

Sinteza i karakterizacija asimetričnih fumardiamida primakina i halogenanilina

Penić, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:341574>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Anamarija Penić

**Sinteza i karakterizacija asimetričnih
fumardiamida primakina i halogenanilina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutska kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Zrinke Rajić.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za Farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu, posebno mentorici Zrinki Rajić na pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima i obitelji, prijateljima i dečku na pomoći i podršci tijekom studiranja.

Rad je financiran sredstvima istraživačkog projekta *Dizajniranje, sinteza i evaluacija derivata primakina, vorinostata i sorafeniba kao potencijalnih citostatika* (IP-2014-09-1501) Hrvatske zaklade za znanost.



KRATICE

^{13}C NMR	^{13}C nuklearna magnetska rezonancija
^1H NMR	^1H nuklearna magnetska rezonancija
ATP	adenozin trifosfat
BCR	B-stanični receptor
BTK	Brutonova tirozin kinaza
CLL	kronična limfocitna leukemija
COMT	katehol- <i>O</i> -metil transferaza
DIEA	N,N-diizopropiletilamin
DMSO	dimetilsulfoksid
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta
EMA	Europska agencija za lijekove (eng. <i>European Medicines Agency</i>)
FDA	Agencija za hranu i lijekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i>)
GSH	glutation
GST	glutation-S-transferaza
HATU	1-(<i>bis</i> (dimetilamino)metilen)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo(4,5- <i>b</i>)piridinijev 3-oksid heksafluorofosfat
HRV-3CP	ljudska rinovirus 3C proteaza
IR	infracrvena spektroskopija
LC-MS/MS	vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektroskopije
MCL	limfom stanica plašta
MS	masena spektroskopija
NSCLC	rak pluća nemalih stanica
ORR	eng. <i>objective response rate</i>
PSF	eng. <i>progression-free survival</i>
TEA	trimetilamin
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
WM	Waldenstormova makroglobulinemija

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Michaelova adicija	2
1.2. Michaelovi akceptori kao lijekovi	4
1.2.1. Inhibitori EGFR-a	6
1.2.2. Inhibitori Brutonove tirozin kinaze (BTK)	9
1.2.3. Antiparkinsonici: entakapon	10
1.2.4. Lijekovi za terapiju multiple skleroze: dimetil-fumarat.....	11
1.2.5. Diuretici: etakrinska kiselina.....	12
1.2.6. Rupintrivir	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1 Sinteza etil-(2 <i>E</i>)-3-({4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil} karbamoil)-prop-2-enoata (2).....	17
3.2 Sinteza etil-(2 <i>E</i>)-3-({4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino]pentil} karbamoil)-prop-2-enske kiseline (3).....	18
3.3 Sinteza fumardiamida 4a-d	18
3.3.1 Sinteza (2 <i>E</i>)- <i>N</i> -(3-fluorofenil)- <i>N'</i> -{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida (4a)	19
3.3.2 Sinteza (2 <i>E</i>)- <i>N</i> -(4-fluorofenil)- <i>N'</i> -{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida (4b)	19
3.3.3 Sinteza (2 <i>E</i>)- <i>N</i> -(3-klorofenil)- <i>N'</i> -{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida (4c).....	20
3.3.4 Sinteza (2 <i>E</i>)- <i>N</i> -(4-klorofenil)- <i>N'</i> -{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida (4d)	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA.....	29
7. SAŽETAK.....	34
8. SUMMARY	36
9. PRILOZI.....	38
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

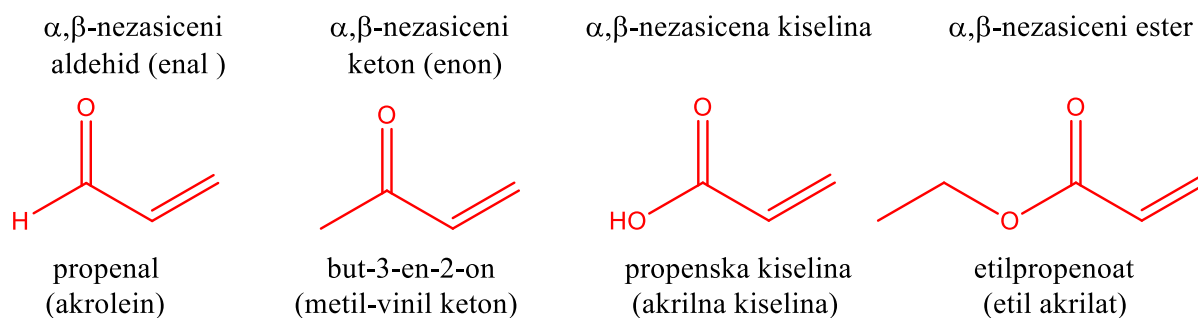
1. UVOD

1.1. Michaelova adicija

Reakcija adicije nukleofila na C=C dvostruku vezu koja je susjedna karbonilnoj C=O skupini zove se konjugirana adicija, Michaelova adicija ili 1,4- adicija (Clayden i sur., 2012).

Prvi primjer nukleofilne adicije ugljika na dvostruku vezu siromašnu elektronima objavio je 1883. godine T. Komnenos, koji je uočio adiciju aniona dietil malonata na etiliden malonat. Međutim, tek je 1887. godine A. Michael sistematski istražio reakcije stabiliziranih aniona i α,β -nezasićenih sutava. Nekoliko godina kasnije, točnije 1894. godine, A. Michael je demonstrirao kako reakcijski partneri nukleofilnom ugljiku, osim dvostrukih veza siromašnih elektronima, mogu biti i trostruke veze. Ova metoda stvaranja novih C-C veza postala je iznimno popularna početkom dvadesetog stoljeća, a danas je adicija stabiliziranog nukleofilnog ugljika na aktivirane π -sustave poznata kao Michaelova adicija te su produkti reakcije Michaelovi adukti. Trenutno se sve reakcije koje uključuju 1,4-adiciju (konjugiranu adiciju) bilo kojeg nukleofila na aktivirani π -sustav nazivaju Michaelovom adicijom (Kurti i Czako, 2005).

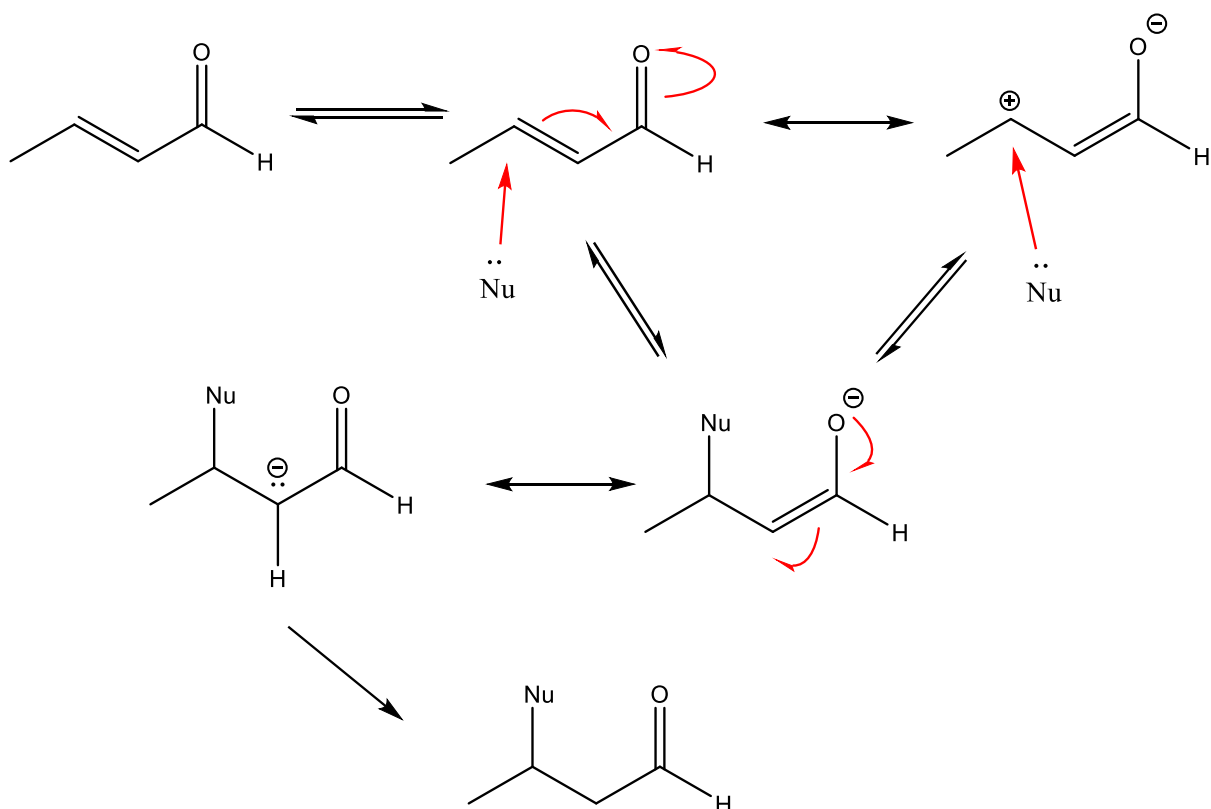
Spojevi koji imaju dvostruku C=C vezu direktno vezanu na karbonilnu C=O skupinu poznati su kao α,β -nezasićeni karbonilni spojevi, to jest Michaelovi akceptori. Neki primjeri Michaelovih akceptora prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Primjeri Michaelovih akceptora

Slova grčkog alfabeta α i β označavaju udaljenost dvostruke veze od karbonilne skupine: α -C atom je onaj odmah pored karbonilne C=O skupine, dok je β -C atom sljedeći u nizu i tako dalje.

Na Slici 2 dan je prikaz rezonantnih struktura jednog Michaelovog akceptora i tijekom same adicije. Zbog delokalizacije π elektrona dolazi do polarizacije dvostuke veze, β -C atom postaje elektrofilan te podložan nukleofilnom napadu (Clayden i sur., 2012).



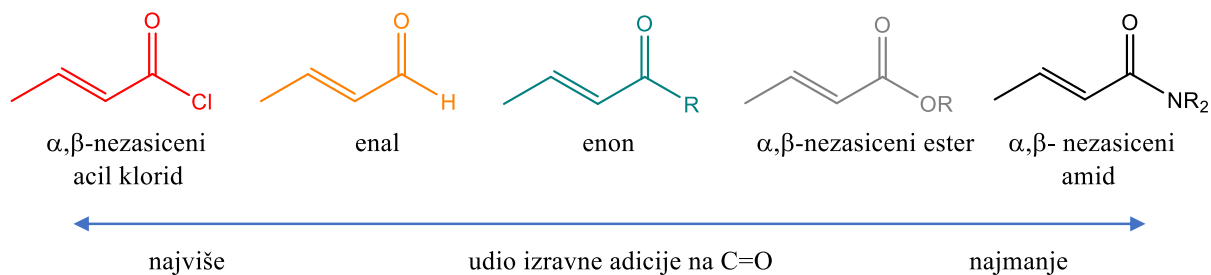
Slika 2. Mehanizam Michaelove adicije

Nekoliko čimbenika određuje hoće li se odvijati reakcija konjugirane 1,4-adicije ili direktne 1,2-adicije, a to su: uvjeti reakcije, priroda α,β nezasićenog karbonilnog spoja te tip nukleofila (Clayden i sur., 2012).

Konjugirana 1,4-adicija je ireverzibilna, dok je direktna adicija reverzibilna i ovisi o dinamičkoj ravnoteži. Produkt direktne adicije nastaje brže nego produkt konjugirane adicije te se još naziva i produkt kinetičke kontrole. Međutim, produkt konjugirane adicije je stabilniji produkt te je on produkt termodinamičke kontrole. Sukladno tome, kinetička kontrola zahtjeva niske temperature i kratko reakcijsko vrijeme kako bi osigurala da se pojavi samo produkt brze reakcije, dok termodinamička kontrola uključuje višu temperaturu i dulje reakcijsko vrijeme. Time se osigurava nastajanje produkta sporih reakcija i potpuna pretvorba reaktanata u stabilniji produkt, odnosno produkt 1,4-adicije (Clayden i sur., 2012).

U reakcijama konjugirane adicije mogu sudjelovati α,β -nezasićeni aldehidi, α,β -nezasićeni ketoni, α,β -nezasićene kiseline, α,β -nezasićeni esteri, α,β -nezasićeni amidi te nitrili. Položaj nukleofilnog napada određen je reaktivnošću spoja, to jest što je reaktivnija karbonilna C=O skupina više će dolaziti do direktne adicije na C=O skupinu. Najreaktivnije

karbonilne skupine su one koje nisu konjugirane s dušikom ili kisikom, osobito su reaktivni acil kloridi i aldehidi za razliku od estera i amida koji su manje reaktivni (Slika 3).



Slika 3. Reaktivnost Michaelovih akceptora

Nukleofili koji sudjeluju u Michaelovoj reakciji nazivaju se Michaelovi donori. Nukleofili koji sadrže male, elektronegativne atome kao kisik ili klor zovu se tvrdi nukleofili dok se nukleofili koji sadrže velike atome poput sumpora, fosfora i joda nazivaju mekim nukleofilima (Tablica 1). Osim nukleofila, i elektrofilu mogu biti podijeljeni na meke i tvrde. Tvrđi nukleofili su skloni reagirati s tvrdim elektrofilima, a meki nukleofili s mekim elektrofilima. Michaelovi akceptori, α,β -nezasićeni karbonilni spojevi, posjeduju dva elektrofilna mjesta. Ugljikov atom karbonilne skupine je tvrdi elektrofil te je sklon reagirati s tvrdim nukleofilima, dok je β -ugljikov atom α,β -nezasićenog karbonilnog spoja meki elektrofil te ima tendenciju reagiranja s mekim nukleofilima. Među najboljim nukleofilima u reakcijama konjugirane adicije su tioli, sumporni analozi alkohola (Clayden i sur., 2012).

Tablica 1. Tvrđi i meki nukleofili.

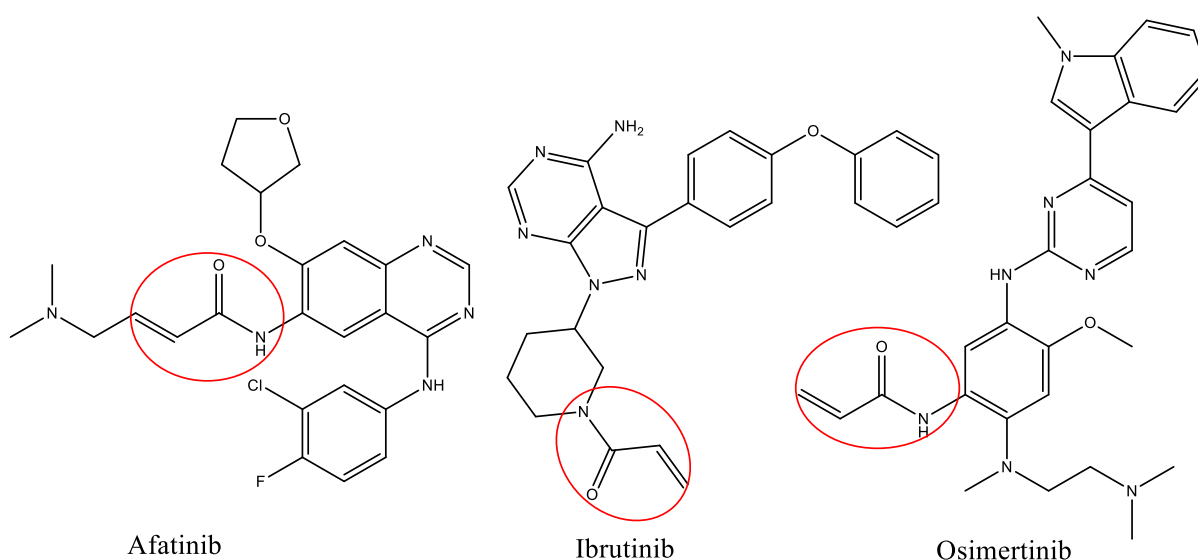
Tvrđi nukleofili	Umjereno tvrđi nukleofili	Meki nukleofili
F^- , OH^- , RO^- , SO_4^{2-} , Cl^-	N_3^- , CN^-	I^- , RS^- , RSe^- , S^{2-}
H_2O , ROH , ROR' , $RCOR'$	RNH_2 , R^1R^2NH	RSH , RSR' , R_3P
NH_3 , $RMgBr$, RLi	Br^-	Alkeni, aromatski prstenovi

1.2. Michaelovi akceptori kao lijekovi

Iako su Michaelovi akceptori iznimno reaktivni spojevi, selektivne reakcije ove vrste lijekova omogućene su podešavanjem elektrofilnosti elektron odvlačeće skupine, kao i cjelokupne

strukture molekule koja okružuje movent Michaelovog akceptora. Previsoka elektrofilnost spoja može uzrokovati niz nespecifičnih reakcija sa širokim spektrom proteinskih tiola, dok niska elektrofilnost može dovesti do farmakološke neučinkovitosti. Nasuprot tome, spojevi odgovarajuće elektrofilnosti ciljaju relativno uski spektar proteina s izloženim ili aktiviranim tiolnim ostacima, što ih čini pogodnim kandidatima u razvoju novih lijekova. (Maucher i sur., 2017; Rücker i sur., 2015)

Nakon što je FDA (eng. *Food and Drug Administration*) odobrila afatinib (2013), ibrutinib (2013) i osimertinib (2015), ciljana kovalentna modifikacija mete postala je prihvaćeni pristup u otkriću novih lijekova (Slika 4). Navedeni lijekovi dizajnirani su s ciljem stupanja u reakcije ireverzibilne Michaelove adicije s specifičnim cisteinskim ostatkom određenog proteina. Povrh toga, lijekovi koji djeluju mehanizmom kovalentne inhibicije mogu nadići rezistenciju na lijekove zbog kovalentne modifikacije ciljanog proteina (Jackson i sur., 2017).



