

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Syntéza nových inhibitorů proteinové kinázy Haspin

Natálie Kumanová
Jihomoravský kraj

Brno 2022

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3.: Chemie

Syntéza nových inhibitorů proteinové kinázy Haspin

Synthesis of New Inhibitors of Protein Kinase Haspin

Autoři: Natálie Kumanová
Škola: Gymnázium Brno, Křenová, příspěvková organizace,
Křenová 304/36, 602 00 Brno
Kraj: Jihomoravský kraj
Konzultant: Mgr. Adam Štefek

Brno, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne datum

Natálie Kumanová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému konzultantovi Mgr. Adamu Štefkovi za odborné vedení, mnoho cenných rad, vedení v laboratoři a za množství času a trpělivosti, který mi ochotně věnoval jak při psaní této práce, tak i v laboratoři.

Dále bych chtěla poděkovat doc. Mgr. Kamilu Paruchovi, Ph.D. za umožnění laboratorní činnosti na Ústavu chemie Masarykovi univerzity a finální revizi této práce.

V neposlední řadě také děkuji Paule Martín Moyano, která mi byla taktéž velmi nápomocná při mé činnosti v laboratoři.

Anotace

Tato práce se zabývá syntézou a charakterizací nových inhibitorů kinázy Haspin. Teoretická část práce shrnuje především základní poznatky týkající se této kinázy a její vliv na buněčný cyklus. V této části jsou také popsány dosud známé inhibitory kinázy Haspin a jejich možné využití ve farmacii. Praktická část práce uvádí přípravu nových inhibitorů této kinázy, které by v budoucnu mohly nalézt uplatnění při léčbě nádorových onemocnění.

Klíčová slova

kináza, Haspin, inhibitory, organická syntéza, chránicí skupiny, Sonogashira cross-coupling, Suzuki cross-coupling

Annotation

This work is focused on synthesis and characterization of new inhibitors of the kinase Haspin. The theoretical part summarises the biology of the kinase, including its involvement in the regulation of the cell cycle. This part also describes heretofore published Haspin inhibitors and their potential use in pharmacy. The practical part of this work describes synthesis of new Haspin inhibitors, which could find use in cancer therapy.

Keywords

kinase, Haspin, inhibitors, organic synthesis, protecting groups, Sonogashira cross-coupling, Suzuki cross-coupling

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 5-ITu | 5-jodtubercidin |
| AGC | Skupina kináz |
| Ala | Alanin |
| Arg | Arginin |
| Asp | Kyselina aspargová |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| B ₂ pin ₂ | Bis(pinakolato)diboran |
| BIR | Doména Survivinu |
| Bn | Benzyl |
| Boc | <i>Tert</i> -Butyl karbamát |
| Boc ₂ O | Di- <i>tert</i> -butyl dikarbamát |
| Bor | Borealin |
| Bub1 | Kináza |
| CAMK | Calcium/calmodulin-dependentní kinázy |
| CDC1 ₃ | Deuterovaný chloroform |
| Cdk | Cyklin-dependentní kinázy |
| CENPA | Centromerní protein A |
| CK1 | Kaseinová kináza 1 |
| CK2 | Kaseinová kináza 2 |
| CLK | CDC2-podobné kinázy |
| cm | Centimetr |

| | |
|-------------------|---|
| CMGC | Skupina kináz |
| CNS | Centrální nervový systém |
| CPC | Chromosomal passenger complex |
| DCM | Dichlormethan |
| DDQ | 2,3-dichlor-5,6-dikyano-1,4-benzochinon |
| DFG | Strukturní motiv proteinových kináz |
| DFG-in | Konformace DFG u aktivní kinázy |
| DFG-out | Konformace DFG u neaktivní kinázy |
| DMAP | (dimethylamino)pyridin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| DYRK | Skupina kináz DYRK |
| DYT | Strukturní modifikovaný motiv Haspin kinázy |
| ePK | Eukaryotické proteinové kinázy |
| Et ₃ N | Triethylamin |
| EtOAc | Ethyl acetát |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethyl karbamát |
| G2 | Fáze buněčného cyklu před mitózou |
| Gln | Glutamin |
| GSK | Glykogensyntázová kináza |
| H2A | Histon |
| H2AT120 | Threonin 120 histonu H2A |

| | |
|----------|--|
| H2B | Histon |
| H3 | Histon |
| H3T3 | Threonin 3 histonu 3 |
| H3T3ph | Fosforylovaný histon 3 na Threoninu 3 |
| H4 | Histon |
| HBIS | Auto-inhibiční segment Haspin |
| HIM | Motiv WAPL |
| IC50 | Poloviční inhibiční koncentrace |
| INCENP | Vnitřní centromerní protein |
| IR | Infračervená spektroskopie |
| Lys | Lysin |
| M | Mitóza |
| MAPK | Mitogenem-aktivované proteinové kinázy |
| MCAK | Mitotický centromerní Kinezin |
| Me | Methyl |
| Med1 | Strukturní jednotka Kohesinu Med1 |
| MEF | Myší embryonický fibroblast |
| MeOD | Deuterovaný methanol |
| MeOH | Methanol |
| NanoBRET | Bioluminiscenční detekční metoda |
| NanoLuc | Modifikovaná luciferáza |
| NIMA | Skupina kináz NIMA |
| NIS | N-jodsukcinimid |

| | |
|----------|--|
| NMR | Spektroskopie nukleární magnetické rezonance |
| OTf | Triflát |
| Pds5 | Protein |
| PIM | Motiv Haspin |
| PKA | Proteinová kináza A |
| PKC | Proteinová kináza C |
| PKG | Proteinová kináza G |
| Plk1 | Polo-like kinázy 1 |
| PMB | p-methoxybenzylová chránicí skupina |
| Polo | Skupina kináz |
| PP1 | Proteinová fosfatáza 1 |
| PP2A | Proteinová fosfatáza 2A |
| PTSA | p-toluensulfonová kyselina |
| Repo-man | Antagonista Proteinové fosfatázy 1 |
| Rf | Retenční faktor |
| R-spine | Jednotka kinázy |
| S | Fáze buněčného cyklu |
| SA1 | Podjednotka Kohesinu |
| SA2 | Podjednotka Kohesinu |
| SAC | Regulační mechanismus |
| Scc1 | Strukturní jednotka Kohesinu Scc1 |
| Scc3 | Strukturní jednotka Kohesinu Scc1 |
| Sgo | Shugoshin |

| | |
|-----------|--|
| SIM | Motiv Haspin |
| Smc1 | Strukturní jednotka Kohesinu Smc1 |
| Smc3 | Strukturní jednotka Kohesinu Smc3 |
| STE | Homolog kinázy Sterile |
| SUMO | Malý protein vázaný na proteiny během post-translačních modifikací |
| Svn | Survivin |
| TBAF | tetra-N-butylamoniumfluorid |
| TEA | Triethylamin |
| TFA | Kyselina trifluoroctová |
| THF | Tetrahydrofuran |
| Thr | Threonin |
| TIPS | Triisopropylsilyl |
| TK | Tyrosin kináza |
| TKL | Tyrosinová kináza |
| TLC | Chromatografie na tenké vrstvě |
| TopoII | Topoizomeráza II |
| Triflát | Trifluormethansulfonát |
| Trityl | Trifenylmethylová chránící skupina |
| uLH | Horní helixová smyčka Haspin |
| UV | Ultrafialové světlo |
| WAPL | Protein disociující Kohesin |
| YSR motiv | Motiv k interakci Pds5 a WAPL |

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod | 13 |
| 2 | Struktura proteinové kinázy Haspin | 15 |
| 2.1 | Struktura proteinových kináz | 15 |
| 2.2 | Struktura Haspin kinázy | 16 |
| 3 | Biologické funkce Haspin kinázy | 19 |
| 3.1 | Lokalizace kinázy Haspin během mitózy | 19 |
| 3.2 | Mechanismus lokalizace Haspinu | 19 |
| 3.3 | Biologická funkce Haspinu | 21 |
| 3.3.1 | Haspin lokalizuje CPC komplex na centromerách | 23 |
| 3.4 | Regulace aktivity kinázy Haspin | 24 |
| 3.5 | Funkce Haspinu během meiózy | 25 |
| 4 | Inhibitory Proteinových kináz | 26 |
| 4.1 | Biochemický mechanismus | 27 |
| 4.2 | Inhibitory kinázy Haspin | 28 |
| 5 | Metodika | 32 |
| 5.1 | Kolonová chromatografie | 32 |
| 5.2 | Chromatografie na tenké vrstvě | 33 |
| 5.3 | Extrakce | 35 |
| 5.4 | Filtrace | 36 |
| 6 | Suzuki-Miyaura cross-coupling | 38 |
| 6.1 | Mechanismus | 38 |
| 6.2 | Katalyzátory | 39 |
| 6.3 | Báze | 39 |
| 6.4 | Reaktivita arylhalogenidů | 40 |
| 7 | Miyauraova borylace | 41 |
| 8 | Sonogashira cross-coupling | 43 |
| 8.1 | Mechanismus | 43 |
| 8.2 | Katalyzátory | 44 |
| 8.3 | Reaktivita arylhalogenidů | 45 |
| 9 | Chránicí skupiny | 46 |
| 9.1 | <i>tert</i> -Butyl karbamát (Boc) | 46 |
| 9.1.1 | Protekce | 47 |

| | | |
|--------|--|----|
| 9.1.2 | Deprotekce..... | 47 |
| 9.2 | 9-Fluorenylmethyl Karbamát (Fmoc)..... | 48 |
| 9.3 | Trifenylmetylová skupina (Trityl) | 49 |
| 9.4 | Benzyl (Bn) | 49 |
| 9.5 | <i>p</i> -methoxybenzylová skupina (PMB) | 49 |
| 10 | Experimentální část | 51 |
| 10.1 | Obecné informace | 51 |
| 10.2 | Syntéza intermediátů 1-4..... | 51 |
| 10.2.1 | Příprava 6-chlor-2-jodpyridin-2-olu (1)..... | 51 |
| 10.2.2 | Příprava 6-chlor-2-((triisopropylsilyl)ethynyl)pyridin-3-olu (2) | 52 |
| 10.2.3 | Příprava 5-chlor-3-jod-2-(triisopropylsilyl)furo[3,2- <i>b</i>]pyridinu (3) | 52 |
| 10.2.4 | Příprava 5-chlor-3-jodfuro[3,2- <i>b</i>]pyridinu (4) | 53 |
| 10.3 | Syntéza (4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)furo[3,2- <i>b</i>]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (7)..... | 53 |
| 10.3.1 | Příprava <i>tert</i> -butyl ((4-(5-chlorofuro[3,2- <i>b</i>]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methyl)carbamátu (5)..... | 53 |
| 10.3.2 | Příprava <i>tert</i> -butyl ((4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)furo[3,2- <i>b</i>]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methyl)carbamátu (6) | 54 |
| 10.3.3 | Příprava (4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)furo[3,2- <i>b</i>]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (7) | 55 |
| 10.4 | Syntéza (4-(4-methyl-5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-4H-pyrazolo[5,1- <i>b</i>]pyrimidin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (12)..... | 55 |
| 10.4.1 | Příprava 5-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidinu (9)..... | 55 |
| 10.4.2 | Příprava 3-jod-5-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidinu (10)..... | 56 |
| 10.4.3 | Příprava <i>tert</i> -butyl ((4-(5-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidin-3-yl)pyridin-2-yl)methyl)carbamátu (11)..... | 57 |
| 10.4.4 | Příprava (4-(5-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (12)..... | 57 |
| 11 | Diskuze a výsledky | 59 |
| 11.1 | Příprava 5-chlor-3-jodfuro[3,2- <i>b</i>]pyridinu (4)..... | 59 |
| 11.2 | Syntéza (4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)furo[3,2- <i>b</i>]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (7)..... | 60 |
| 11.3 | Syntéza (4-(4-methyl-5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-4H-pyrazolo[5,1- <i>b</i>]pyrimidin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (12)..... | 61 |
| 11.4 | Inhibice kinázy Haspin sloučeninami 7 a 12..... | 62 |
| 12 | Závěr..... | 64 |

| | | |
|----|--------------------------------|----|
| 13 | Použitá literatura | 66 |
| 14 | Seznam obrázků | 72 |
| 15 | Seznam schémat | 74 |
| 16 | Seznam tabulek | 75 |
| 17 | Seznam grafů | 76 |
| 18 | Příloha 1: H NMR Spektra | 77 |
| 19 | Příloha 2: C NMR | 87 |
| 20 | Příloha 3: IR spektra | 89 |
| 21 | HRMS spektra | 99 |

1 ÚVOD

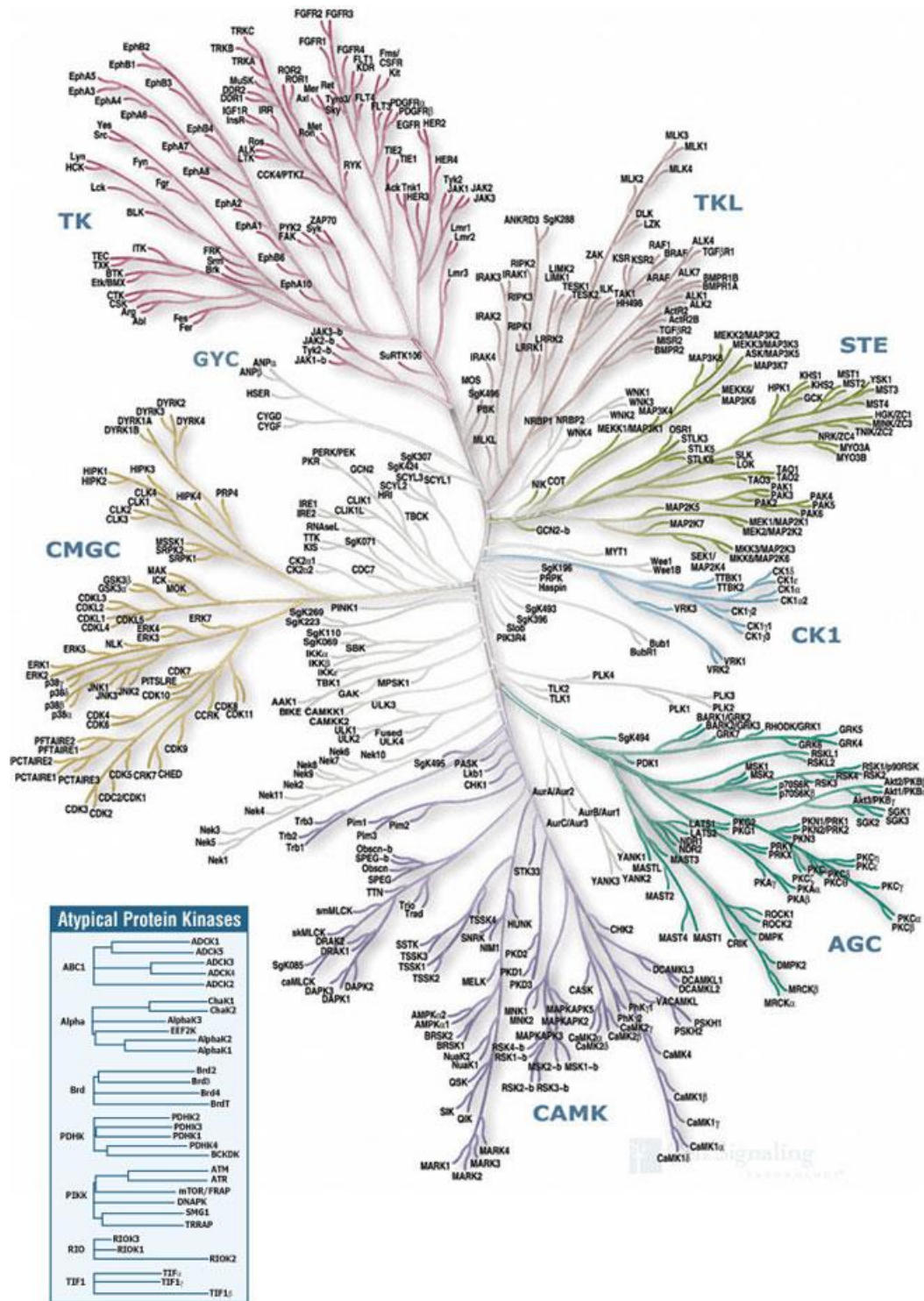
Proteinové kinázy tvoří velkou skupinu vývojově a strukturně podobných enzymů. Patří mezi nejrozšířeněji studované biomolekuly buněčných signálních drah, které regulují růst, vývoj, dělení a homeostázu eukaryotických buněk. [1]

Proteinové kinázy katalyzují přenos fosfátových zbytků z ATP na proteiny, běžně na určitou aminokyselinu, čímž způsobí jejich „aktivaci“. Jedná se o běžnou post-translační, reverzibilní modifikaci proteinů, která mění hydrofobní nepolární protein na hydrofilní polární protein. Tato aktivace umožňuje změnu konformace proteinů během jejich interakce s jinými molekulami. Lidský genom obsahuje více než 500 proteinových kináz (obr. 1), které můžeme klasifikovat jako (1) tyrosinové, (2) serin-threoninové a (3) nespecifické proteinové kinázy, na základě toho, které aminokyseliny v proteinech přednostně fosforylují. Naproti tomu enzymy, zvané fosfatázy, zajišťují defosforylaci a společně tyto dva enzymatické procesy regulují mnoho signálních drah v buňce. [1]

Fosforylace je jedním z kritických mechanismů regulující buněčné funkce a nadměrná exprese proteinových kináz či jakákoliv chyba v jejich regulaci může vést k nežádoucím změnám těchto procesů. Takovéto kinázy se mohou stát onkogenem a mohou podpořit tvorbu nádorových buněk. Mezi takovéto poruchy proteinových kináz zařazujeme mimo jiné i například mis-regulaci exprese a amplifikaci, mutaci a chromosomální translokaci. [1] Už v roce 1980 byl prokázán důležitý vliv některých proteinových kináz v onkogenezi a progresi nádorů; a od té doby jsou studovány inhibitory proteinových kináz jako potenciální protinádorová léčiva. Více než 70 inhibitorů proteinových kináz již bylo schváleno pro klinické použití (zejména pro léčbu rakoviny) a mnoho dalších je v současné době profilováno v rámci klinických testů. [2]

Kinázové inhibitory jsou malé molekuly, které specificky cílí na proteinové kinázy. Typicky se váží se na aktivní místo kinázy, na které by se běžně vázala molekula ATP. Tím pádem zamezí tomu, aby kináza transferovala fosfátový zbytek z ATP na příslušný protein – tzn. provedla jeho fosforylaci.

Tato práce se zaměřuje na inhibitory konkrétní proteinové kinázy Haspin. Tato kináza je atypickou kinázou, která se mírně odlišuje od ostatních eukaryotických proteinových kináz. Haspin je serin/threoninová kináza, která se účastní regulace mitotického dělení. Prostřednictvím fosforylace threoninu 3 histonu 3 (H3T3) zajišťuje správnou lokaci kinázy Aurory B na centromere mitotického chromosomu. [11] Chybná exprese Haspin kinázy vede k předčasné separaci chromatid, selhání seřazení chromozomů a k zablokování mitózy ve stavu pro-metafáze. [12]



Obrázek 1: Lidský kinom. Převzato z *Cell Signaling Technology: Human Protein Kinases Overview*

2 STRUKTURA PROTEINOVÉ KINÁZY HASPIN

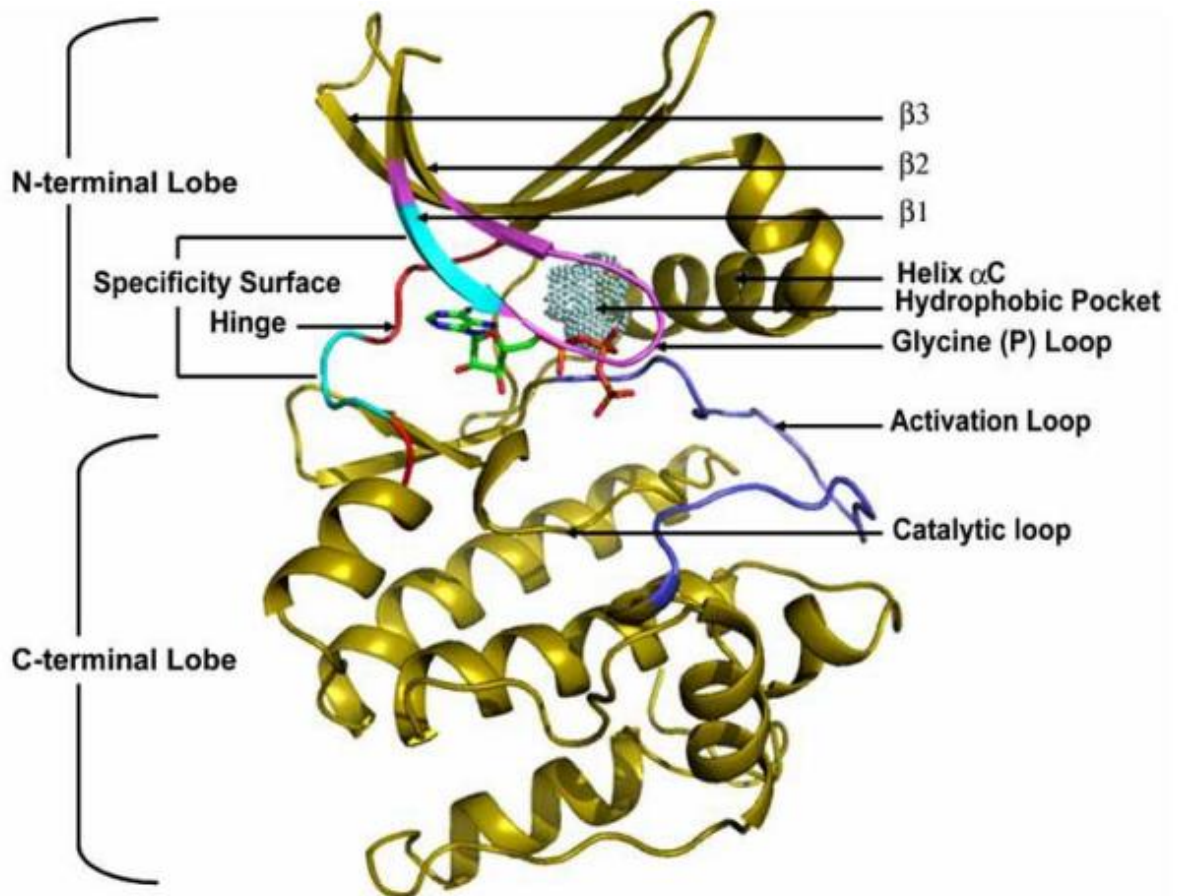
2.1 Struktura proteinových kináz

Na základě strukturní podobnosti a role v biologickém systému jsou kinázy rozděleny do několika skupin, které shrnuje následující tabulka.

| Zkratka | Název |
|---------|---|
| TK | Tyrosine Kinase |
| AGC | Obsahující PAK, PKG, PKC skupin |
| CAMK | Calcium/calmodulin - dependentní kinázy |
| CMGC | Obsahující CDK, MAPK, GSK, CLK |
| STE | Homolg kinázy Sterile 7, 11,20 |
| TKL | Tyrosine Kinase-like |
| CK1 | Kasein kináza 1 |
| a další | |

Tabulka 1: Rozdělení proteinových kináz dle strukturní a biologické podobnosti

Kinázy jsou velmi dynamické enzymy, které mohou zaujímat aktivní a inaktivní konformace. Kináza je obvykle složena ze dvou hlavních jednotek a 12 podjednotek (obr. 2). N-koncová jednotka bývá menší a skládá se z β -vláken a samotného α -helixu. [8] Větší C-koncová jednotka je téměř celá helikální. Obě jednotky jsou spojeny peptidovým řetězcem nazývaným hinge. Štěrbina mezi těmito smyčkami tvoří aktivní místo, se kterou interaguje ATP prostřednictvím vodíkových můstků. P-smyčka bohatá na glycin stabilizuje interakce s fosfátem.

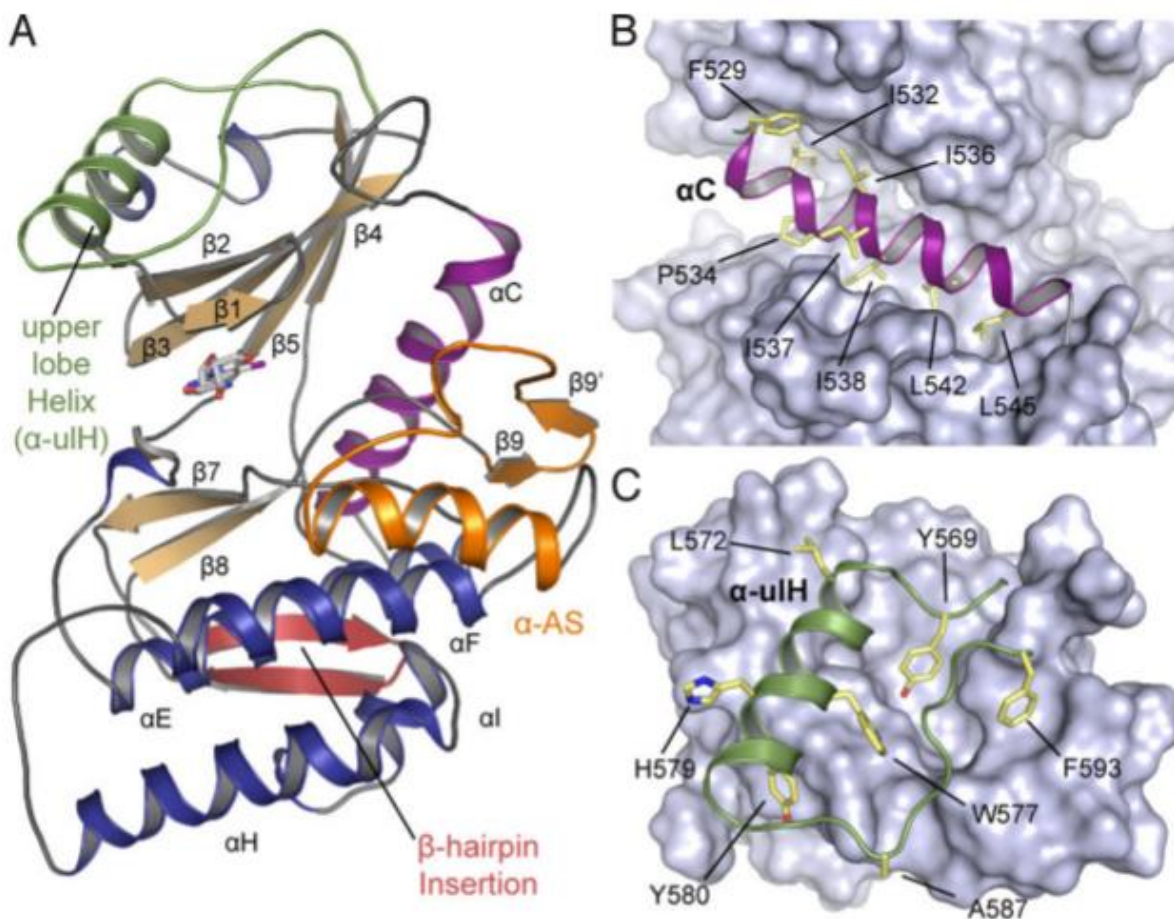


Obrázek 2: X-ray krystalová struktura ATP navázané na PKA. Převzato ze *Syntéza nových potenciálních inhibitorů proteinových kináz*, Václav Němec.

2.2 Struktura Haspin kinázy

Haspin je proteinová kináza, která patří do skupiny eukaryotických proteinových kináz ePK. [9][10] Tato skupina se skládá z objemné skupiny kináz, které regulují velké množství buněčných procesů prostřednictvím fosforylace jejich cílených proteinů na určitých specifických stranách. Aktivní kinázy pak často regulují i aktivity jiných enzymů, včetně dalších kináz a mají tak možnost regulace někdy až tisíce různých proteinů. [11]

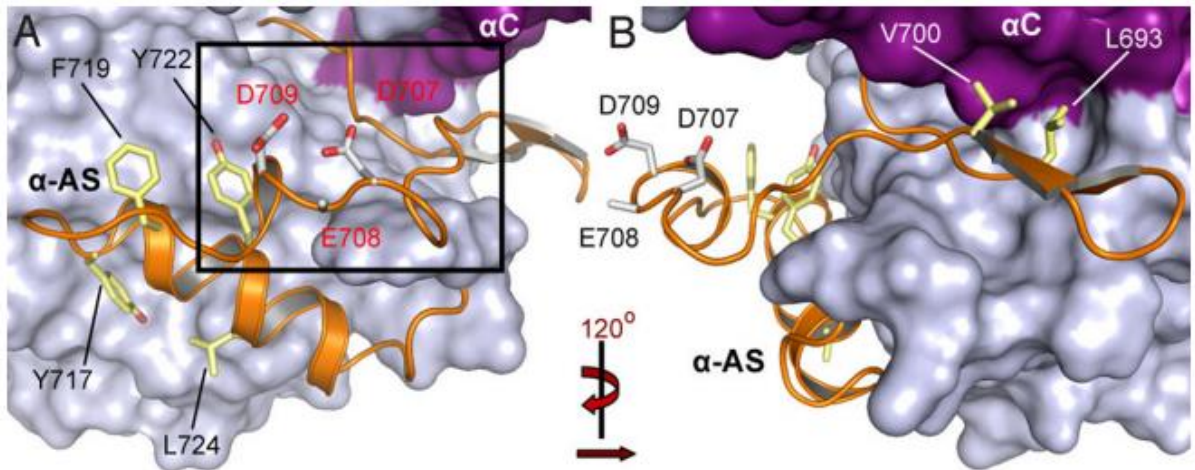
Kináza Haspin je 798 aminokyselinová serin/threoninová proteinová kináza, která byla poprvé identifikována u myších zárodečných buněk. [45] N-koncová jednotka, obsahující 5 β -řetězců, tvoří dominantní část a má regulační funkci (obr. 3A). Obsahuje též auto-inhibiční jednotku HBIS. [9][10][45] C-koncová jednotka obsahuje ATP vazebnou stranu (obr. 3B). Kináza Haspin se nicméně mírně liší od ostatních členů ePK skupiny a vykazuje jisté strukturní zvláštnosti. Tyto vlastnosti vyplývají z inserce dalších aminokyselin nebo změny v proteinové sekvenci katalytické jednotky. Haspin disponuje pouze třemi podjednotkami z dvanácti, které se běžně u kináz vyskytují. N-koncová smyčka obsahuje inserce tří dodatečných smyček. První smyčka se nachází před $\beta 1$ řetězcem a druhá mezi $\beta 3$ řetězcem a αC smyčkou. Poslední inserce se nazývá ulH helix, který je spojen s $\beta 5$ vláknem a je z nich nejdelší (obr. 3C). Struktura kináz je většinou velmi dynamická a umožňuje kináze přecházet mezi aktivní a neaktivní formou. Všechny tyto inserce a interakce s jednotlivými podjednotkami ovlivňují



Obrázek 3: (A) Celková struktura Haspin kinázy s vyznačenými atypickými insercemi, ulH je vyznačen zeleně, aktivační segment žlutě a vlásečnicová inserce červeně. (B) Detailní zobrazení α C helixu obklopeného hydrofobními jednotkami. (C) Inserce ulH helixu a jeho interakce s aromatickými jednotkami. Převzato z *Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin*, Jeyanthi Eswarana, Debasis Patnaikb, Panagis Filippakopouloua, Fangwei Wangb, Ross L. Steinc, James W. Murraya, Jonathan M. G. Higginsb a Stefan Knappa

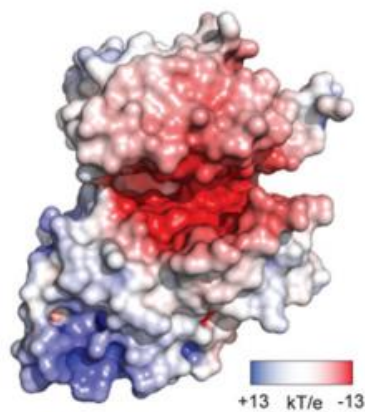
konformaci kinázy. Změny v N-koncové smyčce umožňují hydrofobní interakce α C smyčky s jejím okolím, které tak vytváří solný můstek mezi jednotkou glutamátu 535 a jednotkou lysinu 511, což omezuje dynamiku Haspin, která je tak udržována neustále v aktivní formě. Další inserce je pak tvořena sekvencí 20 aminokyselin umístěnou mezi β 7 a β 8 řetězci. [\[9\]](#)[\[12\]](#)[\[45\]](#)

K dalším stabilizačním faktorům Haspinu patří aktivační segment. [\[9\]](#) U běžných proteinových kináz je aktivační segment složen z β 9 řetězce, DFG, aktivační smyčky a P + 1 smyčky. U Haspinu se tento segment od ostatních kináz liší. Haspin nedisponuje β 6 řetězcem, místo toho obsahuje β 9' vlákno, které tvoří vlásenku s β 9 vláknem. Tato vlásenka interaguje s α C helixem prostřednictvím hydrofobních interakcí. Místo DFG motivu, což je segment, který prostřednictvím vazby s kationty Mg^{2+} umožňuje běžné aktivované kináze zaujmout takovou konformaci, aby bylo možné navázat ATP, obsahuje Haspin modifikovaný DFG motiv zvaný DYT. DYT je na rozdíl od DFG, který je složen z jednotek fenyloalaninu a glycinu, složen z jednotek tyrosinu a threoninu. P+1 smyčka je nahrazena motivem α AS. Celý segment je stabilizován díky přítomnosti některých aminokyselin s aromatickými řetězci (obr. 4). [\[38\]](#)[\[10\]](#)[\[39\]](#)[\[45\]](#)



Obrázek 4: Detailní aktivační segment Haspinu. (A) Povrch kinázy s aktivačním segmentem zobrazeným jako vlásečnicová struktura s aromatickými jednotkami, které tvoří střed a stabilizují konformaci kinázy. (B) Segment otočený o 120° poskytující detailnější náhled. Převzato z *Structure and functional characterization of the atypical human kinase Haspin* (Jeyanthi Eswarana, Debasis Patnaikb, Panagis Filippakopouloa, Fangwei Wangb, Ross L. Steinc, James W. Murraya, Jonathan M. G. Higginsb a Stefan Knappa)

Kináza Haspin se v neposlední řadě také liší částí, na kterou je vázán substrát. [9] Jediným známým substrátem, který Haspin fosforyluje, je histon H3. Thr-3, který je takto fosforylován se nachází v sekvenci 1–Ala-Arg-Thr-Lys-Gln-5, přičemž nezbytné pro tuto fosforylaci jsou Arg-2 a Lys-4. Tuto vazbu také stabilizují elektrostatické interakce, které se uplatňují při vazbě kladně nabitého substrátu a záporně nabitě katalytické jednotky Haspin (obr. 5). [10]

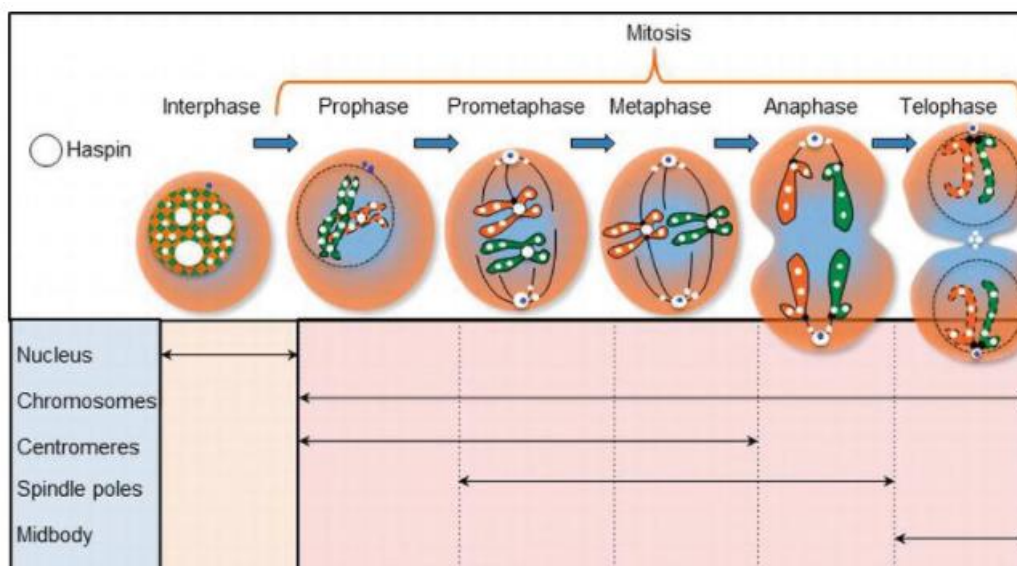


Obrázek 5: Elektrostatický potenciál Haspin kinázy. Převzato z *Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization* (Villa F, Capasso P, Tortorici M, Forneris F, de Marco A, Mattevi A, Musacchio A)

3 BIOLOGICKÉ FUNKCE HASPIN KINÁZY

3.1 Lokalizace kinázy Haspin během mitózy

Haspin zůstává aktivní po celou dobu buněčného cyklu, na rozdíl od jiných mitotických kináz



Obrázek 6: Lokalizace Haspin kinázy během různých fází mitózy. Převzato z *The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors* (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier a Sandrine Ruchaud)

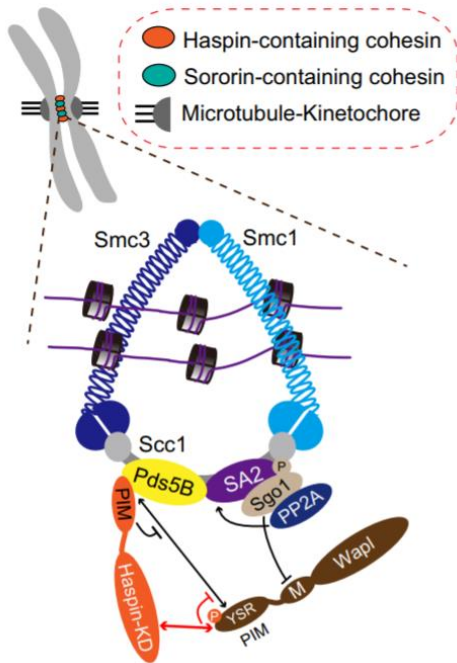
jako Aurora B a Plk1, které jsou na samotném konci mitózy degradovány. Dosud nemohla být určena přesná buněčná lokalizace z důvodu nedostatečné imunofluorescenční specifity Haspin protilátek. Nicméně byly provedeny studie zaměřené na nadměrnou expresi Haspinu v různých eukaryotických buněčných liniích a všechny studie potvrdily jeho přítomnost v jádru během interfáze. Lokalizace Haspinu během mitózy je však mnohem komplexnější (obr. 6). [9]

