



Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske  
znanosti

**Stabilnost i pregrađivanje *N*-radikala relevantnih za sintezu  
bioaktivnih spojeva**

Stability and rearrangements of *N*-centered radicals relevant for  
bioactive compounds syntheses

Student: Gabrijel Zučić, mag.appl.chem.

Mentor: Doc.dr.sc. Davor Šakić

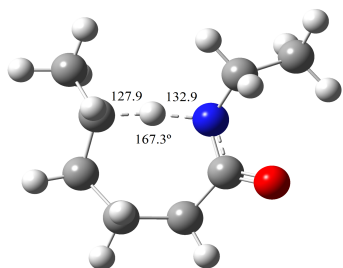
Komentor: Prof.dr.sc. Valerije Vrček



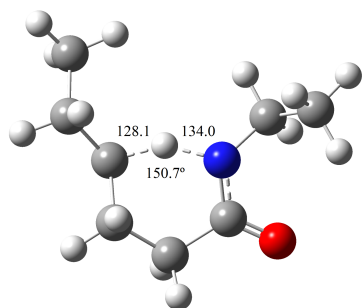
HRZZ-UIP-2020-02-4857

Zagreb, 26.02.2024.





# Sadržaj



- 1. Uvod:
  - Uloga i stabilnost *N*-radikala u biološkim sustavima
  - *N*-radikali u Hofmann–Löffler–Freytagovoj reakciji i biološkim sustavima
- 2. Hipoteza
- 3. Ciljevi rada
- 4. Materijali i metode
- 5. Očekivani znanstveni doprinos
- 6. Literatura

# 1. Uvod

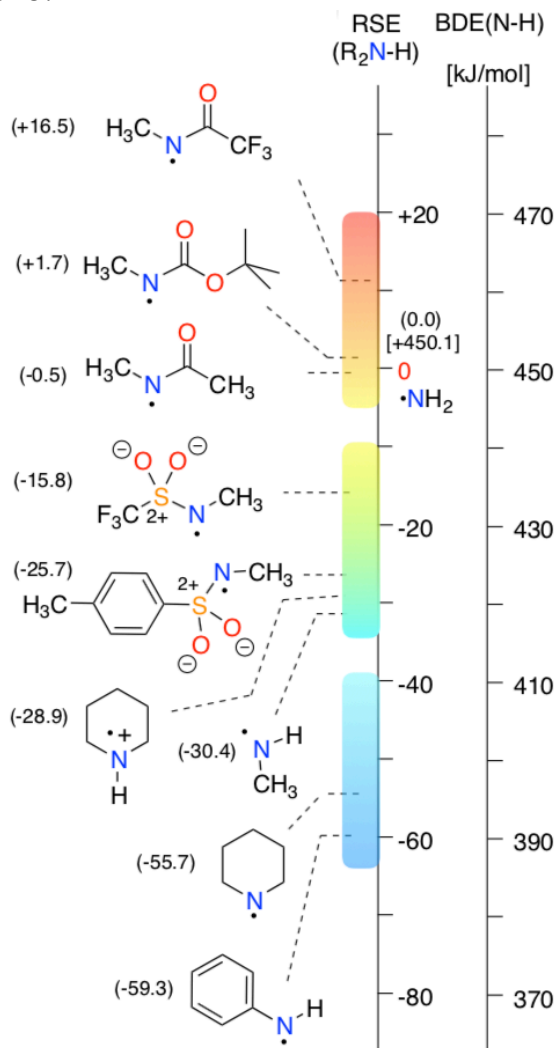
## Uloga i stabilnost *N*-radikala u biološkim sustavima

- *N*-radikali mogu se koristiti kao reaktivni intermedijeri u reakcijama prijenosa atoma vodika (HAT)
- Aminokiseline se mogu aktivirati stvaranjem *N*-radikala.
- *N*-radikali se proizvode u nukleinskim kiselinama odcjepljenjem vodikovog atoma ili adicijom radikala na nukleobazu.

