAS for Anticancer Therapeutics: A Review of Novel Small Molecule Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56: 5219–5230.
27. Friday, B. B.; Adjei, A. A. KRAS as a target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1756: 127– 144.
28. Rajalingam, K.; Schreck, R.; Rapp, U. R.; Alber, Š. RAS oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1773: 1177-1195.
29. Marais, R.; Light, Y.; Paterson, H. F.; Marshall, C. J. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal* 1995; 14: 3136-3145.
30. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 11-22.
31. Benesova, L.; Minarik, M.; Jancarikova, D.; Belsanova, B.; Pesek, M. Multiplicity of *EGFR* and *KRAS* Mutations in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients Treated with Tyrosine Kinase Inhibitors. *Anticancer Research* 2010; 30: 1667-1672.
32. Chang, Y.; Yeh, K.; Hsu, N. C.; Lin, S.; Chang, T.; Chang J. Detection of N-, H-, and KRAS codons 12, 13, and 61 mutations with universal RAS primer multiplex PCR and N-, H-, and KRAS-specific primer extension. *Clinical Biochemistry* 2010; 43: 296–301.
33. Kranenburg, O. The KRAS oncogene: Past, present, and future. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1756: 81-82.
34. Pylayeva-Gupta, Y.; Grabocka, E.; Bar-Sagi, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature reviews cancer* 2011; 11: 761-774.
35. Castagnola, P.; Giaretti, W. Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1756: 115-125.
36. Lievre, A.; Bachet, J. B.; Le Corre, D. et al. KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Research* 2006; 66: 3992-3995.
37. Baker, N. M.; Der, C. J. Drug for an 'undruggable' protein. *Nature* 2013; 497: 577-578.
38. Obreza, A. Sintezne zdravilne učinkovine v onkologiji. *Farmacevtski vestnik* 2009; 60: 48-60.
39. Airley, R. Cancer Chemotherapy: Basic Science to the Clinic. Wiley-Blackwell, 2009: 55-116.
40. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/>, American Cancer Society (Citirano februar 2014)
41. Vanneman, M.; Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature reviews Cancer* 2012; 12: 237-251.
42. Blattman, J. N.; Greenberg, P. D. Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. *Science* 2004; 305: 200-205.
43. Kočevár, N.; Čemažar, M.; Serša, G. Gensko zdravljenje raka. *Farmacevtski vestnik* 2010; 61: 14-22.
44. Cooper, G. M.; Hausman, R. E. The Cell- A Molecular Approach, 4th ed.; ASM Press, 2007: 756-761.

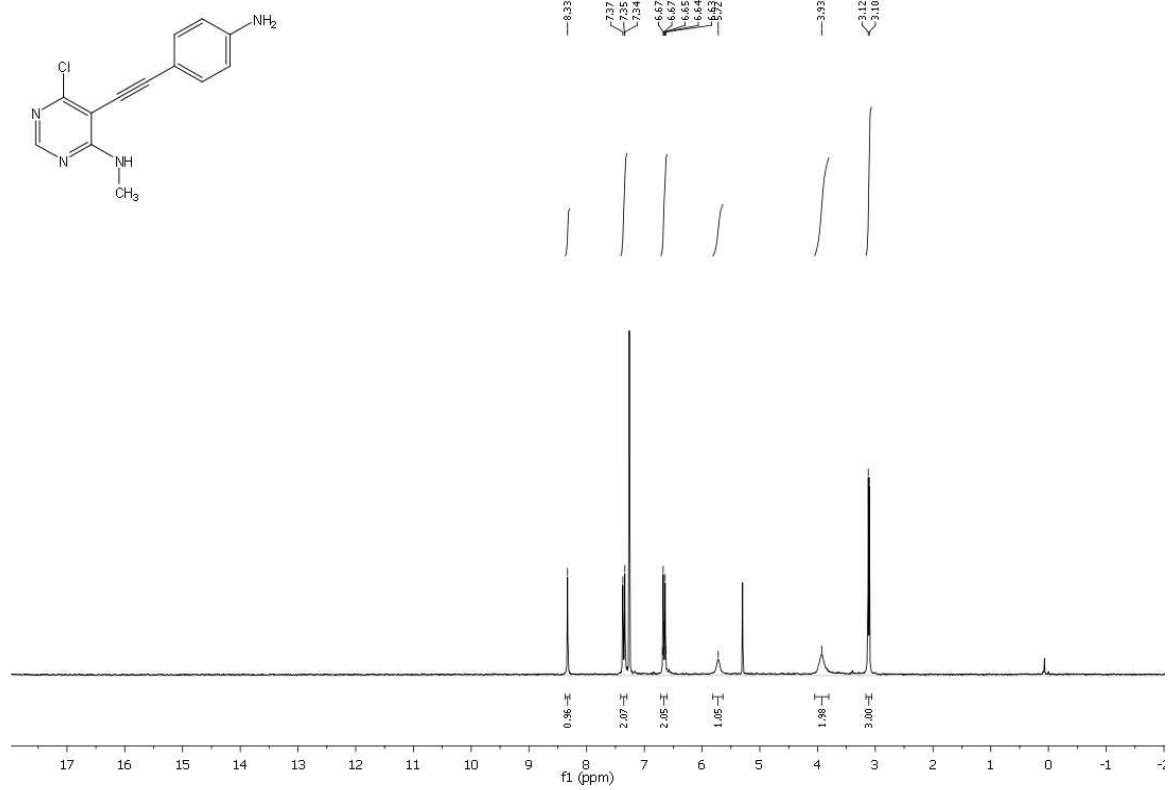
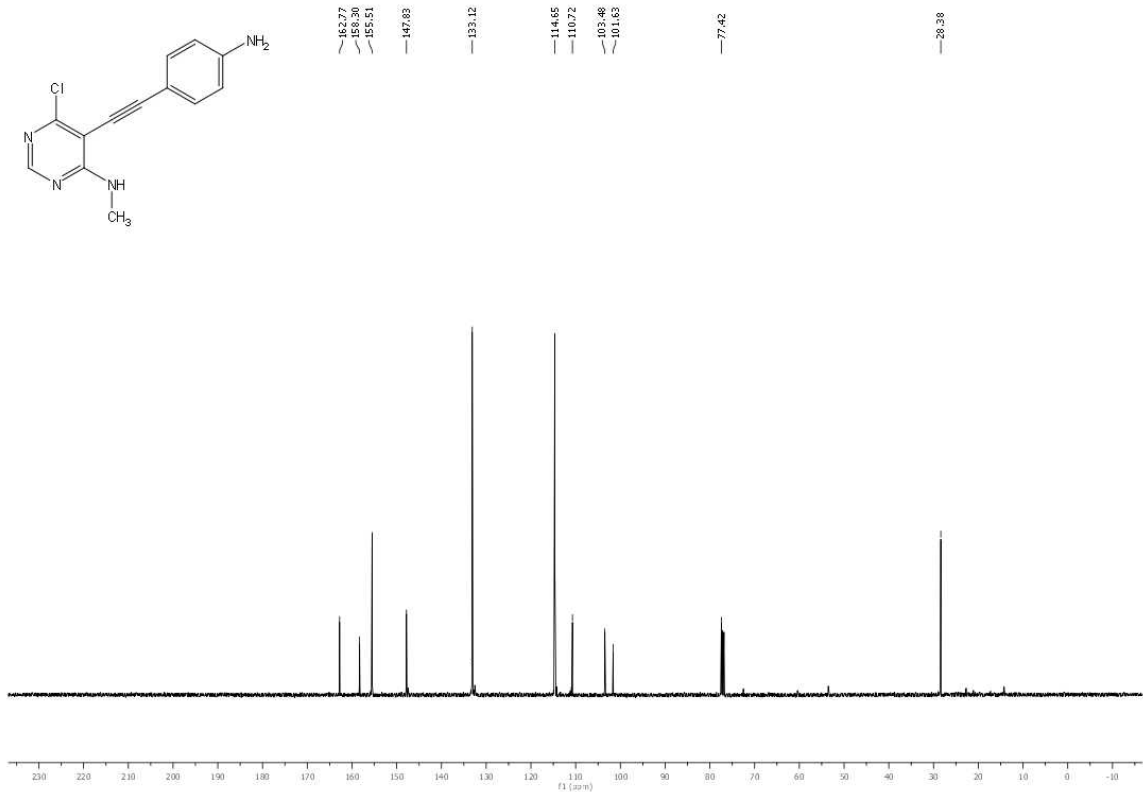
45. Prieur, V.; Rubio-Martínez, J.; Font-Bardia, M.; Guillaumet, G.; Dolors Pujol, M. Microwave-Assisted Synthesis of Substituted Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines. *European Journal of Organic Chemistry* 2014, 7: 1514–1524.
46. Ding, S.; Wu, T. Y. H.; Brinker, A.; Peters, E. C.; Hur, W.; Gray, N. S.; Schultz, P. G. Synthetic small molecules that control stem cell fate. *PNAS* 2003; 100: 7632-7637.
47. Mohamed, M. S.; El-domany, R. A.; Abd El-Hameed, R. H. Synthesis of certain pyrrole derivatives as antimicrobial agents. *Acta Pharmaceutica* 2009; 59: 145–158.
48. Dudhe, R.; Sharma, P. K.; Verma, P.; Chaudhary, A. Pyrimidine As Anticancer Agent: A Review. *Journal of Advanced Research* 2011, 2: 10-17.
49. Gangjee, A.; Zhao, Y.; Raghavan, S.; Ihnat, M. A.; Disch, B. C. Design, synthesis and evaluation of 2-amino-4-mbromoanilino-6-arylmethyl-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines as tyrosine kinase inhibitors and antiangiogenic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010; 18: 5261–5273.
50. Gangjee, A.; Kurup, S.; Ihnat, M. A.; Thorpe, J. E.; Disch, B. *N*⁴-aryl-6 substitutedphenylmethyl-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-2,4-diamines as receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2012; 20: 910–914.
51. Tumkevicius, S.; Dodonova, J. Functionalization of pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine by palladium-catalyzed cross-coupling reactions. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 2012; 48(2):258-279.
52. Kopecky, J. et al. Synthesis and optimization of substituted furo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amines and 7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amines as ACK1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012; 22: 6212–6217.
53. Carpita, A.; Ribecai, A.; Stabile, P. Microwave-assisted synthesis of indole- and azaindole-derivatives in water via cycloisomerization of 2-alkynylanilines and alkynylpyridinamines promoted by amines or catalytic amounts of neutral or basic salts. *Tetrahedron* 2010; 66: 7169-7178.
54. Mayasundari, A.; Fujii, N. Efficient formation of 4,6-disubstituted pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines: a novel route to TWS119, a glycogen synthase kinase-3b inhibitor. *Tetrahedron Letters* 2010; 51: 3597–3598.
55. Chinchilla, R.; Nájera, C. The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chemical Reviews* 2007; 107: 874-922.
56. Elangovan, A.; Wang, Y.; Ho, T. Sonogashira Coupling Reaction with Diminished Homocoupling. *Organic Letters* 2003; 5: 1841-1844.

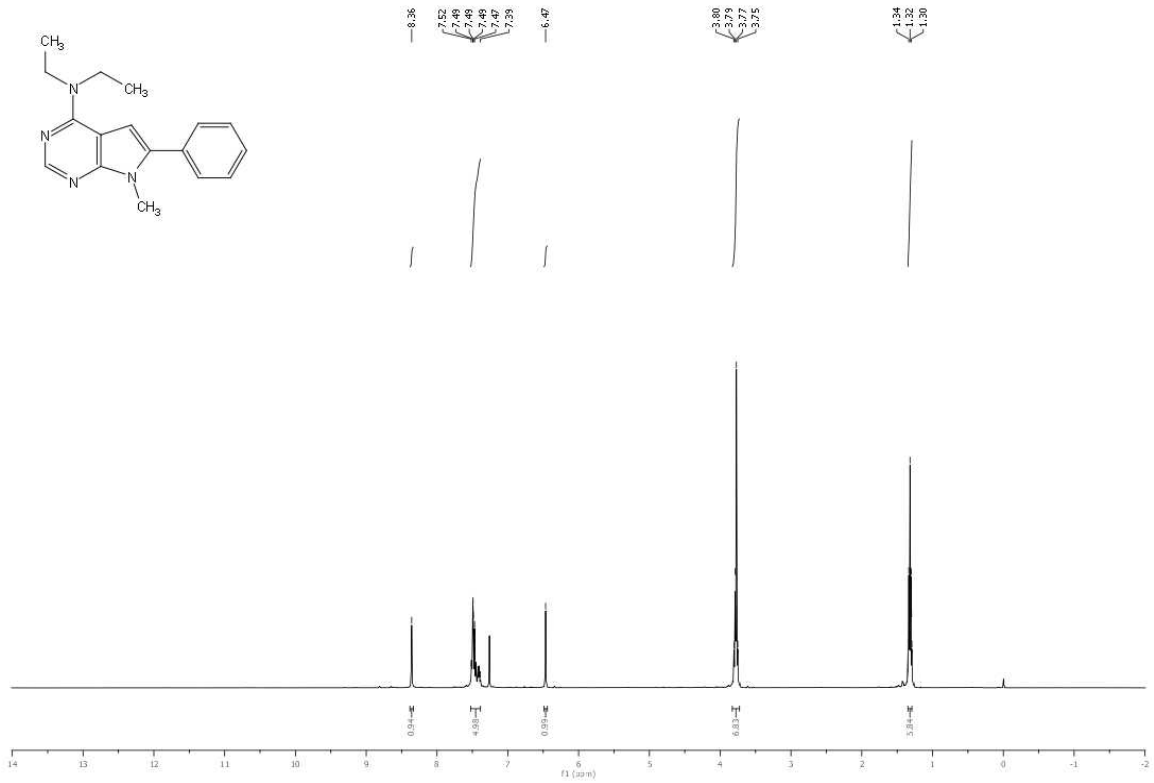
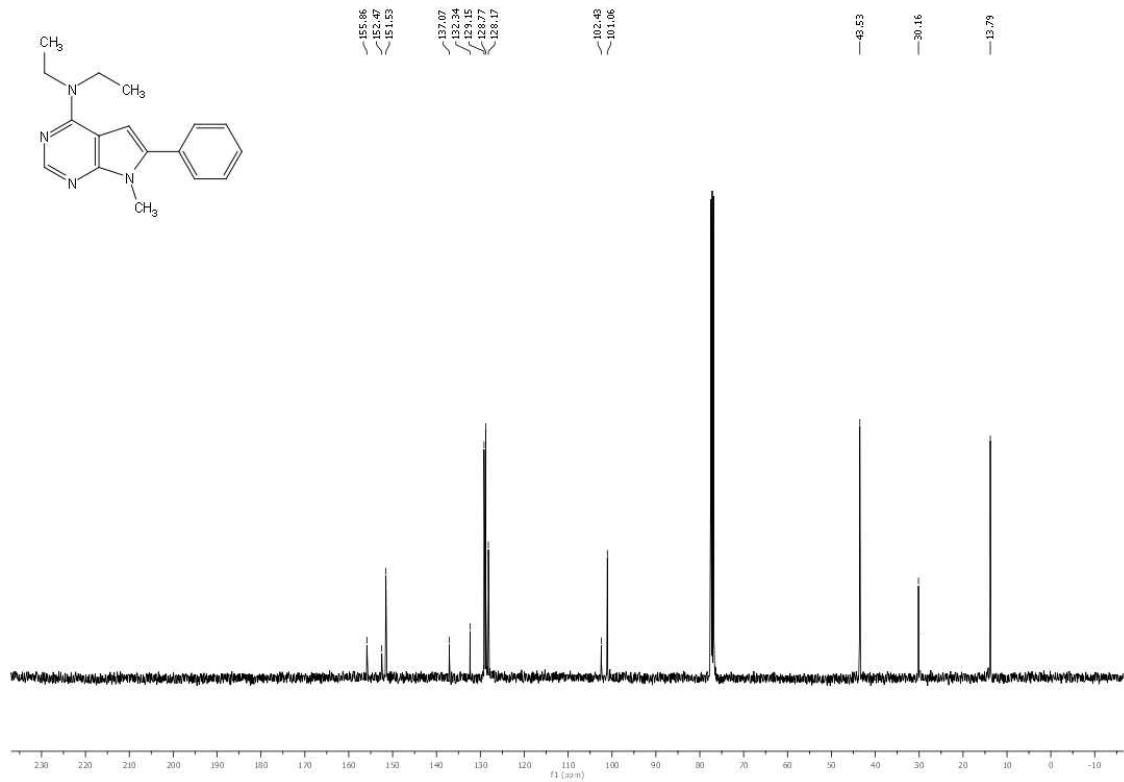
PRILOGASpojina **2**: ^1H NMR, CDCl_3 , 250 MHzSpojina **2**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 63 MHz