Během interfáze byla kináza Haspin identifikována v jádře. Na konci profáze se Haspin nachází v místě chromosomů až do anafáze B. [14] Během metafáze se působnost Haspinu rozšiřuje do několika dalších míst. Haspin byl pozorován na ramenech chromosomů a na centromerách. Dále byl také detekován na centromerách dělicího vřeténka v pro-metafázi až do telofáze. Fosforylace histonu H3 byla také zkoumána u rostlin. Většina studií potvrdila přítomnost Haspinu na chromozomech na konci G2 fáze a jeho vymizení během anafáze. [9] [13]

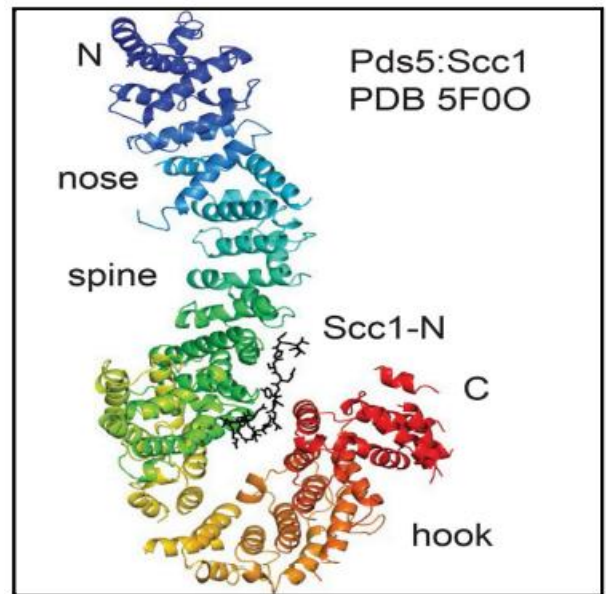
3.2 Mechanismus lokalizace Haspinu

Byly provedeny studie, které potvrdily způsob lokalizování Haspinu na chromosomech (obr. 9). Haspin patrně interaguje s proteinem Pds5 (obr. 7), který interaguje s proteinovým komplexem Kohesin a reguluje tak zároveň centromerní kohezi sesterských chromatid (obr. 8). [9][47]

Kohesin je komplex, který je složen z podjednotek nazývaných Scc1, Scc3, Smc1 a Smc3 a SA1 nebo SA2. Jedná se o komplex, který tvoří smyčku, jež spojuje sesterské chromatidy po replikaci v S fázi k sobě. Je tedy zodpovědný za zprostředkování koheze sesterských chromatid od replikace v S fázi až po začátek anafáze. [17][40][45] Na začátku mitózy, než jsou sesterské chromatidy odděleny na centromerách, Kohesin musí být odstraněn z ramen chromozomů, což zajišťují kinázy Plk1 a Aurora B. Oddělení sesterských chromatid, po fosforylaci Kohesinu těmito kinázami, je regulováno WAPL proteinem a Pds5 proteinem. [45][46] Obratlovci mají dvě verze proteinu Pds5, protein Pds5A a Pds5B. Pds5B interaguje s SA1 nebo SA2



Obrázek 8: Struktura Kohesinu a interakce jeho podjednotek se Sgo1, Pds5B, Haspin a Wapl. Převzato z *A kinase-dependent role for Haspin in antagonizing Wapl and protecting mitotic centromere cohesion* (Liang C, Chen Q, Yi Q, Zhang M, Yan H, Zhang B, Zhou L, Zhang)



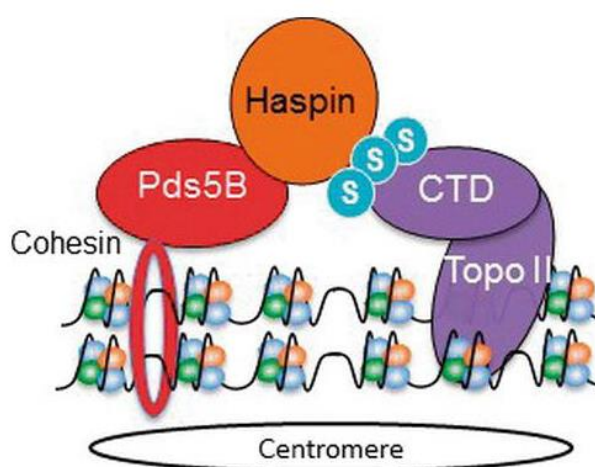
Obrázek 7: Struktura Pds5 proteinu. Převzato z *Crystal Structure of the Cohesin Gatekeeper Pds5* (Byung-Gil Lee, Maurici B. Roig, Marijke Jansma, Naomi Petela, Jean Metson, Kim Nasmyth, Jan Löwe)

podjednotkou Kohesinu. WAPL se váže s Kohesinem přes Scc1 podjednotku a SA1 nebo SA2 podjednotkou. Na centromery je WAPL lokalizován Sororinem a Haspin. Sororin a Haspin obsahují ve své struktuře stejný motiv YSR, který WAPL a Pds5B využívají k interakci. U Haspinu se tento motiv nazývá PIM. PIM umožňuje interakci s motivem WAPL zvaným HIM, a protože je tato interakce mezi Haspin a WAPL silnější než mezi WAPL a Pds5B, může Haspin zabránit vazbě Pds5B a WAPL a zastavit tak disociaci Kohesinu na centromerách. Pds5B také napomáhá k lokalizaci Haspin na centromerách a je potřebný pro fosforylaci H3T3. [45][46][47][49]

Disociace Kohesinu prostřednictvím WAPL ale není jediný proces, který se během mitózy odehrává. Sgo1 částečně potlačuje disociaci Kohesinu, neboť se váže na fosfatázu PP2A a zabraňuje fosforylaci SA2 podjednotky Kohesinu, což způsobuje rezistenci Kohesinu vůči WAPL. Zbytek Kohesinu, který WAPL neodstraní, je proteolyticky odštěpen proteázou

zvanou Separáza. Separáza disociuje zbylý Kohesin prostřednictvím odštěpením kohesinové podjednotky Scc1, čímž dojde k uvolnění chromosomu ze smyčky Kohesinu. [48][45]

Další studie poukazují také na interakci Haspinu s C-koncovou jednotkou topoizomerázy II, která může být rovněž příčinou lokalizace Haspin na chromozomech. (obr. 9) [9] Poté, co byl na TopoII přidán malý SUMO protein, interaguje TopoII s Haspinem a lokalizuje tak Auroru B na vnější straně centromery. Haspin má dva motivy (SIM), prostřednictvím nichž interaguje s TopoII a SUMO proteinem. Inhibice TopoII způsobuje aktivaci SAC. SAC je regulační mechanismus, který nedovoluje pokračování v mitóze, pokud nejsou vřeténkové mikrotubuly správně přilnuté k chromosomům. [45]



Obrázek 9: Schématické zobrazení lokalizace Haspinu na chromosomech. Převzato z *The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors* (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier and Sandrine Ruchaud)

3.3 Biologická funkce Haspinu

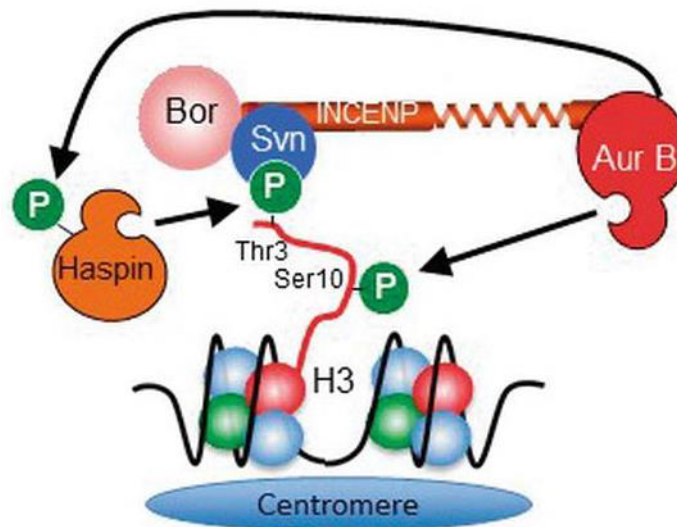
Dělení buněk probíhá v procesu zvaném mitóza. Během tohoto životně důležitého cyklu dochází k procesu kondenzace chromatinu, uspořádání chromosomů, k jejich separaci a cytokinezi. Pro správné dělení buněk musí tyto procesy proběhnout v určité sekvenci. Z tohoto důvodu musí být struktura chromatinu a dělicího vřeténka přesně regulována. Chyby v tomto procesu mohou vést ke genové nestabilitě a vzniku nádorového bujení. [13]

Správný průběh mitózy zajišťuje několik kináz. Konkrétně se jedná o kinázy ze skupiny cyklin-dependentních kináz, Aurora B, Polo a NIMA/Nek skupiny, které fosforylují substráty na chromatinech a vřeténkách a regulují tak jednotlivé fáze během mitózy. [13]

Histon H3 tvoří dvě jednotky z histonového oktameru (H3, H2B, H2A a H4), který vytváří DNA nukleozom. Histonová fosforylace je jednou z modifikací, které mění chromatinovou strukturu, což hraje důležitou roli např. v procesu regulace transkripce nebo kondenzace chromosomu. Fosforylace H3T3 se objevuje během profáze a trvá až do anafáze. [45]

Aurora B zajišťuje chromosomální bi-orientaci při metafázi přilnutím k dělicímu vřeténku a je zapojena do separace chromatidových vláken a cytokineze. [13] Během mitózy jsou vřeténkové mikrotubuly lokalizovány na pólech zvaných centrozomy. Centrozomy se běžně skládají ze dvou centriol, které udržují strukturu pólů. [16] Mimo jiné je také Aurora B nezbytná pro fosforylaci histonu H3, ale ukazuje se, že není jedinou kinázou zapojenou do tohoto procesu. [13]

Studie prokázaly, že hlavní kinázou, fosforylující Thr3 histonu H3 během mitózy, je kináza Haspin. Haspin je kináza nezbytná pro správné seřazení chromosomů. Je propojena s chromatiny a dělicím vřeténkem a během mitózy je fosforylována. [13]

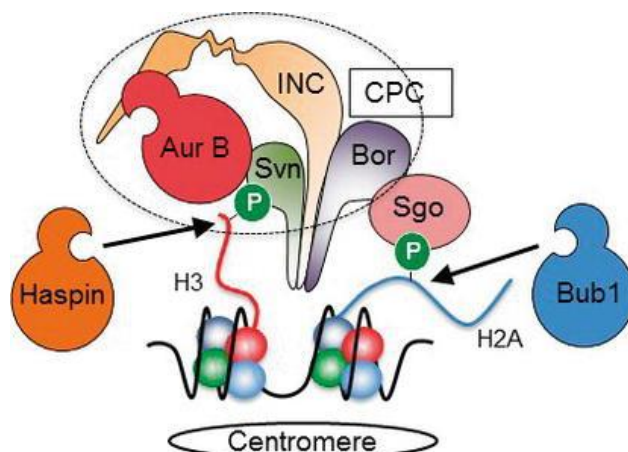


Obrázek 10: Regulace CPC komplexu prostřednictvím Haspin kinázy. Aurora B fosforyluje N-konec Haspin kinázy a zesiluje její aktivitu. Převzato z *The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors* (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Syl)

Synergie událostí na chromosomech a cytoskeletu je regulována prostřednictvím CPC (chromosomal passenger complex) komplexu, který zajišťuje správné přilnutí chromosomů a mikrotubulů, taktéž aktivaci dělicího vřeténka a zajišťuje procesy vedoucí ke správné cytokinezi (obr. 10). [18][41] CPC komplex je složen ze čtyř jednotek: Survivin (Svn), Borealin (Bor), INCENP a kinázy Aurora B. [9] INCENP, Svn a Bor mají regulační funkci a Aurora B disponuje enzymatickou funkcí a je zodpovědná za opravu chyb během přilnutí vřeténkových mikrotubulů, což je umožněno regulací aktivity MCAK (mitotic centromere-associated kinesin), který dokáže depolymerizovat mikrotubuly. Survivin je jednotka, která rozeznává H3T3ph a INCENP je jednotka, která slouží jako most mezi Svn a Aurorou B. [45] CPC provede buňku procesy metafáze-anafáze prostřednictvím regulace správného přilnutí kinetochor a mikrotubulů. [15] Pro správný průběh mitózy je esenciální správné propojení kinetochor všech sesterských chromatid a mikrotubulů pólů dělicího vřeténka. Stablní bi-orientace chromosomů je dosaženo právě prostřednictvím CPC komplexu. [20] Během profáze se CPC komplex nachází na ramenech chromosomů a centromerách. [18] K vazbě na

centromeru dojde prostřednictvím Haspin kinázy, která fosforyluje H3T3 a vytvoří tak vhodné místo pro navázání CPC komplexu. [19] Během anafáze se přesouvá na vřeténkové mikrotubuly a během telofáze se nakonec akumuluje v oblasti Mid-body. [18] Během metafáze kontroluje správné seřazení chromosomů. [15] H3T3 je přímo rozeznáván BIR doménou Survivinu, částí CPC komplexu, což tedy vede k ukotvení CPC na centromerách. [9] Během anafáze dochází k defosforylaci H3T3 a CPC se přesune do Mid-Body, kde reguluje cytokinezi. Haspin je tudíž kináza, která určuje lokalizaci CPC, čímž reguluje mitotický cyklus. [15]

Haspin ale není jediný prostředek, díky kterému se CPC komplex dostává na centromery. Druhá paralelní cesta zahrnuje fosforylaci histonu H2A na Thr-120 (H2AT120) prostřednictvím Bub1 kinázy. Bub1 kináza je fosforylována Plk1 kinázou, která dále fosforyluje H2AT120, který tvoří vazebnou stranu pro Shugoshin 1 (Sgo), protein chránící centromerickou kohezi (obr. 11). Sgo dále podporuje akumulaci CPC komplexu na centromerách tím, že váže PP2A a nedovoluje tak defosforylaci proteinů a aktivaci Repo-man. Shugoshin se přímo váže na Survivin a Borelin CPC komplexu a vykonává funkci podobnou Haspin kináze. Hlavním úkolem proteinové kinázy Haspin je, společně s Bub1 kinázou, lokalizovat CPC komplex na centromerách. [9][45]



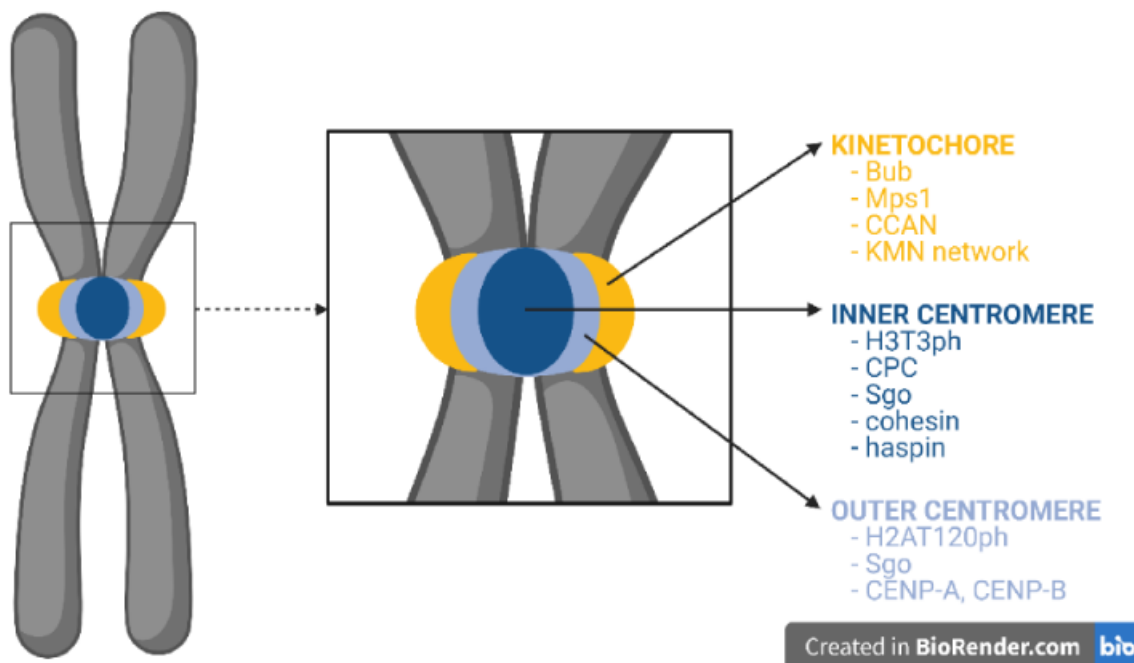
Obrázek 11: Lokalizace CPC komplexu na centromerách prostřednictvím Haspin a Bub1 kinázy. Převzato z *The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors* (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier and Sandrine Ruchaud)

Inhibice Haspin kinázy má za následek významný pokles fosforylace histonu H3, což vede k prodloužení pro-metafáze a metafáze a k významnému defektu uspořádání chromosomů. Mitotická vřeténka jsou taktéž neuspořádaná a dochází k předčasné separaci chromatidových vláken. [45]

3.3.1 Haspin lokalizuje CPC komplex na centromerách

Lokalizace CPC komplexu na centromerách je klíčový proces pro průběh mitózy. Centromery lze rozdělit na dvě části; vnitřní a vnější centromeru, které se liší proteiny, které s těmito jednotkami během mitózy interagují. (obr. 12) Kinetochora je proteinový komplex, který je

tvořen na vnější centromer a na který přiléhají mikrotubuly, jež oddělují sesterské chromatidy během mitózy. H3T3ph se prvně objevuje na ramenou chromosomů v profázi. V průběhu mitózy je pak silnější signál H3T3ph pozorován na vnitřních centromerách, což je způsobeno aktivitou PP1/Repo-man komplexu. [45]



Obrázek 12: Struktura chromosomu s vyznačenou vnitřní a vnější centromerou společně s kinetochorou. Převzato z *Haspin kináza jako cíl protinádorové strategie* (Aneta Jarošková)

3.4 Regulace aktivity kinázy Haspin

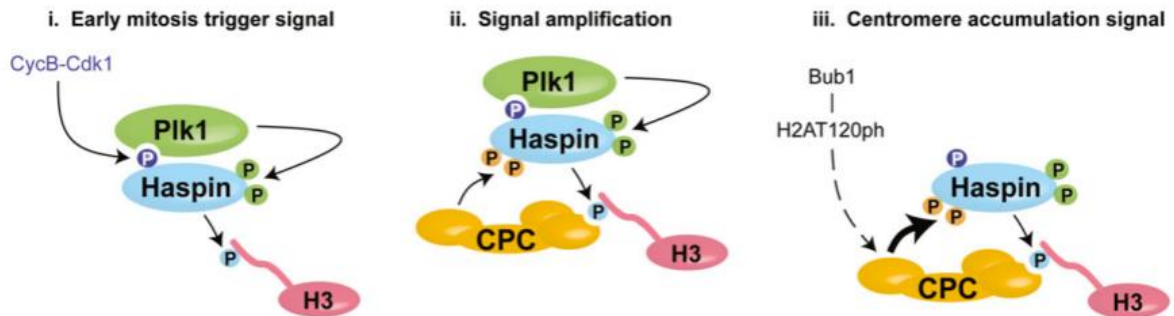
Haspin fosforyluje histon H3T3 během mitózy, ale na rozdíl od kinázy Aurory B a Plk1, které jsou na konci mitózy degradovány, je exprese Haspinu udržována na téměř konstantní úrovni během celého buněčného cyklu. Během mitózy je Haspin velmi silně fosforylován a bylo odhaleno 30 míst na N-koncové smyčce Haspinu, kde tato fosforylace probíhá. Ukazuje se, že zásahy do N-koncové smyčky Haspinu dokáží pozměnit její enzymatickou aktivitu. Modifikace a navázání proteinů na N-koncovou část Haspinu má proto potenciál pro regulaci aktivity Haspinu. [21]

Auto-inhibice kinázy Haspin zajišťuje, aby byl Haspin aktivní pouze během mitózy. Auto-inhibice nastává v průběhu interfáze, prostřednictvím segmentu v N-koncové smyčce zvaném HBIS. HBIS interaguje se zbytkem struktury Haspinu a zabraňuje vazbě s H3T3, ale po jeho odstranění se Haspin opět stává aktivní a znovu může fosforylovat H3T3 během interfáze. [45]

Než se Haspin zapojí do mitózy, je samotná kináza fosforylována na Thr-128 prostřednictvím kinázy Cdk1 (obr. 13). Haspin fosforylovaný Thr-128 slouží jako signál pro kinázy Plk1, které fosforylaci Haspinu ještě zvýší. Tato zvýšená fosforylace Haspinu zasahuje do interakcí

s HBIS, což ukončuje auto-inhibici a stimuluje aktivitu kinázy. Obě kinázy Cdk1 a Plk1 jsou důležitými regulačními prvky buněčného cyklu a Haspin je pouze jedním z mnoha jejich dalších substrátů. [9][42][45]

Dalším mechanismem aktivace Haspinu je fosforylace prostřednictvím Aurory B. Haspin fosforylovaný H3T3 slouží jako signál pro CPC komplex, jehož je Aurora B součástí. Aurora B fosforyluje Haspin a generuje tak silnější signál pro vlastní akumulaci Aurory B na chromozomech. Bez kinázové aktivity Aurory B nemůže Haspin nikdy dosáhnout úplné fosforylace.



Obrázek 13: Mechanismus fosforylace Haspin. (i) Cdk1 kináza fosforyluje Haspin a vytváří místo k navázání Plk1 kinázy, která zesílí fosforylaci Haspin a umožní jí fosforylaci H3T3. (ii) Navázání CPC komplexu (iii) alternativní varianta fosforylace H2A kinázou Bub1. Převzato z *Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis* (Zhou L, Tian X, Zhu C, Wang F, Higgins JM.)

Aurora A je také v menším měřítku zahrnuta ve fosforylaci Haspinu nezávisle na Aurorě B a Plk1. Fosforylace je zahájena v brzké G2 fázi buněčného cyklu, což zajišťuje efektivnější akumulaci CPC na H3T3ph centromer. [9][42][45]

3.5 Funkce Haspinu během meiózy

Meióza, proces dělení generující haploidní buňky, je náchylný k poruchám, které vedou u žen k aneuploidii, která vzniká v důsledku poruchy dělicího vřeténka nebo centromer. [15]

Přítomnost Haspinu byla potvrzena v myších oocytech. [9] Vyskytuje se společně s chromatinem a H3T3ph ve všech fázích meiózy. Během Metafáze I byla kináza Haspin detekována na centromerách a sesterských chromatidech. Po metafázi I se nachází v kůře oocytů v blízkosti chromatin a dělicího vřeténka.

Haspin je vyžadována v tomto procesu pro obnovení meiózy a k regulaci Aurory C-CPC lokalizace na inter-chromatinové ose. V případě narušení aktivity Haspinu dochází k nesprávnému přilnutí kinetochor a mikrotubulů což nakonec vede k aneuploidním vajíčkám. Haspin tak reguluje segregaci chromosomů v myších oocytech. [15]

4 INHIBITORY PROTEINOVÝCH KINÁZ

Lidský kinom obsahuje více než 500 proteinových kináz přenášejících γ -fosfát z ATP na proteiny. Během rakoviny byla častokrát u mnoha těchto kináz, včetně mitotických kináz, pozorována změna jejich exprese během buněčného cyklu. Častá skupina kináz, která je v průběhu rakoviny deregulována, jsou kinázy skupiny Aurora. Přílišná exprese Aurory A i Aurory B vede k různým typům rakoviny jako je rakovina vaječníků, nemalobuněčný karcinom plic a mnoha dalším. [45] Nedávný rozvoj kinázových inhibitorů na bázi malých organických molekul pro léčbu různých druhů rakoviny se prokázal jako úspěšný, a tak bylo od vývoje prvního proteinového kinázového inhibitoru (v 80. letech) schváleno již více než 50 inhibitorů proteinových kináz pro léčbu rakoviny. A co víc, více než 150 potenciálních inhibitorů je ve fázi klinických testů a mnoho dalších inhibitorů v preklinické fázi vývoje. [43]

Kinázy hrají důležitou roli v karcinogenezi a metastázi různých druhů nádorových onemocnění, neboť podporují proliferaci buněk, jejich přežití a v případě jejich přílišné exprese také ovlivňují onkogenezi. V posledních třech desetiletích byly objeveny zhoubné nádory spojené s modulací a dysfunkcí proteinových a lipidových kináz a deaktivovaných fosfatáz, což vedlo k chybnému přeskupování chromosomů a ke genetickým mutacím. Mimo onkologické problémy mají kinázy vliv i na imunitní, neurologické a infekční nemoci, a tak se kinázy staly atraktivním cílem pro vývoj nových léčiv. [43]

Inhibice různých signalizačních drah kináz může být daleko méně toxická vůči zdravým nerakovinotvorným buňkám, neboť umožňuje selektivní destrukci nádorových buněk. Většina inhibitorů cílí na ATP-vazebné místo kinázy, ale existují i ATP nekompetitivní inhibitory, jež se váží na alosterickou stranu. Na základě toho, jakým mechanismem inhibitor působí, lze inhibitory rozdělit do několika skupin. [43]

Typ I reprezentuje ATP-kompetitivní inhibitory, které často napodobují strukturu purinu, resp. adeninové části ATP. Tyto kinázové inhibitory se vodíkovými můstky váží na katalytickou stranu aktivní kinázy. Inhibitory typu I jsou nicméně často poměrně neselektivní vzhledem k tomu, že ATP-vazebná kavita je u většiny kináz značně podobná, a tak tyto inhibitory mohou mít nežádoucí vedlejší účinky. [43]

Inhibitory typu II se nekovalentně váží na neaktivní konformaci kinázy a interagují s DFG. Vzhledem k diverzitě konformací inaktivních kináz, se tento typ inhibitorů obecně jeví jako selektivnější v porovnání s inhibitory typu I. [43]

Inhibitory typu III a IV jsou alosterické inhibitory. Jejich mechanismus spočívá v alosterické regulaci kinázy. Po navázání inhibitoru dojde u kinázy ke změně v konformaci a kináza tak není dále schopná vázat ATP a zůstává inaktivovaná. Typ III se na rozdíl od inhibitorů typu IV váže na vnější stranu katalytické jednotky. [43]

Poslední inhibitory typu V jsou inhibitory kovalentní. Inhibitory vytvoří pevnou kovalentní vazbu s aktivním místem kinázy, konkrétně s volně přístupnou cysteinovou jednotkou. Tyto

inhibitory obecně tvoří značně stabilní komplexy s příslušnými kinázami a jejich toxicita může být poměrně nízká. [\[43\]](#)

4.1 Biochemický mechanismus

Biochemický mechanismus inhibitorů proteinových kináz se liší v závislosti na stavu proteinové kinázy, tedy jestli se kináza nachází v aktivované případně deaktivované konformaci, což zahrnuje stav DFG (aktivní – in, inaktivní-out), C-helixu (aktivní – in, inaktivní-out) a regulační jednotky (je-li R-spine aktivní–lineární, nebo inaktivní-nelineární). [\[43\]](#)

Mimo alosterické inhibitory, tvoří inhibitory vodíkové můstky s jednotkou hinge. Celkově vytváří většina inhibitorů hydrofobní kontakt s katalytickou jednotkou, s regulační jednotkou uvnitř C-helixu a s jednotkou gatekeeper. [\[43\]](#)

Existuje mnoho způsobů, jak se inhibitory váží na cílenou kinázu a tyto interakce se ještě různí v závislosti na tom, jestli se jedná o inhibitor, který se váže kovalentně nebo nekovalentně s ATP vazebnou stranou. Na této straně se adeninová jednotka ATP váže prostřednictvím dvou vodíkových můstků na spojku spojující N a C smyčky – jednotka hinge. O aktivním či neaktivním stavu kinázy rozhoduje pozice A-smyčky, zahrnující DFG motiv, který může zaujmout několik konformací. Jediná složka kináz, která se mezi aktivními a inaktivními kinázami neliší, je katalytická smyčka. Kináza se stává aktivní, pokud Asp v DFG koordinuje Mg^{2+} , což připravuje fosfát ATP k transportu. Kináza se vrací do inaktivní formy, jakmile dojde k transportu fosfátu na cílený protein. Tento proces zahrnuje návrat A-smyčky do uzavřené pozice prostřednictvím změny konformace DFG do inaktivního DFG-out stavu. [\[43\]](#)

Nekovalentní kinázové inhibitory se liší v tom, zda se váží na jednotku hinge. Inhibitory typu I se na tuto jednotku váží a reprezentují většinu nekovalentních inhibitorů. [\[43\]](#)

Inhibitory typu II se váží na DFG-out konformaci kinázy a způsobují změnu konformace tak, že už není kináza schopna dále vykonávat svou funkci. Inhibitory také využívají hydrofobní kapsu přilehlou k ATP straně, která je přístupná díky změně konformace z DFG-in na DFG-out, což činí inhibitor velmi selektivním. [\[43\]](#)

Inhibitory typ III mohou být též velmi selektivní, neboť se zaměřují na vazebná místa a regulační mechanismy kinázy, které jsou u většiny kináz unikátní. Obsahují heterocyklus, který tvoří jednu nebo dvě vodíkové vazby s jednotkou hinge. Inhibitory také vynucují u kinázy konformaci DFG-out a přemisťují fenylalaninovou stranu řetězce do nové pozice. [\[43\]](#)

Kovalentní inhibitory tvoří kovalentní vazbu s cysteinovou nebo jinou nukleofilní jednotkou v ATP-vazebné kavitě. Tyto inhibitory byly vytvořeny zabudováním elektrofilní jednotky do své struktury. Inhibitory se váží na cystein ve vazebné straně nebo v jejím okolí a zabráňují navázání ATP. Inhibitory podléhají Michaelově reakci, což je reakce, která zahajuje adici nukleofilu (cysteinu) na elektronově chudou $C=C$ vazbu. Reakce vede k deaktivování kinázy, protože blokuje vazbu ATP ke kináze. Inhibitory mohou být vysoce selektivní, neboť inhibitor cílí na cysteinovou jednotku, která se nachází na specifickém místě kinázy. [\[43\]](#)

S využíváním kinázových inhibitorů přicházejí však i jistá omezení. Jedním z nich je možná rezistence na určitý inhibitor, což vede k selhání jeho funkce. Během léčby je tato rezistence často vyvolána změnou v kinázové jednotce gatekeeper. Inhibitory se na této jednotce váží prostřednictvím hydrofobních interakcí a jakákoliv změna v této jednotce těmito interakcím brání. Změna konformace kinázy je ve většině případů spojena se záměnou jedné aminokyseliny za druhou. K předejití ztráty aktivity kvůli těmto mutacím je nutné vytvořit inhibitor, který by tuto rezistenci obešel. Inhibitory jsou vylepšovány tak, aby jejich vazba byla kompatibilní s více druhy aminokyselin, další možností je vývoj inhibitorů, které cílí na alternativní místa v proteinové kináze. [43]

Další problém inhibitorů se týká jejich specifity. Například většina kináz skupiny ePK mají podobnou kinázovou strukturu, a tak nejsou inhibitory často dostatečně specifické na to, aby interagovaly pouze s jedním druhem kinázy, což může způsobit řadu vedlejších účinků. [45]

4.2 Inhibitory kinázy Haspin

Jak již bylo řečeno, mitotické kinázy mají vliv na regulaci buněčných procesů a staly se tak cílem mnoha výzkumů vyvíjející nová léčiva, jež by mohly tyto kinázy kontrolovat prostřednictvím jejich inhibitorů.

S nekontrolovanou expresí Haspinu se setkáváme u několika druhů rakoviny, např. Burkittova lymfomu, nádorů prsou, rakoviny slinivky břišní a chronické lymfatické leukemie. Typy nádorů spojené s nadměrnou expresí Haspinu sdílejí jeden společný znak, a to zhoršení prognózy u pacientů, u nichž byla tato exprese Haspinu pozorována oproti pacientům, u nichž byla hladina Haspinu nezměněna, což podnítilo výzkum a vývoj několika inhibitorů. [9][50][51]

Mezi potenciálními inhibitory Haspin kinázy byly zařazeny některé akridinové deriváty jako **LDN-192960** a **LDN-209929**. Poslední zmíněný inhibitor byl velmi selektivní, ale v důsledku nežádoucích účinků nejsou inhibitory s tímto aromatickým systémem podporovány ve vývoji léčiv. [44]

Beta karbolinové deriváty jako jsou Harmine a Harmalol tvoří inhibitory cílené na kinázy skupiny DYRK a v nedávné době byly klasifikovány taktéž i jako inhibitory Haspin, ale jejich nežádoucí halucinogenní účinky na CNS tyto sloučeniny značně omezuje, ale základ jejich struktury by mohl sloužit k vývoji nových modifikovaných léčiv. [44]

Inhibitor **LDN-211898** vznikl na základě studií o beta karbolinových a akridinových derivátech. Jedná se o velmi selektivní inhibitor vůči Haspin. [44]

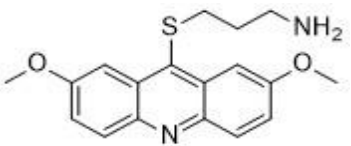
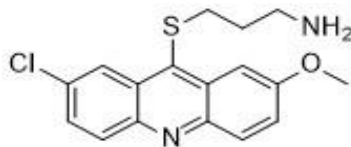
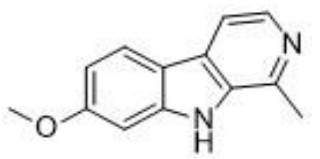
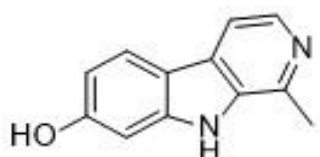
5-Iodotubercidin (5-ITu) byl původně adenosinový inhibitor [52]. Nedávno ale byla prokázána i efektivní inhibice Haspin kinázy, [53] kde se inhibitor váže na ATP-vazebnou stranu kinázy a způsobuje posun jednotek CPC komplexu. Ukázalo se, že inhibice Haspin touto látkou ovlivnilo i Auroru B, což vedlo k defosforylaci CENPA, proteinu, který se často objevuje při různých typech rakoviny. 5-ITu se jeví jako účinný inhibitor in vitro, ale vazba C-I je relativně (metabolicky) labilní, a proto jod coby substituent nebývá při vývoji inhibitorů příliš využíván. [44]

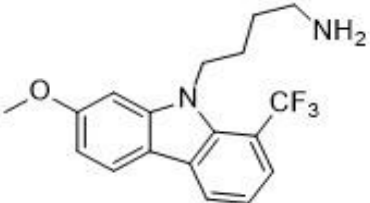
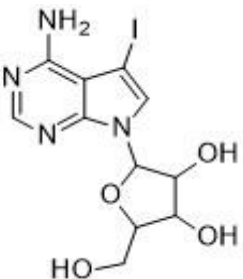
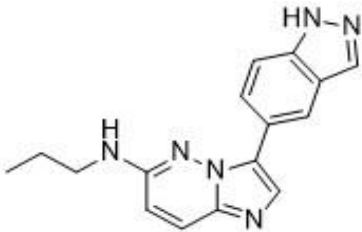
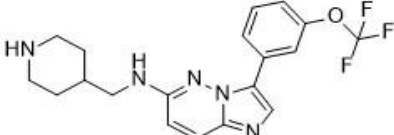
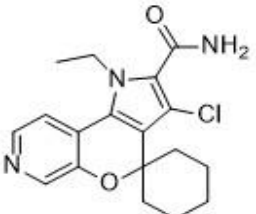
Inhibitor CHR4-6494 (3-(1H-indazol-5-yl)-N-propylimidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine) je členem nové generace antimitotických léčiv, které cílí na jiné složky mitózy než mikrotubuly. [44] Látka způsobuje chaotické procesy v nádorových buňkách, abnormální tvorbu dělicího vřeténka, vychýlení chromosomů a je příčinou zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M, potlačuje apoptózu a stala se tak cílem zájmu ve vývoji nových léčiv. [54][45]

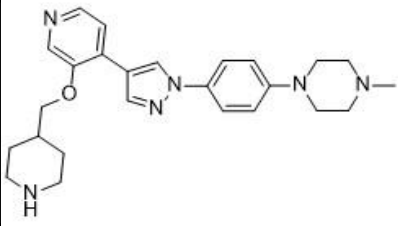
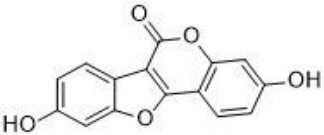
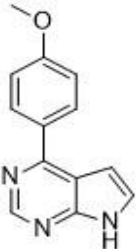
Coumestrol je další identifikovaný inhibitor Haspinu, který potlačuje proliferaci rakovinných buněk. Kromě Haspinu taktéž inhibuje i kinázy CK2, které ale nemají hlavní vliv na tvorbu rakoviny. Inhibitor pravděpodobně s Haspinem interaguje prostřednictvím vodíkových můstků a cytotoxicky působí na buněčné linie melanomu a rakoviny plic. [55]

7-azaindolové deriváty představují účinnou skupinu inhibitorů, jež inhibují Haspin a zároveň kinázy Cdk9/Cyklin T. [56]

Následující tabulka uvádí některé známé inhibitory Haspin kinázy.

| Struktura | IC50/nM | Název |
|---|---------|------------|
|  | 10 | LDN-192960 |
|  | 55 | LDN-209929 |
|  | 590 | Harmine |
|  | 770 | Harmalol |

| | | |
|---|-----|-----------------|
|  | 100 | LDN-211898 |
|  | 5-9 | 5-iodotubrcidin |
|  | 2 | CHR6494 |
|  | 34 | SGI - 1776 |
|  | 9 | L1 |

| | | |
|---|---------|--|
|  | 190 | NVS - MELK8a |
|  | 6 - 100 | Coumestrol |
|  | 0,11 | 4-(4-Methoxyphenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin |

Tabulka 2: Vybrané inhibitory Haspin kinázy. Informace převzaty z *The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors* (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier and Sandrine Ruchaud a *Haspin: a promising target for the design of inhibitors as potent anticancer drugs*. Amoussou NG, Bigot A, Roussakis C, Robert JH.)

