Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

**Maja Beus, Tomislav Ubrekić i Josipa Vidović**

**Sinteza pirazinskih analoga antitumorskog lijeka sorafeniba**

Zagreb, 2014.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Zrinke Rajić Džolić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2013./2014.

**KRATICE**

|  |  |
| --- | --- |
| BtH  EGFR  Erk  FDA  IGF INN  MAPK  MCL  MEK  PDGF  PDGFR  SAR  TEA  VEGF VEGFR | benzotriazol  receptor za epidermalni faktor rasta (*epidermal growth factor receptor*)  kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (*extracellular signal-regulated kinase*)  Agencija za hranu i lijekove (*Food and drug administration*)  faktor rasta sličan inzulinu (*insulin-like growth factor*)  međunarodno nezaštićeno ime (*international non‐proprietary name*)  proteinska kinaza aktivirana mitogenom (*mitogen-activated protein kinase*)  mijeloična leukemija (*myeloid cell leukemia*)  proteinska kinaza aktivirana mitogenom (*mitogen-activated protein kinase kinase*)  trombocitni faktor rasta (*platelet-derived growth factor*)  receptor za trombocitni faktor rasta (*platelet-derived growth factor receptor*)  odnos između strukture i djelovanja (*structure-activity relationship*)  trietilamin  vaskularni endotelni faktor rasta (*vascular endothelial growth factor*)  receptor za vaskularni endotelni faktor rasta (*vascular endothelial growth factor receptor*) |

**SADRŽAJ**

[1. Uvod 1](#_Toc386546488)

[1.1. Signalni put MAP kinaze 2](#_Toc386546489)

[1.1.2. Uloga signalnog puta MAP kinaze u nastanku karcinoma 3](#_Toc386546490)

[1.2. Sorafenib 4](#_Toc386440650)

[1.2.1. Dizajniranje sorafeniba 4](#_Toc386440651)

[1.2.2. Mehanizam djelovanja sorafeniba 5](#_Toc386440652)

[1.2.3. Vezno mjesto za sorafenib 7](#_Toc386440653)

[1.3. Analozi sorafeniba 8](#_Toc386440654)

[1.3.1 Regorafenib 8](#_Toc386440655)

[1.3.2 Vemurafenib 9](#_Toc386440656)

[1.3.3. Dabrafenib 10](#_Toc386440657)

[1.3.4. RAF265 1](#_Toc386440658)1

[1.4. Literaturni pregled sinteze derivata sorafeniba 11](#_Toc386440659)

[2. Opći i specifični ciljevi rada 19](#_Toc386440660)

[3. Materijali i metode 21](#_Toc386440661)

[3.1. Sinteza amida 5-klor-2-pirazinkarboksilne kiseline 1–6 23](#_Toc386440662)

[3.1.1. 5-Klor-*N*-metilpirazin-2-karboksamid (1) 23](#_Toc386440663)

[3.1.2. *N*-(2-hidroksietil)-5-klorpirazin-2-karboksamid (2) 23](#_Toc386440664)

[3.1.3. *N*-ciklopentil-5-klorpirazin-2-karboksamid (3) 24](#_Toc386440665)

[3.1.4. *N*-cikloheksil-5-klorpirazin-2-karboksamid (4) 24](#_Toc386440666)

[3.1.5. 5-Klor-*N*-(4-klor-3-(trifluormetil)fenil)pirazin-2-karboksamid (5) 25](#_Toc386440667)

[3.1.6. *N*-(benziloksi)-5-klorpirazin-2-karboksamid (6) 25](#_Toc386440668)

[3.2. Sinteza eter-amida 7, 8 26](#_Toc386440674)

[3.2.1. 5-(4-aminofenoksi)-*N*-ciklopentilpirazin-2-karboksamid (7) 26](#_Toc386440675)

[3.2.2. 5-(4-aminofenoksi)-*N*-cikloheksilpirazin-2-karboksamid (8) 27](#_Toc386440676)

[3.3. Sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (9) 27](#_Toc386440669)

[3.4. Sinteza benzotriazolida *p*-aminofenola 10 27](#_Toc386440670)

[3.5. Sinteza urea 11, 12 28](#_Toc386440671)

[3.5.1. 1-Ciklopentil-3-(4-hidroksifenil)urea (11) 28](#_Toc386440672)

[3.5.2. 1-(4-Klor-3-(trifluormetil)fenil)-3-(4-hidroksifenil)urea (12) 28](#_Toc386440673)

[3.6. Sinteza urea-eter-amida 13–19 29](#_Toc386440677)

[3.6.1. 1-(4-Klor-3-(trifluormetil)fenil)-3-(4-(5-(metilkarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil) urea (13) 29](#_Toc386440678)

[3.6.2. 1-(4-(5-((2-Hidroksietil)karbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil)fenil)urea (14) 30](#_Toc386440679)

[3.6.3. 1-(4-(5-(Ciklopentilkarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil)fenil)urea (15) 30](#_Toc386440680)

[3.6.4. 1-(4-(5-(Cikloheksilkarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil)fenil)urea (16) 31](#_Toc386440681)

[3.6.5. 1-(4-(5-((4-Klor-3-(trifluormetil)fenil)karbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil)fenil)urea (17) 32](#_Toc386440682)

[3.6.6. 1-(4-(5-(Benziloksikarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil)fenil)urea (18) 32](#_Toc386440683)

[3.6.7. 1-Ciklopentil-3-(4-(5-(ciklopentilkarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)urea (19) 33](#_Toc386440684)

[4. Rezultati i rasprava 34](#_Toc386440685)

[5. Zaključak 50](#_Toc386440686)

[6. Zahvale 52](#_Toc386440686)

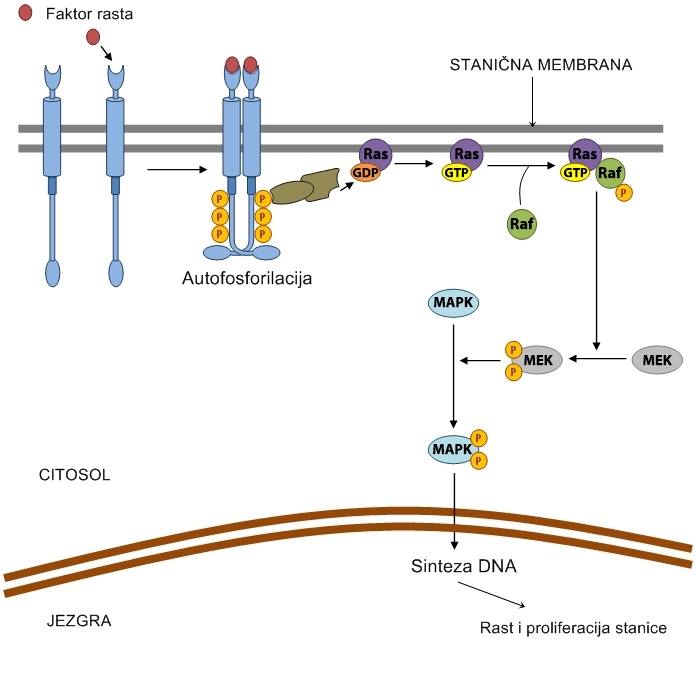
[7. Literatura 54](#_Toc386440687)  
[8. Sažetak 59](#_Toc386440686)

[9. Summary 61](#_Toc386440686)  
[10. Prilozi 63](#_Toc386440686)

# Uvod

* 1. **Signalni put MAP kinaze**

Signalni put MAP kinaze (MAPK signalni put, odnosno Ras-Raf-Mek-Erk signalni put) predstavlja kaskadnu reakciju koja ima važnu ulogu u prijenosu izvanstaničnih signala kroz citosol sve do jezgre (Slika 1). Sudjeluje u modulaciji staničnih funkcija kao što su rast stanice, proliferacija, pokretljivost i preživljavanje. Ta kaskada je evolucijski očuvana sve do danas što ukazuje na njezinu važnost. Potrebno je napomenuti da put kroz koji signal prolazi nije uvijek linearan, već postoji mnoštvo proteina koji također ulaze u interakcije s proteinima ovog signalnog puta (Matallanas i sur., 2011).



Slika 1. MAPK signalni put

Središnju ulogu u ovom prijenosu signala imaju Raf proteini koje ubrajamo u porodicu serin/treoninskih kinaza. Raf postoji u tri izoforme: A-Raf, B-Raf i C-Raf, koji se još naziva i Raf-1 (Wan i sur., 2004). Potječu iz nezavisnih gena nađenih u sisavaca, te sve mogu aktivirati MAPK put. Raf na regulatornom *N*-terminalnom kraju sadrži domenu koja veže Ras, dok se na katalitičkom *C*-terminalu nalazi kinazna domena čija je fosforilacija nužna za aktivnost (Matallanas i sur., 2011).

Kaskadna reakcija uključuje niz fosforilacija, a započinje vezanjem faktora rasta (kao što su VEGF, PDGF, IGF-1), raznih citokina i hormona na receptor, odnosno na receptorsku protein tirozinsku kinazu. Vezanjem na izvanstaničnu domenu receptora oni potiču konformacijske promjene koje dovode do interakcija između receptora i njihove dimerizacije. Takvo udruživanje receptora ima za posljedicu autofosforilaciju, odnosno unakrsnu fosforilaciju dvaju polipeptidnih lanaca receptora, što dovodi do vezanja GTP-a za Ras i aktivacije Ras-a, koji je inače vezan za staničnu membranu u inaktivnom obliku s GDP-om. Aktivan Ras protein veže se u kompleks s Raf proteinom, koji se zatim fosforilira i aktivira MEK fosforilacijom. Idući korak je aktivacija Erk-a fosforilacijom te je on ključan u prijenosu signala. Fosforilacija Erk-a uzrokuje daljnju fosforilaciju proteina u jezgri i citoplazmi, te transkripcijskih faktora koji odlaze u jezgru i na taj se način kontrolira ekspresija gena (Cooper i Hausman, 2010).

## 1.1.2. Uloga signalnog puta MAP kinaze u nastanku karcinoma

Budući da MAPK signalni put ima važnu ulogu u prijenosu izvanstaničnih signala kroz citosol sve do jezgre, promjene u aktivaciji signalizacije MAPK signalnog puta imaju važnu ulogu u nastanku karcinoma, uključujući nekoliko vrsta dobro prokrvljenih solidnih tumora i hematoloških malignih bolesti. Izoforme Raf-a su prve kinaze u MAPK kaskadi, što ih čini glavnim regulatorima stanične proliferacije i preživljavanja.

Divlji tip Raf-1 može produljiti život stanice direktnom interakcijom s antiapoptotičkim i apoptotičkim proteinima neovisno o MAPK signalizaciji (Kolch i sur., 2002). Hiperaktivacija Raf-1 u odsutnosti onkogenih mutacija uobičajena je u karcinomu bubrežnih (50 %) i jetrenih stanica (100 %) (Hwang i sur., 2004; Oka i sur., 1995). Kasid i suradnici su 1989. godine pomoću specifičnog *antisense* oligonukleotida promijenili *raf1* gen u stanicama karcinoma pluća, dojke i jajnika te dokazali da ova promjena inhibira rast tih tumora u atimičnim miševima, što je bio prvi dokaz da je *raf1* gen dobra meta za liječenje karcinoma (Kasid i sur., 2003).

Tijekom osamdesetih godina prošlog stoljeća došlo je do velikih otkrića u razumijevanju nastanka karcinoma, što je dovelo i do napretka u dizajniranju novih citostatika. Umjesto dizajniranja nespecifičnih citostatika koji su djelovali štetno na sve stanice, fokus se prebacio na racionalno dizajniranje lijekova čije je djelovanje usmjereno na signalne putove specifične za nastanak karcinoma.

* 1. **Sorafenib**

Sorafenib inhibira više tirozin-kinaza, posebno tirozin-kinazne domene dvaju podtipova receptora za VEGF (VEGFR2 i VEGFR3), receptora za trombocitni faktor rasta-β (PDGFR-β), a inhibira i Raf (Slika 2) (Katzung i sur., 2011). On je jedini lijek odobren za liječenje uznapredovalog hepatocelularnog karcinoma, a koristi se i za liječenje uznapredovalog metastatskog karcinoma bubrežnih stanica. Najčešće nuspojave su umor, mučnina, dijarea, anoreksija i osip. Rjeđe nuspojave su supresija koštane srži i gastrointestinalne perforacije (Chabner i sur., 2011).