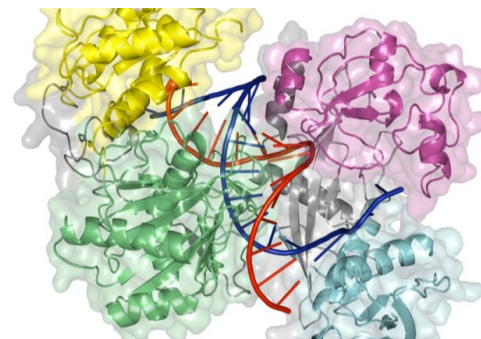


*N*-radikali sudjeluju u procesu razgradnje DNA

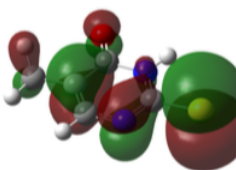
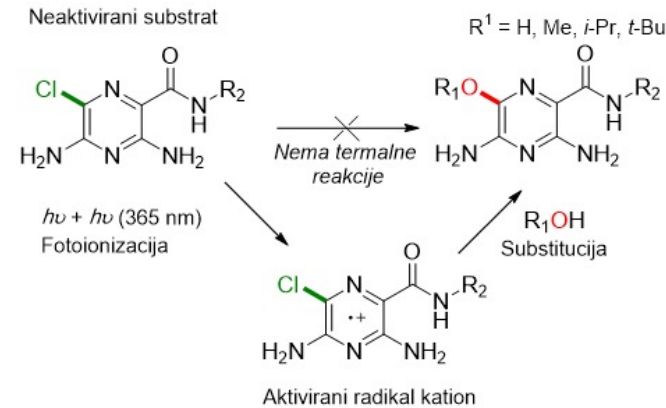
- Stabilnost se može opisati izodezmičkim reakcijama
- Tada govorimo o radikalnim stabilizacijskim energijama (RSE)
- RSE vrijednosti se mogu pretvoriti u BDE vrijednosti
- BDE + dostupni podaci o energijama C-H veza omogućuju predviđanje reakcijskih entalpija u npr. 1,5-HAT koracima koji se susreću u HLF reakciji
- Stabilnost *N*-radikala jako ovisi o supstituentu
- U većini slučajeva stabilniji je radikal  $\pi$ -tipa