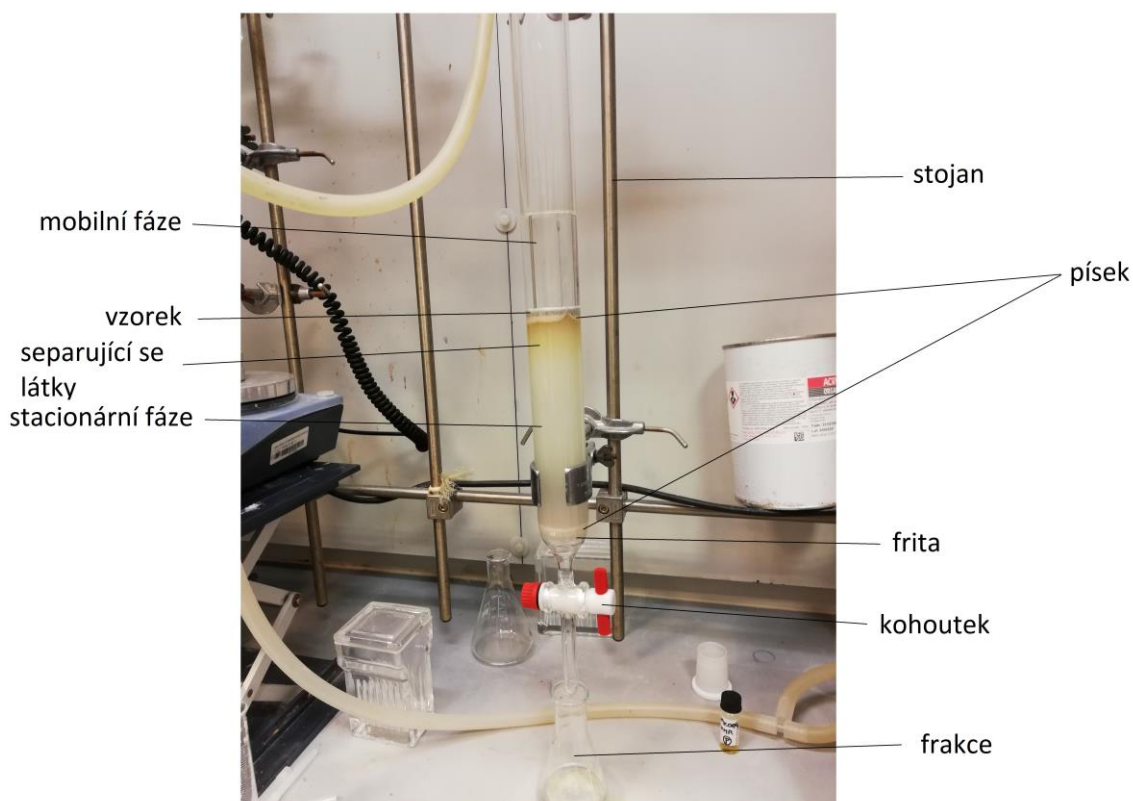
Naším cílem bylo pokusit se o přípravu nových sloučenin inhibitorů kinázy Haspin. Vybrali jsme cílové sloučeniny na bázi furo[3,2-*b*]pyridinu a pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu, protože s těmito třídami sloučenin skupina doc. Parucha dlouhodobě pracuje a některé z dříve testovaných sloučenin vykazaly vůči Haspinu určitou aktivitu (IC₅₀ ~ 0.5 μM). Cílové sloučeniny byly také designovány tak, aby obsahovaly vhodnou funkční skupinu (v našem případě substituent CH₂NH₂), která může být potenciálně dále modifikována a použita k výstavbě fluorescentního konstruktů pro NanoBRET esej (viz kapitola 12).

5 METODIKA

5.1 Kolonová chromatografie

Při syntéze většiny molekul v této práci byla použita separační metoda zvaná kolonová chromatografie. Metoda sloužila k separaci nežádoucích vedlejších produktů, které v reakční směsi vznikaly společně s produktem.

Aparatura se skládala ze skleněné kolony uchycené ke stojanu. (obr. 14) Spodní stranu kolony tvoří skleněná fritra, která brání v proniknutí stacionární fáze z kolony. Na fritu byla nanášena tenká vrstva písku jako ochrana, na kterou byl nanášen sloupec silikagelu jako stacionární fáze. Sloupec stacionární fáze byl několikrát promyt mobilní fází, aby částice silikagelu přilehly těsně k sobě. Na sloupec silikagelu byla opět nanášena vrstva písku sloužící k ochraně silikagelu a na vrstvu písku byl nanášen vzorek k separaci.

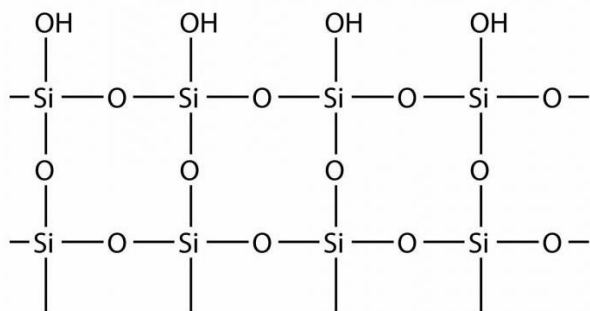


Obrázek 14: Popis aparatury pro kolonovou chromatografii

Celý separační proces je založen na schopnosti různě polárních látek interagovat se stacionární fází kolony. V kolonové chromatografii jsou použity dvě fáze; fáze stacionární a fáze mobilní. Stacionární fází tvoří v koloně velmi polární sloupec, na který je nanášen vzorek společně s mobilní fází. Mobilní fáze je kapalina, která unáší vzorek skrz polární sloupec. Každá látka ve vzorku prostupuje sloupcem různou rychlostí na základě intenzity interakce s polárním sloupcem kolony. Čím více je látka ve vzorku polární, tím silnější bude interakce se sloupcem,

a o to pomaleji bude látka kolonou prostupovat. Látky se tedy ve sloupci dělí a jsou postupně odebírány ve formě frakcí. K urychlení celého procesu bývá často používána tlaková pumpa.

Jako stacionární fáze se běžně užívá silikagel. Silikagel je bílý prášek složený z velmi jemných částic. Tvoří síť atomů křemíku pospojovaných přes atomy kyslíku. (obr. 15) Na povrchu siliky jsou navázané velmi polární hydroxylové skupiny OH, které interagují s látkami ve vzorku. Kromě silikagelu lze taktéž jako stacionární fázi použít např. oxid hlinitý.



Obrázek 15: Vrstva silika gelu. Převzato z <https://www.chemicals.co.uk/blog/what-is-silica-gel>

Složení mobilní fáze závisí na charakteru separované látky. V případě použití méně polární nebo nepolární mobilní fáze jako je např. cyklohexan, bude skrz kolonu prostupovat nepolární látka vzorku daleko rychleji oproti polární látce, jednak protože se rozpouštědlo neváže na polární sloupec silikagelu a taktéž protože nepolární mobilní fáze v sobě bude držet více nepolární látku ze vzorku, kterou bude unášet rychleji než polární látku, která tak zůstane opožděná. V případě, že už je frakce s nepolární látkou odebrána, můžeme urychlit prostupování polární látky skrz kolonu použitím polárnější mobilní fáze např. ethyl acetátu nebo methanolu. Polární mobilní fáze bude kompetitivně interagovat s polárním sloupcem siliky, která nebude již tak pevně vázat polární vzorek a rychlost prostupování kolonou se tak zvýší. Cílem je použít takovou mobilní fázi, aby byla zajištěna co nejefektivnější separace daných látek ve vzorku. Přesto, že princip kolonové chromatografie je poměrně jednoduchý a instrumentace není nijak komplikovaná, lze pomocí této separační techniky často (i našem případě) rozdělit značně komplexní směsi organických sloučenin.

V organické chemii bývají látky často bezbarvé a k identifikaci správné frakce s produktem je používána chromatografie na tenké vrstvě v kombinaci s vhodnou vizualizační metodou.

5.2 Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) je analytická metoda sloužící k monitorování reakce, stejně tak, jako k identifikaci látek na kolonové chromatografii. TLC funguje na stejném principu jako kolonová chromatografie, jen v menším měřítku.

Místo skleněné kolony jsou využívány menší hliníkové destičky pokryté tenkou vrstvou silikagelu. Na spodní stranu destičky, 1 cm od okraje, je tenkou tužkou zakreslena čára, do které

jsou zaznačeny startovní pozice nanášených vzorků. Pro monitorování reakce jsou standardně zaznačeny tři startovní místa. Jedna pozice slouží pro nanesení výchozí látky, se kterou byla reakce prováděna, druhé místo je vyhrazeno pro nanesení vzorku z probíhající reakce a na poslední pozici jsou naneseny obě látky, jak výchozí látka, tak i produkt vznikající v reakci. Látky jsou nanášeny tenkou kapilárou na vyznačená místa.

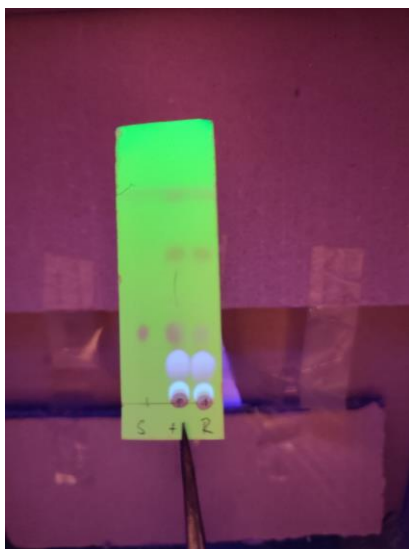
Vývoj TLC probíhá ve vyvíjející cele. Jako vyvíjející cela může být použita kádinka nebo skleněná komůrka s uzávěrem (obr. 16). Do cely je přidána mobilní fáze v takovém množství, aby sahala do výšky 0,5 – 1 cm. Cela je uzavřena a ponechána stát do té doby, než se vzduch v ní nasytí parami mobilní fáze.

Do vyvíjecí cely je poté pinzetou vložena hliníková destička s nanesenými vzorky a cela je uzavřena. Mobilní fáze se nechá vzlínat destičkou směrem k jejímu hornímu okraji. Nepochární látky budou unášeny rozpouštědlem nahoru a polární látky zůstanou na spodní straně destičky. Destička je z cely odebrána, jakmile rozpouštědlo dovzliná cca. 0,5 cm pod horní okraj destičky. Hranice, kam mobilní fáze došla, se označuje jako čelo a je zaznačeno tužkou jako tenká čára.



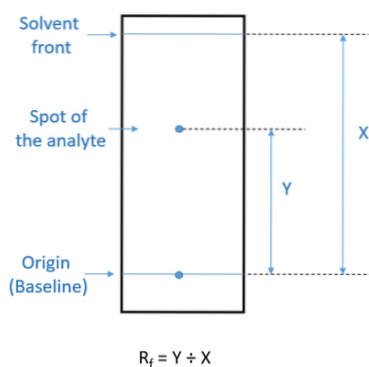
Obrázek 16: Vyvíjecí cela pro TLC s destičkou TLC uvnitř

Skvrny látek na destičce jsou následně vizualizovány pomocí UV světla nebo pomocí manganistanu draselného, či jiného tzv. vizualizačního činidla (obr. 17). Porovnáním skvrn na destičce lze následně vyčíst, zda proběhla reakce až do konce, nebo zda je stále přítomno nějaké množství výchozí látky. V případě, že veškerá výchozí látka již zreagovala, nebude ve sloupci, kde byl nanášen vzorek z reakce, viděna skvrna, která se objevuje ve sloupci, kde byla nanesena výchozí látka.



Obrázek 17: Vizualizace TLC pod UV

Následně může být vypočten retenční faktor R_f . Retenční faktor je číslo nabývající hodnoty mezi $0 \leq x \leq 1$. Udává informaci o tom, jak daleko zaostává skvrna analyzované látky za čelem rozpouštědla a je charakteristická pro danou látku v daném systému. Vypočítá se jako poměr uražené dráhy látkou a dráhy uražené čelem mobilní fáze (obr. 18).

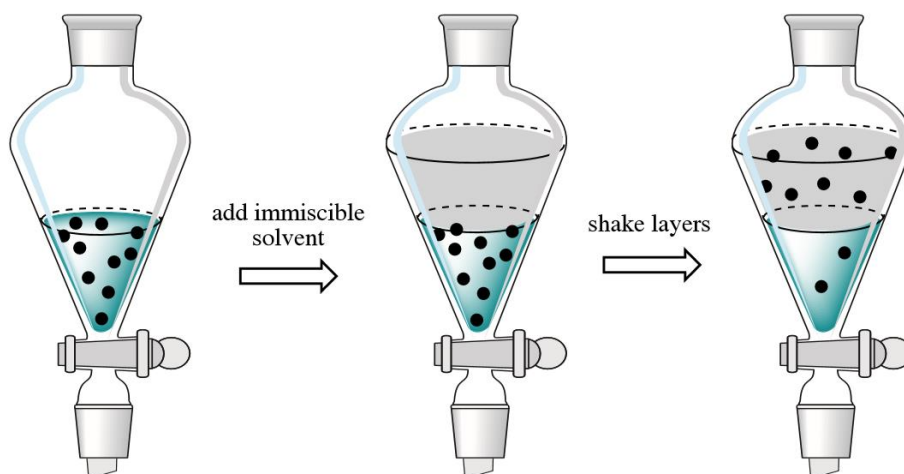


Obrázek 18: Výpočet retenčního faktoru. Y = dráha uražená látkou ze vzorku, X = dráha uražená čelem. Převzato z https://en.differbetween.com/article/how_to_calculate_rf_values_for_tlc

5.3 Extrakce

Další separační metoda použitá v této práci se nazývá extrakce. Jedná se o metodu, která umožňuje separaci látek na základě jejich rozpustnosti v rozdílných rozpouštědlech.

K extrakci se využívá dělicí nálevka, do které je umístěn vzorek určený k separaci (obr. 19). Látka se smísí se dvěma navzájem nemísitelnými rozpouštědly. V nálevce vzniknou dvě fáze, v nichž jsou látky ze vzorku distribuovány na základě jejich rozpustnosti v daném rozpouštědle. Pro správné rozpuštění veškerého vzorku je potřeba dělicí baňku protřepat. V tomto kroku je nezbytné uvolňovat tlak opakovaným otevíráním kohoutku, aby nálevka nepraskla. Jednotlivé fáze jsou poté odpuštěny separovaně do kádinek a případně dále podrobeny filtraci.

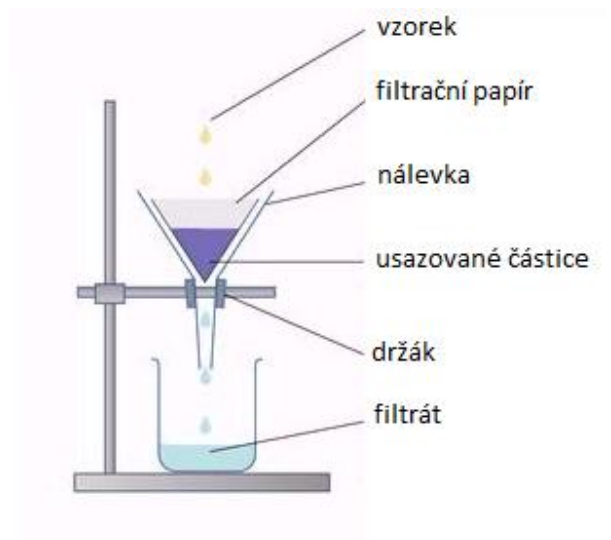


Obrázek 19: Průběh extrakce. Převzato z [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_\(Nichols\)/04%3A_Extraction/4.02%3A_Overview_of_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/04%3A_Extraction/4.02%3A_Overview_of_Extraction)

5.4 Filtrace

Poslední separační metodou užitou v této práci je metoda filtrace. Tato metoda slouží k separaci pevných nerozpustných částic látky od kapaliny, v níž jsou rozptýleny.

Jednoduchá filtrace se provádí s kádinkou a nálevkou (obr. 20). Ke stojanu je připevněna pomocí svorky nálevka, pod kterou je umístěna kádinka, do které bude odtékat filtrát. Do nálevky je umístěn filtrační papír (popř. vata). Přes filtrační papír je poté filtrována směs kapaliny a pevných částic, pevné částice se zachytí na filtračním papíru a čistá kapalina přeteče do kádinky.



Obrázek 20: Filtrační aparatura

6 SUZUKI-MIYAURA CROSS-COUPLING

Suzukiho-Miyaurova cross-couplingová reakce je pojmenována po svých objevitelích (A. Suzuki a N. Miyaura). [3] Jedná se o reakci, při níž vzniká vazba mezi atomy uhlíku v přítomnosti palladnatého, nebo palladného katalyzátoru. Reaktanty, které spolu reagují, jsou organoborové sloučeniny a organické halogenidy. [4] Výhodou těchto reakcí jsou mírné reakční podmínky, komerční dostupnost mnoha organoborových sloučenin a jejich nízká toxicita. Reakce jsou slučitelné s velkým množstvím funkčních skupin a mohou být prováděny i ve vodném prostředí. [4][3]

Reakce se, pro své poměrně mírné podmínky k vytvoření C-C vazby, využívá v mnoha syntézách léčiv. [5]

6.1 Mechanismus

Mechanismus reakce je podobný katalytickým cyklům ostatních cross-couplingových reakcí (schéma č. 1). Katalyzátorem této reakce je Pd katalyzátor v oxidačním stavu Pd⁰. V prvním kroku dojde k oxidativní adici, tj. inserci Pd⁰ mezi vazbu uhlík-halogen a vzniku Pd^{II}. Ve druhém kroku proběhne metatize – výměna aniontu navázaného na katalyzátor a aniontu navázaného na bázi. [7] Následuje transmetalace mezi Pd^{II} a alkyloborátovým komplexem, který vznikl reakcí organoborátu s bázi. [6] Posledním krokem je reduktivní eliminace, při níž vzniká jednoduchá vazba uhlík-uhlík a regeneruje se Pd⁰, které může vstoupit do dalšího cyklu. [4]

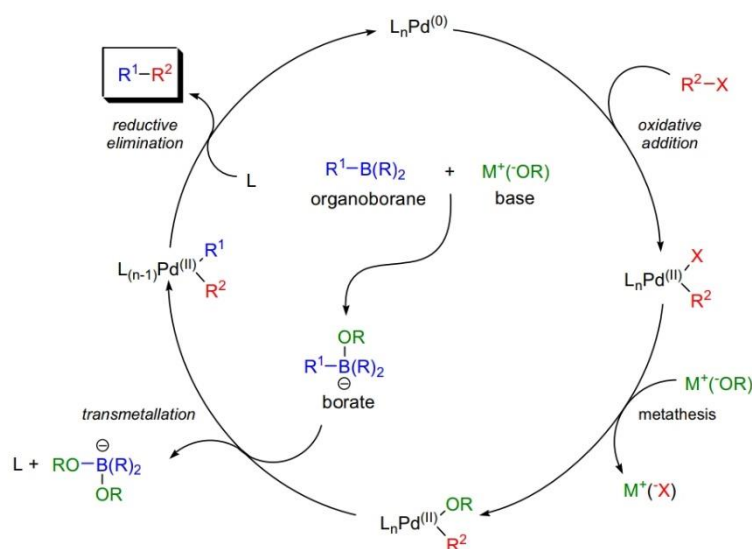
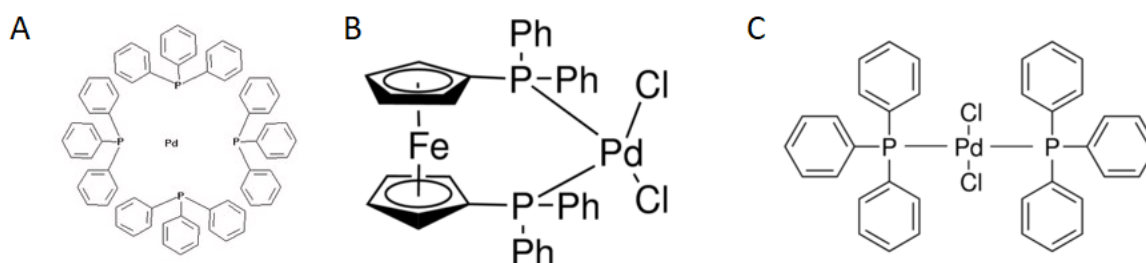


Schéma č. 1: Mechanismus Suzuki cross-couplingové reakce. Obrázek převzatý z knihy *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis* (László Kürti a Barbara Czakó)

6.2 Katalyzátory

Katalyzátory během reakce oslabují R-X vazbu elektrofilu během oxidativní adice, což nakonec vede ke vzniku dvouvazného komplexu R-Pd-X a umožňují tak další kroky reakce. [25]

Katalyzátory využívané při Suzukiho couplingu jsou katalyzátory na bázi palladia. Existuje několik vhodných katalyzátorů pro tuto reakci, které jsou stabilní i při vyšších teplotách, jsou elektronově bohaté a relativně ekologické. [26] Historicky první používaný katalyzátor byl Pd(PPh₃)₄ (obr. 21A). V současné době je pravděpodobně nejpoužívanějším katalyzátorem Pd(dppf)Cl₂ a Pd(PPh₃)Cl₂ (obr. 21B, 21C). Kvůli možné kontaminaci vzorku palladiem byly zkoumány i katalyzátory s jiným přechodným kovem než palladium. Vhodnou alternativou, díky menší velikosti, počtu oxidačních stavů a nukleofilnímu charakteru, je katalyzátor na bázi niklu. Mimo jiné existují i katalyzátory obsahující železo. [25]



Obrázek 21: (A) Katalyzátor Pd(PPh₃)₄ (B) Katalyzátor Pd(dppf)Cl₂ (C) Katalyzátor Pd(PPh₃)Cl₂. Převzato z <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en>

6.3 Báze

Průběh Suzukiho couplingu závisí mimo jiné i na tom, jaká báze je pro reakci zvolena. Hlavní rolí báze je tvorba borátového aniontu R-B(OH₃)⁻ z neutrální kyseliny borité R-B(OH)₂, čímž dojde ke zvýšení nukleofility, a tím pádem schopnosti reagovat s PdX komplexem.

Ačkoliv je reakce hojně využívána, není zcela znám mechanismus zahrnující transmetalaci, a to pravděpodobně z důvodu silné závislosti reakce na reakčních podmínkách. V této části cyklu hraje báze důležitou roli. Výtěžek reakce závisí na stechiometrickém množství použité báze.

Byly navrženy dva možné mechanismy, kterých se báze účastní (schéma č. 2). První možností (A) je mechanismus, kde dojde po oxidativní adici s nukleofilní částicí k výměně halogenu X na Pd^{II} katalyzátoru. Touto nukleofilní částicí může být anion báze použitý během Suzukiho reakce nebo jiný OH⁻ anion přítomen v roztoku. Anion musí být silná nukleofilní částice, aby dokázala vytěsnit halogen X jakožto odstupující skupinu z centra katalyzátoru. Tento intermediát poté reaguje s organoborátem během transmetalace a vytváří se R⁻-Pd^{II}-R komplex.

Druhá cesta (B) předpokládá, že báze atakuje organoborát a vzniká nukleofilní oranoborátový anion, který vymění svůj zbytek R za halogenid X v centru Pd^{II} při klasické transmetalaci. [27]

Mezi běžně užívané báze patří (K₂CO₃, Cs₂CO₃), K₃PO₄, a Et₃N

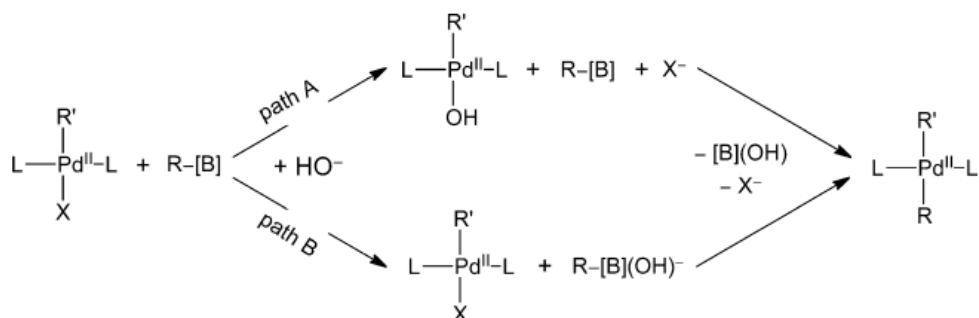


Schéma č. 2: Dva možné mechanismy, kterých se báze účastní. X = F, Cl, Br, I, L=ligand, OH⁻ použitá báze, R-[B] = organoborát. Převzato z *Role of the Base and Control of Selectivity in the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction* (Dr. Carlos F. R. A. C. Lima, Ana S. M. C. Rodrigues, Dr. Vera L. M. Silva, Prof. Artur M. S. Silva, Prof. Luís M. N. B. F. Santos)

6.4 Reaktivita arylhalogenidů

Arylhalogenidy (popř. alkenyl, alkynyl, allyl, benzyl halogenidy) v reakci vystupují jako elektrofil. Jejich reaktivitu při oxidativní adici lze zvýšit elektronakceptorními skupinami v pozici ortho, nebo para (popř. v alfa nebo beta pozici 1-alkenyl halogenidů). Nejreaktivnějším arylhalogenidem je aryljodid díky velikosti a polarizovatelnosti jodidového iontu. Reaktivita klesá v řadě I >> Br > OTf >> Cl > F. [26]

7 MIYAURAOVA BORYLACE

Příprava pinakolesteru kyseliny borité (schéma č. 3 látka 3) jakožto výchozího činidla pro Suzukiho coupling, vychází z palladiem katalyzované cross-couplingové reakce pinakolesteru kyseliny diborité [(Me₄C₂O₂)BB(O₂C₂Me₄)] (schéma č. 3 látka 1) a arylhalogenidu (schéma č. 3 - látka 2). Reakce je katalyzována Pd(dppf)Cl₂ v přítomnosti slabé báze octanu draselného v DMSO, nebo jiném aprotickém, polárním rozpouštědle a je slučitelná s velkým množstvím funkčních skupin, jako je nitro skupina, kyano skupina, či karbonylová skupina.

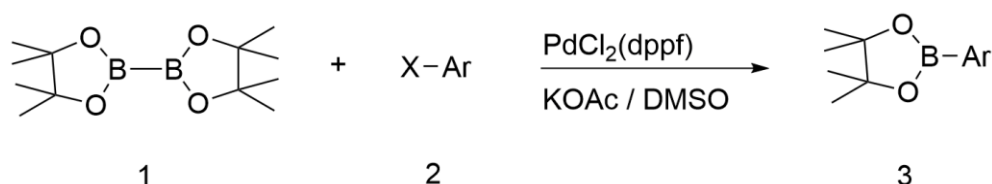


Schéma č. 3: Příprava pinakolesteru kyseliny borité. Převzato z *Palladium(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters* (Tatsuo Ishiyama, Miki Murata, and Norio Miyaura)

Mechanismem je katalytický cyklus, během něhož dojde v prvním kroku k transmetalaci, která zahrnuje oxidativní adici halogenarenu na Pd⁰ a vzniká komplex ArPd^{II}X. (schéma č. 4)

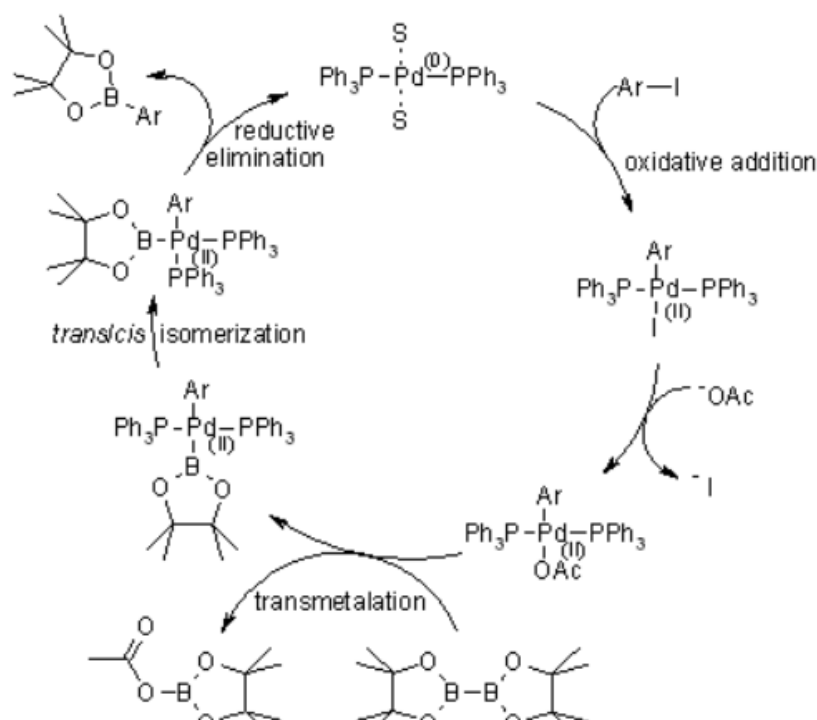


Schéma č. 4: Mechanismus Miyaurovy borylace. Převzato z <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/miyaura-borylation-reaction.shtml>

Transmetalace 1 a $\text{ArPd}^{\text{II}}\text{X}$ poskytuje intermediát $\text{ArPd}^{\text{II}}\text{B}(\text{OR})_2$ a reduktivní eliminací 3 se regeneruje zpět Pd^0 . [22]

Přítomnost báze je esenciální nejen k urychlení reakce, ale také zabraňuje tvorbě biarylových vedlejších produktů. V reakci se záporně nabitá báze po oxidativní adici koordinuje na komplex $\text{ArPd}^{\text{II}}\text{X}$ a ovlivňuje transmetalaci krok.

Největší výtěžek byl obdrženo při použití katalyzátoru $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$. V přítomnosti katalyzátoru $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ byl výtěžek nižší, neboť v reakci vzniká vedlejší produkt a další katalyzátory jako $\text{Ni}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pt}(\text{PPh}_3)_4$ a $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ reakci nekatalyzovaly vůbec.

Kromě arylhalogenidů lze reakci uskutečnit i s 1-alkenyl halogenidy. (schéma č. 5) Reakce vede ke vzniku pinakol 1-alkenylboritého esteru. [23]

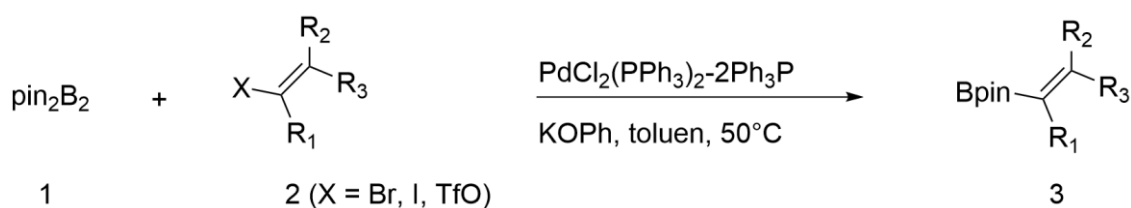


Schéma č. 5: Reakce pinakolesteru kyseliny diborité s halogenalkenem

Jako další výchozí látka, z níž lze připravit pinakolester, jsou fenoly (schéma č. 6). Fenol se typicky převede na příslušný trifluormethansulfonát, který se podrobí palladiem katalyzované reakci s bis(pinakolato)diboranem. V reakci vzniká pinakolester kyseliny borité. [24]

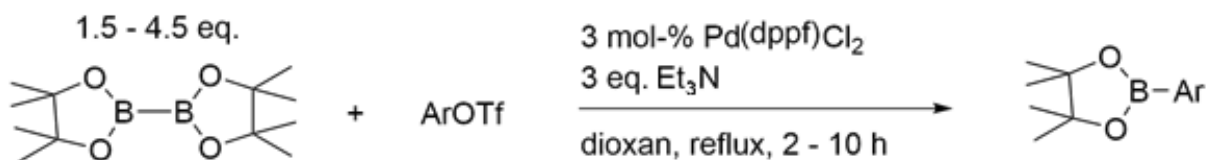


Schéma č. 6: Reakce pinakolesteru kyseliny diborité s trifluorometansulfonátem

8 SONOGASHIRA CROSS-COUPLING

V roce 1975 K. Sonogashira a jeho spolupracovníci publikovali práci, ve které popsali přípravu symetricky substituovaného alkynu reakcí acetylenů a aryljodidů v přítomnosti katalytického množství Pd(PPh₃)Cl₂ a CuI. [4]

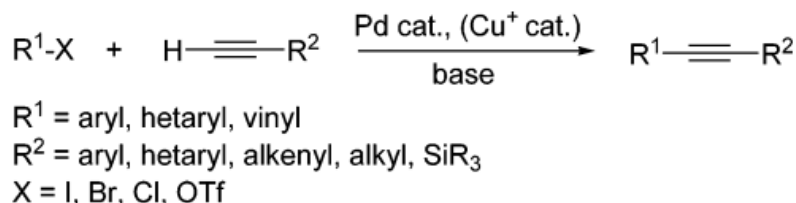


Schéma č. 7: Sonogashirova reakce arylhalogenidu a substituovaného alkynu. Převzato z *The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry* (Rafael Chinchilla and Carmen Nájera *Chemical Reviews*)

Reakce katalyzována palladiem a mědí se nazývá Sonogashira cross-coupling po svém objeviteli. [4] Jedná se o důležitou metodu přípravy arylalkynů, které jsou prekurzory různých farmaceutických léčiv a dalších organických materiálů. [28] Výhody této reakce spočívají v její proveditelnosti za laboratorní teploty, je slučitelná s velkým množstvím funkčních skupin a lze ji uskutečnit i s velmi malým množstvím výchozí látky. Aby nedošlo k explozi citlivých acetylidů mědi, je použito pouze katalytické množství měďné soli, která je komerčně dostupná jako CuI nebo CuBr. Reakce s méně reaktivními arylhalogenidy a objemnými substráty ovšem vyžaduje vyšší teplotu a terminální alkyny za těchto teplot podléhají vedlejším reakcím. [4]

8.1 Mechanismus

Mechanismus této reakce je stále poměrně málo prozkoumaný z důvodu obtížné izolace reakčních intermediátů, ale předpokládá se, že se cross-coupling řídí podobným cyklem jako Suzukiho cross-coupling. Cyklus je složen ze dvou navzájem nezávislých cyklů (schéma č. 8), ve kterých je přítomen terciární amin jako báze. Katalytický cyklus palladnatého katalyzátoru je založen na rychlé oxidativní adici arylhalogenidu na katalyzátor Pd⁰L₂ vzniklého redukcí různých katalyzátorů Pd^{II} nakoordinováním ligandů jako jsou fosfany, aminy nebo ethery. V dalším kroku dojde k propojení Pd-cyklu s cyklem mědi. Následuje rychlost určující transmetalace s acetylidem měďným, který vznikl v Cu-cyklu. Vzniká komplex R₁Pd(-C≡R₂)L₂, který reduktivní eliminací poskytuje finální produkt a obnovuje se katalyzátor pro nový cyklus. V cyklu mědi, báze (většinou amin) odštěpí proton acetylenů a je generován anion, který následně reaguje s měďným kationtem za vzniku acetylidu měďného. Je nutno zmínit, že aminy většinou nejsou dostatečně silnou bází, která by byla schopna deprotonovat alkyn za vzniku aniontového nukleofilu, který by měl formovat acetylid měďný. Proto pravděpodobně

dochází v průběhu cyklu ke vzniku π -alkyn-Cu komplexu, který by mohl být v cyklu zahrnut, a dochází tak ke zvýšení kyselosti alkynového protonu, čímž se stává lépe odštěpitelným. [28]

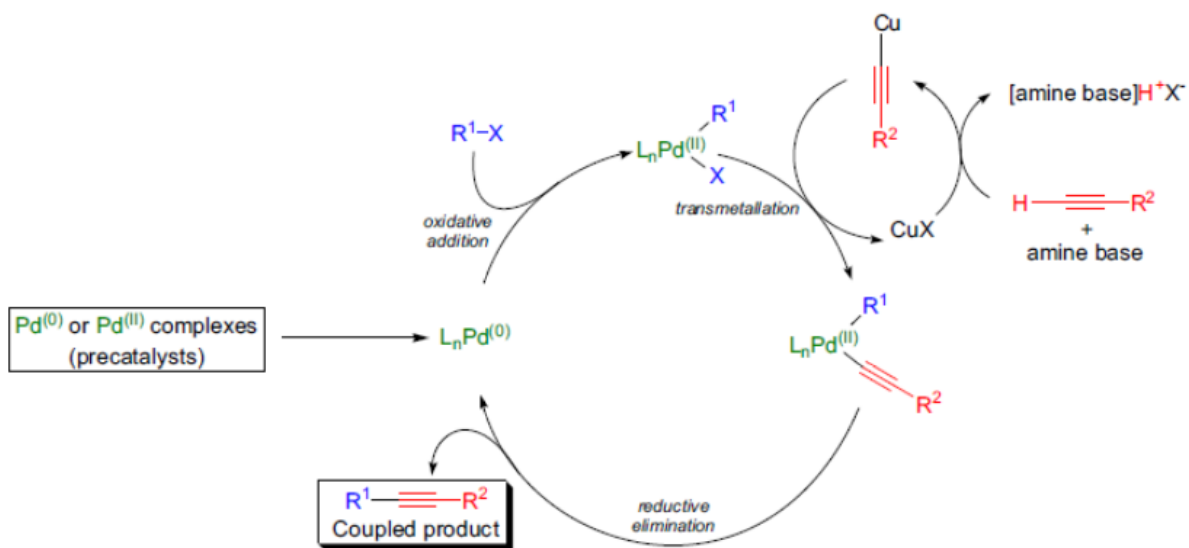
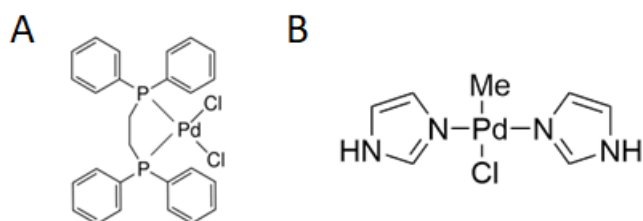


Schéma č. 8: Mechanismus Sonogashirova cross-couplingu. Převzato z knihy *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis* (László Kürti a Barbara Czako)

8.2 Katalyzátory

Typicky je Sonogashirova reakce prováděna v prostředí palladnatého katalyzátoru s fosfíny jako ligandy a měďného katalyzátoru. [29] Nejpoužívanější katalyzátory jsou $\text{Pd}(\text{PPh}_3)\text{Cl}_2$, nebo $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (obr. 21A). [4] Jsou používány i bidentátní ligandy jako $\text{Pd}(\text{dppe})\text{Cl}_2$ (obr. 22A) a $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (obr. 21B). Kromě katalyzátorů obsahující fosfor jsou v reakci používány i katalyzátory na bázi dusíku, jako např. katalyzátor bis-imidazolyl palladnatý (obr. 22B), který je účinný už při velmi malém množství. [29]



Obrázek 22: (A) Katalyzátor $\text{Pd}(\text{dppe})\text{Cl}_2$ (B) Katalyzátor bis-imidazolyl palladnatý

8.3 Reaktivita arylhalogenidů

Snadnost průběhu této reakce závisí na tom, s jakým substrátem je reakce prováděna. [28] Obecně reaktivita klesá v řadě vinyl jodid \geq vinyl triflát > vinyl bromid > vinyl chlorid > aryl jodid > aryl triflát > aryl bromid \geq aryl bromid \gg aryl chlorid [29], a proto coupling běží hladce, když jsou používány dražší a méně stabilní aryljodidy případně vinyljodidy. V případě, že je halogenidových systém aktivovaný, tedy elektronově chudý, probíhá reakce ochotněji. Proto obecně není vhodné reakci provádět s deaktivovanými bromidy či aryl chloridy. [28]

9 CHRÁNICÍ SKUPINY

V této práci byla použita chránicí skupina Boc, která byla následně kyselou odstraňována. V případě, že má být reakce provedena selektivně na jedné funkční skupině molekuly, která obsahuje více funkčních skupin, které jsou stejné, nebo mají příbuznou reaktivitu, musí být tyto ostatní funkční skupiny zablokovány (ochráněny). Pro tento účel bylo navrženo velké množství funkčních skupin. Ochranné skupiny musí splňovat několik kritérií. Odstranění skupiny musí být proveditelné za podmínek kompatibilních se zbytkem molekuly. Chránicí skupiny by měly mít minimální vliv na funkčnost sloučeniny, aby se předešlo nechtěným vedlejším reakcím. [30] A v neposlední řadě by chránicí skupiny měly být stabilní za podmínek prováděných reakcí. [31]

Každá chránicí skupina prodlužuje syntézu typicky o dva kroky, během kterých se skupina musí na sloučeninu zavést a následně, po provedení příslušných reakcí, odstranit. [31] Každá skupina taktéž vyžaduje jiné podmínky pro její zavedení a odstranění, na což musí být brán zřetel v případě, že pracujeme s více než jednou chránicí skupinou, aby se předešlo nechtěnému odstranění více skupin než pouze těch, které odstranit potřebujeme.

