

# Sinteza i karakterizacija novih amidnih derivata itakonske kiseline

---

**Katušić, Vedran**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:163:637560>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Vedran Katusić**

**Sinteza i karakterizacija novih amidnih  
derivata itakonske kiseline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je na kolegiju Farmaceutska kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ivane Perković.

Prije svega zahvalio bih se mentorici doc. dr. sc. Ivani Perković na vodstvu, savjetima i pomoći tokom izrade ovoga rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Branki Zorc na pruženoj prilici da sudjelujem na ovom projektu.

Najljepše hvala svim kolegama u labosu na svojoj pomoći i ugodnom društvu za vrijeme izrade rada.

Za kraj se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na svojoj podršci tijekom studiranja.

## KRATICE

BTK - Brutonova tirozin kinaza

cADC *cis*-akonitat dekarboksilaze

DCM diklormetan

DIEA N,N- diizopropiletilamin

DMF dimetilformamid

DMSO dimetilsulfoksid

EGFR - receptor za epidermalni faktor rasta

EtAc etil-acetat

HATU heksafluorfosfat azabenzotriazol tetrametil uronij

IL – interleukin

IR infracrveno elektromagnetsko zračenje

*IRG1* immune-responsive gene 1

IZL izocitrat liaza

LPS lipopolisaharidi

MMI 4-monometilitakonat

MR molarna refraktivnost

Mr relativna molekulska masa

MS masena spektrometrija

NMR nuklearna magnetska rezonancija

ROS – reaktivne kisikove specije

s.t. sobna temperatura

TEA trietilamin

TLC tankoslojna kromatografija

TPSA -total polar surface area (ukupna polarna površina)

$t_t$  temperatura taljenja

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Itakonska kiselina.....	2
1.2. Fizikalno – kemijska svojstva itakonske kiseline .....	2
1.3. Biološko djelovanje itakonske kiseline .....	3
1.4. Michaelovi akceptori.....	6
1.5. Michaelovi akceptori kao lijekovi.....	7
1.6. Sinteza amida <i>coupling</i> reakcijom .....	10
2. Obrazloženje teme .....	12
3. Materijali i metode.....	14
3.1. Sinteza kiselinskog klorida monometil itakonata ( <b>2</b> ).....	16
3.2. Sinteza amidnih derivata monometil itakonata ( <b>3a-3f</b> ) .....	16
3.2.1 Metil 3-(piridin-3-ilkarbamoil)but-3-enoat ( <b>3a</b> ).....	16
3.2.2 Metil 3-((5-fluoropiridin-3-il)karbamoil)but-3-enoat ( <b>3b</b> ).....	17
3.2.3 Metil 3-(2-(piridin-3-il)etil)karbamoil)but-3-enoat ( <b>3c</b> ) .....	18
3.2.4 Metil 3-((4-fluorofenil)karbamoil)but-3-enoat ( <b>3d</b> ).....	18
3.2.5 Metil 3-((4-(trifluorometil)fenil)karbamoil)but-3-enoat ( <b>3e</b> ).....	19
3.2.6 Metil 3-((3-(trifluorometil)fenil)karbamoil)but-3-enoat ( <b>3f</b> ) .....	20
3.3. Sinteza amidnih derivata monometil itakonata HATU <i>couplingom</i> ( <b>3g-h</b> ).....	20
3.3.1 Metil 3-((piridin-3-ilmetil)karbamoil)but-3-enoat ( <b>3g</b> ).....	21
3.3.2 Metil 3-((2-(5-metoksi-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)karbamoil)but-3-enoat ( <b>3h</b> ).....	21
4. Rezultati i rasprava .....	23
5. Zaključci .....	39
6. Literatura.....	41
7. Sažetak/Summary .....	46

8. Prilozi.....	49
9. Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card.....	

## 1. Uvod



## 1.1. Itakonska kiselina

Itakonska kiselina je butan dikiselina sa metilenskom skupinom na  $\alpha$ -C atomu. Otkrio ju je Gustav Crasso 1840. godine dok je istraživao termalnu razgradnju akonitinske kiseline. Crasso joj je dodijelio ime tako da je presložio ime prekursora (Crasso, 1840). Zbog svoje strukture koristan je monomerni blok u proizvodnji polimera. Direktnom polikondenzacijom sa diolima se mogu dobiti linearni poliesteri koji se dodatno mogu modificirati aduktima na metilenu (Winkler i sur., 2015). Ta adicija je moguća zbog konjugacije dvostrukih veza, a takvi spojevi podliježu Michaelovoj reakciji. Polimeri itakonske kiseline su u današnje vrijeme okretanja obnovljivim resursima pogotovo zanimljivi zato što se ona dobiva fermentacijom ugljikohidrata pomoću gljivica *Aspergillus itaconicus* ili *Aspergillus terreus* (Sheldon, 2014).

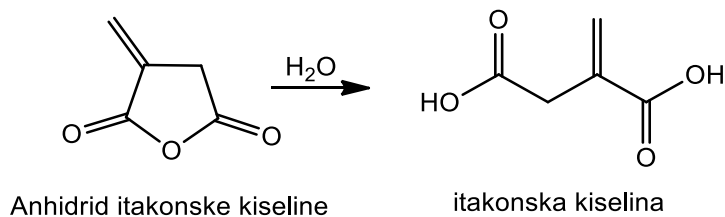
## 1.2. Fizikalno – kemijska svojstva itakonske kiseline

Itakonska kiselina je pri sobnoj temperaturi bijela kristalinična krutina. Dobro je topljiva vodi, etanolu i acetonu, a slabije u nepolarnim otapalima poput DCM-a ili benzena. Karakterističnog je mirisa i jako je higroskopna. Njezina osnovna fizikalno kemijska svojstva su navedena u Tablici 1.

Tablica 1. Fizikalno – kemijska svojstva itakonske kiseline (www.chemicalbook.com)

Molekulska formula	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Relativna molekulska masa	130,1
Temperatura tališta	165-168 °C
Temperatura vrelišta	268 °C
Gustoća	1,573 gcm <sup>-3</sup>
Topljivost u vodi	7,75 gcm <sup>-3</sup>
pK <sub>a</sub>	3,85

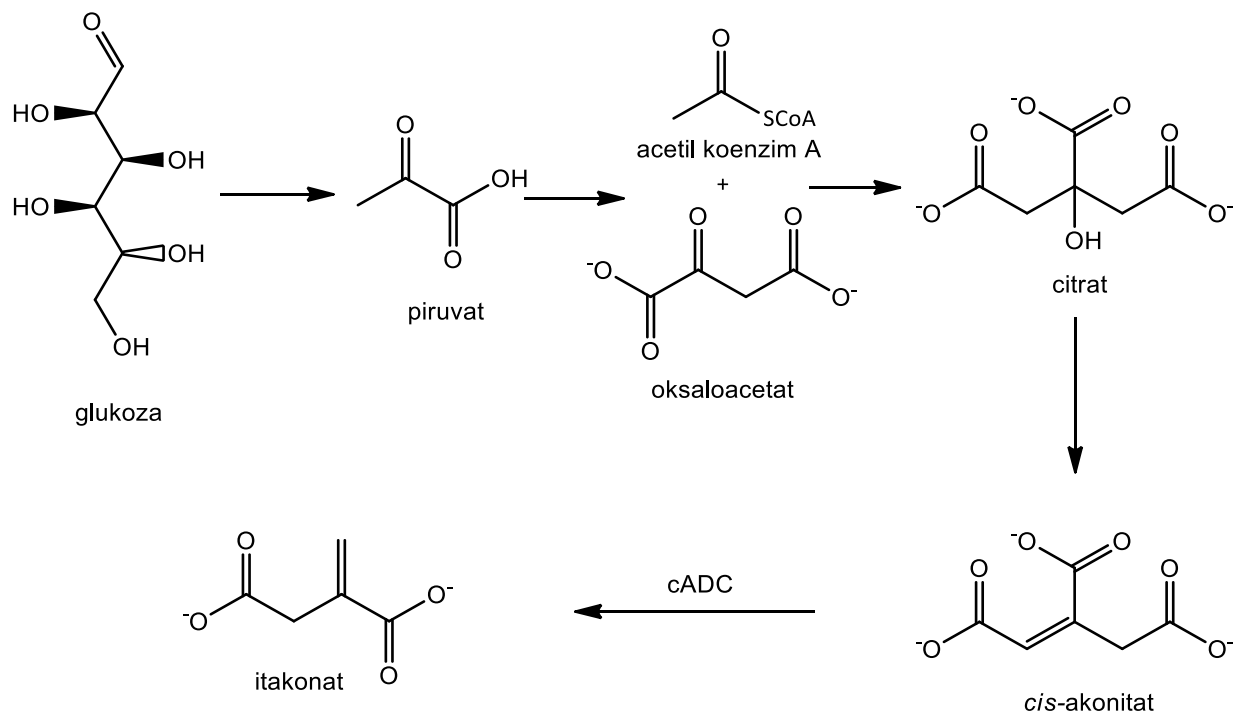
Iako se u komercijalne svrhe dobiva fermentacijom, itakonska kiselina se može dobiti suhom destilacijom limunske kiseline. Produkt te reakcije je anhidrid itakonske kiseline koji se onda hidrolizira u itakonsku kiselinu (Slika 1.) (Armarego, 2017).



Slika 1. Hidroliza anhidrida itakonske kiseline

### 1.3. Biološko djelovanje itakonske kiseline

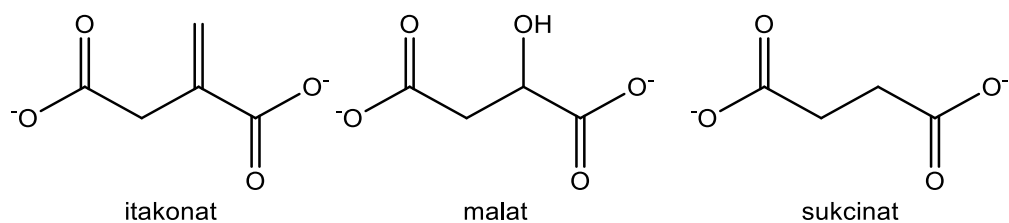
Kada je prvi put otkrivena smatralo se da je itakonska kiselina uključena u ciklus limunske kiseline pošto je prvi put dobivena iz citrata (Holmes, 1991), ali se kasnije utvrdilo da sudjeluje imunosnom odgovoru. U organizmu se sintetizira u makrofazima dekarboksilacijom *cis*-akonitata. Njezina ekspresija je kontrolirana genom *IRG1*, a stvaranje potiče niz proupalnih faktora poput LPS, interferona  $\gamma$  i liganda za *toll-like* receptore (Strelko i sur., 2011). U prisutnosti tih podražaja iz okoline aktivirani makrofazi povećavaju transkripciju *cis*-akonitat dekarboksilaze (*cADC*) 200 puta, a ona pretvara *cis*-akonitat u itakonat (Slika 2.).



Slika 2. Sinteza itakonata u stanici

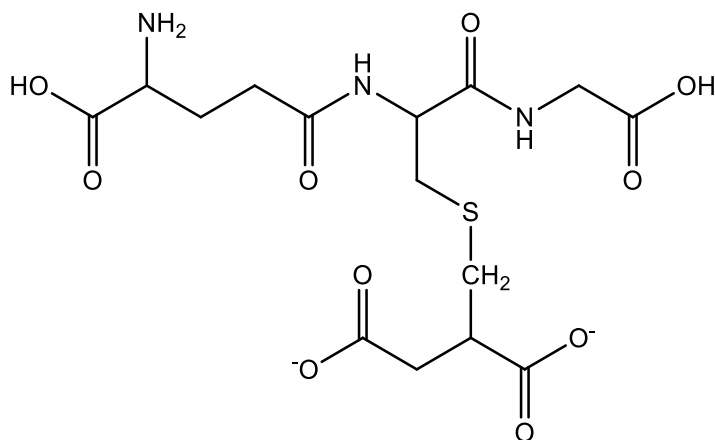
Njezina uloga u ljudima nije do kraja razjašnjena. U bakterijama inhibira baterijski enzim glioksilatnog ciklusa izocitrat liazu (IZL) (McFadden i Purohit, 1977). U uvjetima niske koncentracije glukoze bakterije ne mogu preživjeti bez IZL, a dokazano je i da itakonska kiselina može inhibirati propionil-CoA karboksilazu u IZL negativnim bakterijama (Berg i sur., 2002). Inhibicija propionil-CoA karboksilaze onemogućuje rast bakterija kojima je acetat glavni katabolit. Iako značajna, inhibicija ovih enzima nije terapijski korisna zato što bakterije mogu rasti uz itakonsku kiselinu u okolišu bogatom glukozom (Hammerer i sur., 2016).

Dokazano je i djelovanje itakonata na ljudske stanice. U mitohondrijima stanica imuloškog sustava djeluje kao kompetitivni inhibitor sukcinat dehidrogenaze, natječući se za isto mjesto sa sukcinatom i malatom (Slika 3.). Sukcinat dehidrogenaza je enzim Krebsova ciklusa koji pretvara sukcinat u fumarat, a pokazano je da inhibicija njegove aktivnosti modulira aktivnost makrofaga i smanjuje lučenje IL-6 i IL-12 (Lampropoulou i sur., 2016).



Slika 3. Strukture inhibitora sukcinat dehidrogenaze

Također je dokazano da itakonat može tvoriti adukt sa glutationom (Slika 4.), što zajedno sa aktivacijom *Nrf2* transkripcijskog faktora ima antioksidativni učinak u stanici (Bambouskova i sur., 2018). Ovo djelovanje je zapaženo za alkilne estere itakonske kiseline, pošto oni mogu difuzijom prolaziti stanične membrane. Sam itakonat ne prolazi membranu, ali može ući u stanicu preko dikarboksilatnog transportera (Mills i sur., 2018).

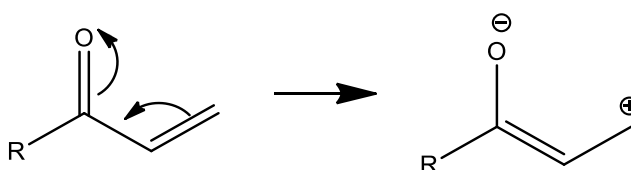


Slika 4. Adukt glutationa na itakonat

Povećana koncentracija itakonata je zapažena u rezidentnim makrofazima kod peritonealnih tumora. Makrofazi mogu djelovati imunoregulatorno i smanjiti širenje tumora, ali kod peritonealnih tumora je zapaženo da oni luče angiogenetske i druge faktore koji ubrzavaju rast i širenje tumora. Itakonat povećava oksidativnu fosforilaciju u makrofazima što povećava izlučivanje ROS-ova u alternativno aktiviranim makrofazima (Weiss i sur., 2018). ROS-ovi pospješuju rast i preživljavanje tumora aktivacijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B i MAPK signalnog puta (Liou i Storz, 2010).

## 1.4. Michaelovi akceptori

Spojevi koji imaju  $\alpha,\beta$  nezasićeni karbonil nazivaju se Michaelovi akceptori. Iako su alkeni nukleofilni kada se nalaze iza karbonila dolazi do delokalizacije  $\pi$  elektrona (Slika 5.) te spoj postaje elektrofilan. Zbog toga je ta grupa spojeva podložna direktnoj (1,2) adiciji na karbonil (Slika 7.) i konjugiranoj (Michaelovoj) adiciji (1,4) (Slika 6.). Koja od te dvije reakcije će se dogoditi ovisi o uvjetima reakcije, prirodi spoja i prirodi nukleofila.



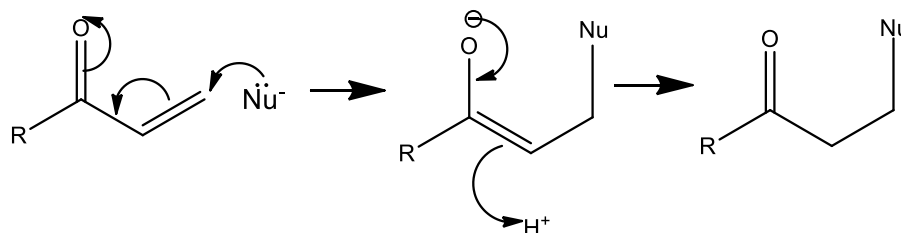
Slika 5. Prikaz delokalizacije elektrona Michaelovih akceptora

Direktna adicija je puno brža od konjugirane, ali je produkt adicije na karbonil reverzibilan za razliku od produkta Michaelove adicije – Michaelovog adukta. Ako se reakcija događa na nižoj temperaturi stvoriti će se više produkta koji brže nastaje (kinetički kontrolirana reakcija) dok ako ubrzamo tijek reakcije povećanjem temperature, nastati će više stabilnijeg produkta (termodinamički kontrolirana reakcija).

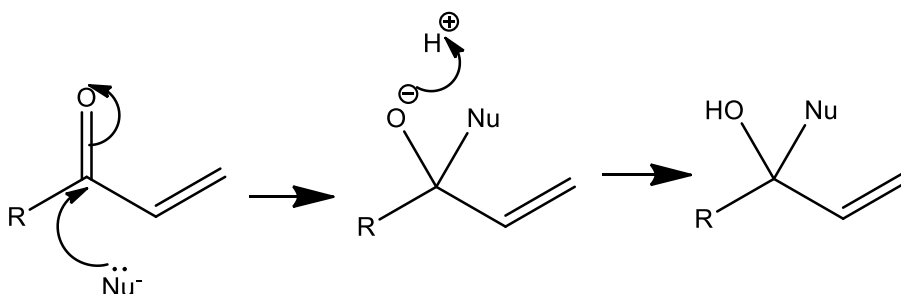
Vrsta reakcije ovisi i o spoju, reaktivniji spojevi sa boljom izlaznom skupinom na karbonilu bit će podložniji direktnoj adiciji, dok će oni manje reaktivni dati više 1,4 adiranog produkta. Najreaktivniji su  $\alpha,\beta$  nezasićeni kiselinski kloridi, iza njih su enali i enoni, a najmanje su reaktivni  $\alpha,\beta$  nezasićeni esteri i amidi.

Tijek reakcije ovisi i o vrsti nukleofila, privlačenje između elektrofila i nukleofila ovisi o dvije vrste interakcija: elektrostatskom privlačenju i preklapanju HOMO orbitala nukleofila i LUMO orbitala elektrofila. Tvrdi nukleofili su manje molekule sa elektronegativnim atomima i kod njih prevladava elektrostatsko privlačenje te obično ulaze u direktnu adiciju. Meki nukleofili imaju veće atome i kod njih do privlačenja dolazi zbog preklapanja orbitala te češće ulaze u Michaelove adicije (Clayden i sur., 2012).

Kao što se vidi iz strukture spoja itakonska kiselina je Michaelov akceptor. Njezina  $\alpha$ -metilenska skupina je konjugirana sa karboksilnom skupinom te može stvarati Michaelove adukte.



Slika 6. Mehanizam Michaelove adicije



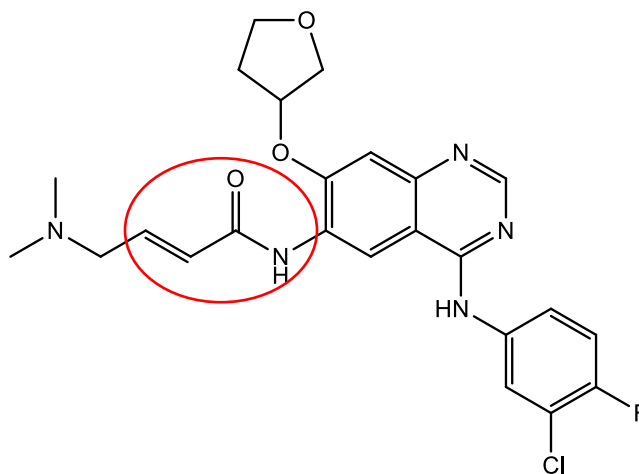
Slika 7. Mehanizam direktne adicije na karbonil

### 1.5. Michaelovi akceptori kao lijekovi

Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju na  $\alpha,\beta$  nezasićene karbonile mogu se vezati razni nukleofili, u ljudskom tijelu su posebno zanimljivi bočni lanci aminokiselina serina i cisteina. Pošto je Michealova reakcija ireverzibilna nakon vezanja lijeka na protein dolazi do trajne inaktivacije. Poseban problem predstavljaju toksični učinci neselektivnog vezanja na proteine i DNA (Schultz i Aptula, 2016), ali se oni mogu izbjeći modifikacijama oko farmakofora koje vode do povećanja selektivnosti Michaelovog akceptora prema željenom proteinu. Cilj svakog lijeka je postizanje što veće djelotvornosti, ali je potrebno zadržati selektivnost prema veznom mjestu ciljnog proteina. Stoga su Jackson i suradnici, 2017. istražili reaktivnost prema endogenim tiolima velikog broja  $\alpha,\beta$  nezasićenih karbonila. Pokazano je da osim vrste karbonila veliki utjecaj na selektivnost *in*

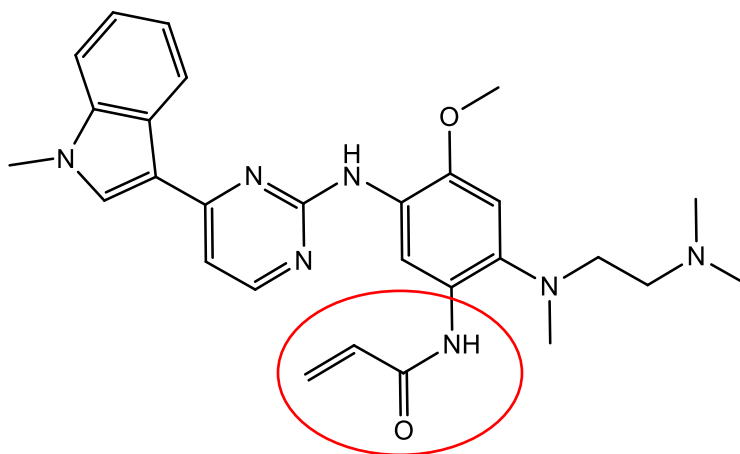
*vitro* ima ostatak molekule koji može sterički ili promjenom elektronegativnosti utjecati na adukt koji nastaje (Jackson i sur., 2017). Zbog svoje neselektivnosti Michaelovi akseptori su se do nedavno smatrali nepoželjnim strukturama za lijekove, no ova saznanja dovela su do razvoja lijekova koji u svojoj strukturi sadrže akrilamidnu skupinu koja je Michaelov akseptor.

U nekim tumorima dolazi do mutacije gena za receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) te su kod takvih tumora djelotvorni ihibitori EGFR-a (Paez i sur., 2004). EGFR je transmembranski protein koji spada u skupinu receptorskih tirozin kinaza iz familije ErbB. Nakon vezanja liganda na receptor, dolazi do njegove dimerizacije koja aktivira unutarstaničnu kinaznu domenu i daljnju signalizaciju. Prva generacija lijekova poput gefitiniba i erlotiniba je bila djelotvorna, ali većina pacijenata je razvila otpornost na terapiju unutar par mjeseci (Riely i sur., 2006). Ti podaci su pokazali potrebu za boljim lijekovima te je 2008. U pretkliničkim studijama zapažena sposobnost molekule s akrilamidnom skupinom da se veže na Cys 773 EGFR-a i Cys 805 HER2 (Li i sur., 2008). Stoga su daljnja istraživanja bila usmjerena na pronalazak novih, djelotvornijih lijekova. Jedan od njih, afatinib, koji u lancu na C6 kinazolinskog prstena ima Michaelov akseptor, kovalentno se i ireverzibilno veže na Cys-773 EGFR-a i Cys-805 HER-2, zbog čega se smatra lijekom druge generacije. Nakon kliničkih ispitivanja pokazano je da je stopa preživljavanja pacijenata sa tumorom nemalih stanica pluća značajno viša nego za pacijente na gefitinibu te je lijek afatinib (Slika 8.) uveden u terapiju i predstavlja lijek druge generacije inhibitora EGFR-a (Mitsudomi i Kobayashi, 2016). Prednost afatiniba nad prvom generacijom inhibitora tirozin kinaza je što se akrilamidnom skupinom dovodi do ireverzibilne inhibicije kinaze.