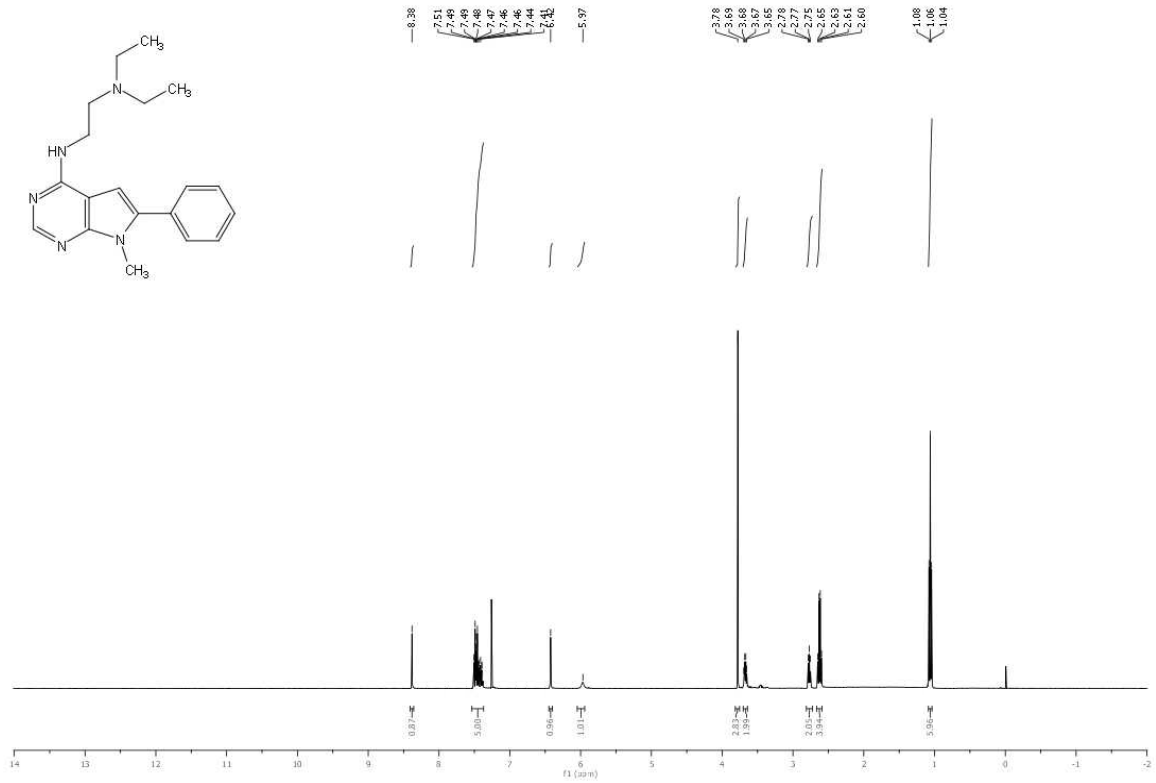
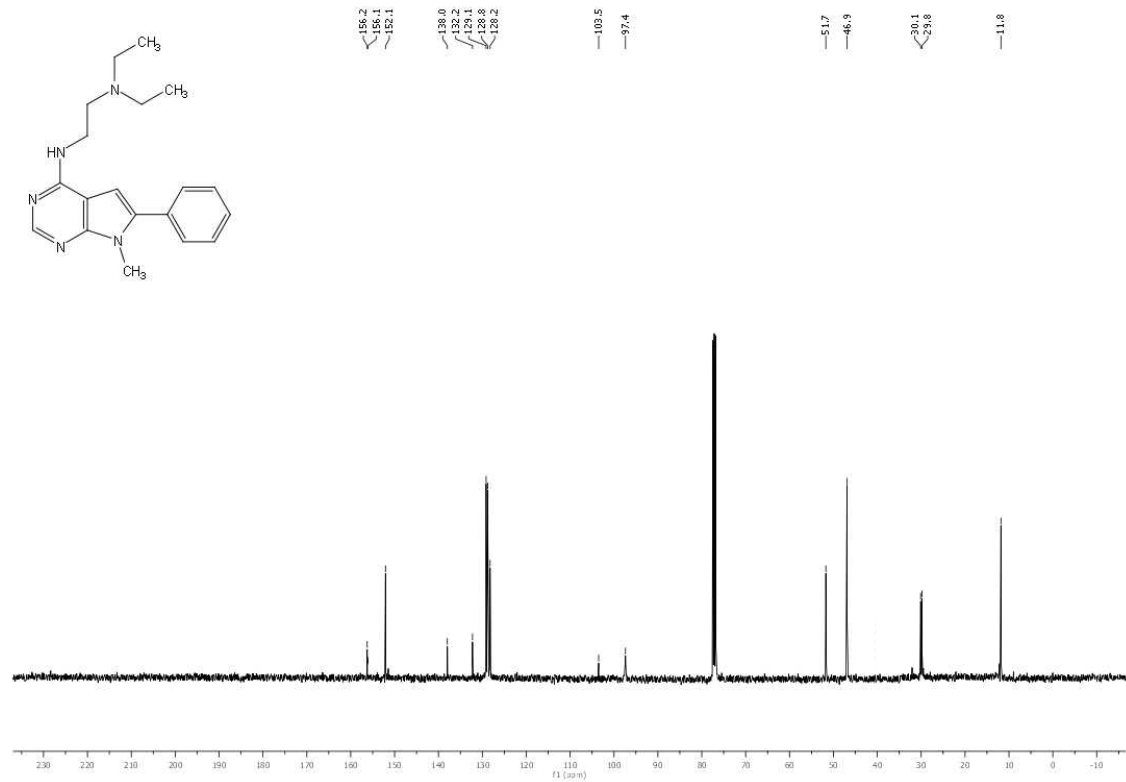
Spojina **3**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **3**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

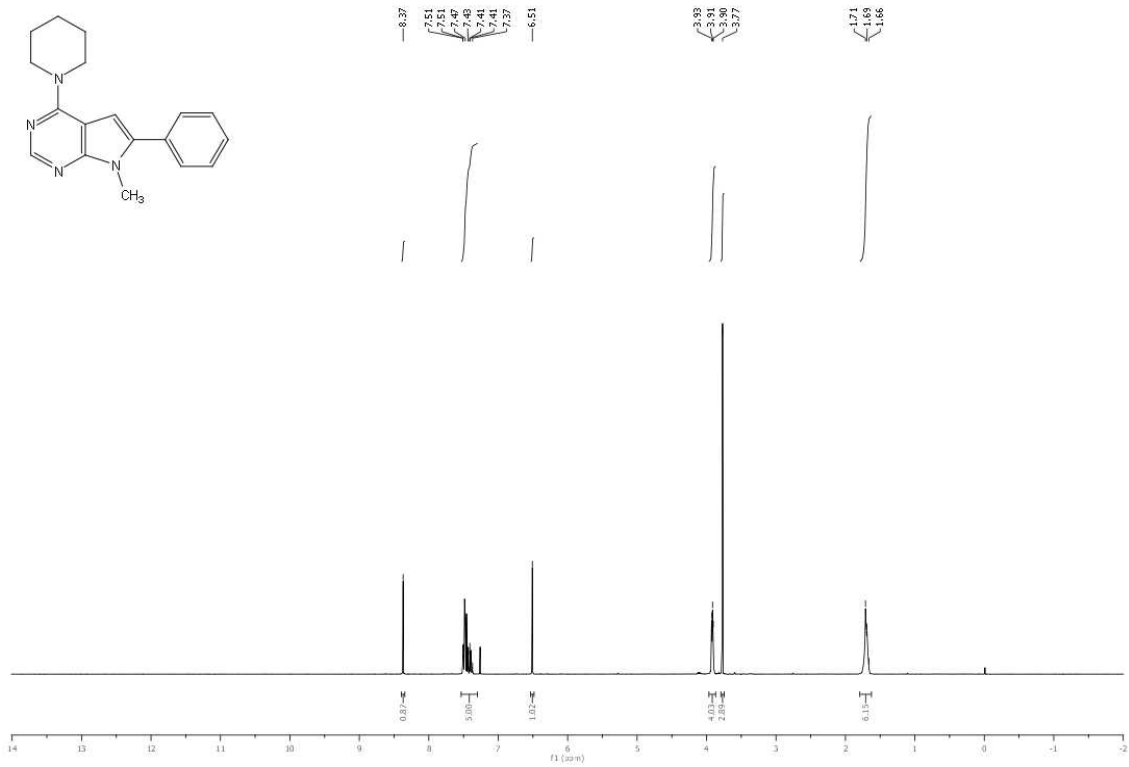
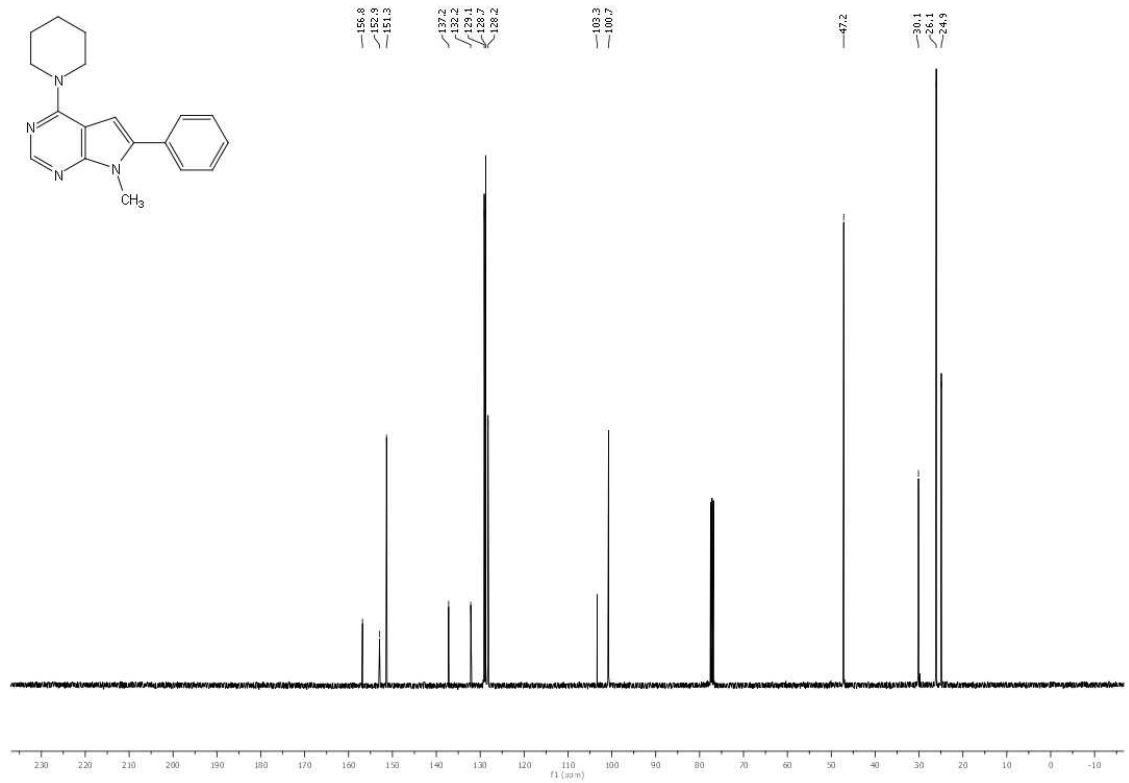
Spojina **4**: ^1H NMR, CDCl_3 , 300 MHzSpojina **4**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 75 MHz

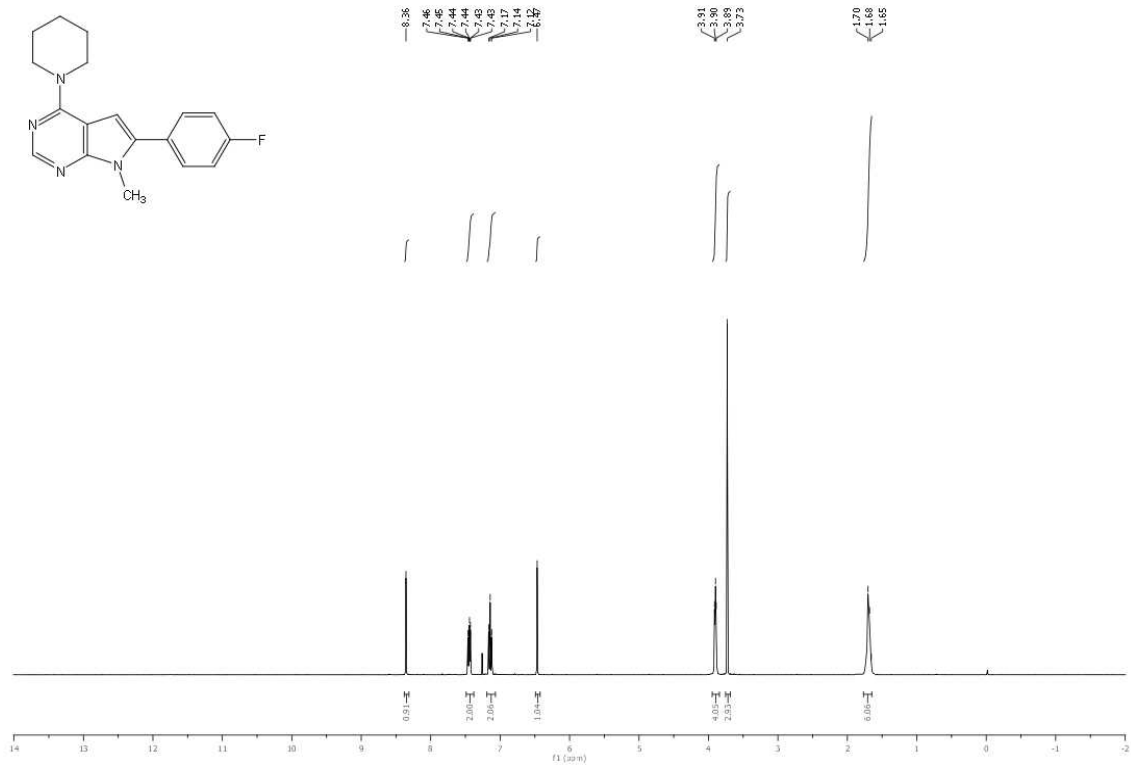
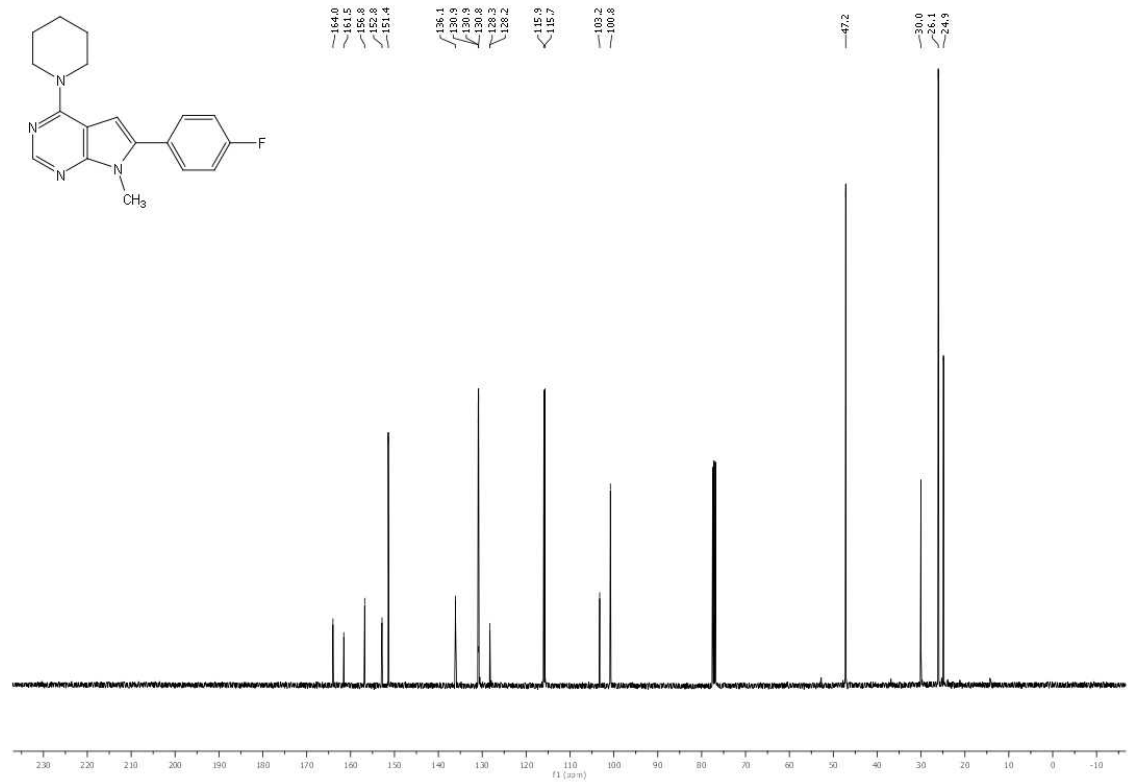
Spojina **5**: ^1H NMR, CDCl_3 , 300 MHzSpojina **5**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