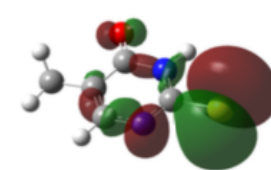
Skala stabilnosti *N*-radikala



Sudjeluju i u procesu razgradnje peptida i proteina

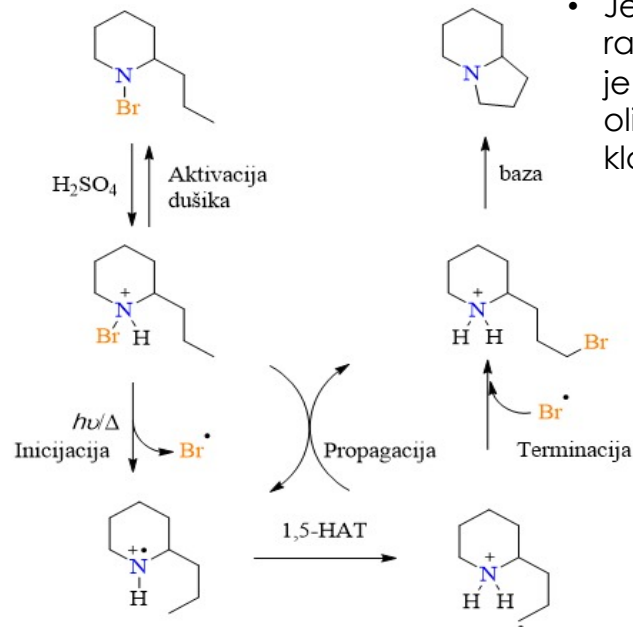


$\pi$ -radikal

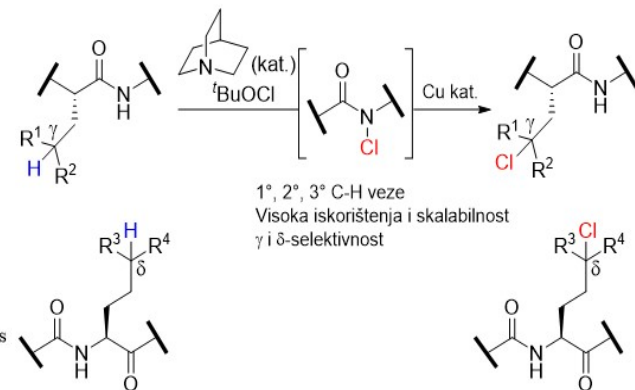


$\sigma$ -radikal

# N-radikali u Hofmann-Löffler-Freytagovoj reakciji i bološkim sustavima

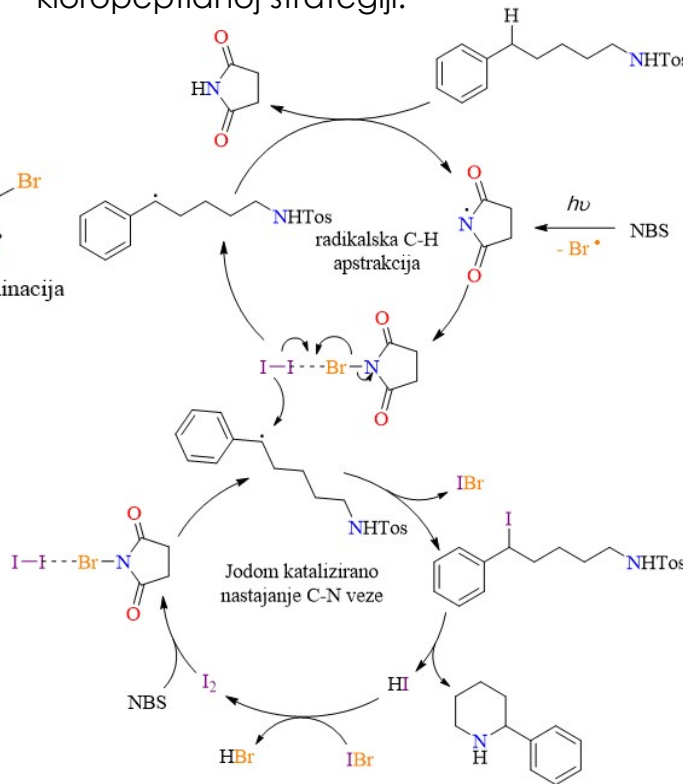


- Jedan takav primjer korištenja N-radikala kao reaktivnih intermedijera je selektivno C(sp<sup>3</sup>)-H kloriranje oligopeptida temeljeno na N-kloropeptidnoj strategiji.



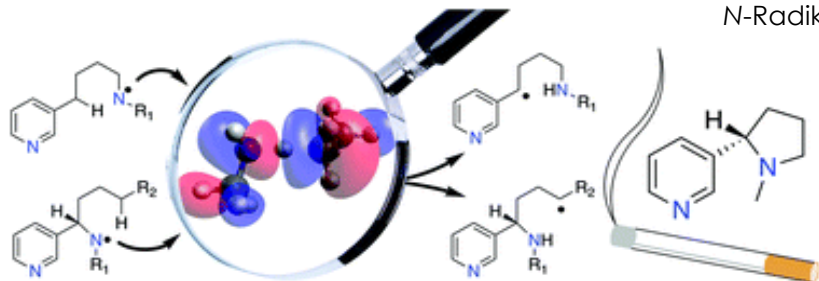
N-radikali kao reaktivni intermedijeri u selektivnoj funkcionalizaciji oligopeptida

- HLF reakcija višestupanjski je proces koji uključuje aktivaciju atoma dušika halogeniranjem, stvaranje N-radikala fotokemijskom ili topinskom aktivacijom, intramolekularni 1,5-HAT i radikalnu terminaciju s ciklizacijom kako bi se formirala konačna C-N veza

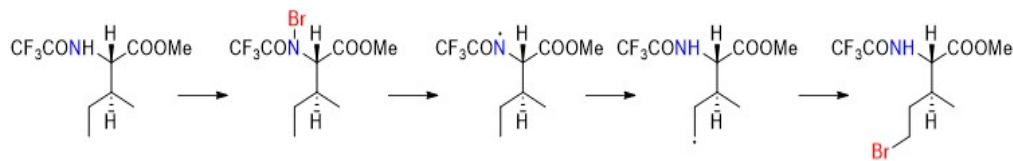


N-Radikali sudjeluju u selektivnoj sintezi piperidina

- U nekim slučajevima dominantni su 1,6-HAT procesi i dobivaju se piperidinski produkti.
- Tada govorimo o regioselektivnosti HLF reakcije koju je zapravo uočio Muniz u svojoj selektivnoj sintezi piperidina.(16)



Može se iskoristiti za sintezu farmakološki aktivnih spojeva



Aminokiseline se mogu aktivirati stvaranjem N-radikala



## 2. Hipoteza:

Razjašnjavajući parametre koji upravljaju termodinamikom, kinetikom i regioselektivnošću reakcija koje uključuju *N*-radikale, proširiti će se primjenjivost HLF reakcije u sintezama analognih bioaktivnih spojeva i omogućiti predviđanje produkata u kompetitivnim procesima.

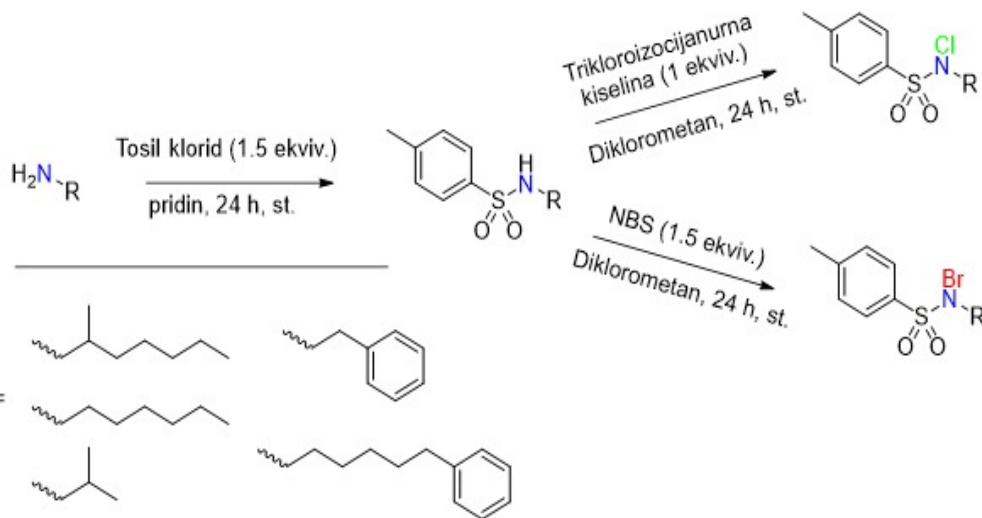
## 3. Cilj rada:

1. Razjasniti parametare koji upravljaju regioselektivnošću HLF reakcije
2. Izračunati stabilnosti *N*-radikala i definirati njihovu steričku okolinu iz višestrukih konformacija i simulacija molekularne dinamike
3. Rasvijetliti mehanizam intermolekulskih HAT reakcija u nukleobazama u čvrstom stanju na različitim temperaturama.
4. Istražiti inter- i intra-molekularne HAT puteve u aminokiselinama i malim peptidima

# 4. Materijali i metode:

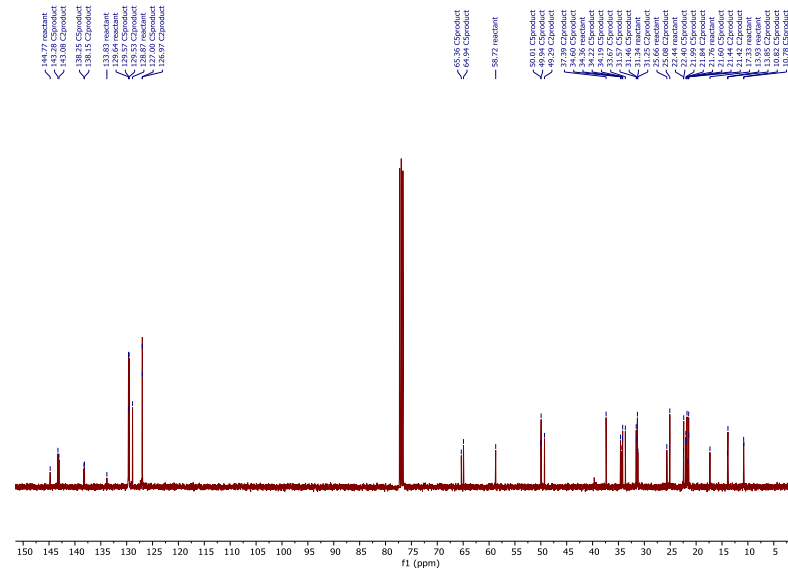
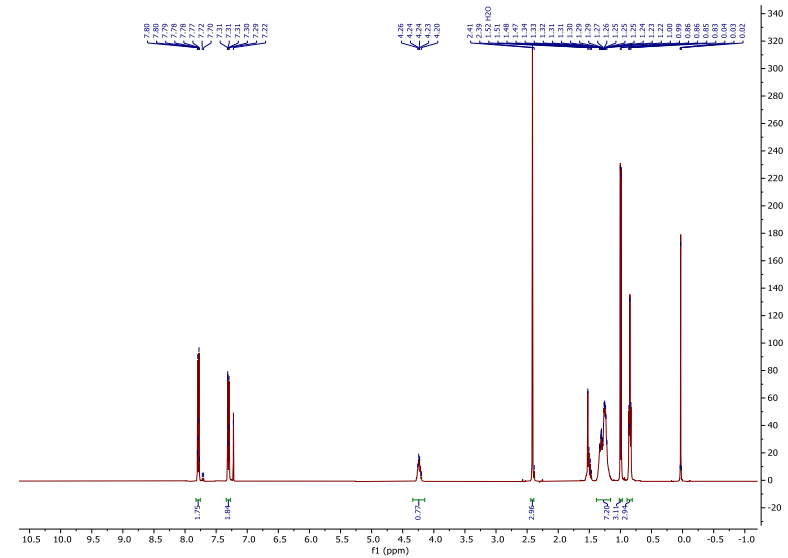
## Motode u sintezi spojeva

- Sinteza N-bromiranih i N-kloriranih N-zaštićenih alkilamina u čiju će se svrhu koristiti komercijalno dostupne kemikalije.
- Dva reakcijska koraka.
- Inkorporiranje tosilne aktivacijske skupine metodologijom razvijenom tijekom boravka na Institutu Rudjer Bošković.
- N-kloriranje će se provesti metodologijom Shorta i sur.(20) pri čemu će sredstvo za kloriranje biti trikloroizocijanurna kiselina a otapalo diklorometan.
- N-bromiranje će se provesti metodologijom razvijenom u sklopu ovog doktorskog studija koja će koristiti N-bromosukcinimid za bromiranje u diklorometanu.
- Praćenje reakcija vršit će se tankoslojnom kromatografijom a dobiveni produkti pročititi će se kolonskom kromatografijom.