Slika 8. Struktura afatiniba, istaknuta akrilamidna skupina na koju se ireverzibilno veže tiolni ostatak cisteina

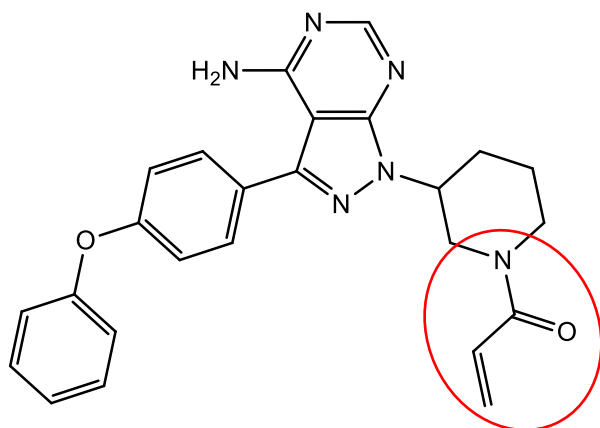
Kod nekih pacijenata sa karcinomom nemalih stanica pluća terapija afatinibom ili inhibitorima tirozin kinaze EGFR prve generacije (gefitinib i erlotinib) dovodi do mutacije na eksonu 20, pri čemu se treonin na položaju 790 zamjenjuje metioninom. Ta promjena mijenja strukturu veznog mjesta za ATP na koje se vežu inhibitori tirozin kinaze EGFR-a. Pacijenti s tom mutacijom postaju rezistentni na terapiju zbog smanjenog afiniteta vezanja lijeka (Tan i sur., 2015). Za pacijente s tom mutacijom razvijen je osimertinib (Slika 9.). On se veže za stanice sa T790M mutacijom tako što stvara adukt sa cisteinom 797 što dovodi do inhibicije stanične signalizacije preko RAS, RAF, MAPK signalnih puteva (Zhang, 2016).



Slika 9. Struktura osimertiniba, istaknuta akrilamidna skupina na koju se ireverzibilno veže tiolni ostatak cisteina

Ibrutinib je registriran 2013. godine. To je ireverzibilni inhibitor za Brutonovu tirozin kinazu (BTK) koji isto ima akrilamidnu skupinu u svojoj strukturi (Slika 10.) (Brown, 2013). BTK je potrebna za stanično signaliziranje i rast B limfocita, koji su promijenjeni i ne kontrolirano se dijele kod nekih malignih oboljenja (Parmar i sur., 2014). Ibrutinib ireverzibilnim vezanjem za cistein 481 BTK sprječava staničnu signalizaciju i uzrokuje smrt malignih B stanica (Bhatt i sur., 2014). Koristi se za liječenje limfoma plaštenih stanica, kronične limfocitne leukemije i Waldenströmове makroglobulinemije.





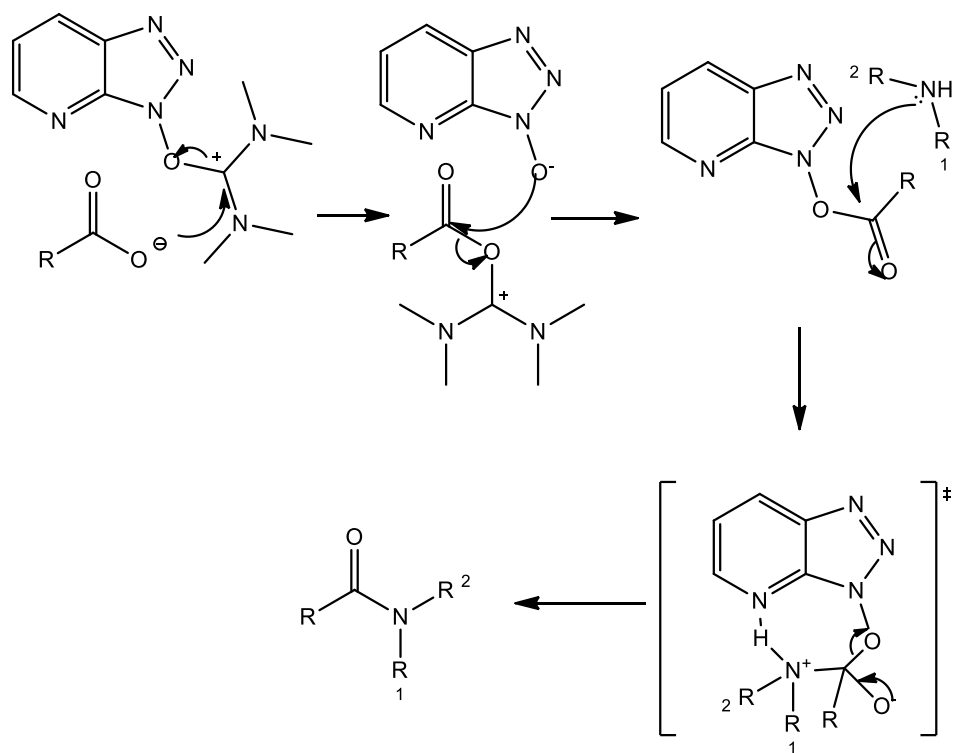
Slika 10. Struktura ibrutiniba, istaknuta akrilamidna skupina na koju se ireverzibilno veže tiolni ostatak cisteina

## 1.6. Sinteza amida *coupling* reakcijom

Za stvaranje amidnih veza dovoljno je pomiješati amin i karboksilnu kiselinu, ali ta reakcija je jako spora i neefikasna. Uzrok tome je loša izlazna skupina kod karboksilnih kiselina. Kako bi se riješio taj problem karboksilne kiseline se prevode u kiselinske kloride ili anhidride koji puno lakše stupaju u reakcije nukleofilne supstitucije (Clayden i sur., 2012). Kod manjih spojeva ova strategija nije problem dok kod većih molekula poput peptida predstavlja problem zbog velikog broja bočnih lanaca koji mogu stupiti u reakciju. Drugi problem je racemizacija peptida, do koje može doći zbog stvaranja enolatnog iona ili oksazolonskog intermedijera (El-Faham i Albericio, 2011). Stoga se za sintezu amida često koriste različiti *coupling* reagensi. Oni sadrže elektron odvlačeću skupinu koja se veže na karbonilni C atom i aktivira ga. Postoji mnogo skupina *coupling* reagensa, neki stvaraju stabilne međuprodukte poput aktiviranih estera ili su ti međuprodukti nestabilni te odmah stupaju u reakciju s nukleofilom. Neki od češće korištenih *coupling* reagensa su acilazoli, acilazidi, kiselinski halidi, fosfonijeve soli, uronijeve soli, orgaonofosfati, triazini, piridinski reagenski i drugi.

U ovom radu je korišten azabenzotriazol tetrametil uronij heksafluorofosfat (HATU) reagens. U prisutnosti Hünigove baze *N,N*-diizopropiletilamina (DIEA) deprotonirana karboksilna kiselina napada elektrofilni ugljikov atom na HATU. Nastali azabenzotriazolni anion napada aktiviranu kiselinu i stvara stabilniji *O*-azabenzotriazolni aktivni ester (Slika 11.). Nakon adicije amina na

karbonilnu skupinu stvara se tetraedarski međuprodukt koji je dodatno stabiliziran vodikovim vezama između protona na aminu i elektronskog para dušika iz piridinskog prstena (Carpino, 1993). Nastali međuprodukt nije stabilan te brzo dolazi do eliminacije azabenzotriazolnog prstena i do stvaranja konačnog produkta amida.



Slika 11. Mehanizam stvaranja amidne veze HATU *couplingom*

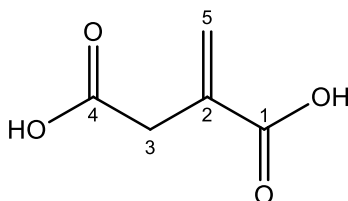
## 2. Obrazloženje teme

Cilj ovog rada bio je sinteza i karakterizacija novih derivata itakonske kiseline. U daljnjim istraživanjima koji prelaze okvire ovog rada sintetizirani spojevi bit će testirani na antivirusno i antiproliferativno djelovanje *in vitro*.

Itakonska kiselina predstavlja zanimljivu kemijsku strukturu zbog prisutnosti  $\alpha,\beta$  nezasićenog karbonila. Zbog njega može tvoriti adukte u fiziološkom okruženju adicijom tiolnih skupina cisteina različitih proteina-potencijalnih meta lijekova. Taj potencijal Michaelovih akceptora da se ireverzibilno vežu na proteine i inhibiraju njihovu funkciju predstavlja mehanizam djelovanja nekih lijekova za liječenje karcinoma nemalih stanica pluća sa mutacijom tirozin kinaze receptora za epidermalni faktor rasta (afatinib, osimertinib, neratinib i dakomitinib), te ibrutiniba za liječenje limfocitne leukemije (Jackson i sur., 2017).

Diamidi i 4-amidni derivati itakonske kiseline istraživani su kao potencijalni antiviroci (Sethy i sur., 2019). Istraživanje je pokazalo da imaju antivirusno djelovanje u mikromolarnim koncentracijama. Ova istraživanja bila su temelj za sintezu derivata itakonske kiseline opisanih u ovom radu.

U ovom radu je opisana sinteza i karakterizacija osam novih derivata itakonske kiseline. Sintetizirani spojevi na položaju 1 itakonske kiseline (Slika 12.) imaju amide s odabranim aromatskim aminima: 3-pikolilamin, 3-amino-5-fluoropiridin, 3-amino-4-kloropiridin, 5-metoksitriptamin, 3-(2-aminoetil)piridin 3-aminopiridin, 4-fluoranilin, 4-(trifluormetil)anilin i 3-(trifluormetil)anilin. Na položaju 4 svi derivati imaju metilni ester. Sintetiziranim spojevima računalno su predviđena fizikalno-kemijska svojstva i neki farmakokinetički parametri.



Slika 12. Itakonska kiselina

### 3. Materijali i metode

Tališta ( $t_r$ ) su određena na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F254 (Merck, Njemačka) kao nepokretna faza, te diklormetan/metanol (98:2, 95:5, 90:10), cikloheksan/etilacetat (3:1) i cikloheksan/etilacetat/metanol (3:1:0,5) kao pokretne faze.

Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Kemika, Hrvatska) i 0,040–0,063 mm (Merck, Njemačka), uz iste pokretne faze kao i u tankoslojnoj kromatografiji. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ( $\lambda = 254$  nm) i parama joda.

IR spektri snimljeni su na Paragon FT-IR spektrometru (Perkin Elmer, UK).

$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-400 (Bruker, Njemačka) kod 400 MHz za  $^1\text{H}$  i kod 101 MHz za  $^{13}\text{C}$  jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO- $d_6$  otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama od 5 mm. Kemijski pomaci dani su u ppm-u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard.

Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420).

4-monometil itakonat, HATU, 3-pikolilamin, 3-amino-5-fluoropiridin, 3-amino-4-kloropiridin, 5-metoksitriptamin, 3-(2-aminoetil)piridin i 3-aminopiridin nabavljeni su od tvrtke Tokyo Chemical Industry (Japan), a TEA, 4-fluoranilin, 4-(trifluormetil)anilin i 3-(trifluormetil)anilin od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD). Natrij klorid i natrij sulfat nabavljeni su od tvrtke Gram-mol (Hrvatska). DIEA je nabavljena od tvrtke Alfa Aesar (Njemačka). DMF je nabavljen od tvrtke Acros Organics (SAD).

Bezvodna otapala dobivena su sljedećim postupcima. Bezvodni toluen: toluen je ekstrahiran vodom, zatim je osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destilirana i čuvan nad natrijem. Bezvodni dimetilformamid (DMF): smjesa 1 L DMF-a i 100 mL bezvodnog toluena destilirana je, pri čemu prvo destilira azeotropna smjesa toluena i vode, a zatim čisti DMF. Čuvan je nad aktiviranim molekulskim sitima. Sve ostale kemikalije bile su *p.a.* čistoće.

### 3.1. Sinteza kiselinskog klorida monometil itakonata (2)

Otopini 0,100 g (0,69 mmol) monometil itakonata u bezvodnom toluenu dodani su 0,413g (3,47 mmol) tionil klorida te 3 kapi DMF-a. Reakcijska smjesa miješana je 30 min na s.t.. Višak tionil klorida uparen je pod sniženim tlakom. Zaostali tionil klorid uklonjen je naparavanjem suhim toluenom tri puta. Dobiveni kiselinski klorid monometil itakonata (2) korišten je u daljnjim reakcijama bez pročišćavanja.

### 3.2. Sinteza amidnih derivata monometil itakonata (3a-3f)

U otopinu 0,76 mmol odgovarajućeg amina i 0,69 mmol (0,070 g, 0,096 mL) TEA u suhom DCM-u dokapano je 0,69 mmol (0,112 g) kiselinskog klorida monometil itakonata (2) otopljenog u suhom DCM-u. Reakcijska smjesa miješana je 0,5-20 sati na s.t. Nakon završetka reakcije DCM je uparen pod sniženim tlakom, a produkt otopljen u etil acetatu te ekstrahiran vodom (3 × 30 mL). Vodeni slojevi su ekstrahirani DCM-om. Sakupljeni organski slojevi su sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni pod sniženim tlakom.

#### 3.2.1 Metil 3-(piridin-3-ilkarbamoil)but-3-enoat (3a)

Masa 3-aminopiridina: 0,072g

Vrijeme reakcije: 2 h

Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol 95:5. Dobiveni produkt **3a** je narančasta smola.

Iskorištenje: 0,085 g (55%)

MS (*m/z*) 221,1 (M+1)<sup>+</sup>

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3180, 3116, 3038, 2998, 2954, 2924, 2850, 1730, 1676, 1632, 1590, 1536, 1482, 1426, 1332, 1270, 1198, 1016, 942, 906, 848, 806, 748, 708, 662, 628  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 10,22 (s, 1H, 1'), 8,83 (d,  $J=2,6$  Hz, 1H, 3'), 8,28 (dd,  $J=4,7, 1,5$  Hz, 1H, 5'), 8,10–8,07 (m, 1H, 7'), 7,37–7,34 (m, 1H, 6'), 6,08 (s, 1H, 4<sup>a</sup>), 5,78 (s, 1H, 4<sup>b</sup>), 3,59 (s, 3H, 9), 3,43 (s, 2H, 5).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 171,50 (6), 166,61 (1), 144,88 (3), 142,07 (2'), 138,26 (5'), 136,12 (7'), 127,35 (4), 123,96 (3'), 120,90 (6'), 52,09 (9), 37,84 (5).

### 3.2.2 Metil 3-((5-fluoropiridin-3-il)karbamoil)but-3-enoat (3b)

Masa 3-amino-5-fluoropiridina: 0,085g

Vrijeme reakcije: 30 min

Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol 9:1. Dobiven je produkt **3b** kao svijetlo-žuta smola.

Iskorištenje: 0,045g (38%)

MS ( $m/z$ ) 239,2 ( $M+1$ )<sup>+</sup>

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3322, 3104, 3070, 3004, 2956, 2850, 2280, 1738, 1682, 1634, 1596, 1540, 1470, 1422, 1350, 1290, 1202, 1168, 1018, 942, 872, 802, 742, 698, 650, 532  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 10,48 (s, 1H, 1'), 8,70 (t,  $J = 1,8$  Hz, 1H, 3'), 8,30 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H, 5'), 8,11–8,07 (m, 1H, 7'), 6,10 (s, 1H, 4<sup>a</sup>), 5,82 (s, 1H, 4<sup>b</sup>), 3,60 (s, 3H, 9), 3,45 (s, 2H, 5).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 171,44 (6), 166,96 (1), 160,33 (6'), 157,81 (d,  $J = 252,9$  Hz, 3'), 138,05 (3), 137,40 (d,  $J = 6,2$  Hz, 5'), 132,39 (d,  $J = 22,6$  Hz, 2'), 124,53 (7'), 113,93 (d,  $J = 22,5$  Hz, 4), 52,12 (5), 37,74 (9).



### 3.2.3 Metil 3-(2-(piridin-3-il)etil)karbamoil)but-3-enoat (3c)

Masa 3-(2-aminoetil)piridina: 0,094g

Vrijeme reakcije: 45 min

Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol 9:1. Dobiveni produkt **3c** je smeđa smola.

Iskorištenje: 0,011 g (9%)

MS ( $m/z$ ) 249,2 ( $M+1$ )<sup>+</sup>

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3864, 3318, 3034, 2998, 2952, 2858, 1914, 1738, 1662, 1620, 1538, 1480, 1430, 1322, 1264, 1200, 1168, 1020, 938, 876, 840, 800, 748, 716, 632  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 8,42–8,40 (m, 2H, 5', 7'), 8,23 (t,  $J=5.7$  Hz, 1H, 1'), 7,62 (dt,  $J=7.8, 1.9$  Hz, 1H, 9'), 7,33–7,291 (m, 1H, 8'), 5,78 (s, 1H, 4<sup>a</sup>), 5,50 (s, 1H, 4<sup>b</sup>), 3,57 (s, 3H, 9), 3,36–3,32 (q,  $J=7.0$  Hz, 2H, 2'), 3,29 (s, 2H, 5), 2,77 (t,  $J=7.1$  Hz, 2H, 3').

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 171,47 (6), 167,03 (1), 150,34 (5'), 147,85 (7'), 138,43 (4'), 136,69 (3), 135,46 (9'), 123,87 (4), 121,80 (8'), 51,95(9), 40,55 (2'), 37,93 (5), 32,40 (3').

### 3.2.4 Metil 3-((4-fluorofenil)karbamoil)but-3-enoat (3d)

Masa 4-fluoranilina: 0,085g

Vrijeme reakcije: 1 h

Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol 98:2. Dobiveni produkt **3d** je narančasta smola.

Iskorištenje: 0,069 g (41%)

MS ( $m/z$ ) 260,1 ( $M+23$ )<sup>+</sup>

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3996, 3316, 3150, 3104, 3072, 3006, 2960, 1890, 1738, 1660, 1626, 1544, 1508, 1436, 1408, 1326, 1214, 1150, 1098, 1010, 934, 834, 780, 746, 674, 626, 570, 518  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 10,06 (s, 1H, 1'), 7,70–7,67 (m, 2H, 3', 7'), 7,17–7,13 (m, 2H, 4', 6'), 6,03 (s, 1H, 4<sup>a</sup>), 5,72 (s, 1H, 4<sup>b</sup>), 3,59 (s, 3H, 9), 3,41 (s, 2H, 5).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 171,54 (6), 166,07 (1), 159,80, 157,42(d,  $J = 240,1$  Hz, 5'), 138,56 (3), 135,84 (d,  $J = 2,6$  Hz, 2'), 135,82 (7'), 123,29 (4), 122,19 (d,  $J = 7,7$  Hz, 3'), 115,49 (d,  $J = 22,1$  Hz, 6'), 52,05 (9), 37,92 (5).

### 3.2.5 Metil 3-((4-(trifluorometil)fenil)karbamoil)but-3-enoat (3e)

Masa 4-(trifluorometil)anilina: 0,124 g

Vrijeme reakcije: 20 h

Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol 98:2, cikloheksan/etil acetat 3:1 i cikloheksan/etil acetat/metanol 3:1:0,5.

Dobiven bijeli talog **3e** je rastrljan u petroleteru.

Iskorištenje: 0,050 g (25%)

$t_r$  101-105 °C

MS ( $m/z$ ) 310,2 ( $M+23$ )<sup>+</sup>

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3372, 3204, 3068, 3008, 2960, 1722, 1686, 1636, 1604, 1548, 1444, 1412, 1330, 1254, 1214, 1166, 1112, 1066, 1014, 942, 902, 854, 800, 744, 664, 628, 594, 508  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 10,35 (s, 1H, 1'), 7,91 (d,  $J=8,2$  Hz, 2H, 3', 7'), 7,69 (d,  $J=8,1$  Hz, 2H, 4', 6'), 6,09 (s, 1H, 4<sup>a</sup>), 5,79 (s, 1H, 4<sup>b</sup>), 3,60 (s, 3H, 9), 3,44 (s, 2H, 5).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 171,50 (6), 166,67 (1), 143,11 (2'), 138,32 (3), 128,29 – 120,85 (q,  $J = 271.3$  Hz, 8'), 126,35 – 126,30 (4', 6'), 122,98 – 123,93 (q,  $J = 31.9$  Hz, 5'), 124,13 (4), 120,23 (3', 7'), 52,08 (9), 37,85 (5).

### 3.2.6 Metil 3-((3-(trifluorometil)fenil)karbamoil)but-3-enoat (3f)

Masa 3-(trifluorometil)anilina: 0,124g

Vrijeme reakcije: 20 h

Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol 98:2 i rastrljavanjem u petroleteru uz dodatak nekoliko kapi etera. Konačni produkt **3f** je bijeli talog.

Iskorištenje: 0,027 g (14%)

$t_r$  61-62 °C

MS ( $m/z$ ) 310,1 (M+23)<sup>+</sup>

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3380, 3118, 2960, 1718, 1684, 1566, 1496, 1442, 1394, 1340, 1216, 1170, 1114, 1068, 1018, 950, 892, 812, 746, 702, 628, 526  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 10,32 (s, 1H, 1'), 8,15 (s, 1H, 7'), 7,94 (d,  $J=8,6$  Hz, 1H, 3'), 7,56 (t,  $J=7,7$  Hz, 1H, 4'), 7,42 (d,  $J=7,8$  Hz, 1H, 5'), 6,09 (s, 1H, 4<sup>a</sup>), 5,78 (s, 1H, 4<sup>b</sup>), 3,60 (s, 3H, 9), 3,44 (s, 2H, 5).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 171,50 (6), 166,60 (1), 140,26 (3), 138,30 (2'), 130,31 – 128,26 (q,  $J = 31,5$  Hz, 6'), 129,95 (4'), 129,64 (3'), 128,20 – 120,00 (q,  $J = 272,2$  Hz, 8'), 123,87 (4), 120,22 (5'), 116,41 (7'), 52,08 (9), 37,83 (5).

### 3.3. Sinteza amidnih derivata monometil itakonata HATU *couplingom* (3g-h)

U otopinu 0,05 g (0,35 mmol) monometil itakonata u DCM dodano je 0,09 g (0,7 mmol) DIEA. Nakon 15 min miješanja na s.t. dodano je 0,38 mmol odgovarajućeg amina. Reakcijska smjesa miješana je 1 h na s.t., te je uparena do suha pod sniženim tlakom. Reakcijska smjesa otopljena je u etil acetatu te je ekstrahirana vodom (3 × 30 mL). Vodeni slojevi su dodatno ekstrahirani DCM-om. Svi organski slojevi su osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom i upareni pod sniženim

tlakom. Sirovi produkt pročišćen kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu sastava diklormetan/metanol 95:5.

### 3.3.1 Metil 3-((piridin-3-ilmetil)karbamoil)but-3-enoat (3g)

Masa 3-pikolilamina: 0,041g

Vrijeme reakcije: 1 h

Dobiveni produkt **3g** je prozirno ulje.

Iskorištenje: 0,040 g (49%)

MS ( $m/z$ ) 235,2 ( $M+1$ )<sup>+</sup>

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3898, 3834, 3746, 3584, 3318, 3030, 2918, 2850, 2600, 2358, 1914, 1732, 1664, 1538, 1430, 1320, 1262, 1148, 1010, 934, 838, 708, 626  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 8,74 (t,  $J=6,0$  Hz, 1H, 1'), 8,42–8,51 (m, 2H, 4', 6'), 7,64 (dt,  $J=7,8, 2,0$  Hz, 1H, 8'), 7,36–7,33 (m, 1H, 7'), 5,89 (s, 1H, 4<sup>a</sup>), 5,57 (s, 1H, 4<sup>b</sup>), 4,34 (d,  $J=6,0$  Hz, 2H, 2'), 3,56 (s, 3H, 9), 3,32 (s, 2H, 5).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 171,48 (6), 167,24 (1), 149,10 (4'), 148,47 (6'), 138,25 (3), 135,51 (3'), 135,33 (8'), 123,86 (4), 122,29 (7'), 51,97 (9), 40,49 (2'), 37,99 (5).