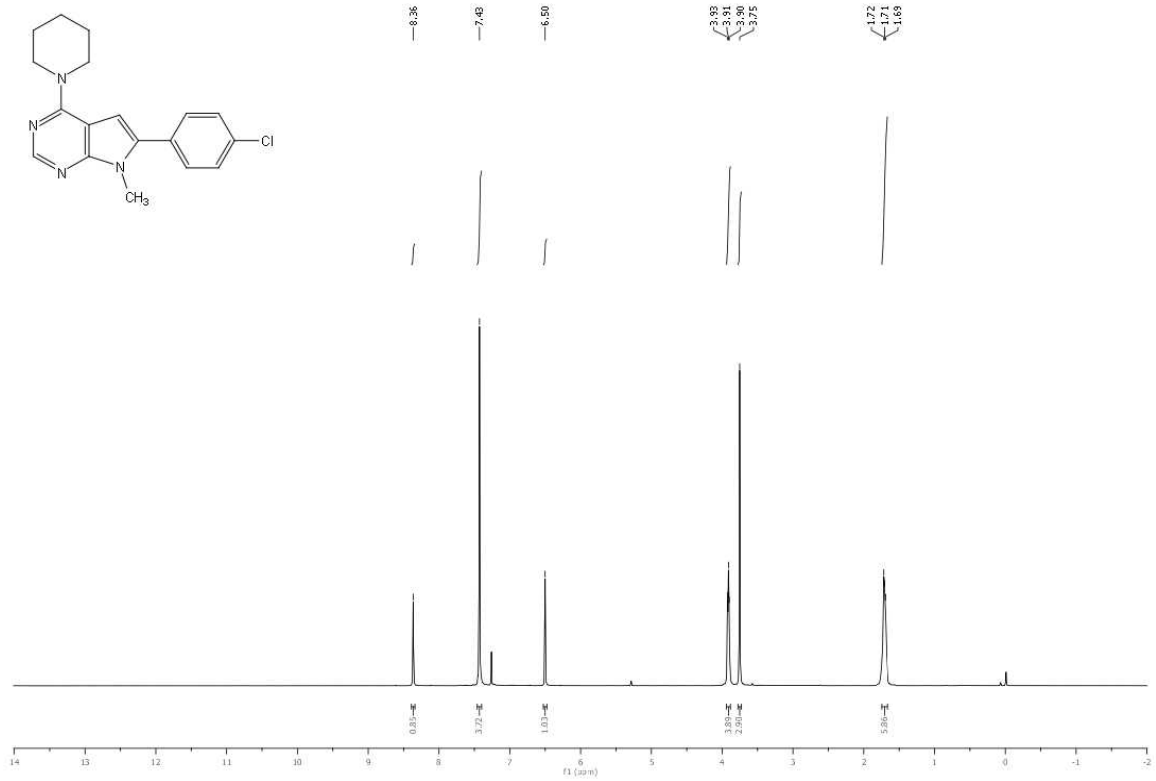
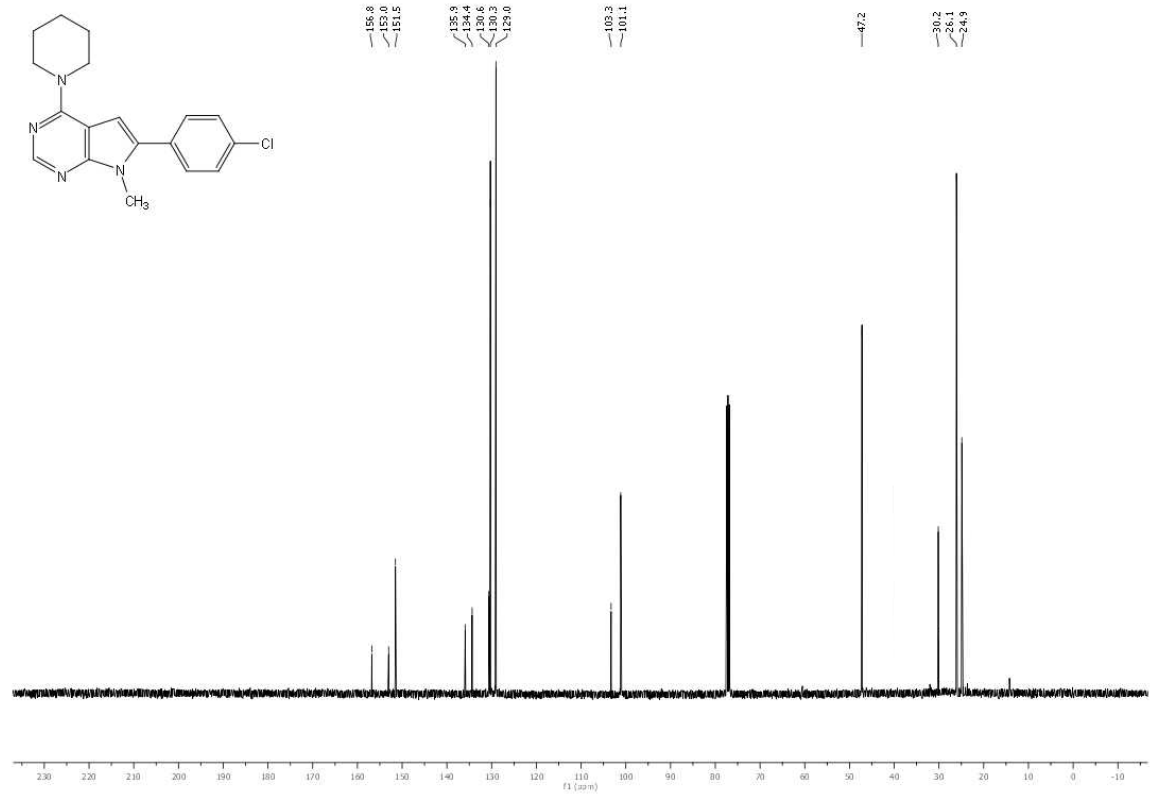
Spojina **6**: ^1H NMR, CDCl_3 , 250 MHzSpojina **6**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

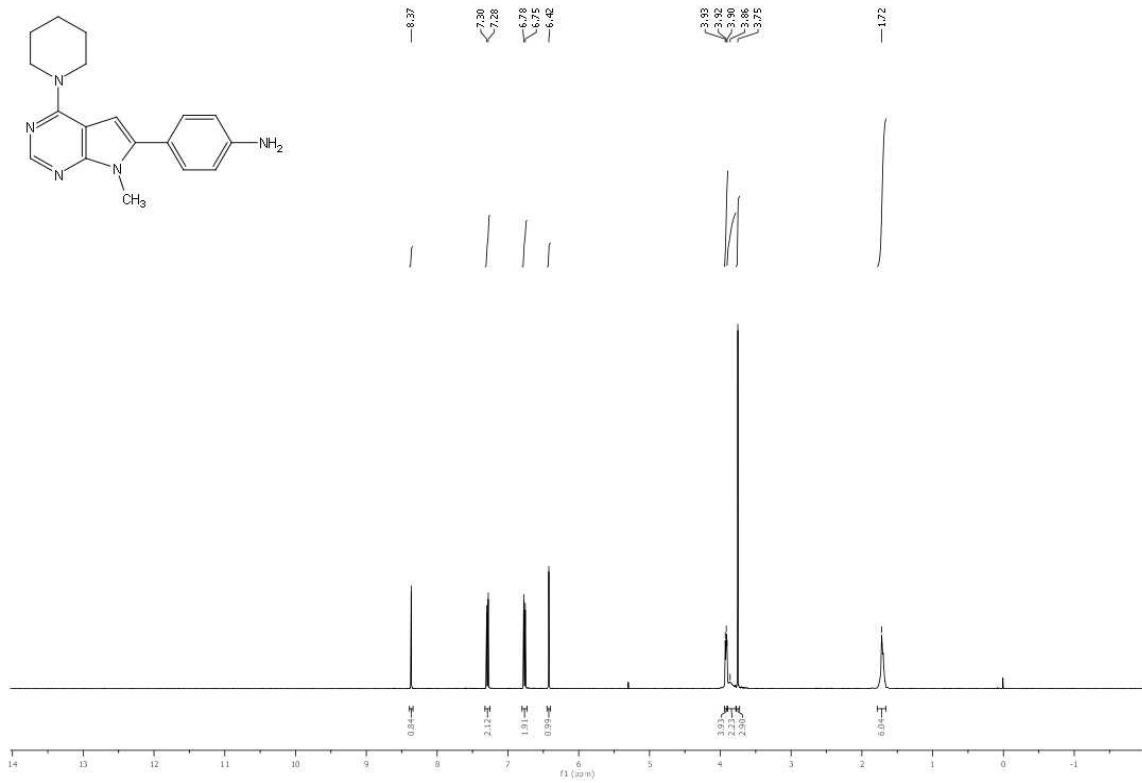
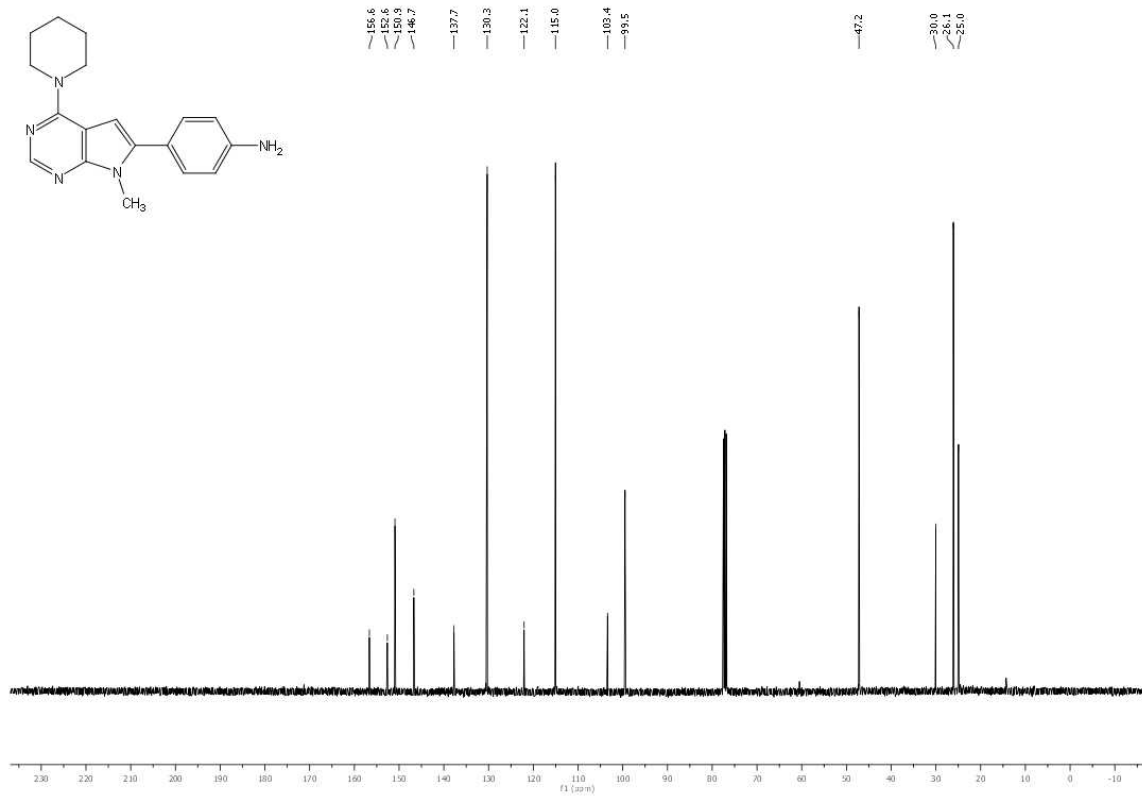
Spojina **7**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **7**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