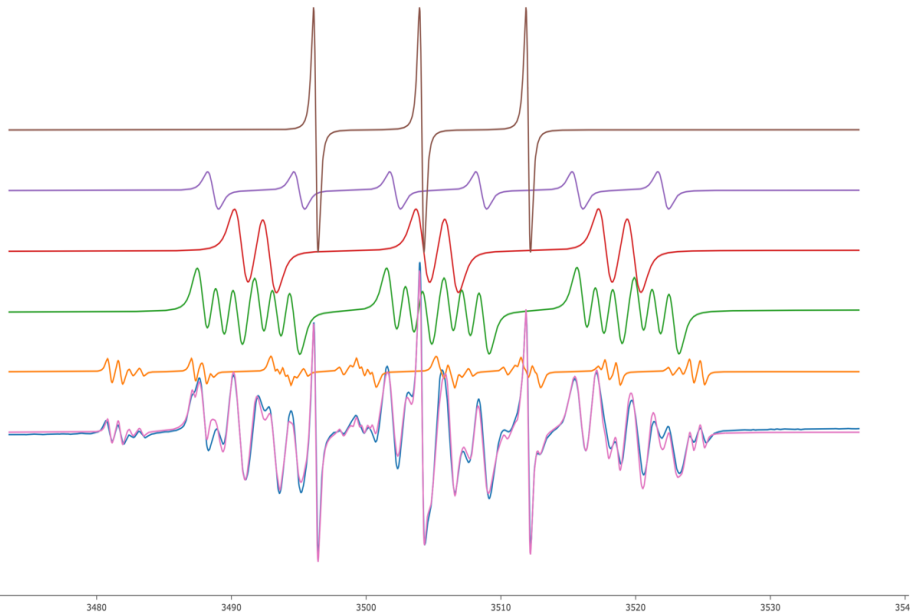
## Metode karakterizacije spojeva

- $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija
- FT-IR i UV-Vis spektroskopija



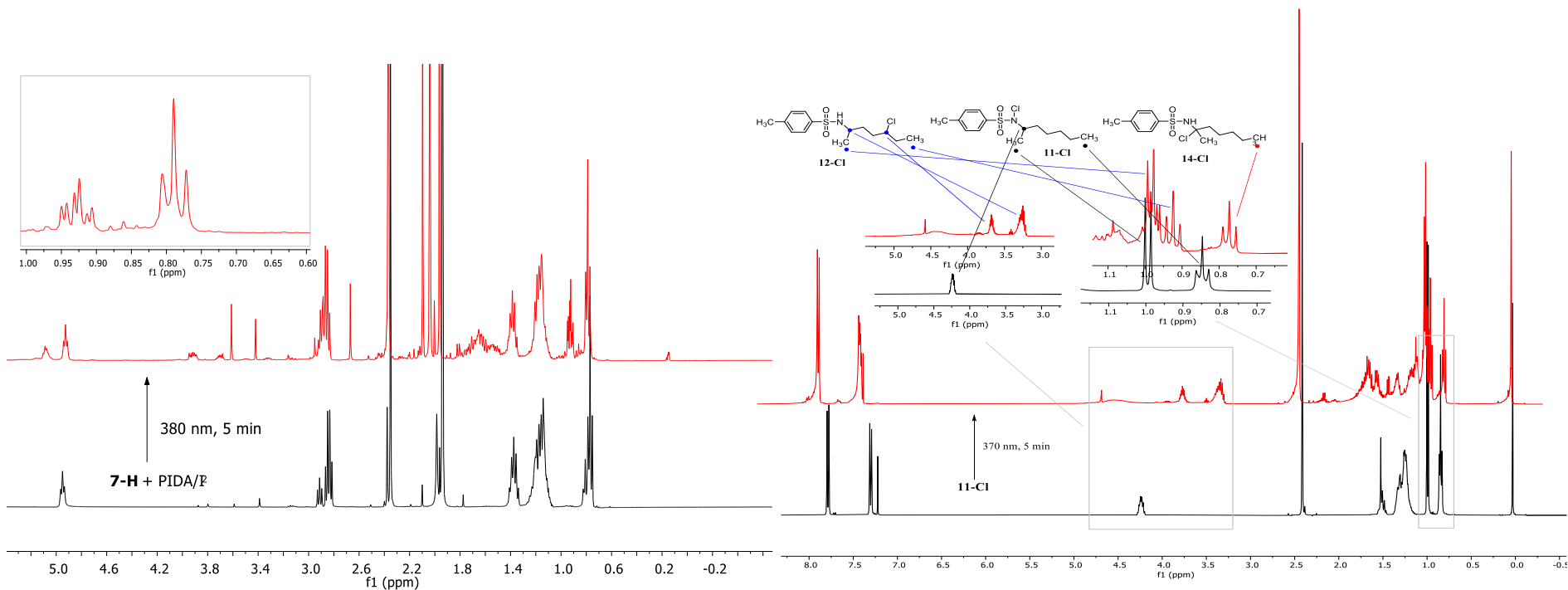
# Reakcija praćena elektron paramagnetskom rezonancijom (EPR)

- Nakon sinteze, temeljne otopine će se pripremiti korištenjem vakuum linija metodom otplinjavanja tekućim dušikom ciklusom zamrzavanje-pumpa-odmrzavanje.
- Na pripremljenim otopinama primijenit će se HLF procedura Shorta i sur.(20) pri čemu će se koristiti četiri Kessil lampe različitih valnih duljina (370nm, 427nm, 456 nm i 525 nm).
- Detekcija intermedijera i reakcija pregradnje EPR tehnikom provesti će se na EPR spektrometru Bruker E500 Elexsy s ovijetljavanjem u šupljini.
- Rezonatorska šupljina nema optički prozor za osvjetljenje, izvor svjetlosti će se montiran ispod šupljine, a svjetlost će dolaziti kroz dno EPR cijevi unutarnjeg promjera 4 mm.