Slika 4. Neki od prvih lijekova, Michaelovih akceptora : afatinib, ibrutinib i osimertinib

Michaelove akceptore nalazimo u sljedećim skupinama lijekova (Rajić i sur., 2018):

1. citostatici

a) inhibitori receptora humanog epidermalnog faktora rasta (EGFR-a) druge generacije: afatinib, neratinib, dakomitinib i treće generacije: osimertinib

b) inhibitori Brutonove tirozin-kinaze: ibrutinib, akalabrutinib

2. antiparkinsonici: entakapon

3. lijekovi za terapiju multiple skleroze: dimetil-fumarat

4. diuretici: etakrinska kiselina.

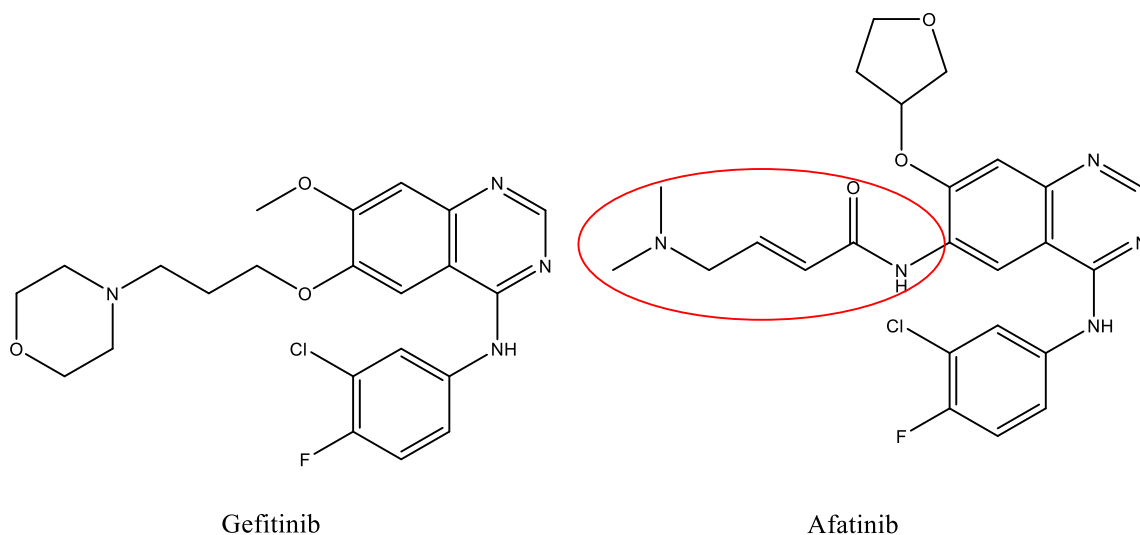
Brojni drugi Michaelovi akceptori nelaze se u fazi istraživanja, primjerice rupintrivir (liječenje prehlade) i ireverzibilni inhibitori proteaze virusa hepatitisa C (AVL-181 i AVL-192) (Hagel i sur., 2011; Jackson i sur., 2017).

1.2.1. Inhibitori EGFR-a

EGFR je transmembranski glikoprotein, jedan od četiri člana ErbB porodice receptorskih tirozin kinaza. Aktivacijom EGFR-a dolazi do njegove autofosforilacije, što inicira kaskadu nizvodnih signalnih putova uključenih u regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja. EGFR može biti abnormalno aktiviran različitim mehanizmima, kao što je prekomjerna ekspresija receptora, mutacija, dimerizacija receptora ovisnog o ligandu, te je povezan s razvojem raznih vrsta tumora kod ljudi. Inhibicija EGFR-a jedan je od ključnih ciljeva kemoterapije tumora (Singh i sur., 2016).

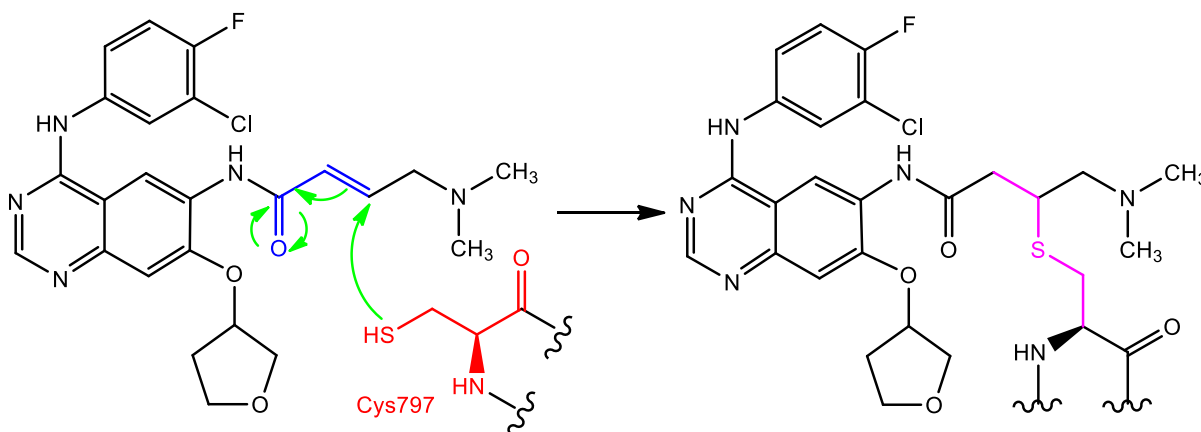
Lijekovi se dijele na lijekove prve generacije (gefitinib, erlotinib, icotinib, lapatinib), lijekove druge generacije (afatinib, dakomitinib, neratinib) i lijekove treće generacije (osimertinib, rociletinib, olmutinib) (Zhang, 2016).

Gefitinib je nekovalentni inhibitor koji cilja mutirane oblike EGFR-a u tumorskim stanicama i predstavlja prvu generaciju EGFR inhibitora (Slika 5). Ranije spomenuta mutacija EGFR-a uključuje deleciju egzona 19 (gotovo uvijek uključuje gubitak aminokiselinskih ostataka 747 i 749) i točkaste mutacije L858R egzona 21 (zamjena leucina za arginin u kodonu 858) (Lin i Bivona, 2012). Do rezistencije na gefitinib dolazi zbog točkaste mutacije T790M (zamjena treonina za metionin na položaju 790 u egzonu 20) u veznom mjestu. Kako bi se nadvladala rezistencija napravljeni su brojni strukturni analozi gefitiniba. Kod jednog od njih 3-morfolinopropilna skupina zamjenjen s 4-dimetilaminobutenamidom, čime je nastao afatinib, prvi lijek 2. generacije inhibitora EGFR-a (Slika 5) (Jackson i sur., 2017).



Slika 5. Gefitinib i afatinib

Afatinib se veže ireverzibilno kovalentno, putem Michaelove adicije, na Cys797, koji se nalazi na rubu veznog mjesta za ATP (adenozin trifosfat) unutar kinazne domene EGFR-a (Engel i sur., 2016). Mehanizam inhibicije prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Mehanizam djelovanja afatiniba

Afatinib je pokazao aktivnost protiv stanica raka pluća, s mutiranim oblikom EGFR-a (mutacija T790M) (Modjtahedi i sur., 2014). Kristalografija x-zraka i *in situ* označavanje spregnuto s LC-MS/MS analizom potvrdilo je nastajanje kovalentne veze između afatiniba i Cys797 (Jackson i sur., 2017). Afatinib je 2013. godine odobren kao prva linija liječenja raka pluća nemalih stanica (NSCLC), na temelju rezultata LUX-Lung 3 i LUX-Lung

6 studija, koje su pokazale značajno povećanje PSF-a (eng. *progression-free survival*) s afatinibom u usporedbi sa standardnom kemoterapijom (Wind i sur., 2017).

Ovi događaji doveli su do razvoja treće generacije EGFR inhibitora, osimertiniba, koji je selektivno ciljao EGFR s T790M mutacijom (Slika 4). Akrilamid osimertinib je ireverzibilni inhibitor EGFR-a odobren 2015. godine za liječenje raka pluća nemalih stanica s T790M mutacijom. Međutim, nakon nekog vremena došlo je i do razvoja rezistencije na osimertinib zbog mutacije C797S, gdje je zamijenjen cistein s manje nukleofilnim serinom, pa ne dolazi do Michaelove adicije osimertiniba na EGFR (Jackson i sur., 2017).

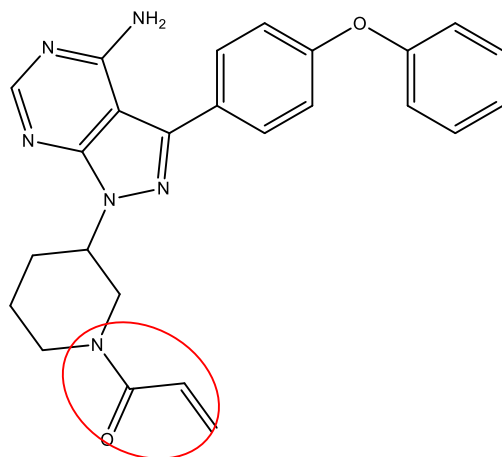
Neratinib je oralni, ireverzibilni inhibitor EGFR-a, HER2 i HER4 (Deeks, 2017). U ExteNET, fazi 3 ispitivanja na 2840 žena s HER2 pozitivnim rakom dojke neratinib je značajno poboljšao dvogodišnje invazivno preživljavanje bez bolesti u usporedbi s placebo. Neratinib je 2017. godine odobren od strane FDA-a za pacijente s ranim stadijem HER2 pozitivnog raka dojke koji su završili namjane 1 godinu terapije trastuzumabom (Seebacher i sur., 2019). Neratinib je također ispitan kao monoterapija za liječene raka pluća nemalih stanica, ali je pokazao umjereno djelovanje. U *in vitro* pokusima neratinib je pokazao značajno djelovanje protiv staničnih linija EGFR^{m+} (senzibilizirajuće mutacije EGFR-a, odnosno delecije egzona 19 i točkaste mutacije L858R egzona 21) nemalih stanica raka pluća, uključujući i stanične linije s mutiranim oblikom EGFR-a (T790M mutacija). Međutim, u fazi 2 kliničkih ispitivanja neratinib je ispoljio slabo djelovanje s ORR-om (eng. *objective response rate*) od 3% u bolesnika s EGFR^{m+} rakom nemalih stanica pluća i bez odgovora kod bolesnika s divljim tipom EGFR-a. Razlog tome bila je nedovoljna bioraspoloživost uzrokovana ograničenjem doze jer su više doze izazivale dijareu (Zhang, 2016).

Dakomitinib je najnoviji ireverzibilni inhibitor EGFR-a, registriran u rujnu 2018. godine. U fazi 2 kliničkih istraživanja u terapiji uznapredovanog raka pluća nemalih stanica s EGFR^{m+}, dakomitinib je doveo do ORR-a od 53% i medijana PFS-a od 11,5 mjeseci (Zhang, 2016). FDA je odobrila dakomitinib kao prvu liniju liječenja kod pacijenata s metastatskim rakom pluća nemalih stanica s EGFR^{m+}. Odobrenje se temeljilo na podacima iz ARCHER 1050, faze 3 ispitivanja na 440 pacijenata gdje je dokazano da je dakomitinib u usporedbi s gefitinibom značajno poboljšao PSF. EMA (eng. *European Medicines Agency*) je također odobrila dakomitinib u istoj indikaciji (Nagano i sur., 2019). U tijeku su klinička istraživanja rane faze za procjenu učinkovitosti dakomitiniba u liječenju raka kože, HER2 pozitivnog raka želuca, raka glave i vrata, glioblastoma i raka jednjaka (Seebacher i sur., 2019).

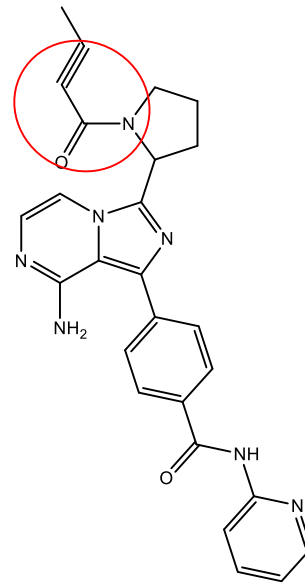
1.2.2. Inhibitori Brutonove tirozin kinaze (BTK)

BTK je citoplazmatska tirozin kinaza, koja prenosi signale sa stanične membrane u unutrašnjost stanice, uključujući signale posredovane B-staničnim receptorima (BCR). Jedinstvena struktura ovog proteina karakterizirana je cisteinom (C481) unutar ATP vezujućeg džepa (Byrd i sur., 2016). Genetska delecija BTK uzrokuje imunodeficijenciju B-limfocita kod ljudi i miševa, čineći ovu kinazu poželjnom metom lijekova za terapiju bolesti povezanih s poremećajima B-limfocita (Burger, 2014).

Ibrutinib je ireverzibilni inhibitor BTK, koji se kovalentno veže za C481 (Slika 7). Pokazao je značajno djelovanje u terapiji malignih bolesti B-limfocita, posebno u bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom (CLL), limfomom stanica plašta (MCL) i Waldenstormovom makroglobulinemijom (WM) (Burger, 2014). Ibrutinib je odobren od strane FDA 2013. godine za liječenje limfoma stanica plašta, a 2014. za liječenje kronične limfocitne leukemije (de Claro i sur., 2015). Ibrutinib inducira redistribuciju malignih B-limfocita iz tkiva u perifernu krv kod CLL-a i MCL-a, brzo smanjenje povećanih limfnih čvorova i nagli porast limfocitoze. Kontinuirana terapija ibrutinibom rezultirala je normalizacijom broja limfocita i remisijom kod većine bolesnika (Burger, 2014). Međutim ibrutinib također ireverzibilno inhibira i druge kinaze kao npr. tirozin kinazu eksprimiranu u hepatocelularnom karcinomu (Tec), EGFR i kinazu T-stanica induciranu interleukinom-2 (Itk). Ova farmakološka svojstva mogu objasniti toksičnost koja se obično ne primjećuje kod bolesnika s nedostatkom BTK, kao što su osip, proljev, artralgijske/mialgijske i atrijska fibrilacija (Byrd i sur., 2016).