9.1 *tert*-Butyl karbamát (Boc)

Tert-Butyl karbamát (Boc) je pravděpodobně nejčastěji používaná skupina k ochraně aminoskupiny. [32] Slouží jako vhodná náhrada ochrany skupiny pomocí acylace, která je snadná, ale vyžaduje náročné podmínky pro odstranění, které nejsou kompatibilní s mnoha funkčními skupinami. [33] Zavedení této skupiny na sloučeninu nevyžaduje žádné extrémní podmínky a výtěžky této reakce jsou často vysoké.

Typicky je reakce uskutečněna ve vodném prostředí, případně v prostředí voda/THF, THF či acetonitril za laboratorní teploty, případně je směs zahřívána na 40 °C, v přítomnosti báze. Běžně užívanou bází je TEA, 4-(dimethylamino)pyridin (DMAP) a NaHCO₃. [32]

9.1.1 Protekce

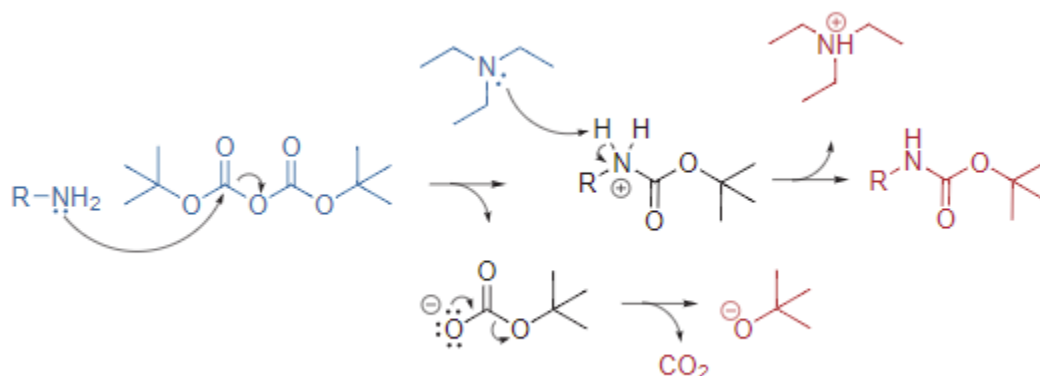


Schéma č. 9: Mechanismus protekce aminu skupinou Boc. Převzato z <https://shop.jk-sci.com/blogs/resource-center/boc-protection-and-deprotection>

Skupina Boc se zavádí na dusík jako ochrana příliš reaktivní aminoskupiny (schéma č. 9). Jako výchozí látka je nejčastěji používán anhydrid di-*tert*-butyl dikarbamát Boc₂O. Reakce probíhá v zásaditém prostředí např. hydroxidu sodného (schéma č. 10) nebo triethylaminu. [31]

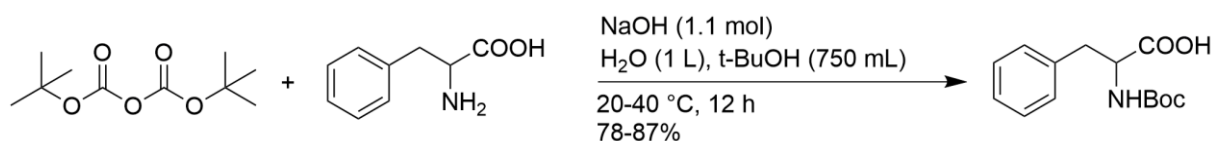


Schéma č. 10: Uplatnění chránicí skupiny Boc při reakci s aminoskupinou

9.1.2 Deprotekce

Boc je odstraňován hydrolyzou v kyselém prostředí (schéma č. 11). Výchozí látka je rozpuštěna ve vodě nebo v organickém rozpouštědle (toluen, dichlormethan) a je přidána koncentrovaná HCl nebo TFA. [32]

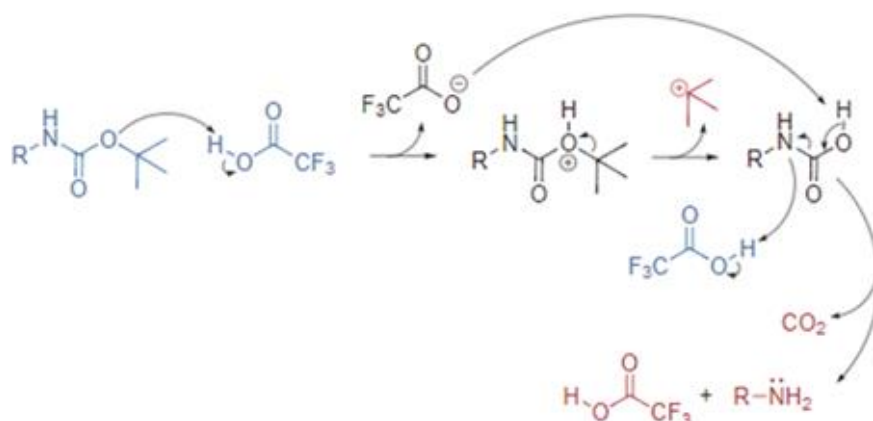


Schéma č. 11: Mechanismus deprotektace skupiny Boc v kyselém prostředí. Převzato z <https://shop.jk-sci.com/blogs/resource-center/boc-protection-and-deprotection>

9.2 9-Fluorenylmethyl Karbamát (Fmoc)

Fmoc je další chránicí skupina používána na ochranu aminoskupiny. Velkou výhodou je její relativní stabilita v kyselém prostředí - z tohoto důvodu lze v její přítomnosti odstraňovat skupinu Boc, aniž by byla porušena skupina Fmoc. Je snadno odstranitelná (viz níže) a zároveň stabilní za podmínek hydrogenace. [30]

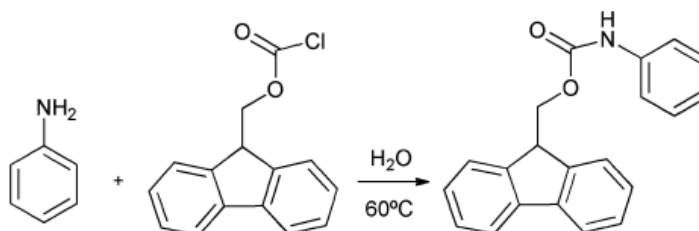


Schéma č. 12: Reakce anilinu s chloridem fluorenylmethoxykarbonylu. Převzato z *An efficient and expeditious Fmoc protection of amines and amino acids in aqueous media.* (Manoj B. Gawande and Paula S. Branco)

Skupina se na amin zavádí nejčastěji reakcí s chloridem fluorenylmethoxykarbonylu ve vodném prostředí (schéma č. 12) a ochránění aminu probíhá za mírných podmínek reakcí s bázi jako amoniak nebo piperidin [34] [30]

9.3 Trifenylmetylová skupina (Trityl)

Dalším způsobem ochrání aminoskupiny je alkylace. Tato poměrně objemná chránící skupina snižuje reaktivitu aminové skupiny prostřednictvím sterického efektu. Nejčastěji se trityl zavádí reakcí trifenylchloridu s aminem v prostředí vhodné báze (triethylamin) a je odstraňována v kyselém prostředí např. HCl nebo TFA. [35] [36]

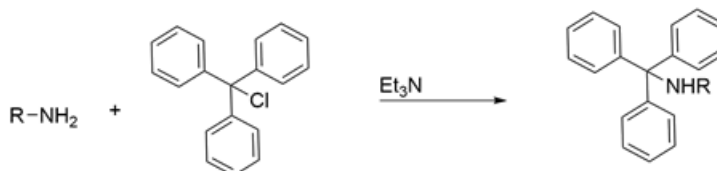


Schéma č. 13: Protekce aminoskupiny tritylem

9.4 Benzyl (Bn)

Další běžně užívanou skupinou používanou k ochraně aminoskupiny je benzyl. Na amin se zavádí reakcí benzyl halogenidů v přítomnosti báze (Et_3N , K_2CO_3) a odstraňuje se pomocí palladiem katalyzované hydrogenolýzy (schéma č. 14). K deprotekcí se běžně užívá katalyzátor Pd/C. [32]

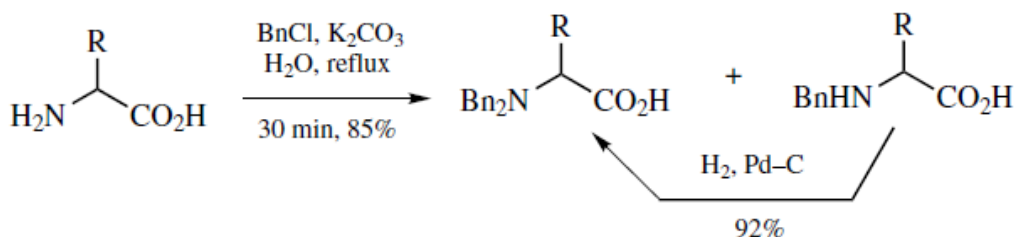


Schéma č. 14: Protekce a deprotekcce benzylové chránící skupiny. Převzato z knihy *The Role of Protective Groups in Organic Synthesis*. In *Protective Groups in Organic Synthesis* (Greene, T.W. and Wuts, P.G.M. (1999))

9.5 *p*-methoxybenzylová skupina (PMB)

PMB chránící skupina se na amin zavádí podobně jako skupina Bn. Jako reakční činidlo se používá *p*-methoxybenzylchlorid, který v zásaditém prostředí (např. K_2CO_3 , PTSA) poskytne ochráněný amin (schéma č. 15). Skupina se může také odstraňovat pomocí palladiem katalyzované hydrogenace, případně lze použít oxidační podmínky (např. DDQ). [30] [37]

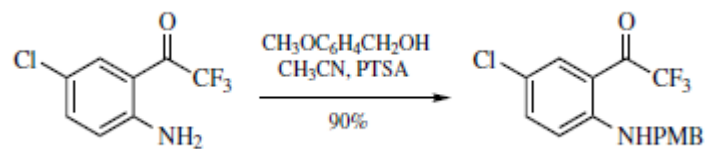


Schéma č. 15: Protekce aminoskupiny skupinou PMB. Převzato z knihy *Greene, T.W. and Wuts, P.G.M. (1999). The Role of Protective Groups in Organic Synthesis. In Protective Groups in Organic Synthesis*

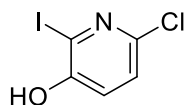
10 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

10.1 Obecné informace

Chemikálie použité v této práci byly pořízeny u specializovaných prodejců (Sigma-Aldrich, Acros, Fluorochem, Penta, Lachner) a nebyly nijak dále purifikovány. Rozpouštědla byla používána v kvalitě dodávané výrobcem, pouze cyklohexan byl před použitím predestilován. Pro reakce použitý methanol, triethylamin, tetrahydrofuran, dimethylformamid a dichlormethan byly tzv. extra suché, dodány firmou Acros. Plynný dusík pro vytvoření inertní atmosféry byl odebírán ze standardní tlakové lahve. Reakce byly prováděny v běžných skleněných baňkách a kapalně látky byly dávkovány pomocí injekčních stříkaček. K separaci pomocí kolonové chromatografie byl použit silikagel (velikost částic 40-60 mikronů). Produkty byly analyzovány pomocí nukleární magnetické rezonance na přístrojích Bruker Avance III 300 MHz a Bruker Avance III 500 MHz. Produkty byly analyzovány hmotnostní spektrometrií na stroji Agilent 6224. Analýza pomocí infračervené spektroskopie byla provedena na přístroji Bruker Alpha TFIR.

10.2 Syntéza intermediátů 1-4

10.2.1 Příprava 6-chlor-2-jodpyridin-2-olu (1)



Obrázek 23: Struktura látky 1

6-chloro-pyridin-2-ol **A** (4 g; 31 mmol) byl rozpuštěn ve vodě (54 ml). K roztoku byl přidán I₂ (7,9 g; 79 mmol) a Na₂CO₃ (6,9 g; 65 mmol). Roztok byl za laboratorní teploty míchán po dobu 3 h. Po skončení reakce byla směs nalita do dělicí baňky a zneutralizována 1M HCl do kyselé oblasti. Směs byla třikrát extrahována ethyl acetátem (70 ml). Spojené organické fáze byly poté promyty Na₂S₂O₇ (10%; 40 ml) a solankou (80 ml). Organická fáze byla poté vysušena bezvodým Na₂SO₄ a přefiltrována. Po odpaření byla obdržena lehce nažloutlá krystalická látka **1** (6,8 g; výtěžek 86 %).

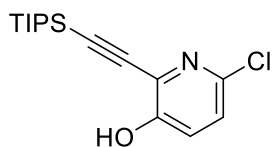
Sumární vzorec: C₅H₃ClINO

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.13 (s), 7.32 (d, *J*= 8,4 Hz, 1 H) 7.18 (d, *J*= 8,4 Hz, 1 H).

Spektrum bylo shodné s publikovaným. [60]

HRMS: *m/z* vypočteno pro [C₅H₃ClINO + H⁺]: 255,9021, experiment. stanoven: 254,8948.

10.2.2 Příprava 6-chlor-2-((triisopropylsilyl)ethynyl)pyridin-3-olu (2)



Obrázek 24: Struktura látky 2

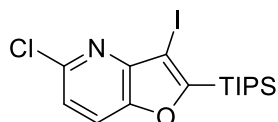
Látka **1** (1,5 g, 5,9 mmol) byla rozpuštěna ve směsi TEA (9,3 ml; 68,9 mmol) a dioxanu (9,3 ml). K roztoku byl přidán (triisopropylsilyl)acetylen (2 g; 12 mmol), CuI (67 mg; 0,35 mmol) a katalyzátor Pd(dppf)Cl₂ (123 mg; 0,22 mmol). Směs byla míchána a zahřívána v olejové lázni na 45 °C po dobu 40 min pod atmosférou argonu. Po skončení reakce bylo rozpouštědlo odpařeno a po přečištění pomocí kolonové chromatografie (EtOAc/cyklohexan; 1:5) byla obdržena šedá pevná látka **2** (1,1 g; 60 %)

Sumární vzorec: C₁₆H₂₄ClNOSi

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.28 (d, *J*=11,0 Hz, 1H), 7.21 (d, *J*=8,6 Hz, 1H), 1.18-1.07 (m)

HRMS: *m/z* vypočteno pro [C₁₆H₂₄ClNOSi + H⁺]: 310,1388, experiment. stanoven: 309,1316.

10.2.3 Příprava 5-chlor-3-jod-2-((triisopropylsilyl)furo[3,2-*b*]pyridinu (3)



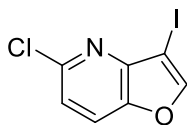
Obrázek 25: Struktura látky 3

K roztoku **2** (1,50 g; 4,8 mmol) v methanolu (25 ml) byl přidán I₂ (3,69 g) v methanolu (30 ml) a CsHCO₃ (2,81 g, 15 mmol). Směs byla míchána a zahřívána na 40 °C po dobu 30 min. v baňce zakryté hliníkovou folií. Po skončení reakce byl přidán roztok Na₂S₂O₃ (1,50 g / 10 ml H₂O) a směs byla extrahována ethyl acetátem (4 x 25 ml), spojené organické fáze byly poté promyty solankou (10 ml). K extraktu bylo přidáno sušidlo MgSO₄, poté byl zfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno. Výsledná látka byla přečištěna pomocí kolonové chromatografie (EtOAc/cyklohexan; 1:20). Byla obdržena hnědá olejovitá látka **3** (1,77 g; 84 %)

Sumární vzorec: C₁₆H₂₃ClINOSi

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.69(d, *J*=8,6 Hz, 1H) 7.30 -7.24 (m, 1H + CDCl₃), 1.19-1.14 (m, 21H).

10.2.4 Příprava 5-chlor-3-jodfuro[3,2-*b*]pyridinu (4)



Obrázek 26: Struktura látky 4

Látka **3** byla rozpuštěna v THF (15 ml) a k roztoku byl přidán 1M TBAF v THF (4,7 ml). Směs byla po dobu 25 min míchána a chlazená na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ v lázni suchý led/acetone. Po 25 min byl k roztoku přidán NH_4Cl (nasycený roztok ve vodě, 15 ml). Směs byla poté přenesena do dělicí nálevky a extrahována DCM (4 x 40 ml). Poté byly organické extrakty vysušeny pomocí MgSO_4 , zfiltrány a rozpouštědlo bylo odpařeno. Takto získaná surová látka byla přečištěna pomocí kolonové chromatografie (cyklohexan/toluen; od 1:0 do 1:1); a poté tritací v pentanu (2x 5 ml). Byla obdržena látka **4** (0,580 g; 51 %).

Sumární vzorec: $\text{C}_7\text{H}_3\text{ClINO}$

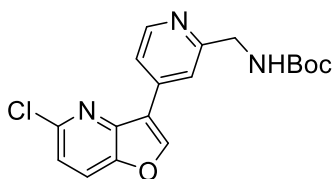
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.90 (s, 1H), 7.74 (d, $J=8,6$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=8,6$ Hz, 1H).

Spektrum bylo shodné s publikovaným. [60]

HRMS: m/z vypočteno pro $[\text{C}_7\text{H}_3\text{ClINO} + \text{H}^+]$: 279,9021, experiment. stanoveno: 278,8948.

10.3 Syntéza (4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)furo[3,2-*b*]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (7)

10.3.1 Příprava *tert*-butyl ((4-(5-chlorofuro[3,2-*b*]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methyl)carbamátu (5)



Obrázek 27: Struktura látky 5

Látka **4** (100 mg; 0,36 mmol) byla rozpuštěna ve směsi dioxanu (6 ml) a vody (1,5 ml). K roztoku byl přidán TEA (150 μl ; 1,1 mmol) a *tert*-butyl ((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyridin-2-yl)methyl)carbamát (**B**) (144 mg; 0,43 mmol). Směs byla 10 min probublávána dusíkem. Směs byla míchána a zahřívána v přítomnosti katalyzátoru $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (13,06 mg; 0,017 mmol) na $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (reflux) po dobu 4 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC (EtOAc/cyklohexan; 1:1). Po skončení reakce byly ke směsi přidány 2 lžičky celitu a směs byla odpařena do sucha na rotační vakuové odparce. Látka byla přečištěna na kolonové

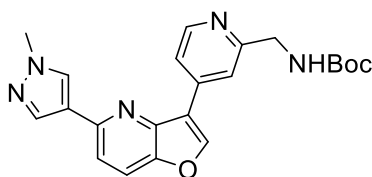
chromatografii (cyklohexan/EtOAc; od 1:0 do 2:3) a byla získána voskovitá hnědá látka **5** (86 mg; 72 %).

Sumární vzorec: C₁₈H₁₈ClN₃O₃

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.63 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.61 (s, 1H), 4.53 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 1.48 (s, 9H).

HRMS: *m/z* vypočteno pro [C₁₈H₁₈ClN₃O₃ + H⁺]: 360,1109, experiment. stanoven: 359,1037.

10.3.2 Příprava *tert*-butyl ((4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)furo[3,2-*b*]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methyl)carbamátu (**6**)



Obrázek 28: Struktura látky **6**

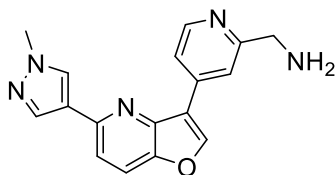
Látka **5** (86 mg; 0,239 mmol) byla rozpuštěna ve směsi dioxanu (4,56 ml) a vody (1,14 ml). K roztoku byl přidán K₃PO₄ (152,05 mg; 0,717 mmol) a 1-methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol (**C**) (59,67 mg; 0,2868 mmol). Směs byla za stálého míchání v přítomnosti Pd(dppf)Cl₂ zahřívána na teplotu 115 °C (reflux) po dobu 4 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC (EtOAc/cyklohexan; 40:1). Po skončení reakce byly ke směsi přidány 2 lžičky celitu a směs byla odpařena do sucha na rotační vakuové odparce. Látka byla přečištěna na kolonové chromatografii (EtOAc/MeOH; 40:1) a byla obdržena voskovitá hnědá pevná látka **6** (84,4 mg; 87 %)

Sumární vzorec: C₂₂H₂₃N₅O₃

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.62 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 17.0 Hz, 2H), 7.99 (s, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.69 (s, 1H), 4.55 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

HRMS: *m/z* vypočteno pro [C₂₂H₂₃N₅O₃ + H⁺]: 406,1874, experiment. stanoven: 405,1801.

10.3.3 Příprava (4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)furo[3,2-*b*]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (7)



Obrázek 29: Struktura látky 7

Látka **6** (70 mg; 0,172 mmol) byla rozpuštěna v DCM (5 ml). Směs byla poté 5 min chlazená v ledové lázni. Dále byla po kapkách přidávána CF₃COOH (1 ml). Po skončení reakce byla směs odpařena na rotační vakuové odparce (2 x z DCM – 5 ml). Dále byl přidán MeOH (3 ml), DCM (3 ml) a 2 lžičky K₂CO₃. Směs byla 24 h ponechána míchat. Poté bylo přidáno 1,5 lžičky celitu a směs byla odpařena na rotační vakuové odparce do sucha. Látky byly děleny na kolonové chromatografii (DCM/MeOH/NH₃ v MeOH (7 M); 20:0,5:0,5) a byl získán produkt v podobě béžovo-žluté pevné látky **7** (29 mg; 55 %).

Sumární vzorec: C₁₇H₁₅N₅O

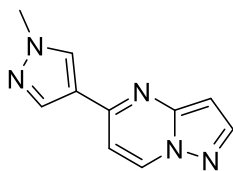
¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm) = 8.67 (s, 1H), 8.5 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 8.29 (brs, 1H), 8.29 (m, *J* = 5 Hz, 2H), 8.09 (brs, 1H), 7.90 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 4,01 (s, 2H) 3.98 (s, 3H).

HRMS: *m/z* vypočteno pro [C₁₇H₁₅N₅O + H⁺]: 306,1349, experiment. stanoven: 305,1277.

¹³C NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm) = 39.09, 47.82, 117.51, 119.87, 120.08, 120.74, 121.01, 125.15, 130.94, 138.59, 141.74, 146.06, 149.13, 149.69, 150.19, 150.53, 162,66

10.4 Syntéza (4-(4-methyl-5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-4H-pyrazolo[5,1-*b*]pyrimidin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (12)

10.4.1 Příprava 5-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu (9)



Obrázek 30: Struktura látky 9

5-chloropyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin (**D**) (200 mg; 1,56 mmol) byl rozpuštěn ve směsi dioxanu (8 ml) a H₂O (2 ml). Ke směsi byl přidán K₃PO₄ (827,8 mg; 3,9 mmol). Byla přidána kyselina **C** (324,5 mg; 1,56 mmol). Směs byla v přítomnosti katalyzátoru Pd(dppf)Cl₂ (48 mg; 0,05 mol) zahřívána na 100 °C po dobu 75 min. Reakce byla monitorována pomocí TLC (EtOAc/cyklohexan; 1,5:1). Po skončení reakce byly ke směsi přidány 2 lžičky celitu a

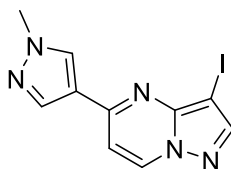
směs byla odpařena na rotační vakuové odparce. Látka byla přečištěna na kolonové chromatografii (EtOAc/cyklohexan; z 2:1 do 20:1) a byla získána světle žlutá pevná látka **9** (260 mg; 97 %).

Sumární vzorec: C₁₀H₉N₅

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.59 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.02 (s, 2H), 6.95 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H).

HRMS: *m/z* vypočteno pro [C₁₀H₉N₅ + H⁺]: 200.0931, experiment. stanoven: 199.0858

10.4.2 Příprava 3-jod-5-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu (**10**)



Obrázek 31: Struktura látky **10**

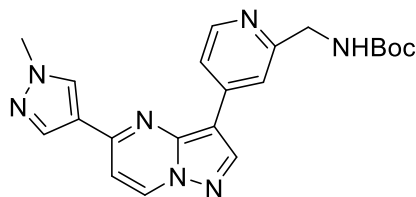
Látka **9** (177 mg, 0,888 mmol) byla rozpuštěna v DMF (5 ml) pod inertní atmosférou N₂. Baňka byla zabalena do alobalu a byl přidán NIS (94 mg; 0,42 mmol). Reakce probíhala 4,5 h při teplotě laboratoře. Po skončení reakce byla směs extrahována diethyl etherem (5 x 6 ml) a etherická fáze byla promyta solankou (10 ml). Roztok látky byl vysušen pomocí Na₂SO₄, přefiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno. Čištění probíhalo pomocí kolonové chromatografie (EtOAc/cyklohexan; 16:1). Bylo obdrženo 173 mg žluté krystalické látky **10** (60 %).

Sumární vzorec: C₁₀H₈IN₅

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.54 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H).

HRMS: *m/z* vypočteno pro [C₁₀H₈IN₅ + H⁺]: 325,9897, experiment. stanoven: 324,9824.

10.4.3 Příprava tert-butyl ((4-(5-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)pyridin-2-yl)methyl)carbamátu (11)

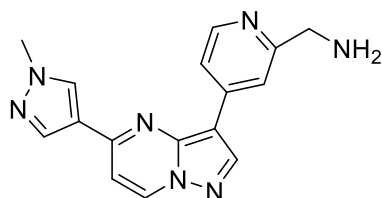


Obrázek 32: Struktura látky 11

Látka **10** (100 mg; 0,308 mmol) byla rozpuštěna ve směsi dioxan (4,8 ml), H₂O (1,2 ml). K roztoku byl přidán TEA (130 μ l; 0,924 mmol) a kyselina **B** (113,23 mg; 0,339 mmol). Byl přidán katalyzátor Pd(dppf)Cl₂ (10 mg, 0,02 mmol) a směs byla po dobu 8 h míchána a zahřívána na 110 °C (reflux). Reakce byla monitorována pomocí TLC (EtOAc/cyklohexan; 20:1). Po skončení reakce byla směs odpařena do sucha a přečištěna 2x pomocí kolonové chromatografie (EtOAc/cyklohexan; od 165:33 do 180:10 + 8 ml MeOH), (EtOAc/cyklohexan; od 25:1 do 10:1) a byla obdržena žlutá voskovitá látka **11** (70 mg; 57 %). Látka byla bez dalšího čištění použita v následujícím kroku.

Sumární vzorec: C₂₁H₂₃N₇O₂

10.4.4 Příprava (4-(5-(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (12)



Obrázek 33: Struktura látky 12

Látka **11** (70 mg; 0,229 mmol) byla rozpuštěna v DCM (5 ml) a směs byla ochlazená na 0 °C. Byla přidána CF₃COOH (1 ml) a směs byla míchána po dobu 4 h, během které došlo k oteplování na laboratorní teplotu. Po skončení reakce byla směs odpařena na rotační vakuové odparce v DCM (2 x 6 ml). Poté byly přidány DCM (3 ml), MeOH (3 ml) a 2 lžičky K₂CO₃. Směs byla míchána přes noc. Poté byla ke směsi přidána 1 lžička celitu a směs byla odpařena do sucha. K separaci směsi byla použita kolonová chromatografie (DCM/MeOH; z 25:1 do 20:1:1 NH₃ 7M). Byla obdržena pevná látka **12** (15 mg; 29 %). Látka byla triturována pentanem (2 x 2 ml).

Sumární vzorec: C₁₆H₁₅N₇

¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm) = 8.79 (d, J = 7.3, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.47 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.17 (brs, 1H), 8.14 (dd, J = 5.3 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.99 (s, 3H)

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm) = 39.39, 47.38, 107.29, 107.77, 118.80, 119.88, 123.14, 132.81, 137.22, 139.86, 143.20, 144.57, 147.02, 150.00, 154.35, 161.12

HRMS: m/z vypočteno pro $[\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_7 + \text{H}^+]$: 306,1462, experiment. stanovené: 305,1389.

11 DISKUZE A VÝSLEDKY

11.1 Příprava 5-chlor-3-jodfuro[3,2-*b*]pyridinu (4)

Sloučenina **4**, která sloužila k syntéze látky **7**, byla připravena prostřednictvím čtyřkrokové syntézy (schéma č. 16). Nejdříve se výchozí látka **A** najodovala ve vodném prostředí a byla připravena látka **1** (ve výtěžku 86 %). Poté byla látka **1** podrobena couplingové reakci s (triisopropylsilyl)acetylenem, což vedlo ke vzniku šedé pevné látky **2** (ve výtěžku 60%). (Triisopropylsilyl)acetylenová skupina ve třetím kroku sloužila k cyklizaci látky **2** a vzniklý produkt **3** byl získán ve výtěžku 84 %. Posledním krokem bylo odstranění skupiny TIPS (triisopropylsilyl) ve výtěžku 51 % (látka **4**). [60]

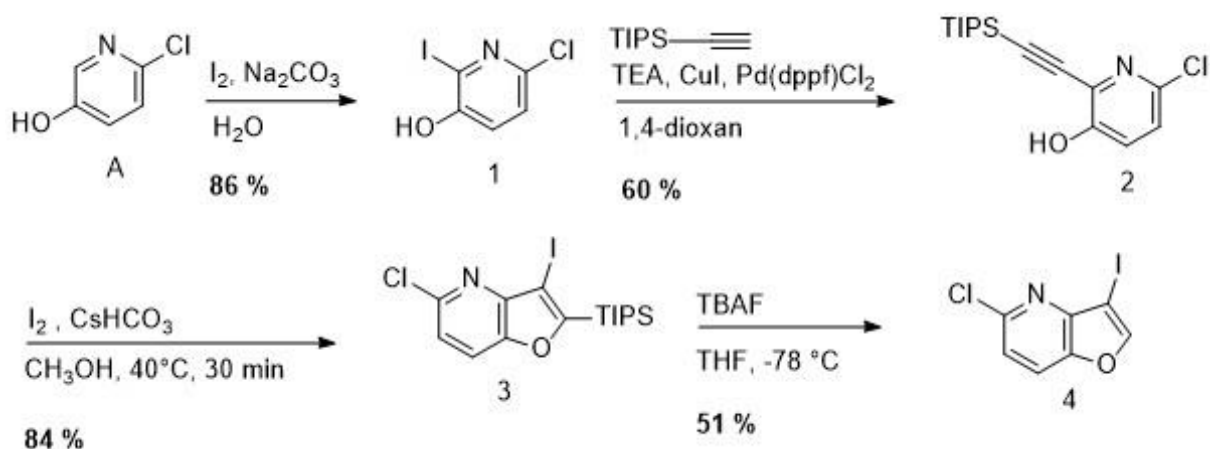


Schéma č. 16: Syntéza výchozí látky

11.2 Syntéza (4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)furo[3,2-b]pyridin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (7)

Připravená látka **4** byla následně použita k přípravě cílové sloučeniny **7** (schéma č. 17). Látka **4** byla v přítomnosti kyseliny **B** a palladnatého katalyzátoru Pd(dppf)Cl₂ podrobena Suzukiho couplingu, který zavedl na furopyridinové jádro první heteroarylový substituent – v pozici 3. Voskovitá hnědá látka **5** byla získána s výtěžkem 72 %. Následně byl proveden druhý Suzukiho coupling a byla připravena voskovitá hnědá pevná látka **6** (ve výtěžku 87 %). Látka **6** byla podrobena deprotekcí aminoskupiny, při níž se odstranila chránicí skupina Boc, v kyselém prostředí TFA ve výtěžku 54 % (látka **7**). Tento poslední krok byl nejprve prováděn jiným způsobem: látka **6** reagovala s HCl (v 1,4-dioxanu), poté byla směs neutralizována NH₃ (v MeOH) a následně přečišťována pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie – tato alternativní metoda ale vedla k relativně nízkému výtěžku a problematické separaci.

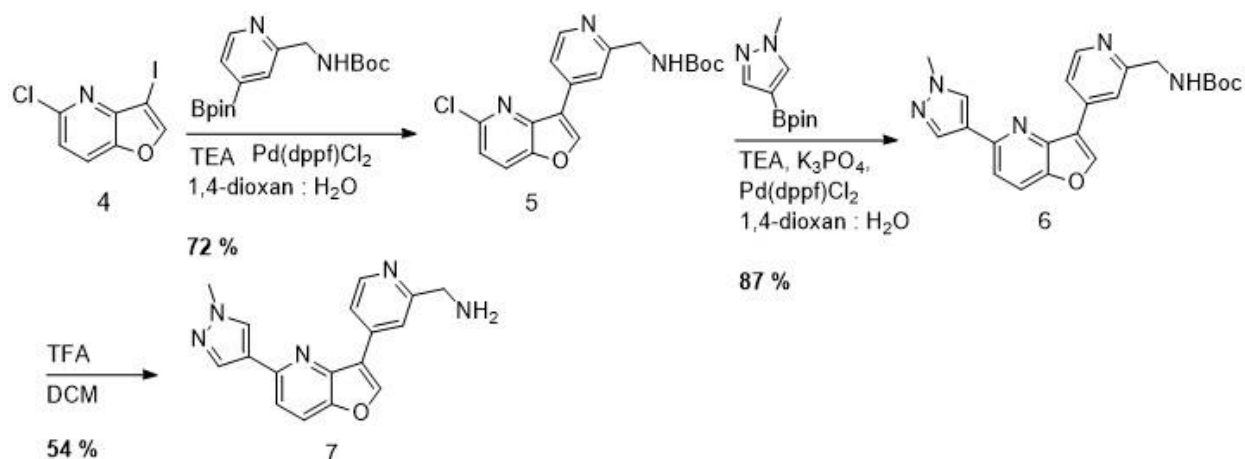


Schéma č. 17: Syntéza látky **7**

11.3 Syntéza (4-(4-methyl-5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-4H-pyrazolo[5,1-b]pyrimidin-3-yl)pyridin-2-yl)methanaminu (12)

Z výchozí látky **D** byla ve čtyřkrokové syntéze (schéma č. 18) připravena žlutá pevná látka **12**. V prvním kroku proběhl u látky **D** Suzukiho coupling s pinakol esterem kyseliny **C** v přítomnosti katalyzátoru Pd(dppf)Cl₂; a takto byl na pyrazolopyrimidinové jádro zaveden první substituent. [59] Reakce poskytla ve vysokém výtěžku (97 %) látku **9**. Následně proběhla jodace látky **9** s NIS, která poskytla látku **10** ve výtěžku 60 %. [59] Poté proběhl druhý Suzukiho coupling v přítomnosti pinakol esteru kyseliny **B** a katalyzátoru Pd(dppf)Cl₂, který na jádro zavedl druhý substituent. Žlutá voskovitá látka **11** byla obdržena ve výtěžku 56 %. Posledním krokem byla deproteckce aminoskupiny, v němž byla odstraněna chránící skupina Boc v kyselém prostředí (TFA) s výtěžkem 28 %.