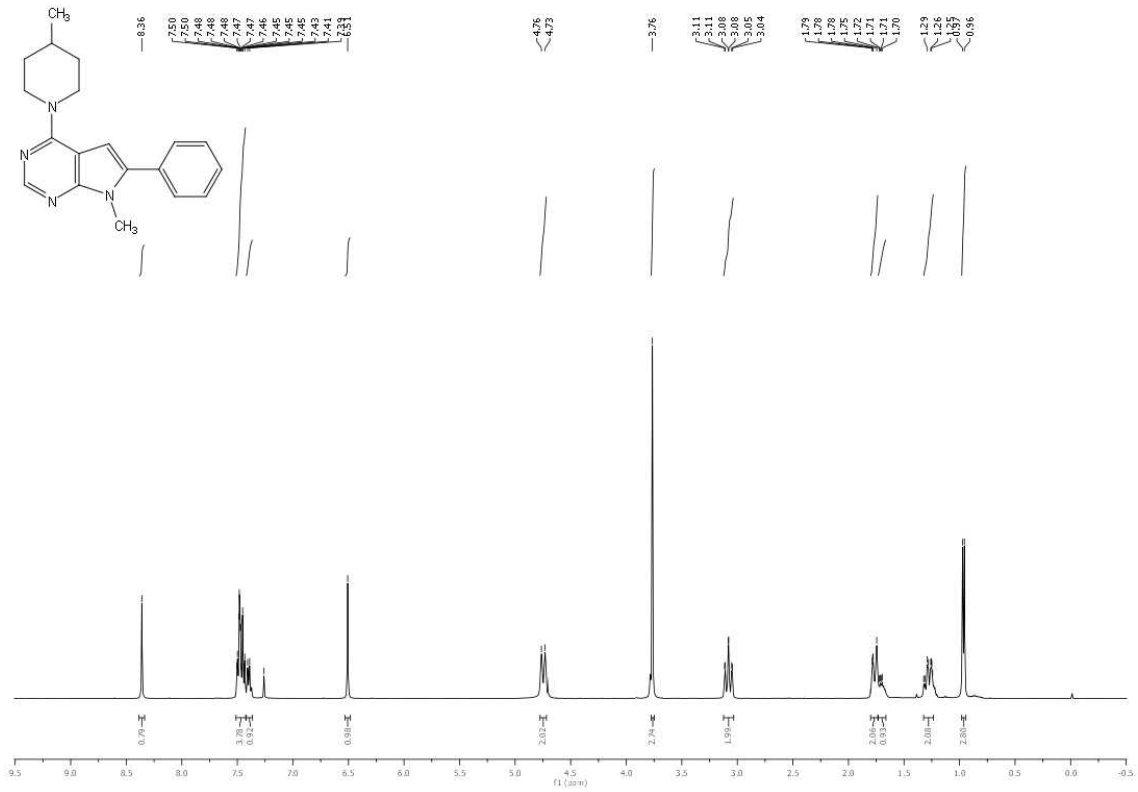
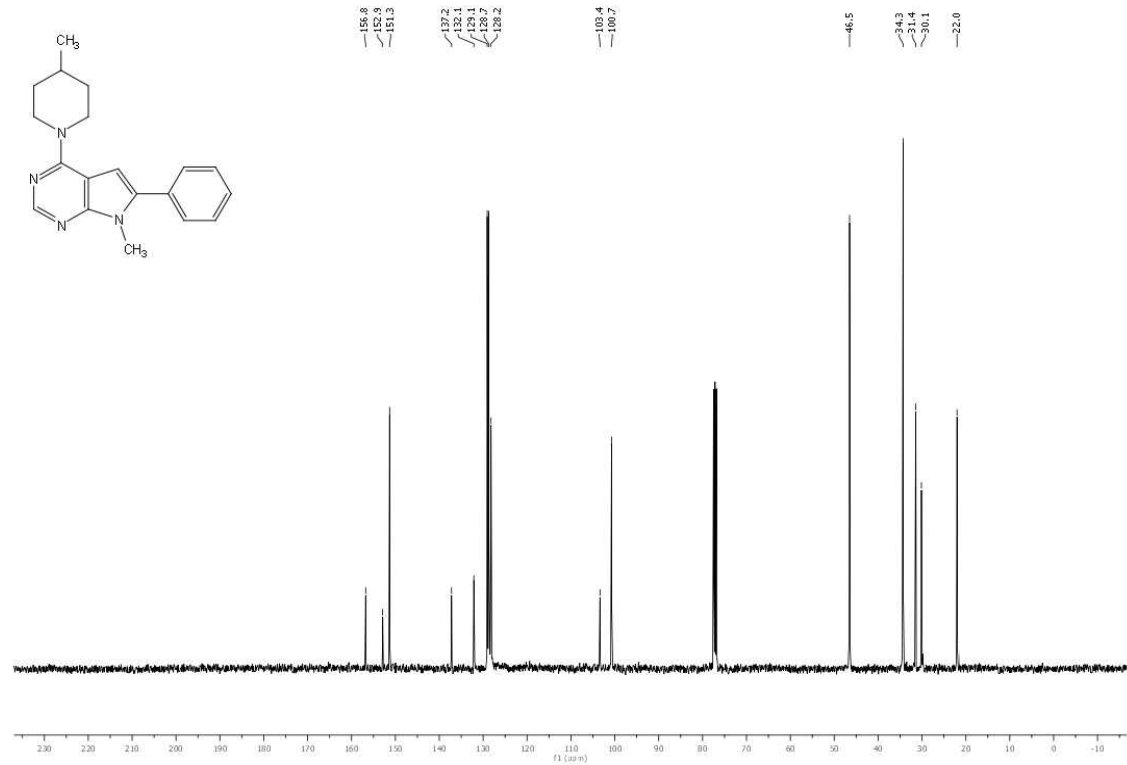
Spojina **8**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **8**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

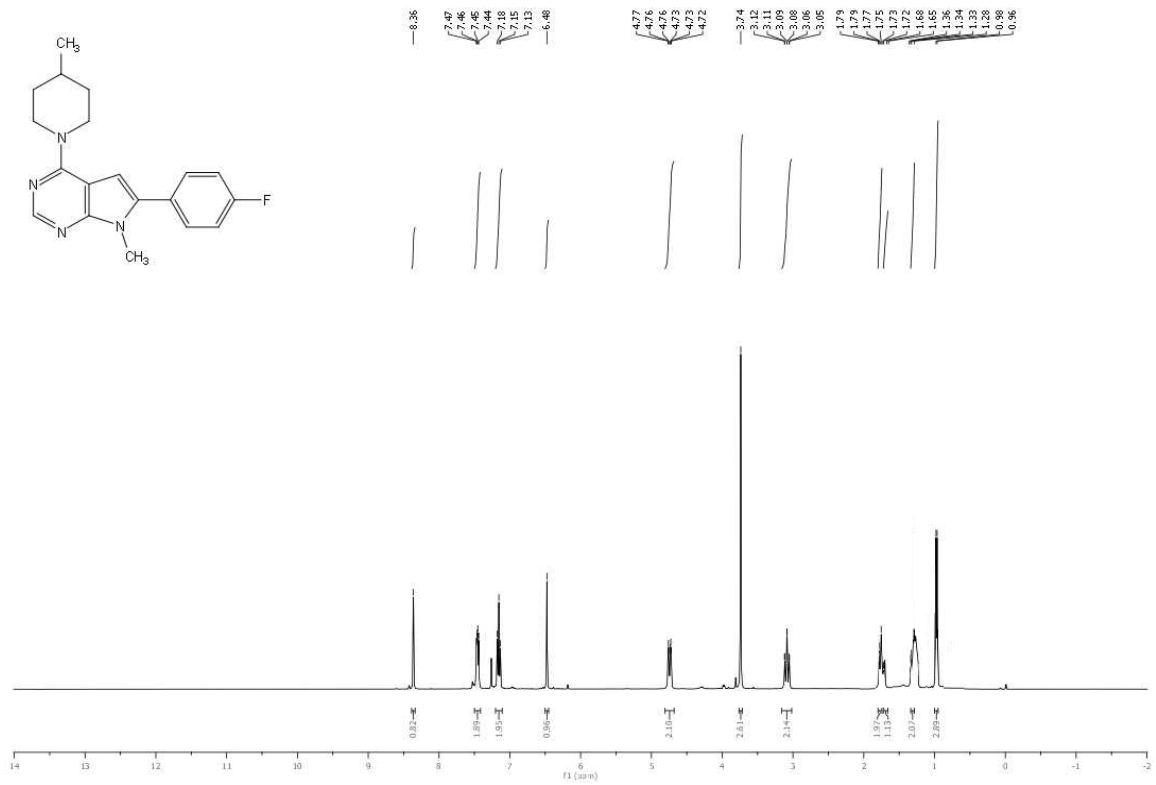
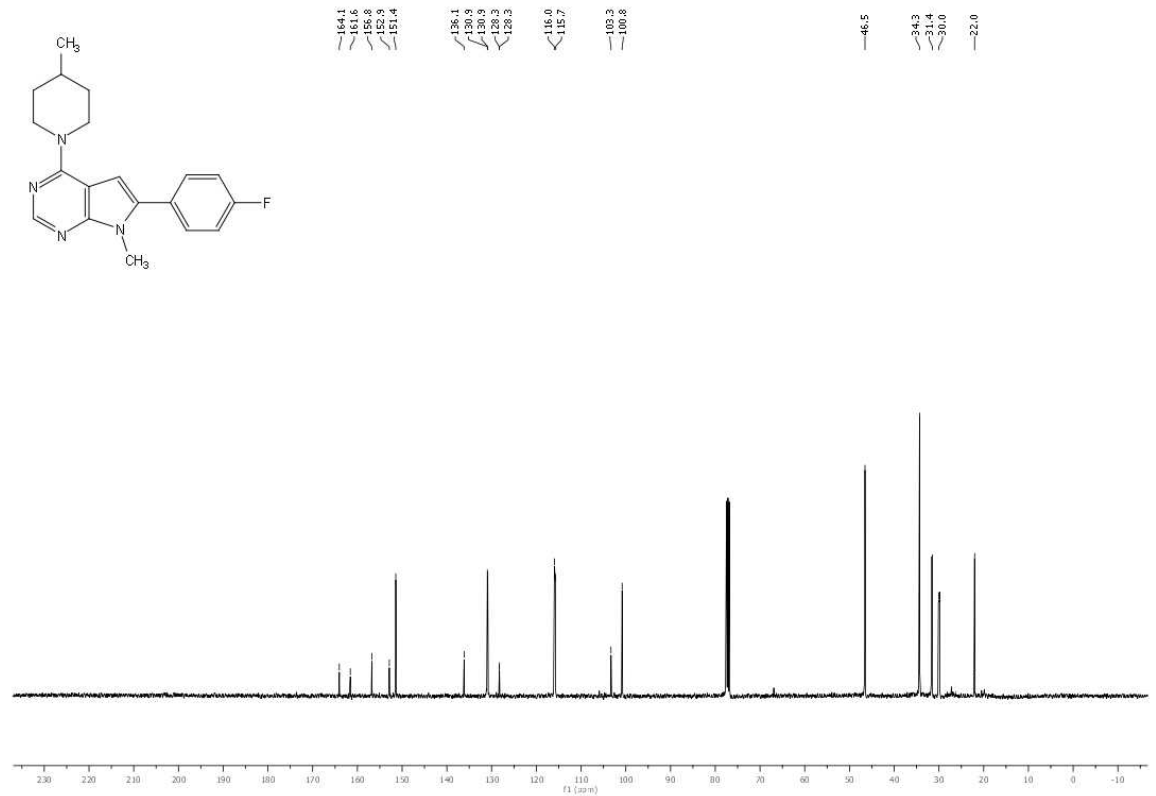
Spojina **9**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **9**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

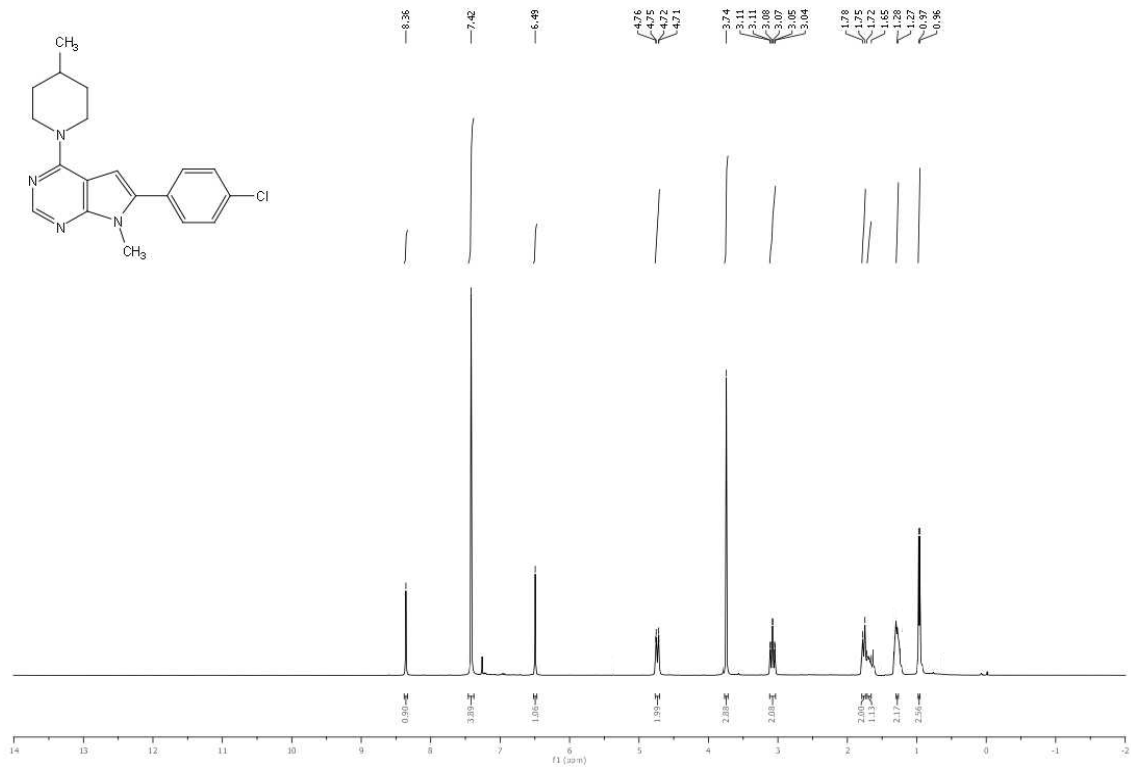
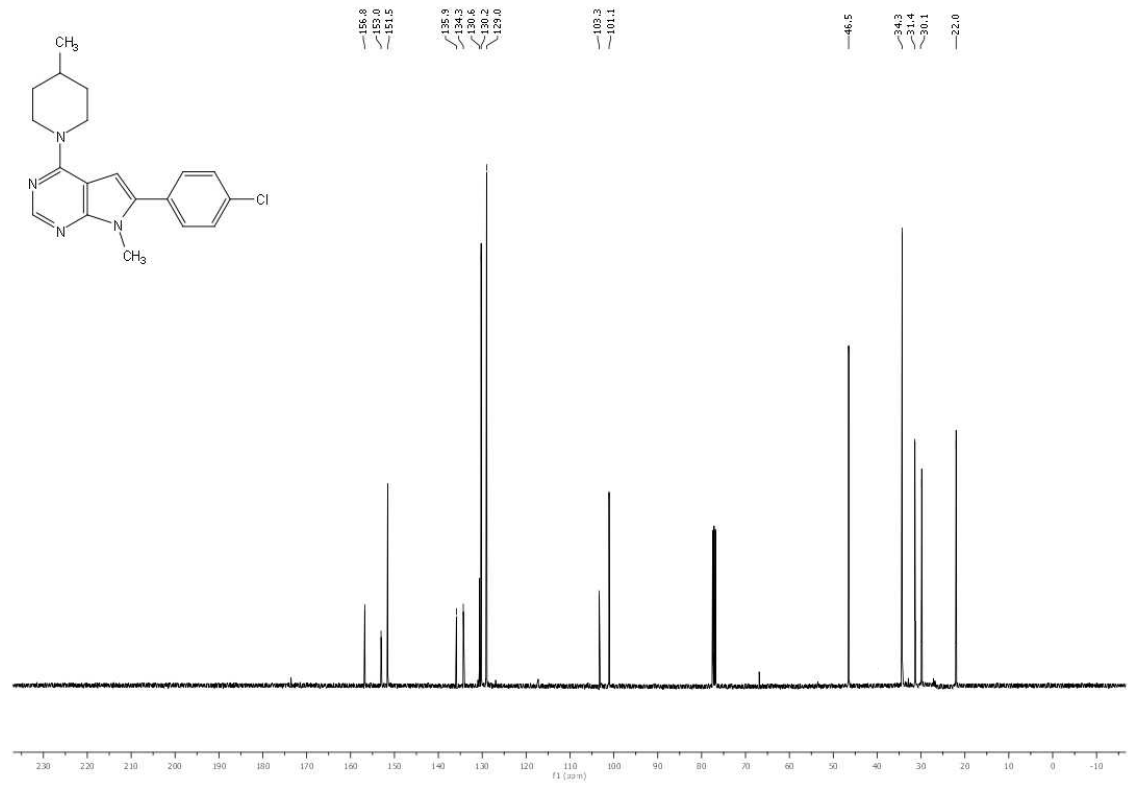
Spojina **10**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **10**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