Ibrutinib



Akalabrutinib

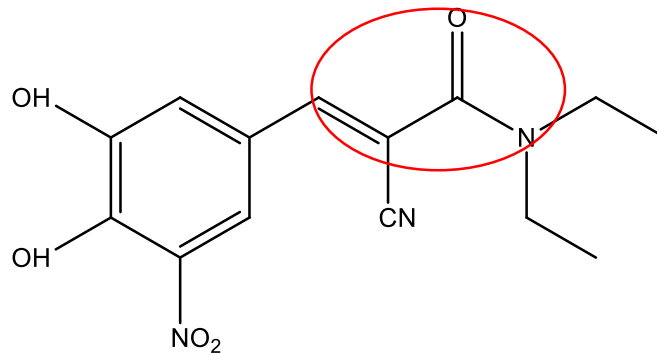
Slika 7. Ibrutinib i akalabrutinib

Akalabrutinib je visoko selektivni ireverzibilni inhibitor BTK druge generacije s poboljšanim farmakološkim značajkama, uključujući brzu apsorpciju nakon peroralne primjene (Slika 7) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acalabrutinib>). Akalabrutinib je selektivniji inhibitor od ibrutiniba, te ne inhibira druge, gore navedene kinaze. Akalabrutinib se primjenjuje dva puta dnevno, što omogućuje gotovo potpunu i kontinuiranu inhibiciju BTK, bez povećane toksičnosti. Dugotrajna terapija akalabrutinibom dobro se podnosi, a najčešće nuspojave bile su glavobolja (43%), proljev (39%), povećanje tjelesne težine (26%), pireksija (23%) i infekcija gornjih dišnih putova (23%) (Byrd i sur., 2016).

1.2.3. Antiparkinsonici: entakapon

Entakapon je antiparkinsonik, koji u svojoj strukturi ima Michaelov akceptor, odnosno α - cijanoakrilamid (Slika 8). Entakapon je selektivni i reverzibilni inhibitor katehol-*O*-metil transferaze (COMT), koja katalizira prijenos metilne skupine *S*-adenozil-*L*-metionina na fenolnu skupinu supstrata kateholne strukture. Fiziološki supstrati COMT-a su dopa kateholamini (dopamin, adrenalin i noradrenalin) te njihovi hidroksilirani metaboliti. U terapiji Parkinsonove bolesti koristi se kao dodatak terapiji levodopom/karbidopom, pri čemu entakapon sprječava metabolizam i inaktivaciju ovih lijekova, čime se povećava njihova

bioraspoloživost (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/entacapone>) (Jackson i sur., 2017).

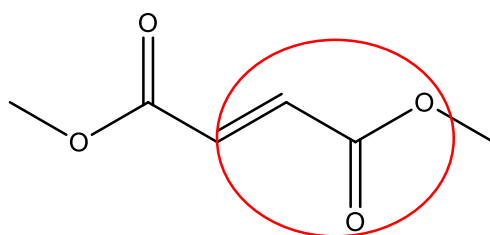


Slika 8. Entakapon

1.2.4. Lijekovi za terapiju multiple skleroze: dimetil-fumarat

Multipla skleroza je autoimuna neurodegenerativna bolest središnjeg živčanog sustava u kojoj dolazi do upale i demijelinizacije živaca u mozgu i leđnoj moždini, pri čemu su periferni živci pošteđeni. Uzrok bolesti je nepoznat. Jedan od čimbenika bolesti koji igra ulogu je genetska predispozicija, ali brojni pokazatelji također govore u korist utjecaja tvari iz okoliša u etiologiji bolesti (Rajić Džolić i sur., 2017).

Dimetil-fumarat koristi se u liječenju psorijaze te je odobren za liječenje multiple skleroze 2013. godine (Slika 9). U strukturi sadrži Michaelov akceptor, koji brzo stvara adukte s glutationom (GSH). Iako je mehanizam djelovanja dimetil-fumarata još uvijek predmet znanstvenih istraživanja, poznato je da u organizmu brzo hidrolizira u monometil fumarat, koji je aktivni metabolit te sporije reagira s GSH od dimetil fumarata (Jackson i sur., 2017). Lijek smanjuje broj aktiviranih T limfocita, utječe na njihovu migraciju i prelazak preko krvno-moždane barijere. Pretklinička ispitivanja pokazala su da dimetil fumarat izaziva farmakodinamičke odgovore prvenstveno aktivacijom signalnog puta nuklearnog transkripcijskog faktora Nrf2, koji je važan antioksidativni put u stanici, čime se smanjuje oksidativni stres i ispoljava citoprotektivno djelovanje. Dimetil fumarat smanjuje učestalost relapsa multiple skleroze, širenje lezija u središnjem živčanom sustavu i progresiju bolesti (Rajić Džolić i sur., 2017).

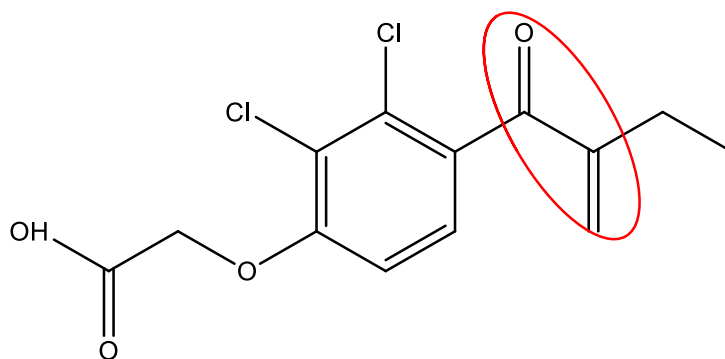


Slika 9. Dimetil-fumarat

1.2.5. Diuretici: etakrinska kiselina

Etakrinska kiselina je diuretik, a pokazano je da ima i protutumorsko djelovanje i pojačava djelovanje citostatika. Diuretsko djelovanje etakrinske kiseline postiže se inhibicijom aktivnosti $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ simportera u debelom uzlaznom kraku Henleove petlje (Molnar i Somberg, 2009). Diuretska aktivnost ovisi o najmanje 2 strukture: α,β -nezasićenom ketonu, odnosno Michaelovon akceptoru i supstuentima na aromatskoj jezgri (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethacrynic-acid>). Poznato je da etakrinska kiselina inhibira glutation-S-transferazu (GST) P1-1 i WNT aktivnost. WNT aktivnost uključuje signaliziranje WNT obitelji proteina, čiji signali su pleiotropni, s učincima koji uključuju mitogenu stimulaciju i diferencijaciju stanica (Komiya i Habas, 2008). GST je prekomjerno eksprimirana u tumorima u reduciranom obliku i kao takva se veže na elektrofilne spojeve što dovodi do detoksifikacije stanica. Etakrinska kiselina i konjugat etakrinska kiselina-GSH inhibiraju GST (Oakley i sur., 1997; Ploemen i sur., 1990) te time povećavaju citotoksičnost kemoterapeutika.

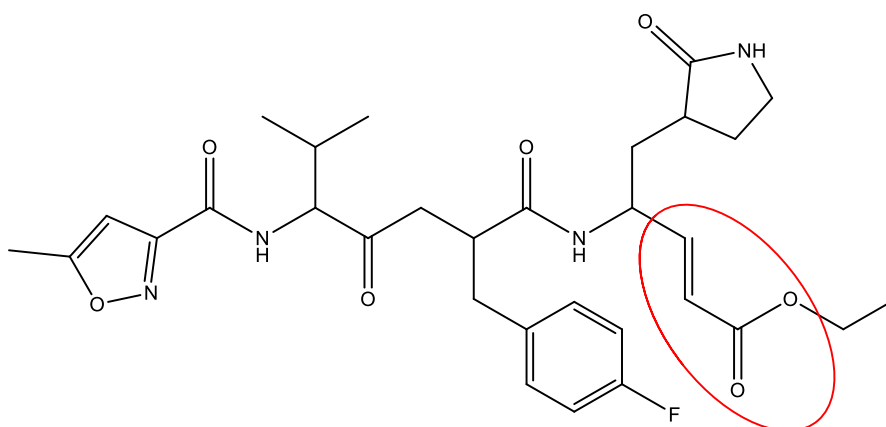
Istraživanja su nadalje pokazala da ireverzibilni inhibitori EGFR-a i etakrinska kiselina sinergistički inhibiraju rast stanica raka dojke u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Kombinacija inhibitora EGFR-a i etakrinske kiseline inducira nekrozu i zaustavljanje staničnog ciklusa te potiskuje signaliziranje WNT/ β -katenina, kao i signaliziranje MAPK-ERK1/2 (Liu i sur, 2016).



Slika 10. Etakrinska kiselina

1.2.6. Rupintrivir

Rupintrivir je eksperimentalni lijek za liječenje infekcija rinovirusima, odnosno prehlade. U svojoj strukturi sadrži α,β -nezasićeni aciklički ester, koji ireverzibilno inhibira ljudsku rinovirus 3C proteazu (HRV-3CP) (Slika 8). Inhibicija toga enzima tvorbom kovalentne veze s očuvanim katalitičkim cisteinom omogućuje ciljanje velikog broja različitih serotipova HRV-3CP-a, čak i u slučaju mutacije enzima. Rupintrivir je zadovoljio kriterije ispitivanja inicijalne faze 2 kliničkih istraživanja s dobrim sigurnosnim profilom i umjerenom učinkovitosti, ali nije zadovoljio u većim ispitivanjima faze 2 zbog smanjene učinkovitosti. Nedavno je ponovno izražen interes za rupintrivir i slične peptidne spojeve koji sadrže Michaelove akceptore za liječenje enterovirusa-71 i norovirusa, jer posjeduju 3C proteaze slične HRV-3CP (Jackson i sur, 2017).



Slika 8. Rupintrivir

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog diplomskog rada bio je sintetizirati asimetrične fumardiamide primakina i halogenanilina. Uzimajući u obzir podatke iz literature i dosadašnja istraživanja derivata primakina provedenih na Zavodu za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, pretpostavljeno je da dizajnirani spojevi **4a-d** imaju visoki farmakološki potencijal. U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, provest će se biološka ispitivanja sintetiziranih spojeva.

3. MATERIJALI I METODE

Tališta (t_r) su određena na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) u otvorenim kapilarama te nisu korigirana. Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC upotrijebljene su silikagel ploče 60 F254 (Merck, Njemačka), a kao pokretna faza odgovarajući sustavi otapala diklormetan/metanol (9:1, 95:5 i 96:4). Za kolonsku kromatografiju kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063-0,200 mm (Kemika, Hrvatska), a kao pokretna faza korišteni su diklormetan/metanol (9.5:0.5) i cikloheksan/etilacetat/metanol (3:1:0.5) kao pokretna faza. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ($\lambda = 254$ nm) i parama joda.

IR spektri snimljeni su na Paragon FT-IR spektrofotometru (Perkin-Elmer, UK). UV-Vis spektri snimljeni su na Lambda 20 spektrofotometru (Perkin-Elmer, UK). ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su Avance 600 spektrometrom (Burker, Njemačka), kod 300,13 odnosno 600.13 MHz za ^1H i kod 75,47 odnosno 150.9 MHz za ^{13}C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO- d_6 otopinama na 25°C u NMR cijevicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard u ^1H , odnosno signal dimetilsulfoksida (DMSO) u ^{13}C spektru. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (HPLC, Agilent Technologies 1200 Series, MS, Agilent Technologies 6410 Triple Quad).

Primakin difosfat, (E)-4-etoksi-4-oksobut-2-enska kiselina (monoetil fumarat), 3-fluoroanilin, 4-fluoroanilin, 3-kloroanilin, 4-kloroanilin, 1-(bis(dimetilamino)metilen)-1*H*-1,2,3-triazolo(4,5-*b*)piridinijev 3-oksid heksafluorofosfat (HATU), N,N-diizopropiletilamin (DIEA) i trietilamin (TEA) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Metanol je nabavljen od tvrtke Honeywell Riedel de Haën (Njemačka), a diklormetan od Fisher Chemical (SAD). Litijev hidroksid monohidrat nabavljen je od tvrtke Honeywell Fluka (SAD).

Bezvodni diklormetan dobiven je na sljedeći način: diklormetan je ekstrahiran vodom, sušen nad kalcijevim kloridom i predestiliran, te čuvan nad aktiviranim molekulskim sitima. Sve druge kemikalije bile su p.a. čistoće.

Primakin je prije izvođenja reakcija oslobođen iz oblika soli. Sve reakcije s primaknom izvođene su uz zaštitu od svjetlosti.

3.1 Sinteza etil-(2*E*)-3-({4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}karbamoil)-prop-2-enoata (2)

Spoj **2** pripremljen je prema postupku opisanom u literaturi (Beus i sur., 2018).

Otopina monoetil fumarata (0,259 g, 1,8 mmol) u tionil-kloridu (7 mL) miješana je na sobnoj temperaturi preko noći, te je potom tionil-klorid uparen pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja naparen dva puta bezvodnim diklormetanom. Dobiveni kiselinski klorid otopljen je u bezvodnom diklormetanu (10 mL), te mu je dokapana otopina primakina (0,401 g, 1,5 mmol) i TEA (0,152 g, 1,5 mmol) u bezvodnom diklormetanu (8 mL). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 1 sat, nakon čega je tri puta ekstrahirana zasićenom otopinom natrijevog klorida. Organski sloj je sušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran te je otapalo upareno pod sniženim tlakom. Ostatak nakon uparavanja pročišćen je kolonskom kromatografijom uz diklormetan/metanol (96:4) kao pokretnu fazu. Dobiveni produkt rastljan je dietil-eteru, te je talog odsisan. Spektroskopski podaci dobivenog spoja su u skladu s literaturnim podacima (Beus i sur., 2018)

3.2 Sinteza etil-(2E)-3-({4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino]pencil} karbamoil)-prop-2-enske kiseline (3)

Spoj **3** pripremljen je prema postupku opisanom u literaturi (Beus i sur., 2018).

Otopina litijevog hidroksida monohidrata (0,126 g, 3 mmol) i spoja **2** (0,35 g, 0,6 mmol) u smjesi metanola i vode (1:1, 20 mL) miješana je na sobnoj temperaturi 1 sat. Metanol je uparen pod sniženim tlakom, a vodena otopina neutralizirana 10%-tnom HCl i ekstrahirana 3 puta diklormetanom. Organski sloj je osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran te je otapalo upareno pod sniženim tlakom. Dobiveni blijedo žuti talog upotrebljen je u kasnijim reakcijama bez daljnjeg pročišćavanja. Spektroskopski podaci dobivenog spoja su u skladu s literaturnim podacima (Beus i sur., 2018).

3.3 Sinteza fumardiamida 4a-d

Otopina spoja **3** (0,096 g, 0,27 mmol), DIEA (0,068 g, 0,54 mmol) i HATU (0,103 g, 0,27 mmol) u diklormetanu (6 mL) miješana je na sobnoj temperaturi 10 minuta, nakon čega je dodano 0,297 mmol odgovarajućeg halogenanilina. Reakcijska smjesa miješana je 2-3 sata na sobnoj temperaturi, uparena pod sniženim tlakom, otopljena u 8 mL etil-acetata i ekstrahirana 3 puta vodom. Organski sloj je osušen nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtriran te je otapalo upareno pod sniženim tlakom.

3.3.1 Sinteza (2E)-N-(3-fluorofenil)-N'-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida (4a)

Količina amina: 29 μ L.

Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom uz diklormetan/metanol (95:5) kao pokretnu fazu i rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: 0,041g (34%).

$t_t = 203-204$ °C.

IR (KBr): ν_{\max} 3388, 3319, 3269, 3080, 2961, 2935, 2866, 1630, 1554, 1520, 1452, 1387, 1334, 1201, 1158, 782, 680 cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 10,63 (s, 1H), 8,55–8,53 (dd, 1H, $J = 1,6, 4,2$), 8,52 (t, 1H, $J = 5,4$), 8,09–8,06 (dd, 1H, $J = 1,5, 8,3$), 7,69 (d, 2H, $J = 11,7$), 7,45–7,41 (m, 1H), 7,39–7,36 (m, 2H), 7,06–7,96 (m, 2H), 6,96–6,92 (m, 1H), 6,47 (d, 1H, $J = 2,4$), 6,28 (d, 1H, $J = 2,4$), 6,15 (d, 1H, $J = 8,8$), 3,82 (s, 3H), 3,70–3,61 (m, 1H), 3,24–3,18 (m, 2H), 1,74–1,64, 1,63–1,52 (2m, 4H), 1,22 (d, 3H, $J = 6,3$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 163,25, 162,62, 162,09 (d, $J = 242,0$), 159,00, 144,63, 144,23, 140,50 (d, $J = 11,5$), 134,79, 134,52, 134,40, 132,28, 130,50 (d, $J = 9,5$), 129,57, 122,09, 115,14, 110,28, 106,13 (d, $J = 27,2$), 96,14, 91,62, 54,96, 46,97, 38,95, 33,45, 25,77, 20,21 .

MS/MS m/z 451,1 (M + 1) $^+$.

3.3.2 Sinteza (2E)-N-(4-fluorofenil)-N'-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida (4b)

Količina amina: 31 μ L.

Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom uz diklormetan/metanol (95:5) kao pokretnu fazu i rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: 0,071g (58%).

$t_t = 226-227$ °C.