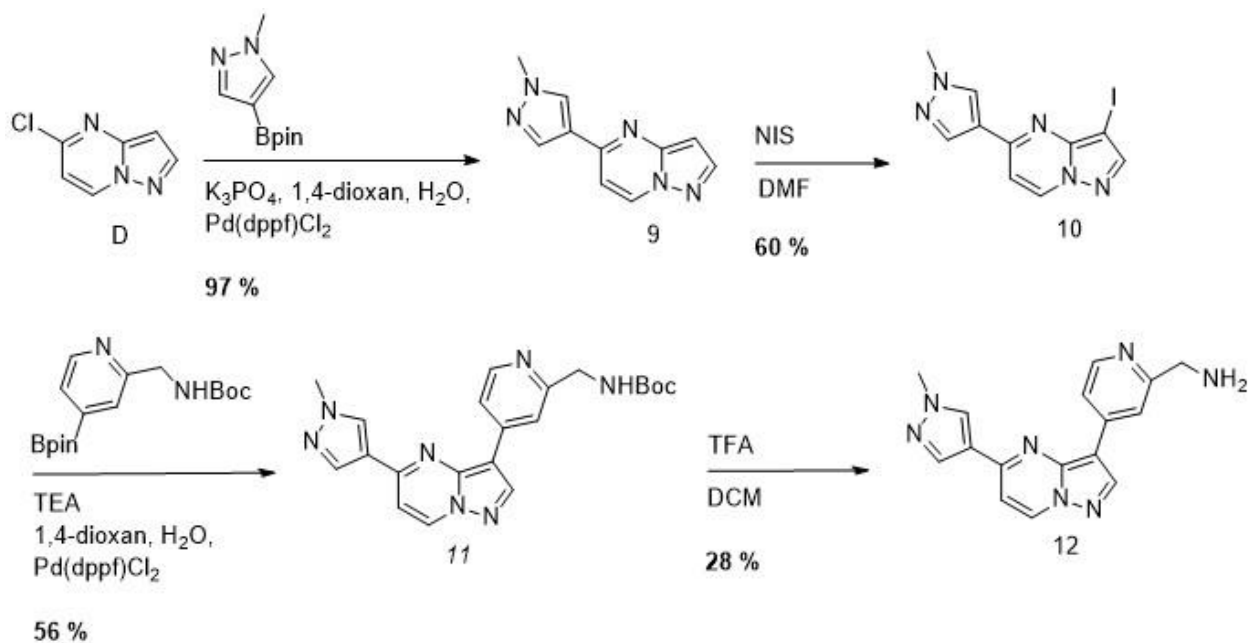
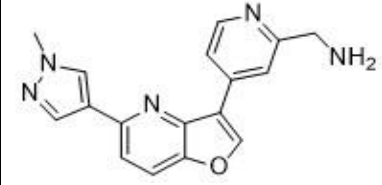
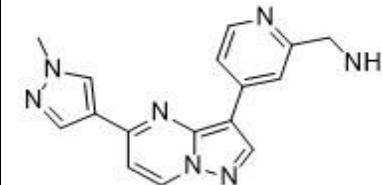


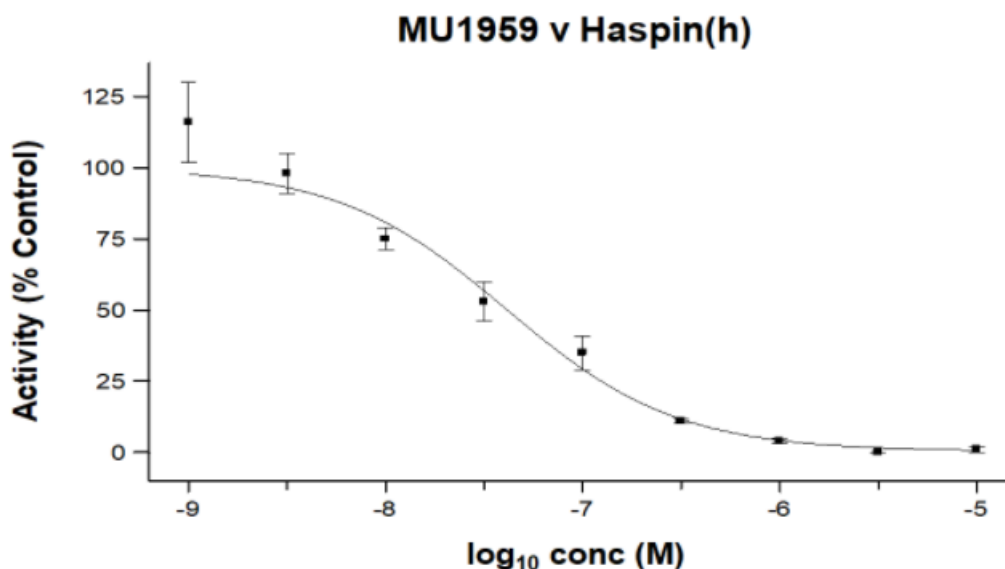
Schéma č. 18: Syntéza látky 12

11.4 Inhibice kinázy Haspin sloučeninami 7 a 12

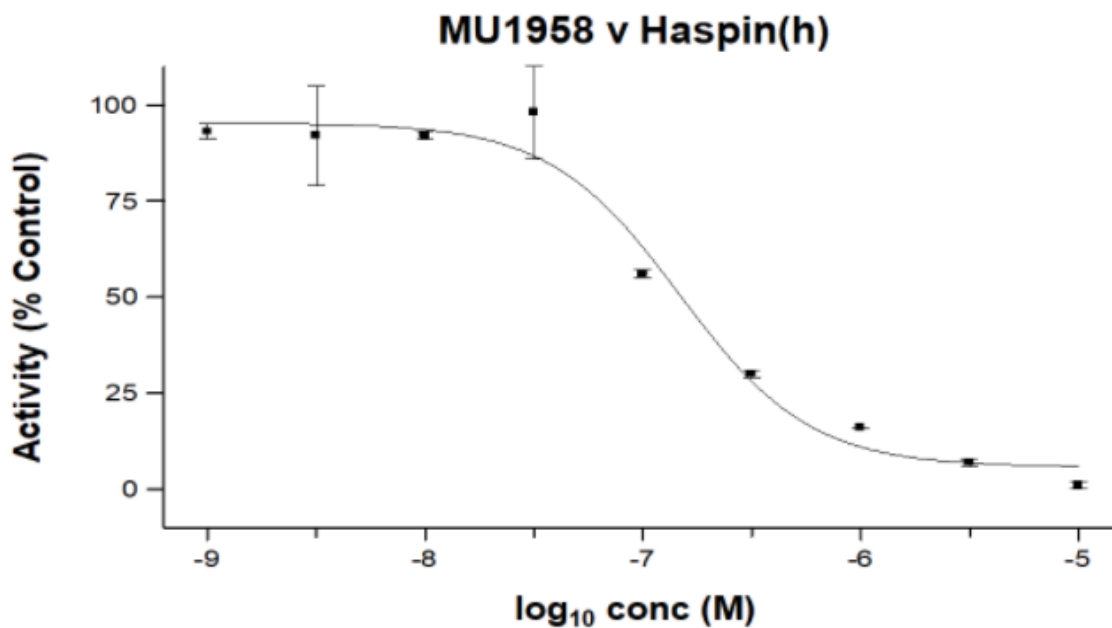
Účinnost inhibitorů v této práci byla testována (formou placené služby) ve firmě Eurofins Scientific. Zkoumána byla inhibice kinázy Haspin. Výsledkem těchto testů jsou hodnoty IC₅₀, které představují koncentraci inhibitoru, při níž látka inhibuje 50 % aktivity cílového enzymu (tab. 3). Pyrazolopyrimidinový inhibitor **12** vykazoval v porovnání s furopyridinovým inhibitorem **7** podstatně vyšší biologickou aktivitu a je tedy vhodnějším kandidátem pro další studie (graf 1 a graf 2).

| Látka | Struktura | IC ₅₀ /nM |
|-------|---|----------------------|
| 7 |  | 148 |
| 12 |  | 41 |

Tabulka 3: Hodnoty IC₅₀ látek **7** a **12** (testovány ve firmě Eurofins Scientific)



Graf 1: Závislost residuální aktivity kinázy Haspin na koncentraci látky **12** (= MU1959).



Graf 2: Závislost residuální aktivity kinázy Haspin na koncentraci látky 7 (= **MU1958**).

Připravené kinázové inhibitory velmi pravděpodobně interagují s Haspinem v ATP-vazebném místě pomocí nekovalentních a hydrofobních interakcí. Jedná se o ATP kompetitivní inhibitory, které Haspinu zabraňují v interakci s ATP a funkce kinázy je tak díky inhibitoru potlačena.

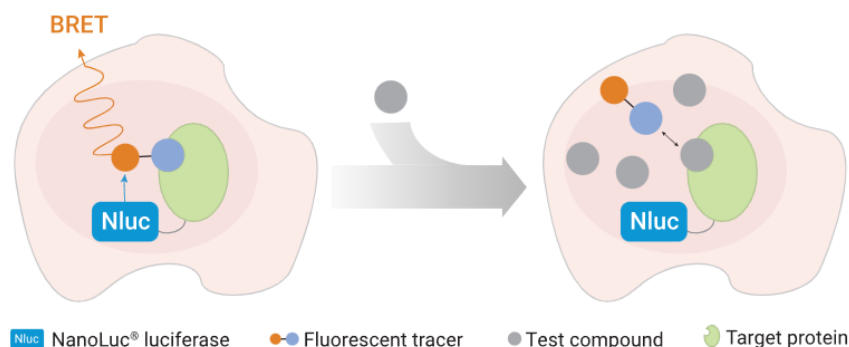
12 ZÁVĚR

Cílem této práce byla příprava nových inhibitorů proteinové kinázy Haspin, které by v budoucnu mohly potenciálně sloužit jako nová léčiva pro boj s rakovinou. Práce zdokumentovala přípravu dvou nových potenciálních inhibitorů proteinové kinázy Haspin prostřednictvím několikakrokové syntézy.

Syntéza prvního furopyridinového inhibitoru **7** se sestávala z celkem sedmikrokové syntézy. První část syntézy umožnila přípravu vhodného dihalogenovaného furopyridinového prekurzoru, ve druhé části byly na furopyridinové jádro zaváděny substituenty prostřednictvím Suzukiho cross-couplingu, a posledním krokem byla deprotektace skupiny Boc v kyselém prostředí. Tento inhibitor vykázal po otestování (in vitro) inhibiční aktivitu vůči proteinové kináze Haspin ($IC_{50} = 148 \text{ nM}$).

Pyrazolopyrimidinový inhibitor **12** byl připraven v čtyřkrokové syntéze prostřednictvím Suzukiho cross-couplingu a deprotektace skupiny Boc v kyselém prostředí. Tento inhibitor se od předešlého inhibitoru lišil pouze ve svém centrálním farmakoforu, který byl složen z kondenzovaného pyrimidinu a pyrazolu namísto kondenzovaného pyridinu a furanu jako tomu bylo u předešlého inhibitoru **7**. Tento zásadní strukturní rozdíl vedl k podstatnému zvýšení biologické aktivity, kterou reprezentuje hodnota $IC_{50} = 41 \text{ nM}$. Inhibitor **12** dosáhl slibných výsledků a je tedy vhodnou látkou k provedení dalších studií.

V navazujících studiích bude látka **12** dále modifikována tak, aby výsledný konstrukt mohl být použit pro testování inhibice Haspinu v buňkách pomocí technologie NanoBRET. Tato technologie umožňuje otestovat inhibitor v buněčném prostředí prostřednictvím monitorování fluorescence v reálném čase. Oproti testování in vitro (viz např. metoda firmy Eurofins popsána výše) poskytuje tato metoda výrazně lepší představu o tom, jaká je skutečná aktivita testovaného inhibitoru v buňce. K látce **12** bude prostřednictvím linkeru připojen fluorofor, který bude sloužit jako akceptor BRET signálu z modifikované NanoLuc Luciferázy navázané na cílovém proteinu, se kterým kináza interaguje (obr. 34). Tento konstrukt bude následně použit pro testování různých potenciálních inhibitorů Haspinu: pokud se budou kompetitivně vázat do stejného ATP-vazebného místa, dojde ke ztrátě pozorovaného signálu BRET. [57][58]



Obrázek 34: Mechanismus NanoBRET technologie. Převzato z <https://worldwide.promega.com/products/cell-signaling/kinase-target-engagement/nanobret-te-intracellular-kinase-assay/?catNum=N2520>

Tento experiment bude prováděn v laboratoři prof. Stefana Knappa ve Frankfurtu, s nímž má skupina doc. Parucha dlouhodobou spolupráci. Prof. Knapp patří k absolutní světové špičce v oboru vývoje inhibitorů proteinových kináz a metod jejich charakterizace (včetně NanoBRET technologie). Pokud se povede připravit vhodný fluorescentní derivát naší sloučeniny **12** pro NanoBRET, bude to znamenat významný posun v testování inhibitorů kinázy Haspin, protože pro tuto kinázu (na rozdíl od jiných) dosud vhodná NanoBRET technologie neexistuje.

13 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Cicenas, Jonas, Zalyte, Egle, Bairoch, Amos a Gaudet, Pascale. *Kinases and Cancer*. 2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5876638/>
- [2] Matthews, David J. a Mary E. Gerritsen. *Targeting Protein Kinases for Cancer Therapy* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2010 [cit. 2021-12-22]. ISBN 9780470555293. Dostupné z: doi:10.1002/9780470555293
- [3] Suzuki, Akira. *Organoborane coupling reactions (Suzuki coupling)*. Proceedings of the Japan Academy, Series B. 2004, 2004(8), 359. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.2183/pjab.80.359>
- [4] Kurti, Laszlo a Barbara Czako. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. Amsterdam: Elsevier Books, 2005. ISBN 0-12-429785-4.
- [5] Kotha, Sambasivarao, Kakali Lahiri a Dhurke Kashinath. *Recent applications of the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction in organic synthesis*. Tetrahedron. 2002, 2002(58). Dostupné z: doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)01188-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(02)01188-2)
- [6] J. J. Lennox, Alastair a Guy C. Lloyd-Jones. *Transmetalation in the Suzuki–Miyaura Coupling: The Fork in the Trail*. Angewandte Chemie International Edition. 2013, 52(29), 7362-7363. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/anie.201301737>
- [7] Meconi, Giulia Magi, Sai Vikrama Chaitanya Vummaleti, Jesus Antonio Luque-Urrutia, et al. *Mechanism of the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction Mediated by [Pd(NHC)(allyl)Cl] Precatalysts*. Organometallics. 2017, 36(11), 2088-2095. Dostupné z: doi:10.1021/acs.organomet.7b00114
- [8] Pinna, Lorenzo A. a Patricia T.W. Cohen. *Inhibitors of Protein Kinases and Protein Phosphates*. 1. Germany: Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. ISBN 3-540-21242-6.
- [9] Feizbakhsh, Omid, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier a Sandrine Ruchaud. *The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors*. Prigent, Claude, ed. Protein Phosphorylation [online]. InTech, 2017, 2017-11-29 [cit. 2021-11-10]. ISBN 978-953-51-3625-5. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.70732
- [10] Villa F, Capasso P, Tortorici M, Forneris F, de Marco A, Mattevi A, Musacchio A. *Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 1;106(48):20204-9. doi:10.1073/pnas.0908485106. Epub 2009 Nov 16. PMID: 19918049; PMCID: PMC2777964.
- [11] Maiolica A, de Medina-Redondo M, Schoof EM, Chaikuad A, Villa F, Gatti M, Jeganathan S, Lou HJ, Novy K, Hauri S, Toprak UH, Herzog F, Meraldi P, Penengo L, Turk BE, Knapp S, Linding R, Aebersold R. *Modulation of the chromatin phosphoproteome by the Haspin protein*

kinase. Mol Cell Proteomics. 2014 Jul;13(7):1724-40. doi: 10.1074/mcp.M113.034819. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24732914; PMCID: PMC4083111.

[12] Eswaran J, Patnaik D, Filippakopoulos P, Wang F, Stein RL, Murray JW, Higgins JM, Knapp S. *Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 1;106(48):20198-203. doi: 10.1073/pnas.0901989106. Epub 2009 Nov 16. PMID: 19918057; PMCID: PMC2777956.

[13] Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JM. *The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment*. Genes Dev. 2005 Feb 15;19(4):472-88. doi: 10.1101/gad.1267105. Epub 2005 Jan 28. PMID: 15681610; PMCID: PMC548948.

[14] Caperta AD, Rosa M, Delgado M, Karimi R, Demidov D, Viegas W, Houben A. *Distribution patterns of phosphorylated Thr 3 and Thr 32 of histone H3 in plant mitosis and meiosis*. Cytogenet Genome Res. 2008;122(1):73-9. doi: 10.1159/000151319. Epub 2008 Oct 14. PMID: 18931489.

[15] Nguyen AL, Gentilello AS, Balboula AZ, Shrivastava V, Ohring J, Schindler K. *Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes*. J Cell Sci. 2014 Dec 1;127(Pt 23):5066-78. doi: 10.1242/jcs.158840. Epub 2014 Oct 14. PMID: 25315835; PMCID: PMC4248095.

[16] Balboula AZ, Nguyen AL, Gentilello AS, Quartuccio SM, Drutovic D, Solc P, Schindler K. *Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes*. J Cell Sci. 2016 Oct 1;129(19):3648-3660. doi: 10.1242/jcs.189340. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27562071; PMCID: PMC5087654.

[17] Silvia Panizza, Tomoyuki Tanaka, Andreas Hochwagen, Frank Eisenhaber, Kim Nasmyth, *Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion*, Current Biology, Volume 10, Issue 24, 2000, Pages 1557-1564, ISSN 0960-9822, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00854-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00854-X).

[18] Chandrasekaran, Aparna, Sathya Raj S, Nancy Priya a Prachy Dixit. *Drivers of the Chromosomal Passenger Complex*. Thermo Fisher Scientific. 2019.

[19] Wang F, Ulyanova NP, van der Waal MS, Patnaik D, Lens SM, Higgins JM. *A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis*. Curr Biol. 2011 Jun 21;21(12):1061-9. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.016. Epub 2011 Jun 9. PMID: 21658950; PMCID: PMC3118923.

[20] Hengeveld, R., Vromans, M., Vleugel, M. et al. *Inner centromere localization of the CPC maintains centromere cohesion and allows mitotic checkpoint silencing*. Nat Commun 8, 15542 (2017). <https://doi.org/10.1038/ncomms15542>

[21] Higgins JM. *Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior*. *Chromosoma*. 2010 Apr;119(2):137-47. doi: 10.1007/s00412-009-0250-4. Epub 2009 Dec 8. PMID: 19997740; PMCID: PMC2839057.

[22] Ishiyama, Tatsuo, Miki Murata a Norio Norio. *Palladium(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters*. *J. Org. Chem.* 1995, 1995(60), 7508-7510.

[23] Jun Takagi, Kou Takahashi, Tatsuo Ishiyama, and Norio Miyaura, *Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Bis(pinacolato)diboron with 1-Alkenyl Halides or Triflates: Convenient Synthesis of Unsymmetrical 1,3-Dienes via the Borylation-Coupling Sequence*, *Journal of the American Chemical Society* 2002 124 (27), 8001-8006, DOI: 10.1021/ja0202255

[24] Alicia L. S. Thompson, George W. Kabalka,b Murthy R. Akula,b John W. Huffman, *The Conversion of Phenols to the Corresponding Aryl Halides Under Mild Conditions*, Clemson University, Department of Chemistry, Clemson, South Carolina 29634-0973, USA Received 23 July 2004; revised 16 November 2004, DOI: 10.1055/s-2005-861791

[25] S. Kadu, Brijesh. *Suzuki–Miyaura cross coupling reaction: recent advancements in catalysis and organic synthesis*. *Catalysis Science & Technology*. 2021, (11), 1186-1221. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1039/D0CY02059A>

[26] Anon, 2020. *Suzuki-Miyaura Coupling*. Available at: <https://chem.libretexts.org/@go/page/69101> [Accessed December 14, 2021].

[27] Lima, C.F.R.A.C., Rodrigues, A.S.M.C., Silva, V.L.M., Silva, A.M.S. and Santos, L.M.N.B.F. (2014), *Role of the Base and Control of Selectivity in the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction*. *ChemCatChem*, 6: 1291-1302. <https://doi.org/10.1002/cctc.201301080>

[28] Rafael Chinchilla and Carmen Nájera *Chemical Reviews, The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry*, 2007 107 (3), 874-922, DOI: 10.1021/cr050992x

[29] Anon, 2020. *Sonogashira Coupling*. Available at: <https://chem.libretexts.org/@go/page/69102> [Accessed December 15, 2021].

[30] Greene, T.W. and Wuts, P.G.M. (1999). *The Role of Protective Groups in Organic Synthesis*. In *Protective Groups in Organic Synthesis* (eds T.W. Greene and P.G.M. Wuts). <https://doi.org/10.1002/0471220574.ch1>

[31] Kocienski, Philip J. *Protecting groups*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, c2005. ISBN 3-13-135603-0.

- [32] *Amine Protection / Deprotection*. Fisher Scientific [online]. UK, 2021 [cit. 2021-12-15]. Dostupné z: <https://www.fishersci.co.uk/gb/en/scientific-products/lab-reporter-europe/chemicals/amine-protection-deprotection.html>
- [33] Anirban Sarkar, Sudipta Raha Roy, Naisargee Parikh, and Asit K. Chakraborti. *Nonsolvent Application of Ionic Liquids: Organo-Catalysis by 1-Alkyl-3-methylimidazolium Cation Based Room-Temperature Ionic Liquids for Chemoselective N-tert-Butyloxycarbonylation of Amines and the Influence of the C-2 Hydrogen on Catalytic Efficiency*. *The Journal of Organic Chemistry* 2011 76 (17), 7132-7140. DOI: 10.1021/jo201102q
- [34] B. Gawande, Manoj a Paula S. Branco. *An efficient and expeditious Fmoc protection of amines and amino acids in aqueous media*. *Green Chem.* 2011, 2011(13), 3355-3359. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1039/C1GC15868F](https://doi.org/10.1039/C1GC15868F)
- [35] Isidro-Llobet, A., Alvarez, M., & Albericio, F. (2009). *Amino acid-protecting groups*. *Chemical reviews*, 109(6), 2455–2504. <https://doi.org/10.1021/cr800323s>
- [36] Roberts, J. D., & Caserio, M. C. (2021, July 31). *Protection of Amino Groups in Synthesis*. California Institute of Technology. <https://chem.libretexts.org/@go/page/22348>
- [37] *P-Methoxybenzyl (PMB) Protective Group*. Chem-Station int.ed. [online]. 2014 [cit. 2021-12-16]. Dostupné z: <https://en.chem-station.com/reactions-2/2014/03/p-methoxybenzyl-pmb-protective-group.html>
- [38] Jeyanthi Eswaran, Debasis Patnaik, Panagis Filippakopoulos, Fangwei Wang, Ross L. Stein, James W. Murray, Jonathan M. G. Higgins, Stefan Knapp. *Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Dec 2009, 106 (48) 20198-20203; DOI: 10.1073/pnas.0901989106
- [39] Yi-Hui Peng, Hui-Yi Shiao, Chih-Hsiang Tu, Pang-Min Liu, John Tsu-An Hsu, Prashanth Kumar Amancha, Jian-Sung Wu, Mohane Selvaraj Coumar, Chun-Hwa Chen, Sing-Yi Wang, Wen-Hsing Lin, Hsu-Yi Sun, Yu-Sheng Chao, Ping-Chiang Lyu, Hsing-Pang Hsieh, and Su-Ying Wu. *Protein Kinase Inhibitor Design by Targeting the Asp-Phe-Gly (DFG) Motif: The Role of the DFG Motif in the Design of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors*. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013 56 (10), 3889-3903 DOI: 10.1021/jm400072p
- [40] Hirano T. *Chromosome cohesion, condensation, and separation*. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:115-44. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.115. PMID: 10966455.
- [41] Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. *The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(12):789-803. doi:10.1038/nrm3474

- [42] Zhou L, Tian X, Zhu C, Wang F, Higgins JM. *Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis*. EMBO Rep. 2014 Mar;15(3):273-81. doi: 10.1002/embr.201338080. Epub 2014 Jan 10. PMID: 24413556; PMCID: PMC3989693.
- [43] Bhullar, K.S., Lagarón, N.O., McGowan, E.M. *et al. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions*. Mol Cancer **17**, 48 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>
- [44] Amoussou NG, Bigot A, Roussakis C, Robert JH. *Haspin: a promising target for the design of inhibitors as potent anticancer drugs*. Drug Discov Today. 2018 Feb;23(2):409-415. doi: 10.1016/j.drudis.2017.10.005. Epub 2017 Oct 13. PMID: 29031622.
- [45] Jarošková, Aneta. *Haspin kináza jako cíl protinádorové strategie* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-12-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/z0ve3/Haspin_kinaza_jako_cil_protinadorove_strategie_Archive.pdf. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Ústav experimentální biologie. Vedoucí práce Mgr. Karel Souček, Ph.D.
- [46] Goto Y, Yamagishi Y, Shintomi-Kawamura M, Abe M, Tanno Y, Watanabe Y. *Pds5 Regulates Sister-Chromatid Cohesion and Chromosome Bi-orientation through a Conserved Protein Interaction Module*. Curr Biol. 2017 Apr 3;27(7):1005-1012. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.066. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28343969.
- [47] Dai J, Sullivan BA, Higgins JM. *Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B*. Dev Cell. 2006 Nov;11(5):741-50. doi: 10.1016/j.devcel.2006.09.018. PMID: 17084365.
- [48] Nakajima M, Kumada K, Hatakeyama K, Noda T, Peters JM, Hirota T. *The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase*. J Cell Sci. 2007 Dec 1;120(Pt 23):4188-96. doi: 10.1242/jcs.011528. Epub 2007 Nov 14. PMID: 18003702.
- [49] Liang C, Chen Q, Yi Q, Zhang M, Yan H, Zhang B, Zhou L, Zhang Z, Qi F, Ye S, Wang F. *A kinase-dependent role for Haspin in antagonizing Wapl and protecting mitotic centromere cohesion*. EMBO Rep. 2018 Jan;19(1):43-56. doi: 10.15252/embr.201744737. Epub 2017 Nov 14. PMID: 29138236; PMCID: PMC5757254.
- [50] Bastea, L.I., Hollant, L.M.A., Döppler, H.R. *et al. Sangivamycin and its derivatives inhibit Haspin-Histone H3-survivin signaling and induce pancreatic cancer cell death*. Sci Rep **9**, 16588 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53223-0>
- [51] Ye Z, Zhang Z, Fang L, Tian D, Liu X. *Bioinformatic Analysis Reveals GSG2 as a Potential Target for Breast Cancer Therapy*. Open Life Sci. 2019 Dec 31;14:688-698. doi: 10.1515/biol-2019-0078. PMID: 33817208; PMCID: PMC7874749.

- [52] Parkinson FE, Geiger JD. *Effects of iodotubercidin on adenosine kinase activity and nucleoside transport in DDT1 MF-2 smooth muscle cells*. J Pharmacol Exp Ther. 1996 Jun;277(3):1397-401. PMID: 8667202.
- [53] Balzano D, Santaguida S, Musacchio A, Villa F. *A general framework for inhibitor resistance in protein kinases*. Chem Biol. 2011 Aug 26;18(8):966-75. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.04.013. Erratum in: Chem Biol. 2011 Oct 28;18(10):1341. PMID: 21867912.
- [54] Huertas, D., Soler, M., Moreto, J. et al. *Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin*. Oncogene 31, 1408–1418 (2012). <https://doi.org/10.1038/onc.2011.335>
- [55] Kim JE, Lee SY, Jang M, Choi HK, Kim JH, Chen H, Lim TG, Dong Z, Lee KW. *Coumestrol Epigenetically Suppresses Cancer Cell Proliferation: Coumestrol Is a Natural Haspin Kinase Inhibitor*. Int J Mol Sci. 2017 Oct 24;18(10):2228. doi: 10.3390/ijms18102228. PMID: 29064398; PMCID: PMC5666907.
- [56] Pieterse, L., Legoabe, L.J., Beteck, R.M. et al. *Synthesis and biological evaluation of selected 7-azaindole derivatives as CDK9/Cyclin T and Haspin inhibitors*. Med Chem Res 29, 1449–1462 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02560-1>
- [57] Dale NC, Johnstone EKM, White CW, Pflieger KDG. *NanoBRET: The Bright Future of Proximity-Based Assays*. Front Bioeng Biotechnol. 2019 Mar 26;7:56. doi: 10.3389/fbioe.2019.00056. PMID: 30972335; PMCID: PMC6443706.
- [58] Machleidt T, Woodroffe CC, Schwinn MK, Méndez J, Robers MB, Zimmerman K, Otto P, Daniels DL, Kirkland TA, Wood KV. *NanoBRET--A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions*. ACS Chem Biol. 2015 Aug 21;10(8):1797-804. doi: 10.1021/acschembio.5b00143. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26006698.
- [59] Patent *Pyrazolo[1,5-a]miazine compound and its preparation method and medical use*, dostupné Z
https://worldwide.espacenet.com/data/publicationDetails/biblio?CC=CN&NR=104250252B&KC=&FT=E&locale=en_EP&fbclid=IwAR218i5I0oAHNGGwJQo-YZWHlfWMa_CvUsqVNf8QdoYwF7pm-_RVlNKO9eM
- [60] Němec V, Maier L, Berger BT, Chaikuad A, Drápela S, Souček K, Knapp S, Paruch K. *Highly selective inhibitors of protein kinases CLK and HIPK with the furo[3,2-b]pyridine core*. Eur J Med Chem. 2021 Apr 5;215:113299. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113299. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33636538.

14 SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: Lidský kinom. Převzato z <i>Cell Signaling Technolog: Human Protein Kinases Overview</i> | 14 |
| Obrázek 2: X-ray krystalová struktura ATP navázané na PKA. Převzato ze <i>Syntéza nových potenciálních inhibitorů proteinových kináz, Václav Němec</i> | 16 |
| Obrázek 3: (A) Celková struktura Haspin kinázy s vyznačenými atypickými insercemi, ulH je vyznačen zeleně, aktivační segment žlutě a vlásečnicová inserce červeně. (B) Detailní zobrazení α C helixu obklopeného hydrofobními jednotkami. (C) Inserce ulH helixu a jeho interakce s aromatickými jednotkami. Převzato z <i>Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin, Jeyanthi Eswarana, Debasis Patnaikb, Panagis Filippakopouloua, Fangwei Wangb, Ross L. Steinc, James W. Murraya, Jonathan M. G. Higginsb a Stefan Knappa</i> | 17 |
| Obrázek 4: Detailní aktivační segment Haspinu. (A) Povrch kinázy s aktivačním segmentem zobrazeným jako vlásečnicová struktura s aromatickými jednotkami, které tvoří střed a stabilizují konformaci kinázy. (B) Segment otočený o 120° poskytující detailnější náhled. Převzato z <i>Structure and functional characterization of the atypical human kinase Haspin (Jeyanthi Eswarana, Debasis Patnaikb, Panagis Filippakopouloua, Fangwei Wangb, Ross L. Steinc, James W. Murraya, Jonathan M. G. Higginsb a Stefan Knappa)</i> | 18 |
| Obrázek 5: Elektrostatický potenciál Haspin kinázy. Převzato z <i>Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization (Villa F, Capasso P, Tortorici M, Forneris F, de Marco A, Mattevi A, Musacchio A)</i> | 18 |
| Obrázek 6: Lokalizace Haspin kinázy během různých fází mitózy. Převzato z <i>The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier a Sandrine Ruchaud)</i> | 19 |
| Obrázek 7: Struktura Pds5 proteinu. Převzato z <i>Crystal Structure of the Cohesin Gatekeeper Pds5 (Byung-Gil Lee, Maurici B. Roig, Marijke Jansma, Naomi Petela, Jean Metson, Kim Nasmyth, Jan Löwe)</i> | 20 |
| Obrázek 8: Struktura Kohesinu a interakce jeho podjednotek se Sgo1, Pds5B, Haspin a Wapl. Převzato z <i>A kinase-dependent role for Haspin in antagonizing Wapl and protecting mitotic centromere cohesion (Liang C, Chen Q, Yi Q, Zhang M, Yan H, Zhang B, Zhou L, Zhang)</i> .. | 20 |
| Obrázek 9: Schématické zobrazení lokalizace Haspin na chromosomech. Převzato z <i>The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier and Sandrine Ruchaud)</i> | 21 |
| Obrázek 10: Regulace CPC komplexu prostřednictvím Haspin kinázy. Aurora B fosforyluje N-konec Haspin kinázy a zesiluje její aktivitu. Převzato z <i>The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Syl)</i> | 22 |
| Obrázek 11: Lokalizace CPC komplexu na centromerách prostřednictvím Haspin a Bub1 kinázy. Převzato z <i>The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier and Sandrine Ruchaud)</i> | 23 |
| Obrázek 12: Struktura chromosomu s vyznačenou vnitřní a vnější centromerou společně s kinetochorou. Převzato z <i>Haspin kináza jako cíl protinádorové strategie (Aneta Jarošková)</i> 24 | 24 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 13: Mechanismus fosforylace Haspin. (i) Cdk1 kináza fosforyluje Haspin a vytváří místo k navázání Plk1 kinázy, která zesílí fosforylaci Haspin a umožní jí fosforylaci H3T3. (ii) Navázání CPC komplexu (iii) alternativní varianta fosforylace H2A kinázou Bub1. Převzato z <i>Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis (Zhou L, Tian X, Zhu C, Wang F, Higgins JM.)</i> | 25 |
| Obrázek 14: Popis aparatury pro kolonovou chromatografii | 32 |
| Obrázek 15: Vrstva silika gelu. Převzato z https://www.chemicals.co.uk/blog/what-is-silica-gel | 33 |
| Obrázek 16: Vytvájecí cela pro TLC s destičkou TLC uvnitř | 34 |
| Obrázek 17: Vizualizace TLC pod UV | 35 |
| Obrázek 18: Výpočet retenčního faktoru. Y = dráha uražená látkou ze vzorku, X = dráha uražená čelem. Převzato z https://en.differbetween.com/article/how_to_calculate_rf_values_for_tlc | 35 |
| Obrázek 19: Průběh extrakce. Převzato z https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/04%3A_Extraction/4.02%3A_Overview_of_Extraction | 36 |
| Obrázek 20: Filtrační aparatura | 37 |
| Obrázek 21: (A) Katalyzátor Pd(PPh ₃) ₄ (B) Katalyzátor Pd(dppf)Cl ₂ (C) Katalyzátor Pd(PPh ₃)Cl ₂ . Převzato z https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en | 39 |
| Obrázek 22: (A) Katalyzátor Pd(dppe)Cl ₂ (B) Katalyzátor bis-imidazolyl palladnatý | 44 |
| Obrázek 23: Struktura látky 1 | 51 |
| Obrázek 24: Struktura látky 2 | 52 |
| Obrázek 25: Struktura látky 3 | 52 |
| Obrázek 26: Struktura látky 4 | 53 |
| Obrázek 27: Struktura látky 5 | 53 |
| Obrázek 28: Struktura látky 6 | 54 |
| Obrázek 29: Struktura látky 7 | 55 |
| Obrázek 30: Struktura látky 9 | 55 |
| Obrázek 31: Struktura látky 10 | 56 |
| Obrázek 32: Struktura látky 11 | 57 |
| Obrázek 33: Struktura látky 12 | 57 |
| Obrázek 34: Mechanismus NanoBRET technologie. Převzato z https://worldwide.promega.com/products/cell-signaling/kinase-target-engagement/nanobrette-intracellular-kinase-assay/?catNum=N2520 | 64 |

15 Seznam schémat

| | |
|---|----|
| Schéma č. 1: Mechanismus Suzuki cross-couplingové reakce. Obrázek převzatý z knihy <i>Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis (László Kürti a Barbara Czakó)</i> | 38 |
| Schéma č. 2: Dva možné mechanismy, kterých se báze účastní. X = F, Cl, Br, I, L=ligand, OH-použitá báze, R-[B] = organoborát. Převzato z <i>Role of the Base and Control of Selectivity in the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction (Dr. Carlos F. R. A. C. Lima, Ana S. M. C. Rodrigues, Dr. Vera L. M. Silva, Prof. Artur M. S. Silva, Prof. Luís M. N. B. F. Santos)</i> | 40 |
| Schéma č. 3: Příprava pinakolesteru kyseliny borité. Převzato z <i>Palladium(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters (Tatsuo Ishiyama, Miki Murata, and Norio Miyaura)</i> | 41 |
| Schéma č. 4: Mechanismus Miyaurovy borylace. Převzato z https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/miyaura-borylation-reaction.shtm | 41 |
| Schéma č. 5: Reakce pinakolesteru kyseliny diborité s halogenalkenem..... | 42 |
| Schéma č. 6: Reakce pinakolesteru kyseliny diborité s trifluorometansulfonátem | 42 |
| Schéma č. 7: Sonogashirova reakce arylhalogenidu a substituobaného alkyneu. Převzato z <i>The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry (Rafael Chinchilla and Carmen Nájera Chemical Reviews)</i> | 43 |
| Schéma č. 8: Mechanismus Sonogashirova cross-couplingu. Převzato z knihy <i>Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis (László Kürti a Barbara Czakó)</i> | 44 |
| Schéma č. 9: Mechanismus protekce aminu skupinou Boc. Převzato z https://shop.jk-sci.com/blogs/resource-center/boc-protection-and-deprotection | 47 |
| Schéma č. 10: Uplatnění chránicí skupiny Boc při reakci s aminoskupinou | 47 |
| Schéma č. 11: Mechanismus deprotektce skupiny Boc v kyselém prostředí. Převzato z https://shop.jk-sci.com/blogs/resource-center/boc-protection-and-deprotection | 48 |
| Schéma č. 12: Reakce anilinu s chloridem fluorenylmethoxykarbonylu. Převzato z <i>An efficient and expeditious Fmoc protection of amines and amino acids in aqueous media. (Manoj B. Gawande and Paula S. Branco)</i> | 48 |
| Schéma č. 13: Protekce aminoskupiny tritylem | 49 |
| Schéma č. 14: Protekce a deprotektce benzylové chránicí skupiny. Převzato z knihy <i>The Role of Protective Groups in Organic Synthesis. In Protective Groups in Organic Synthesis (Greene, T.W. and Wuts, P.G.M. (1999))</i> | 49 |
| Schéma č. 15: Protekce aminoskupiny skupinou PMB. Převzato z knihy <i>Greene, T.W. and Wuts, P.G.M. (1999). The Role of Protective Groups in Organic Synthesis. In Protective Groups in Organic Synthesis</i> | 50 |
| Schéma č. 16: Syntéza výchozí látky..... | 59 |
| Schéma č. 17: Syntéza látky 7..... | 60 |
| Schéma č. 18: Syntéza látky 12..... | 61 |