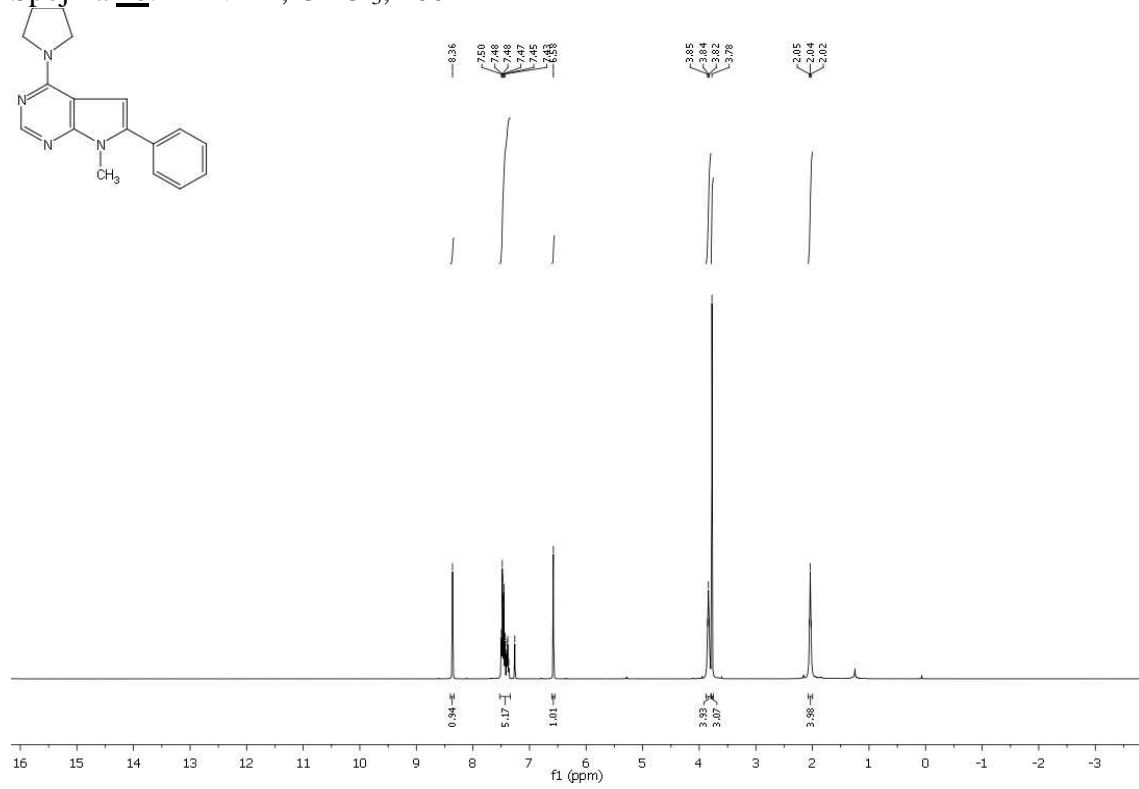
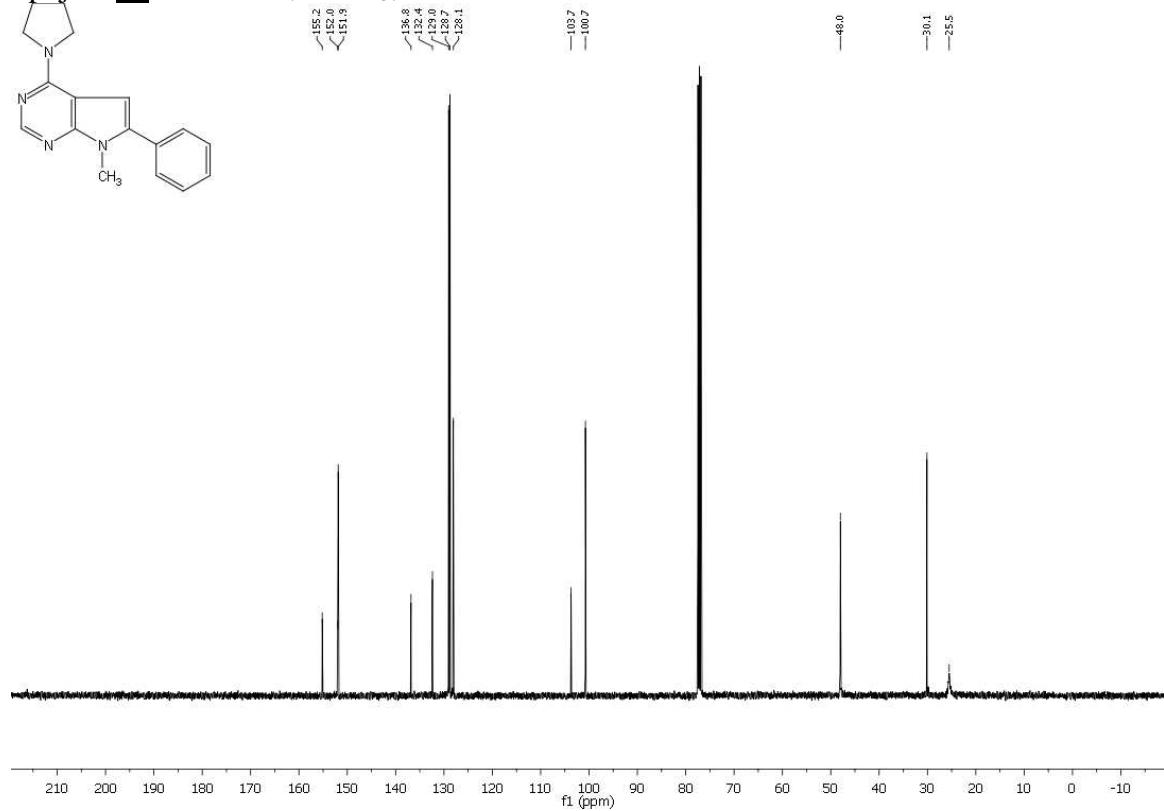
Spojina **11**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **11**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

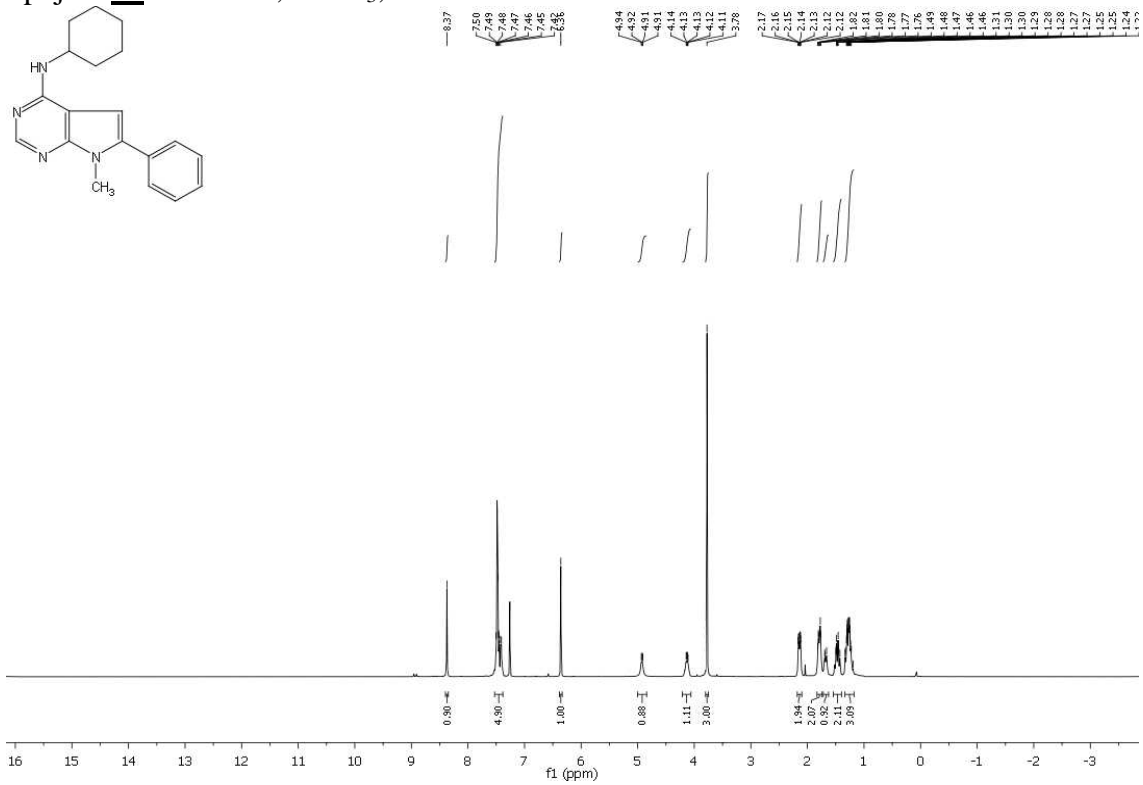
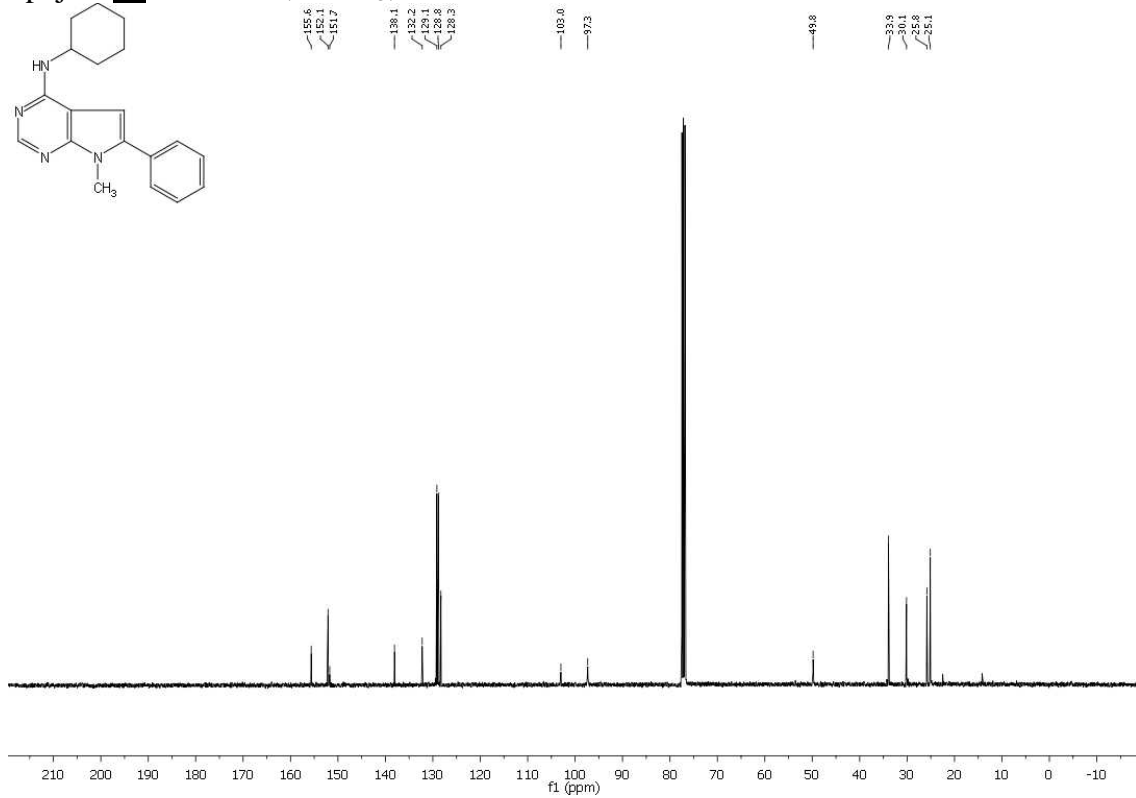
Spojina **12**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **12**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

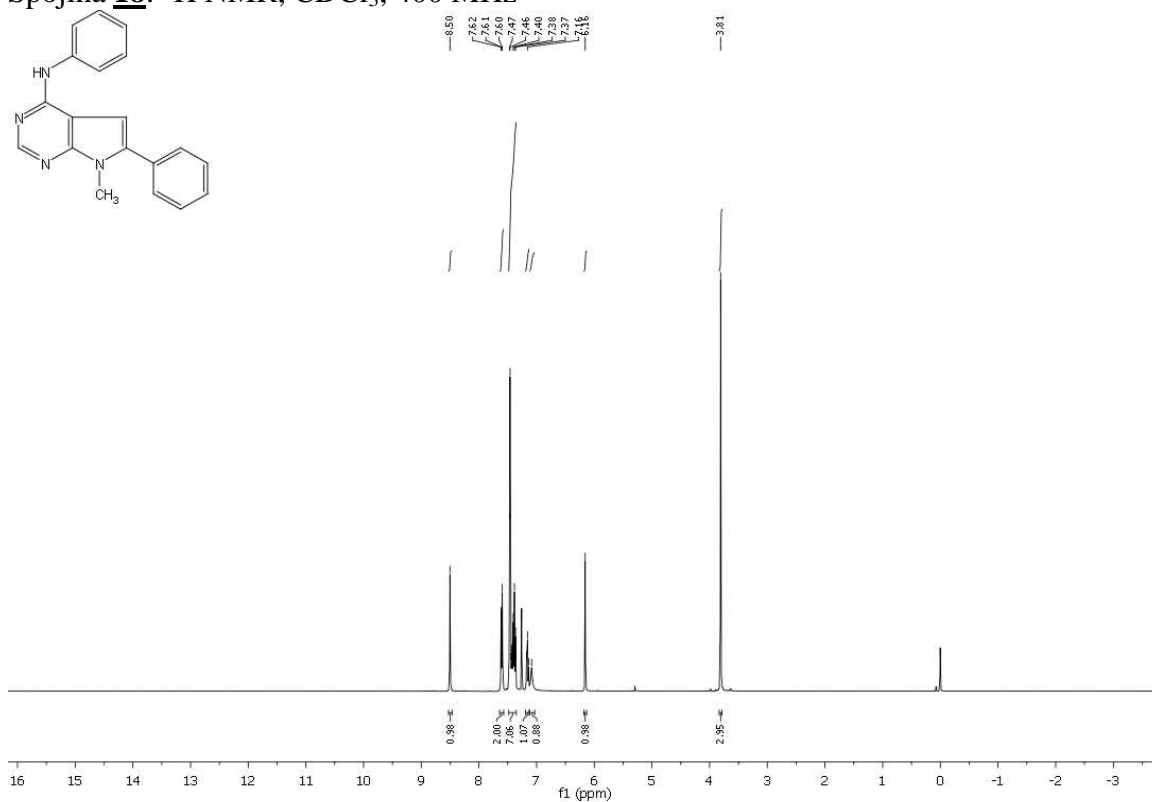
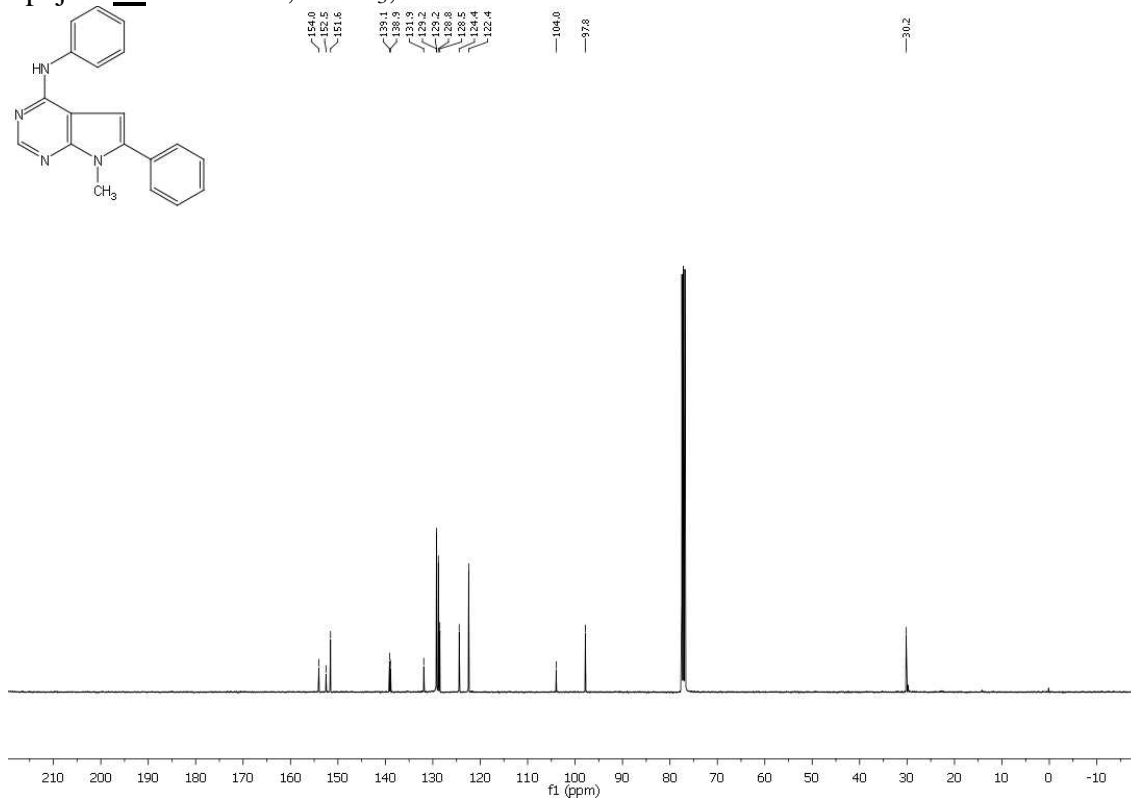
Spojina **13**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **13**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