### 3.3.2 Metil 3-((2-(5-metoksi-1H-indol-3-il)etil)karbamoil)but-3-enoat (3h)

Masa 5-metoksitriptamina: 0,073g

Vrijeme reakcije: 1 h

Dobiveni produkt **3h** je žuto ulje.

Iskorištenje: 0,060 g (54%)

MS ( $m/z$ ) 339,22 ( $M+23$ )<sup>+</sup>

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3996, 3322, 3054, 2948, 2720, 2558, 2362, 1860, 1738, 1660, 1620, 1536, 1486, 1438, 1322, 1264, 1216, 1172, 1072, 1028, 926, 800, 736, 702, 638, 556  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 10,64 (s, 1H, 6'), 8,24 (t,  $J=5,7$  Hz, 1H, 1'), 7,22 (d,  $J=8,8$  Hz, 1H, 5'), 7,10 (d,  $J=2,4$  Hz, 1H, 12'), 7,03 (d,  $J=2,4$  Hz, 1H, 9'), 6,71 (dd,  $J=8,8, 2,4$  Hz, 1H, 11'), 5,83 (s, 1H, 4<sup>a</sup>), 5,51 (s, 1H, 4<sup>b</sup>), 3,76 (s, 3H, 9), 3,57 (s, 3H, 14), 3,39–3,34 (m, 2H, 2'), 3,31 (s, 2H, 5), 2,82 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H, 3').

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 171,55 (6), 166,88 (1), 153,44 (1'0), 138,62 (3), 131,82 (7'), 128,02 (8'), 123,74 (4), 121,65 (5'), 112,45 (11'), 112,10 (4'), 111,49 (12'), 100,59 (9'), 55,80 (14), 51,93 (9), 38,71 (2'), 38,00 (5), 25,53 (3').

## 4. Rezultati i rasprava

Ciljni spojevi ovog rada su 1-supstituirani amidni derivati monometilnog estera itakonske kiseline te će se dalje u sklopu istraživanja Zavoda za farmaceutsku kemiju testirati njihov antitumorski i antivirusni učinak. Sintetizirano je 8 derivata koji dosada nisu opisani u literaturi. Četiri derivata u svojoj strukturi sadrže piridinski (**3a,3b,3c,3g**), tri derivata benzenski (**3d,3e,3f**) i jedan derivat indolski prsten (**3h**).

Itakonska kiselina kao i novosintetizirani derivati sadrže  $\alpha,\beta$  nezasićeni karbonil koji je prisutan u antitumorskim lijekovima u primjeni poput *afatiniba*, *ibrutiniba* ili *osimertiniba* (Jackson i sur., 2017).

Derivati **3a-f** sintetizirani su iz kiselinskog klorida monometil itakonata (**2**) i odgovarajućeg amina. Manje bazični amini nisu bili dovoljno reaktivni da stupe u reakciju HATU *couplinga* te su ti derivati sintetizirani iz kiselinskog klorida MMI (**2**) koji je dobiven u reakciji MMI i tionil klorida. Kiselinski klorid **2** je u reakciji nukleofilne supstitucije reagirao s odgovarajućim aminom u prisutnosti TEA te su tako dobiveni konačni produkti amidi **3a-f**.

U sintezi amida u prisutnosti HATU (derivati **3g** i **3h**), MMI je aktiviran tako da je preveden u *O*-azabenzotriazolni ester dodatkom HATU reagensa. Na ester je dodan odgovarajući amin te su dobiveni konačni amidni produkti. U obje reakcije je prije samog amina dodana i baza diizopropiletil amin (DIEA) čija je uloga aktivacija karboksilne kiseline. Tek nakon aktivacije u reakcijsku smjesu dodaje se odgovarajući amin. Reakcije su bile brze (1h), te su iskorištenja bila u rasponu 49-54%.

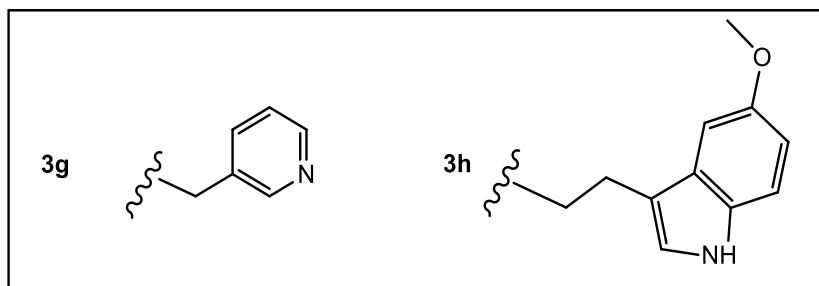
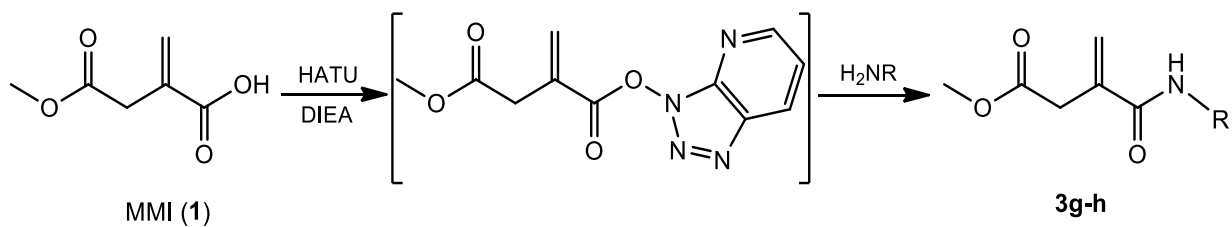
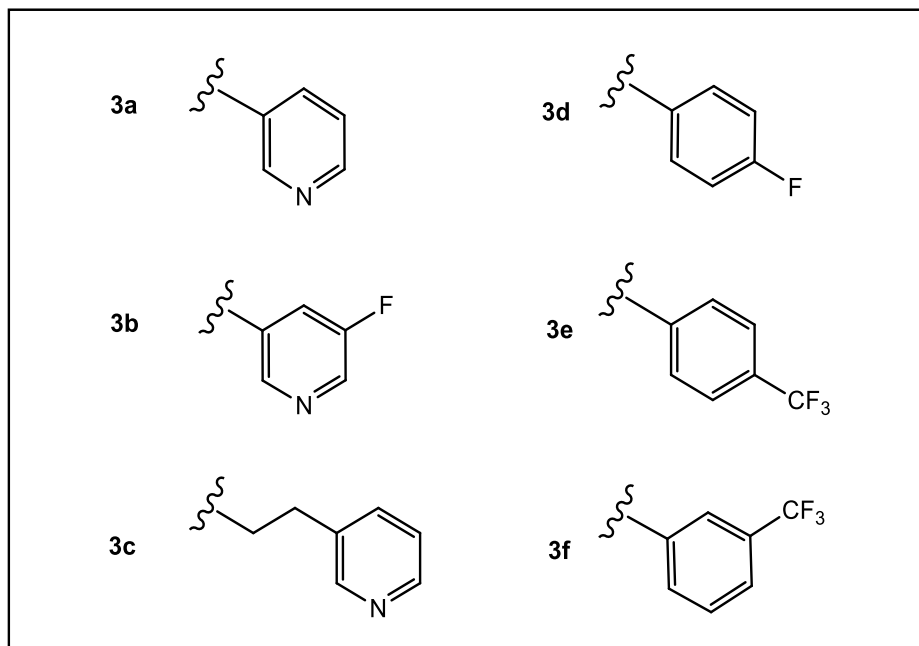
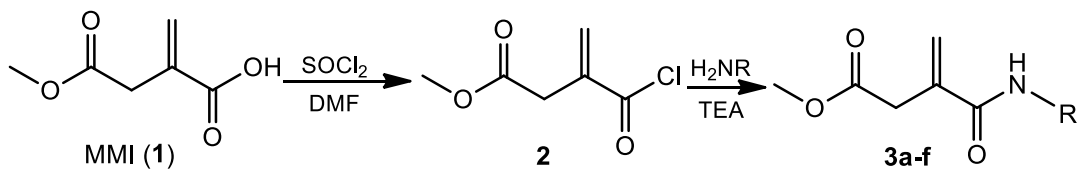
Dobiveni produkti odvojeni su od suviška amina i nusprodukta reakcije ekstrakcijom u etil acetatu i vodi. Neki derivati (**3b** i **3c**) su zbog topljivosti u vodi djelomično prelazili u vodenu fazu. Oni su dodatno ekstrahirani iz vodenog sloja DCM-om te su organske frakcije spojene kako bi se povećalo iskorištenje. Svi derivati dodatno su pročišćeni kromatografijom na koloni. Nakon pročišćavanja novosintetizirani spojevi karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, MS i za krutine talište). Dobiveni rezultati strukturne karakterizacije derivata prikazani su u Tablicama 2-4.

Dobiveni rezultati se podudaraju sa predloženim strukturama spojeva. Na  $^{13}\text{C}$  NMR spektru vide se signali za karbonilni atom esterske skupine sa pomakom od 171,48-171,56 ppm i signal od amidnog karbonila na 166,03-167,07 ppm. Na  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima fluoriranih derivata **3b, 3d, 3e,**

i **3f** jasno je vidljivo sprezanje između atoma ugljika i fluora, dublet za derivate koji sadrže atom fluora (**3b**, **3d**) i kvartet za derivate koji sadrže  $\text{CF}_3$  (**3e**, **3f**).

Na  $^1\text{H}$  NMR spektru vidljiv je karakteristični signal NH amidne skupine derivata **3a**, **3b**, **3d**, **3e**, **3f** i **3h** na 10,05-10,65 ppm. Za derivate **3c** i **3g** signali su na 8,42 ppm i 8,75 ppm. Također su u spektrima svih derivata signali dva vodika egzometilenske skupine vidljiva kao dva singletna signala na 5,8 i 6,3 ppm.



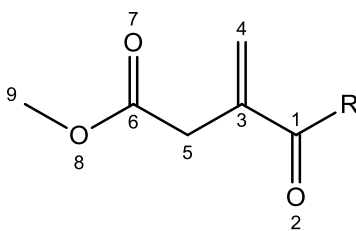


Slika 13. Sinteza derivata itakonske kiseline

Tablica 2. Analitički podaci za amidne derivate monometil itakonata (**3a-h**)

spoj	$t_f$ (°C)	Molekulska formula	$M_r$	MS ( $m/z$ )	IR (KBr) $\nu_{\max}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>3a</b>	-	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$	220,22	221,1 ( $\text{M}+1$ ) <sup>+</sup>	3180, 3116, 3038, 2998, 2954, 2924, 2850, 1730, 1676, 1632, 1590, 1536, 1482, 1426, 1332, 1270, 1198, 1016, 942, 906, 848, 806, 748, 708, 662, 628
<b>3b</b>	-	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_3$	238,22	239,2 ( $\text{M}+1$ ) <sup>+</sup>	3322, 3104, 3070, 3004, 2956, 2850, 2280, 1738, 1682, 1634, 1596, 1540, 1470, 1422, 1350, 1290, 1202, 1168, 1018, 942, 872, 802, 742, 698, 650, 532
<b>3c</b>	-	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$	248,28	249,2 ( $\text{M}+1$ ) <sup>+</sup>	3864, 3318, 3034, 2998, 2952, 2858, 1914, 1738, 1662, 1620, 1538, 1480, 1430, 1322, 1264, 1200, 1168, 1020, 938, 876, 840, 800, 748, 716, 632
<b>3d</b>	-	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{FNO}_3$	237,23	260,1 ( $\text{M}+23$ ) <sup>+</sup>	3996, 3316, 3150, 3104, 3072, 3006, 2960, 1890, 1738, 1660, 1626, 1544, 1508, 1436, 1408, 1326, 1214, 1150, 1098, 1010, 934, 834, 780, 746, 674, 626, 570, 518
<b>3e</b>	101- 105	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_3$	287,23	310,2 ( $\text{M}+23$ ) <sup>+</sup>	3372, 3204, 3068, 3008, 2960, 1722, 1686, 1636, 1604, 1548, 1444, 1412, 1330, 1254, 1214, 1166, 1112, 1066, 1014, 942, 902, 854, 800, 744, 664, 628, 594, 508
<b>3f</b>	61- 62	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_3$	287,23	310,1 ( $\text{M}+23$ ) <sup>+</sup>	3380, 3118, 2960, 1718, 1684, 1566, 1496, 1442, 1394, 1340, 1216, 1170, 1114, 1068, 1018, 950, 892, 812, 746, 702, 628, 526
<b>3g</b>	-	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$	234,25	235,2 ( $\text{M}+1$ ) <sup>+</sup>	3898, 3834, 3746, 3584, 3318, 3030, 2918, 2850, 2600, 2358, 1914, 1732, 1664, 1538, 1430, 1320, 1262, 1148, 1010, 934, 838, 708, 626
<b>3h</b>	-	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$	316,35	339,2 ( $\text{M}+23$ ) <sup>+</sup>	3996, 3322, 3054, 2948, 2720, 2558, 2362, 1860, 1738, 1660, 1620, 1536, 1486, 1438, 1322, 1264, 1216, 1172, 1072, 1028, 926, 800, 736, 702, 638, 556

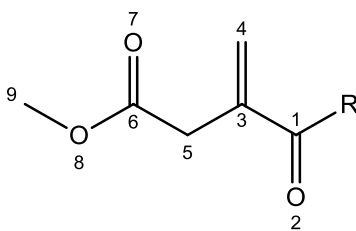
Tablica 3. Pomaci u  $^1\text{H}$  NMR spektru za amidne deriviate monometil itakonata (**3a-h**)



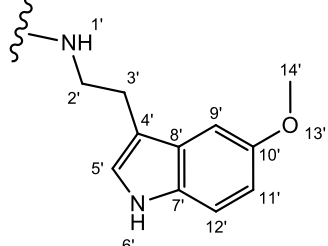
spoj	R	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm)
<b>3a</b>		10,22 (s, 1H, 1'), 8,83 (d, $J=2,6$ Hz, 1H, 3'), 8,28 (dd, $J=4,7, 1,5$ Hz, 1H, 5'), 8,10–8,07 (m, 1H, 7'), 7,37–7,34 (m, 1H, 6'), 6,08 (s, 1H, 4 <sup>a</sup> ), 5,78 (s, 1H, 4 <sup>b</sup> ), 3,59 (s, 3H, 9), 3,43 (s, 2H, 5).
<b>3b</b>		10,48 (s, 1H, 1'), 8,70 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H, 3'), 8,30 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H, 5'), 8,11–8,07 (m, 1H, 7'), 6,10 (s, 1H, 4 <sup>a</sup> ), 5,82 (s, 1H, 4 <sup>b</sup> ), 3,60 (s, 3H, 9), 3,45 (s, 2H, 5).
<b>3c</b>		8,42–8,40 (m, 2H, 5', 7'), 8,23 (t, $J=5,7$ Hz, 1H, 1'), 7,62 (dt, $J=7,8, 1,9$ Hz, 1H, 9'), 7,33–7,291 (m, 1H, 8'), 5,78 (s, 1H, 4 <sup>a</sup> ), 5,50 (s, 1H, 4 <sup>b</sup> ), 3,57 (s, 3H, 9), 3,36–3,32 (q, $J=7,0$ Hz, 2H, 2'), 3,29 (s, 2H, 5), 2,77 (t, $J=7,1$ Hz, 2H, 3').
<b>3d</b>		10,06 (s, 1H, 1'), 7,70–7,67 (m, 2H, 3', 7'), 7,17–7,13 (m, 2H, 4', 6'), 6,03 (s, 1H, 4 <sup>a</sup> ), 5,72 (s, 1H, 4 <sup>b</sup> ), 3,59 (s, 3H, 9), 3,41 (s, 2H, 5).
<b>3e</b>		10,35 (s, 1H, 1'), 7,91 (d, $J=8,2$ Hz, 2H, 3', 7'), 7,69 (d, $J=8,1$ Hz, 2H, 4', 6'), 6,09 (s, 1H, 4 <sup>a</sup> ), 5,79 (s, 1H, 4 <sup>b</sup> ), 3,60 (s, 3H, 9), 3,44 (s, 2H, 5).
<b>3f</b>		10,32 (s, 1H, 1'), 8,15 (s, 1H, 7'), 7,94 (d, $J=8,6$ Hz, 1H, 3'), 7,56 (t, $J=7,7$ Hz, 1H, 4'), 7,42 (d, $J=7,8$ Hz, 1H, 5'), 6,09 (s, 1H, 4 <sup>a</sup> ), 5,78 (s, 1H, 4 <sup>b</sup> ), 3,60 (s, 3H, 9), 3,44 (s, 2H, 5).
<b>3g</b>		8,74 (t, $J=6,0$ Hz, 1H, 1'), 8,42–8,51 (m, 2H, 4', 6'), 7,64 (dt, $J=7,8, 2,0$ Hz, 1H, 8'), 7,36–7,33 (m, 1H, 7'), 5,89 (s, 1H, 4 <sup>a</sup> ), 5,57 (s, 1H, 4 <sup>b</sup> ), 4,34 (d, $J=6,0$ Hz, 2H, 2'), 3,56 (s, 3H, 9), 3,32 (s, 2H, 5).

<p><b>3h</b></p>		<p>10,64 (s, 1H, 6'), 8,24 (t, <math>J=5,7</math> Hz, 1H, 1'), 7,22 (d, <math>J=8,8</math> Hz, 1H, 5'), 7,10 (d, <math>J=2,4</math> Hz, 1H, 12'), 7,03 (d, <math>J=2,4</math> Hz, 1H, 9'), 6,71 (dd, <math>J=8,8, 2,4</math> Hz, 1H, 11'), 5,83 (s, 1H, 4<sup>a</sup>), 5,51 (s, 1H, 4<sup>b</sup>), 3,76 (s, 3H, 9), 3,57 (s, 3H, 14), 3,39–3,34 (m, 2H, 2'), 3,31 (s, 2H, 5), 2,82 (t, <math>J=7,5</math> Hz, 2H, 3').</p>
------------------	--	--

Tablica 4. Pomaci u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru za amidne derivate monometil itakonata(**3a-h**)



spoj	R	$^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm)
<b>3a</b>		171,50 (6), 166,61 (1), 144,88 (3), 142,07 (2'), 138,26 (5'), 136,12 (7'), 127,35 (4), 123,96 (3'), 120,90 (6'), 52,09 (9), 37,84 (5).
<b>3b</b>		171,44 (6), 166,96 (1), 160,33 (6'), 157,81 (d, $J = 252.9$ Hz, 3'), 138,05 (3), 137,40 (d, $J = 6.2$ Hz, 5'), 132,39 (d, $J = 22,6$ Hz, 2'), 124,53 (7'), 113,93 (d, $J = 22,5$ Hz, 4), 52,12 (9), 37,74 (5).
<b>3c</b>		171,47 (6), 167,03 (1), 150,34 (5'), 147,85 (7'), 138,43 (4'), 136,69 (3), 135,46 (9'), 123,87 (4), 121,80 (8'), 51,95(9), 40,55 (2'), 37,93 (5), 32,40 (3').
<b>3d</b>		171,54 (6), 166,07 (1), 159,80, 157,42(d, $J = 240,1$ Hz, 5'), 138,56 (3), 135,84 (d, $J = 2,6$ Hz, 2'), 135,82 (7'), 123,29 (4), 122,19 (d, $J = 7,7$ Hz, 3'), 115,49 (d, $J = 22,1$ Hz, 6'), 52,05 (9), 37,92 (5).
<b>3e</b>		171,50 (6), 166,67 (1), 143,11 (2'), 138,32 (3), 128,29-120,85 (q, $J = 271.3$ Hz, 8'), 126,35 – 126,30 (4', 6'), 122,98 – 123,93 (q, $J = 31.9$ Hz, 5'), 124,13 (4), 120,23 (3', 7'), 52,08 (9), 37,85 (5).
<b>3f</b>		171,50 (6), 166,60 (1), 140,26 (3), 138,30 (2'), 130,31 – 128,26 (q, $J = 31,5$ Hz, 6'), 129,95 (4'), 129,64 (3'), 128,20 – 120,00 (q, $J = 272,2$ Hz, 8'), 123,87 (4), 120,22 (5'), 116,41 (7'), 52,08 (9), 37,83 (5).
<b>3g</b>		171,48 (6), 167,24 (1), 149,10 (4'), 148,47 (6'), 138,25 (3), 135,51 (3'), 135,33 (8'), 123,86 (4), 122,29 (7'), 51,97 (9), 40,49 (2'), 37,99 (5).

<p><b>3h</b></p>		<p>171,55 (6), 166,88 (1), 153,44 (1'0), 138,62 (3), 131,82 (7'), 128,02 (8'), 123,74 (4), 121,65 (5'), 112,45 (11'), 112,10 (4'), 111,49 (12'), 100,59 (9'), 55,80 (14), 51,93 (9), 38,71 (2'), 38,00 (5), 25,53 (3').</p>
------------------	---	---

Da bi se predvidjela farmakokinetička svojstva novosintetiziranih molekula, izračunati su molekularni deskriptori pomoću besplatnog *web*-alata SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) te su uspoređeni sa različitim setovima pravila koja predviđaju potencijal određene molekule da se koristi kao lijek (*drug-likeness*). Ta pravila uključuju različite deskriptore fizikalno-kemijskih svojstava molekula poput: molekulske mase, lipofilnosti molekule, broja aromatskih ili hetero atoma, udjela  $sp^3$  hibridiziranih atoma ili broja atoma koji su donori ili akceptori vodikove veze. Dobra farmakokinetička svojstva su nužna kako bi određena molekula postala lijek. Osim samog afiniteta vezanja za metu, potrebna je dovoljna koncentracija lijeka na mjestu djelovanja kako bi bio učinkovit (Rizk i sur., 2017).

Prvi set pravila je postavio Lipinski. Ona traže da potencijalna molekula ima molekularnu masu manju od 500,  $\log P < 5$ , broj donora vodikovih veza  $< 5$  i broj akceptora vodikovih veza  $< 10$  (Lipinski i sur., 2001). Za molekule koje ne zadovoljavaju te uvjete predviđa se loša oralna bioraspoloživost. Kako bi se povećala preciznost modela razvijeni su drugi setovi pravila koja koriste nešto drugačije deskriptore. U ovom radu su novosintetizirani spojevi uspoređeni sa: Lipinskijevim, Eganovim, Mueggovim, Veberovim i Ghoesovim pravilima.

Tablica 5. Pregled parametara za Lipinskijeva pravila izračunatih na SwissADME

Spoj	$M_r$ ( $<500$ )	$\log P$ ( $<5$ )	Broj donora vodikove veze ( $<5$ )	Broj akceptora vodikove veze ( $<10$ )	Lipinskijeva pravila
<b>3a</b>	220.22	0.90	1	4	4/4
<b>3b</b>	238.22	1.25	1	5	4/4
<b>3c</b>	248.28	1.21	1	4	4/4
<b>3d</b>	237.23	2.05	1	4	4/4
<b>3e</b>	287.23	2.81	1	6	4/4
<b>3f</b>	287.23	2.88	1	6	4/4
<b>3g</b>	234.25	0.97	1	4	4/4
<b>3h</b>	316.35	2.19	2	4	4/4

Drugi set pravila je postavio Muegge, on je proširio broj parametara tako da je na Lipinskijeva pravila dodao uvjet ukupne polarne površine ( $< 150$ ), maksimalnog broja prstena u strukturi ( $< 7$ ), minimalnog broja ugljikovih ( $> 4$ ) i heteroatoma ( $> 1$ ) te maksimalnog broja rotirajućih veza ( $< 15$ ) (Muegge, 2002).