Slika 2. Sorafenib

* + 1. **Dizajniranje sorafeniba**

Devedesetih godina prošlog stoljeća započeli su Bayer i Onyx u suradnji istraživanja novih lijekova čije bi djelovanje bilo usmjereno na Ras-Raf-MEK-Erk signalni put. Pretraživanjem visokog kapaciteta testirano je inhibitorno djelovanje 200 000 spojeva na Raf. Ovo istraživanje dovelo je do otkrića 3-tienil uree (spoj **I**), obećavajućeg spoja s inhibitornim djelovanjem na Raf-1 u mikromolarnim koncentracijama (Slika 3). Djelovanje spoja **I** se udeseterostručilo uvođenjem metilne supstitucije na benzenski prsten (spoj **II**) (Wilhelm i sur., 2006).

Kako bi se dodatno poboljšalo inhibitorno djelovanje na Raf-1, sintentizirano je oko 1000 analoga bis-arilnih urea te im je ispitana aktivnost. Na taj način otkriven je spoj **III**, čije je djelovanje bilo nešto snažnije od djelovanja spoja **II**. Zamjenom distalnog benzenskog prstena piridinom, dobiven je spoj **IV** koji je imao značajno snažnije inhibitorno djelovanje, smanjenu lipofilnost i povećanu topljivost u vodi (Wilhelm i sur., 2006).

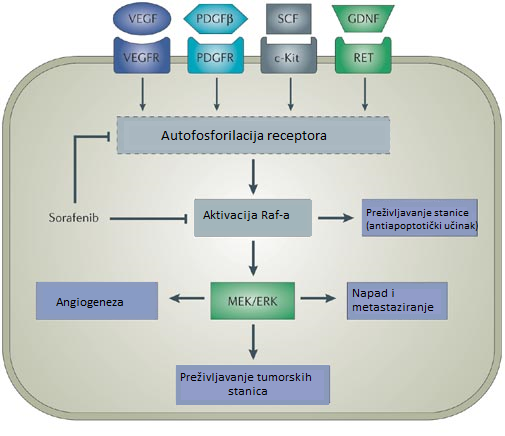
Daljnim proučavanjem SAR-a primijećeno je da je za inhibitorno djelovanje važna urea, dok je prstenove moguće zamijeniti. Zadržavanjem difeniluree i modifikacijom piridinskog prstena dizajniran je sorafenib, koji djelotvoran u nanomolarnim koncentracijama (Wilhelm i sur., 2006).



Slika 3. Ključne strukture u razvoju sorafeniba

* + 1. **Mehanizam djelovanja sorafeniba**

Do danas su poznata tri mehanizma djelovanja sorafeniba: inhibicija MAPK signalnog puta, inhibicija angiogeneze i indukcija apoptoze (Slika 4) (Wilhelm i sur., 2004).

****

Slika 4. Mehanizam djelovanja sorafeniba

Zbog inhibicije MAPK signalnog puta, sorafenib ima široki spektar djelovanja na tumorske stanice (Matallanas i sur., 2011). Izdravno blokira autofosforilaciju nekoliko tirozin-kinaznih receptora (VEGFR1, 2 i 3, PDGFRβ, c-Kit i RET) i inhibira izoforme Raf-a (divlji tip Raf-1, B-Raf i mutirani *b-raf* V600E) u staničnim linijama. Snažno inhibira i VEFG- i PDGFβ-stimuliranu fosforilaciju VEGFR2 i PDGFRβ receptorskih tirozin-kinaza. U potpunosti zastavilja rast sljedećih tumorskih staničnih linija: kolona (HT-29 i Colo-205), dojke (MDA-MB-231 s G463 *b-raf* i *k-ras* onkogenima), jajnika (SK-OV-3), gušterače (*k-ras* pozitivne MIA PaCa2 stanice), melanoma (LOX, UACC903, 1205 Lu s *b-raf*  V600E) i štitnjače (Carlomagno i sur., 2006;.Wilhelm i sur., 2006; Sharma i sur., 2005; Wilhelm i sur., 2004).

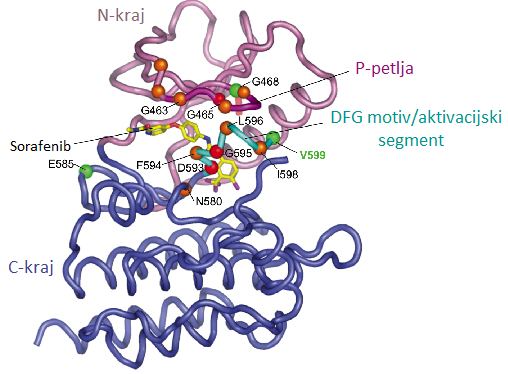
Antikancerogeno djelovanje sorafeniba na stanice makrocelularnog karcinoma pluća (A549 i NCI-H460) te na stanice karcinoma kolona (Colo-205) neovisno je o inhibiciji MAPK signalnog puta i bez vidljivog je smanjenja fosforilacije Erk-a. Inhibicija rasta tumora postignuta je inhibicijom tumorske angiogeneze. Nadalje, na modelu tumora bubrega dokazano je da sorafenib, inhibicijom receptora endotelnog (VEGFR2) i pericitnog (PDGFRβ) faktora rasta, inhibira angiogenezu, dok je na modelima karcinoma dojke (MDA-MB-231) i kolona (HT-29) dokazano da sorafenib ispoljava antikancerogeno djelovanje inhibicijom MAPK signalnog puta i inhibicijom angiogeneze (Wilhelm i sur., 2006).

Smanjenjem razine antiapoptotičkog proteina MCL1, sorafenib inducira apoptozu sljedećih tumorskih stanica: bubrega (ACHN), kolona (HT-29), dojke (MDA-MB-231), bilijarnog trakta (KMCH), te stanica leukemije (Jurkat, K562, MEC-2) (Yu i sur., 2005). U stanicama melanoma također inducira apoptozu neovisno o MEK/Erk signalnom putu, ali u ovim stanicama do apoptoze dolazi zbog translokacije nuklearnog faktora apoptoze (Panka i sur., 2006; Wilhelm i sur., 2006).

* + 1. **Vezno mjesto za sorafenib**

Wan i suradnici pripravili su kristal sorafeniba i B-Raf-a (divljeg i mutiranog tipa), te kristal sorafeniba i Raf-1 (Slika 5).Distalni piridinski prsten sorafeniba zauzima ATP adeninsko vezno mjesto kinazne domene interakcijom s tri aromatska ostatka: triptofanom u zglobnom dijelu, fenilalaninom na kraju katalitičke petlje, te fenilalaninom u DFG motivu koji je također u kontaktu sa središnjim benzenskim prstenom sorafeniba. Benzenski prsten s trifluormetilnom skupinom uklapa se u hidrofobni džep kojeg tvore αC i αE uzvojnice *N*-terminalnih regija DFG motiva i katalitičke petlje, dok je središnji benzenski prsten sorafeniba u kontaktu s postraničnim alifatskim lancima lizina, leucina i treonina (Wan i sur., 2004).

Iako su van der Waalsove interakcije najbrojnije pri vezanju sorafeniba za B-Raf, polarne interakcije također pridonose vezanju. Urea sorafeniba tvori dvije vodikove veze s proteinom – jednu putem dušika uree s karboksilatom postraničnog lanca glutamata, a drugu putem karbonilne skupine uree s dušikom glavnog lanca aspartata DFG motiva. Dušik piridinskog prstena tvori vodikovu vezu s dušikom cisteina u zglobnoj regiji interdomene glavnog lanca, dok je dušik amida na piridinskom prstenu u kontaktu s karbonilom cisteina glavnog lanca (Wan i sur., 2004).



Slika 5. Shematski prikaz kompleksa sorafeniba i kinazne domene B-Raf-a

* 1. **Analozi sorafeniba**

**1.3.1. Regorafenib**

Regorafenib (BAY 73-4506, Stivarga®) je međunarodno nezaštićeno ime (INN) 4-[4-({[4-kloro-3-(trifluormetil)fenil]karbamoil}amino)-3-fluorfenoksi]-*N*-metilpiridin-2-karboksamid hidrata (Slika 6).FDA je odobrila stavljanje regorafeniba u promet 27. 9. 2012. godine. Ovaj lijek odobren je kao *orphan* lijek, budući da se koristi za liječenje rijetkih i teških bolesti (www.cancer.gov).



Slika 6. Struktura regorafeniba

Regorafenib je oralni multikinazni inhibitor koji inhibira tirozin-kinazne domene VEGFR-1, VEGFR-1, receptor faktora rasta fibroblasta-1, te mutirane onkogene kinaze KIT, RET i B-Raf (Cooper i Hausman, 2010).Koristi se za liječenje metastatskog kolorektalnog karcinoma kod pacijenata koji su prethodno liječeni fluoropirmidinom, oksaliplatinom, anti-VEGF terapijom (bevacizumab, ziv-aflibercept) i anti-EGFR terapijom (cetuksimab, panitumumab) (reference.medscape.com).Regorafenib se također koristi za liječenje neoperabilnih gastrointestinalnih stromalnih tumora koji više ne reagiraju na drugu terapiju (imatinib, sunitinib) (reference.medscape.com).Nuspojave su česte kod liječenja regorafenibom, a uključuju: anemiju (79 %), povišenje koncentracije aspartat-aminotransferaze u plazmi (65%), gubitak snage (64 %), proteinuriju (60 %), hipokalcemiju (59 %), hipofosfatemiju (57 %), limfopeniju (54 %), smanjeni apetit i unos hrane (47 %), povišenje koncentracije lipaza (46 %), *hand-foot* kožni osip (45 %), hiperbilirubinemiju (45 %), povišenje koncentracije alanin-aminotransferaze u plazmi (45 %), te dijareu (43 %) (reference.medscape.com).

**1.3.2. Vemurafenib**

Vemurafenib (PLX4032, RG7204, RO5185426, Zelboraf®) međunarodno je nezaštićeno ime *N*-(3-{[5-(4-klorofenil)-1*H*-pirolo-[2,3-b]piridin-3-il]karbonil}-2,4-difluorofenil)propan-1-sulfonamida (Slika 6). FDA je odobrila njegovo stavljanje u promet 17.8.2011. godine. Vemurafenib je oralni inhibitor B-Raf-a, a ime je dobio na temelju mutiranog gena za B-Raf (V600E mutirani *b-raf* gen). V600E mutacija je zamijena valina glutaminskom kiselinom na položaju 600 B-Raf-a. B-Raf normalno je uključen u regulaciju staničnog rasta, no mutiran je kod ~50 % pacijenata s terminalnim stadijom melanoma. Koristi se za liječenje pacijenata s metastatskim ili neoperabilnim melanomom kod kojih postoji mutacija gena *b-raf* V600E. Kod pacijenata bez te mutacije nije primjenjivan. Nacionalni institut za tumore u SAD-u procjenjuje kako je u 2010. godini dijagnosticiralno 68130 novih slučaja melanoma, te je otprilike 8700 pacijenata preminulo od te bolesti u SAD-u (www.fda.gov).



Slika 7. Struktura vemurafeniba

Neke od češćih nuspojava su artralgija (53–67 %), umor (38–54 %), osip (37–52 %), fotosenzitivnost (33–49 %), alopecija (36–45 %), mučnina (35–37 %), svrbež (23–30 %), dijarea (28–29 %), hiperkeratoza (24–28 %), glavobolja (23–27 %), povraćanje (18–26 %), te mijalgija (13–24 %) (refererence.medscape.com).

**1.3.3. Dabrafenib**

Dabrafenib (Tafinlar®) međunarnodno je nezaštićeno ime *N*-{3-[5-(2-aminopirimidin-4-il)-2-*tert*-butil-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobenzensulfon-amida (Slika 8). Stavljanje dabrafeniba u promet FDA je odobrila 29.3.2013. godine (www.fda.gov).