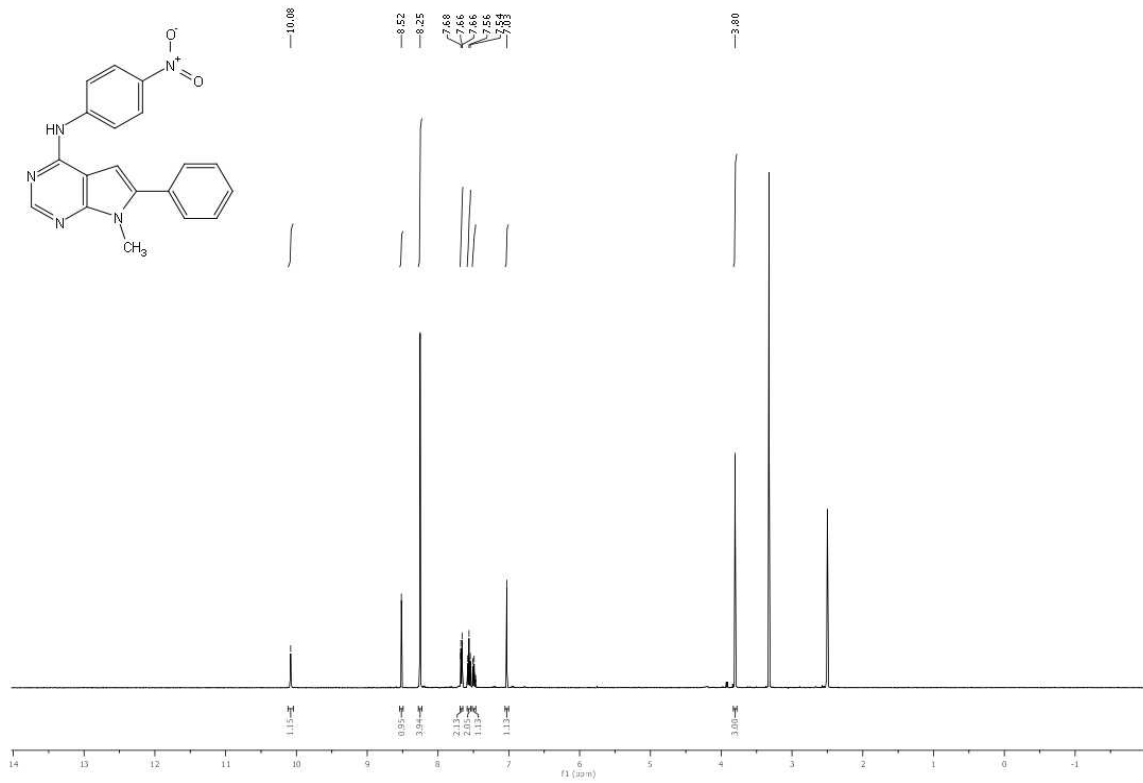
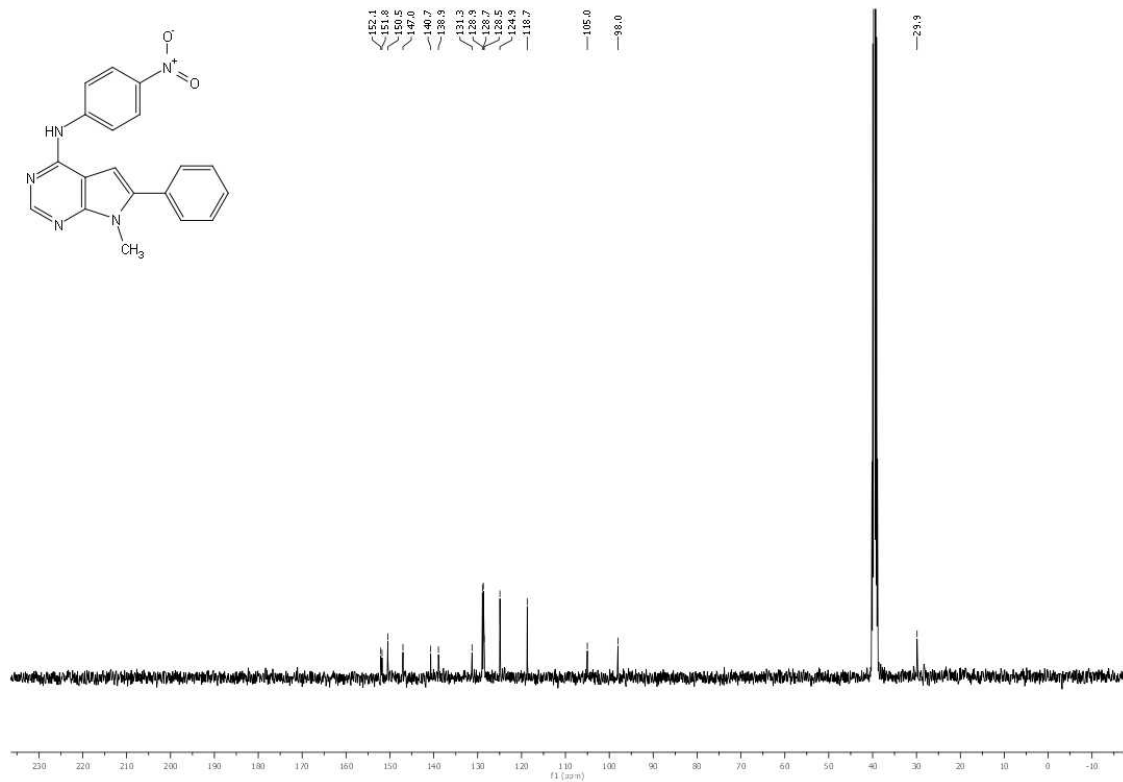
Spojina **14**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **14**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

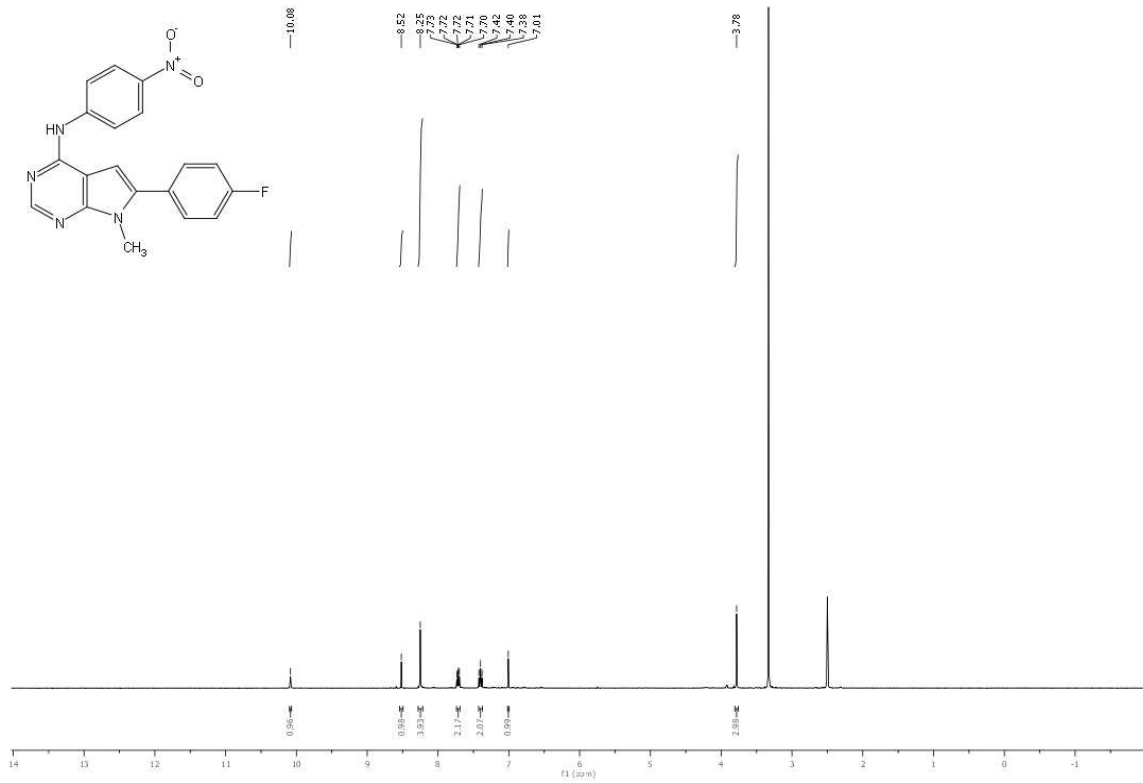
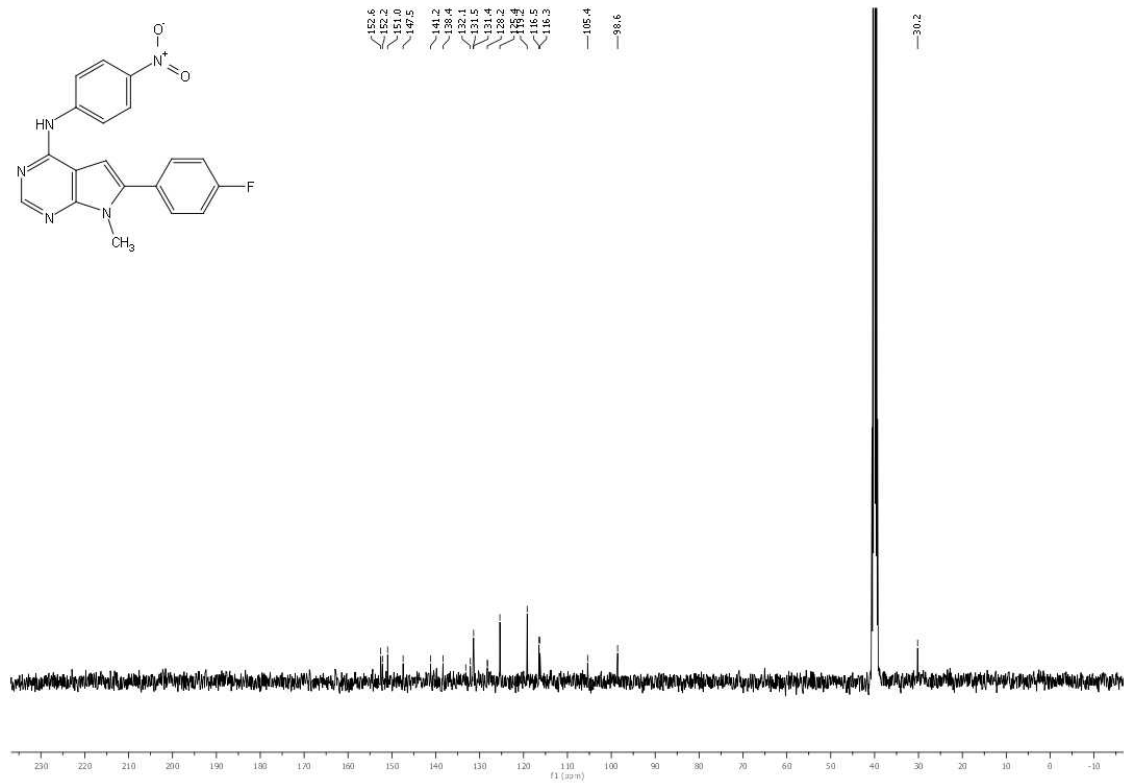
Spojina **15**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **15**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