Tablica 6. Pregled parametara za Mueggeova pravila izračunatih na SwissADME

Spoj	$M_r$ (200-600)	$\log P$ (-2-5)	TPSA/ $\text{Å}^2$ ( $<150$ )	Broj prstena ( $<7$ )	Broj ugljikovih atoma ( $>4$ )
<b>3a</b>	220.22	0.90	68.29	1	11
<b>3b</b>	238.22	1.25	68.29	1	11
<b>3c</b>	248.28	1.21	68.29	1	13
<b>3d</b>	237.23	2.05	55.40	1	12
<b>3e</b>	287.23	2.81	55.40	1	13
<b>3f</b>	287.23	2.88	55.40	1	13
<b>3g</b>	234.25	0.97	68.29	1	12
<b>3h</b>	316.35	2.19	80.42	2	17

Spoj	Broj heteroatoma (>1)	Broj rotirajućih veza (<15)	Broj akceptora vodikovih veza (<10)	Broj donora vodikovih veza (<5)	Mueggeova pravila
<b>3a</b>	5	6	4	1	9/9
<b>3b</b>	6	6	5	1	9/9
<b>3c</b>	5	8	4	1	9/9
<b>3d</b>	5	6	4	1	9/9
<b>3e</b>	7	7	6	1	9/9
<b>3f</b>	7	7	6	1	9/9
<b>3g</b>	5	7	4	1	9/9
<b>3h</b>	6	9	4	2	9/9

Treći set pravila postavio je Veber. U njima je smanjen utjecaj molekulske mase, slično kao i u Eganovim pravilima, prati se polarnost molekule. Pošto je zapaženo da velik broj lijekova prolazi membrane pomoću transportnih proteina, dodan je parametar rigidnosti molekule za kojeg je izračunato da korelira sa afinitetom za iste. Uvjeti su broj rotirajućih veza (< 10) i TPSA (< 140). (Veber i sur., 2002).

Tablica 7. Pregled parametara za Veberova pravila izračunatih na SwissADME

Spoj	Broj rotirajućih veza (< 10)	Zbroj donora i akceptora vodikove veze	TPSA/Å <sup>2</sup> (< 140)	Veberova pravila
<b>3a</b>	6	5	68.29	2/2
<b>3b</b>	6	6	68.29	2/2
<b>3c</b>	8	5	68.29	2/2
<b>3d</b>	6	5	55.40	2/2
<b>3e</b>	7	7	55.40	2/2
<b>3f</b>	7	7	55.40	2/2
<b>3g</b>	7	5	68.29	2/2
<b>3h</b>	9	6	80.42	2/2

Četvrti set pravila koja smo provjerili je postavio Ghose. Statističkom obradom podataka za sedam najčešće korištenih klasa lijekova dobiveni su intervali za svaki deskriptor te je zaključeno da za većinu postojećih lijekova vrijedi da im je molekulska masa u rasponu 160 – 480, logP -0,4 – 5,6, molarna refraktivnost 40 – 130, a broj atoma u molekuli 20 – 70 (Ghose i sur., 1999).

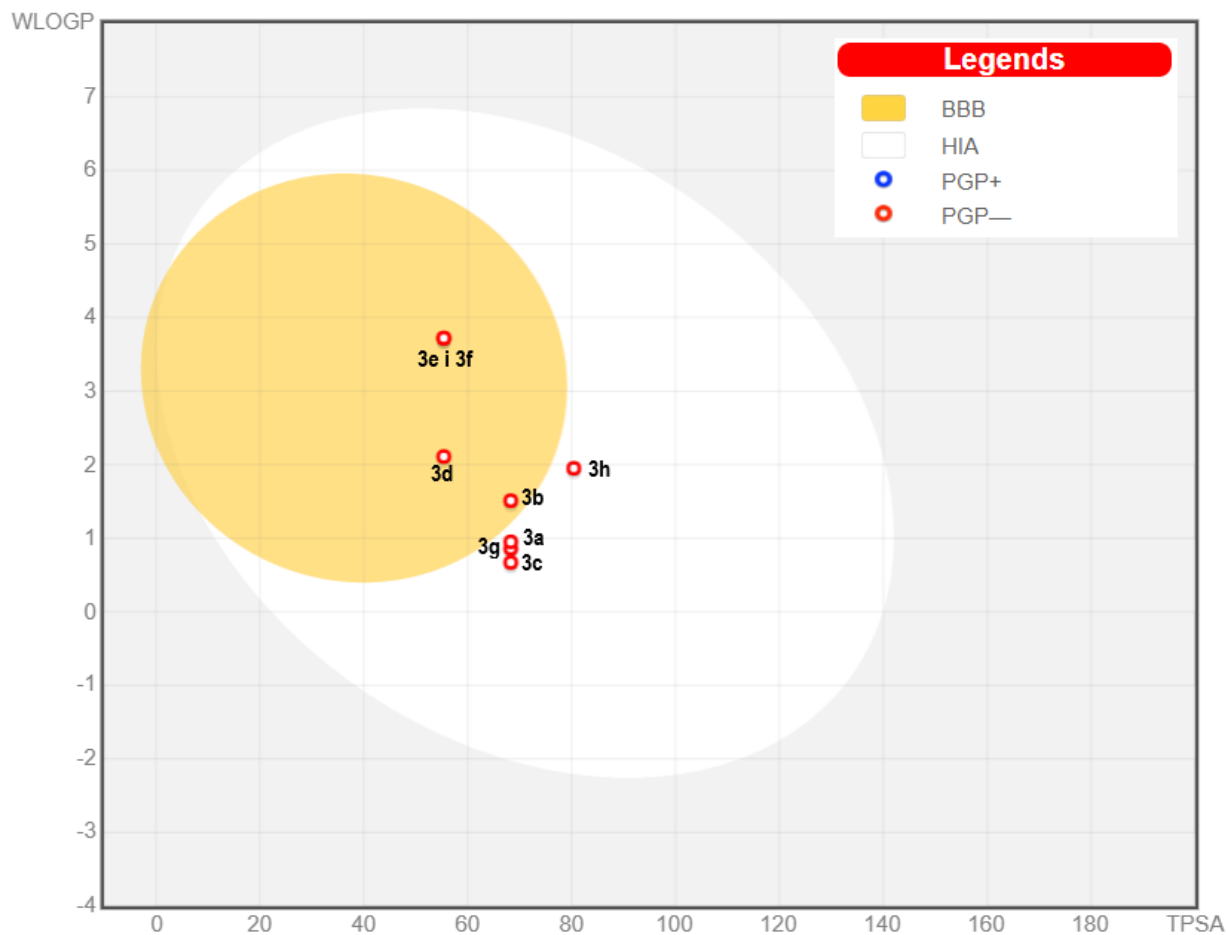


Tablica 8. Pregled parametara za Ghoseova pravila izračunatih na SwissADME

Spoj	$M_r$ (160 – 480)	$\log P$ (-0,4 – 5,6)	MR (40 – 130)	Broj atoma (20 – 70)	Ghoseova pravila
<b>3a</b>	220.22	0.90	58.59	28	4/4
<b>3b</b>	238.22	1.25	58.55	28	4/4
<b>3c</b>	248.28	1.21	66.66	34	4/4
<b>3d</b>	237.23	2.05	60.75	29	4/4
<b>3e</b>	287.23	2.81	65.80	32	4/4
<b>3f</b>	287.23	2.88	65.80	32	4/4
<b>3g</b>	234.25	0.97	61.86	31	4/4
<b>3h</b>	316.35	2.19	87.22	43	4/4

Zadnji set pravila koja promatramo postavio je Egan. On je smanjio broj deskriptora s obzirom da su neki poput molekulske mase već izraženi u drugima. Njegov model predviđa bioraspoloživost molekule u tijelu iz  $\log P$  te iz ukupne polarne površine (TPSA). Statističkom obradom molekula s poznatim karakteristikama dobivene su granične vrijednosti područja na kojima je velika vjerojatnost da će molekula imati dobru intestinalnu apsorpciju (Egan i sur., 2000).

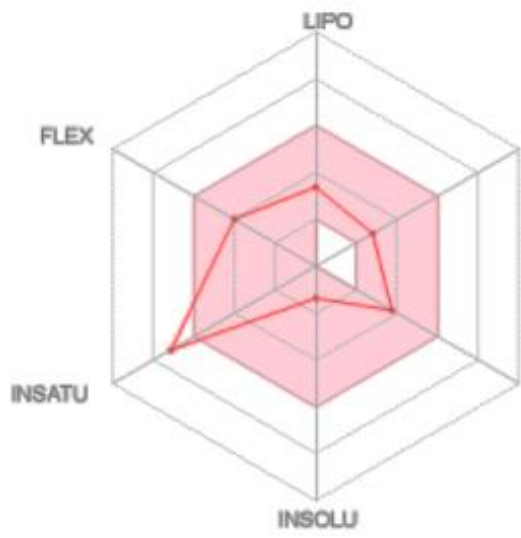
Pomoću alata SwissADME generiran je *Boiled EGG* prikaz (Slika 14.) iz kojega je vidljivo da se za sve molekule predviđa dobra intestinalna apsorpcija, jer ne izlaze iz bijelog područja. Derivati (**3b**, **3d**, **3e**, **3f**) se nalaze u žutom području te se za njih predviđa da će prelaziti krvno-moždanu barijeru, zajedničko im je da imaju fluor u strukturi. Na prikazu su sve molekule označene crvenom bojom što ukazuje da nijedna molekula neće biti supstrat za P – glikoprotein (Daina i Zoete, 2016). P -gp je transportni protein koji je eksprimiran u tankom crijevu, jetri, bubrezima i krvno-moždanoj barijeri. Njegova uloga je izbacivanje molekula iz stanice na luminalnu stranu membrane čime se protivi unutarstaničnom nakupljanju molekula. Zbog njegove mogućnosti vezanja različitih supstrata mogu utjecati na apsorpciju ili ciljano djelovanje raznih lijekova. Na primjer zbog njegove prekomjerne ekspresije kod određenih tumora javlja se rezistencija na antitumorsku terapiju, a kod bakterija njegova prisutnost može dovesti do rezistencije na antibiotike (Jalšenjak i sur., 1998).



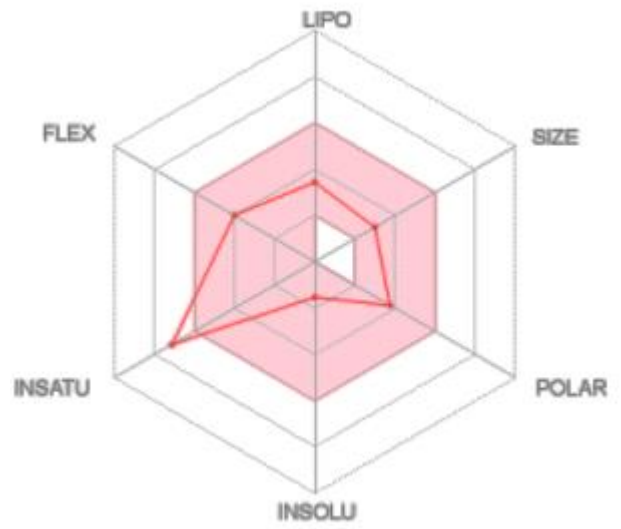
Slika 14. *Boiled EGG* model novosintetiziranih derivata itakonske kiseline (www.swissadme.ch)

Kao što se vidi iz tablica 5-8 sve novosintetizirane molekule zadovoljavaju zahtjeve svih pravila te se zbog toga mogu očekivati dobra farmakokinetička svojstva. Ove rezultate treba još dodatno provjeriti *in vitro* ispitivanjima, ali je korak u dobrom smjeru jer je dobra oralna bioraspodivnost važna za učinkovitost lijeka.

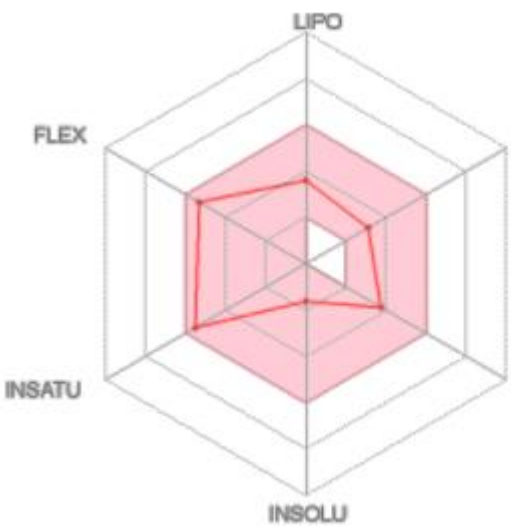
Iz gore dobivenih fizikalno – kemijskih deskriptora generirani su grafovi (Slika 15.) koji objedinjuju sve podatke te daju jednostavni grafički prikaz.



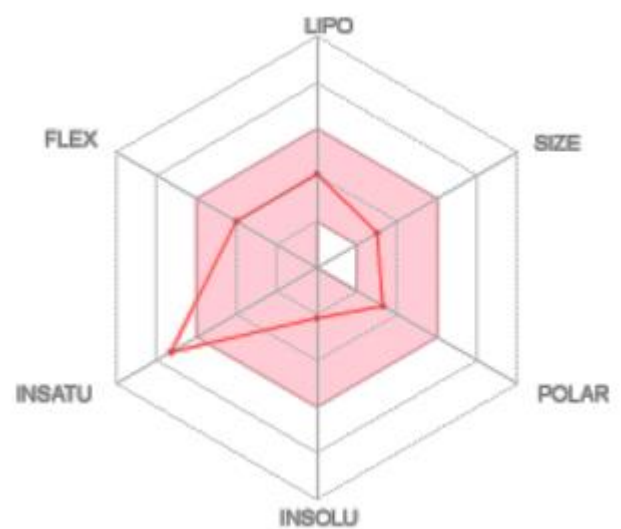
**3a**



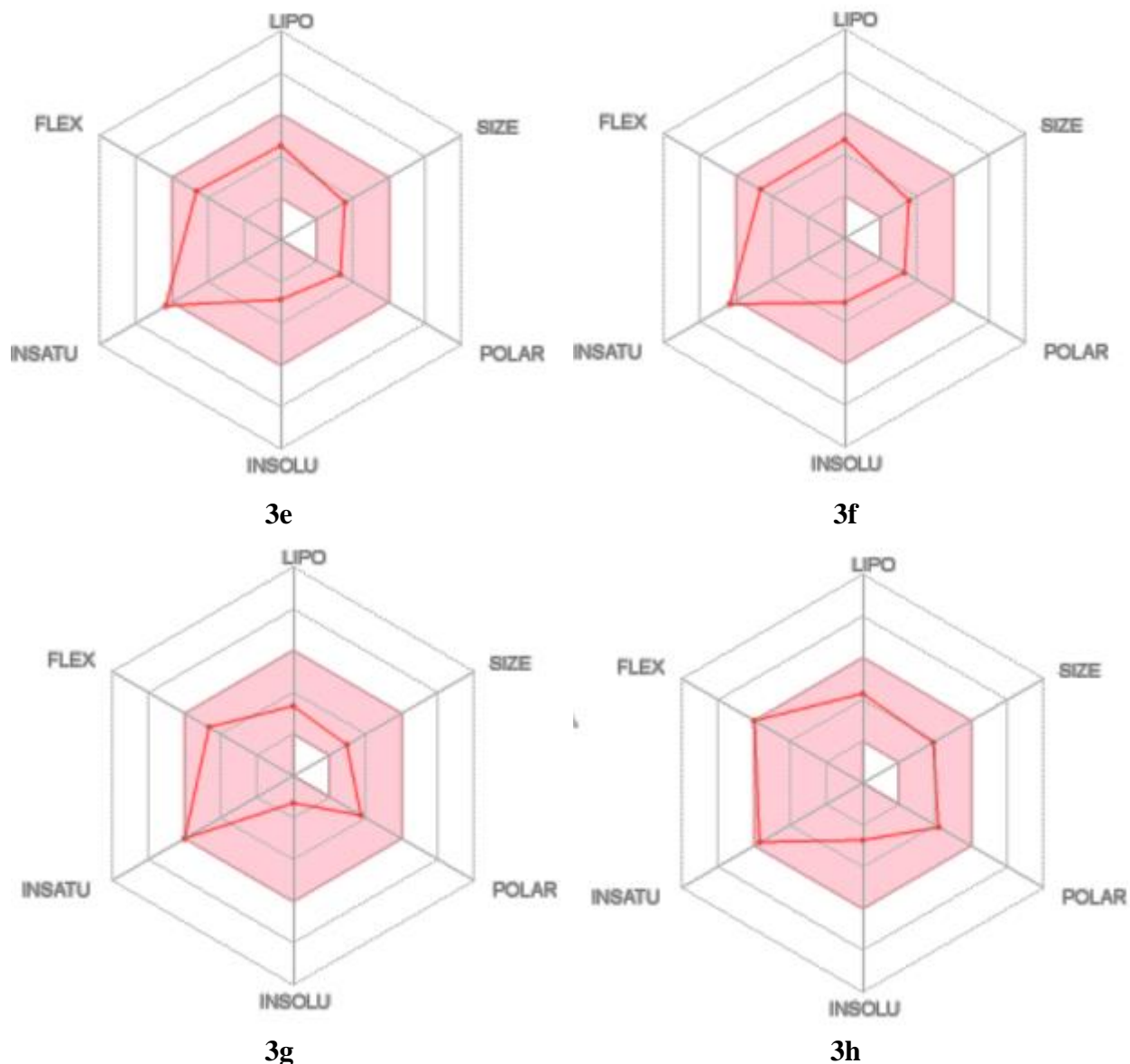
**3b**



**3c**



**3d**



Slika 15. *Bioavailability radar* novodobivenih derivata itakonske kiseline (www.swissadme.ch)

Na šest osi grafova se nalaze pojedini deskriptori, a ružičasti dio grafa označava područje vrijednosti za koje se predviđaju dobra farmakokinetička svojstva. Lipofilnost (LIPO) je kvantificirana logaritmom partijskog koeficijenta izračunatog korištenjem programa XLOGP 3.2.2 te mora zadovoljiti vrijednosti od -0,7 do 5,0. Veličina molekule (SIZE) kvantificirana je molekulskom masom od 150 do 500 g mol<sup>-1</sup>. Polarnost molekule (POLAR) kvantificirana je vrijednošću TPSA koja mora biti između 20 i 130 Å<sup>2</sup>, dok je netopljivost molekule (INSOLU) kvantificirana negativnom vrijednošću logaritma molarne topljivosti izračunate topološkom

metodom Delaneyja ( $\log S$ ) te mora biti manja od 6. Nezasićenost molekule (INSATU) kvantificirana je udjelom  $sp^3$  hibridiziranih ugljikovih atoma u ukupnom broju atoma ugljika te vrijednost mora biti viša od 0,25. Fleksibilnost molekule kvantificirana je brojem rotirajućih veza kojih mora biti manje od 9 (Daina i sur., 2017).

Iz grafova se vidi da pet zahtjeva zadovoljavaju sve molekule. Derivati koji nemaju metilenski ili etilenski most između itakonske kiseline i aromatskog prstena (**3a,3b,3d,3e,3f**) imaju premalen udio nezasićenih ugljikovih atoma.

## 5. Zaključci

U ovom radu opisana je sinteza osam novih amidnih derivata monometil itakonata. Sinteza i karakterizacija novih derivata provedena je u okviru istraživanja derivata itakonske kiseline koje se provodi na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Sintetizirani su i karakterizirani sljedeći spojevi koji dosada nisu opisani u literaturi:

- metil 3-(piridin-3-ilkarbamoil)but-3-enoat **3a**
- metil 3-((5-fluoropiridin-3-il)karbamoil)but-3-enoat **3b**
- metil 3-(2-(piridin-3-il)etil)karbamoil)but-3-enoat **3c**
- metil 3-((4-fluorofenil)karbamoil)but-3-enoat **3d**
- metil 3-((4-(trifluorometil)fenil)karbamoil)but-3-enoat **3e**
- metil 3-((3-(trifluorometil)fenil)karbamoil)but-3-enoat **3f**
- metil 3-((piridin-3-ilmetil)karbamoil)but-3-enoat **3g**
- metil 3-((2-(5-metoksi-1*H*-indol-3-il)etil)karbamoil)but-3-enoat **3h**

Svim navedenim spojevima potvrđena je struktura spektroskopskim tehnikama (IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR) te je za krutine određena temperatura tališta.

Pomoću računalnih metoda novosintetiziranim spojevima su izračunate vrijednosti deskriptora fizikalno-kemijskih svojstava te su im predviđena neka farmakokinetička svojstva. Za sve dobivene derivate se predviđa dobra oralna bioraspodjelivost. Predviđa se da nijedan derivat ne bi trebao biti supstrat za P-gp, a derivati **3b**, **3d**, **3e**, **3f** bi trebali prelaziti krvno – moždanu barijeru.

U daljnjim ispitivanjima, koja prelaze okvire ovog rada, derivatima **3a-h** će se ispitati *in vitro* antitumorsko djelovanje na nizu staničnih linija tumora te antivirusno djelovanje.

## 6. Literatura



Armarego WLF. Purification of Laboratory Chemicals, Elsevier Science, 2017. 716

Bambouskova M, Gorvel L, Lampropoulou V, Sergushichev A, Loginicheva E, Johnson K, Korenfeld D, Mathyer ME, Kim H, Huang LH, Duncan D, Bregman H, Keskin A, Santeford A, Apte RS, Sehgal R, Johnson B, Amarasinghe GK, Soares MP, Satoh T, Akira S, Hai T, de Guzman Strong C, Auclair K, Roddy TP, Biller SA, Jovanovic M, Klechevsky E, Stewart KM, Randolph GJ, Artyomov MN. Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the IkappaBzeta-ATF3 inflammatory axis. *Nature*, 2018, 556, 501-504.

Berg IA, Filatova LV, Ivanovsky RN. Inhibition of acetate and propionate assimilation by itaconate via propionyl-CoA carboxylase in isocitrate lyase-negative purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 216, 49-54.

Bhatt V, Alejandro L, Michael A, Ganetsky A. The promising impact of ibrutinib, a Bruton's tyrosine kinase inhibitor, for the management of lymphoid malignancies. *Pharmacotherapy*, 2014, 34, 303-314.

Brown JR. Ibrutinib (PCI-32765), the first BTK (Bruton's tyrosine kinase) inhibitor in clinical trials. *Curr Hematol Malig Rep*, 2013, 8, 1-6.

Carpino LA. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc*, 1993, 115, 4397-4398.

Clayden J, Greeves N, Warren S. Organic Chemistry, Oxford, Oxford University press, 2012. str. 605-611.

Crasso G. Untersuchungen über das Verhalten der Citronsäure in höherer Temperatur und die daraus hervorgehenden Produkte. *Justin Liebigs Ann Chem*, 1840, 34, 53-84.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 2017, 7, 42717.

Daina A, Zoete V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 2016, 11, 1117-1121.

Egan WJ, Merz KM, Jr., Baldwin JJ. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J Med Chem*, 2000, 43, 3867-3877.

El-Faham A , Albericio F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem Rev*, 2011, 111, 6557-6602.

Ghose AK, Viswanadhan VN , Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem*, 1999, 1, 55-68.

Hammerer F, Chang JH, Duncan D, Castaneda Ruiz A , Auclair K. Small Molecule Restores Itaconate Sensitivity in *Salmonella enterica*: A Potential New Approach to Treating Bacterial Infections. *Chembiochem*, 2016, 17, 1513-1517.

Holmes FL. Hans Krebs, New York, Oxford University Press, 1991. 1933-1937

Itaconic acid, <https://www.chemicalbook.com>, pristupljeno: 10.10.2020.