IR (KBr): ν_{\max} 3386, 3294, 3072, 2963, 2928, 2863, 1635, 1548, 1513, 1452, 1391, 1330, 1212, 1160, 1051, 973, 829, 673 cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 10,49 (s, 1H), 8,55–8,53 (dd, 1H, $J = 1,6, 4,2$), 8,52 (t, 1H, $J = 5,4$), 8,09–8,06 (dd, 1H, $J = 1,5, 8,3$), 7,72–7,68 (dd, 2H, $J = 5,0, J = 8,9$), 7,45–7,41 (m, 1H), 7,18 (t, 2H, $J = 8,8$), 7,05–6,93 (m, 2H), 6,47 (d, 1H, $J = 2,1$), 6,28 (d, 1H, $J = 2,1$), 6,15 (d, 1H, $J = 8,8$), 3,82 (s, 3H), 3,69–3,61 (m, 1H), 3,24–3,18 (m, 2H), 1,74–1,64, 1,63–1,52 (2m, 4H), 1,22 (d, 3H, $J = 6,3$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 163,34, 162,21, 159,00, 158,26 (d, $J = 240,0$), 144,63, 144,23, 135,22, 134,79, 134,53, 133,98, 132,52, 129,58, 122,09, 121,05 (d, $J = 7,6$), 115,44 (d, $J = 21,9$), 96,14, 91,62, 54,96, 46,97, 38,95, 33,45, 25,79, 20,21.

MS/MS m/z 451,1 ($M + 1$) $^+$.

3.3.3 Sinteza (2E)-N-(3-klorofenil)-N'-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida (4c)

Količina amina: 31 μL .

Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom uz diklormetan/metanol (95:5) kao pokretnu fazu i rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: 0,053g (42%).

$t_{\text{t}} = 187\text{--}188^\circ\text{C}$.

IR (KBr): ν_{max} 3381, 3298, 3068, 2959, 2928, 2863, 1635, 1591, 1521, 1465, 1419, 1386, 1331, 1210, 1163, 976, 821, 783, 670 cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 10,59 (s, 1H), 8,54–8,53 (dd, 1H, $J = 1,5, 4,1$), 8,50 (t, 1H, $J = 5,5$), 8,08–8,06 (dd, 1H, $J = 1,4, 8,2$), 7,90 (s, 1H), 7,51 (d, 1H, $J = 8,1$), 7,43–7,41 (m, 1H), 7,37 (t, H, $J = 8,1$), 7,16–7,14 (dd, 1H, $J = 1,2, J = 8,0$), 7,00 (q, 2H, $J = 15,1$), 6,47 (d, 1H, $J = 2,4$), 6,28 (d, 1H, $J = 2,3$), 6,14 (d, 1H, $J = 8,8$), 3,82 (s, 3H), 3,67–3,63 (m, 1H), 3,23–3,20 (m, 2H), 1,73–1,67, 1,63–1,53 (2m, 4H), 1,22 (d, 3H, $J = 6,3$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 163,21, 162,60, 158,97, 144,60, 144,19, 140,19, 134,74, 134,50, 134,41, 133,10, 132,19, 130,48, 129,54, 123,45, 122,03, 118,74, 117,72, 96,11, 91,63, 54,93, 46,98, 39,23, 33,44, 25,72, 20,18.

MS/MS m/z 467,0 ($M+1$) $^+$.

3.3.4 Sinteza (2E)-N-(4-klorofenil)-N'-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida (4d)

Količina amina: 32 μ L.

Dobiveni produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom uz cikloheksan/etilacetat/metanol (3:1:0.5) kao pokretnu fazu i rastrljavanjem u dietil-eteru.

Iskorištenje: =0,062g (49%).

$t_r = 223-226^\circ\text{C}$.

IR (KBr): ν_{max} 3381, 3289, 3071, 2959, 2931, 2864, 1640, 1526, 1452, 1388, 1331, 1210, 1163, 1094, 1049, 973, 822, 787, 686, 631, 507 cm^{-1} .

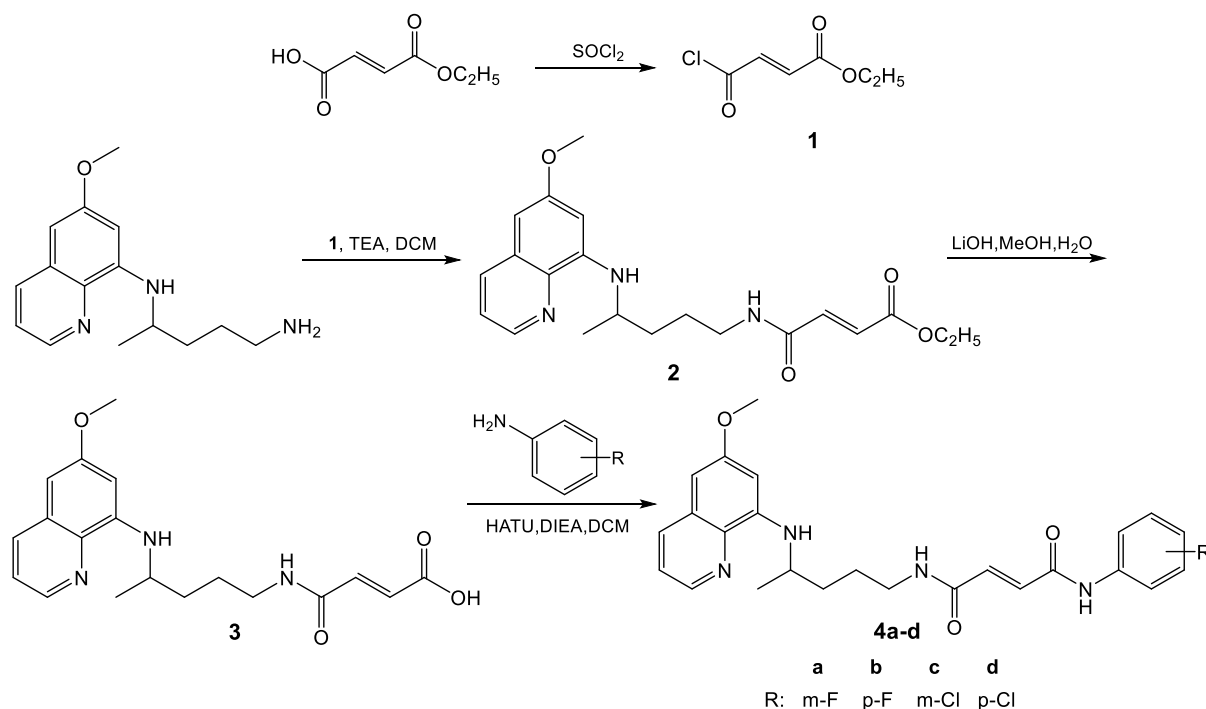
^1H NMR (DMSO- d_6) δ 10,56 (s, 1H), 8,55–8,53 (dd, 1H, $J = 1,7, 4,2$), 8,50 (t, 1H, $J = 5,6$), 8,09–8,06 (dd, 1H, $J = 1,6, 8,3$), 7,72–7,68 (m, 2H), 7,45–7,37 (m, 3H), 7,06–6,94 (m, 2H), 6,47 (d, 1H, $J = 2,5$), 6,27 (d, 1H, $J = 2,4$), 6,14 (d, 1H, $J = 8,8$), 3,82 (s, 3H), 3,69–3,60 (m, 1H), 3,24–3,18 (m, 2H), 1,74–1,64, 1,63–1,51 (2m, 4H), 1,22 (d, 3H, $J = 6,3$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 163,29, 162,43, 159,00, 144,63, 144,23, 137,76, 134,79, 134,52, 134,21, 132,38, 129,57, 128,75, 127,36, 122,09, 120,84, 96,14, 91,61, 54,96, 46,97, 38,82, 33,44, 25,77, 20,21.

MS/MS m/z 467,0 (M+1) $^+$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu sintetizirani su asimetrični fumardiamidi primakina i halogenanilina **4a-d**. Sinteza je provedena prema shemi 1.



Shema 1. Sinteza asimetričnih fumardiamida primakina i halogenanilina **4a-d**.

U ovoj sintezi drivata primakina jedna amidna veza nastala je u reakciji nukleofilne supstitucije na karbonilnoj skupini fumarne kiseline s primarnom amino skupinom primakina, a druga s odgovarajućim halogenanilinom.

Nakon pripreve kiselnog klorida monoetil fumarata **1**, pripremljen je amid **2**, u reakciji s primarnom amino skupinom primakina. Spoj **2** moguće je pripremiti i reakcijom *couplinga* između monoetil fumarata i primakina korištenjem standardnih uvjeta (HATU/DIEA/DCM). Međutim, prevođenjem monoetil fumarata u kiselnik klorid i amidacijom s primakinom dobiveno je bolje iskorištenje (Beus i sur., 2018).

Hidroliza terminalnog estera spoja **2** s litijevim hidroksidom dala je odgovarajuću karboksilnu kiselinu **3**. U posljednjem koraku *couplingom* između kiseline **3** i odgovarajućeg halogenanilina u prisustvu HATU/DIEA, dobiveni su produkti **4a-d**. Iskorištenja reakcija bila su umjerena (34-58%). Za pripremu spojeva **4a-d** korišteni su sljedeći anilini: 3-fluoroanilin, 4-fluoroanilin, 3-kloroanilin, 4-kloroanilin te su sintetizirani sljedeći spojevi:

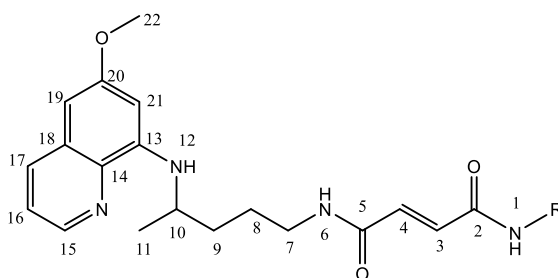
- (2*E*)-*N*-(3-fluorofenil)-*N'*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil}but-2-endiamida
(4a)
- (2*E*)-*N*-(4-fluorofenil)-*N'*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida
(4b)
- (2*E*)-*N*-(3-klorofenil)-*N'*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida
(4c)
- (2*E*)-*N*-(4-klorofenil)-*N'*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida
(4d)

Strukture svih spojeva potvrđene su MS-om te odgovarajućim spektroskopskim metodama (IR, ¹H i ¹³C NMR). Spojevima su također određena tališta. Analitički i spektroskopski podaci prikazani su u Tablicama 2 i 3 dok se spektri nalaze u Prilogu.

Tablica 2. Analitički i spektroskopski podaci spojeva **4a-d**

Spoj	t_f (°C)	Molekulska formula	M_r	MS (m/z)	IR (KBr) ν_{\max} (cm ⁻¹)
4a	203-204	C ₂₅ H ₂₇ FN ₄ O ₃	450,514	451,1 (M+1) ⁺	3388, 3319, 3269, 3080, 2961, 2935, 2866, 1630, 1554, 1520, 1452, 1387, 1334, 1201, 1158, 782, 680
4b	226-227	C ₂₅ H ₂₇ FN ₄ O ₃	450,514	451,1 (M+1) ⁺	3386, 3294, 3072, 2963, 2928, 2863, 1635, 1548, 1513, 1452, 1391, 1330, 1212, 1160, 1051, 973, 829, 673
4c	187-188	C ₂₅ H ₂₇ ClN ₄ O ₃	466,970	467,0 (M+1) ⁺	3381, 3298, 3068, 2959, 2928, 2863, 1635, 1591, 1521, 1465, 1419, 1386, 1331, 1210, 1163, 976, 821, 783, 670
4d	223-226	C ₂₅ H ₂₇ ClN ₄ O ₃	466,970	467,0 (M+1) ⁺	3381, 3289, 3071, 2959, 2931, 2864, 1640, 1526, 1452, 1388, 1331, 1210, 1163, 1094, 1049, 973, 822, 787, 686, 631, 507

Tablica 3. ^1H i ^{13}C NMR spektroskopski podaci za spojeve **4a-d**.



Spoj	R	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm)	^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ / ppm)
4a		10,63 (s, 1H, 1), 8,55-8,53 (dd, 1H, 15, $J = 1,6, 4,2$), 8,52 (t, 1H, 6, $J = 5,4$), 8,09-8,06 (dd, 1H, 17, $J = 1,5, 8,3$), 7,69 (d, 2H, 6', $J = 11,7$), 7,45-7,41 (m, 1H, 16), 7,39-7,36 (m, 2H, 2', 4'), 7,06-7,96 (m, 2H, 3, 4), 6,96-6,92 (m, 1H, 5'), 6,47 (d, 1H, 21, $J = 2,4$), 6,28 (d, 1H, 19, $J = 2,4$), 6,15 (d, 1H, 12, $J = 8,8$), 3,82 (s, 3H, 22), 3,70-3,61 (m, 1H, 10), 3,24-3,18 (m, 2H, 7), 1,74-1,64, 1,63-1,52 (2m, 4H, 8, 9), 1,22 (d, 3H, 11, $J = 6,3$)	163,25 (5), 162,62 (2), 162,09 (3', $J = 242,0$), 159,00 (20), 144,63 (13), 144,23 (15), 140,50 (1', d, $J = 11,5$), 134,79 (17), 134,52 (14), 134,40 (3), 132,28 (4), 130,50 (5', d, $J = 9,5$), 129,57 (18), 122,09 (16), 115,14 (6'), 110,28 (2', d, $J = 18,8$), 106,13 (4', d, $J = 27,2$), 96,14 (21), 91,62 (19), 54,96 (22), 46,97 (10), 38,95 (7), 33,45 (9), 25,77 (8), 20,21 (11)
4b		10,49 (s, 1H, 1), 8,55-8,53 (dd, 1H, 15, $J = 1,6, 4,2$), 8,52 (t, 1H, 6, $J = 5,4$), 8,09-8,06 (dd, 1H, 17, $J = 1,5, 8,3$), 7,72-7,68 (dd, 2H, 2', 6', $J = 5,0, J = 8,9$), 7,45-7,41 (m, 1H, 16), 7,18 (t, 2H, 3', 5', $J = 8,8$), 7,05-6,93 (m, 2H, 3, 4), 6,47 (d, 1H, 21, $J = 2,1$), 6,28 (d, 1H, 19, $J = 2,1$), 6,15 (d, 1H, 12, $J = 8,8$), 3,82 (s, 3H, 22), 3,69-3,61 (m, 1H, 10), 3,24-3,18 (m, 2H, 7), 1,74-1,64, 1,63-1,52 (2m, 4H, 8, 9), 1,22 (d, 3H, 11, $J = 6,3$)	163,34 (5), 162,21 (2), 159,00 (20), 158,26 (4', d, $J = 239,99$), 144,63 (13), 144,23 (15), 135,22 (1'), 134,79 (17), 134,53 (14), 133,98 (3), 132,52 (4), 129,58 (18), 122,09 (16), 121,05 (2', 6', d, $J = 7,6$), 115,44 (3', 5', d, $J = 21,89$), 96,14 (21), 91,62 (19), 54,96 (22), 46,97 (10), 38,95 (7), 33,45 (9), 25,79 (8), 20,21 (11)
4c		10,59 (s, 1H, 1), 8,54-8,53 (dd, 1H, 15, $J = 1,5, 4,1$), 8,50 (t, 1H, 6, $J = 5,5$), 8,08-8,06 (dd, 1H, 17, $J = 1,4, 8,2$), 7,90 (s, 1H, 2'), 7,51 (d, 1H, 6', $J = 8,1$), 7,43-7,41 (m, 1H, 16), 7,37 (t, 1H, 5', $J = 8,1$), 7,16-7,14 (dd, 1H, 4', $J = 1,2, J = 8,0$), 7,00 (q, 2H, 3, 4, $J = 15,1$), 6,47 (d, 1H, 21, $J = 2,4$), 6,28 (d, 1H, 19, $J = 2,3$), 6,14 (d, 1H, 12, $J = 8,8$), 3,82 (s, 3H, 22), 3,67-3,63 (m, 1H, 10), 3,23-3,20 (m, 2H, 7), 1,73-1,67, 1,63-1,53 (2m, 4H, 8, 9), 1,22 (d, 3H, 11, $J = 6,3$)	163,21 (5), 162,60 (2), 158,97 (20), 144,60 (13), 144,19 (15), 140,19 (1'), 134,74 (17), 134,50 (14), 134,41 (3), 133,10 (3'), 132,19 (4), 130,48 (5'), 129,54 (18), 123,45 (6'), 122,03 (16), 118,74 (2'), 117,72 (4'), 96,11 (21), 91,63 (19), 54,93 (22), 46,98 (10), 39,23 (7), 33,44 (9), 25,72 (8), 20,18 (11)
4d		10,56 (s, 1H, 1), 8,55-8,53 (dd, 1H, 15, $J = 1,7, 4,2$), 8,50 (t, 1H, 6, $J = 5,6$), 8,09-8,06 (dd, 1H, 17, $J = 1,6, 8,3$), 7,72-7,68 (m, 2H, 2', 6'), 7,45-7,37 (m, 3H, 16, 3', 5'), 7,06-6,94 (m, 2H, 3, 4), 6,47 (d, 1H, 21, $J = 2,5$), 6,27 (d, 1H, 19, $J = 2,4$), 6,14 (d, 1H, 12, $J = 8,8$), 3,82 (s, 3H, 22), 3,69-3,60 (m, 1H, 10), 3,24-3,18 (m, 2H, 7), 1,74-1,64, 1,63-1,51 (2m, 4H, 8, 9), 1,22 (d, 3H, 11, $J = 6,3$)	163,29 (5), 162,43 (2), 159,00 (20), 144,63 (13), 144,23 (15), 137,76 (1'), 134,79 (17), 134,52 (14), 134,21 (3), 132,38 (4), 129,57 (18), 128,75 (3', 5'), 127,36 (4'), 122,09 (16), 120,84 (2', 6'), 96,14 (21), 91,61 (19), 54,96 (22), 46,97 (10), 38,82 (7), 33,44 (9), 25,77 (8), 20,21 (11)

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu opisana je sinteza asimetričnih fumardiamida primakina i halogenanilina **4a-d**.