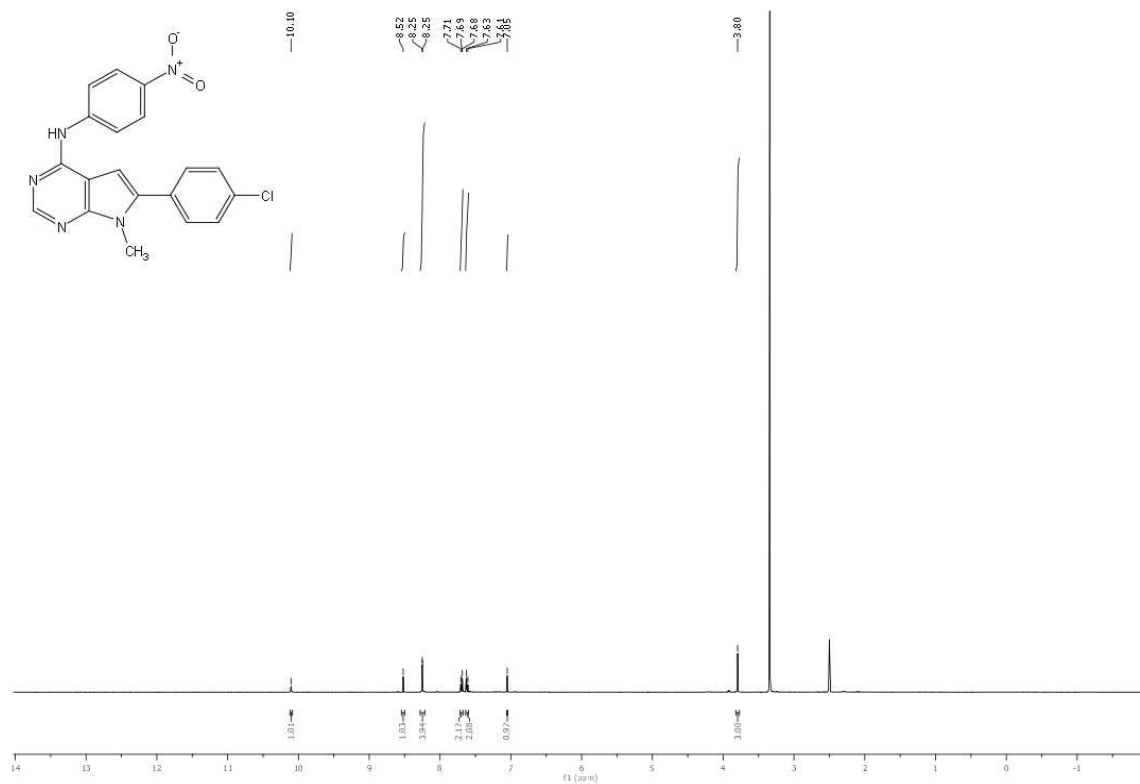
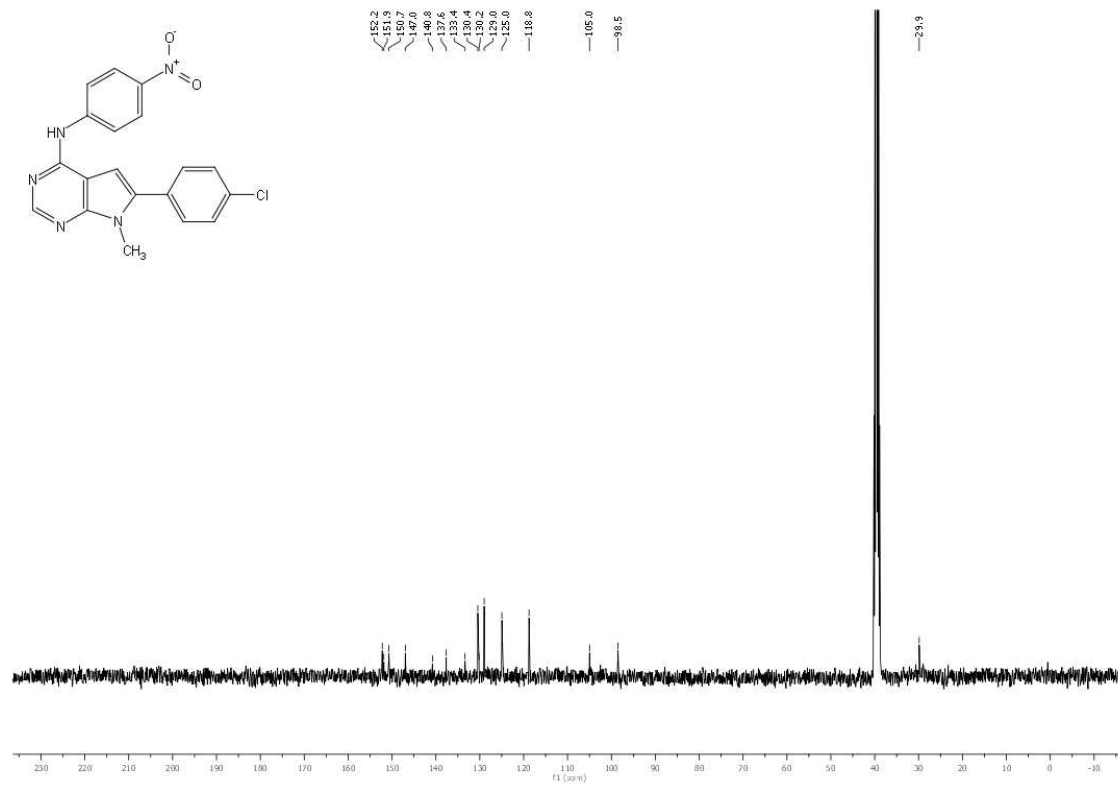
Spojina **16**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **16**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

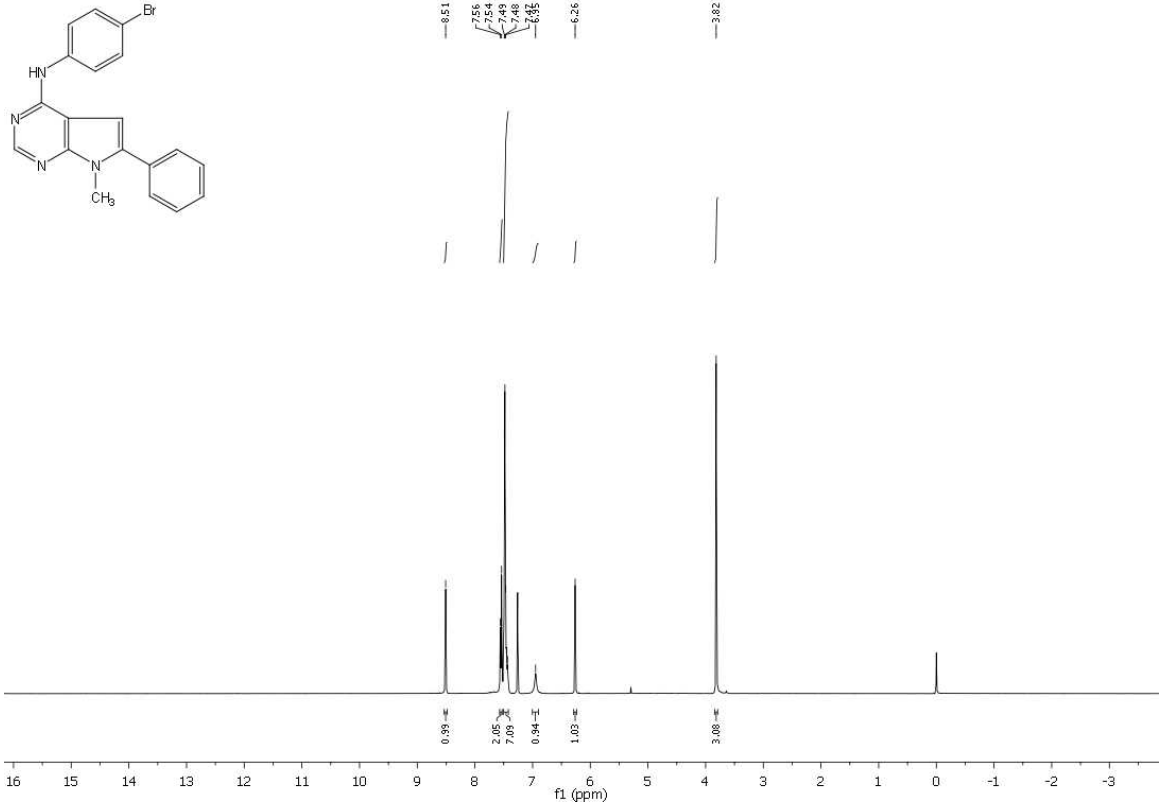
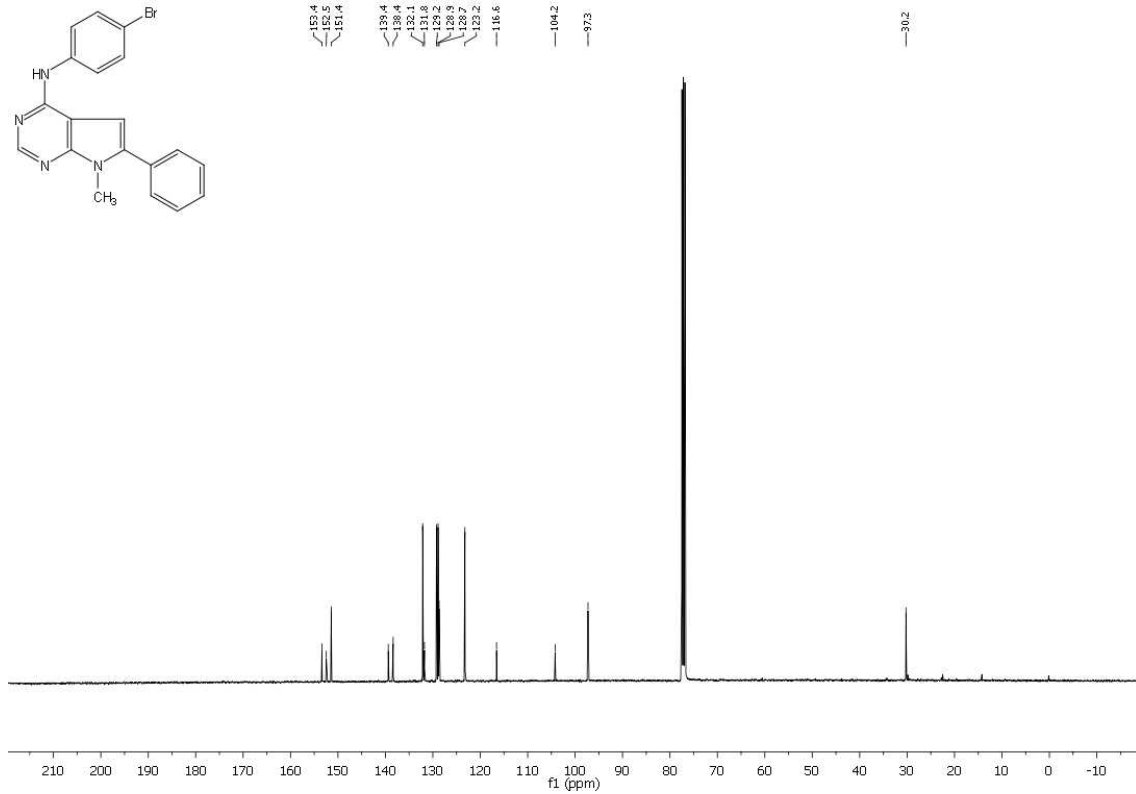
Spojina **17**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **17**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

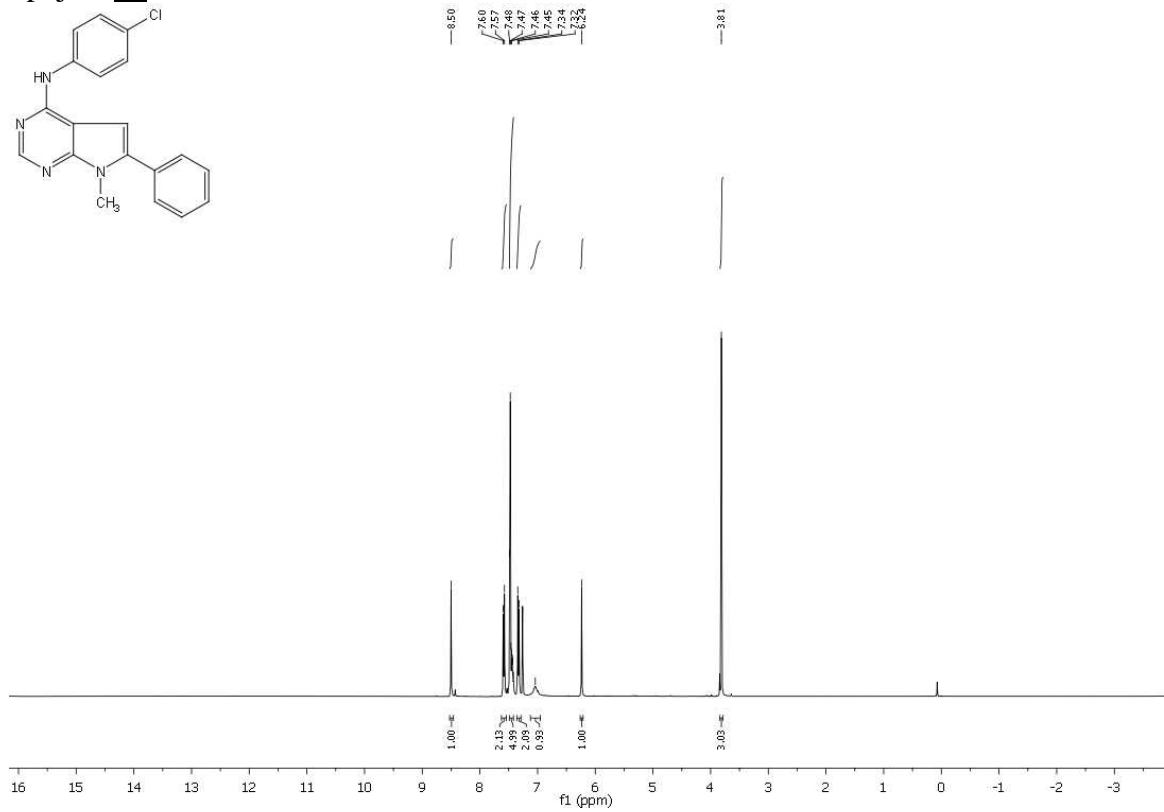
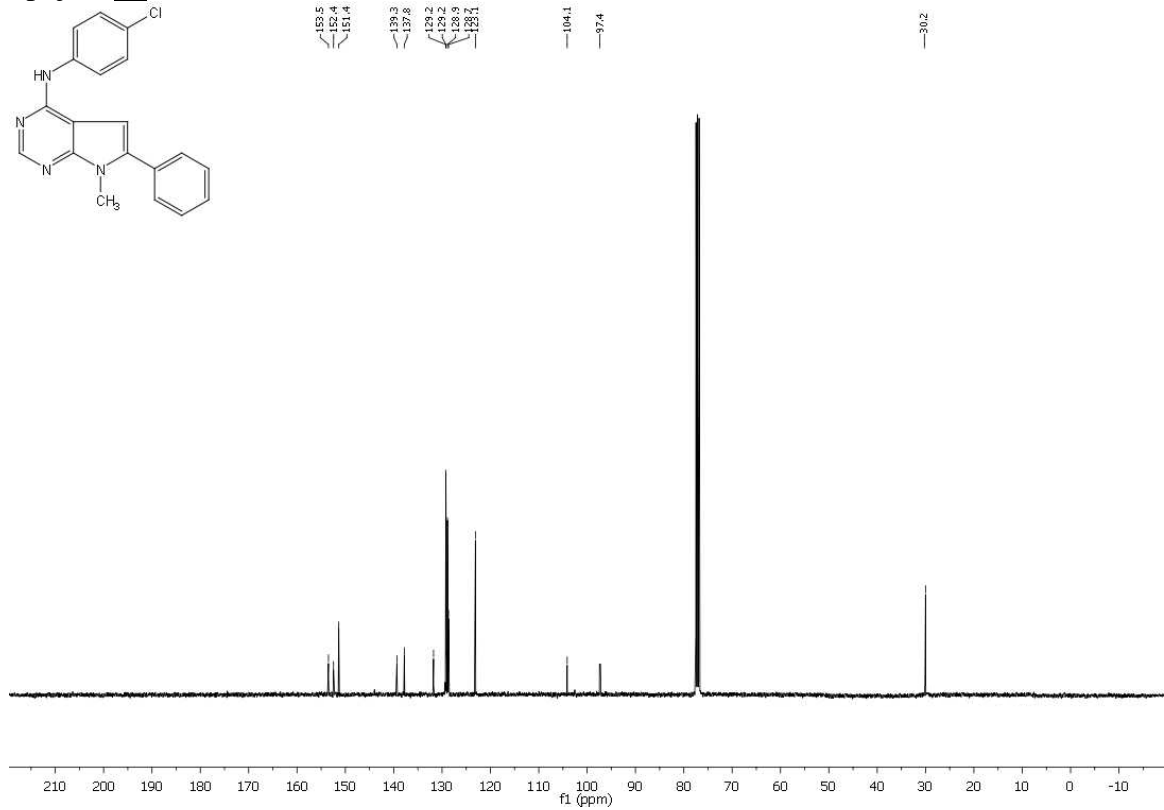
Spojina **18**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **18**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