16 SEZNAM TABULEK

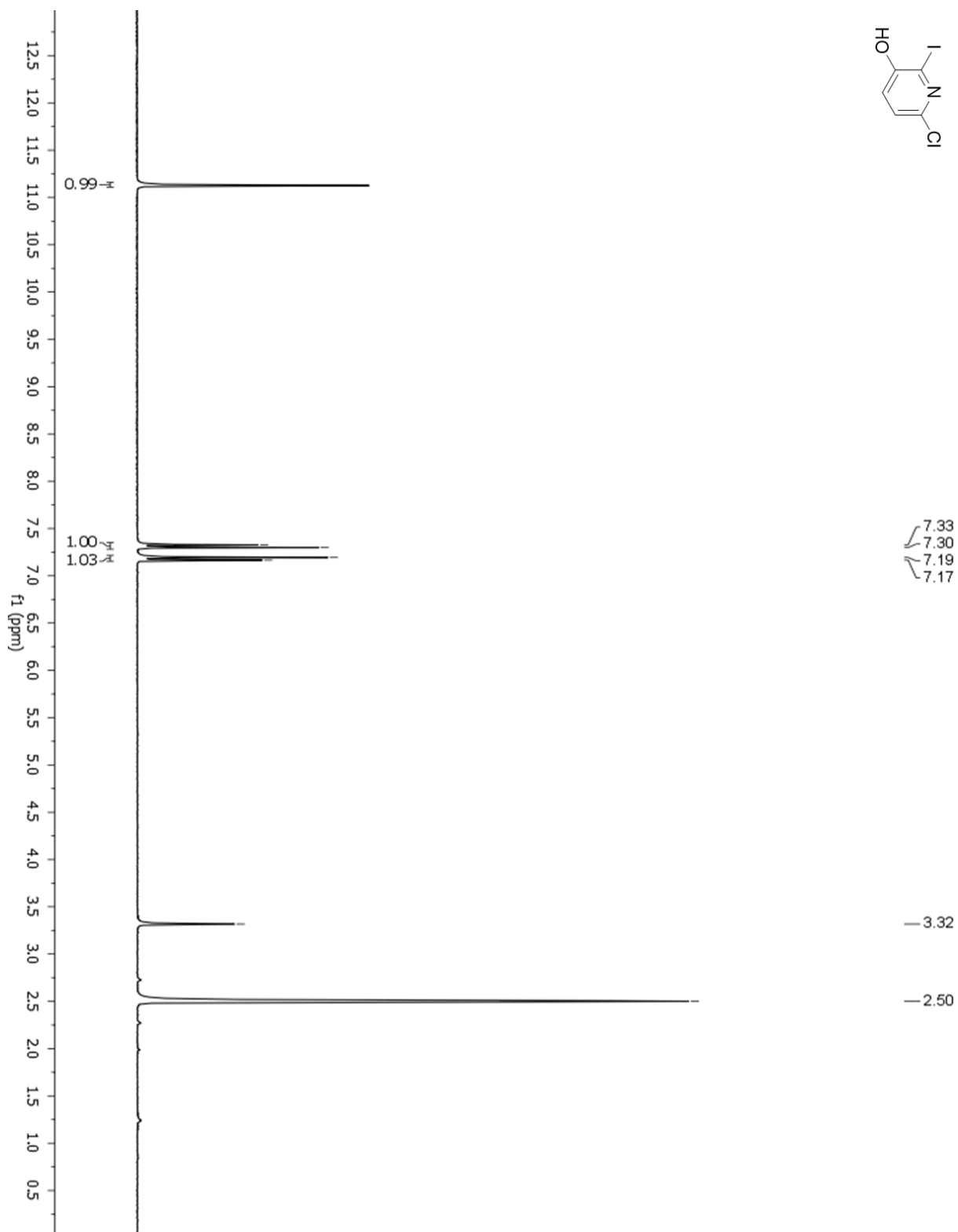
| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Rozdělení proteinových kináz dle strukturní a biologické podobnosti..... | 15 |
| Tabulka 2: Vybrané inhibitory Haspin kinázy. Informace převzaty z <i>The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors</i> (Omid Feizbakhsh, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier and Sandrine Ruchaud a <i>Haspin: a promising target for the design of inhibitors as potent anticancer drugs</i> . Amoussou NG, Bigot A, Roussakis C, Robert JH.)..... | 31 |
| Tabulka 3: Hodnoty IC50 látek 7 a 12 (testovány ve firmě Eurofins Scientific) | 62 |

17 SEZNAM GRAFŮ

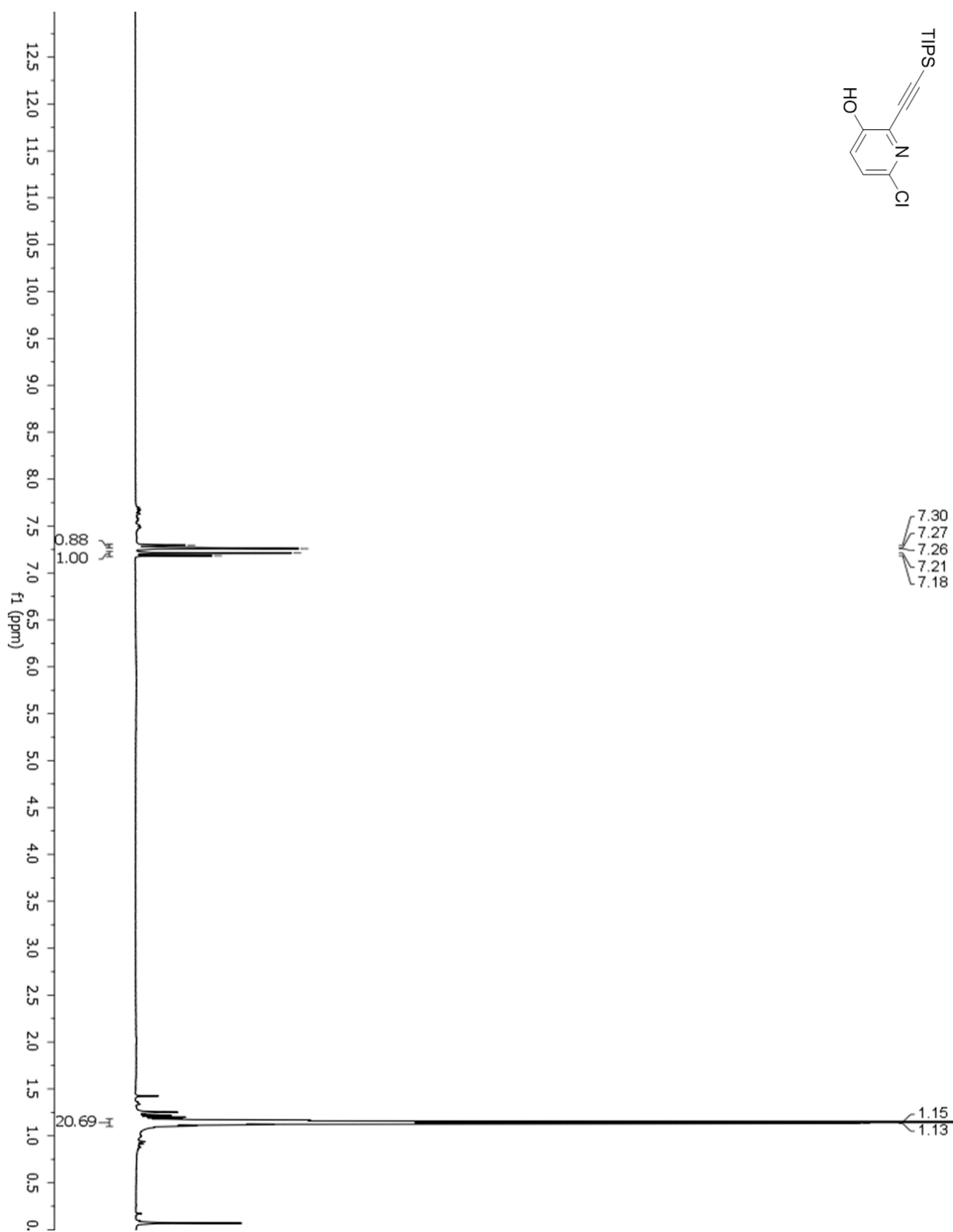
Graf 1: Závislost residuální aktivity kinázy Haspin na koncentraci látky **12** (= **MU1959**). 62

Graf 2: Závislost residuální aktivity kinázy Haspin na koncentraci látky **7** (= **MU1958**). 63

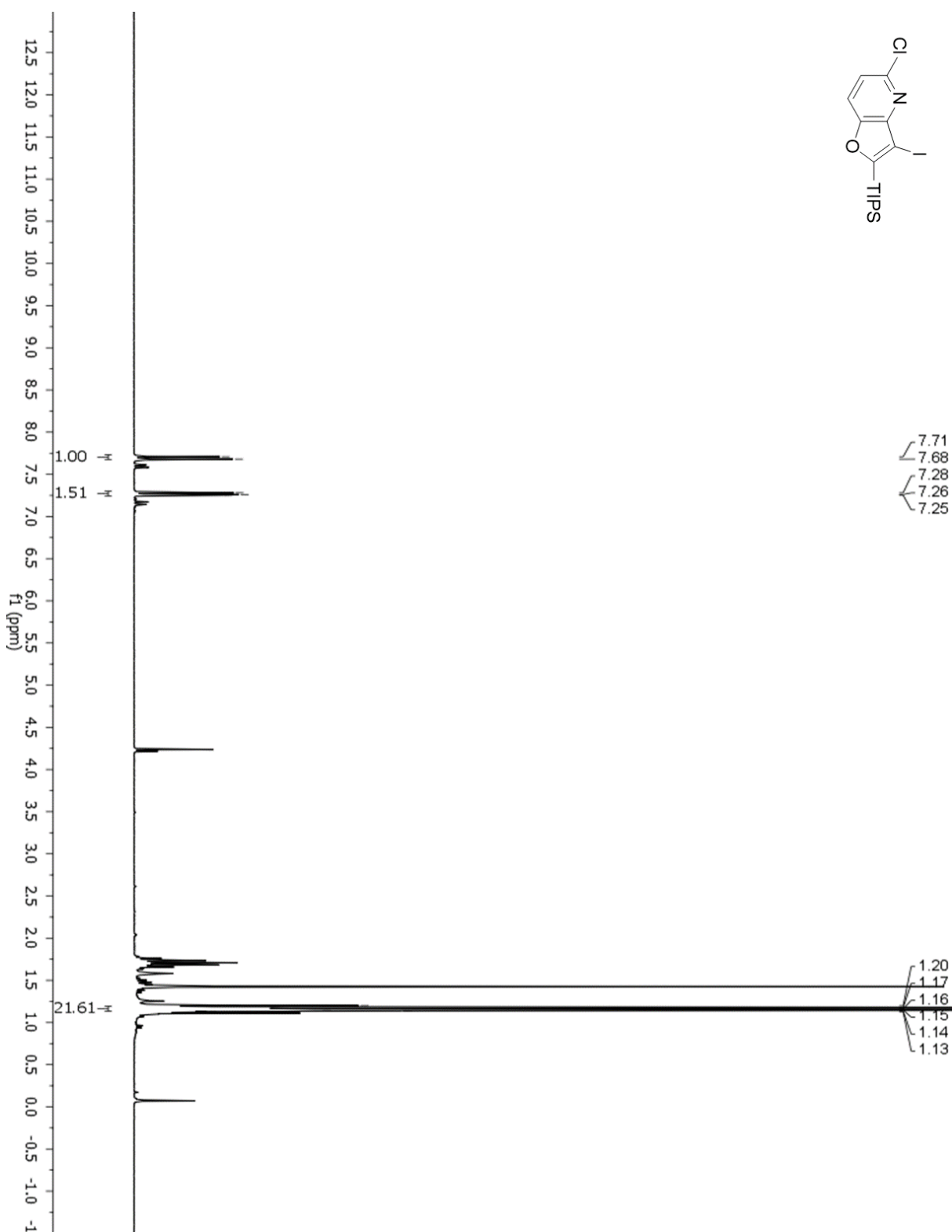
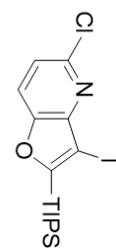
18 PŘÍLOHA 1: ¹H NMR SPEKTRA



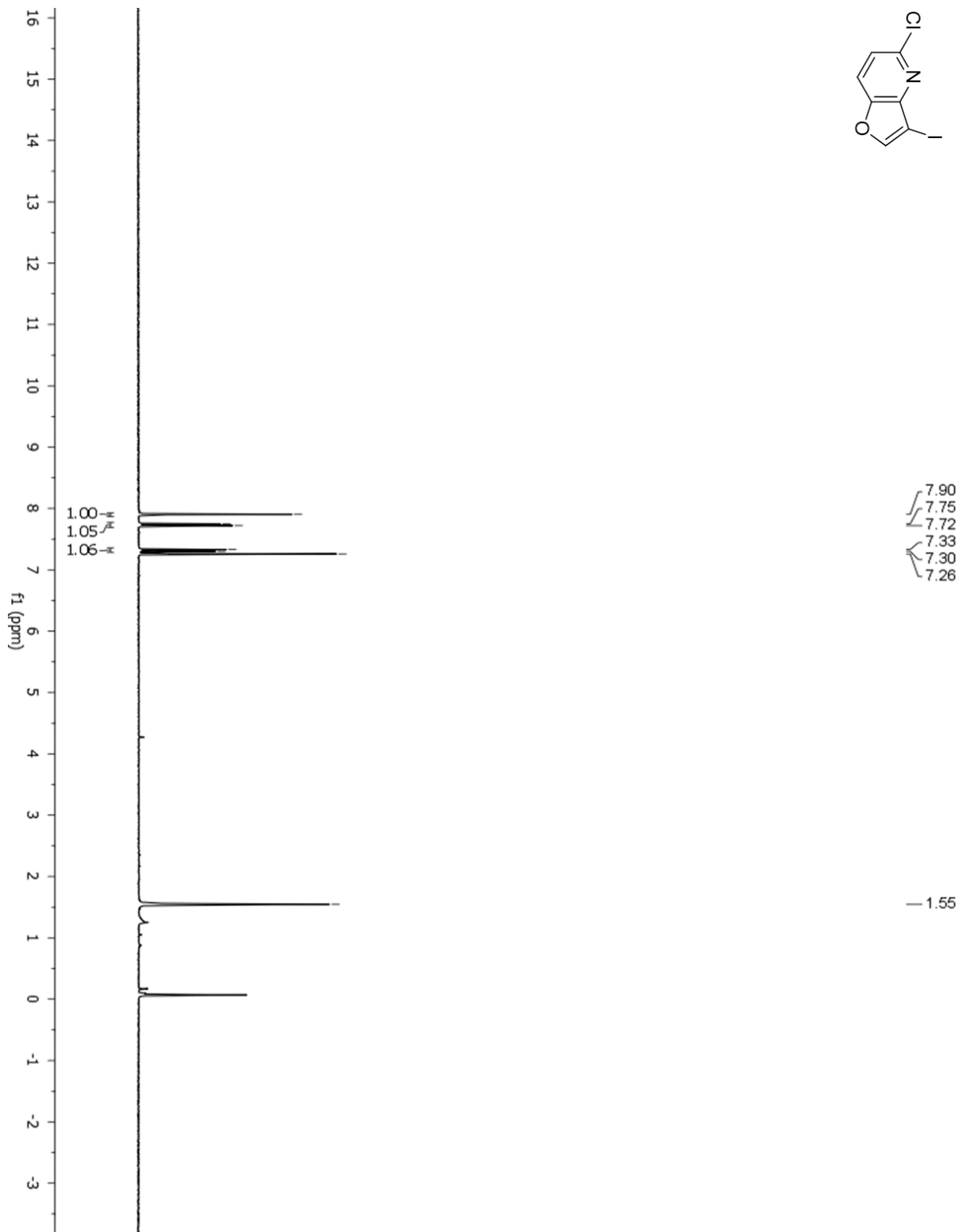
¹H NMR 1: Látka 1



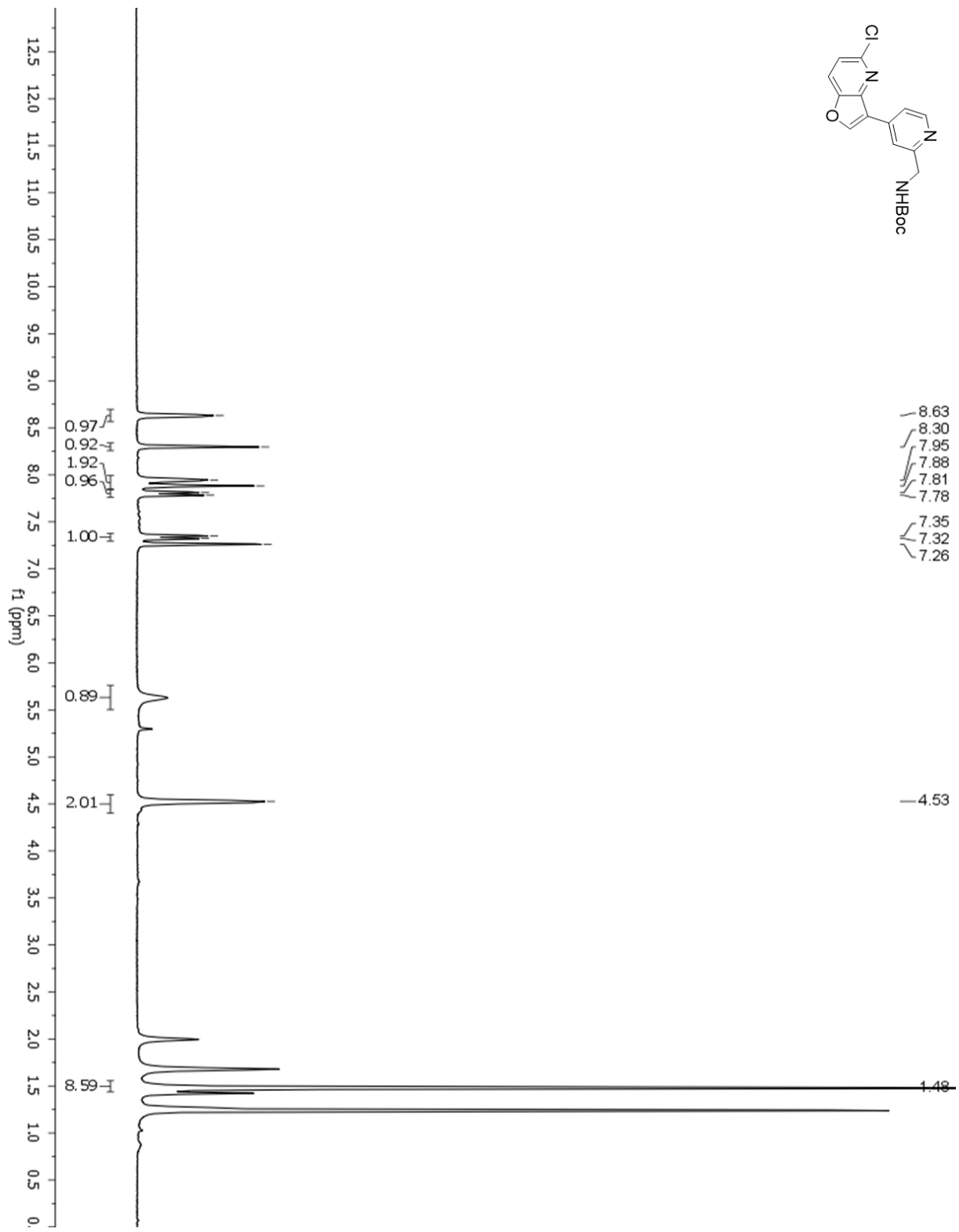
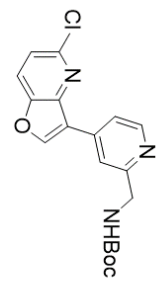
H NMR 2: Látka 2