Sintetizirani su sljedeći spojevi:

- (2*E*)-*N*-(3-fluorofenil)-*N'*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil}but-2-endiamida
(4a)
- (2*E*)-*N*-(4-fluorofenil)-*N'*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida
(4b)
- (2*E*)-*N*-(3-klorofenil)-*N'*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida
(4c)
- (2*E*)-*N*-(4-klorofenil)-*N'*-{4-[(6-metoksikinolin-8-il) amino] pentil} but-2-endiamida
(4d)

Strukture spojeva potvrđene su standardnim metodama (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS), te su im određena tališta. U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, provest će se biološka ispitivanja sintetiziranih spojeva.

6. LITERATURA

Beus M, Rajić Z, Maysinger D, Mlinarić Z, Antunović M, Marijanović I, Fontinha D, Prudêncio M, Held J, Olgen S, Zorc B. SAHAquines, Novel Hybrids Based on SAHA and Primaquine Motifs, as Potential Cytostatic and Antiplasmodial Agents. *ChemistryOpen*, 2018, 7, 624–638.

Burger JA. Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitors in Clinical Trials. *Curr Hematol Malig Rep*, 2014, 9, 44–49.

Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, Chaves J, Wierda WG, Awan FT, Brown JR, Hillmen P, Stephens DM, Ghia P, Barrientos JC, Pagel JM, Woyach J, Johnson D, Huang J, Wang X, Kaptein A, Lannutti BJ, Covey T, Fardis M, McGreivy J, Hamdy A, Rothbaum W, Izumi R, Diacovo TG, Johnson AJ, Furman RR. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 2016, 374, 323–332.

Clayden J, Greeves N, Warren S. Conjugate addition and nucleophilic aromatic substitution. U: Organic Chemistry. Oxford University Press, urednik, New York, 2012, str. 498–527.

de Claro RA, McGinn KM, Verdun N, Lee S-L, Chiu H-J, Saber H, Brower ME, Chang CJG, Pfuma E, Habtemariam B, Bullock J, Wang Y, Nie L, Chen X-H, Lu D, Al-Hakim A, Kane RC, Kaminskas E, Justice R, Farrell AT, Pazdur R. FDA Approval: Ibrutinib for Patients with Previously Treated Mantle Cell Lymphoma and Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*, 2015, 21, 3586–3590.

Deeks ED. Neratinib: First Global Approval. *Drugs*, 2017, 77, 1695–1704.

Engel J, Lategahn J, Rauh D. Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Med Chem Lett*, 2016, 7, 2–5.

Hagel M, Niu D, St Martin T, Sheets MP, Qiao L, Bernard H, Karp RM, Zhu Z, Labenski MT, Chaturvedi P, Nacht M, Westlin WF, Petter RC, Singh J. Selective irreversible inhibition of a protease by targeting a noncatalytic cysteine. *Nat Chem Biol*, 2011, 7, 22–24.

Jackson PA, Widen JC, Harki DA, Brummond KM. Covalent Modifiers: A Chemical Perspective on the Reactivity of α,β -Unsaturated Carbonyls with Thiols via Hetero-Michael

Addition Reactions. *J Med Chem*, 2017, 60, 839–885.

Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 2008, 4, 68–75.

Kurti L, Czako B. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis. Cambridge, Massachusetts, Academic Press, 2005, str. 286.

Lin L, Bivona TG. Mechanisms of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Resistance in NSCLC Patients. *Chemother Res Pract*, 2012, 817297.

Liu B, Huang X, Hu Y, Chen T, Peng B, Gao N, Jin Z, Jia T, Zhang N, Wang Z, Jin G. Ethacrynic acid improves the antitumor effects of irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in breast cancer. *Oncotarget*, 2016, 7, 58038–58050.

Maucher I V., Rühl M, Kretschmer SBM, Hofmann B, Kühn B, Fettel J, Vogel A, Flügel KT, Manolikakes G, Hellmuth N, Häfner A-K, Golghalyani V, Ball A-K, Piesche M, Matrone C, Geisslinger G, Parnham MJ, Karas M, Steinhilber D, Roos J, Maier TJ. Michael acceptor containing drugs are a novel class of 5-lipoxygenase inhibitor targeting the surface cysteines C416 and C418. *Biochem Pharmacol*, 2017, 125, 55–74.

Modjtahedi H, Cho BC, Michel MC, Solca F. A comprehensive review of the preclinical efficacy profile of the ErbB family blocker afatinib in cancer. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2014, 387, 505–521.

Molnar J, Somberg JC. The Clinical Pharmacology of Ethacrynic Acid. *Am J Ther*, 2009, 16, 86–92.

Nagano T, Tachihara M, Nishimura Y. Dacomitinib, a second-generation irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) to treat non-small cell lung cancer. *Drugs of Today*, 2019, 55, 231.

Oakley AJ, Rossjohn J, Lo Bello M, Caccuri AM, Federici G, Parker MW. The Three-Dimensional Structure of the Human Pi Class Glutathione Transferase P1-1 in Complex with

the Inhibitor Ethacrynic Acid and Its Glutathione Conjugate. *Biochemistry*, 1997, 36, 576–585.

Ploemen JH, van Ommen B, van Bladeren PJ. Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochem Pharmacol*, 1990, 40, 1631–1635.

PubChem, 2019, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acalabrutinib>, pristupljeno 5. 5. 2019.

PubChem, 2019, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/entacapone>, pristupljeno 10. 5. 2019.

PubChem, 2019, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethacrynic-acid>, pristupljeno 15. 5. 2019.

Rajić Džolić Z, Šipicki S, Perković I. Terapija multiple skleroze – od konvencionalnih lijekova i monoklonskih protutijela do kanabinoida. *Farm Glas Hrvat Farm društva*, 2017, 73, 177–190.

Rajić Z, Beus M, Michnová H, Vlainić J, Persoons L, Kosalec I, Jampílek J, Schols D, Keser T, Zorc B. Asymmetric Primaquine and Halogenaniline Fumardiamides as Novel Biologically Active Michael Acceptors. *Molecules*, 2018, 23.

Rücker H, Al-Rifai N, Rasclé A, Gottfried E, Brodziak-Jarosz L, Gerhäuser C, Dick TP, Amslinger S. Enhancing the anti-inflammatory activity of chalcones by tuning the Michael acceptor site. *Org Biomol Chem*, 2015, 13, 3040–3047.

Seebacher NA, Stacy AE, Porter GM, Merlot AM. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38, 156.

Singh D, Attri BK, Gill RK, Bariwal J. Review on EGFR Inhibitors: Critical Updates. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16, 1134–1166.

Wind S, Schnell D, Ebner T, Freiwald M, Stopfer P. Clinical Pharmacokinetics and

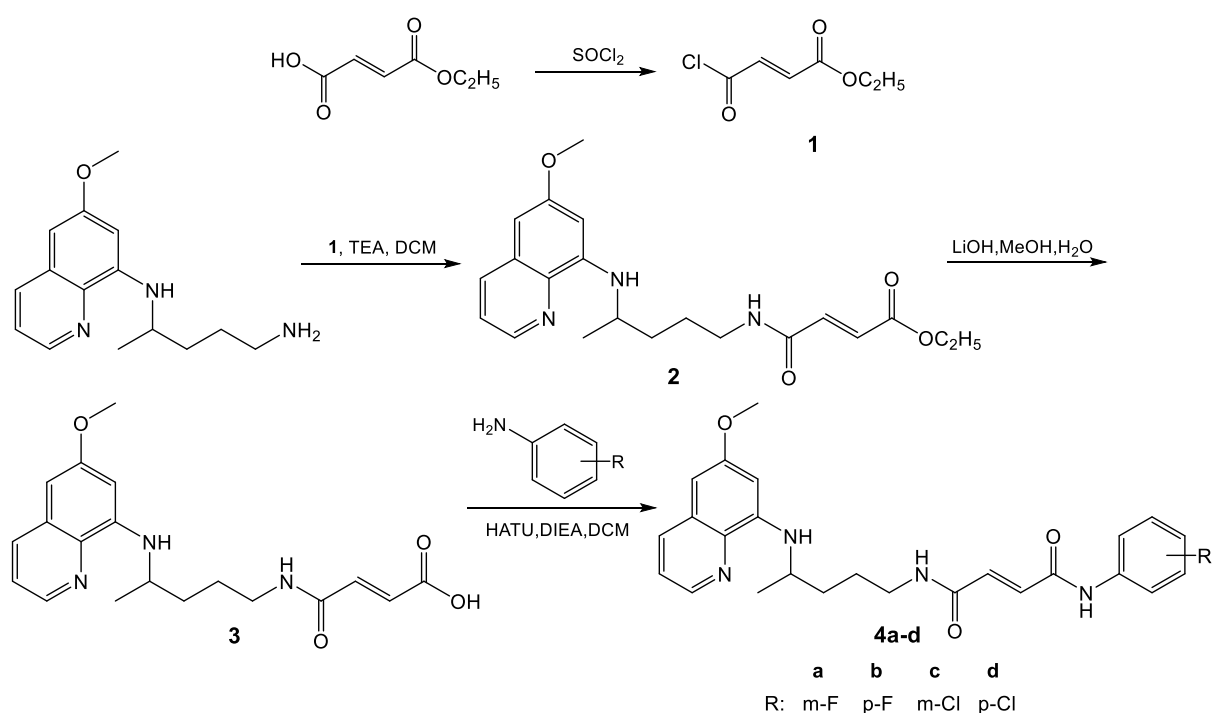
Pharmacodynamics of Afatinib. *Clin Pharmacokinet*, 2017, 56, 235–250.

Zhang H. Three generations of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors developed to revolutionize the therapy of lung cancer. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10, 3867–3872.

7. SAŽETAK

Reakcija adicije nukleofila na C=C dvostruku vezu koja je susjedna karbonilnoj C=O skupini zove se konjugirana adicija, Michaelova adicija ili 1,4-adicija. Reaktanti u Michaelovoj adiciji još se nazivaju Michaelovi donori i Michaelovi akceptori. Michaelove akceptore nalazimo u sljedećim skupinama lijekova: citostatici - inhibitori EGFR-a, te inhibitori Brutonove tirozin-kinaze, potom antiparkinsonici, lijekovi za terapiju multiple skleroze (dimetil-fumarat) i diuretici (etakrinska kiselina).

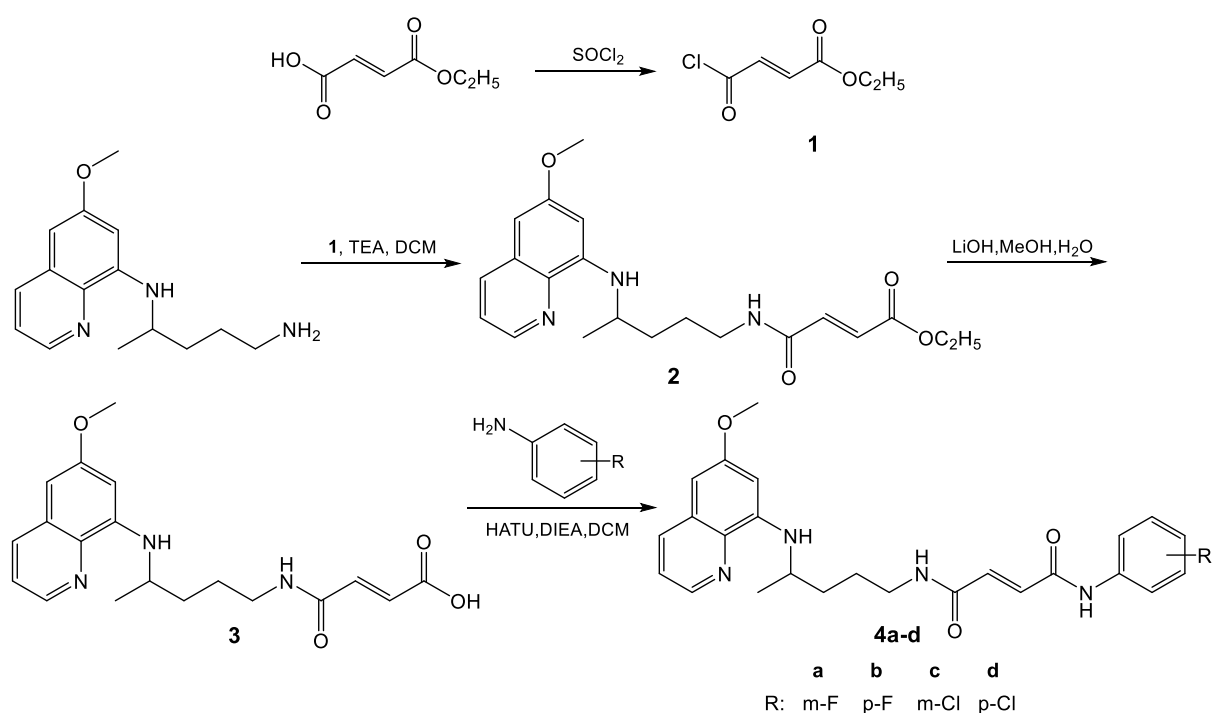
U ovom radu opisana je sinteza potencijalnih Michaelovih akceptora, asimetričnih fumaridamida primakina i halogenanilina **4a-d**. Novi spojevi karakterizirani su uobičajenim metodama (MS, IR, ^1H i ^{13}C NMR). Ispitivanje njihovog biološkog djelovanja je u tijeku.



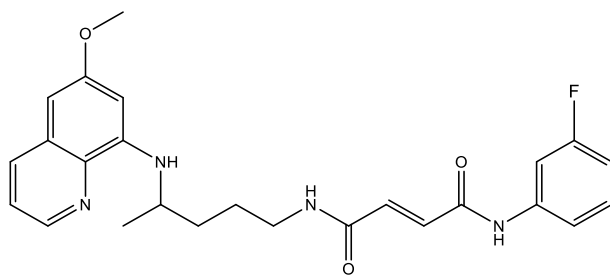
8. SUMMARY

Nucleophilic addition to a C=C double bond immediately adjoined to the C=O group is called conjugate addition, Michael addition or 1,4-addition. The reactants in Michael's addition are commonly known as Michael acceptors and Michael donors. Michael acceptors are present in the following drug classes: cytostatics – EGFR inhibitors and Bruton's tyrosine kinase inhibitors, antiparkinsonics, drug for the therapy of multiple sclerosis and diuretics.