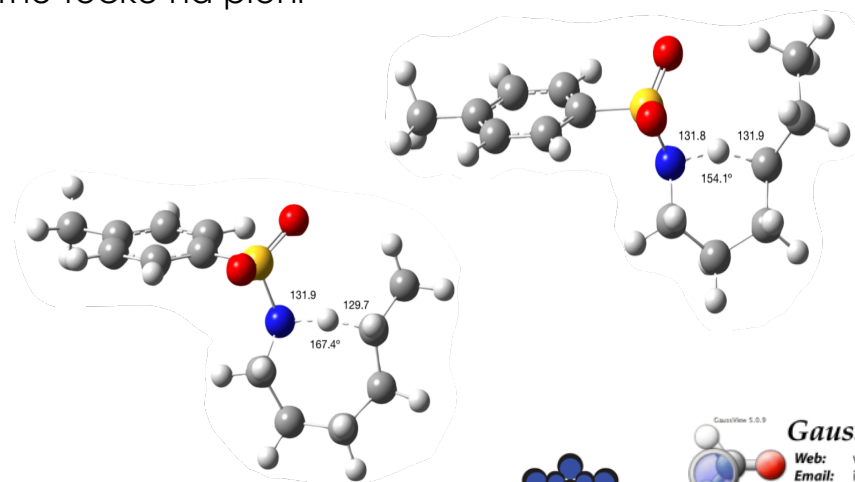
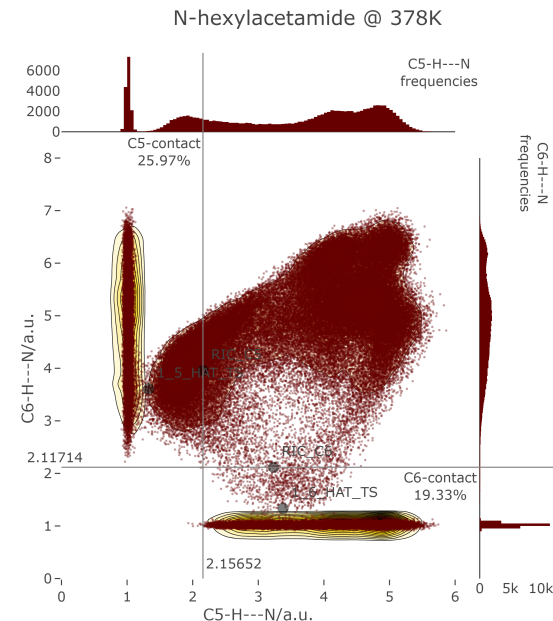
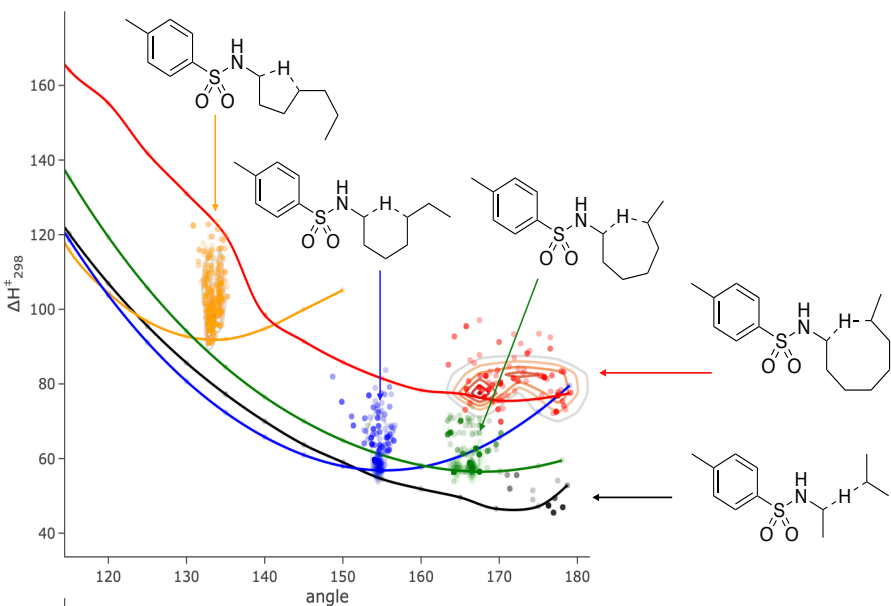
# Reakcija praćena nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR)

- NMR spektri reakcijske smjese napraviti će s osvjetljenjem izvan mjesta jednom od četiri Kessil lampe (370 nm) u različitim otapalima na Varian Inova 400 NMR spektrometru koji radi na 399,90 MHz za  $^1\text{H}$  NMR, 100,6 MHz za  $^{13}\text{C}$  NMR a kemijski pomaci ( $\delta$ ) prikazati će se u dijelovima na milijun (ppm).
- Spektri će biti unutrašnje referencirani prema signalima zaostalog otapala ( $^1\text{H}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 7,26 ppm;  $^{13}\text{C}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 77,0 ppm;). Spektri će se uvesti i obraditi u programu MestreNova 14.2.0.