Jackson PA, Widen JC, Harki DA , Brummond KM. Covalent Modifiers: A Chemical Perspective on the Reactivity of alpha,beta-Unsaturated Carbonyls with Thiols via Hetero-Michael Addition Reactions. *J Med Chem*, 2017, 60, 839-885.

Jalšenjak, I., Jalšenjak, V., Filipović-Grčić, J., Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str. 88.

Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent EE, Loginicheva E, Cervantes-Barragan L, Ma X, Huang SC, Griss T, Weinheimer CJ, Khader S, Randolph GJ, Pearce EJ, Jones RG, Diwan A, Diamond MS , Artyomov MN. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab*, 2016, 24, 158-166.

Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac LR, Padera RF, Shapiro GI, Baum A, Himmelsbach F, Rettig WJ, Meyerson M, Solca F, Greulich H , Wong KK. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene*, 2008, 27, 4702-4711.

Liou GY , Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*, 2010, 44, 479-496.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW , Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46, 3-26.

McFadden BA , Purohit S. Itaconate, an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera*. *J Bacteriol*, 1977, 131, 136-144.

Mills EL, Ryan DG, Prag HA, Dikovskaya D, Menon D, Zaslona Z, Jedrychowski MP, Costa ASH, Higgins M, Hams E, Szpyt J, Runtsch MC, King MS, McGouran JF, Fischer R, Kessler BM, McGettrick AF, Hughes MM, Carroll RG, Booty LM, Knatko EV, Meakin PJ, Ashford MLJ, Modis LK, Brunori G, Sevin DC, Fallon PG, Caldwell ST, Kunji ERS, Chouchani ET, Frezza C, Dinkova-Kostova AT, Hartley RC, Murphy MP , O'Neill LA. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature*, 2018, 556, 113-117.

Mitsudomi T , Kobayashi Y. Afatinib in lung cancer harboring EGFR mutation in the LUX-Lung trials: six plus three is greater than seven? *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5, 446-449.

Muegge I. Pharmacophore features of potential drugs. *Chem Eur J*, 2002, 8, 1976-1981.

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE , Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004, 304, 1497-1500.

Parmar S, Patel K , Pinilla-Ibarz J. Ibrutinib (imbruvica): a novel targeted therapy for chronic lymphocytic leukemia. *P T*, 2014, 39, 483-519.

Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M , Miller VA. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*, 2006, 12, 839-844.

Rizk ML, Zou L, Savic RM , Dooley KE. Importance of Drug Pharmacokinetics at the Site of Action. *Clin Transl Sci*, 2017, 10, 133-142.

Schultz TW , Aptula AO. Kinetic-Based Reactivity for Michael Acceptors: Structural Activity Relationships and Its Relationship to Excess Acute Fish Toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2016, 97, 752-756.

Sethy B, Hsieh CF, Lin TJ, Hu PY, Chen YL, Lin CY, Tseng SN, Horng JT , Hsieh PW. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Itaconic Acid Derivatives as Potential Anti-Influenza Agents. *J Med Chem*, 2019, 62, 2390-2403.

Sheldon RA. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chem*, 2014, 16, 950-963.

Strelko CL, Lu W, Dufort FJ, Seyfried TN, Chiles TC, Rabinowitz JD , Roberts MF. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc*, 2011, 133, 16386-16389.

SwissADME [www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch) pristupljeno: 20.10.2020

Tan CS, Gilligan D , Pacey S. Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*, 2015, 16, e447-e459.

Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW , Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615-2623.

Weiss JM, Davies LC, Karwan M, Ileva L, Ozaki MK, Cheng RY, Ridnour LA, Annunziata CM, Wink DA , McVicar DW. Itaconic acid mediates crosstalk between macrophage metabolism and peritoneal tumors. *J Clin Invest*, 2018, 128, 3794-3805.

Winkler M, Lacerda TM, Mack F , Meier MAR. Renewable Polymers from Itaconic Acid by Polycondensation and Ring-Opening-Metathesis Polymerization. *Macromolecules*, 2015, 48, 1398-1403.

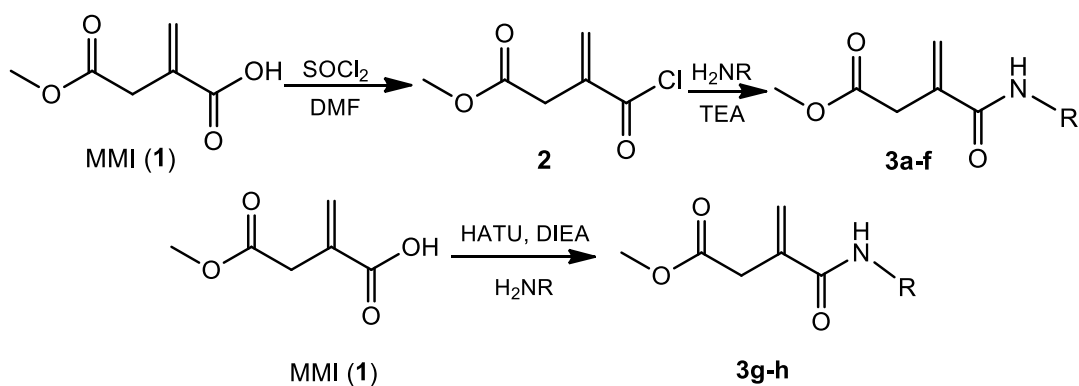
Zhang H. Osimertinib making a breakthrough in lung cancer targeted therapy. *Onco Targets Ther*, 2016, 9, 5489-5493.

## 7. Sažetak/Summary

## Vedran Katušić

### Sinteza i karakterizacija novih amidnih derivata itakonske kiseline

Itakonska kiselina u svojoj strukturi posjeduje  $\alpha,\beta$  konjugirane nezasićene veze što je čini Michaelovim akceptorom u reakcijama Michaelove adicije. Takvi spojevi se mogu ireverzibilno vezati na nukleofile u biološkim makromolekulama te na taj način inhibirati njihovu aktivnost. U ovom radu sintetizirano je osam novih derivata metilnog estera itakonske kiseline, **3a-h**. Derivati **3a-f** dobiveni su iz kiselinskog klorida monometil itakonata **2** u reakciji s odgovarajućim aminom. Derivati **3g** i **3h** dobiveni su metodom HATU *couplina* uz DIEA kao bazu.



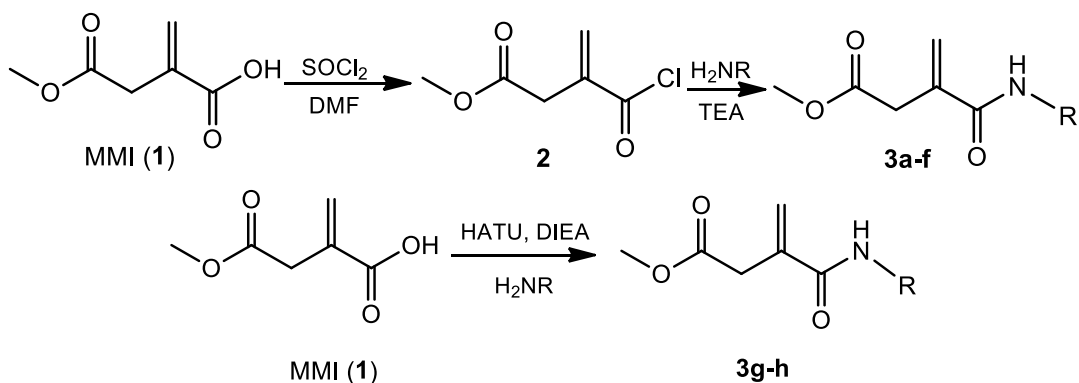
Svim sintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, MS), a krutinama je određeno talište. Za sve spojeve računalno su predviđena fizikalno-kemijska svojstva i neka farmakokinetička svojstva. *In vitro* antitumorska aktivnost protiv različitih staničnih linija karcinoma i antivirusna aktivnost biti će ispitana u daljnjim istraživanjima na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ključne riječi: Michaelov akceptor, itakonska kiselina, amidi, sinteza

## Vedran Katušić

### Synthesis and characterization of novel itaconic acid amide derivatives

Itaconic acid has  $\alpha,\beta$  conjugated methylene group in its structure, which makes it an Michael acceptor in Michael's addition reactions. Michael acceptors can irreversibly bind to nucleophiles in biological macromolecules and irreversibly inhibit their activity. In this thesis eight novel derivatives of itaconic acid, **3a-h** were synthesized. Derivatives **3a-f** were obtained from the acyl chloride of monomethyl itaconate (**2**) in the reaction with the corresponding amine. Derivatives **3g** and **3h** were obtained using the standard HATU *coupling* method in the presence of DIEA as a base.

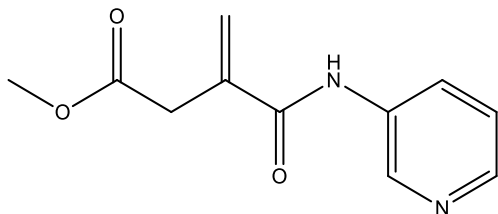


Structures of the newly synthesized compounds were confirmed by usual analytical and spectroscopic methods (IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, MS) and melting points were determined for solids. Some physicochemical and some pharmacokinetic proprieties were calculated for the final products using computational methods. *In vitro* antitumor and antiviral activity will be explored in the continuation of this research.

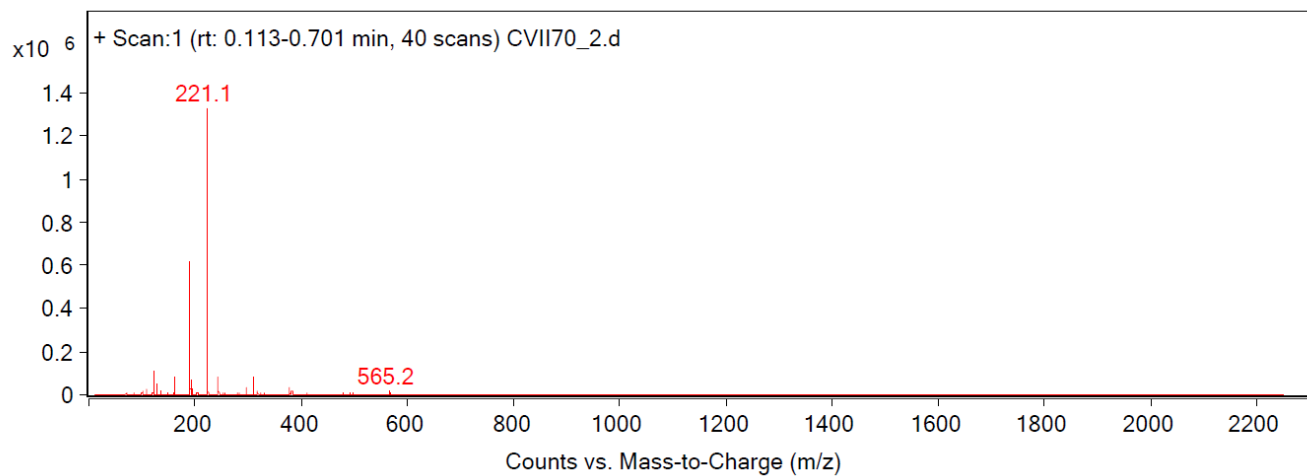
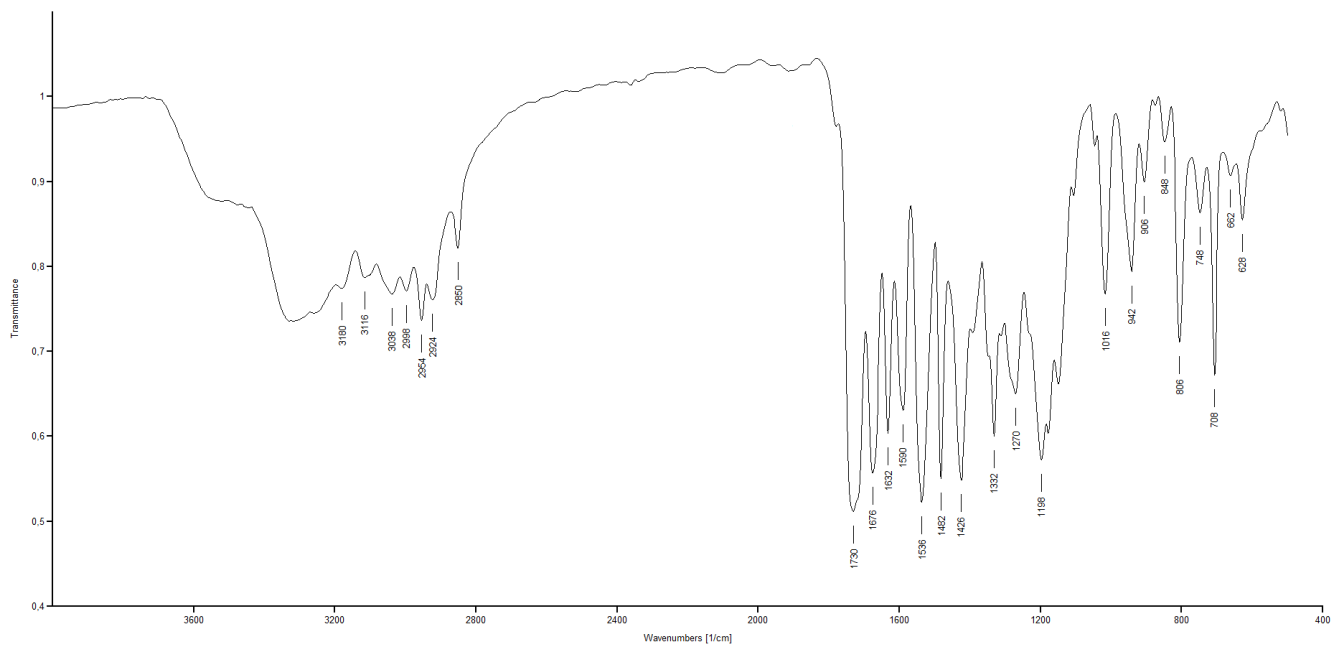
Key words: Michael acceptor, itaconic acid, amides, synthesis

## 8. Prilozi

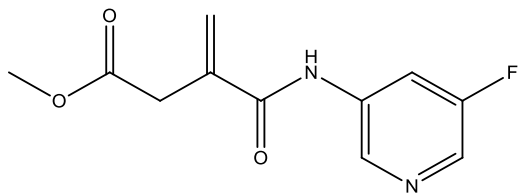




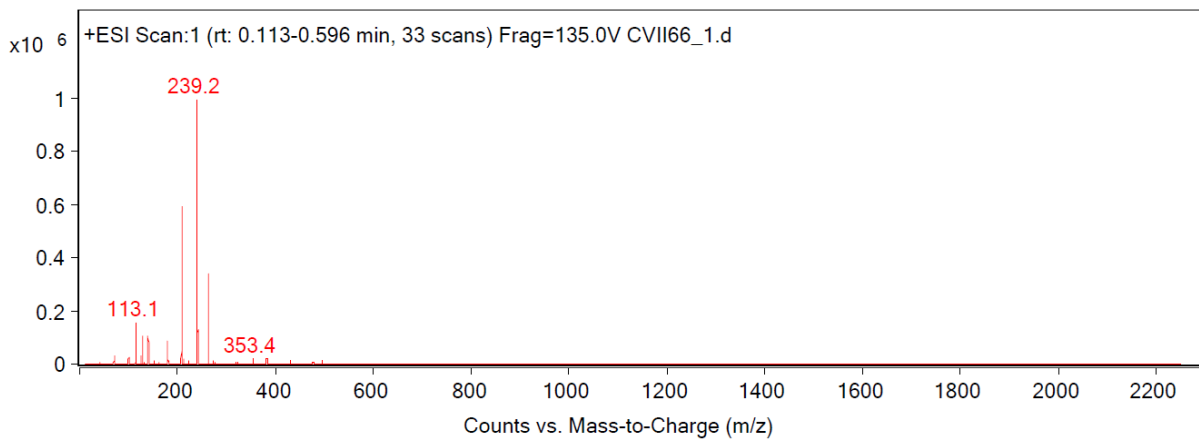
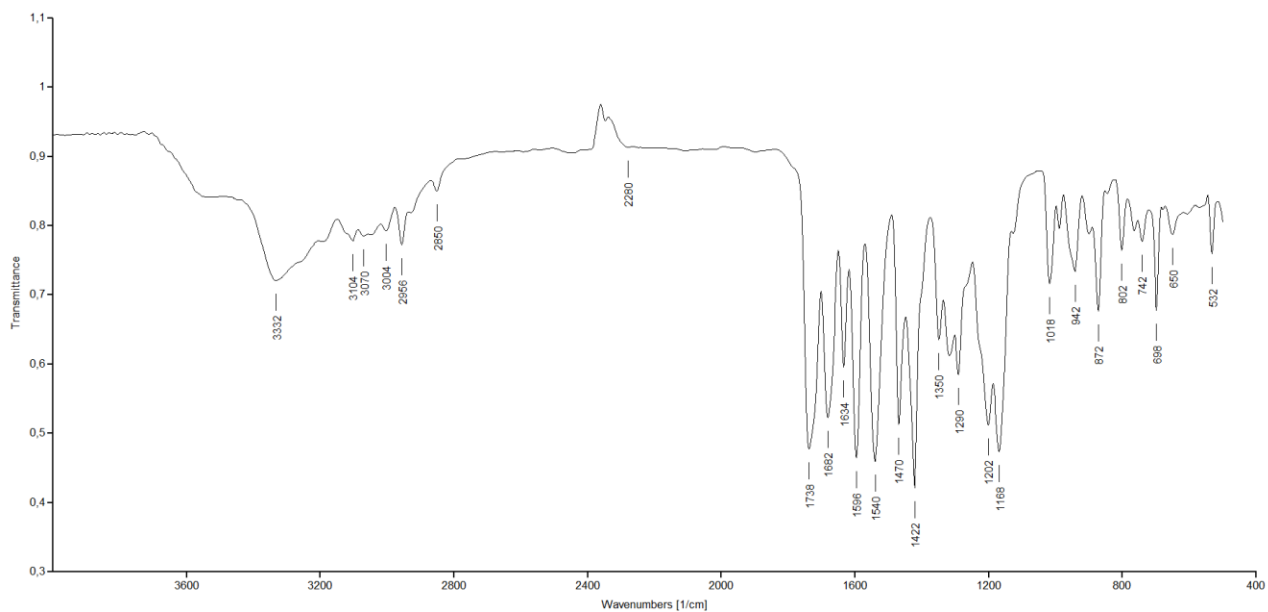
3a

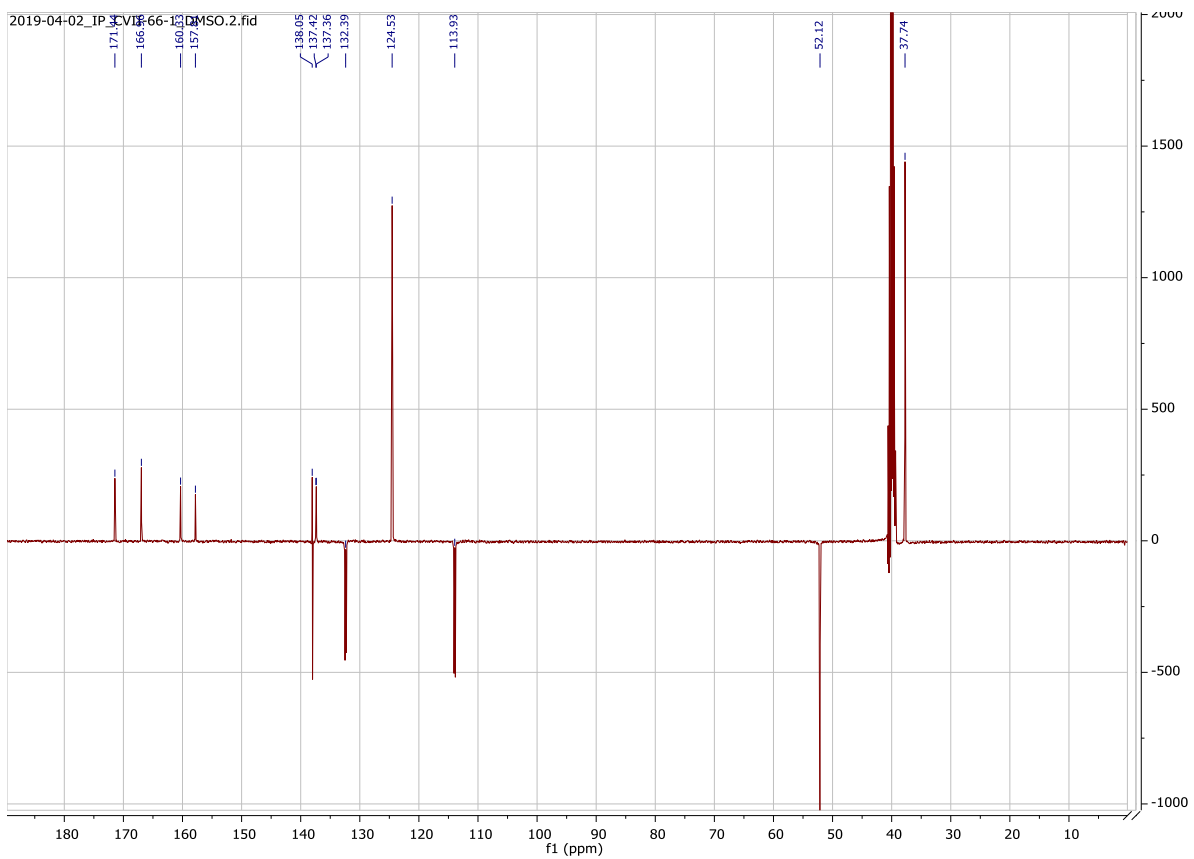
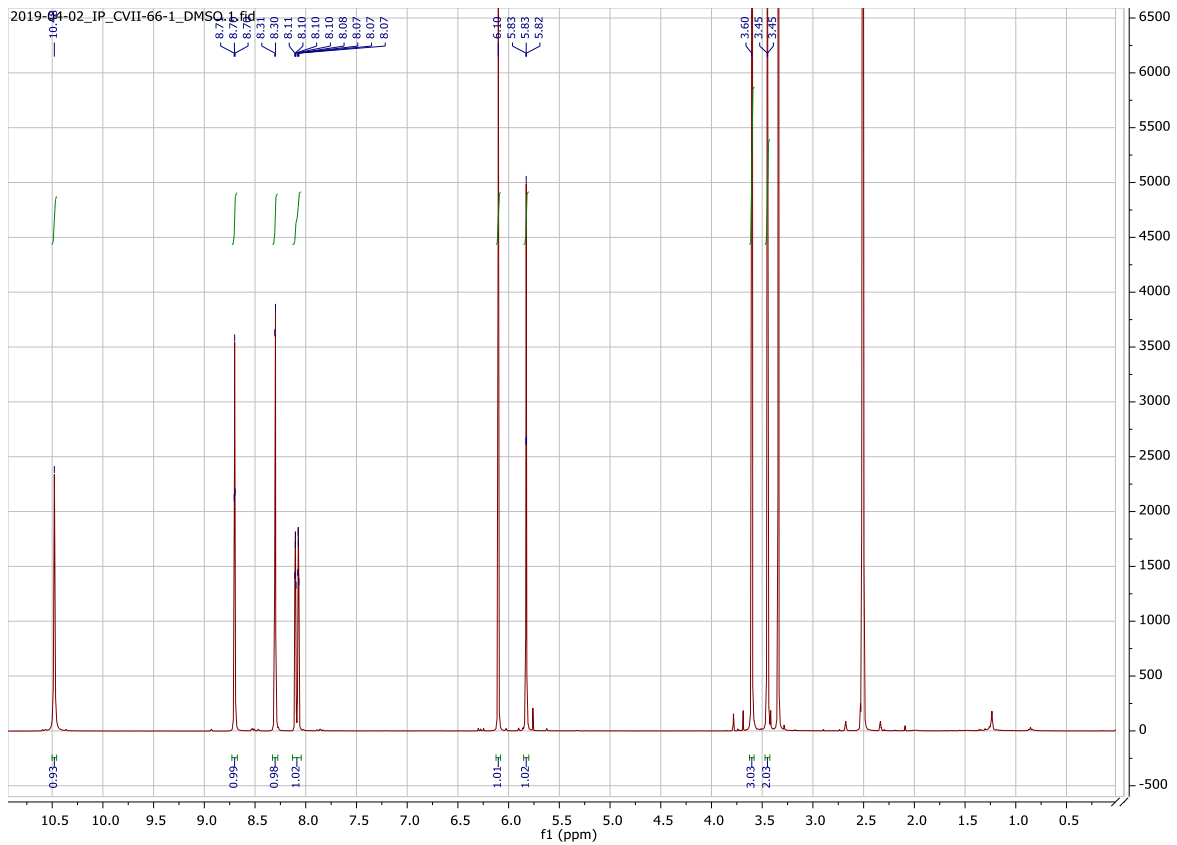