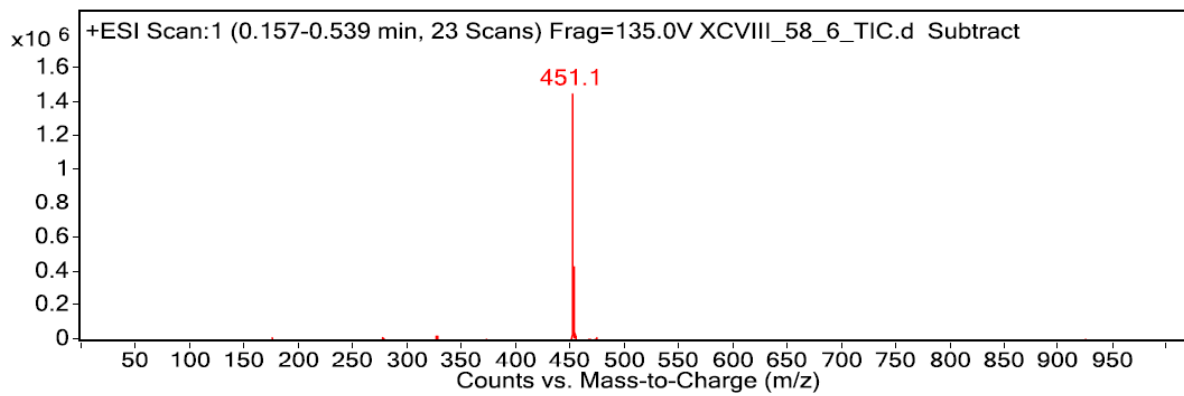
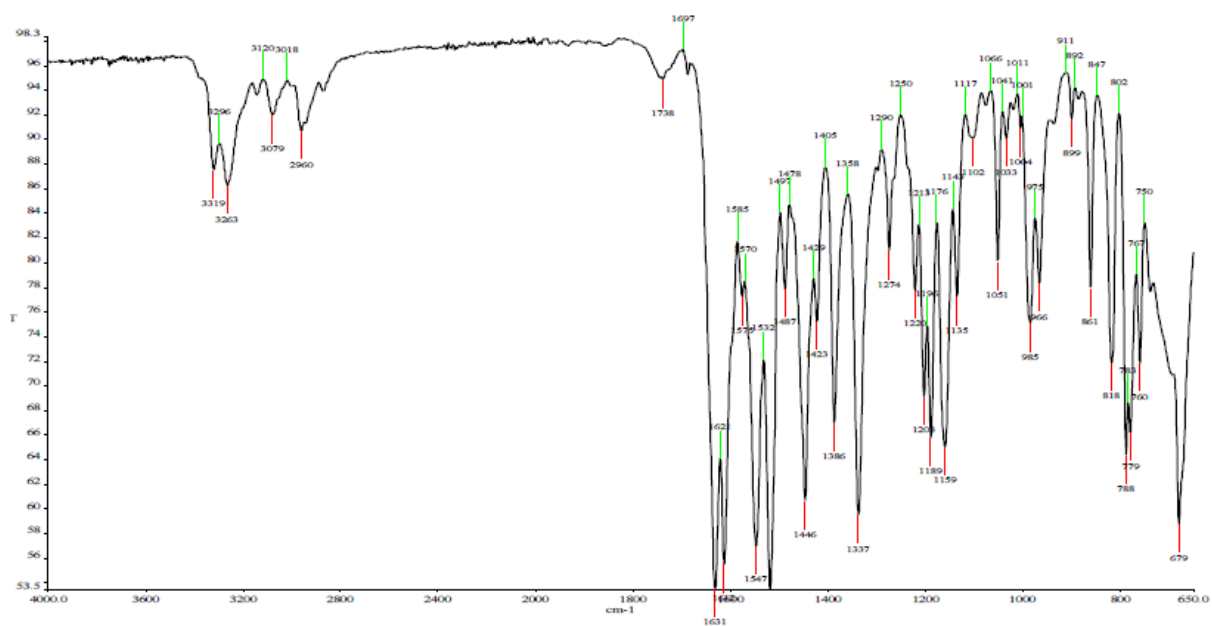
Here we present synthesis of potential Michael acceptors, asymmetric primaquine and halogenaniline fumardiamides **4a-d**. All new compounds were characterized by standard methods (MS, IR, ^1H and ^{13}C NMR). The evaluation of their biological activity is in progress.

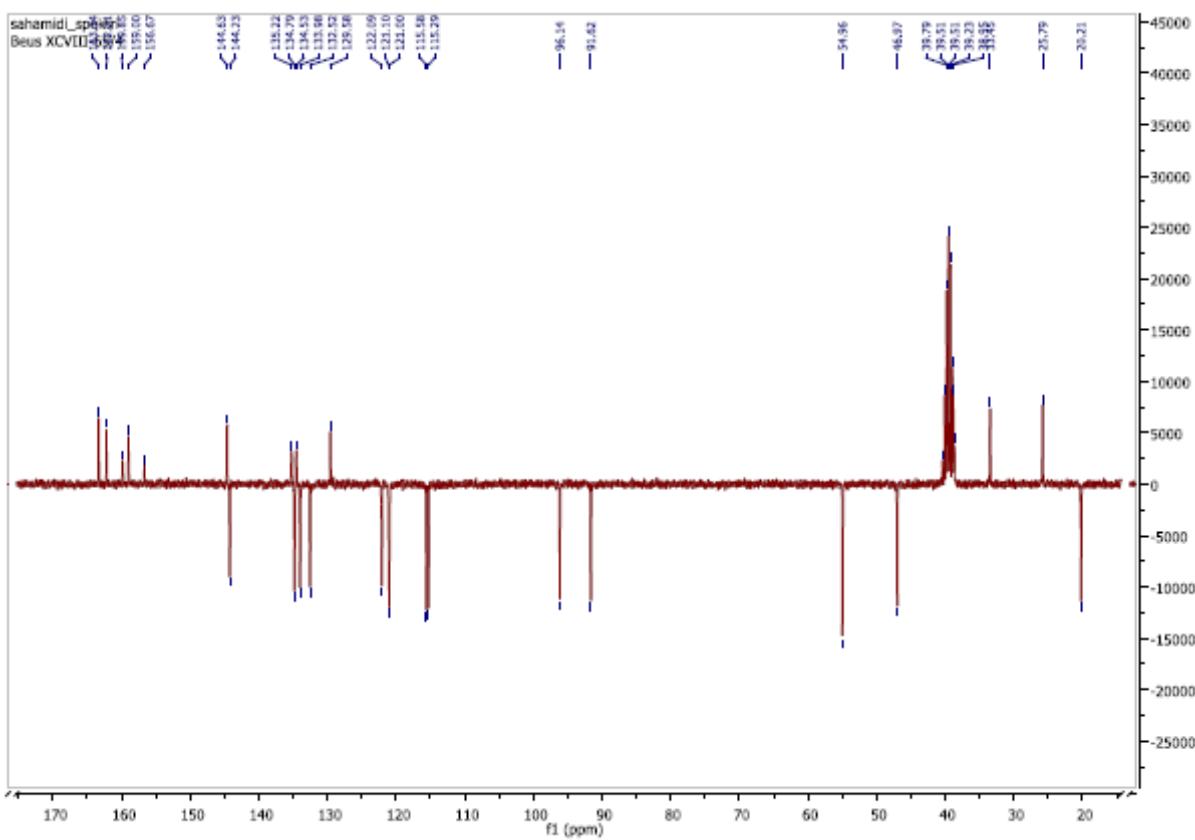
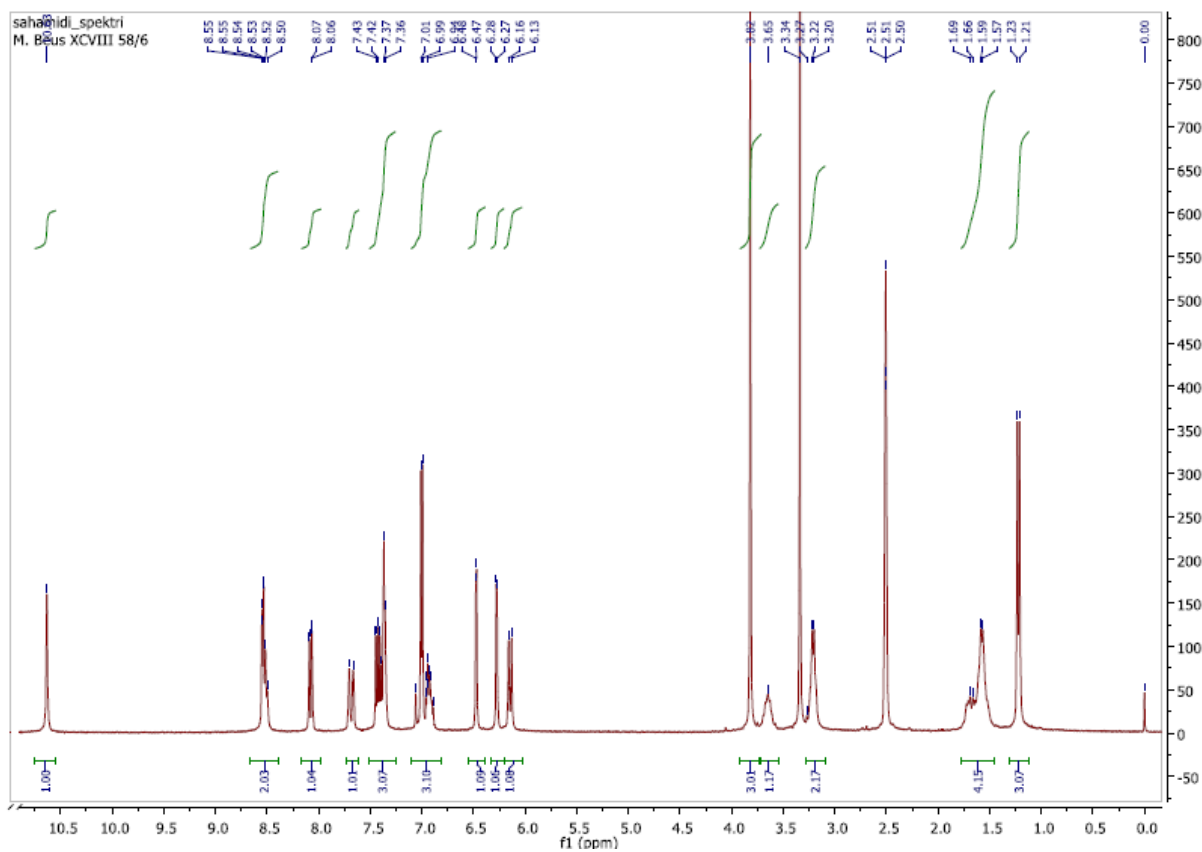


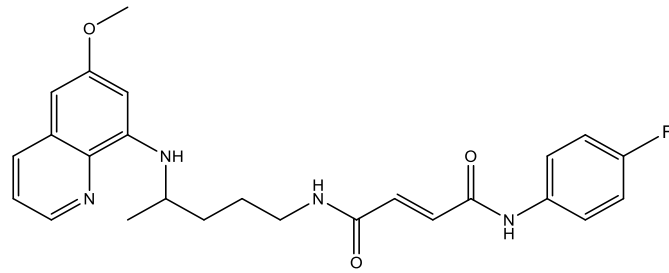
9. PRILOZI



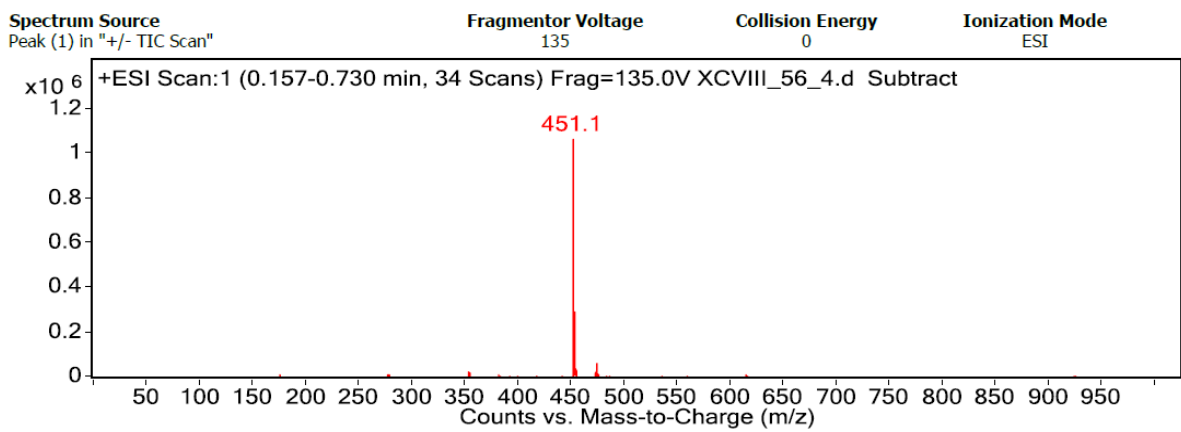
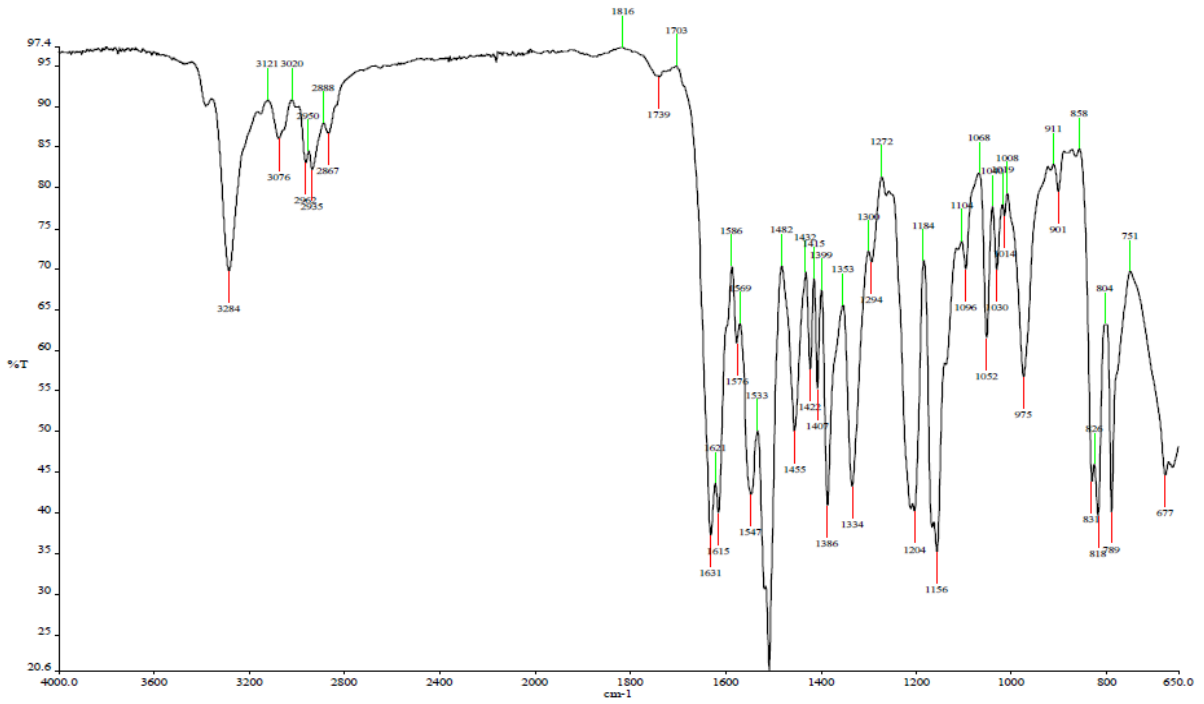
4a