# Kvantno-kemijska metodologija

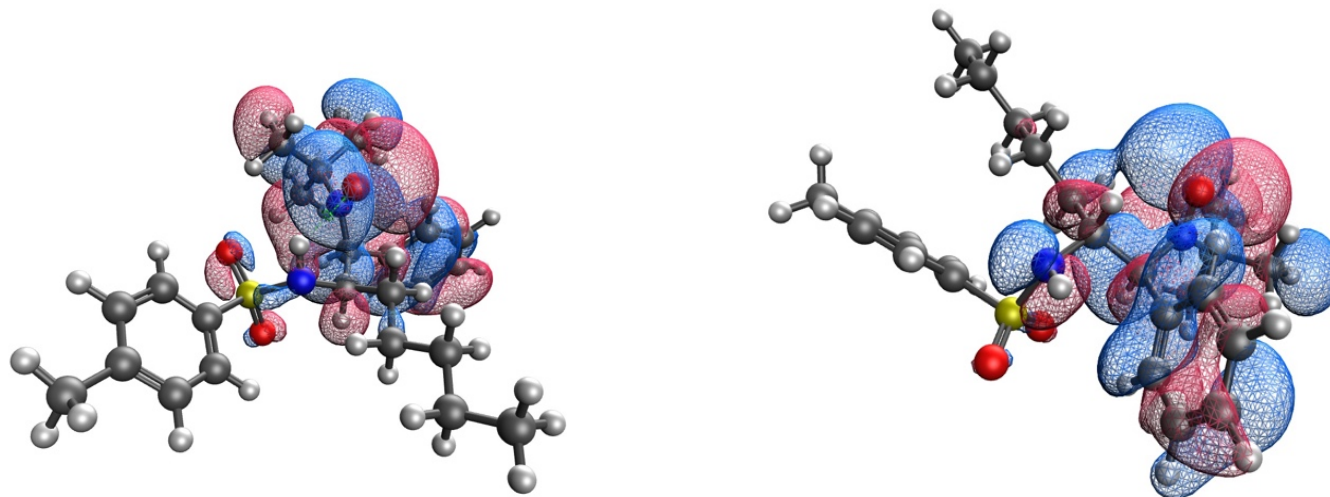
- Proračuni će se izvoditi na Advanced computing servisu (klasteri Isabella i Supek) Sveučilišnog računskog centra Sveučilišta u Zagrebu – SRCE te na klasteru sw.pharma.hr koristeći Gaussian 16 softverski paket te XTB softverski paket.
- Semiempirijska razina teorije za pretragu konformacijskog prostora pomoću Conformer–Rotamer Ensemble Sampling Tool – CREST programa koristeći xtb-GFN1 i xtb-GFN2 metode.
- DFT metode (B3LYP) za optimizaciju konformera reaktanata, produkata i prijelaznih stanja
- Poboljšana termodinamika metodama (G3B3, RO-B2PLYP-D3)
- Procjena implicitnih učinaka otapala metodama COSMO, SMD i C-PCM
- Izračuni EPR parametara napravljeni su pomoću B3LYP funkcionalnog
- Bazni setovi- 6-31G(d); def2-QZVP; G3MP2-large; EPR-III.
- Frekvencijski račun za definiranje prirode stacionarne točke na plohi potencijalne energije





## 5. Očekivani znanstveni doprinos

- Predloženo istraživanje ima za cilj unaprijediti razumijevanje reaktivnosti *N*-radikala u organskoj kemiji i mehanizma reakcija pregradnje u kojima oni sudjeluju
- To podrazumijeva računanje stabilnosti *N*- i *C*-radikala te produciranje skala stabilnosti takvih radikala, sintezu prekursora radikala i karakterizaciju tih radikala pomoću EPR-a.
- Istraživanjem će se procijeniti i prikazati komplemetarna uporaba EPR i NMR spektroskopije za proučavanje reakcija preraspodjele, optimizirati će se računski modeli za tumačenje mehanizma pregradnje radikala u nukleobazama na različitim temperaturama te će se odrediti reakcijska mjesta u peptidnim vezama koja sudjeluju u HAT reakcijama.