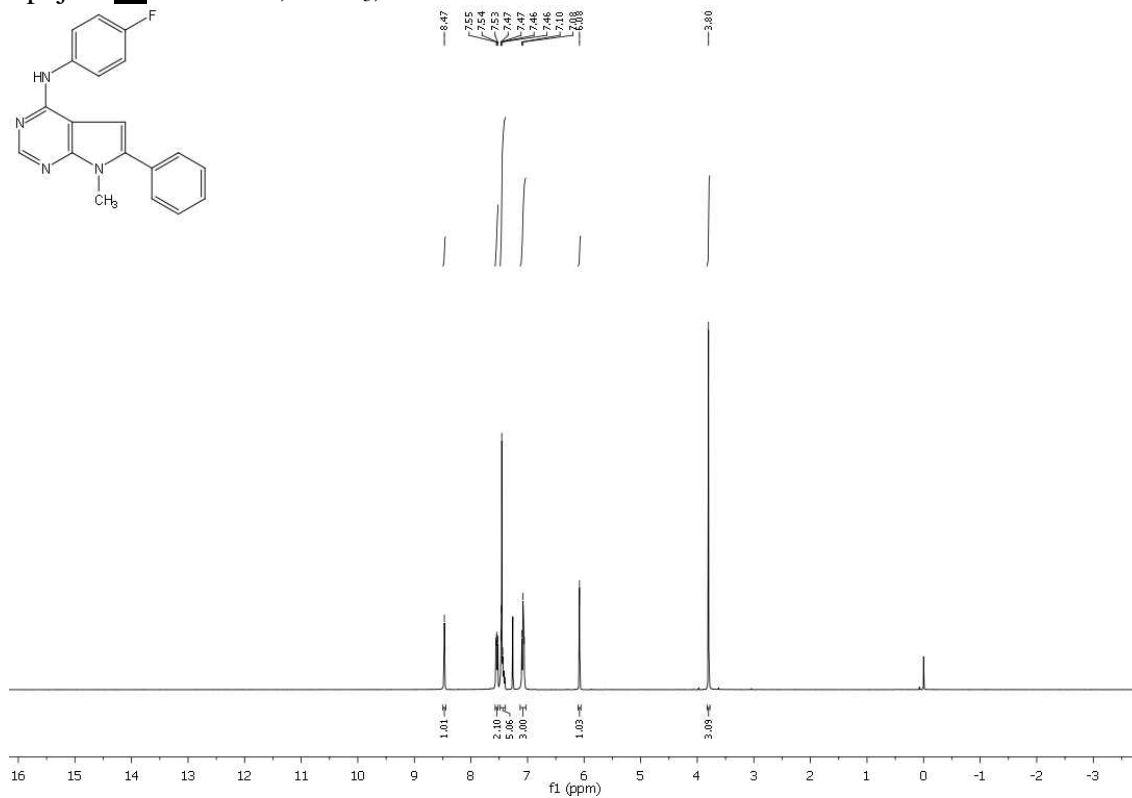
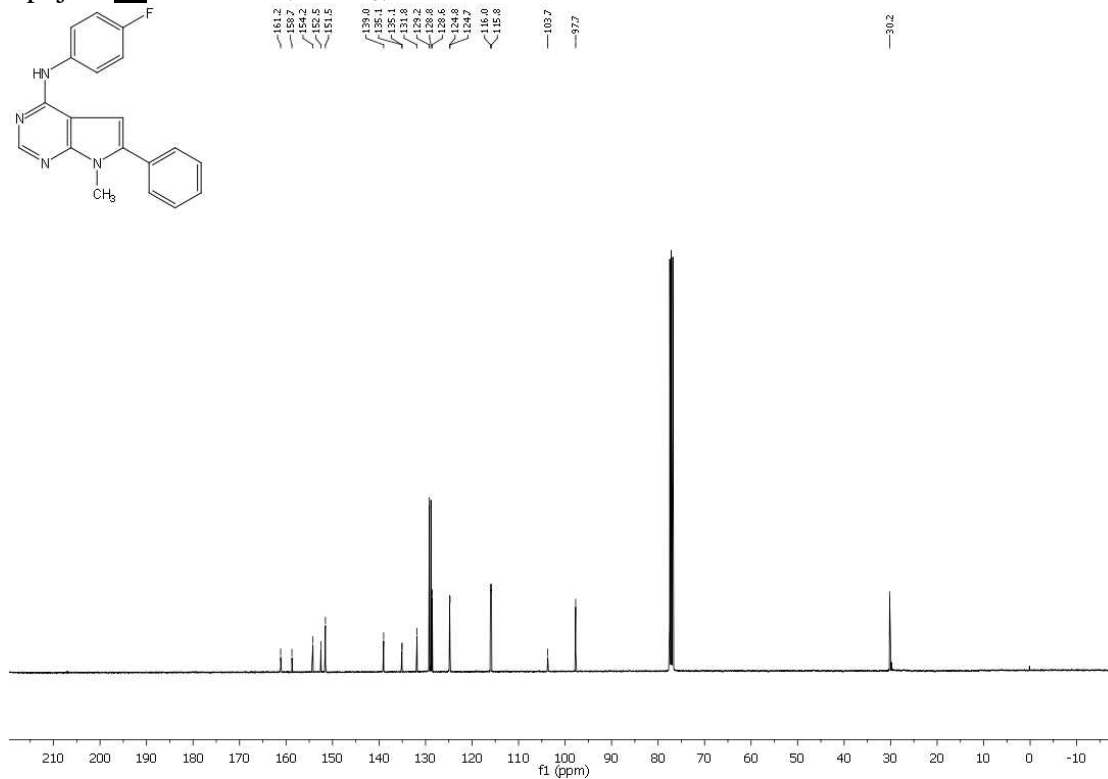
Spojina **19**: ^1H NMR, $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHzSpojina **19**: ^{13}C NMR, $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz

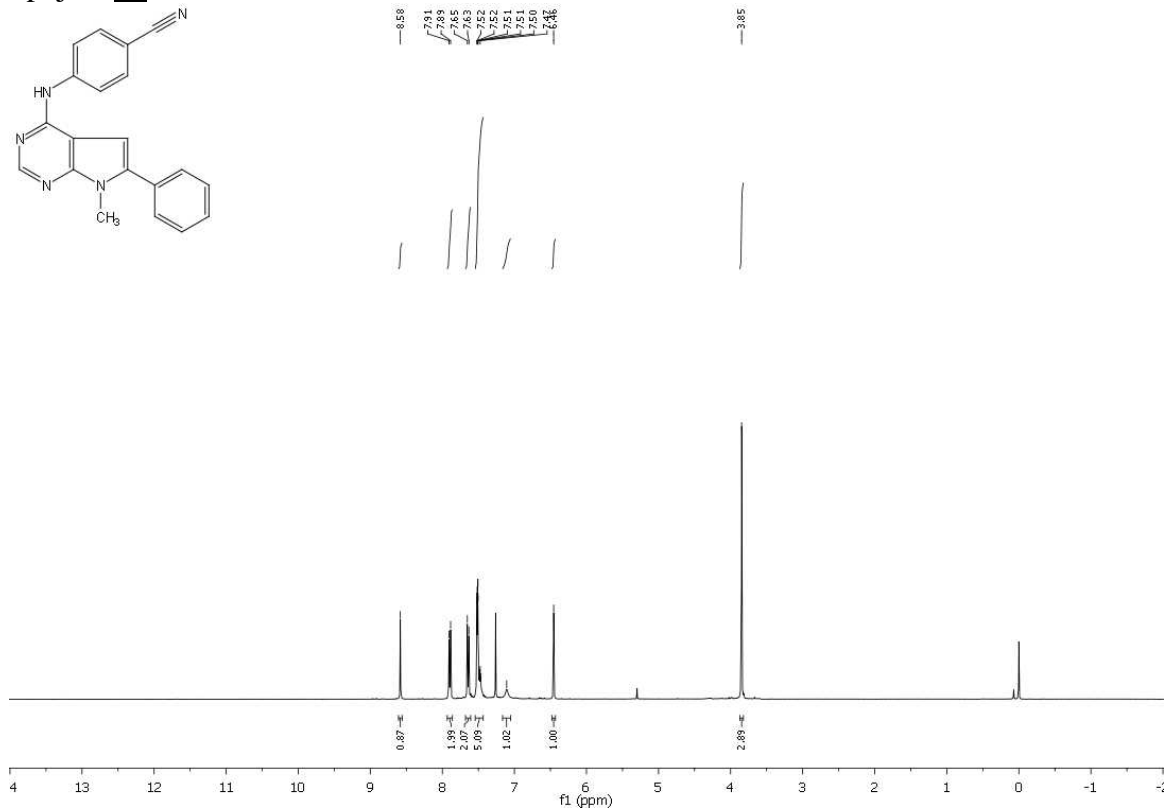
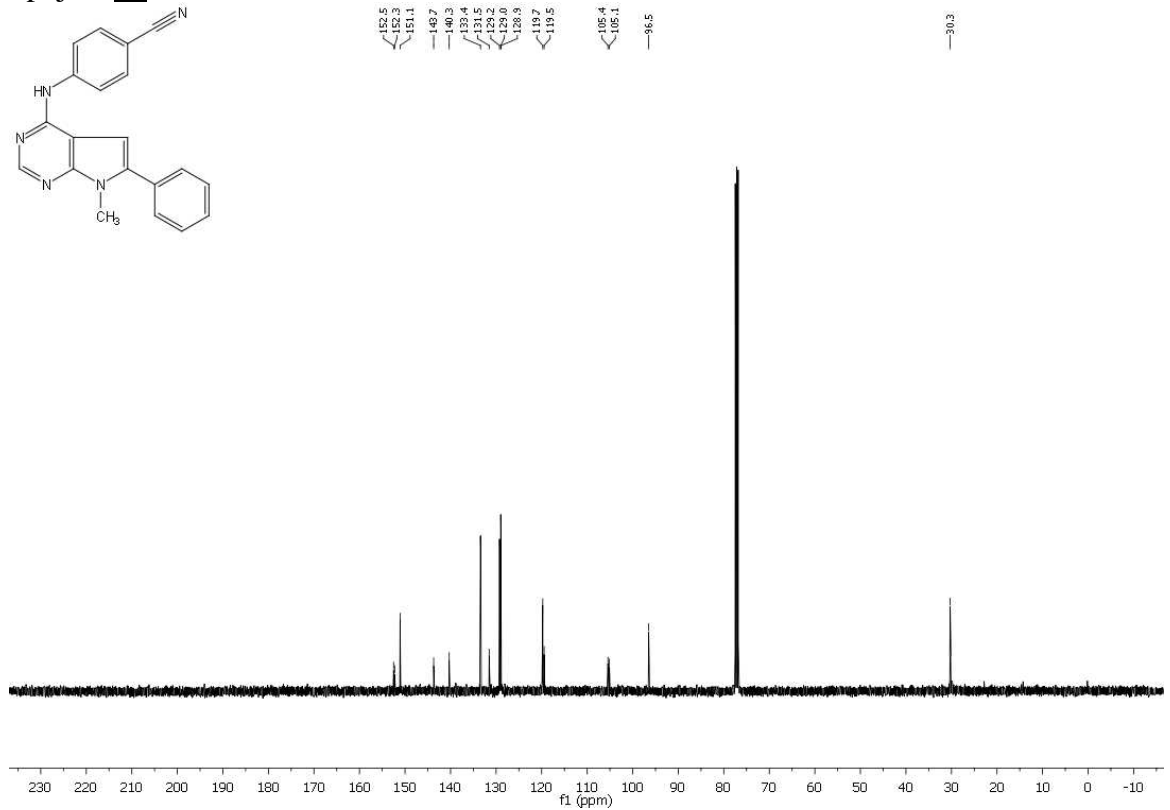
Spojina **20**: ^1H NMR, $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHzSpojina **20**: ^{13}C NMR, $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz

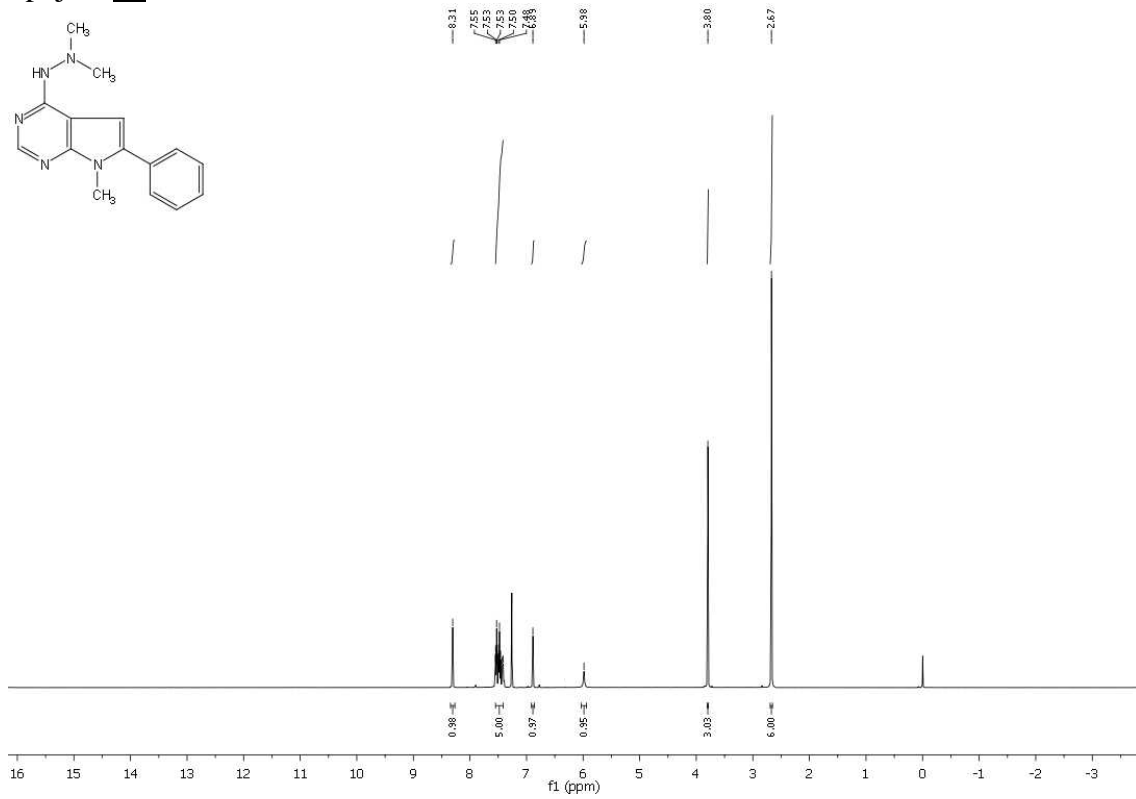
Spojina **21**: ^1H NMR, $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHzSpojina **21**: ^{13}C NMR, $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz

Spojina **22**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **22**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

Spojina **23**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **23**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

Spojina **24**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **24**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

Spojina **25**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **25**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz

Spojina **28**: ^1H NMR, CDCl_3 , 400 MHzSpojina **28**: ^{13}C NMR, CDCl_3 , 100 MHz