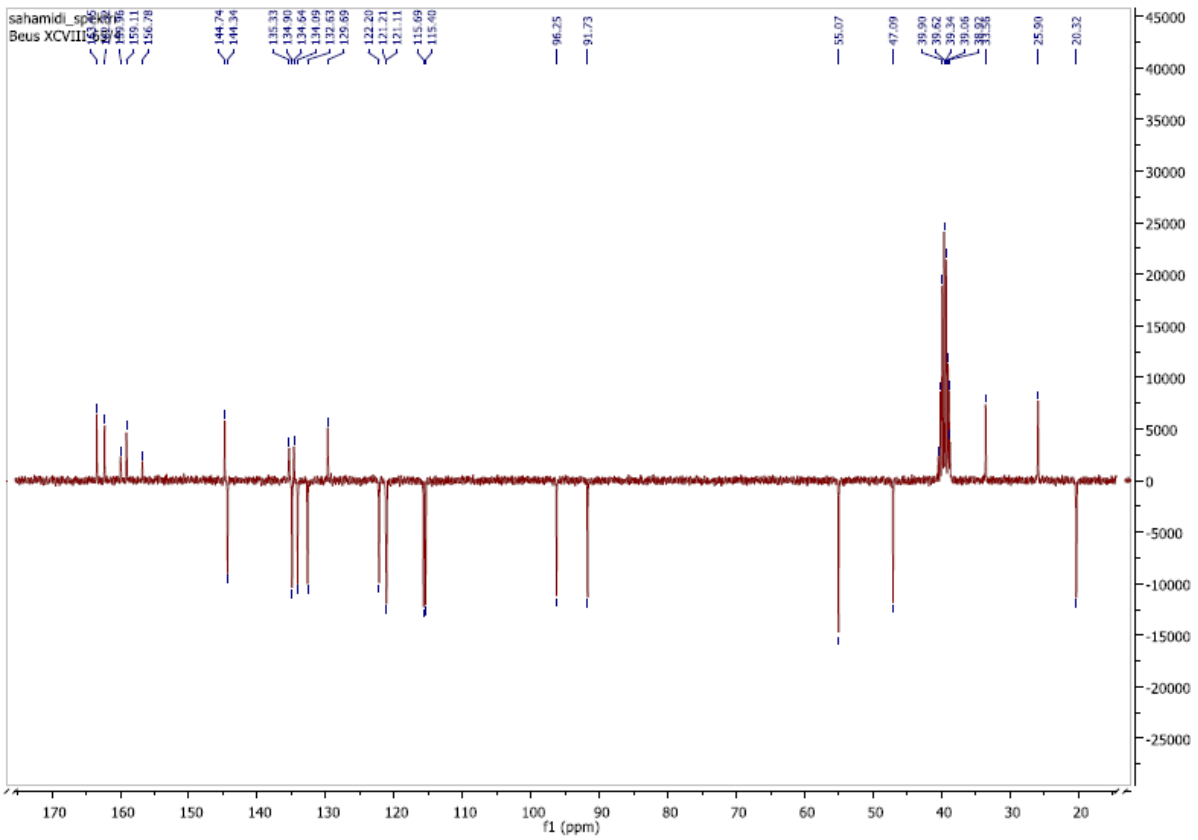
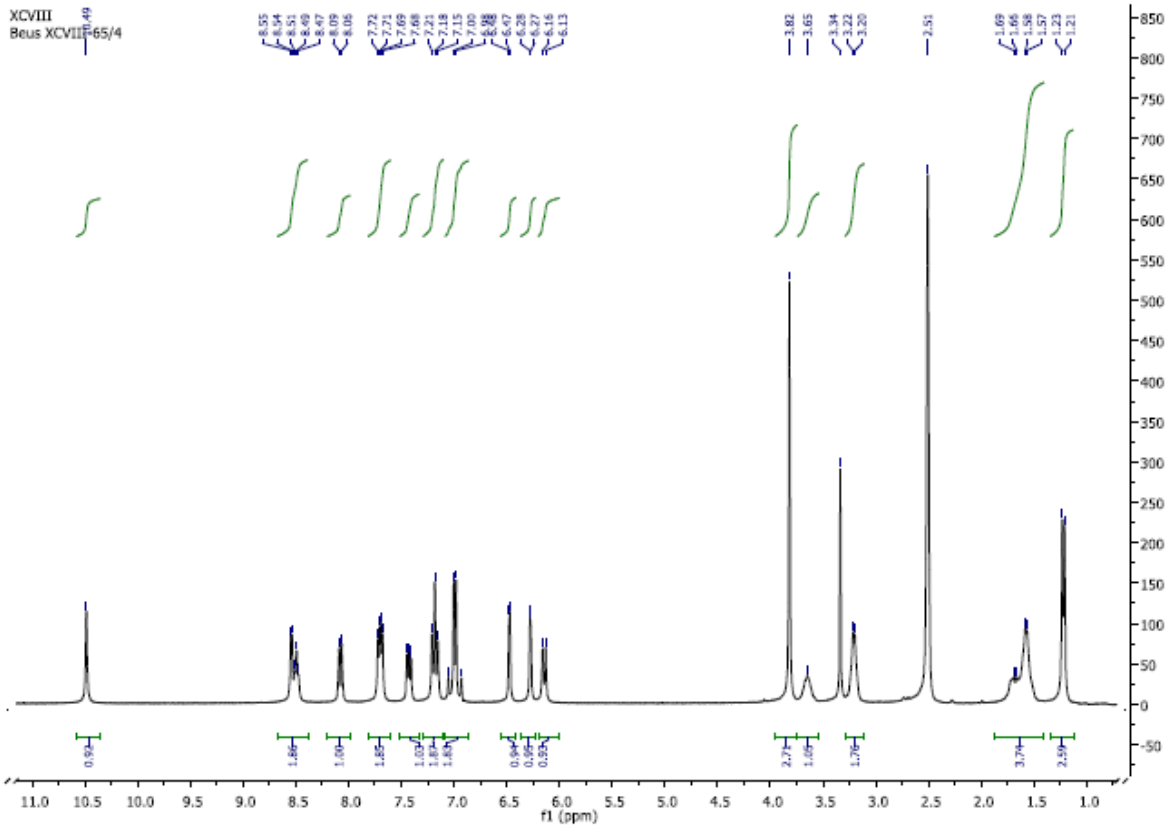


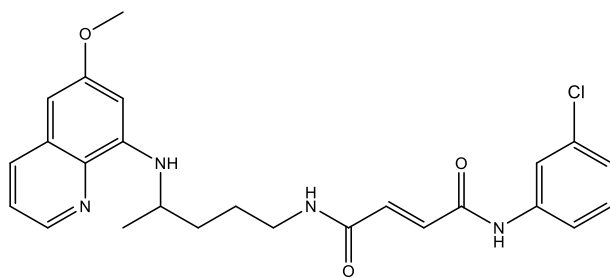




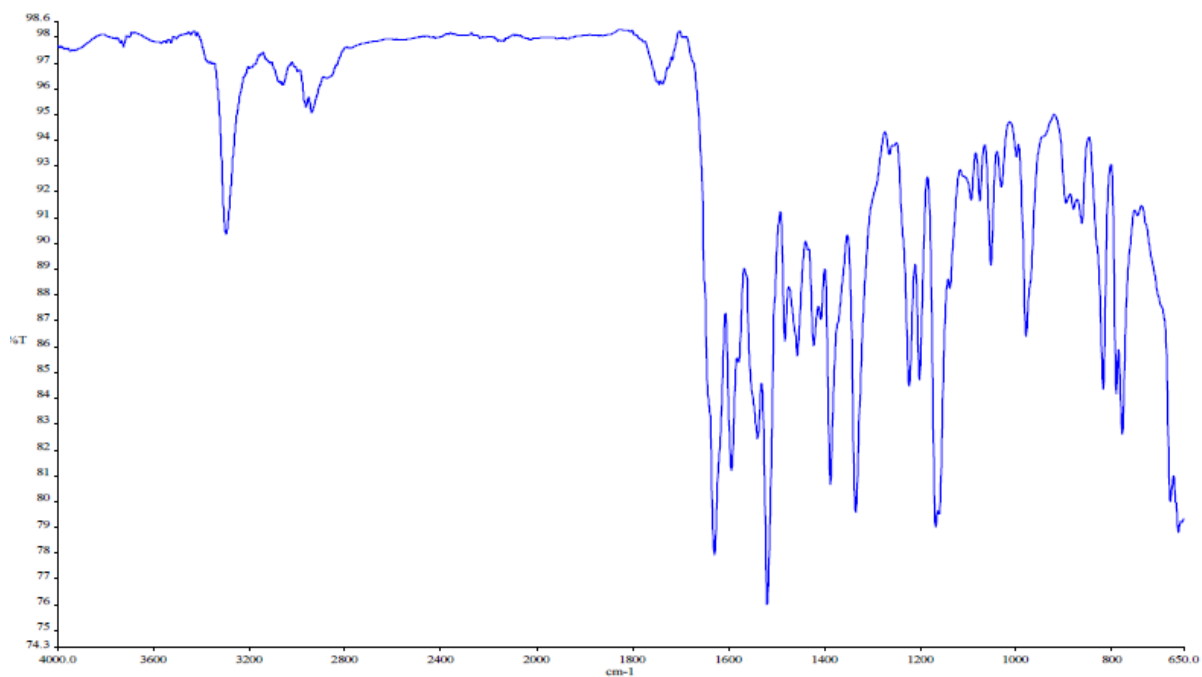
4b



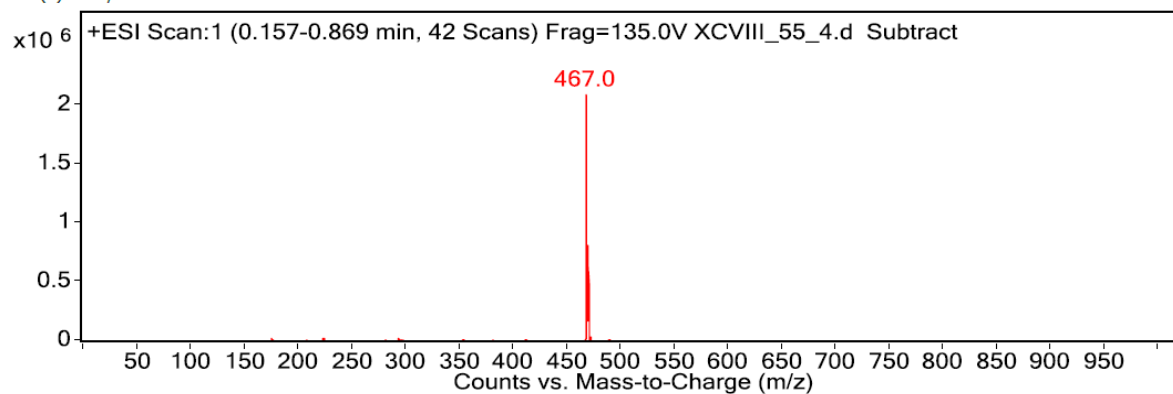


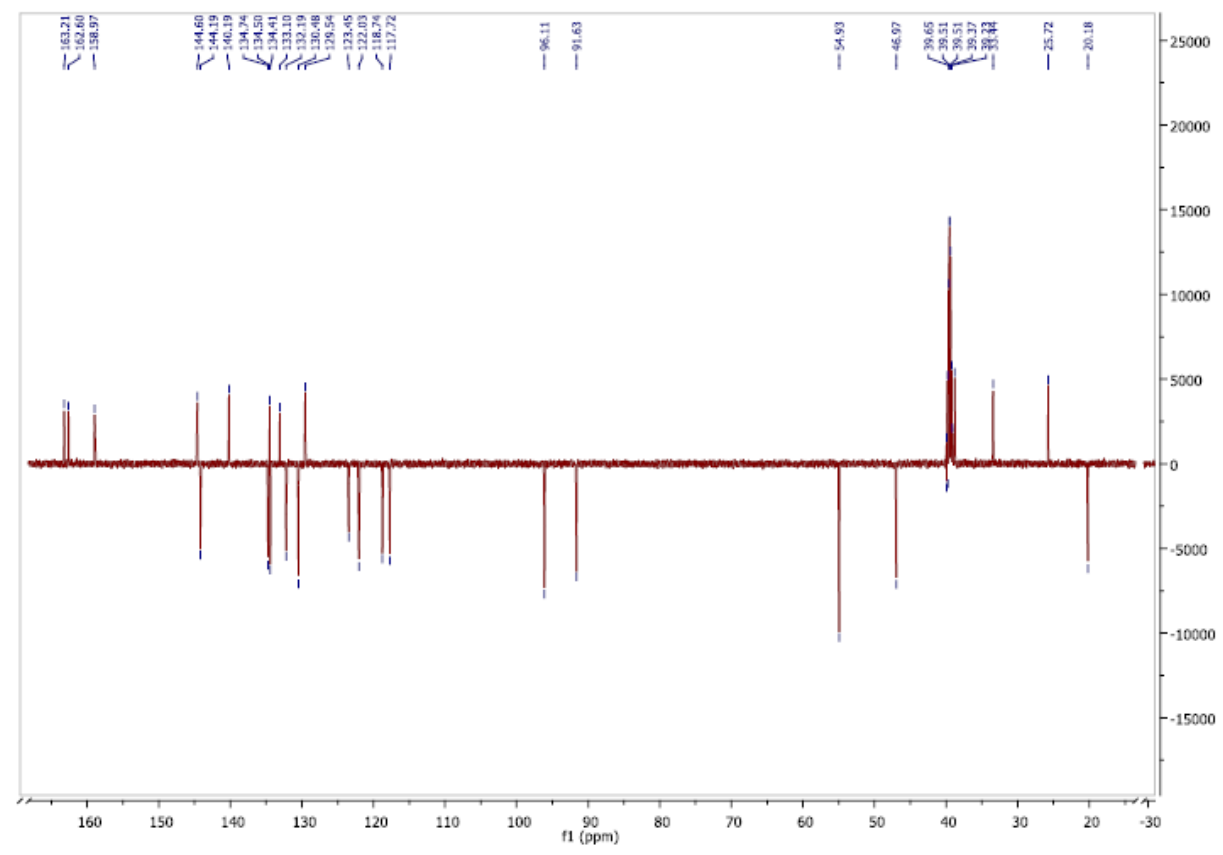
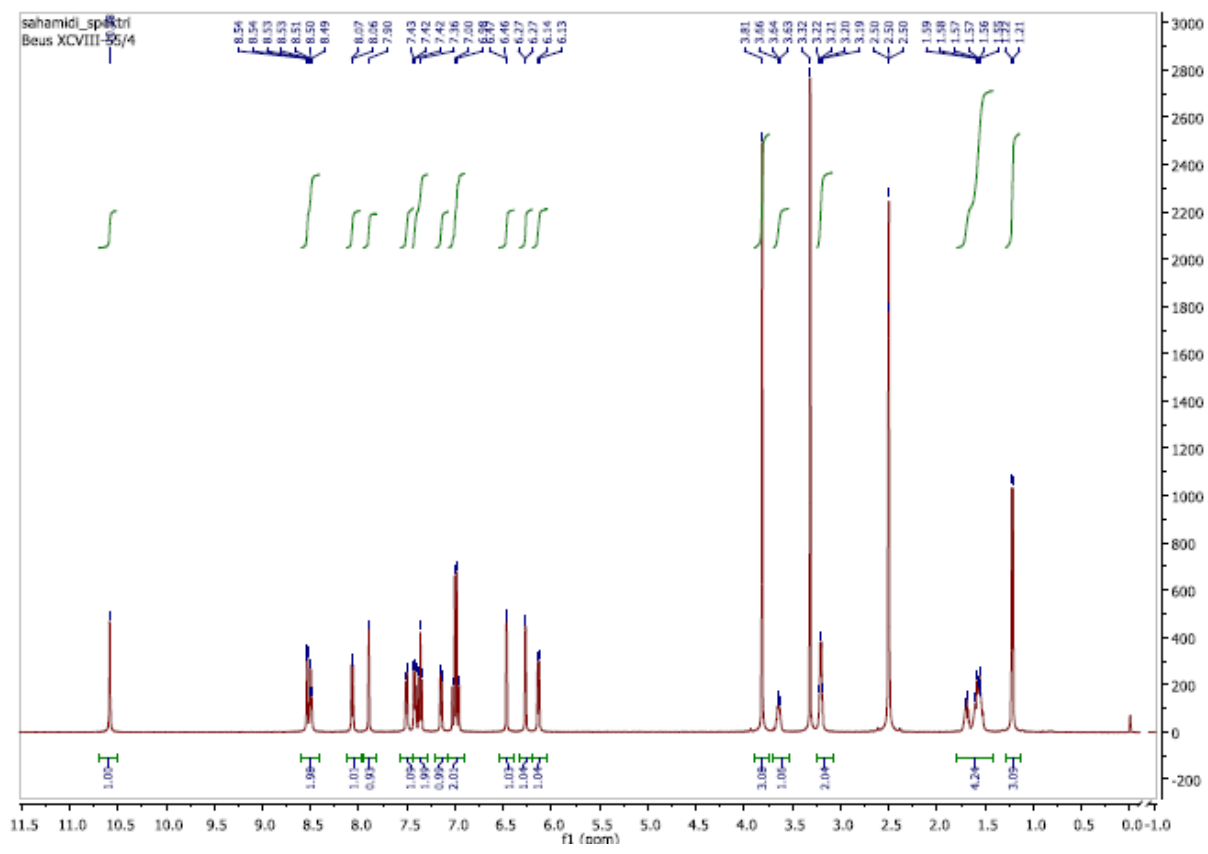