Slika 8. Struktura dabrafeniba

Dabrafenib se koristi za liječenje pacijenata s neoperabilnim ili metastatskim melanomom kod kojeg je došlo do V600E mutacije *b-raf* gena. Nije indiciran za liječenje pacijenata s divljim tipom B-Raf melanoma, budući da postoji potencijalni rizik od promocije tumora. Istovremeno s odobrenjem dabrafeniba, FDA je odobrila i THxID BRAF test za otkrivanje navedene mutacije (www.fda.gov). Neke od češćih nuspojava kod liječenja dabrafenibom: hiperglicemija (50 %), hipofosfatemija (37 %), hiperkeratoza (37 %), glavobolja (28 %), artralgija (27 %), alopecija (22 %), povišenje koncentracije alanin-aminotransferaze u plazmi (19 %), osip (17 %), bol u leđima (12 %), mijalgija (11 %), te konstipacija (11 %) (reference.medscape.com).

**1.3.4. RAF265**

RAF265 je oralni citostatik, koji je trenutno u fazi 1b kliničkih ispitivanja u kombinaciji s MEK162 kod odraslih pacijenata s naprednim karcinomima s mutacijama na RAS-u ili B-Raf V600E (Slika 9.). RAF265 je pokazao selektivnu inhibitornu aktivnost u biokemijskim ispitivanjima i *in vivo* modelima na Raf-u, uključujući B-Raf (divlji tip), Raf-1 (C-Raf), te mutirani B-Raf V600E.*In vitro*, RAF265 pokazuje antiangiogenu aktivnost kroz inhibiciju fosforilacije VEGFR -2 (Garcia-Echeverria, 2009; Amiri i sur., 2006). U *in vitro* istaživanjima na imunodeficijentnim miševima (bez timusa), RAF265 je uzrokovao regresiju tumora ovisnu o dozi (www.novartisoncology.com).



Slika 9. Struktura RAF265

**1.4. Literaturni pregled sinteze derivata sorafeniba**

Početna metoda sinteze sorafeniba zahtijevala je pročišćavanje kromatografijom u skoro svim koracima sinteze zbog čega je ukupno iskorištenje bilo 10 %. Kako bi postigli bolje ukupno iskorištenje, Bankston i suradnici poboljšali su metodu sinteze sorafeniba i time izbjegli upotrebu kromatografije (Slika 10).U prvom koraku se početni reaktant (**V**) grije u prisutnosti Vilsmeierovog reagensa šesnaest sati, pri čemu nastaje kiselinski klorid (**VI**) (Meyer i sur., 2006). U drugom koraku kiselinski klorid reagira s metanolom pri sobnoj temperaturi kako bi se dobio ester (**VII**). Amidacijom spoja **VII** metilaminom u THF-u i kasnijom prekristalizacijom iz etil-acetata nastaje ključni međuprodukt **VIII**. Idući korak u sintezi je reakcija dobivenog amida s *p*-hidroksianilinom, u bezvodnom DMF-u u prisutnosti 1 ekvivalenta kalijevog *t*-butoksida i 0,5 ekvivalenata kalijevog karbonata, čime je dobiven spoj **IX**. Primijećeno je da prisutnost kalijevog karbonata znatno skraćuje vrijeme trajanja reakcije. U zadnjem koraku sinteze spoj **IX** reagira s izocijanatom i nastaje sorafenib. Ukupno iskorištenje sinteze ovom metodom je 63 % (Bankston i sur., 2008).



Slika 10. Sinteza sorafeniba

Yao i suradnici sintentizirali su niz derivata diaril-tiourea po uzoru na sorafenib. Antikancerogeni učinak ispitan je *in vitro* na staničnim linijama kolorektalnog karcinoma (HCT116) i karcinoma dojke (MDA-MB-231). Među 20 sintentiziranih spojeva, derivati **X-XIV** pokazali su snažnije citotoksično djelovanje na stanice od samog sorafeniba (Slika 11).Uočeno je da duljina i oblik supstituenta u amidnom dijelu utječe na citotoksičnu aktivnost, pri čemu dulje skupine (npr. *n-*butilna i benzilna skupina) smanjuju djelovanje. Jedino su spojevi s metilnom skupinom iskazali inhibitorno djelovanje na MDA-MB-231 stanice, kao i na HCT-116 stanice, dok su spojevi s cikloheksilnom skupinom djelovali samo na HCT-116 stanice, ali su imali snažnije djelovanje u usporedbi sa spojevima s metilnom skupinom. Supstitucija na terminalnom aromatskom prstenu utječe na selektivnost djelovanja spoja, što je primijećeno kod djelovanja spojeva s metilnom skupinom (Yao i sur., 2012a).



Slika 11. Aktivni derivati diaril-tiourea

Holladay i suradnici sitentizirali su niz diaril-urea s 4-kinazolinskim supstituentom u *p*-položaju (Slika 12). Prema rezultatima SAR analiza, spojevi vezani preko atoma u *m*-položaju trebali bi imati veći afinitet vezanja za B-Raf u odnosu na *p*-položaj, što je ovom studijom i dokazano. Na Slici 10. prikazani su spojevi vezani na kinazolin preko NH-, O- ili S- skupine u *m*-položaju središnjeg benzenskog prstena. Svi navedeni derivati imali su veliki afinitet vezanja za B-Raf i snažno citotoksično djelovanje u nanomolarnim koncentracijama. Među navedenim spojevima spoj s NH-skupinom imao je najveću specifičnost za enzim, najveći afinitet, te najsnažnije citotoksično djelovanje. Međutim, spoj s NH-skupinom je tijekom testiranja na štakorima pokazao i najlošija farmakokinetička svojstva u usporedbi s *m-*O- i *m*-S-derivatima, zbog čega je u daljnim istraživanjima fokus stavljen na spojeve s *m­*-O-poveznicom između kinazolinske skupine i središnjeg benzenskog prstena (Holladay i sur., 2011).



Slika 12. Diaril-uree s 4-kinazolinskim supstituentom u *m*-položaju

Na temelju gore navedenog rada, Yao i suradnici sintentizirali su niz derivata *m*-hidroksianilina. Među 23 sintentizirana derivata, posebno su se istaknuli spojevi **XV-XVIII** (Slika 13). Antiproliferativna aktivnost svih derivata ispitana je na staničnim linijama kolorektalnog karcinoma (HTC11), karcinoma dojke (MDA-MB-231) i karcinoma prostate (PC-3), u usporedbi sa sorafenibom. Spojevi **XV** i **XVII** pokazali su antiproliferativnu aktivnost sličnu sorafenibu, dok je spoj **XVIII** pokazao snažnije djelovanje na sve tri stanične linije u odnosu na sorafenib. U prijašnjem radu istih autora(Yao i sur., 2012a), samo spojevi s metilamidom pokazali su antiproliferativnu aktivnost, dok je u ovom radu uočeno da veća amidna skupina pridonosi snažnijem citotoksičnom djelovanju. Spojevi s benzilamidnom ili cikloheksilamidnom skupinom imali su snažnije djelovanje u odnosu na druge skupine, dok su spojevi s metilamidnom skupinom pokazali relativno slabo citotoksično djelovanje. Što se tiče supstitucija na terminalnom benzenskom prstenu, spojevi s 3-CF3 i 4-Cl supstituentom imali su najsnažnije citotoksično djelovanje (Yao i sur,. 2012b).



Slika 13. Aktivni derivati diaril-tiourea pripravljeni *m*-hidroksianilinom

Sun i suradnici su na temelju sorafeniba kao vodećeg spoja sintetizirali dvije nove serije diaril-urea koje sadrže tiazolski i imidazolski prsten. Antitumorski efekt je ispitivan inhibicijom *in vitro* rasta staničnih linija makrocelularnog karcinoma pluća (A549) i karcinoma dojke (MDA-MB-231). Spojevi **XIX-XXII** pokazali su snažnije djelovanje od sorafeniba, pri čemu se izdvaja spoj **XXII** s inhibicijom rasta većom od 80 % (Slika 14). Spojevi s tiazolskim prstenom pokazali su bolje citotoksično djelovanje u odnosu na one s imidazolskim prstenom. Aktivnost spojeva također je pojačala prisutnost elektron-odvlačećih skupina na benzeskom prstenu (CF3, *p*-Cl, *o*-F, *o*-Cl, *m*-Br) (Sun i sur., 2010).



Slika 14. Aktivne diaril-uree s tiazolskim prstenom

Zhan i suradnici sintetizirali su seriju novih diaril-urea koje sadrže triflourmetil-imidazolilnu skupinu (Slika 15). Antiproliferativna aktivnost dobivenih urea ispitana je *in vitro* na tri stanične linije: karcinoma dojke (MDA-MB-231), želudca (BG-823) i jetre (SMMC-7721), te na inhibiciju Raf-a *in vitro.* Spojevi **XXIII-XXV** pokazali su snažnije djelovanje u odnosu na sorafenib, a posebno spoj **XXIII** koji je iskazao 95,3%-tno inhibitorno djelovanje na Raf-1. Zaključeno je da zamjena linearne metilamidne skupine na piridinskom prstenu sorafeniba rigidnom triflourmetilnom skupinom pogoduje antitumorskoj aktivnosti, kao i uvođenje klora na središnji benzenski prsten (Zhan i sur., 2012).



Slika 15. Aktivne diaril-uree s trifluormetil-imidazolilnom skupinom

Zhao i suradnici napravili su novu seriju diaril-urea koje sadrže indazolni prsten (Slika 16). Za ispitivanje antitumorske aktivnosti korištene su stanične linije makrocelularnog karcinoma pluća (NCI-H460 i A549), karcinoma kolona (HT-9 i Lovo), hepatocelularnog karcinoma (HepG2 i Bel-7402), karcinoma bubrega (OS-RC-2), karcinoma želudca (SGC-7901) i karcinoma dojke (MDA-MB-231). Većina spojeva pokazala je jednaku ili bolju aktivnost od sorafeniba, a posebno treba istaknuti spojeve **XXVI-XXVIII**. Spoj **XXVIII** jedini je pokazao aktivnost na sve tumorske stanične linije. Indazolski prsten ima važnu ulogu u antitumorskoj aktivnosti što je dokazano sintezom tri spoja s azaindazolskim prstenom koji su pokazali manju aktivnost. Spojevi s triflourmetilnom skupinom i halogenom u položaju 4 benzenskog prstena također postižu jače djelovanje od sorafeniba (Zhao i sur., 2012).



Slika 16. Aktivne diaril-uree s indazolskim prstenom

Ramurthy i suradnici dizajnirali su seriju benzimidazola kao Raf-inhibitora. Cilj im je bio poboljšati svojstva početnog spoja eliminiranjem funkcionalne skupine uree, te u isto vrijeme zadržati inhibitorno djelovanje protiv Raf-a. Spojevi **XXIX-XXXI** pokazali su najsnažnije inhibitorno djelovanje na B-Raf V600E i na Raf-1 (Slika 17). Opaženo je kako su spojevi s *m*- i *p*-supstituentima na fenilnom prstenu aktivniji od spojeva koji imaju supstituente u *o*-položaju, te da su za inhibitorno djelovanje potrebne elektron-odvlačeće skupine. Najjače antiproliferativno djelovanje na stanične linije melanoma (SK-MEL-28) te na inhibiciju fosforilacije Erk-a *in vitro* na istoj staničnoj liniji pokazali su spojevi **XXXI** i **XXXII** (Ramurthy i sur., 2008).



Slika 17. Derivati benzimidazola kao inhibitori Raf-a

U sljedećem radu, Ramurthy i suradnici dizajnirali su 5,6-kondenzirane heterocikličke amide kao inhibitore Raf-a, te je ispitivana njihova inhibitorna aktivnost prema Raf-1-u i B-Raf-u V600E i inhibicija fosforilacije Erk-a na staničnim linijama melanoma (SK-MEL -28). Sintetizirane serije benzoksazolskih i benzotiazolskih spojeva uspoređivane su s vodećim benzimidazolskim spojevima iz prethodnog rada. Najjače inhibitorno djelovanje na izoforme Raf-a u benzoksazolskoj seriji pokazali su spojevi **XXXIII-XXXV**, dok su spojevi **XXXVI** i **XXXIX** pokazali najveću aktivnost u benzotiazolskoj seriji (Slika 18). Najveću aktivnost u obje serije spojeva pokazali su spojevi koji su imali *t*-butilnu skupinu na fenilnom prstenu u *m*- i *p*-položaju. Spojevi iz novosintetiziranih serija nisu pokazivali aktivnost na staničnim linijama. Budući da je aktivnost tih spojeva niža od spojeva prethodno sintetizirane benzimidazolske serije, daljnja istaživanja su prekinuta (Ramurthy i sur., 2011).