## 6. Literatura

- (1) Zarić BL, Macvanin MT, Išenović ER. Free radicals: Relationship to Human Diseases and Potential Therapeutic applications. *Int J Biochem Cell Biol* 2023;154:106346.
- (2) Gates KS. An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals. *Chem Res Toxicol* 2009;22:1747–1760.
- (3) Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2001;1504:196–219.
- (4) Kavčič H, Jug U, Mavri J, Umek N. Antioxidant activity of lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine in aqueous and lipophilic environments: an experimental and computational study. *Front Chem* 2023;11:1208843.
- (5) Hofmann AW. Ueber die Einwirkung des Broms in alkalischer Lösung auf Amide. *Ber Dtsch Chem Ges* 1881;14:2725–2736.
- (6) Hofmann AW. Ueber die Einwirkung des Broms in alkalischer Lösung auf die Amine. *Ber Dtsch Chem Ges* 1883;16:558–560.
- (7) Hofmann AW. Zur Kenntniss der Coniin-Gruppe. *Ber Dtsch Chem Ges* 1885;18:109–131.
- (8) Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003;25:207–218.
- (9) Greenberg MM. Reactivity of Nucleic Acid Radicals. *Adv Phys Org Chem* 2016;50:119–202.
- (10) Ćioe J, Šakić D, Vrčak V, Zipse H. The stability of nitrogen-centered radicals. *Org Biomol Chem* 2015;13:157–169.
- (11) Šakić D, Zipse H. Radical Stability as a Guideline in C-H Amination Reactions. *Adv Synth Catal* 2016;358:3983–3991.
- (12) Stella L. Homolytic Cyclizations of N-Chloroalkenylamines. *Angew Chem Int Ed Engl* 1983;22:337–350.
- (13) Nanjo T, Matsumoto A, Oshita T, Takemoto Y. Synthesis of Chlorinated Oligopeptides via  $\gamma$ - and  $\delta$ -Selective Hydrogen Atom Transfer Enabled by the *N*-Chloropeptide Strategy. *J Am Chem Soc* 2023;145:19067–19075.
- (14) Reddy LR, Reddy BVS, Corey EJ. Efficient Method for Selective Introduction of Substituents as C(<sub>5</sub>) of Isoleucine and Other  $\alpha$ -Amino Acids. *Org Lett* 2006;8:2819–2821.
- (15) Knörlein A, Sarnowski CP, De Vries T, Stoltz M, Götze M, Aebersold R, et al. Nucleotide-amino acid  $\pi$ -stacking interactions initiate photo cross-linking in RNA-protein complexes. *Nat Commun* 2022;13:2719.
- (16) Zhang H, Muñiz K. Selective Piperidine Synthesis Exploiting Iodine-Catalyzed C<sub>sp</sub><sup>3</sup>-H Amination under Visible Light. *ACS Catal* 2017;7:4122–4125.
- (17) Bosnidou AE, Duhamel T, Muñiz K. Detection of the Elusive Nitrogen-Centered Radicals from Catalytic Hofmann–Löffler Reactions. *Eur J Org Chem* 2020;40:6361–6365.
- (18) Shkunnikova S, Zipse H, Šakić D. Role of substituents in the Hofmann–Löffler–Freitag reaction. A quantum-chemical case study on nicotine synthesis. *Org Biomol Chem* 2021;19:854–865.
- (19) Šakić D, Achraimer F, Vrčak V, Zipse H. The chemical fate of paroxetine metabolites. Dehydration of radicals derived from 4-(4-fluorophenyl)-3-(hydroxymethyl)piperidine. *Org Biomol Chem* 2013;11:4232.
- (20) Short MA, Blackburn JM, Roizen JL. Sulfamate Esters Guide Selective Radical-Mediated Chlorination of Aliphatic C–H Bonds. *Angew Chem Int Ed* 2018;57:296–299.
- (21) Hermosilla L, Calle P, García De La Vega JM, Sieiro C. Density Functional Theory Study of 14 N Isotropic Hyperfine Coupling Constants of Organic Radicals. *J Phys Chem A*. 2006;50:13600–8.
- (22) Hermosilla L, Vega JM, Sieiro C, et al. DFT Calculations of Isotropic Hyperfine Coupling Constants of Nitrogen Aromatic Radicals: The Challenge of Nitroxide Radicals. *J Chem Theory Comput* 2011;7:169–179.

# Članovi LIGHT RING



Doc. dr. sc. Davor  
Šakić



HRZZ-UIP-2020-02-4857,  
Hrvatska zaklada za znanost

Dr. sc. Mirsada  
Čehić



Doc. dr. sc. Ana  
Kraković Marković



Gabrijel Zubčić  
Mag. appl. chem.



## Zahvaljujem na pažnji!

### Suradnje

Prof. dr. sc. Valerije  
Vrček



Prof. dr.  
Hendrik Zipse



Doc. dr. sc. Maria  
Kolypadi Marković



Prof. dr. Moisés  
Canle López



Doc. dr. sc. Erim  
Bešić



Dr. sc. Jiangyang  
You



Dr. sc. Tomislav  
Portada