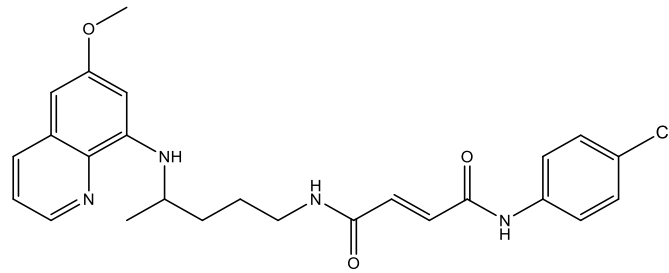
4c



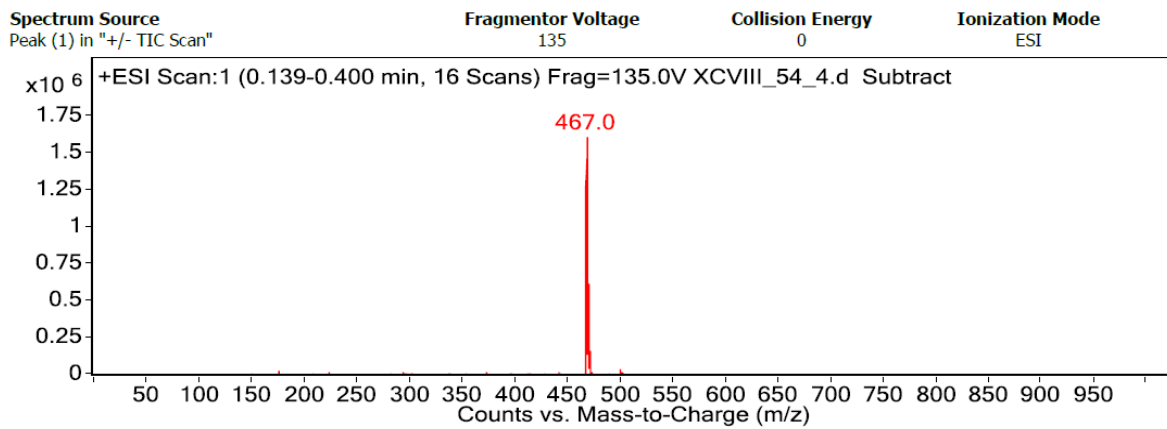
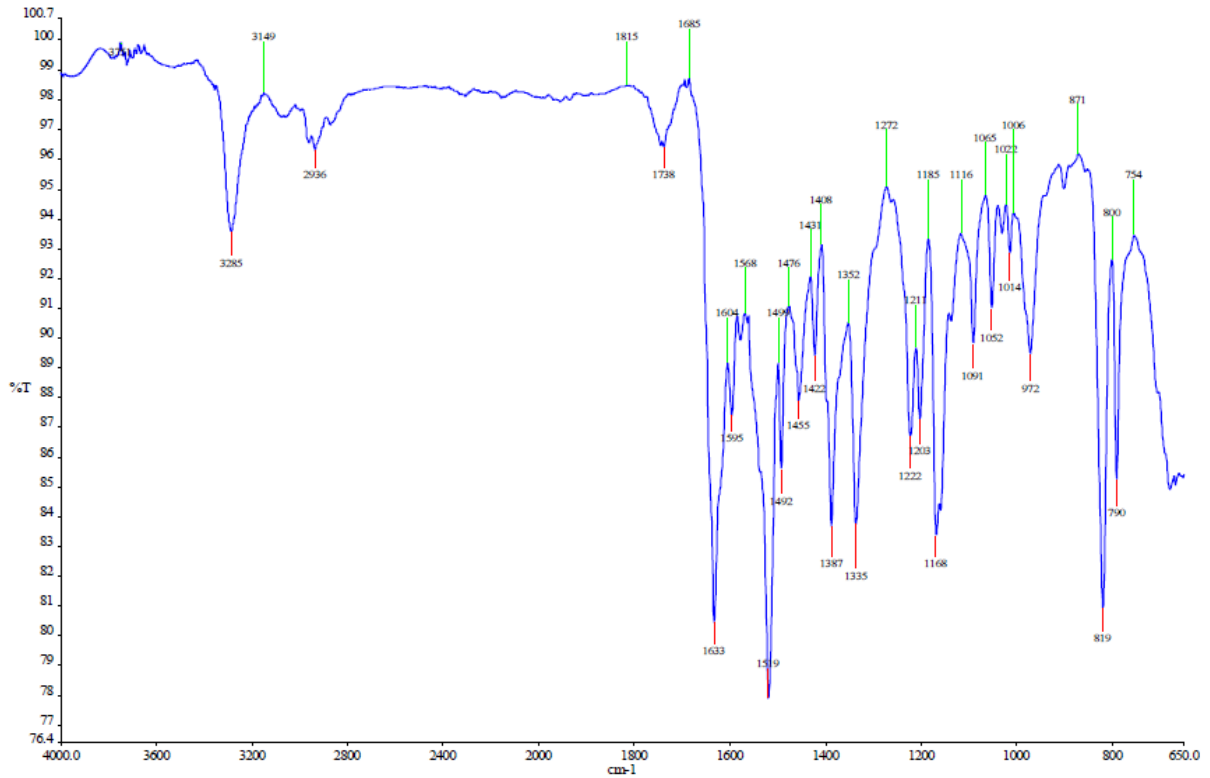
Spectrum Source: Peak (1) in "+/- TIC Scan" Fragmentor Voltage: 135 Collision Energy: 0 Ionization Mode: ESI

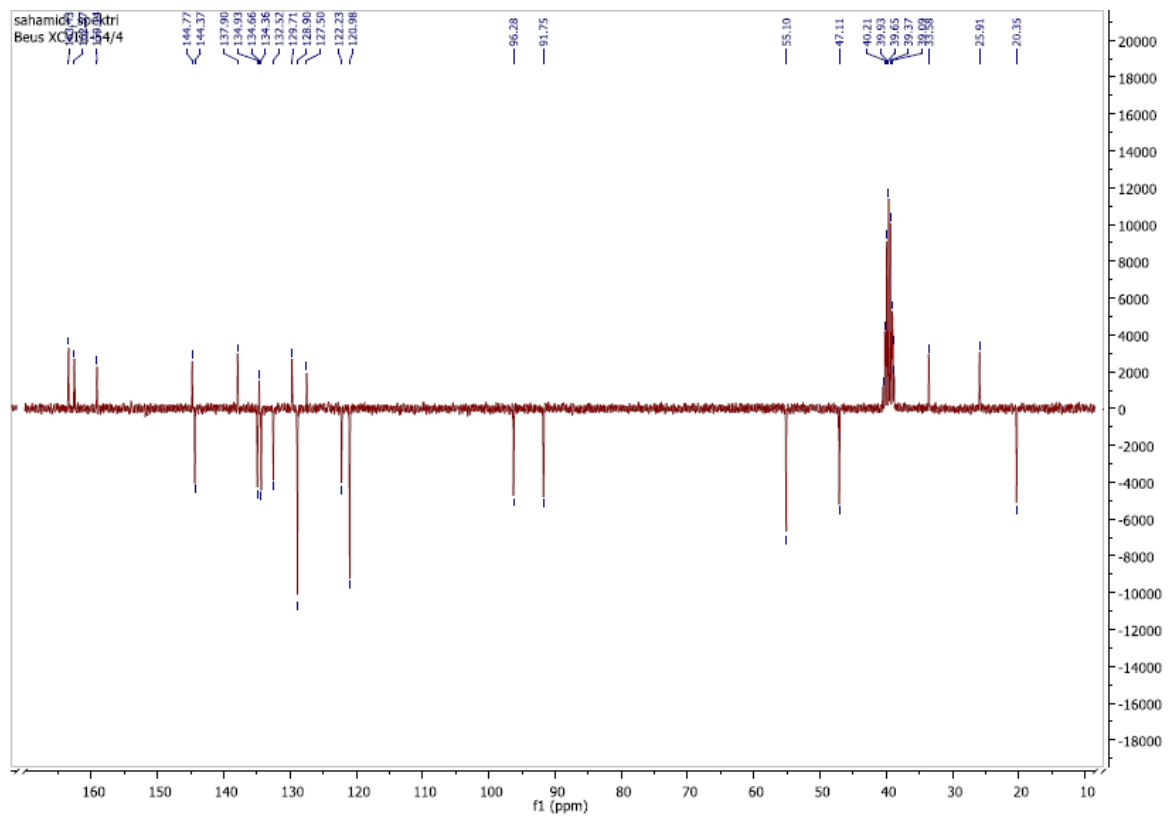
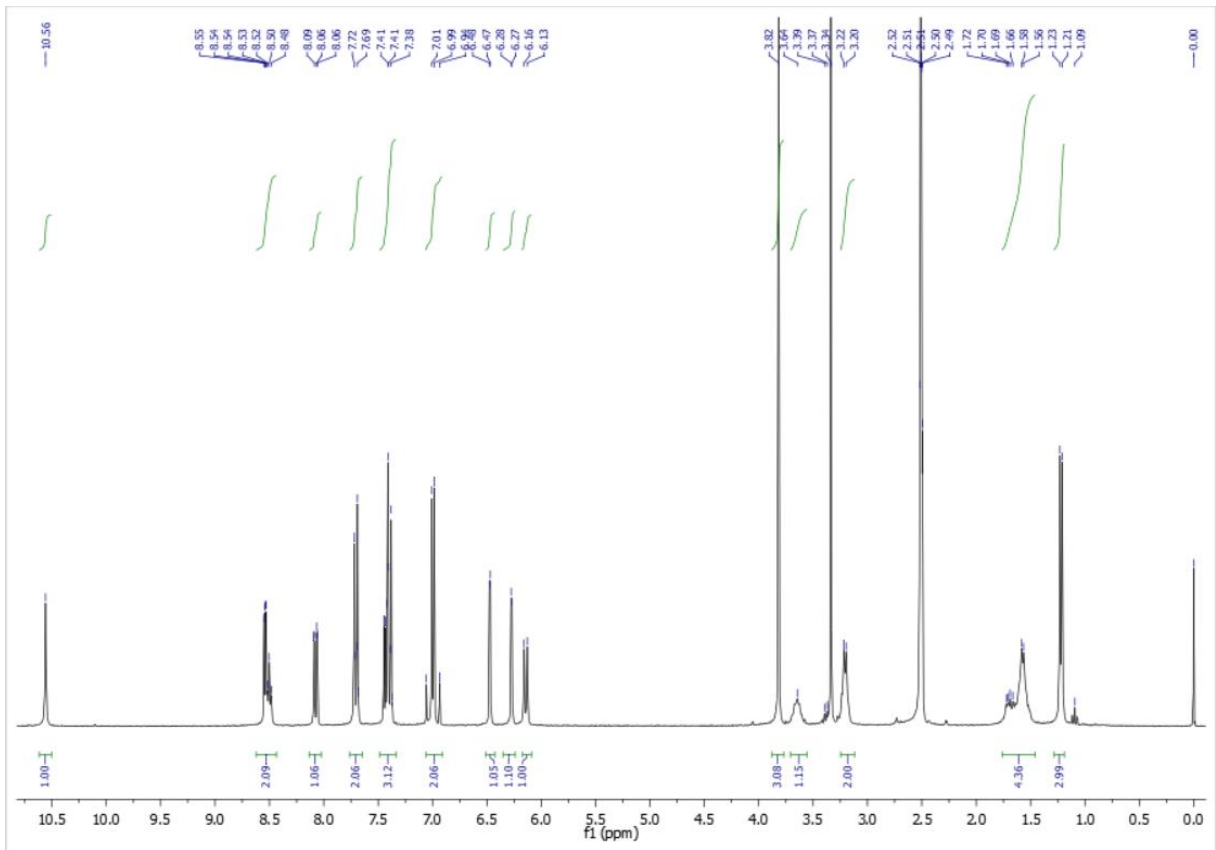






4d





**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/
BASIC DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

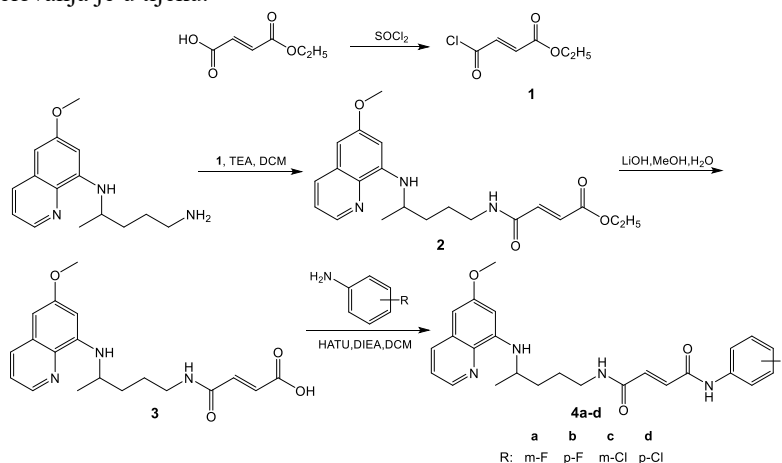
SINTEZA I KARAKTERIZACIJA ASIMETRIČNIH FUMARDIAMIDA PRIMAKINA I HALOGENANILINA

Anamarija Penić

SAŽETAK

Reakcija adicije nukleofila na C=C dvostruku vezu koja je susjedna karbonilnoj C=O skupini zove se konjugirana adicija, Michaelova adicija ili 1,4-adicija. Reaktanti u Michaelovoj adiciji još se nazivaju Michaelovi donori i Michaelovi akceptori. Michaelove akceptore nalazimo u sljedećim skupinama lijekova: citostatici - inhibitori EGFR-a, te inhibitori Brutonove tirozin-kinaze, potom antiparkinsonici, lijekovi za terapiju multiple skleroze (dimetil-fumarat) i diuretici (etakrinska kiselina).

U ovom radu opisana je sinteza potencijalnih Michaelovih akceptora, asimetričnih fumardiamida primakina i halogenanilina **4a-d**. Novi spojevi karakterizirani su uobičajenim metodama (MS, IR, ^1H i ^{13}C NMR). Ispitivanje njihovog biološkog djelovanja je u tijeku.



Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 46 stranica, 12 grafičkih prikaza, 3 tablice i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Michaelova adicija, primakin, sinteza

Mentor: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Zrinka Rajić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Hrvoje Rimac, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Jasna Jablan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medicinal Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

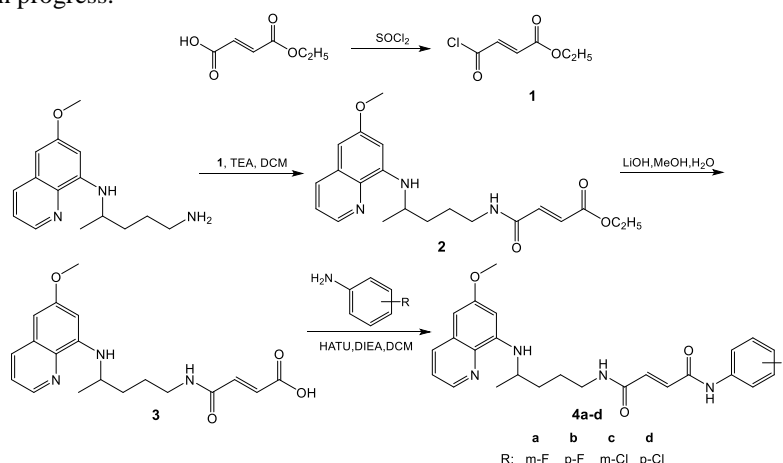
Diploma thesis

SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF ASYMMETRIC PRIMAQUINE AND HALOGENANILINE FUMARDIAMIDES

Anamarija Penić

SUMMARY

Nucleophilic addition to a C=C double bond immediately adjoined to the C=O group is called conjugate addition, Michael addition or 1,4-addition. The reactants in Michael's addition are commonly known as Michael acceptors and Michael donors. Michael acceptors are present in the following drug classes: cytostatics – EGFR inhibitors and Bruton's tyrosine kinase inhibitors, antiparkinsonics, drug for the therapy of multiple sclerosis and diuretics. Here we present synthesis of potential Michael acceptors, asymmetric primaquine and halogenaniline fumardiamides 4a-d. All new compounds were characterized by standard methods (MS, IR, ^1H and ^{13}C NMR). The evaluation of their biological activity is in progress.



The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 46 pages, 12 figures, 3 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Michael addition, primaquine, synthesis

Mentor: **Zrinka Rajić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Zrinka Rajić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Hrvoje Rimac, Ph.D. Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Jablan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.