Slika 18. Derivati benzoksazola i benzotiazola kao inhibitori Raf-a

Ramurthy i suradnici također su dizajnirali 6,6-kondenzirane amide, derivate kinazolina, kinolina i kinoksalina (Slika 19). Ispitivanje inhibitorne aktivnost provedeno je *in vitro* na B-Raf-u V600E. Najveću aktivnost pokazali su spojevi **XXXVIII** i **XXXIX** iz kinazolinske serije spojeva. Inhibitorno djelovanje spojeva povećavalo se ako su spojevi imali supstituent u *p*-položaju benzenskog prstena. Međutim, uvođenje većih skupina u *p*-položaj (kao što su fenoksi i 3-piridilna skupina) dovelo je do smanjenja njihovog inhibitornog djelovanja. Najaktivniji spojevi kinolinske i kinoksazolinske serije imali su šest puta snažnije inhibitorno djelovanje od spojeva benzimidazolske serije, koja je prva pripravljena (Ramurthy i sur., 2012).



Slika 19. Derivati kinazolina inhibitori Raf-a

Babić i suradnici sintetizirali su derivate po uzoru na sorafenib koji su se od sorafeniba razlikovali u amidnom dijelu molekule (Slika 20). Antiproliferativno djelovanje spojeva **XL-XLIV** bilo je slično ili snažnije od djelovanja samog sorafeniba. Za ispitivanje citotoksične aktivnosti korištene su stanične linije sljedećih karcinoma: kolona (HCT 116, SW 620), dojke (MCF-7), pluća (H 460), leukemije (L1210), limfoma (CEM), te karcinoma cerviksa (HeLa). Spojevi **XL-XLIV** nisu pokazali selektivnost pri djelovanju na tumorske stanice. Istraživanje je pokazalo da je za antitumorsku aktivnost nužna 4-klor-3-trifluormetilfenilkarbamoilna skupina (Babić i sur., 2012).



Slika 20. Derivati sorafeniba s različitim amidnim dijelom

1. **OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Cilj ovog rada bio je razvoj novog puta sinteze difenil-urea te sinteza šest pirazinskih analoga sorafeniba. U daljnjim istraživanjima koja prelaze okvire ovog rada ispitat će se antitumorsko djelovanje sintetiziranih spojeva.

# Materijali i metode

Tališta (*t*t) su određena na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. Iskorištenja nisu optimirana.

Za tankoslojnu kromatografiju upotrebljene su silikagel ploče 60 F254 (Kemika, Hrvatska), te etil-acetat/petroleter/metanol (3:1:0,1), cikloheksan/etil-acetat/metanol (3:1:0,5), cikloheksan/etil-acetat (3:1), cikloheksan/etil-acetat (1:1), etil-acetat te diklormetan/metanol (98:2), diklormetan/metanol (95:5) kao pokretne faze. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 nm (Merck, Njemačka), a kao pokretne faze etil-acetat/petroleter/metanol (2:2:0,1), etil-acetat/petroleter/metanol (3:1:0,1), petroleter/etil-acetat (1:1), cikloheksan/etil-acetat (1:2), etil-acetat/metanol (2:0,1), etil-acetat i diklormetan/metanol (95:5). Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem (*λ* = 254 nm) i parama joda.

IR spektri snimljeni su na Paragon FT-IR spektrofotometru (Perkin Elmer, UK). NMR spektri snimljeni su Bruker AV-600 spektrometrom (Bruker, USA) kod 300,13, odnosno 600,13 MHz za 1H, te kod 75,47, odnosno 150,90 MHz za 13C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO-*d***6**otopinama 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 (HPLC, Agilent Technologies 1200 Series; MS, Agilent Technologies 6410 Triple Quad).

Benzotriazol, ciklopentilamin, cikloheksilamin, 5-hidroksi-2-pirazinkarboksilna kiselina, 2-hidroksietilamin, 4-klor-3-(trifluorometil)anilin, *O*-benzilhidroksilamin hidroklorid, metilamin hidroklorid i kalijev *t*-butoksid nabavljeni su od tvrtke Aldrich (Njemačka), *p*-aminofenol i 4-kloro-3-(trifluorometil)fenil izocijanat od tvrtke Acros Organics (Belgija), trifosgen od tvrtke Alpha Aesar (SAD), TEA od Sigme (SAD), a kalijev karbonat od Kemike (Hrvatska).

U eksperimentalnom dijelu korištena su bezvodna otapala. Bezvodni toluen dobiven je sljedećim postupkom: toluen je ekstrahiran vodom, zatim je osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destiliran i čuvan nad elementarnim natrijem. Bezvodni dimetilformamid (DMF): u 1 L DMF-a dodano je 100 mL suhog toluena te je smjesa destilirana. Toluen azeotropski veže vodu i destilira prvi, a zatim destilira čisti DMF. Čuvan je nad aktiviranim molekulskim sitima. Bezvodni diklormetan: diklormetan je ekstrahiran vodom, sušen iznad kalcijevog klorida i predestiliran.

Sve ostale kemikalije bile su *p. a*. čistoće.

**3.1. SINTEZA AMIDA 5-KLOR-2-PIRAZINKARBOKSILNE KISELINE 1–6**

*Opća metoda.* Suspenzija 5-hidroksi-2-pirazinkarboksilne kiseline (0,300 g, 0,00214 mol), tionil-klorida (1 mL, 0,014 mol) i DMF-a (2 kapi) u bezvodnom toluenu (30 mL) miješana na 100 °C 70 minuta. Reakcijska smjesa ohlađena, profiltrirana, uparena pod sniženim tlakom i naparena nekoliko puta bezvodnim diklormetanom. Dobiveno crveno ulje otopljeno u bezvodnom diklormetanu (10 mL) i dokapano u otopinu odgovarajućeg amina i trietilamina (osim u sintezi spoja **2**) u bezvodnom diklormetanu (20 mL) na 0 °C. Nakon 30 minuta reakcija je prekinuta i obrađena.

**3.1.1. 5-Klor-*N*-metilpirazin-2-karboksamid (1)**

Amini: metilamin hidroklorid (0,115 g, 0,00171 mol), trietilamin (0,835 mL, 0,00599 mol).

Reakcijska smjesa je nakon 30 minuta uparena, a dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu etil-acetat/petroleter:metanol (3:1:0,1).

Iskorištenje: 0,200 g (68 %).

*t*t 153–156 °C.

IR (KBr): *ν*max 3369, 3078, 2944, 1660, 1573, 1536, 1517, 1456, 1412, 1278, 1181, 1126, 1032, 1003, 932, 852, 664, 632, 522, 491 cm–1.

MS/MS *m/z* 172.1 (M+1)+, 154.1 (M-CH3)+, 141.1 (M-NHR1)+, 113.1 (M-ONHR1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 8.99 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.89-8.86 (m, 2H, 3, 1'), 2.83 (d, 3H, 2', *J* = 4.83).

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 162.40 (1), 150.54 (4), 143.59 (2), 143.17 (5), 143.00 (3), 25.98 (2').

**3.1.2. *N*-(2-Hidroksietil)-5-klorpirazin-2-karboksamid (2)**

Amini: etanolamin (0,259 mL, 0,00428 mol).

Reakcijska smjesa je nakon 30 minuta uparena, a dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu etil-acetat.

Iskorištenje: 0,218 g (51 %).

*t*t 94–96 °C.

IR (KBr): *ν*max 3356, 3079, 2942, 2879, 1665, 1573, 1529, 1459, 1439, 1365, 1302, 1278, 1210, 1182, 1127, 1055, 1031, 872, 794, 742, 692, 519 cm–1.

MS/MS *m/z* 224.2 (M+23)+, 202.2 (M+1)+, 184.2 (M-OH)+, 113.2 (M-CONHCH2CH2OH)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 9.00 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.87 (d, 1H, 3, *J* = 1.32), 8.76 (t, 1H, 1', *J* = 4.63), 4.77 (t, 1H, 4', *J* = 5.51), 3.54 (q, 2H, 3', *J* = 5.90), 3.39 (q, 2H, 2', *J* = 5.96).

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 161.97 (1), 150.64 (4), 143.46 (2), 143.27 (5), 143.00 (3), 59.41 (3'), 41.67 (2').

**3.1.3. *N*-ciklopentil-5-klorpirazin-2-karboksamid (3)**

Amini: ciklopentilamin (0,169 mL, 0,00171 mol), TEA (0,597 mL, 0,00428 mol).

Reakcijska smjesa je nakon 30 minuta uparena, a dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (95:5).

Iskorištenje: 0,171 g (89 %).

*t*t 107–108 °C.

IR (KBr): *ν*max 3373, 3079, 2951, 2870, 1660, 1571, 1528, 1466, 1295, 1176, 1161, 1125, 1027, 927, 632, 526, 492 cm–1.

MS/MS *m/z* 248.1 (M+23)+, 226.1 (M+1)+, 158.1 ((M-R1)H+1)+, 141 (M-NHR1)+, 113.1 (M-CONHR1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 8.97 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.84 (d, 1H, 3, *J* = 1.52), 8.79 (d, 1H, 1', *J* = 7.56), 4.29-4.23 (m, 1H, 2'), 1.91-1.86 (m, 2H, 3'), 1.72-1.67 (m, 2H, 6'), 1.63-1.51 (m, 4H, 4', 5').

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 161.56 (1), 150.45 (4), 143.80 (2), 143.37 (5), 142.84 (3), 50.68 (2'), 31.85 (3', 6'), 23.52 (4', 5').

**3.1.4. *N*-cikloheksil-5-klorpirazin-2-karboksamid (4)**

Amini: cikloheksilamin (0,197 mL, 0,00171 mol), TEA (0,597 mL, 0,00428 mol).

Reakcijska smjesa je nakon 30 minuta ekstrahirana 3 puta vodom, a organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je rastrljavanjem eterom.

Iskorištenje: 0,277 g (68 %).

*t*t 153–154 °C.

IR (KBr): *ν*max 3377, 3081, 2923, 2851, 1657, 1570, 1530, 1465, 1454, 1310, 1169, 1124, 1079, 1026, 925, 895, 861, 633, 524, 439 cm–1.

MS/MS *m/z* 262.1 (M+23)+, 240.1 (M+1)+, 158.1 ((M-R1)H+1)+, 141.1 (M-NHR1)+, 113.1 (M-CONHR1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 8.99 (d, 1H, 5, *J* = 1.35), 8.84 (d, 1H, 3, *J* = 1.32), 8.60 (d, 1H, 1', *J* = 8.37), 3.85-3.74 (m, 1H, 2'), 1.81-1.69, 1.63-1.58, 1.48-1.24, 1.20-1.06 (m, 10H, 3'-7').

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 160.96 (1), 150.49 (4), 143.77 (2), 143.38 (5), 142.84 (3), 48.19 (2'), 31.93 (3', 7'), 25.01 (5'), 24.76 (4', 6').

**3.1.5. 5-klor-*N*-(4-klor-3-(trifluormetil)fenil)pirazin-2-karboksamid (5)**

Amini: 4-klor-3-trifluormetilanilin (0,251 g, 0,00128 mol), TEA (0,597 mL, 0,00428 mol).

Reakcijska smjesa je nakon 30 minuta ekstrahirana 3 puta vodom, a organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je rastrljavanjem eterom i prekristalizacijom iz acetona i vode.

Iskorištenje: 0,281 g (65 %).

*t*t 149–151 °C.

IR (KBr): *ν*max 3376, 3360, 3122, 3083, 1693, 1590, 1530, 1423, 1332, 1262, 1251, 1180, 1136, 1116, 1023, 830, 663 cm–1.