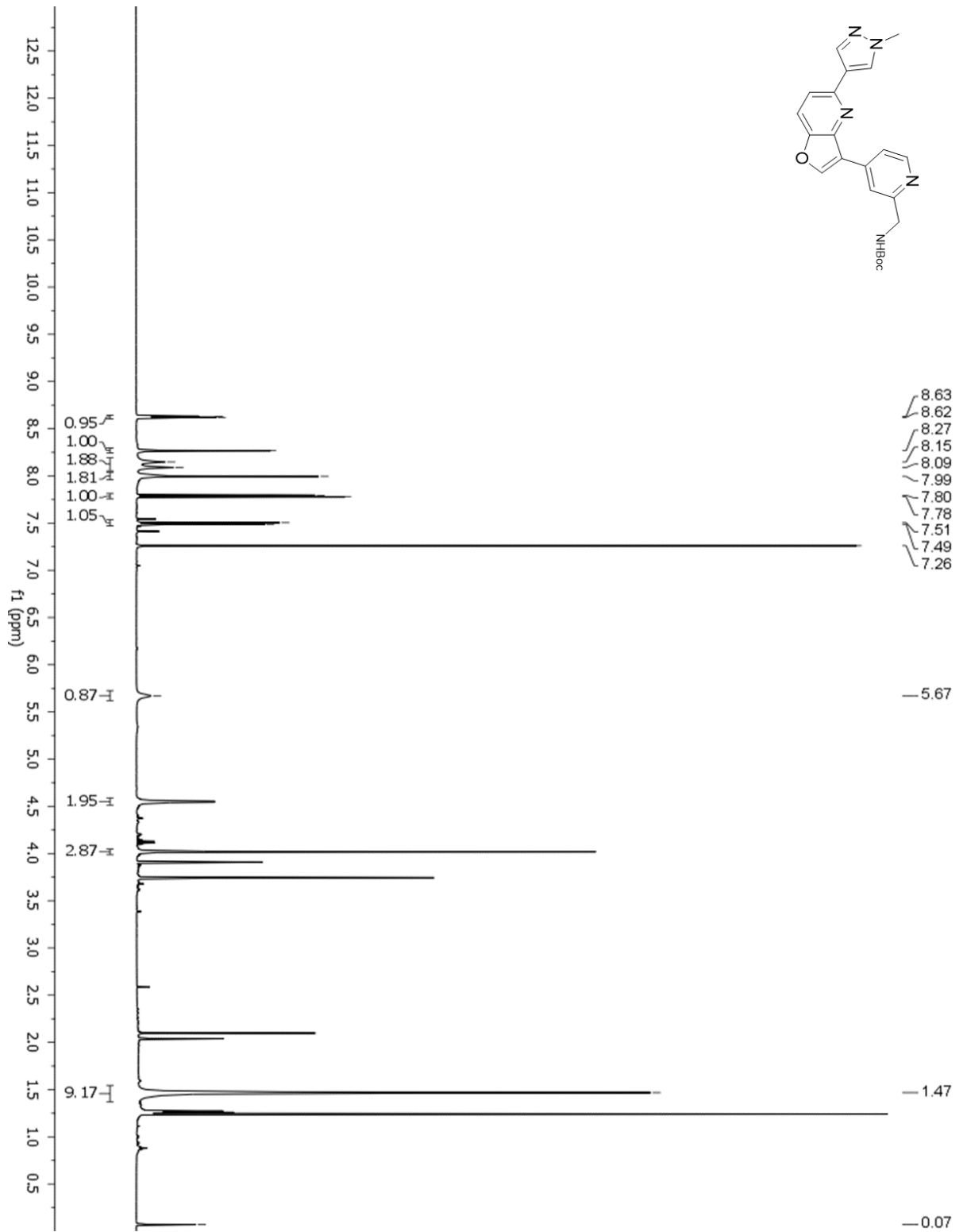
^1H NMR 4: Látka 3



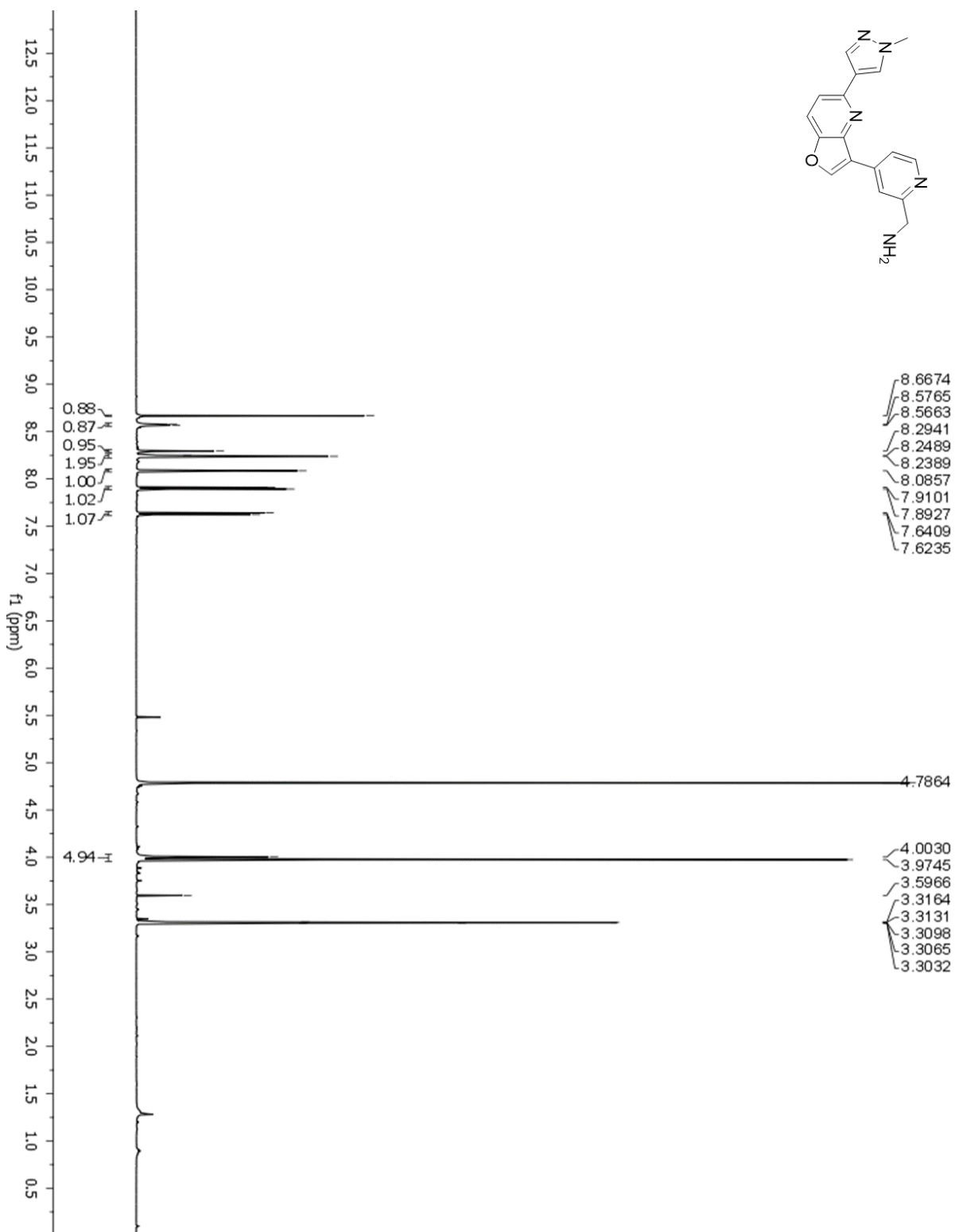
H NMR 6: Látka 4



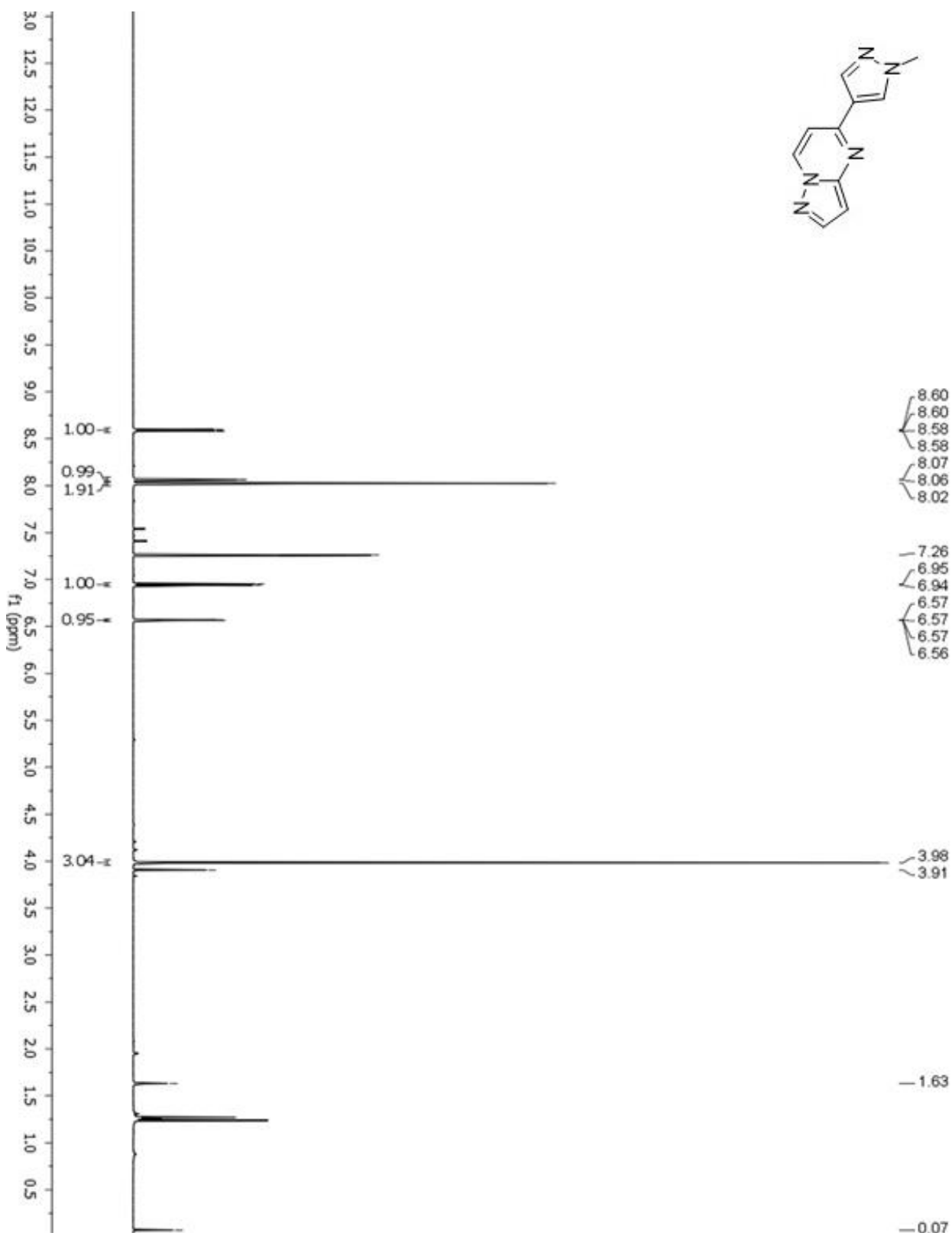
H NMR 7: Látka 5



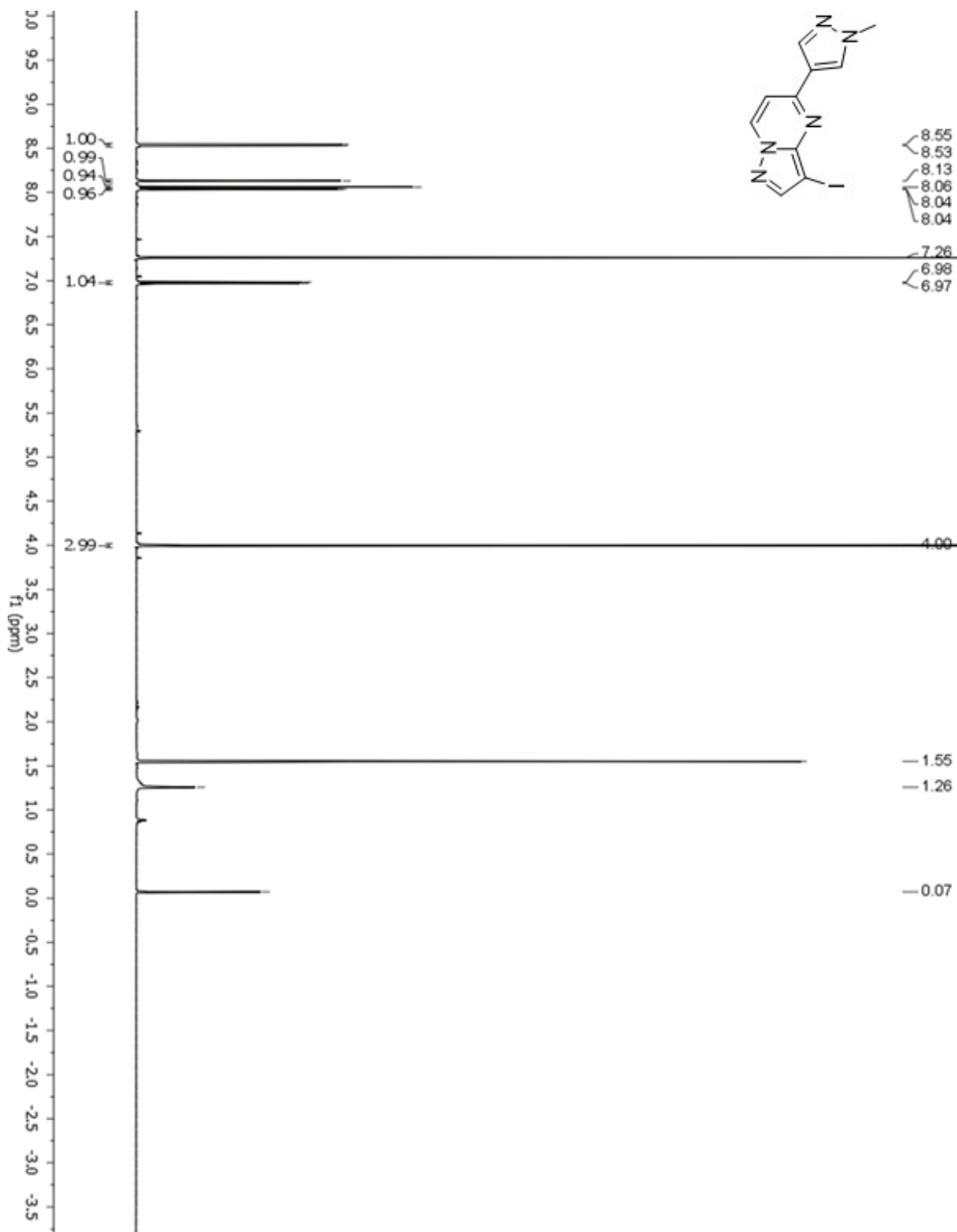
H NMR 9: Látka 6



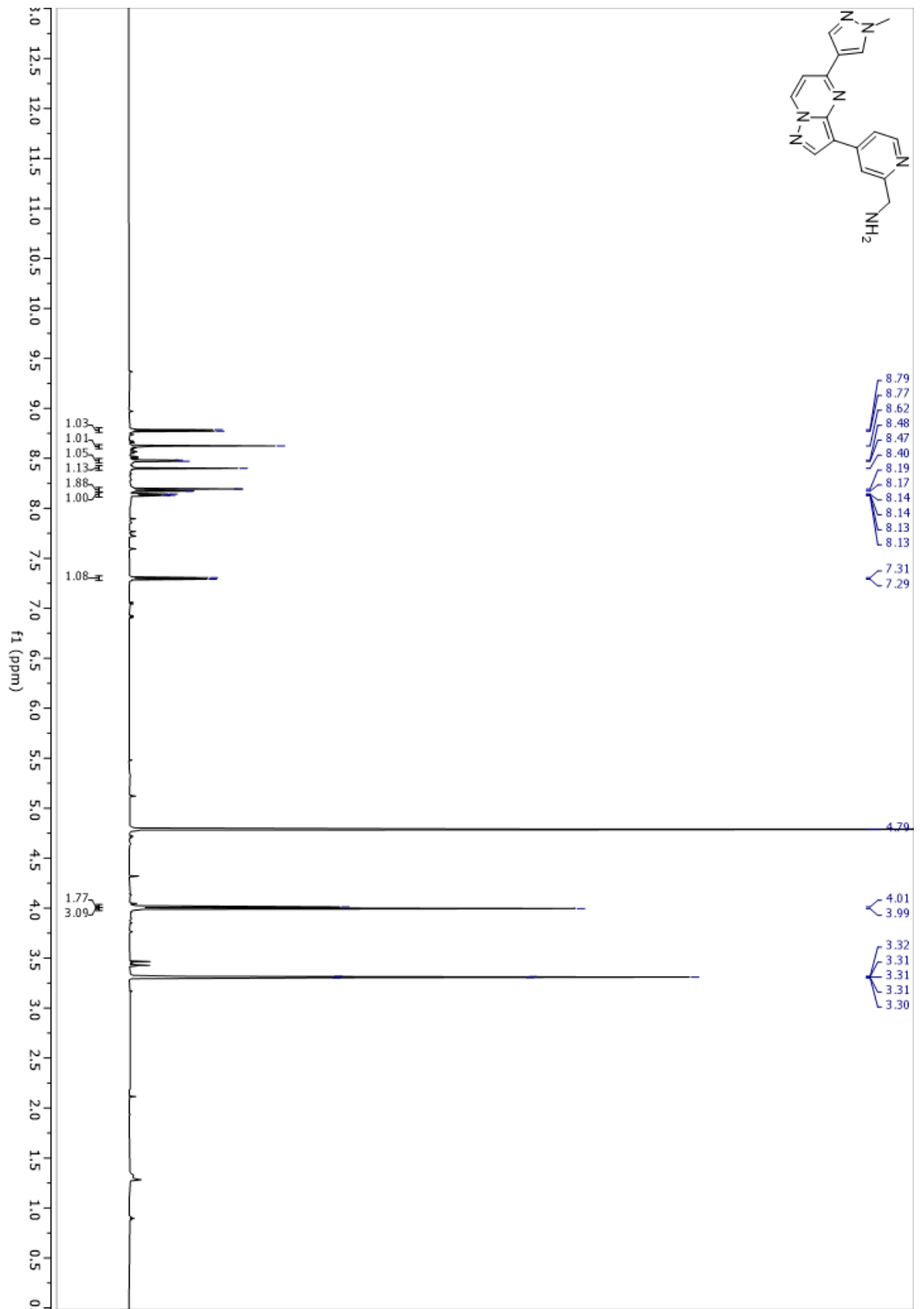
H NMR 11: Látka 7



H NMR 13: Látka 9

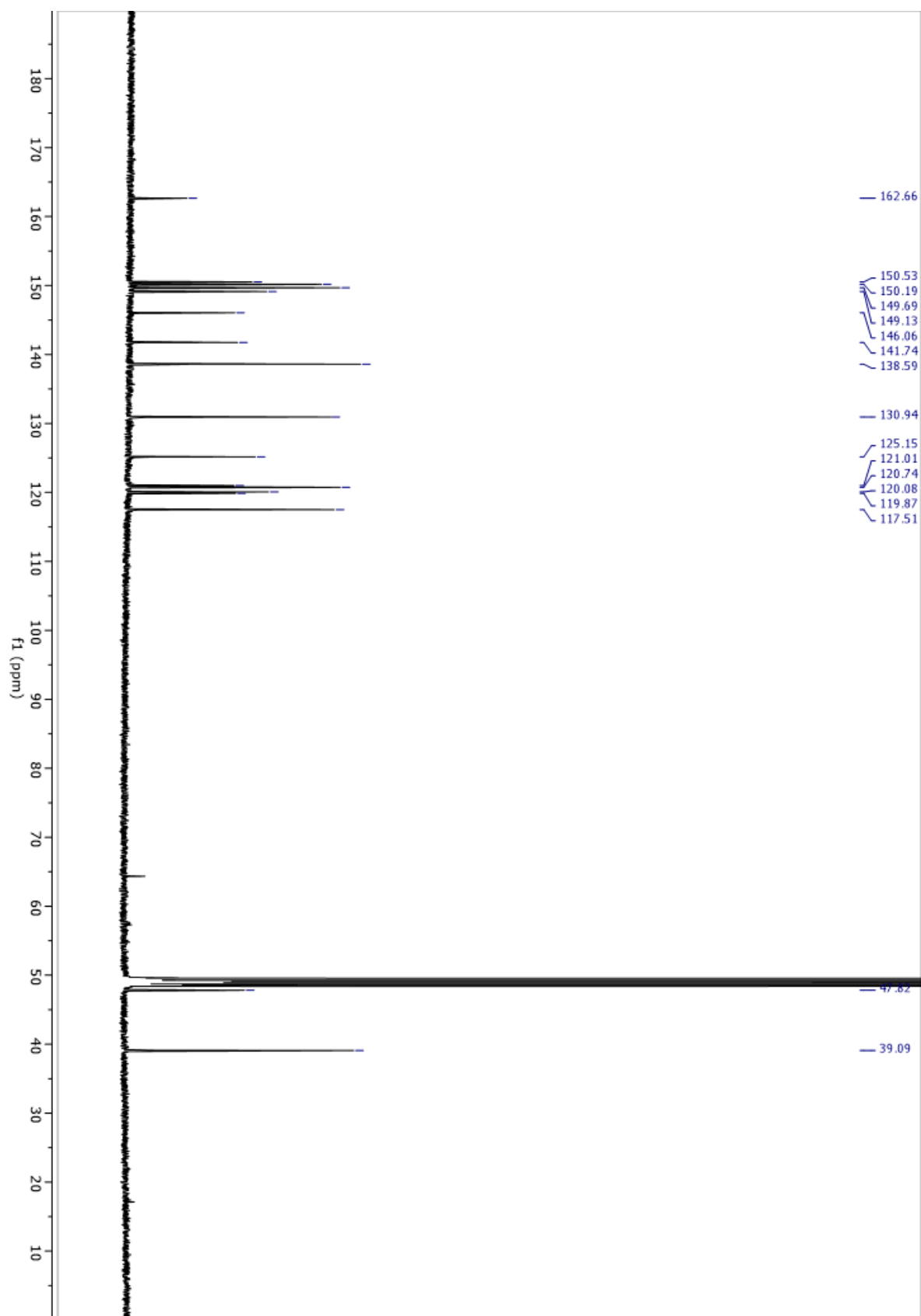


H NMR 15: Látka 10

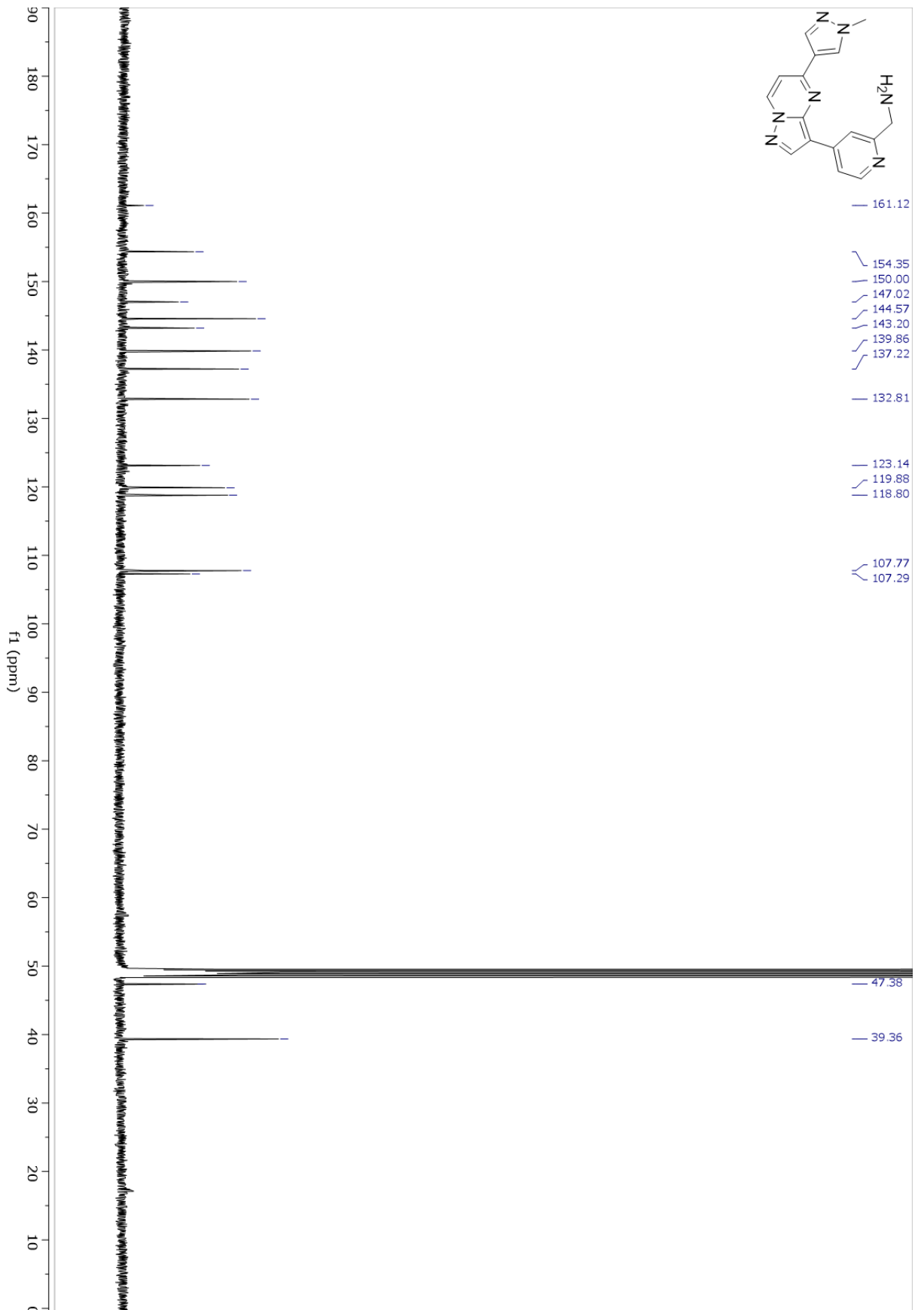


H NMR 17: Látka 12

19 PŘÍLOHA 2: C NMR

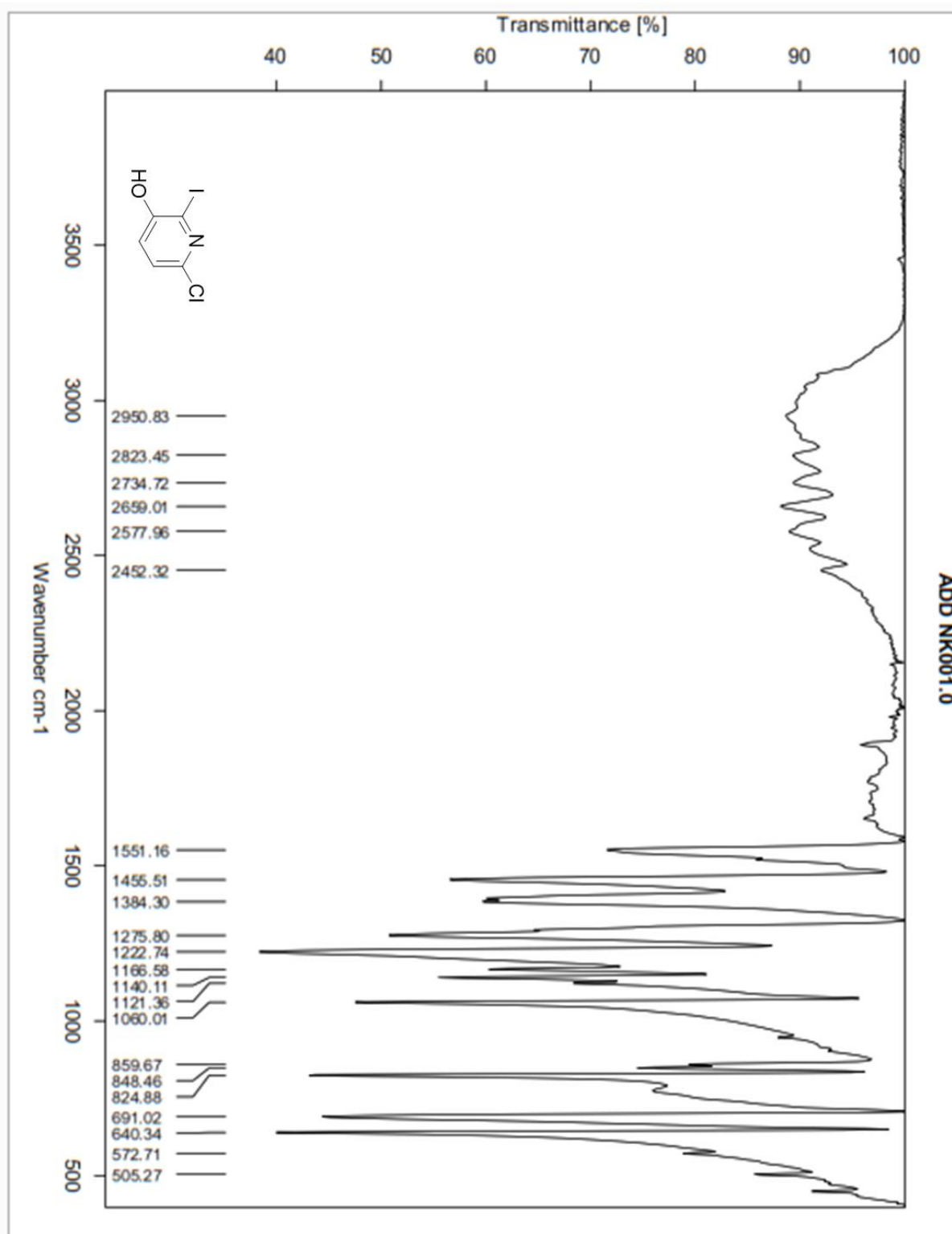


C NMR 1: Látka 7

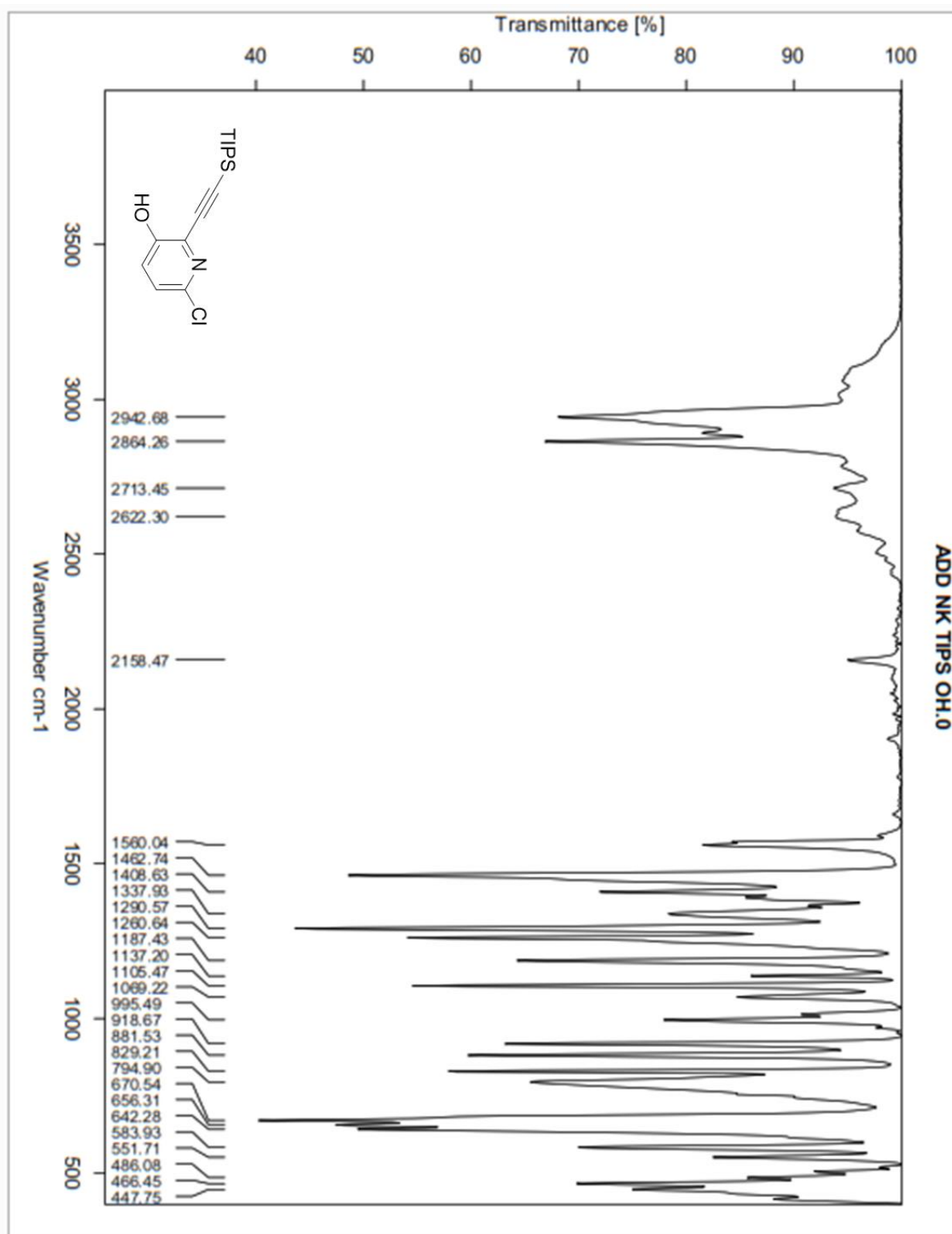


C NMR 2: Látka 12

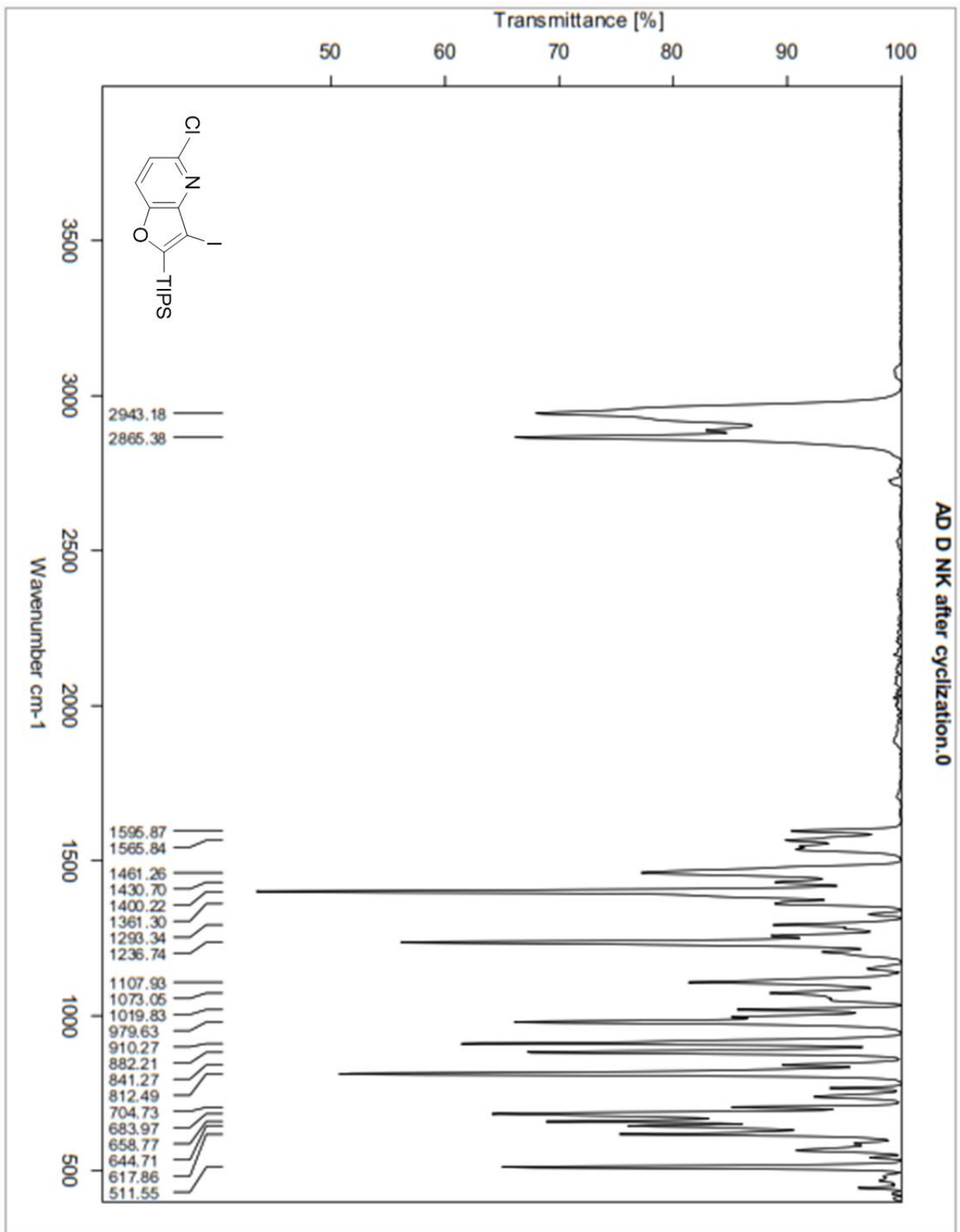
20 PŘÍLOHA 3: IR SPEKTRA



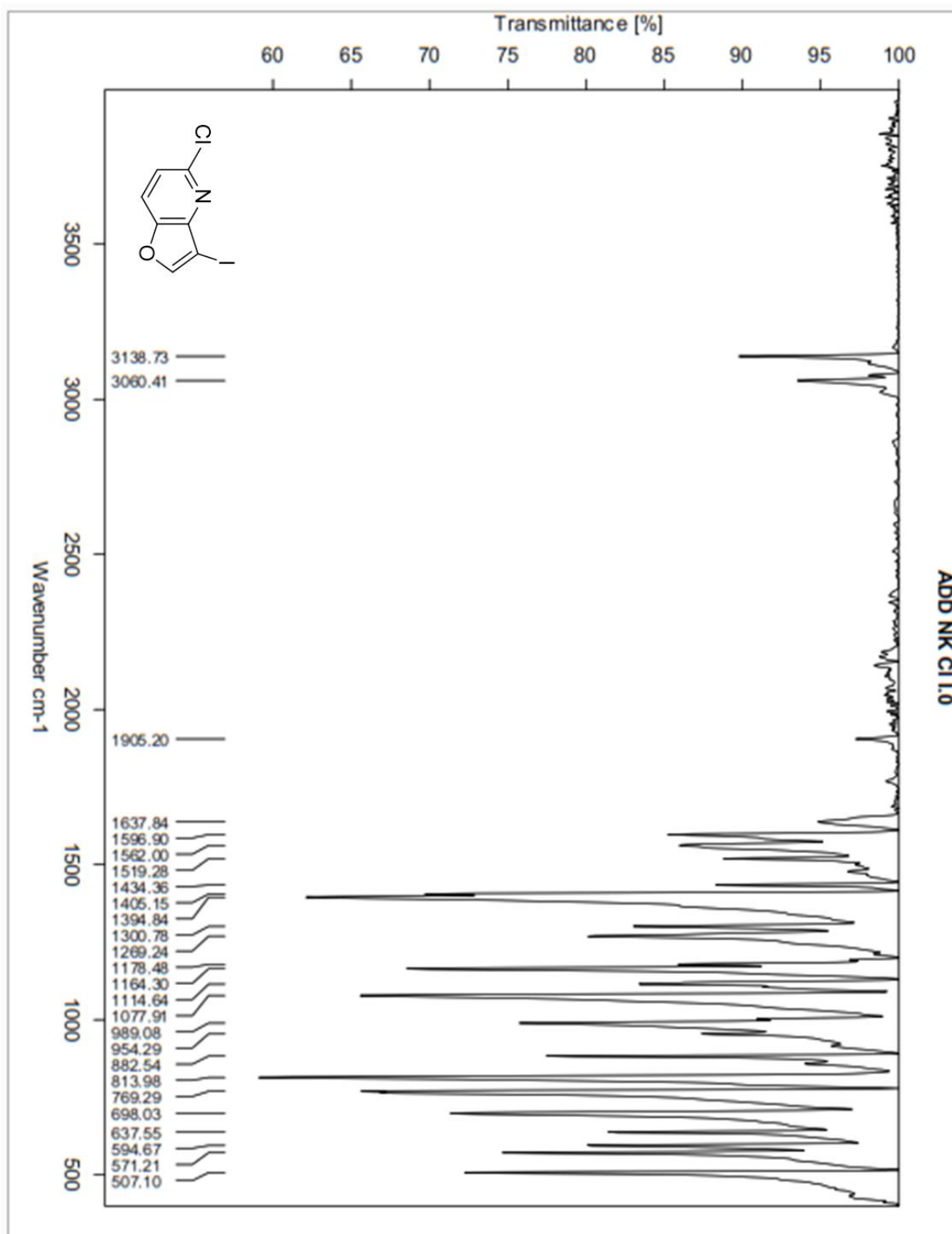
IR 1: Látka 1



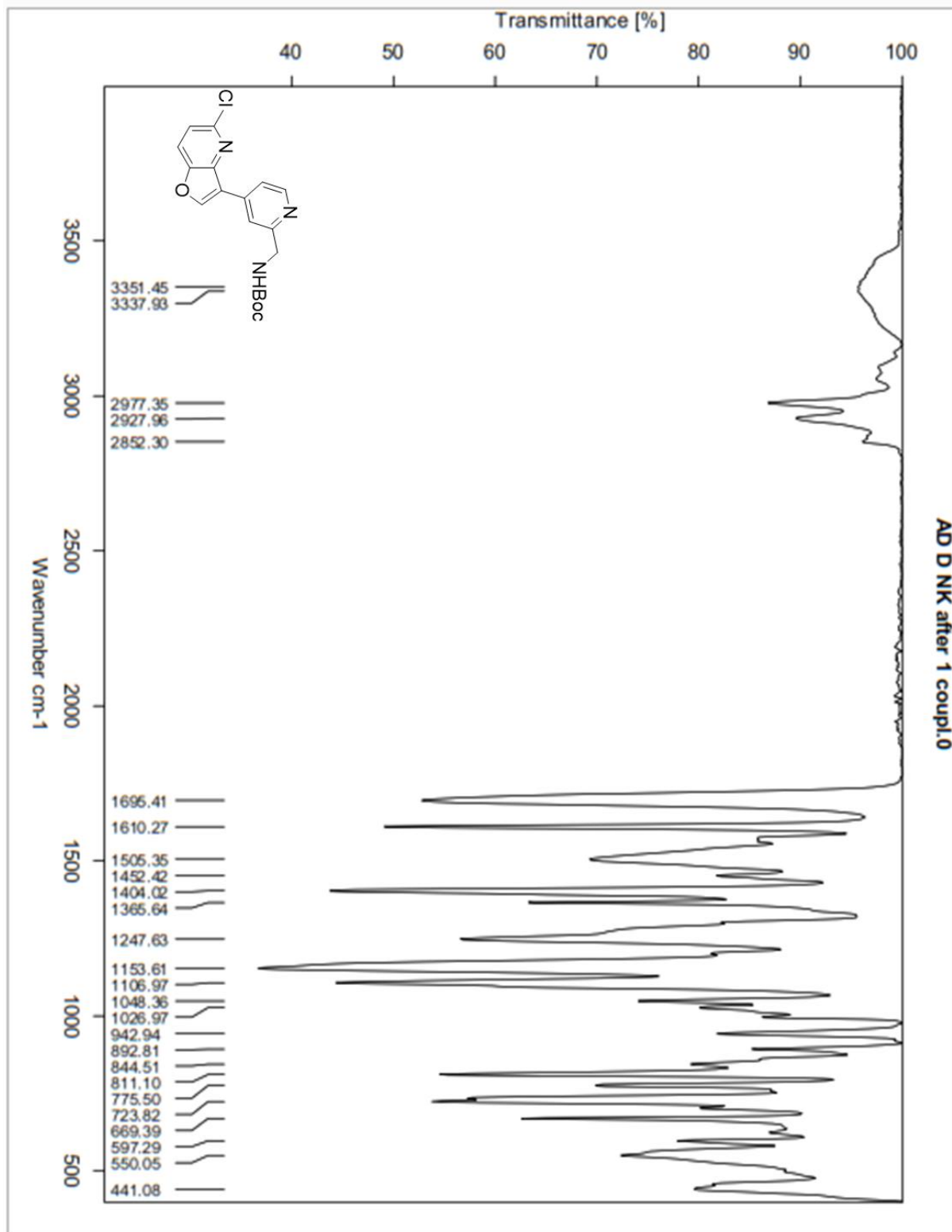
IR 2: Látka 2



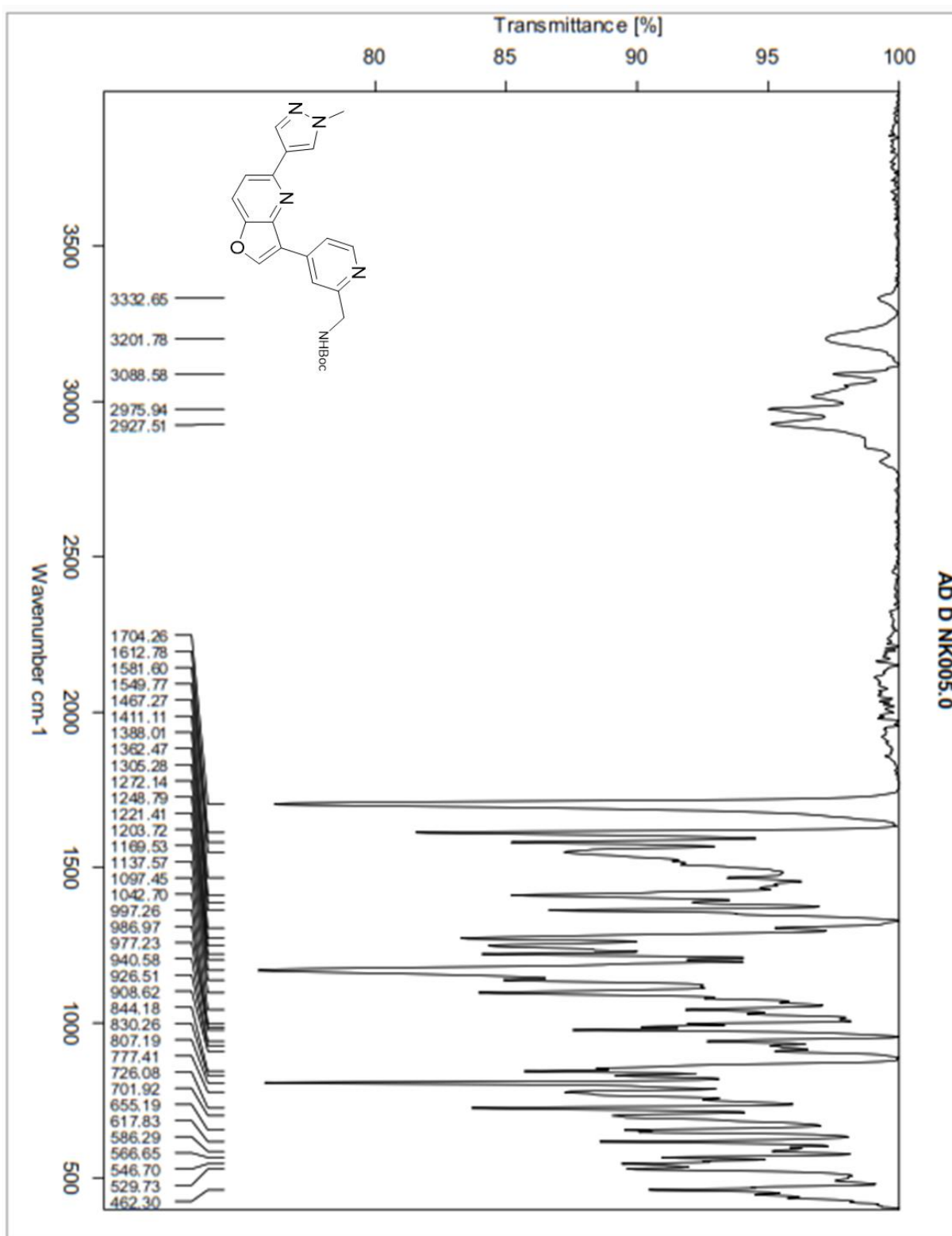
IR 4: Látka 3



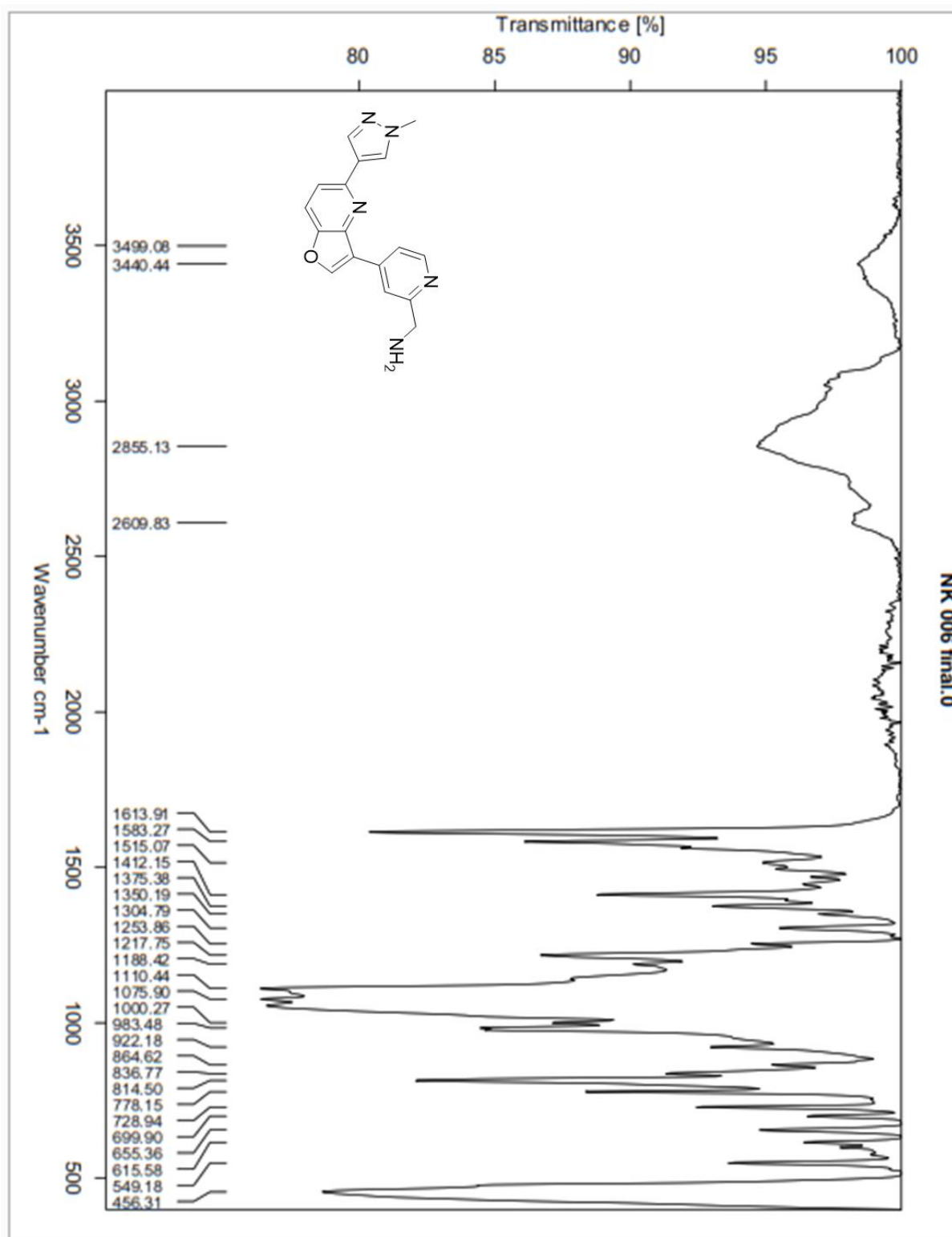
IR 5: Látka 4



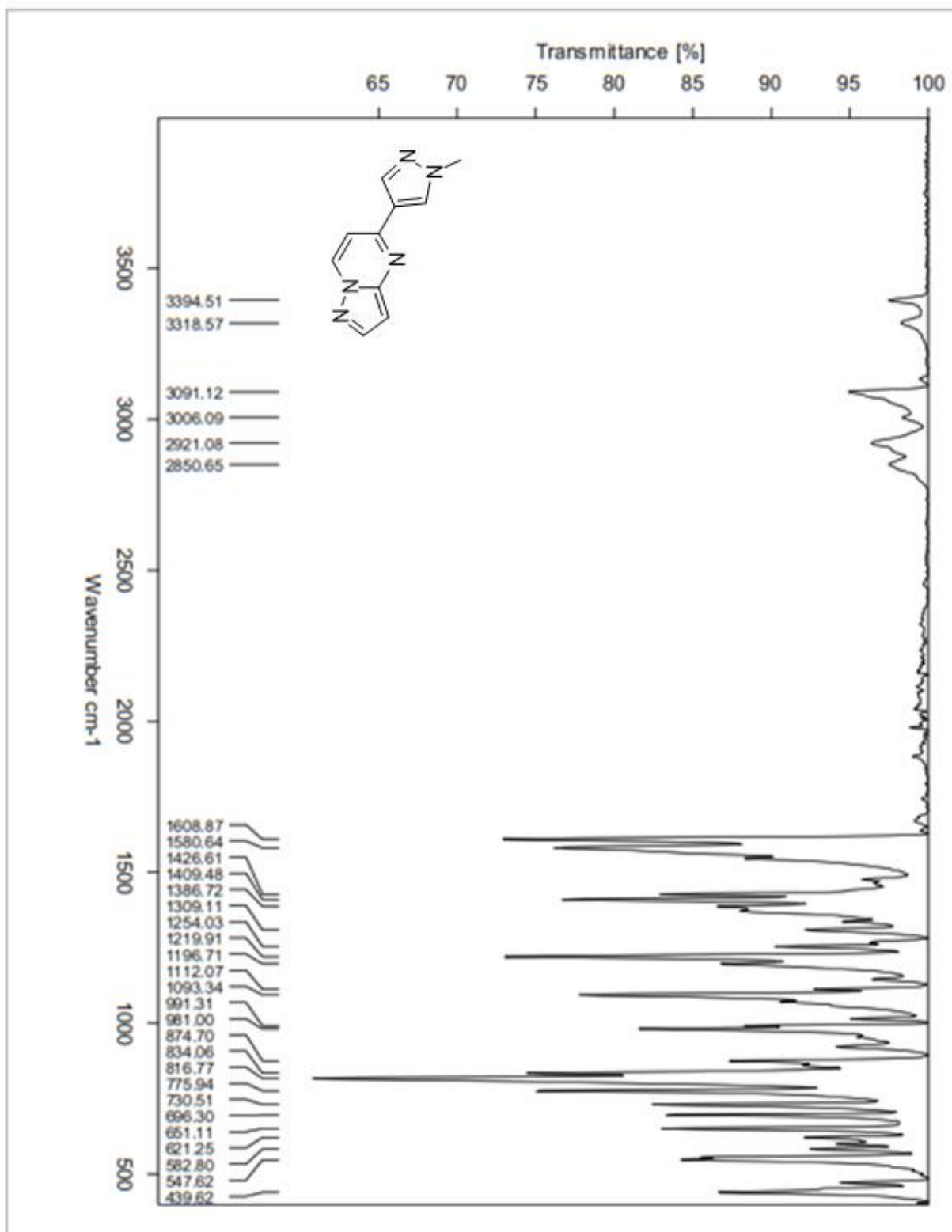
IR 7: Látka 5



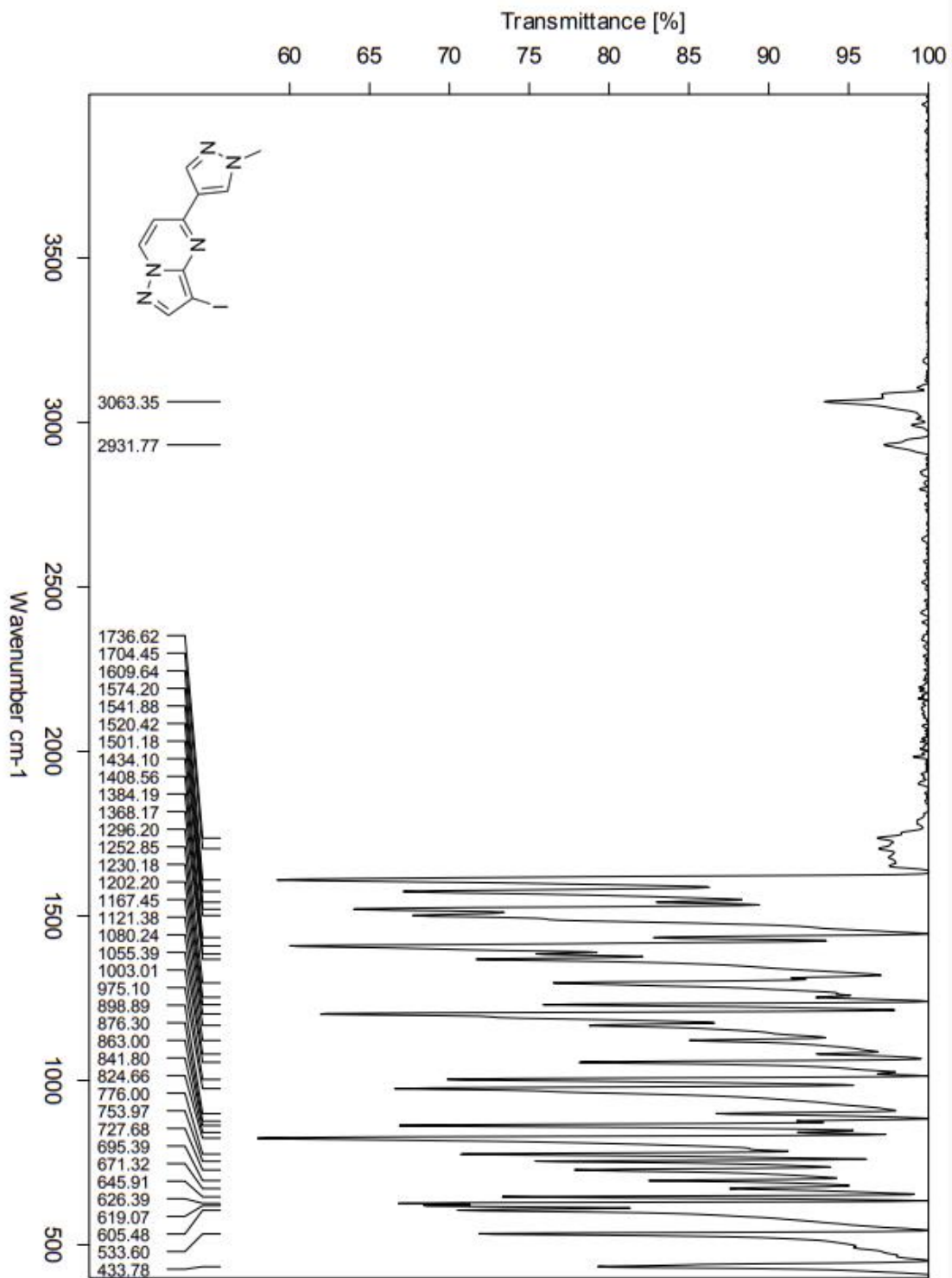
IR 9: Látka 6



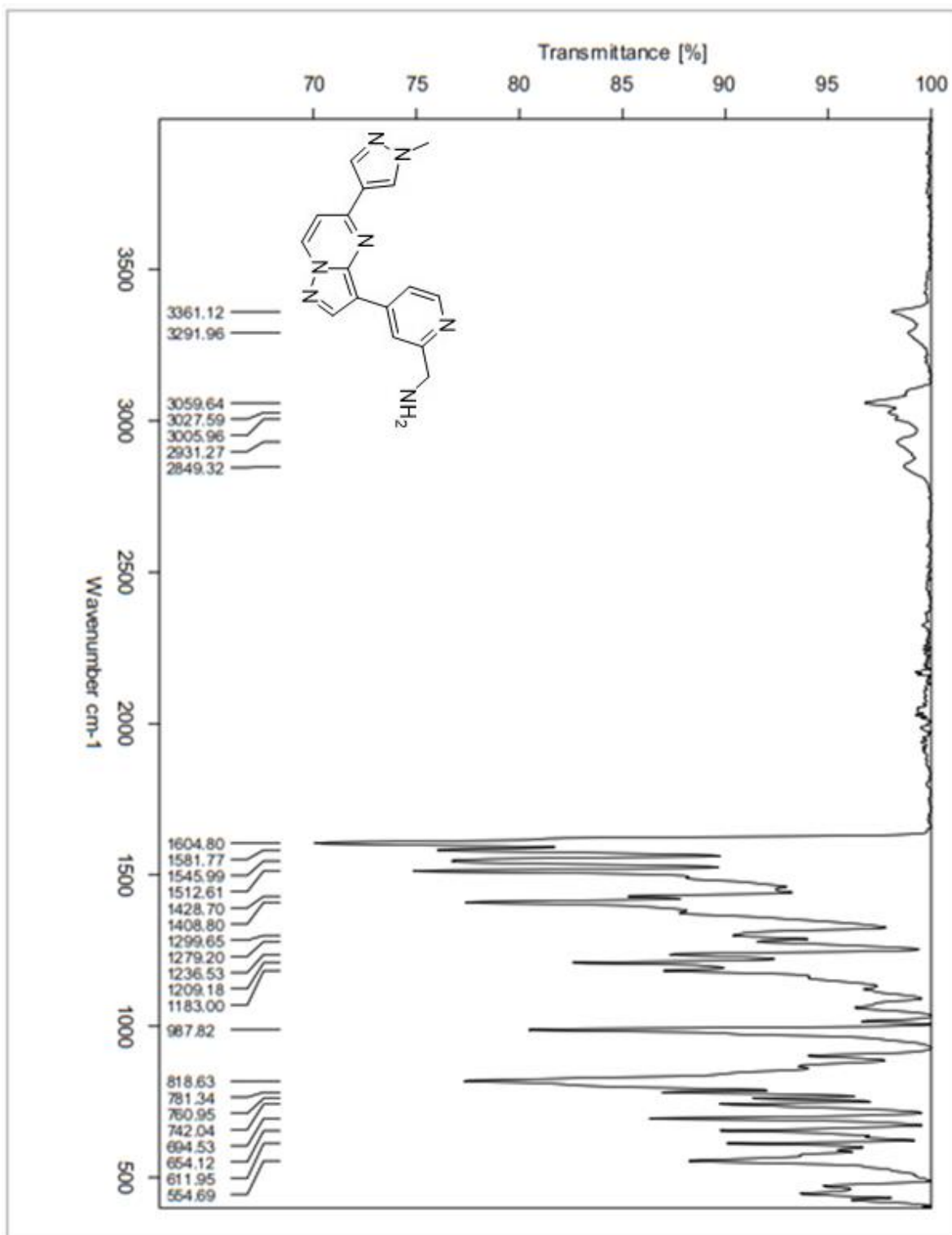
IR 11: Látka 7



IR 13: Látka 9



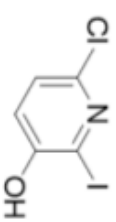
IR 14: Látka 10



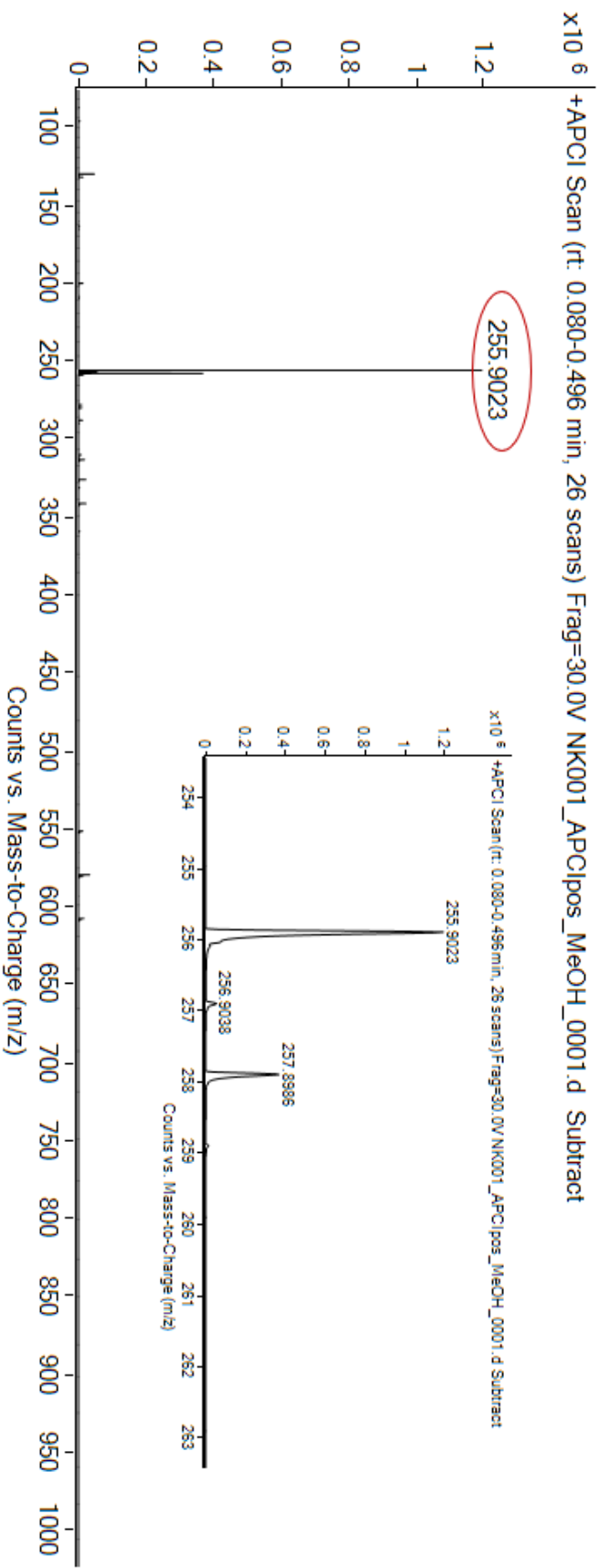
IR 15: Látka 12

C₅H₃ClINO

exact mass: 254.8948



APCI + (MMI)
nitrogen flow 5 L/min, gas temperature 325°C, nebulizer 45 psig, skimmer 65 V,
vaporizer 200°C, fragmentor 30 V, dissolved in methanol



expected mass: [M+H]⁺ = 255.9021

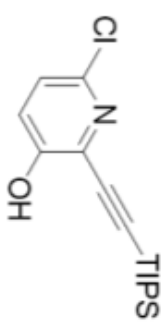
observed mass: [M+H]⁺ = 255.9023

mass accuracy = 0.8 ppm

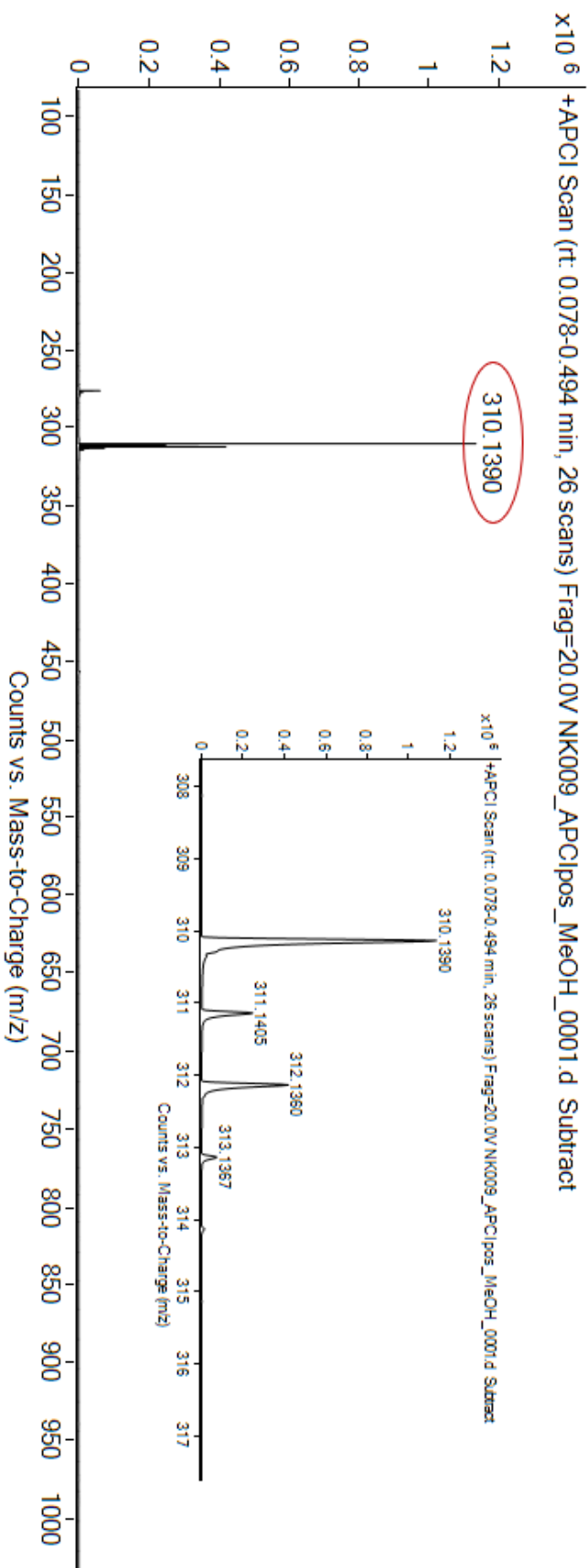
21 HRMS SPEKTRA

HRMS 1: Látka 1

C₁₆H₂₄ClNOSi exact mass: 309.1316



APCI + (MMI)
nitrogen flow 5 L/min, gas temperature 325°C, nebulizer 45 psig, skimmer 65 V,
vaporizer 200°C, fragmentor 20 V, dissolved in methanol



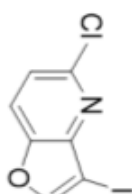
expected mass: [M+H]⁺ = 310.1388

observed mass: [M+H]⁺ = 310.1390

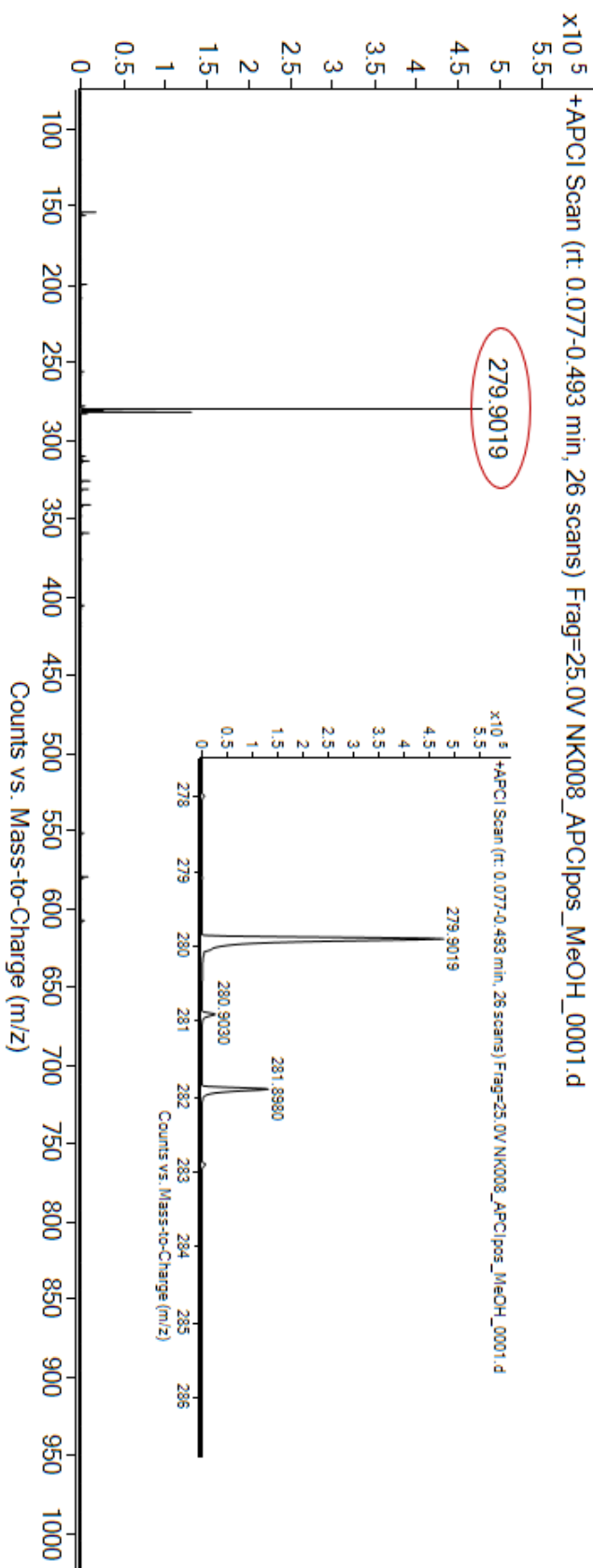
mass accuracy = 0.6 ppm

C₇H₃ClINO

exact mass: 278.8948



APCI + (MMI)
nitrogen flow 5 L/min, gas temperature 325°C, nebulizer 45 psig, skimmer 65 V,
vaporizer 200°C, fragmentor 25 V, dissolved in methanol

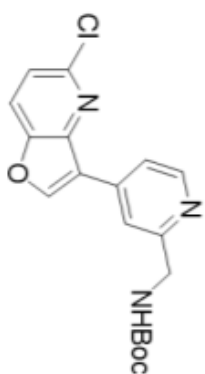


expected mass: [M+H]⁺ = 279.9021