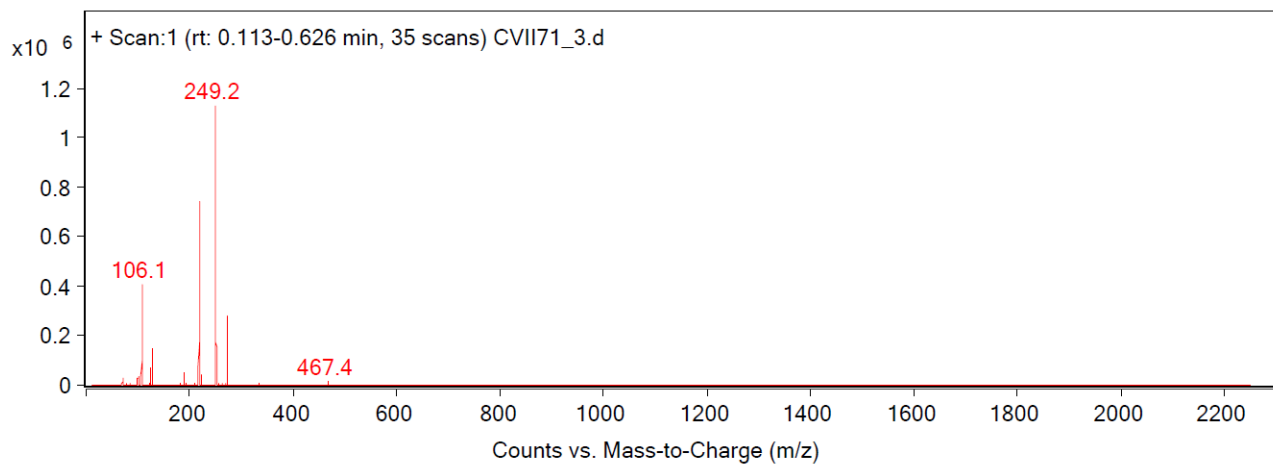
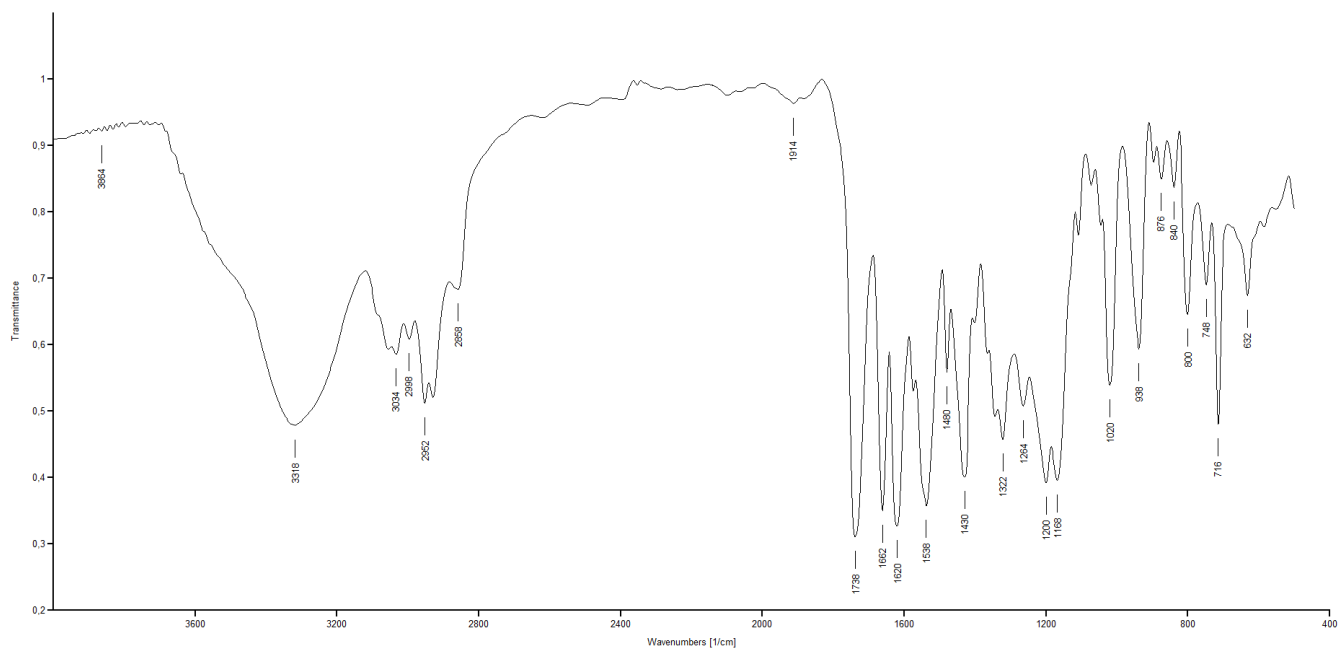
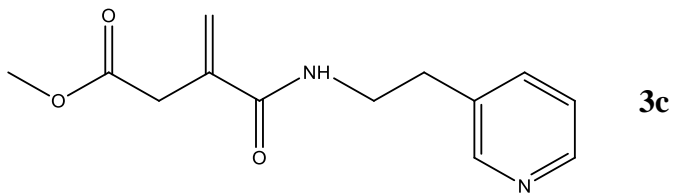


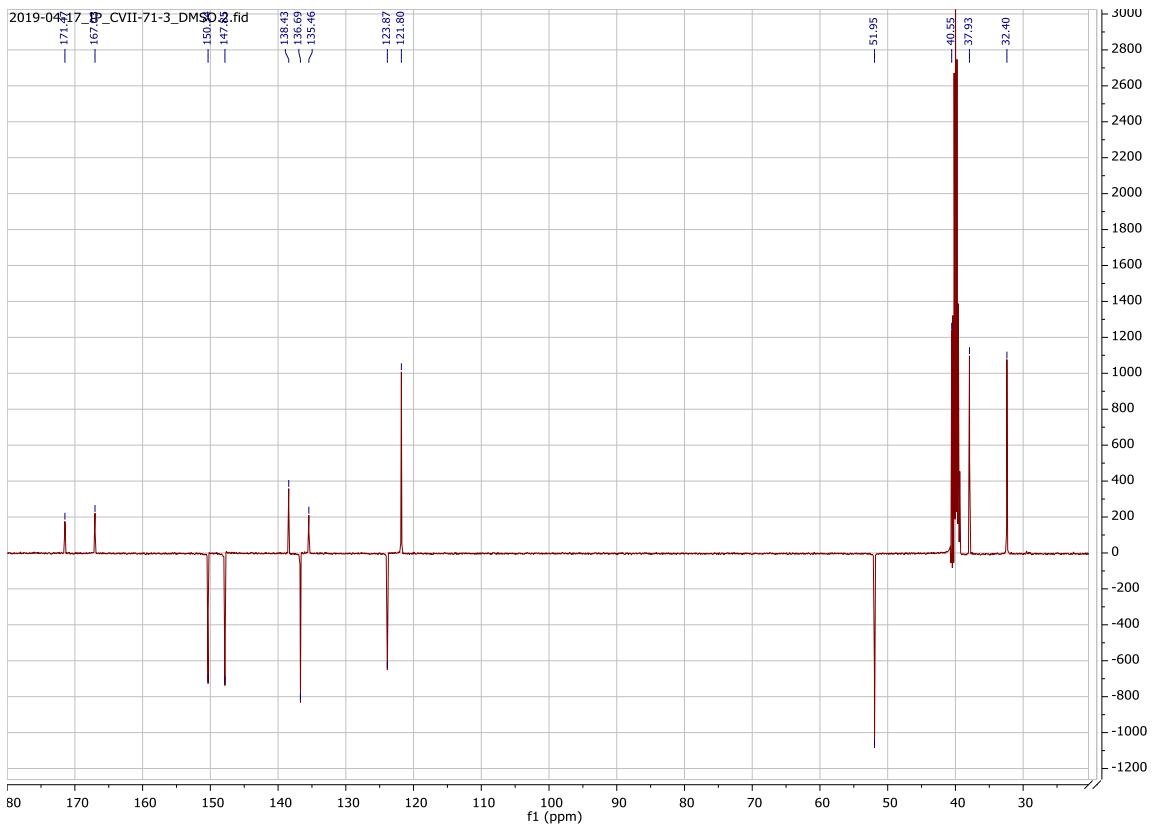
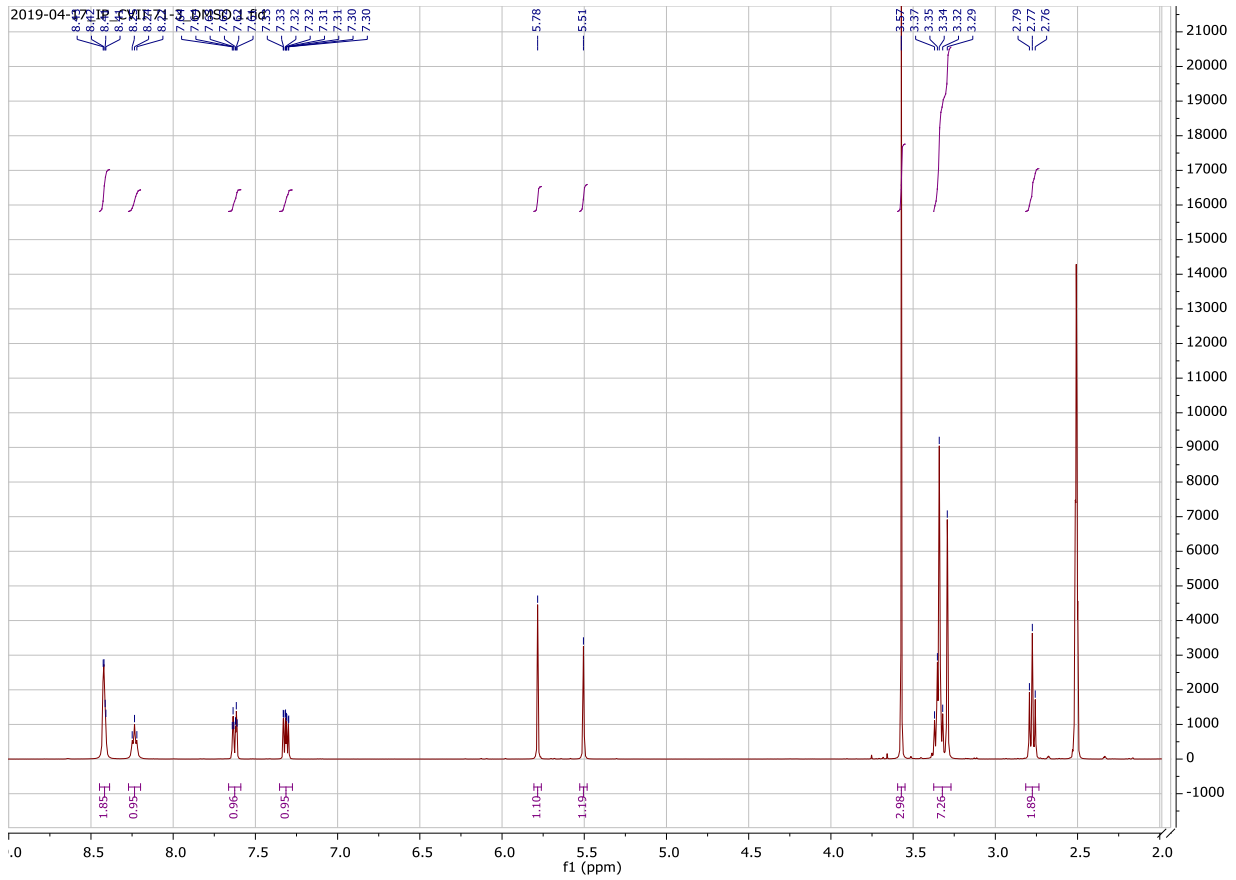


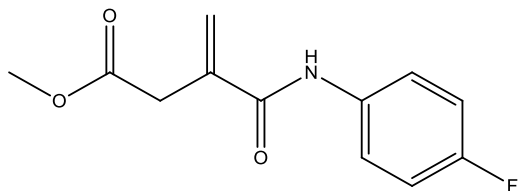
**3b**



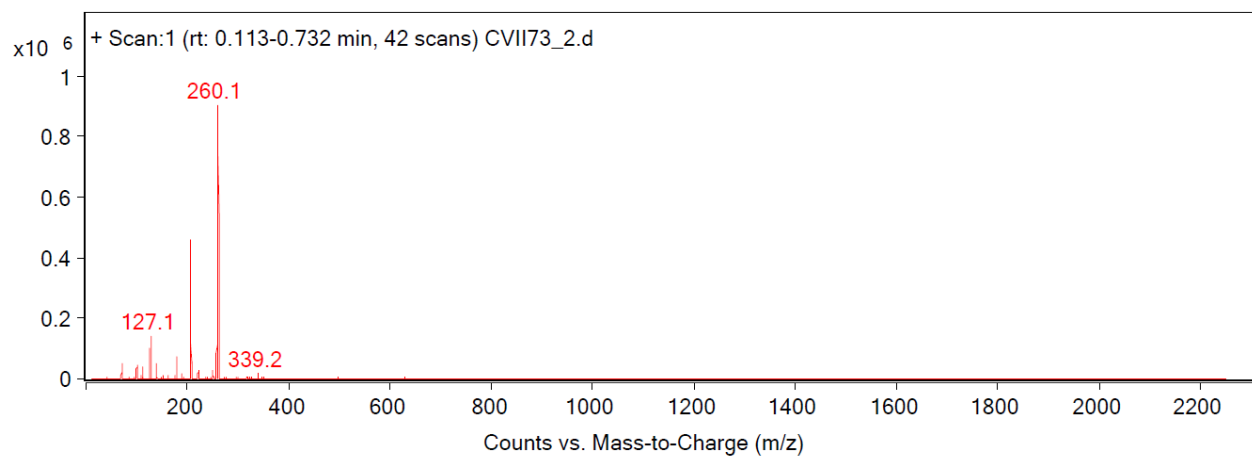
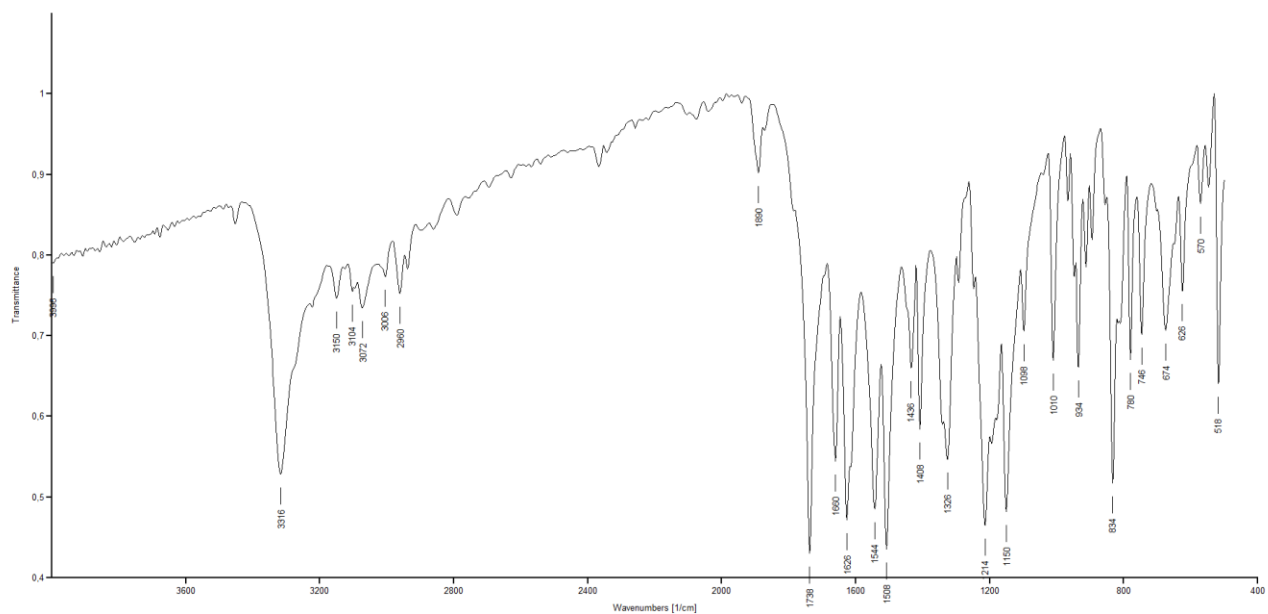


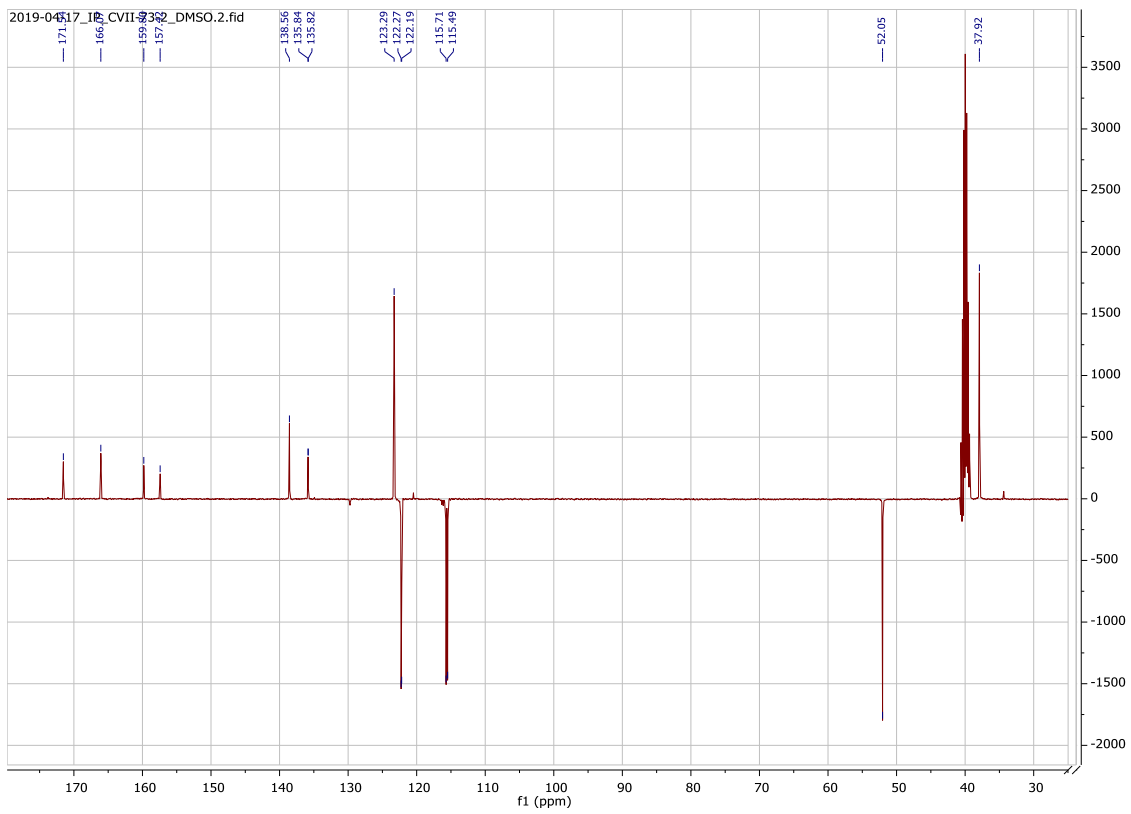
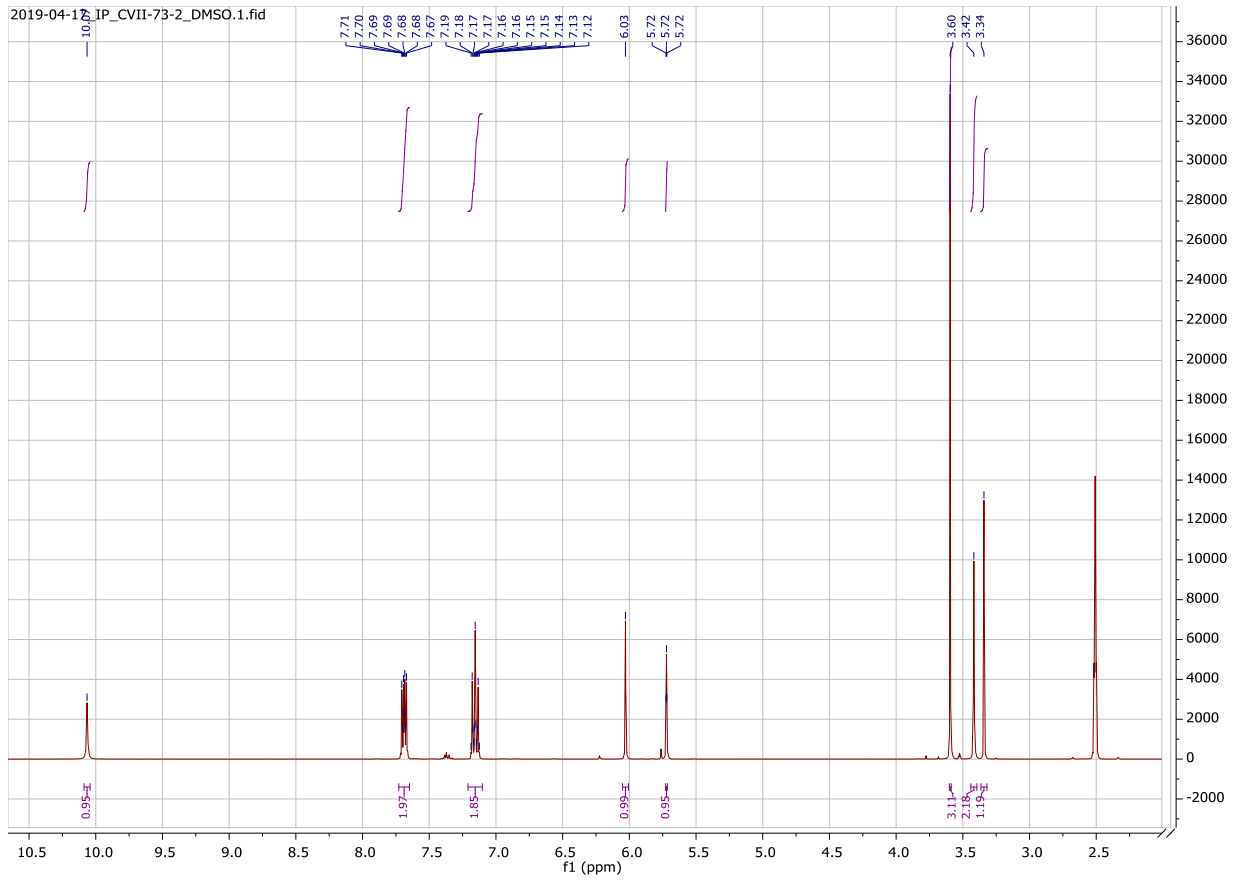