MS/MS *m/z* 336.2 (M+1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 11.22 (s, 1H, 1'), 9.13 (d, 1H, 5, *J* = 1.20), 8.96 (d, 1H, 3, *J* = 1.26), 8.52 (d, 1H, 3', *J* = 2.37), 8.23 (dd, 1H, 7', *J* = 2.31, *J* = 6.51), 7.74 (d, 1H, 6', *J* = 8.79).

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 161.53 (1), 151.24 (4), 144.19 (5), 143.22 (2), 142.99 (3), 137.66 (2'), 132.01 (7'), 126.97-126.36 (q, 4', *J* = 30.94), 125.43 (6'), 125.09 (5'), 125.40-119.97 (q, 8', *J* = 273.67), 119.56-119.45 (q, 3', *J* = 5.58).

**3.1.6. *N*-(benziloksi)-5-klorpirazin-2-karboksamid (6)**

Amini: *O*-benzilhidroksilamin hidroklorid (0,273 g, 0,00171 mol), TEA (0,597 mL, 0,00428 mol).

Reakcijska smjesa je nakon 30 minuta ekstrahirana 3 puta vodom, a organski sloj sušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je rastrljavanjem eterom i prekristalizacijom iz acetona i vode.

Iskorištenje: 0,300 g (67 %).

*t*t 124–125 °C.

IR (KBr): *ν*max 3246, 3089, 3062, 3032, 2963, 1678, 1491, 1452, 1276, 1121, 1016, 906, 751, 699, 505 cm–1.

MS/MS *m/z* 286.2 (M+23)+, 264.2 (M+1)+, 91.3 (Bn)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 12.33 (s, 1H, 1'), ), 8.98 (d, 1H, 5, *J* = 0.99), 8.85 (d, 1H, 3, *J* = 1.23), 7.49-7.37 (m, 5H, 4'-8'), 4.96 (s, 2H, 2').

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 160.05 (1), 151.42 (4), 143.83 (5), 143.72 (3), 143.54 (2), 136.04 (3'), 129.30 (5', 7'), 128.83 (4'), 128.78 (6', 8'), 77.18 (2').

**3.2. SINTEZA ETER-AMIDA 7, 8**

*Opća metoda.* Suspenzija kalijevog *t*-butoksida (0,112 g, 0,001 mol) i *p*-aminofenola (0,11 g, 0,001 mol) u bezvodnom DMF-u (10 mL) miješana je na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon dodatka odgovarajućeg amida 5-klor-2-pirazinkarboksilne kiseline (0,001 mol) i kalijevog karbonata (0,07 g, 0,0005 mol) reakcijska smjesa miješana na 80 °C 2 h. DMF je uparen pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja pročišćen je kromatografijom na koloni i rastrljavanjem eterom.

**3.2.1. 5-(4-aminofenoksi)-*N*-ciklopentilpirazin-2-karboksamid (7)**

Količina amida **3**: 0,226 g. Željeni produkt je dobiven pročišćavanjem kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (95:5), te rastrljavanjem eterom.

Iskorištenje: 0,176 g (59 %).

*t*t 142–144 °C.

IR (KBr): *ν*max 3458, 3380, 3079, 3020, 2938, 2864, 1652, 1619, 1587, 1506, 1470, 1352, 1326, 1298, 1268, 1196, 1025, 836, 594 cm–1.

MS/MS *m/z* 299.3 (M+1)+, 214.2 (M-NHR1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 8.67 (d, 1H, 3, *J* = 1.29), 8.46 (d, 1H, 1', *J* = 7.95), 8.40 (d, 1H, 5, *J* = 1.29), 6.91-6.86 (m, 2H, 7, 11), 6.63-6.58 (m, 2H, 8, 10), 5.09 (s, 2H, 12), 4.31-4.19 (m, 1H, 2'), 1.93-1.81 (m, 2H, 3'), 1.75-1.65 (m, 2H, 6'), 1.63-1.51 (m, 4H, 4', 5').

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 162.11 (4), 161.72 (1), 146.54 (6), 142.44 (9), 140.93 (5), 139.22 (2), 133.13 (3), 121.69 (7,11), 114.41 (8,10), 50.48 (2'), 32.02 (3',6'), 23.53 (4',5').

**3.2.2. 5-(4-aminofenoksi)-*N*-cikloheksilpirazin-2-karboksamid (8)**

Količina amida **4**: 0,240 g. Željeni produkt je dobiven pročišćavanjem kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu cikloheksan/etil-acetat (1:2), te rastrljavanjem eterom.

Iskorištenje: 0,140 g (45 %).

*t*t 167–170 °C.

IR (KBr): *ν*max 3404, 3336, 3018, 2929, 2855, 1661, 1609, 1579, 1522, 1504, 1459, 1344, 1326, 1262, 1181, 1022, 890, 834, 593, 509 cm–1.

MS/MS *m/z* 625.5 (2M+1)+, 313.3 (M+1)+, 214.2 (M-NHR1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 8.67 (d, 1H, 3, *J* = 1.29), 8.39 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.32 (d, 1H, 1', *J* = 8.52), 6.91-6.86 (m, 2H, 7, 11), 6.63-6.58 (m, 2H, 8, 10), 5.06 (s, 2H, 12), 3.84-3.72 (m, 1H, 2'), 1.80-1.70, 1.62-1.56, 1.47-1.25, 1.20-1.11 (m, 10H, 3'-7').

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 161.70 (4), 161.47 (1), 146.48 (6), 142.45 (9), 140.92 (5), 139.17 (2), 133.09 (3), 121.60 (7, 11), 114.38 (8, 10), 47.85 (2'), 32.10 (3', 7'), 25.04 (5'), 24.76 (4', 6').

**3.3. SINTEZA KLORIDA 1-BENZOTRIAZOLKARBOKSILNE KISELINE (9)**

Otopina BtH (0,714 g, 0,006 mol) i trifozgena (0,978 g, 0,00326 mol) u bezvodnom toluenu (20 mL) refluksirana je 3 h. Reakcijska smjesa uparena je pod sniženim tlakom i nekoliko puta naparena toluenom. Dobiveni klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (BtcCl, **9**) upotrebljen je u daljnjim reakcijama bez čišćenja.

**3.4. SINTEZA BENZOTRIAZOLIDA *p*-AMINOFENOLA 10**

U otopinu *p*-aminofenola (0,654 g, 0,006 mol) i TEA (0,836 mL, 0,006 mL) u bezvodnom dioksanu (30 mL) dokapana je otopina BtcCl (**7**) (0,006 mol) u bezvodnom dioksanu (25 mL) tijekom 0,25 h, uz hlađenje. Nakon 30 minuta talog trietilamina hidroklorida odsisan, a matičnica uparena. Matičnica pročišćena kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (95:5). Dobiveni sirovi produkt višekratno rastrljavan eterom, prekristaliziran iz toluena te acetona i vode. Unatoč tome spoj **10** nije dobiven potpuno čist, zbog čega iskorištenje i *t*t nisu određeni.

IR (KBr): *ν*max 3456, 3252, 1726, 1544, 1616, 1544, 1618, 1488, 1446, 1370, 1236, 1212, 1060, 926, 825, 146, 583 cm–1.

MS/MS *m/z* 277.1 (M+23)+, 120.1 (R2H+1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 10.89 (s, 1H, 1), 9.41 (s, 1H, 8), 8.24 (d, 2H, arom., *J* = 9.12), 7.76-7.73 (m, 1H, arom.), 7.60-7.57 (m, 3H, arom.), 6.83-6.81 /m, 2H, arom.).

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 154.61 (9), 146.99 (2), 145.50 (15), 131.47 (10), 129.94 (13), 128.40 (5), 125.62 (12), 123.19 (4, 6), 119.18 (14), 115.18 (3, 7), 113.69 (11).

**3.5. SINTEZA UREA 11, 12**

**3.5.1. 1-Ciklopentil-3-(4-hidroksifenil)urea (11)**

Suspenzija benzotriazolida **8** (0,127 g, 0,0005 mol) i ciklopentilamina (54 µL, 0,00055 mol) u etanolu (10 mL) miješana je 1 h na 50 °C. Reakcijska smjesa je profiltrirana, uparena i pročišćena kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu petroleter/etil-acetat (1:1).

Iskorištenje: 0,95 g (86 %).

*t*t 173–177 °C.

IR (KBr): *ν*max 3243, 2960, 2870, 1608, 1574, 1517, 1442, 1309, 1259, 1220, 1163, 835, 805, 727, 667, 523 cm–1.

MS/MS *m/z* 221.1 (M+1)+, 441.2 (2M+1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 8.88 (s, 1H, 1), 7.86 (s, 1H, 8), 7.13-7.11 (m, 2H, arom.), 6.63-6.60 (m, 2H, arom.), 5.94 (d, 1H, 10, *J* = 7.20), 3.93-3.88 (m, 1H, 11), 1.84-1.78 (m, 2H, 12), 1.64-1.59 (m, 2H, 15), 1.55-1.50 (m, 2H, 13), 1.36-1.30 (m, 2H, 12).

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 155.11 (9), 151.79 (2), 132.07 (5), 119.60 (4, 6), 115.02 (3, 7), 50.82 (11), 32.86 (12, 15), 23.10 (13, 14).

**3.5.2. 1-(4-Klor-3-(trifluormetil)fenil)-3-(4-hidroksifenil)urea (12)**

Otopina benzotriazolida **10** (0,28 g, 0,0011 mol) i 4-klor-3-(trifluormetil)anilina (0,430 g (0,0022 mol) u bezvodnom DMF-u (12 mL) miješana na 115 °C 3 h. Reakcijska smjesa uparena i pročišćena kromatografijom na koloni, uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (95:5).

Iskorištenje: 0,109 g (30 %).

*t*t 210–215 °C.

IR (KBr): *ν*max 3305, 3112, 2930, 1673, 1625, 1591, 1560, 1482, 1436, 1328, 1268, 1185, 1147, 1126, 832, 684 cm–1.

MS/MS *m/z* 331.0 (M+1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 9.09 (s, 1H, 1), 9.00 (s, 1H, 8), 8.46 (s, 1H, 10), 8.09 (d, 1H, 16, *J* = 2.13), 7.64-7.56 (m, 2H, 12, 13), 7.24-7.19 (m, 2H, 3, 7), 6.72-6.67 (m, 2H, 4, 6)

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 152.95 (1), 152.60 (9), 139.66 (11), 131.88 (13), 130.45 (5), 126.93-126.32 (q, 15, *J* = 30.57), 125.53-120.10 (q, 17, *J* = 272.90), 122.77 (12), 121.84 (14), 120.99 (4, 6), 116.57-116.45 (q, 16, *J* = 5.72), 115.17 (3, 7).

**3.6. SINTEZA UREA-ETER-AMIDA 13–19**

*Opća metoda A.* Suspenzija odgovarajućeg eter-amida **11**,**12** (0,0002 mol) i 4-klor-3-(trifluormetil)fenilizocijanata (0,066 g, 0,0003 mol) u bezvodnom diklormetanu (3 mL) je miješana 2 sata. Reakcijska smjesa je odsisana, a dobiveni talog rastljan diklormetanom.

*Opća metoda B.* Suspenzija odgovarajućeg amida 5-klor-2-pirazinkarboksilne kiseline **1**-**6** (0,00044 mol), uree **9**,**10** (0,0004 mol) i kalijevog karbonata (0,111 g, 0,0008 mol) u bezvodnom DMF-u (4 mL) miješana je na 100 °C 3 h. Reakcijskoj smjesi dodano je 30 mL etil-acetata te je organski sloj ekstrahiran 3 puta zasićenom otopinom natrijevog klorida. Vodeni sloj je ekstrahiran 3 puta etil-acetatom. Spojeni organski slojevi sušeni su iznad bezvodnog natrijevog sulfata, profiltrirani i upareni. Ostatak nakon uparavanja pročišćen je kromatografijom na koloni i/ili prekristalizacijom, odnosno rastrljavanjem.

**3.6.1. 1-(4-Klor-3-(trifluormetil)fenil)-3-(4-(5-(metilkarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)urea (13)**

Spoj **13** pripravljen je Metodom B.