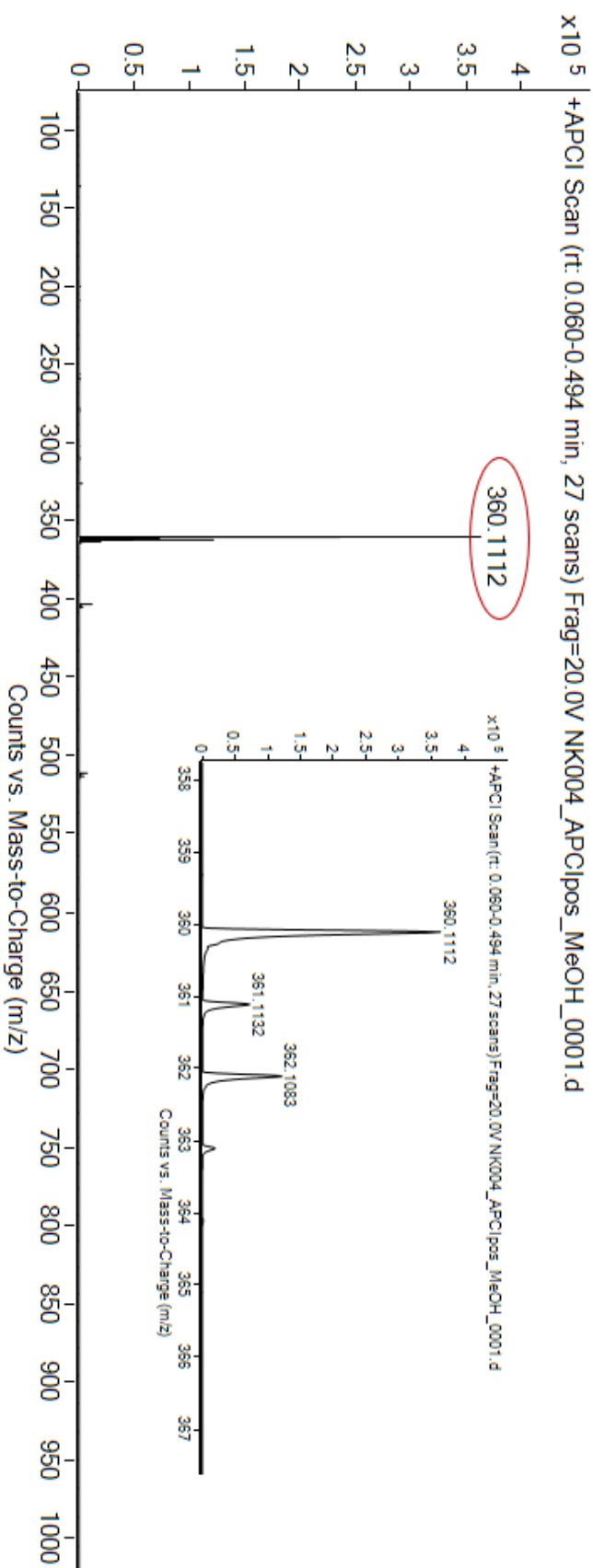
observed mass: [M+H]⁺ = 279.9019

mass accuracy = - 0.7 ppm

$C_{18}H_{18}ClN_3O_3$ exact mass: 359.1037



APCI + (MMI)
nitrogen flow 5 L/min, gas temperature 325°C, nebulizer 45 psig, skimmer 65 V,
vaporizer 200°C, fragmentor 20 V, dissolved in methanol



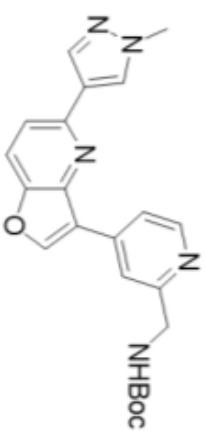
expected mass: $[M+H]^+ = 360.1109$

observed mass: $[M+H]^+ = 360.1112$

mass accuracy = 0.8 ppm

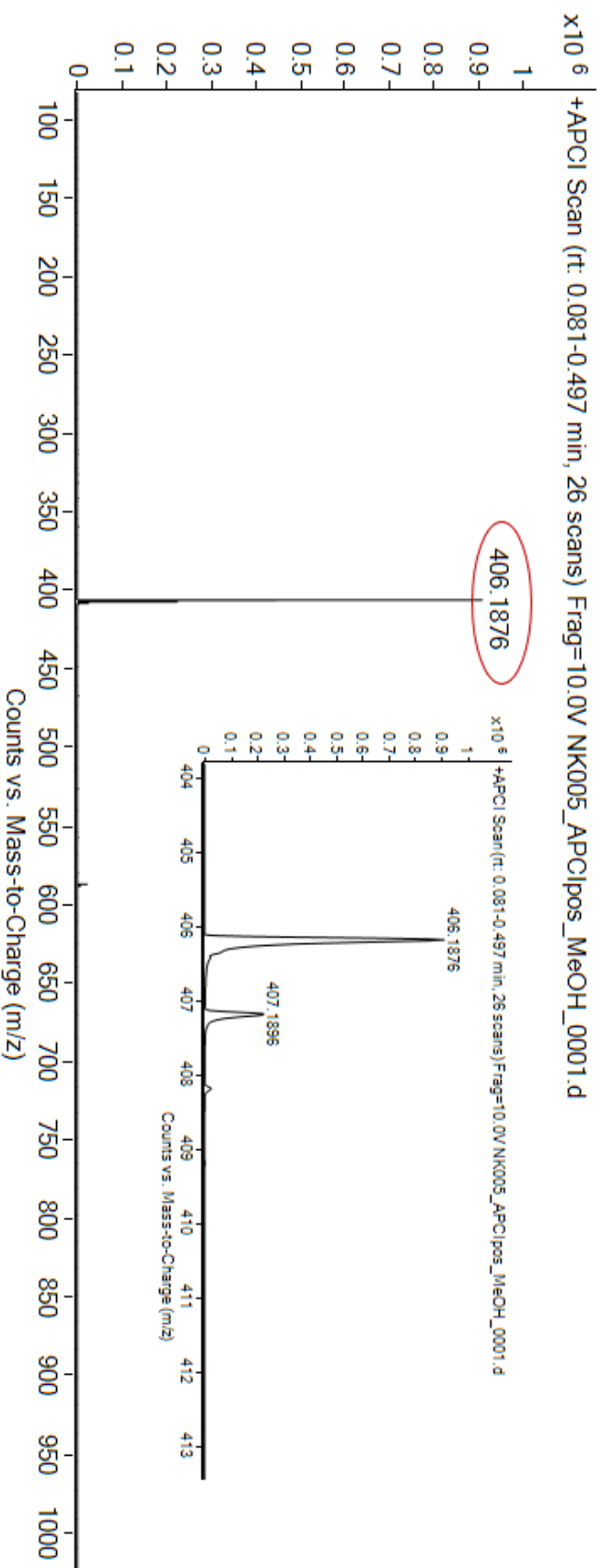
$C_{22}H_{23}N_5O_3$

exact mass: 405.1801



APCI + (MII)

nitrogen flow 5 L/min, gas temperature 325°C, nebulizer 45 psig, skimmer 65 V,
vaporizer 200°C, fragmentor 10 V, dissolved in methanol



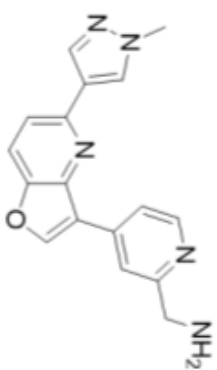
expected mass: $[M+H]^+ = 406.1874$

observed mass: $[M+H]^+ = 406.1876$

mass accuracy = 0.5 ppm

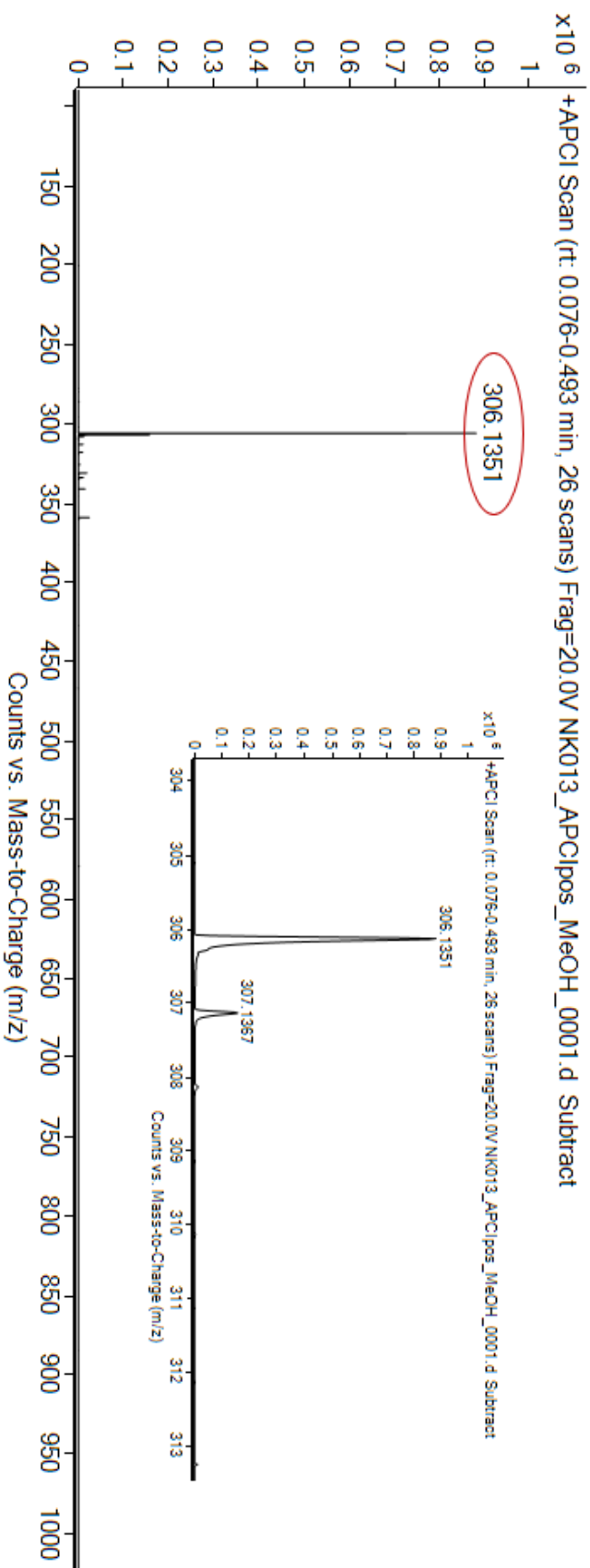
$C_{17}H_{15}N_5O$

exact mass: 305.1277



APCI + (MII)

nitrogen flow 5 L/min, gas temperature 325°C, nebulizer 45 psig, skimmer 65 V, vaporizer 200°C, fragmentor 20 V, dissolved in methanol



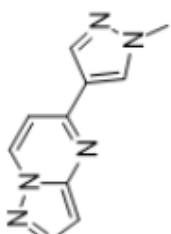
expected mass: $[M+H]^+ = 306.1349$

observed mass: $[M+H]^+ = 306.1351$

mass accuracy = 0.7 ppm

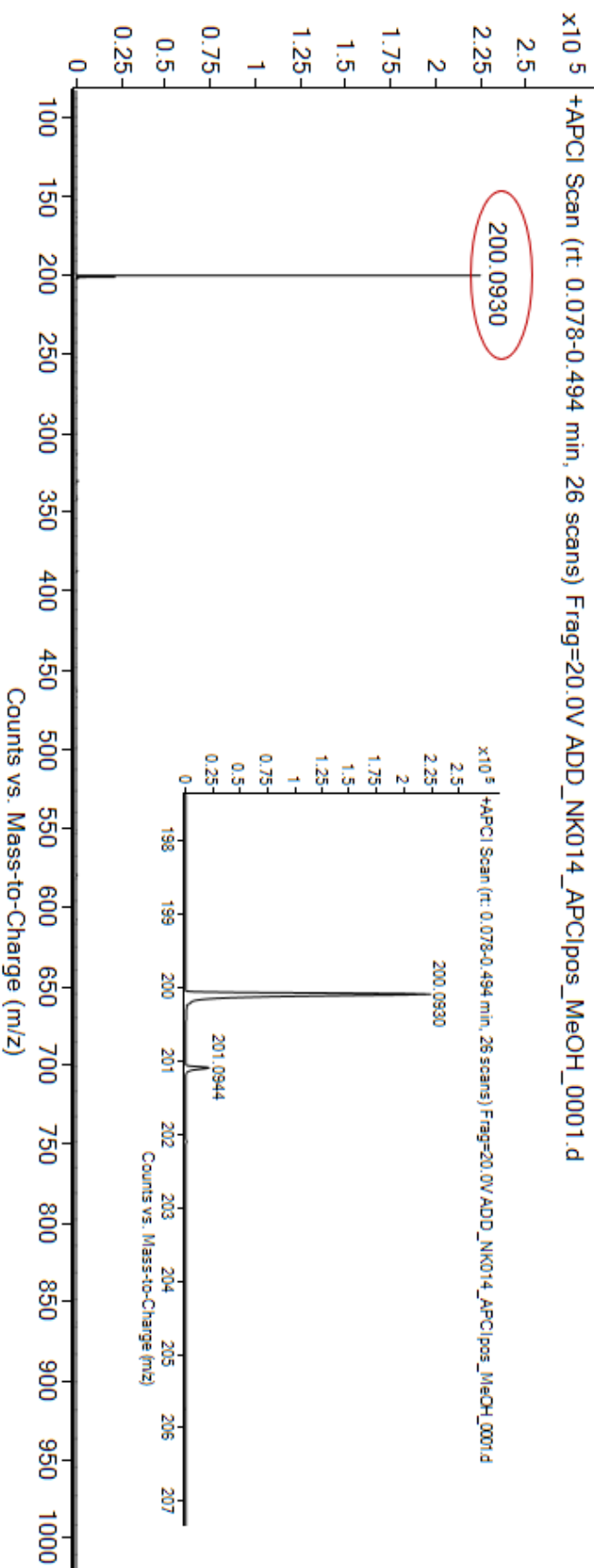
C₁₀H₆N₅

exact mass: 199.0858



APCI+ (MMI)

nitrogen flow 5 L/min, gas temperature 325°C, nebulizer 45 psig, skimmer 65 V,
vaporizer 200°C, fragmentor 20 V, dissolved in methanol



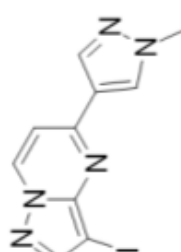
expected mass: [M+H]⁺ = 200.0931

observed mass: [M+H]⁺ = 300.0930

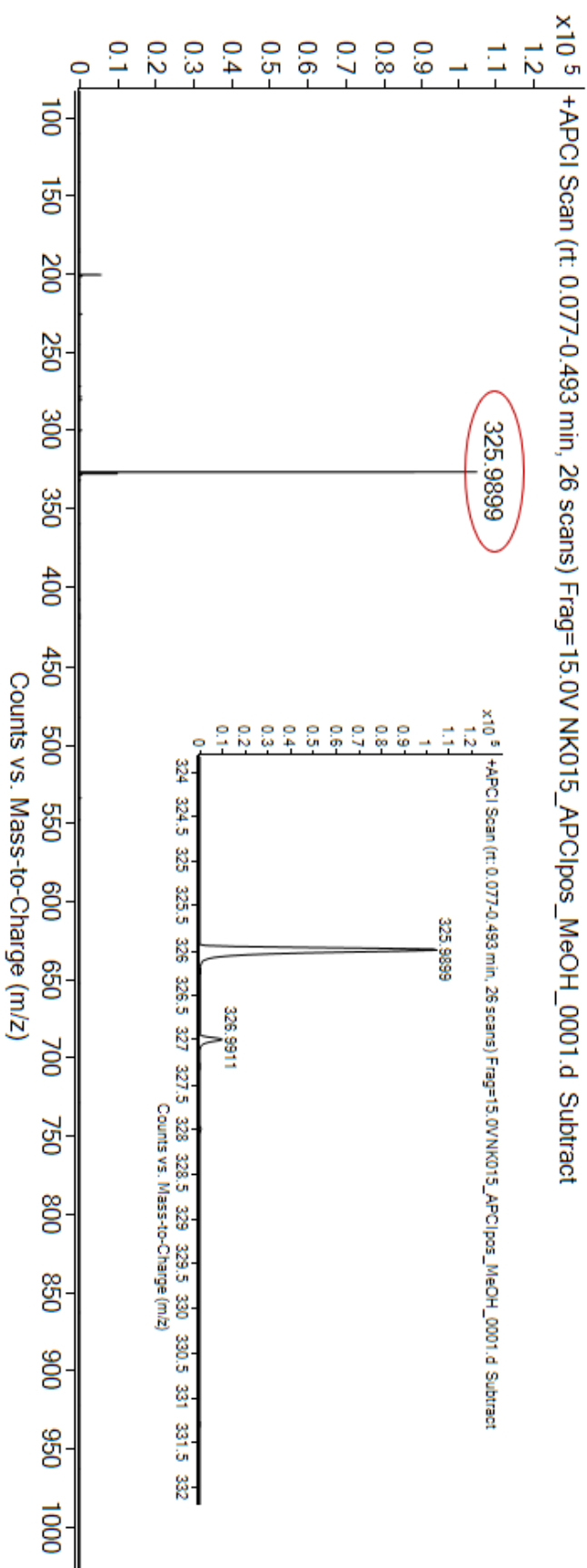
mass accuracy = - 0.5 ppm

C₁₀H₈N₅

exact mass: 324.9824



APCI + (MMI)
nitrogen flow 5 L/min, gas temperature 325°C, nebulizer 45 psig, skimmer 65 V,
vaporizer 200°C, fragmentor 15 V, dissolved in methanol



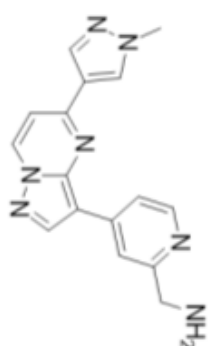
expected mass: [M+H]⁺ = 325.9897

observed mass: [M+H]⁺ = 325.9899

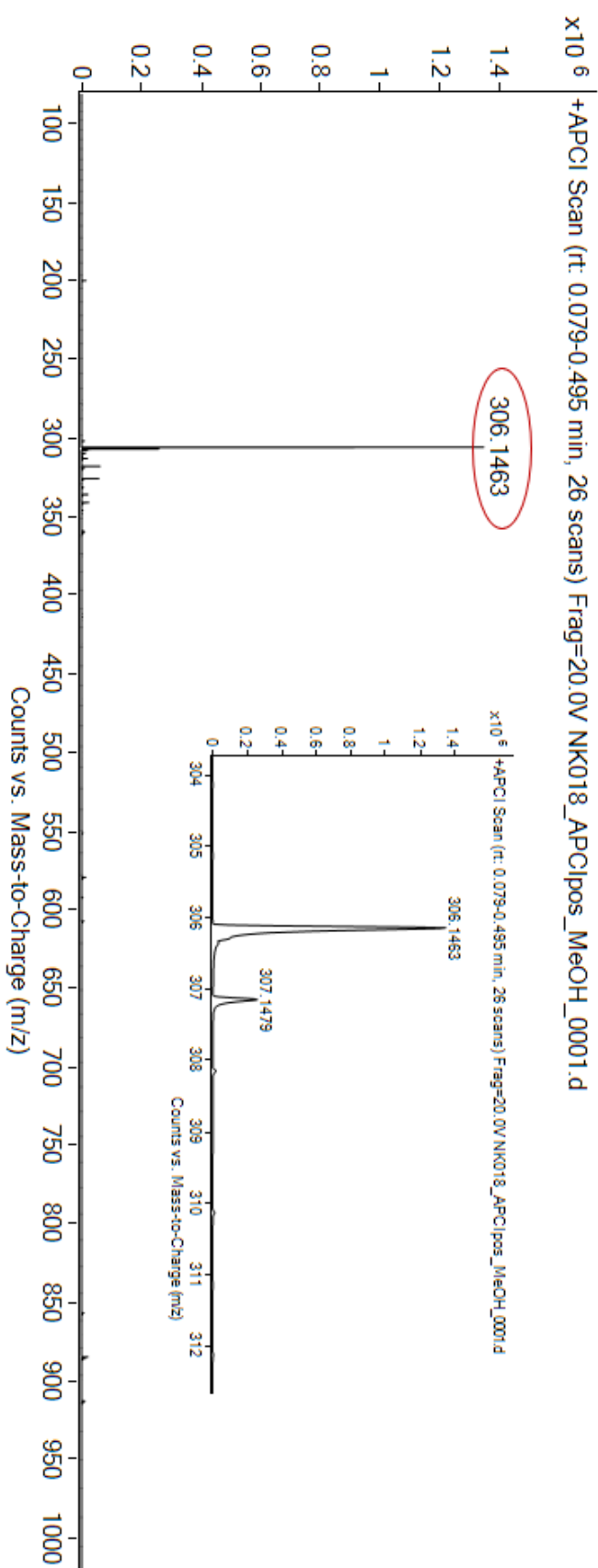
mass accuracy = 0.6 ppm

$C_{16}H_{15}N_7$

exact mass: 305.1389



APCI+ (MMI)
nitrogen flow 5 L/min, gas temperature 325°C, nebulizer 45 psig, skimmer 65 V,
vaporizer 200°C, fragmentor 20 V, dissolved in methanol



expected mass: $[M+H]^+ = 306.1462$

observed mass: $[M+H]^+ = 306.1463$

mass accuracy = 0.3 ppm

HRMS 9: Látka 12