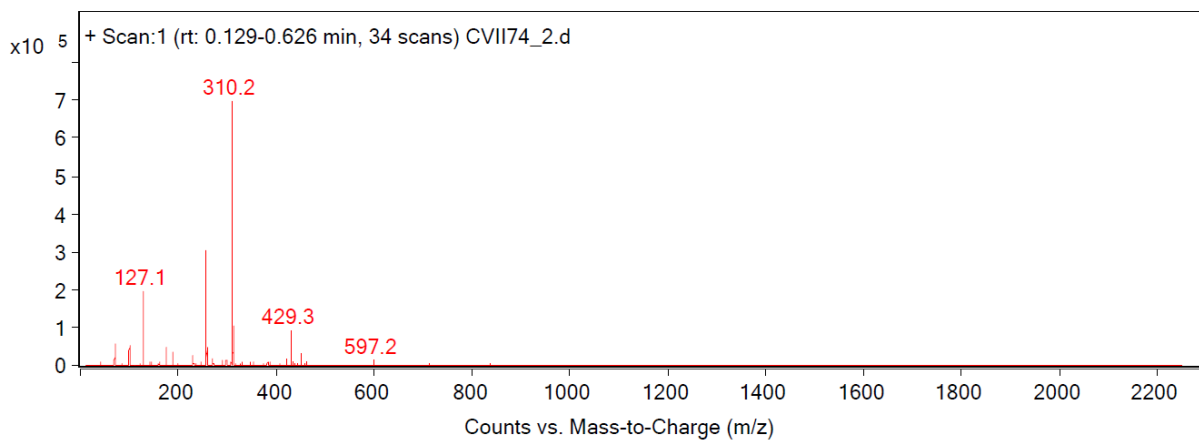
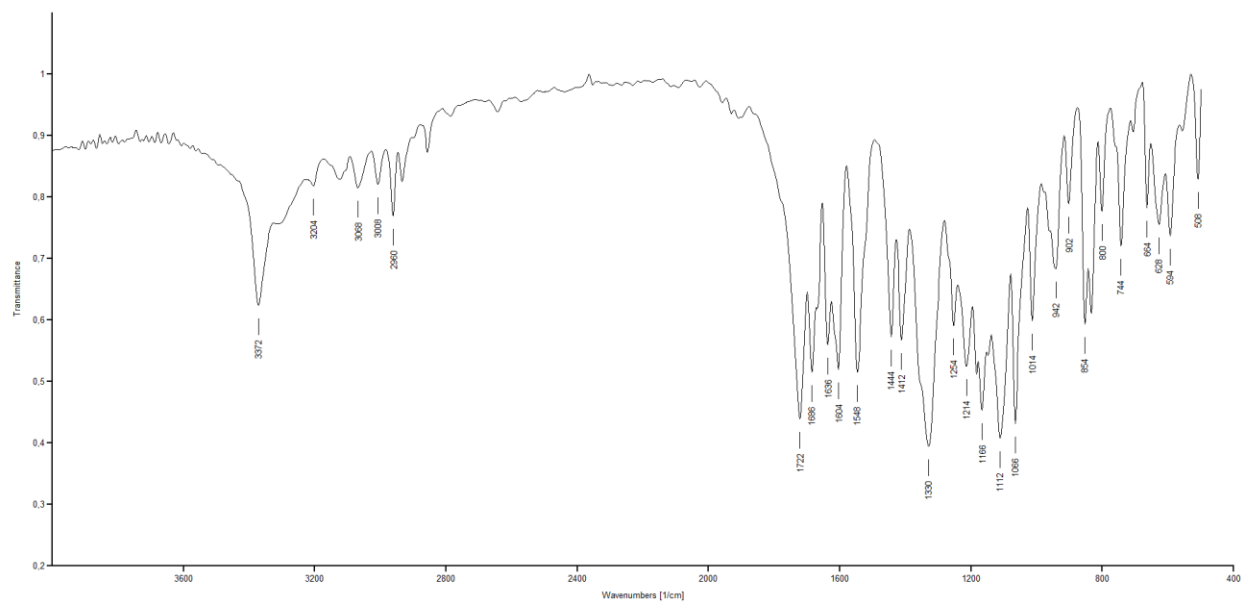
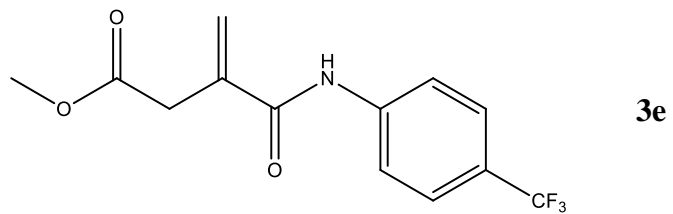


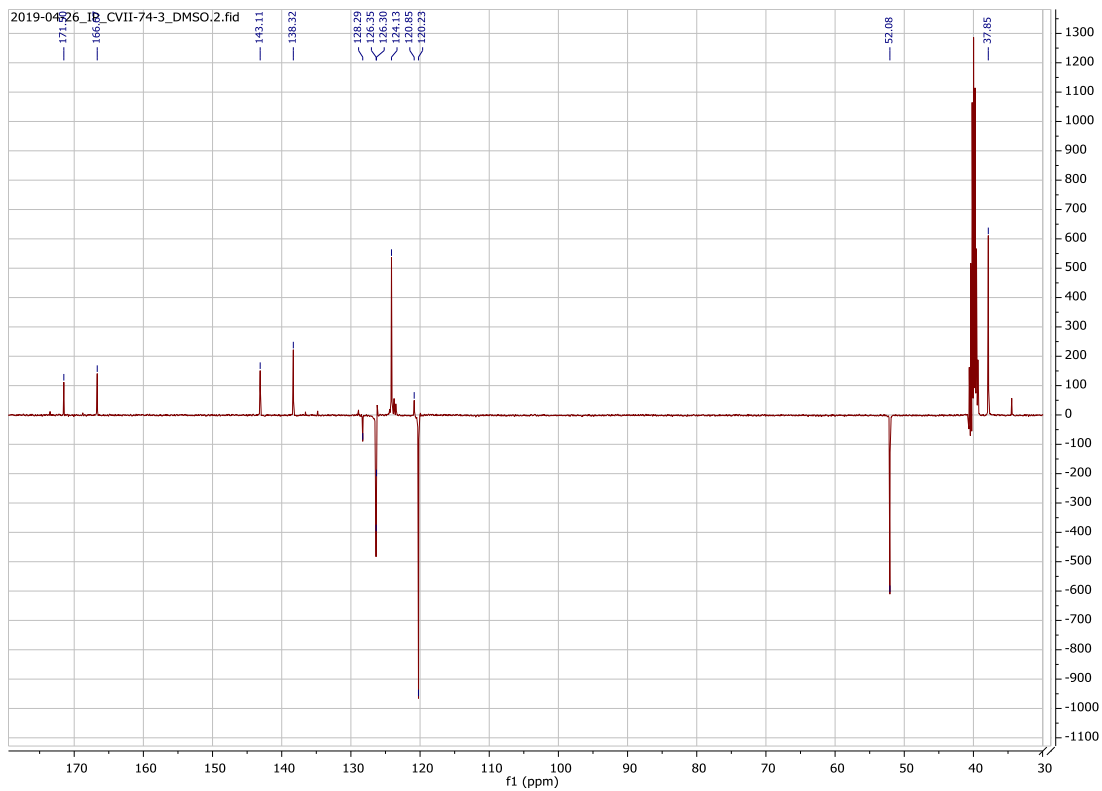
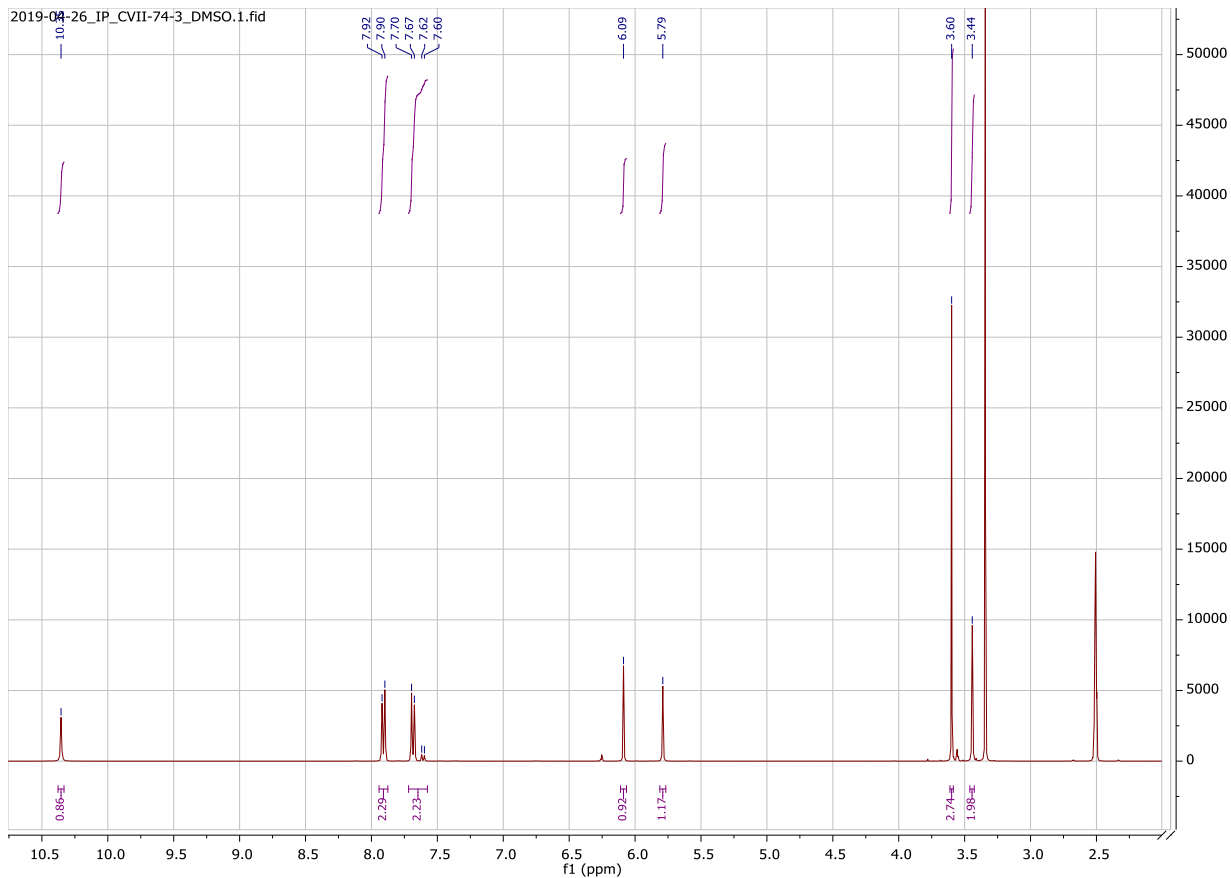
3d

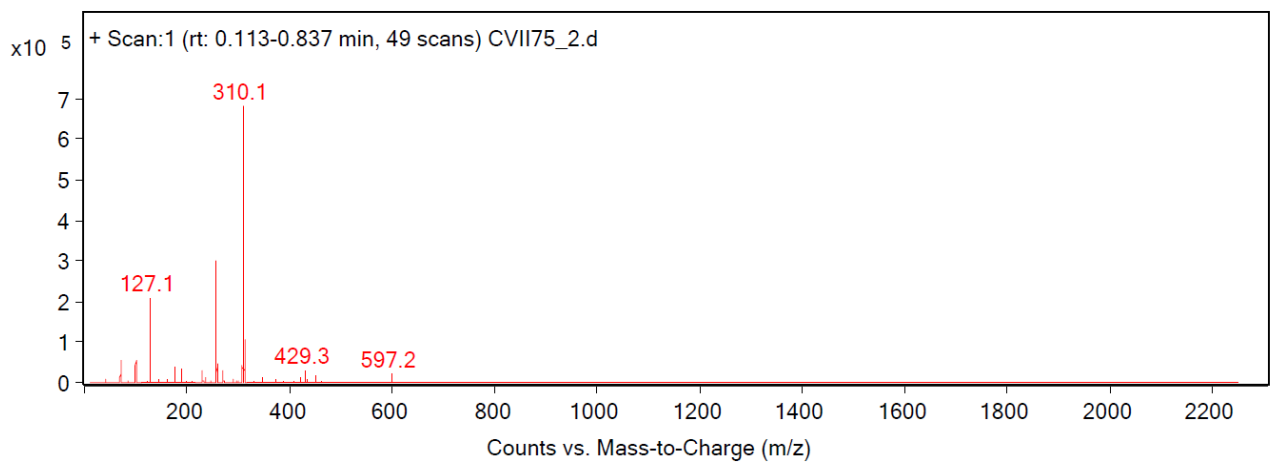
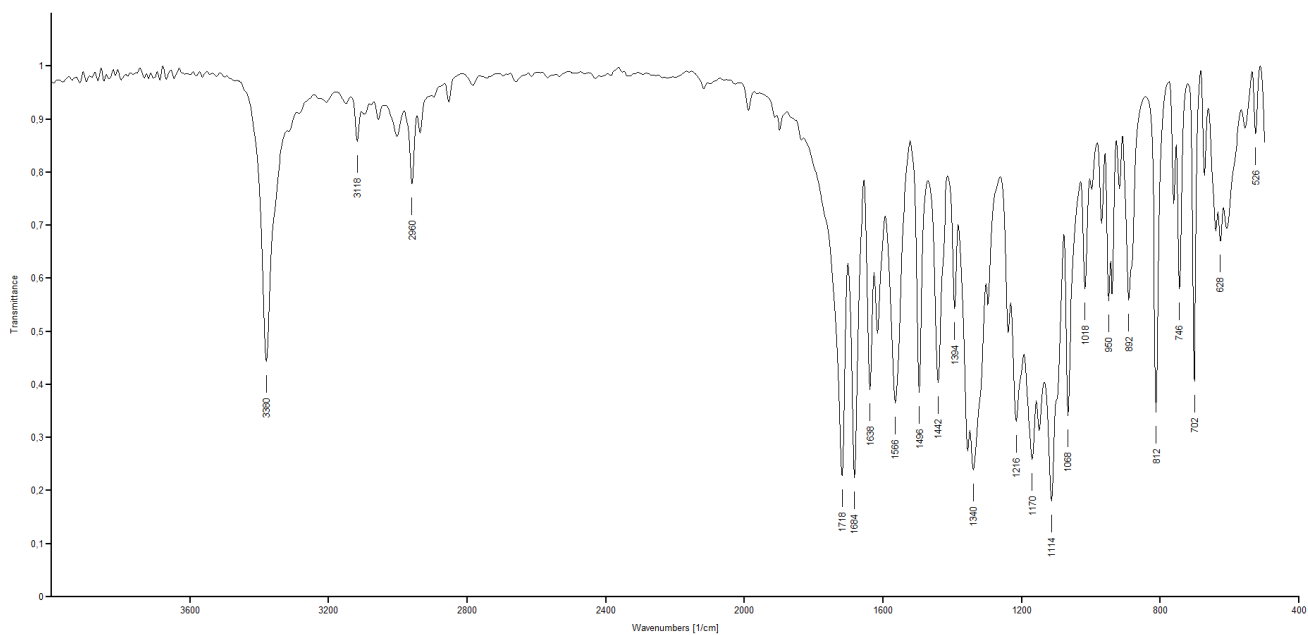
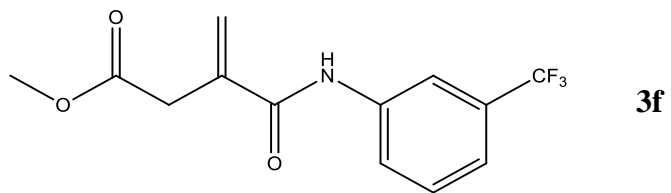


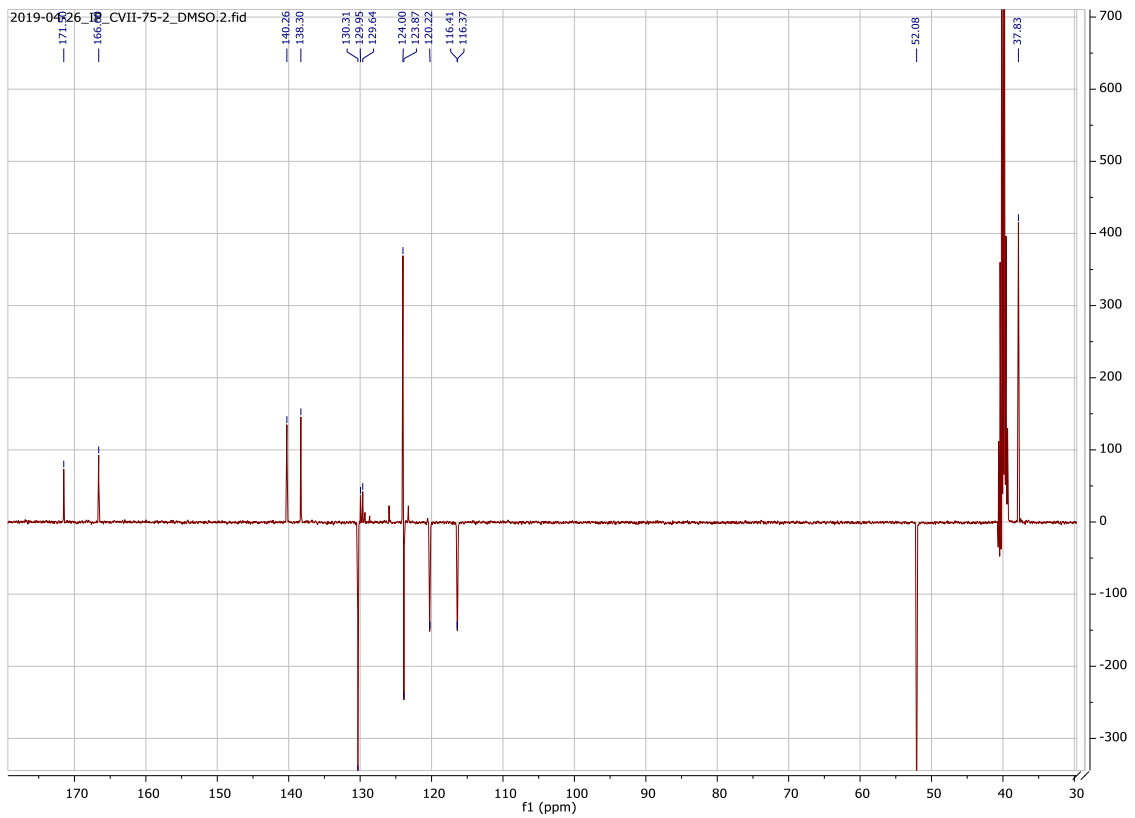
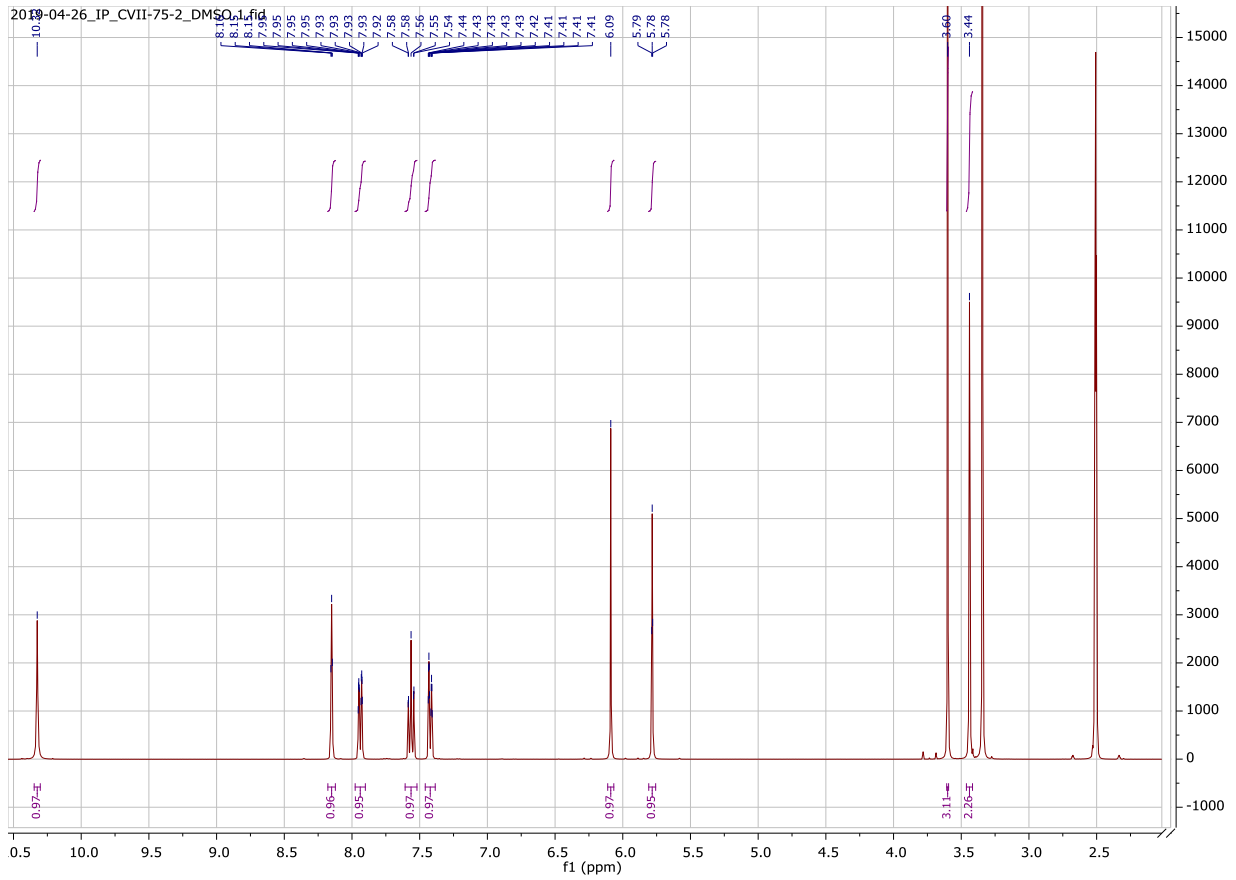