Reaktanti: amid **1** (0,075 g), urea **12** (0,132 g).

Kromatografija na koloni, pokretna faza petroleter/etil-acetat/metanol (2:2:0,1). Sirovi produkt rastrljan je eterom.

Iskorištenje: 0,093 g (50 %).

*t*t 233–239 °C.

IR (KBr): *ν*max 3415, 3289, 3134, 3103, 1710, 1662, 1608, 1586, 1550, 1510, 1487, 1460, 1402, 1301, 1176, 1125, 1029, 837, 664, 509 cm–1.

MS/MS *m/z* 466.1 (M+1)+, 381.3 (M-R1-CF3)+, 341.3 ((M-CONHR1-CF3)H+1), 313.3 (R2NHCONHC6H4+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 9.18 (s, 1H, 14), 8.91 (s, 1H, 12), 8.69 (s, 2H, 3, 1'), 8.53 (s, 1H, 5), 8.12 (s, 1H, 20), 7.68-7.60 (m, 2H, 16, 17), 7.54 (d, 2H, 8, 10, *J* = 8.73), 7.19 (d, 2H, 7, 11, *J* = 8.70), 2.82 (d, 3H, 2', *J* = 4.56).

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 162.94 (4), ¸161.16 (1), 152.47 (13), 147.25 (6), 140.64 (5), 139.61 (15), 139.35 (2), 136.68 (9), 133.63 (3), 131.96 (17), 126.99-126.38 (q, 19, *J* = 30.48), 125.51-120.28 (q, 21, *J* =273.27), 123.10 (16), 122.27 (18), 121.75 (8, 10), 120.04 (7, 11), 116.82-116.71 (q, 20, *J* = 5.44), 25.89 (2').

**3.6.2. 1-(4-(5-((2-Hidroksietil)karbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil) fenil)urea (14)**

Spoj **14** pripravljen je Metodom B.

Reaktanti: amid **2** (0,089 g), urea **12** (0,132 g).

Kromatografija na koloni, pokretna faza etil-acetat/metanol (2:0,1). Sirovi produkt prekristaliziran je iz metanola.

Iskorištenje: 0,070 g (35 %).

*t*t 175–180 °C.

IR (KBr): *ν*max 3437, 3352, 3140, 2929, 1712, 1647, 1608, 1561, 1509, 1486, 1462, 1420, 1354, 1329, 1304, 1279, 1258, 1225, 1192, 1143, 1076, 1032, 1019, 915, 894, 845, 688, 664, 641, 513 cm–1.

MS/MS *m/z* 991.3 (2M+1)+, 518.2 (M+23)+, 496.3 (M+1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 9.26 (s, 1H, 14), 9.00 (s, 1H, 12), 8.70 (d, 1H, 3, *J =* 1.30), 8.56 (t, 1H, 1', *J* = 5.85), 8.54 (d, 1H, 5, *J* = 1.31), 8.12 (d, 1H, 20, *J* = 2.32), 7.68-7.59 (m, 2H, 16, 17), 7.56-7.51 (m, 2H, 8, 10), 7.22-7.17 (m, 2H, 7, 11), 4.77 (t, 1H, 4', *J* = 5.47), 3.56-3.50 (q, 2H, 3', *J* = 5.85), 3.41-3.35 (q, 2H, 2', *J* = 5.74).

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 162.39 (4), 161.17 (1), 152.42 (13), 147.24 (6), 140.73 (5), 139.40 (15), 139.30 (2), 136.63 (9), 133.58 (3), 131.91 (17), 126.55 (t, 19, *J* = 30.33), 125.46-120.03 (q, 21, *J* = 272.95), 123.01 (16), 122.23 (18), 121.63 (8, 10), 120.01 (7, 11), 116.80-116.68 (q, 20, *J* = 5.68), 59.55 (3'), 41.48 (2').

**3.6.3. 1-(4-(5-(Ciklopentilkarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil) fenil)urea (15)**

Spoj **15** pripravljen je Metodom A i Metodom B.

Reaktanti: Metoda A = eter-amid **7** (0,060 g);

Metoda B = amid **3** (0,099 g), urea **12** (0,132 g).

Metoda B: Sirovi produkt nakon ekstrakcije pročišćen je rastrljavanjem eterom.

Iskorištenje: 0,051 g (49 %) (metoda A)

0,094 g (45 %) (metoda B)

*t*t 231–233 °C.

IR (KBr): *ν*max 3382, 3294, 3115, 3081, 2963, 2875, 1711, 1658, 1604, 1549, 1509, 1485, 1460, 1327, 1195, 1133, 1023, 840, 661, 513 cm–1.

MS/MS *m/z* 520.1 (M+1)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 9.20 (s, 1H, 14), 8.95 (s, 1H, 12), 8.69 (d, 1H, 3, *J* = 1.20), 8.53 (d, 1H, 5, *J* = 1.26), 8.49 (d, 1H, 1', *J* = 7.98), 8.12 (d, 1H, 20, *J* = 2.46), 7.67-7.65 (m, 1H, 16), 7.63-7.61 (m, 1H, 17), 7.55-7.53(m, 2H, 8, 10), 7.21-7.18 (m, 2H, 7, 11), 4.27-4.22 (m, 1H, 2'), 1.91-1.85 (m, 2H, 3'), 1.72-1.68 (m, 2H, 6'), 1.62-1.53 (m, 4H, 4', 5').

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 162.02 (4), 161.14 (1), 152.48 (13), 147.28 (6), 140.84 (5), 139.70 (15), 139.35 (2), 136.67 (9)133.51 (3), 131.97 (17), 126.99-126.39 (q, 19, *J* = 30.50), 125.52-120.09 (q, 21, *J* = 273.44), 123.05 (16), 122.28 (18), 121.71 (8, 10),120.04 (7, 11), 116.81-116.70 (q, 20, *J* = 4.39), 50.50 (2'), 32.01 (3', 6'), 23.52 (4', 5').

**3.6.4. 1-(4-(5-(Cikloheksilkarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil) fenil)urea (16)**

Spoj **16** pripravljen je Metodom A i Metodom B.

Reaktanti: Metoda A = eter-amid **8** (0,062 g);

Metoda B = amid **4** (0,105 g), urea **12** (0,132 g).

Metoda B: Sirovi produkt nakon ekstrakcije pročišćen je rastrljavanjem eterom.

Iskorištenje: 0,065 g (61 %) (metoda A)

0,135 g (63 %) (metoda B)

*t*t 217–220 °C.

IR (KBr): *ν*max 3394, 3322, 3122, 3082, 2928, 2857, 1711, 1660, 1595, 1513, 1481, 1421, 1310, 1227, 1143, 1033, 844, 576, 515 cm–1.

MS/MS *m/z* 534.4 (M+1)+, 381.5 (M-R1-CF3)+, 313.3 (R2NHCONHC6H4+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 9.19 (s, 1H, 14), 8.93 (s, 1H, 12), 8.69 (d, 1H, 3, *J* = 1.20), 8.52 (d, 1H, 5, *J* = 1.20), 8.40 (d, 1H, 1', *J* = 8.52), 8.12 (d, 1H, 20, *J* = 2.13), 7.68-7.60 (m, 1H, 16, 17), 7.56-7.51(m, 2H, 8, 10), 7.22-7.17 (m, 2H, 7, 11), 3.84-3.73 (m, 1H, 2'), 1.80-1.70, 1.62-1.58, 1.48-1.25, 1.19-1.07 (4m, 10H, 3'-7').

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 161.43 (4), 161.17 (1), 152.48 (13), 147.30 (6) 140.90 (5) 139.67 (15) 139.36 (2), 136.68 (9) 133.55 (3), 131.99 (17) 128.25-117.41 (q, 21, *J* = 273.26) 127.31-126.09 (q, 19, *J* = 30.29),123.54 (16), 122.27 (18), 122.18 (8, 10), 120.53 (7, 11) 116.88-116.65 (q, 20, *J* = 5.82), 47.93 (2'), 32.13 (3', 7'), 25.08 (5'), 24.82 (4', 6').

**3.6.5. 1-(4-(5-((4-Klor-3-(trifluormetil)fenil)karbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil)fenil)urea (17)**

Spoj **17** pripravljen je Metodom B.

Reaktanti: amid **5** (0,148 g), urea **12** (0,132 g).

Kromatografija na koloni, pokretna faza diklormetan/metanol (95:5). Sirovi produkt prekristaliziran iz smjese eter/petroleter.

Iskorištenje: 0,68 g (27 %).

*t*t 141–144 °C (raspad).

IR (KBr): *ν*max 3353, 3123, 1689, 1593, 1532, 1506, 1482, 1463, 1421, 1353, 1321, 1274, 1261, 1230, 1185, 1138, 1113, 1034, 1020, 835, 665 cm–1.

MS/MS *m/z* 630.2 (M+1)+, 409.2 ((M-CONHR1)H+1)+, 381.4 (M-R1-CF3)+.

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 11.09 (s, 1H, 1'), 9.20 (s, 1H, 14) 8.95 (s, 1H, 12), 8.86 (d, 1H, 3, *J* = 1.26), 8.65 (d, 1H, 5, *J* = 2.46), 8.24 (dd, 1H, 3', *J* = 2.40, *J* = 6.42), 8.12 (d, 1H, 7', *J* = 2.22), 7.73 (d, 1H, 6', *J* = 8.89), 7.68-7.60 (m, 2H, 16, 17), 7.58-7.53 (m, 2H, 8, 10), 7.26-7.21 (m, 2H, 7, 11).

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 161.97 (4) 161.60 (1) 152.47 (13), 147.10 (6) 142.02 (5), 139.34 (15), 138.91 (2), 137.97 (2'), 136.83 (9), 133.76 (3), 131.98 (17), 131.96 (6'), 128.23-117.37 (q, 21, *J* = 273.33), 128.18-117.32 (q, 8', *J* = 273.33), 127.30-126.08 (q, 19, *J* = 30.59), 127.24-126.02 (q, 4', *J* = 30.77), 125.26 (16) 124.71 (d, 5', *J* = 1.66) 123.06 (7'), 122.29 (d, 18, *J* = 1.65), 121.79 (8, 10), 120.04 (7,11) 119.44-119.21 (q, 20, *J* = 5.71), 116.88-116.65 (q, 3', *J* = 5.71).

**3.6.6. 1-(4-(5-(Benziloksikarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)-3-(4-klor-3-(trifluormetil)fenil) urea (18)**

Spoj **18** pripravljen je Metodom B.

Reaktanti: amid **6** (0,116 g), urea **12** (0,132 g).

Kromatografija na koloni, pokretna faza petroleter/etil-acetat/metanol (2:2:0,1). Sirovi produkt prekrostaliziran iz smjese eter/petroleter.

Iskorištenje: 0,040 g (18 %).

*t*t 208–212 °C.

IR (KBr): *ν*max 3351, 3073, 1678, 1595, 1547, 1506, 1486, 1460, 1420, 1349, 1330, 1280, 1230, 1194, 1137, 1033, 1017, 912, 839, 753, 701, 664, 636, 532, 516 cm–1.

MS/MS *m/z* 558.2 (M+1)+, 381.4 (M-R1-CF3)+, 341.4 ((M-CONHR1-CF3)H+1).

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 12.10 (s, 1H, 1'), 9.20 (s, 1H, 14), 8.94 (s, 1H, 12), 8.68 (d, 1H, 3, *J* = 1.23), 8.52 (d, 1H, 5, *J* = 1.29), 8.12 (d, 1H, 20, *J* = 2.28), 7.68-7.60 (m, 2H, 16, 17), 7.57-7.51 (m, 2H, 8, 10), 7.49-7.45, 7.42-7.35 (2m, 5H, 4'-8'), 7.22-7.17 (m, 2H, 7, 11), 4.94 (s, 2H, 2').

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 161.35 (4), 160.17 (1), 152.48 (13), 147.15 (6), 140.93 (5), 139.35 (15), 138.83 (2), 136.74 (9), 135.73 (3'), 133.92 (3), 131.99 (17), 128.78 (4', 8'), 128.28 (5'-7'), 128.24-117.38 (q, 18, *J* = 272.87), 127.30-126.09 (q, 19, *J* = 30.54), 123.07 (16), 121.78 (8, 10), 120.05 (7, 11), 116.88-116.66 (q, 20, *J* = 5.53), 77.11 (2').

**3.6.7. 1-Ciklopentil-3-(4-(5-(ciklopentilkarbamoil)pirazin-2-iloksi)fenil)urea (19)**

Spoj **19** pripravljen je Metodom B.

Reaktanti: amid **3** (0,105 g), urea **11** (0,088g).

Sirovi produkt nakon ekstrakcije pročišćen je rastrljavanjem eterom.

Iskorištenje: 0,067 g (41 %).

*t*t 235–237 °C.

IR (KBr): *ν*max 3341, 3070, 3052, 2952, 2867, 1660, 1606, 1571, 1505, 1461, 1408, 1349, 1316, 1284, 1242, 1194, 1023, 897, 835, 626, 527, 502 cm–1.

MS/MS *m/z* 841.4 (2M+23), 819.4 (2M+1), 432.2 (M+23), 410.2 (M+1).

1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz): 8.67 (d, 1H, 3, *J* = 1,29), 8.48 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.43 (d, 1H, 1', *J* = 2.88), 8.32 (s, 1H, 12), 7.46-7.41 (m, 2H, 8, 10), 7.12-7.07 (m, 2H, 7, 11), 6.15 (d, 1H, 14, *J* = 7.23), 4.31-4.19 (m, 1H, 2'), 4.00-3.89 (m, 1H, 15), 1.93-1.79, 1.72-1.50, 1.42-1.32 (3m, 16H, 3'-6', 16-19).

13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm): 162.01 (4), 161.21 (1), 154.78 (13), 146.18 (6), 140.82 (5), 139.57 (2), 138.06 (9), 133.87 (3), 121.45 (8, 10), 118.70 (7, 11), 50.86 (15), 50.48 (2'), 32.78 (3', 6'), 31.99 (16, 19), 23.49 (4', 5'), 23.62 (17, 18).

1. **REZULTATI I RASPRAVA**

Sorafenib je noviji citostatik, odobren 2005. godine (www.drugs.com). Zbog svog širokog spektra djelovanja, niske toksičnosti i novog mehanizma djelovanja, koji uključuje inhibiciju više kinaza uključenih u staničnu proliferaciju i preživljavanje, brojni znanstvenici pokušavaju optimirati i modificirati molekulu sorafeniba (Rawling i sur., 2012).

Opisani sintetski put u posljednjem koraku uključuje reakciju amina i 4-klor-3-(trifluormetil)fenilizocijanata (Slika 8), što može biti problematično zbog same uporabe izocijanata (Rawling i sur., 2012). Isto tako, zbog ograničene dostupnosti komercijalnih izocijanata i tioizocijanata, priprava različitih derivata difenil-urea često zahtjeva sintezu tih izocijanata, odnosno tioizocijanata (Rawling i sur., 2012; Yao i sur., 2012). Kao alternativa izocijanatima opisane su metode uz fenil-karbamate (Zhang i sur., 2011) i *N*,*N*-karbonildiimidazol (Rawling i sur., 2012).

U Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta razvijena je benzotriazolska metoda, kojom su pripravljeni različiti heterociklički spojevi, derivati aminokiselina, karbamata, urea, semikarbazida, karbazida, sulfonilurea, hidantoinskih kiselina, derivata NSAID i primakina, polimer-lijek i tiomer-lijek konjugati (Zorc i sur., 2012).

Jedan od zadataka ovog rada bio je razviti novi put sinteze difenil-urea, čiji je najpoznatiji predstavnik sorafenib, korištenjem navedene benzotriazolske metode. Cilj je bio tom metodom pripraviti 6 novih, do sada neopisanih, pirazinskih derivata sorafeniba, te na primjeru usporediti metodu uz izocijanate (Metoda A) i novu benzotriazolidsku metodu (Metoda B), što je prikazano na Shemi 1.



Shema 1. Sinteza pirazinskih analoga sorafeniba

Početni spoj u sintezi je 5-hidroksi-2-pirazinkarboksilna kiselina, koja nakon refluksiranja u tionil-kloridu kroz 1 h, prelazi u odgovarajući kiselinski klorid, uz istovremenu supstituciju hidroksilne skupine na položaju 5 klorom (Zitko i sur., 2013). U sljedećoj reakciji s odgovarajućim aminima dobiveni su amidi 5-klor-2-pirazinkarboksilne kiseline **1**–**6**.Reakcija amidacije provedena je na sniženoj temperaturi, na ledenoj kupelji, u prisutnosti TEA koji neutralizira oslobođeni klorovodik. Sirovi produkti pročišćeni su kromatografijom na koloni i/ili rastrljavanjem s odgovarajućim otapalom, odnosno prekristalizacijom. Amidi **1**–**6** upotrebljeni su kao ishodni spojevi u obje Metode.

U Metodi A, *N*-ciklopentil-5-klorpirazin-2-karboksamid (**3**) i *N*-cikloheksil-5-klorpirazin-2-karboksamid (**4**) prevedeni su u odgovarajuće eter-amide **7** i **8**. Reakcija je provedena uz 1 ekvivalent kalijevog *t*-butoksida i 0,5 ekvivalenata kalijevog karbonata, u bezvodnom DMF-u. Tijekom reakcije dolazi do supstitucije atoma klora u strukturi amida **3** i **4** 4-aminofenoksi skupinom pri čemu nastaju eter-amidi **7** i **8**. Ova reakcija također je korištena kod sinteze derivata sorafeniba, koji u svojoj strukturi imaju piridinski prsten, te je u tom slučaju napredovala puno lošije i s manjim iskorištenjima (Babić i sur., 2012). Sirovi produkti pročišćeni su kromatografijom na koloni i rastrljavanjem eterom.

U idućem koraku eter-amidi **7** i **8** reagiraju s 4-klor-3-(trifluormetil)fenil izocijanatom. Reakcija se provodi u bezvodnom diklormetanu te dolazi do taloženja produkata iz reakcijske smjese. Konačni produkti dobiveni su u iskorištenjima od 49, odnosno 61 %.

U metodi B, početni korak je sinteza klorida 1-benzotriazolkarboksilne kiseline (**9**). Taj spoj dobiven je refluksiranjem benzotriazola i trifozgena u toluenskoj otopini (42). U idućoj reakciji klorid **9** reagira s *p*-aminofenolom u omjeru 1:1, u prisutnosti TEA, koji neutralizira nastali oslobođeni klorovodik, u bezvodnom dioksanu. Produkt reakcije je benzotriazolid *p*-aminofenola **10**. Obrada reakcije bila je problematična te unatoč pročišćavanju kromatografijom na koloni i višekretnim prekristalizacijama nije dobiven potpuno čist produkt. Čistoća spoja bila je dostatna za utvrđivanje njegove strukture 1H i 13C NMR spektroskopijom, ali nije određeno talište spoja niti je navedeno iskorištenje reakcije. Produkt **10** je djelomično onečišćen korišten u daljnjim reakcijama.

U idućem koraku pripravljeni benzotriazolid **10** reagira s odgovarajućim aminima. Benzotriazol je dobra izlazna skupina te kao produkti nastaju uree **11** i **12**. U slučaju sinteze uree **11**, koja nastaje reakcijom spoja **10** i ciklopentilamina, nije bilo većih poteškoća. Omjer reaktanata bio je 1:1, a reakcija se odvija u etanolu, na 50 °C. Urea **11** izolirana je nakon kromatografije na koloni s iskorištenjem od 86 %. Kao metoda pročišćavanja i uklanjanja BtH nije korištena ekstrakcija jer se uree s fenolnom skupinom djelomično tope u vodi.

Međutim, sinteza spoja **12**, koji nastaje u reakciji spoja **10** i 4-klor-3-(trifluormetil)anilina, nije dobro napredovala pri tim uvjetima jer je amino skupina anilina puno slabiji nukleofil od amino skupine ciklopentilamina. Optimiranjem reakcije utvrđeno je da mora biti prisutno 2 ekvivalenta navedenog anilina u odnosu na benzotriazolid **10**. Kao otapalo je umjesto etanola korišten DMF iz dva razloga. DMF ima više vrelište te je reakciju moguće provoditi na puno višim temperaturama (115 °C kroz 3 sata). Osim toga, pri višim temperaturama i duljem zagrijavanju sam etanol postaje reaktant i nastaju dodatni nusprodukti.Nakon 3 sata u reakcijskoj smjesi je i dalje prisutna manja količina početnog benzotriazolida **10**, ali daljnje zagrijavanje ne dovodi do pomicanja ravnoteže prema produktima i završetku reakcije, iako je i dalje prisutna veća količina početnog anilina. Također je utvrđeno da je koncentracija reaktanata važna – ukoliko se smanji volumen DMF-a, nastaju dodatni nusprodukti, isti kao kad se reakcija odvija u talini. DMF je iz reakcijske smjese uklonjen uparavanjem, a ne ekstrakcijom zbog, kako je već navedeno, djelomične topljivosti produkta u vodi. Spoj **12** pročišćen je kromatografijom na koloni.

U posljednjem reakcijskom koraku amidi 5-klor-2-pirazinkarboksilne kiseline **1**–**6** reagiraju s ureama **11** i **12**, pri čemu nastaju konačni produkti, uree-eter-amidi **13**–**19**. Reakcija se provodi u bezvodnom DMF-u, u prisutnosti 2 ekvivalenta kalijevog karbonata, na 100 °C tijekom 3 h. Unatoč produljenom zagrijavanju reakcija ne ide do kraja pa su manje količine početnih reaktanata i dalje prisutni u reakcijskoj smjesi. DMF je iz reakcijske smjese uklonjen ekstrakcijom, dok su konačni produkti dobiveni nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni i/ili prekristalizacijom, odnosno rastrljavanjem.

Osim spojeva **1** i **12**, svi pripravljeni spojevi su novi, do sada neopisani u literaturi, te su karakterizirani uobičajenim spektroskopskim metodama (IR, 1H i 13C NMR, MS). U Tablicama 1–13 dani su njihovi analitički i spektroskopski podatci, dok su spektri prikazani u Prilogu.

Usporedbom Metode A i Metode B možemo doći do zaključka da Metoda A ima jedan reakcijski korak manje, ali je Metoda B općenitiji put sinteze difenil-urea te kao reaktante koristi jeftinije i dostupnije reagense. Ukupna iskorištenja na produktima koji su dobiveni u Metodom B su nešto niža, pa je reakcijske uvjete nužno još optimirati.