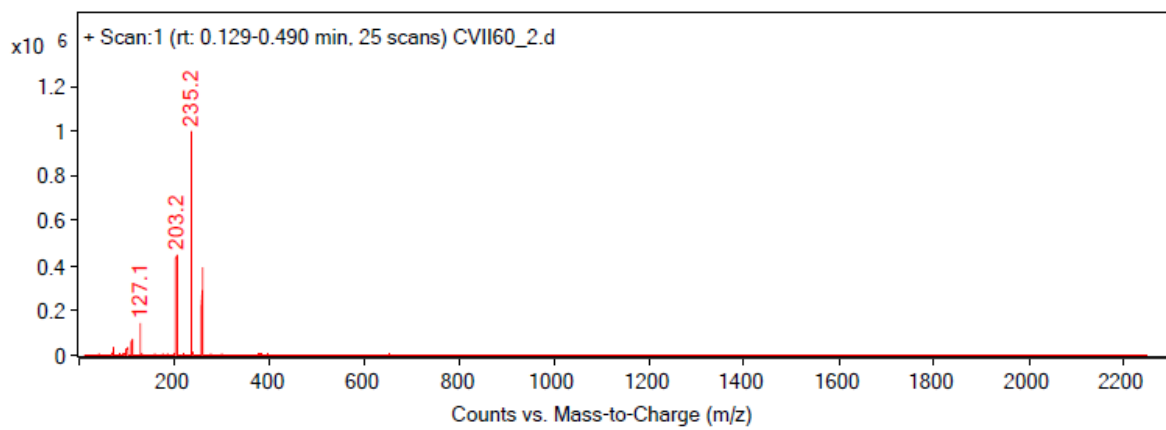
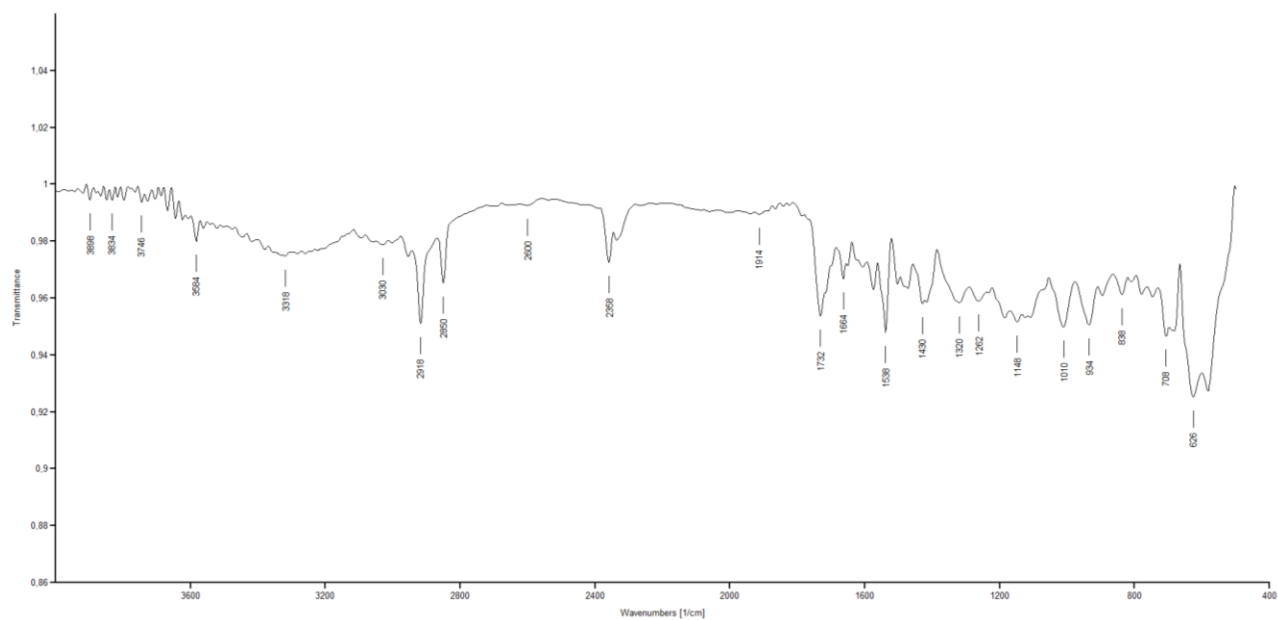
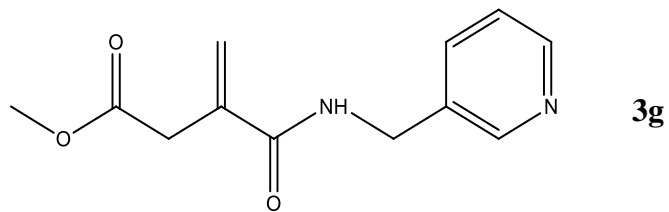


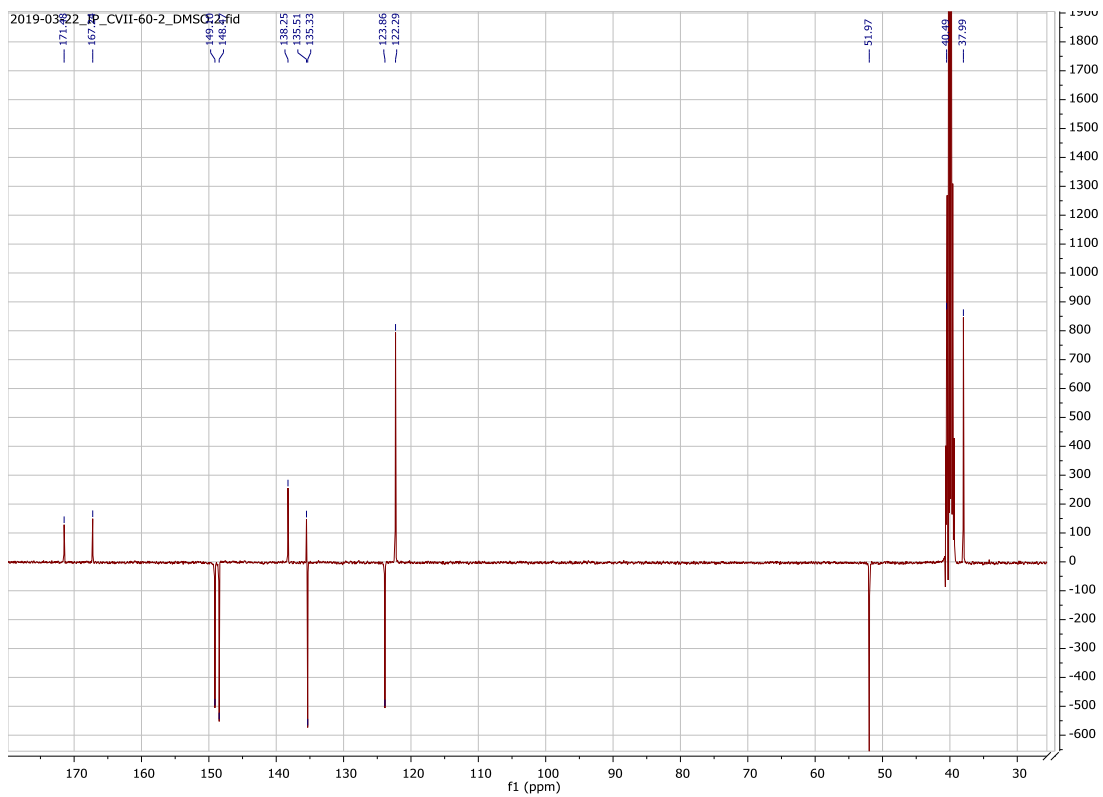
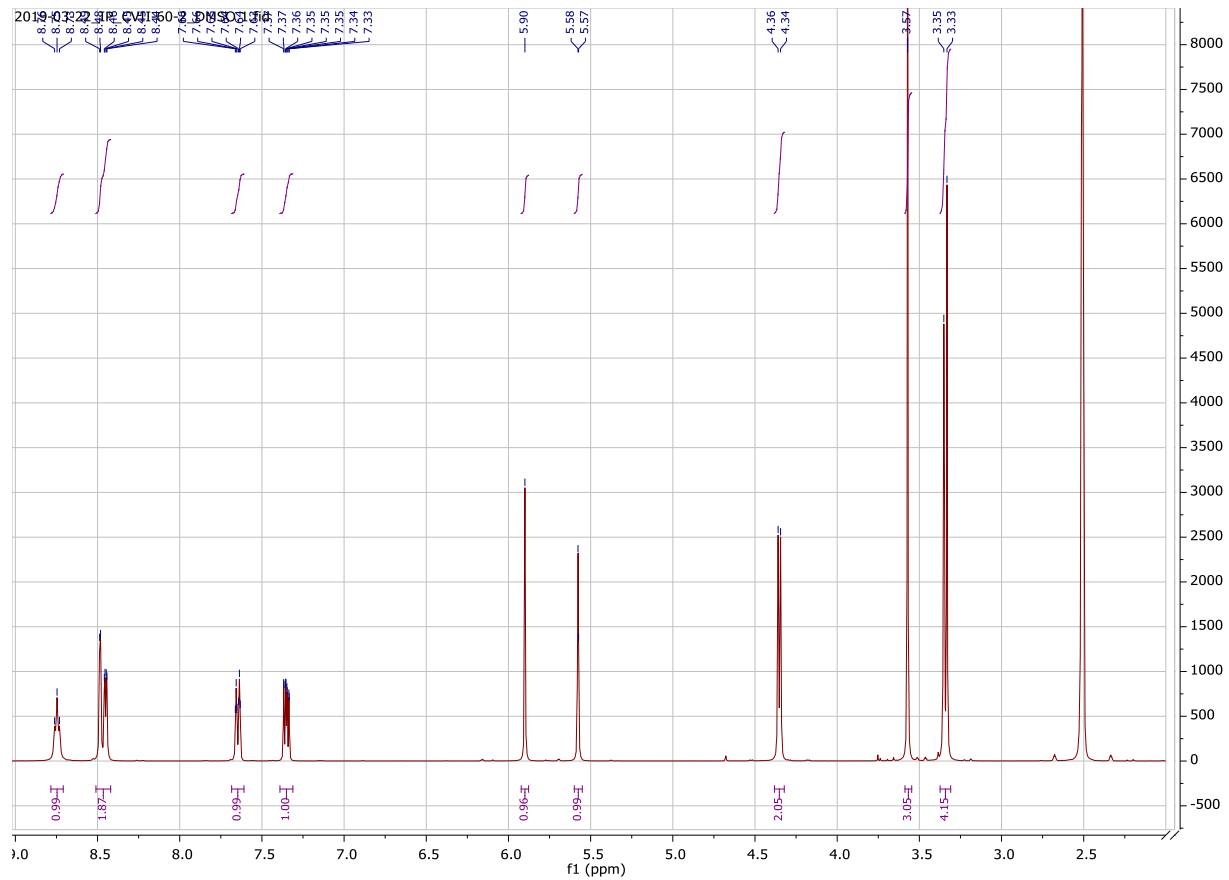


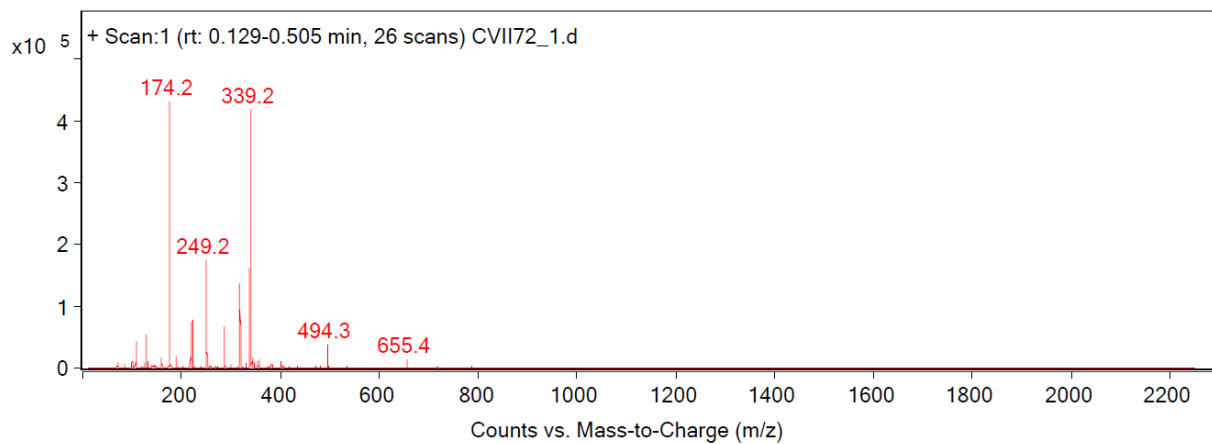
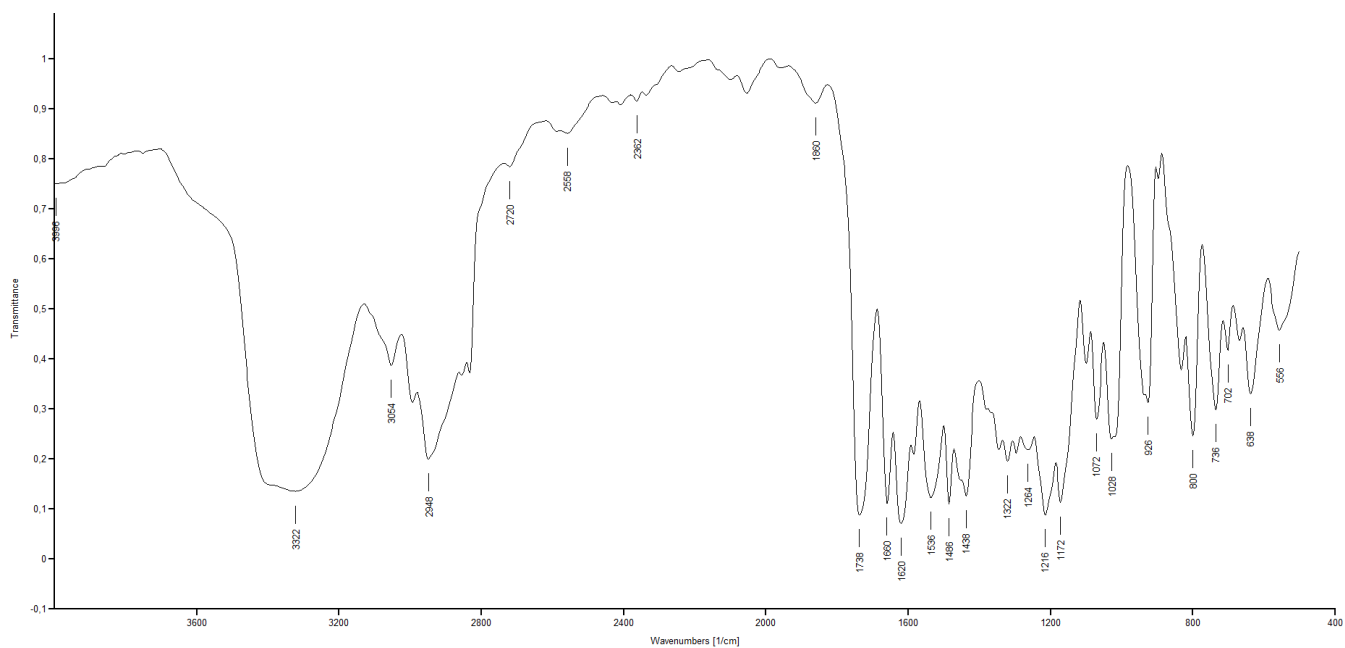
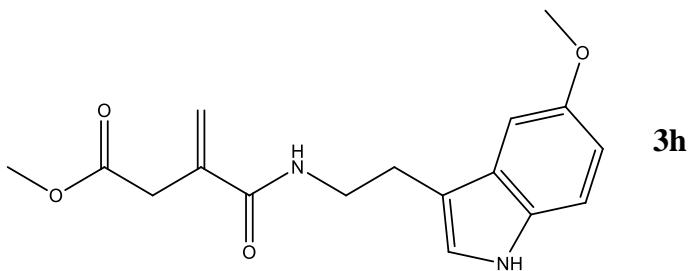


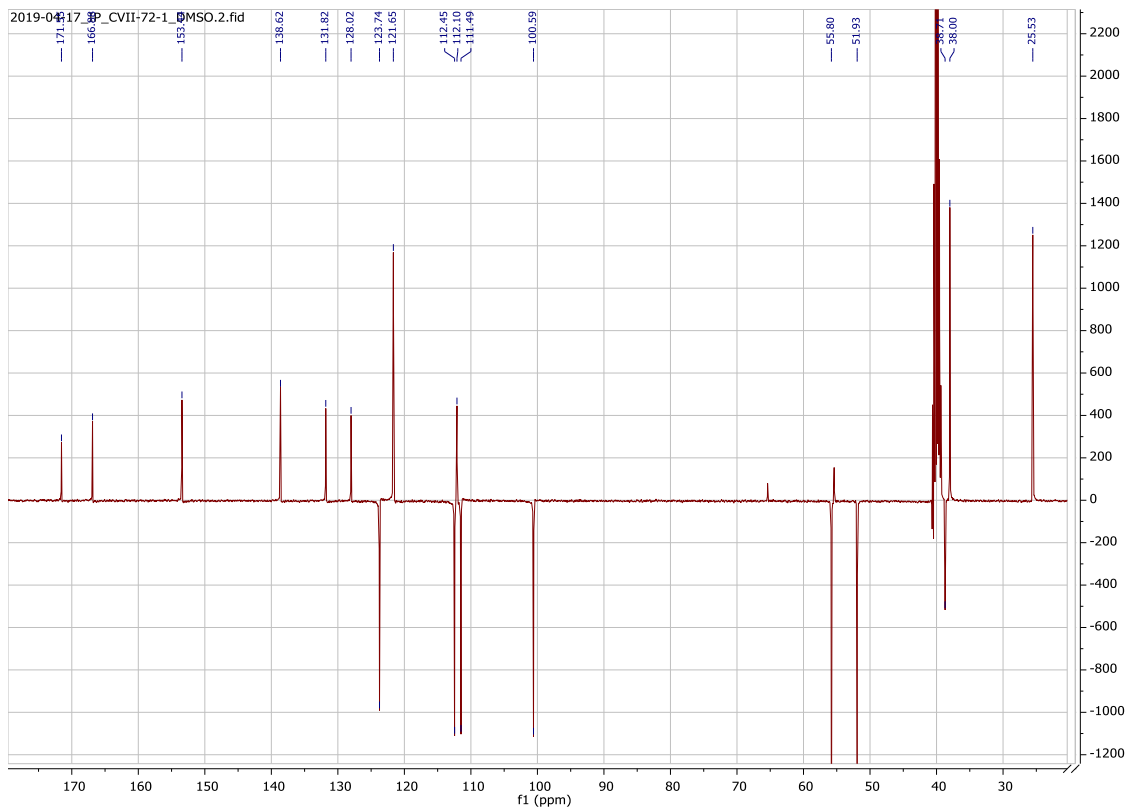
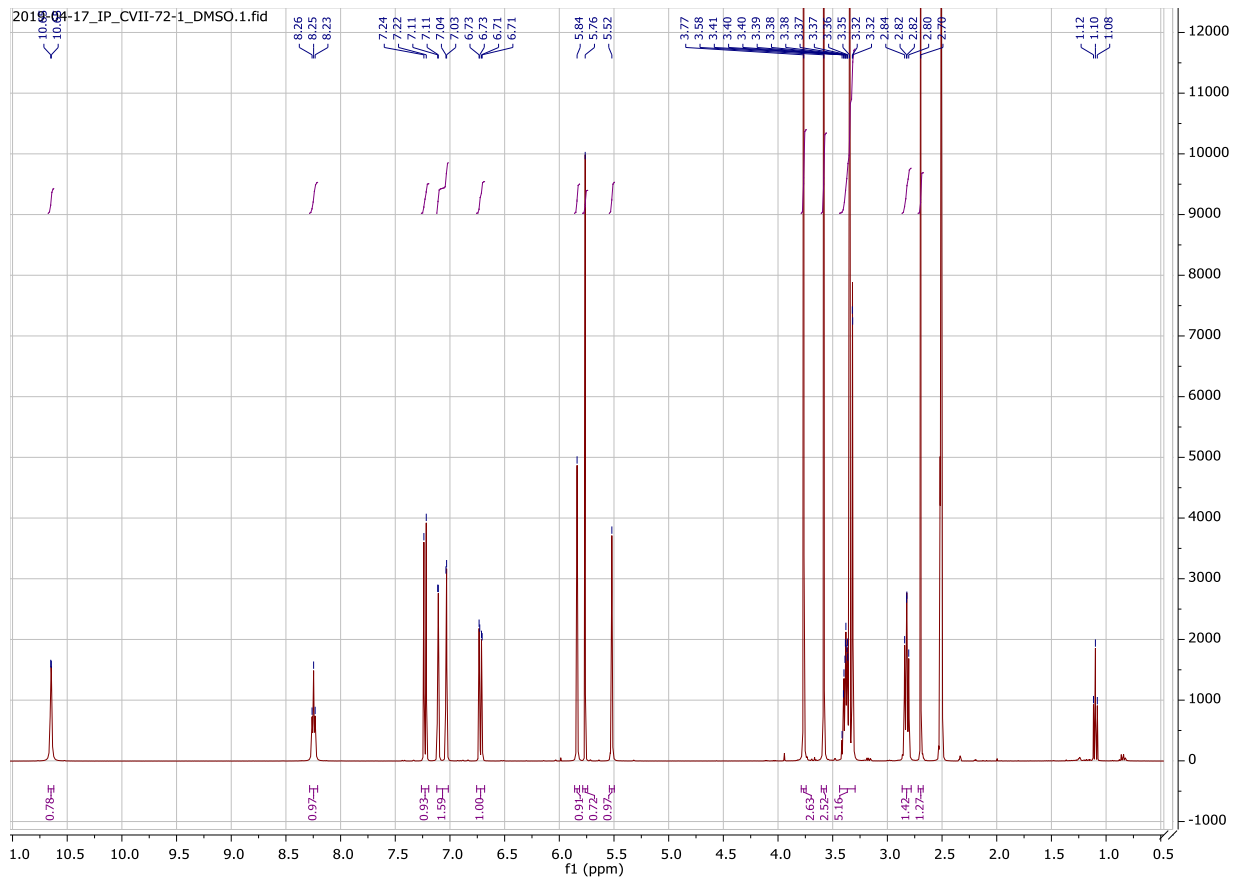














## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Sinteza i karakterizacija novih amidnih derivata itakonske kiseline

Vedran Katušić

### SAŽETAK

Itakonska kiselina u svojoj strukturi posjeduje  $\alpha,\beta$  konjugirane nezasićene veze što je čini Michaelovim akceptorom u reakcijama Michaelove adicije. Takvi spojevi se mogu ireverzibilno vezati na nukleofile u biološkim makromolekulama te na taj način inhibirati njihovu aktivnost. U ovom radu sintetizirano je osam novih derivata metilnog estera itakonske kiseline, 3a-h. Derivati 3a-f dobiveni su iz kiselinskog klorida monometil itakonata 2 u reakciji s odgovarajućim aminom. Derivati 3g i 3h dobiveni su metodom HATU couplinga uz DIEA kao bazu.

Svim sintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, MS), a krutinama je određeno talište. Za sve spojeve računalno su predviđena fizikalno-kemijska svojstva i neka farmakokinetička svojstva. In vitro antitumorska aktivnost protiv različitih staničnih linija karcinoma i antivirusna aktivnost biti će ispitana u daljnjim istraživanjima na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu..

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

Rad sadrži: 65 stranice, 15 grafička prikaza, 8 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Michaelov akceptor, itakonska kiselina, amidi, sinteza

Mentor: **Dr. sc. Ivana Perković**, docentica *Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivana Perković**, docentica *Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

**Dr. sc. Davor Šakić**, docent *Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

**Dr. sc. Maja Beus**, asistentica *Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: prosinac 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical chemistry  
A Kovacica 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Synthesis and characterization of novel itaconic acid amide derivatives

Vedran Katušić

#### SUMMARY

Itaconic acid has  $\alpha,\beta$  conjugated bonds in its structure, which makes it an Michael acceptor in Michael's addition reactions. Michael acceptors can irreversibly bind to nucleophiles in biological macromolecules and irreversibly inhibit their activity. In this thesis eight novel derivatives of itaconic acid, 3a-h were synthesized. Derivatives 3a-f were obtained from the acyl chloride of monomethyl itaconate (2) in the reaction with the corresponding amine. Derivatives 3g and 3h were obtained using the standard HATU coupling method in the presence of DIEA as a base.

Structures of the newly synthesized compounds were confirmed by usual analytical and spectroscopic methods (IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, MS) and melting points were determined for solids. Some physicochemical and some pharmacokinetic properties were calculated for the final products using computational methods. In vitro antitumor and antiviral activity will be explored in the continuation of this research.

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

Thesis includes: 65 pages, 15 figures, 8 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Michael acceptor, itaconic acid, amides, synthesis

Mentor: **Ivana Perković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivana Perković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Davor Šakić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Beus, Ph.D.** Postdoktorand, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: December 2020.