Tablica 1. Analitički podaci za amide 5-klor-2-pirazinkarboksilne kiseline **1**-**6**



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **Molekulska formula**  **(*M*r)** | **Iskorišt. (%)** | ***t*t (°C)** |
| **1** |  | C6H6ClN3O  (171,58) | 68 | 153–156 |
| **2** |  | C7H8ClN3O2  (201,61) | 51 | 94–96 |
| **3** |  | C10H12ClN3O  (225,67) | 89 | 107–108 |
| **4** |  | C11H14ClN3O  (239,70) | 68 | 153–154 |
| **5** |  | C12H6Cl2F3N3O  (336,10) | 65 | 149–151 |
| **6** |  | C12H10ClN3O  (263,68) | 67 | 124–125 |

Tablica 2. IR i MS spektroskopski podaci za amide 5-klor-2-pirazinkarboksilne kiseline **1**-**6**



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **IR (KBr) νmax (cm-1)** | **MS (*m/z*)** |
| **1** |  | 3369, 3078, 2944, 1660, 1573, 1536, 1517, 1456, 1412, 1278, 1181, 1126, 1032, 1003, 932, 852, 664, 632, 522, 491 | 172.1 (M+1)+  154.1 (M-CH3)+  141.1 (M-NHR1)+  113.1 (M-CONHR1)+ |
| **2** |  | 3356, 3079, 2942, 2879, 1665, 1573, 1529, 1459, 1439, 1365, 1302, 1278, 1210, 1182, 1127, 1055, 1031, 872, 794, 742, 692, 519 | 224.2 (M+23)+  202.2 (M+1)+  184.2 (M-OH)+  113.2 (M-CONHCH2CH2OH)+ |
| **3** |  | 3373, 3079, 2951, 2870, 1660, 1571, 1528, 1466, 1295, 1176, 1161, 1125, 1027, 927, 632, 526, 492 | 248.1 (M+23)+  226.1 (M+1)+  158.1 ((M-R1)H+1)+  141 (M-NHR1)+  113.1 (M-CONHR1)+ |
| **4** |  | 3377, 3081, 2923, 2851, 1657, 1570, 1530, 1465, 1454, 1310, 1169, 1124, 1079, 1026, 925, 895, 861, 633, 524, 439 | 262.1 (M+23)+  240.1 (M+1)+  158.1 ((M-R1)H+1)+  141.1 (M-NHR1)+  113.1 (M-CONHR1)+ |
| **5** |  | 3376, 3360, 3122, 3083, 1693, 1590, 1530, 1423, 1332, 1262, 1251, 1180, 1136, 1116, 1023, 830, 663 | 336.2 (M+1)+ |
| **6** |  | 3246, 3089, 3062, 3032, 2963, 1678, 1491, 1452, 1276, 1121, 1016, 906, 751, 699, 505 | 286.2 (M+23)+  264.2 (M+1)+  91.3 (Bn)+ |

Tablica 3. 1H i 13C NMR spektroskopski podaci za amide 5-klor-2-pirazinkarboksilne kiseline **1**-**6**



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz)** | **13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm)** |
| **1** |  | 8.99 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.89-8.86 (m, 2H, 3, 1'), 2.83 (d, 3H, 2', *J* = 4.83) | 162.40 (1), 150.54 (4), 143.59 (2), 143.17 (5), 143.00 (3), 25.98 (2') |
| **2** |  | 9.00 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.87 (d, 1H, 3, *J* = 1.32), 8.76 (t, 1H, 1', *J* = 4.63), 4.77 (t, 1H, 4', *J* = 5.51), 3.54 (q, 2H, 3', *J* = 5.90), 3.39 (q, 2H, 2', *J* = 5.96) | 161.97 (1), 150.64 (4), 143.46 (2), 143.27 (5), 143.00 (3), 59.41 (3'), 41.67 (2') |
| **3** |  | 8.97 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.84 (d, 1H, 3, *J* = 1.52), 8.79 (d, 1H, 1', *J* = 7.56), 4.29-4.23 (m, 1H, 2'), 1.91-1.86 (m, 2H, 3'), 1.72-1.67 (m, 2H, 6'), 1.63-1.51 (m, 4H, 4', 5') | 161.56 (1), 150.45 (4), 143.80 (2), 143.37 (5), 142.84 (3), 50.68 (2'), 31.85 (3', 6'), 23.52 (4', 5') |
| **4** |  | 8.99 (d, 1H, 5, *J* = 1.35), 8.84 (d, 1H, 3, *J* = 1.32), 8.60 (d, 1H, 1', *J* = 8.37), 3.85-3.74 (m, 1H, 2'), 1.81-1.69, 1.63-1.58, 1.48-1.24, 1.20-1.06 (m, 10H, 3'-7') | 160.96 (1), 150.49 (4), 143.77 (2), 143.38 (5), 142.84 (3), 48.19 (2'), 31.93 (3', 7'), 25.01 (5'), 24.76 (4', 6') |
| **5** |  | 11.22 (s, 1H, 1'), 9.13 (d, 1H, 5, *J* = 1.20), 8.96 (d, 1H, 3, *J* = 1.26), 8.52 (d, 1H, 3', *J* = 2.37), 8.23 (dd, 1H, 7', *J* = 2.31, *J* = 6.51), 7.74 (d, 1H, 6', *J* = 8.79) | 161.53 (1), 151.24 (4), 144.19 (5), 143.22 (2), 142.99 (3), 137.66 (2'), 132.01 (7'), 126.97-126.36 (q, 4', *J* = 30.94), 125.43 (6'), 125.09 (5'), 125.40-119.97 (q, 8', *J* = 273.67), 119.56-119.45 (q, 3', *J* = 5.58) |
| **6** |  | 12.33 (s, 1H, 1'), ), 8.98 (d, 1H, 5, *J* = 0.99), 8.85 (d, 1H, 3, *J* = 1.23), 7.49-7.37 (m, 5H, 4'-8'), 4.96 (s, 2H, 2') | 160.05 (1), 151.42 (4), 143.83 (5), 143.72 (3), 143.54 (2), 136.04 (3'), 129.30 (5', 7'), 128.83 (4'), 128.78 (6', 8'), 77.18 (2') |

Tablica 4. Analitički podaci za eter-amide **7, 8**



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **Molekulska formula**  **(*M*r)** | **Iskorišt. (%)** | ***t*t (°C)** |
| **7** |  | C16H18N4O2  (298,34) | 82 | 142–144 |
| **8** |  | C17H20N4O2  (312,37) | 45 | 167–170 |

Tablica 5. IR i MS spektroskopski podaci za eter-amide **7, 8**



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **IR (KBr) νmax (cm-1)** | **(*m/z*)** |
| **7** |  | 3458, 3380, 3079, 3020, 2938, 2864, 1652, 1619, 1587, 1506, 1470, 1352, 1326, 1298, 1268, 1196, 1025, 836, 594 | 299.3 (M+1)+  214.2 (M-NHR1)+ |
| **8** |  | 3404, 3336, 3018, 2929, 2855, 1661, 1609, 1579, 1522, 1504, 1459, 1344, 1326, 1262, 1181, 1022, 890, 834, 593, 509 | 625.5 (2M+1)+  313.3 (M+1)+  214.2 (M-NHR1)+ |

Tablica 6. 1H i 13C NMR spektroskopski podaci za eter-amide **7, 8**



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz)** | **13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm)** |
| **7** |  | 8.67 (d, 1H, 3, *J* = 1.29), 8.46 (d, 1H, 1', *J* = 7.95), 8.40 (d, 1H, 5, *J* = 1.29), 6.91-6.86 (m, 2H, 7, 11), 6.63-6.58 (m, 2H, 8, 10), 5.09 (s, 2H, 12), 4.31-4.19 (m, 1H, 2'), 1.93-1.81 (m, 2H, 3'), 1.75-1.65 (m, 2H, 6'), 1.63-1.51 (m, 4H, 4', 5') | 162.11 (4), 161.72 (1), 146.54 (6), 142.44 (9), 140.93 (5), 139.22 (2), 133.13 (3), 121.69 (7,11), 114.41 (8,10), 50.48 (2'), 32.02 (3',6'), 23.53 (4',5') |
| **8** |  | 8.67 (d, 1H, 3, *J* = 1.29), 8.39 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.32 (d, 1H, 1', *J* = 8.52), 6.91-6.86 (m, 2H, 7, 11), 6.63-6.58 (m, 2H, 8, 10), 5.06 (s, 2H, 12), 3.84-3.72 (m, 1H, 2'), 1.80-1.70, 1.62-1.56, 1.47-1.25, 1.20-1.11 (m, 10H, 3'-7') | 161.70 (4), 161.47 (1), 146.48 (6), 142.45 (9), 140.92 (5), 139.17 (2), 133.09 (3), 121.60 (7, 11), 114.38 (8, 10), 47.85 (2'), 32.10 (3', 7'), 25.04 (5'), 24.76 (4', 6') |

Tablica 7. Analitički podaci za benzotriazolid *p*-aminofenola **10** i uree **11, 12**



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R2** | **Molekulska formula**  **(*M*r)** | **Iskorišt. (%)** | ***t*t (°C)** |
| **10** |  | C13H10N4O2  (254,24) | a | a |
| **11** |  | C12H16N2O2  (220,27) | 86 | 173–177 |
| **12** |  | C14H10ClF3N2O2  (330,69) | 30 | 210–215 |

a Spoj nije dobiven u čistom obliku.

Tablica 8. IR i MS spektroskopski podaci za benzotriazolid *p*-aminofenola **10** i uree **11, 12**



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R2** | **IR (KBr) νmax (cm-1)** | **MS (*m/z*)** |
| **10** |  | 3456, 3252, 1726, 1544, 1616, 1544, 1618, 1488, 1446, 1370, 1236, 1212, 1060, 926, 825, 146, 583 | 277.1 (M+23)+  120.1 (R2H+1)+ |
| **11** |  | 3243, 2960, 2870, 1608, 1574, 1517, 1442, 1309, 1259, 1220, 1163, 835, 805, 727, 667, 523 | 221.1 (M+1)+  441.2 (2M+1)+ |
| **12** |  | 3305, 3112, 2930, 1673, 1625, 1591, 1560, 1482, 1436, 1328, 1268, 1185, 1147, 1126, 832, 684 | 331.0 (M+1)+ |

Tablica 9. 1H i 13C NMR spektroskopski podaci za benzotriazolid *p*-aminofenola **10** i uree **11, 12**



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R2** | **1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz)** | **13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm)** |
| **10** |  | 10.89 (s, 1H, 1), 9.41 (s, 1H, 8), 8.24 (d, 2H, arom., *J* = 9.12), 7.76-7.73 (m, 1H, arom.), 7.60-7.57 (m, 3H, arom.), 6.83-6.81 /m, 2H, arom.) | 154.61 (9), 146.99 (2), 145.50 (15), 131.47 (10), 129.94 (13), 128.40 (5), 125.62 (12), 123.19 (4, 6), 119.18 (14), 115.18 (3, 7), 113.69 (11) |
| **11** |  | 8.88 (s, 1H, 1), 7.86 (s, 1H, 8), 7.13-7.11 (m, 2H, arom.), 6.63-6.60 (m, 2H, arom.), 5.94 (d, 1H, 10, *J* = 7.20), 3.93-3.88 (m, 1H, 11), 1.84-1.78 (m, 2H, 12), 1.64-1.59 (m, 2H, 15), 1.55-1.50 (m, 2H, 13), 1.36-1.30 (m, 2H, 12) | 155.11 (9), 151.79 (2), 132.07 (5), 119.60 (4, 6), 115.02 (3, 7), 50.82 (11), 32.86 (12, 15), 23.10 (13, 14) |
| **12** |  | 9.09 (s, 1H, 1), 9.00 (s, 1H, 8), 8.46 (s, 1H, 10), 8.09 (d, 1H, 16, *J* = 2.13), 7.64-7.56 (m, 2H, 12, 13), 7.24-7.19 (m, 2H, 3, 7), 6.72-6.67 (m, 2H, 4, 6) | 152.95 (1), 152.60 (9), 139.66 (11), 131.88 (13), 130.45 (5), 126.93-126.32 (q, 15, *J* = 30.57), 125.53-120.10 (q, 17, *J* = 272.90), 122.77 (12), 121.84 (14), 120.99 (4, 6), 116.57-116.45 (q, 16, *J* = 5.72), 115.17 (3, 7) |

Tablica 10. Analitički podaci za urea-eter-amide **13**-**19**



|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **R2** | **Molekulska formula**  **(*M*r)** | **Isk. (%)** | ***t*t** |
| **13** |  |  | C20H15ClF3N5O3  (465,81) | 50 (B) | 233–239 |
| **14** |  |  | C21H17ClF3N5O4  (495,84) | 35 (B) | 175–180 |
| **15** |  |  | C24H21ClF3N5O3  (519,90) | 49 (A)  45 (B) | 231–233 |
| **16** |  |  | C25H23ClF3N5O3  (533,93) | 61 (A)  63 (B) | 217–220 |
| **17** |  |  | C26H15Cl2F6N5O3  (630,33) | 27 | 141–144 (raspad) |
| **18** |  |  | C26H19ClF3N5O4  (557,91) | 18 | 208–212 |
| **19** |  |  | C22H27N5O3  (409,48) | 41 | 235–237 |

Tablica 11. IR i MS spektroskopski podaci za urea-eter-amide **13**-**19**



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **R2** | **IR (KBr) νmax (cm-1)** | **MS** |
| **13** |  |  | 3415, 3289, 3134, 3103, 1710, 1662, 1608, 1586, 1550, 1510, 1487, 1460, 1402, 1301, 1176, 1125, 1029, 837, 664, 509 | 466.1 (M+1)+  381.3 (M-R1-CF3)+  341.3 ((M-CONHR1- CF3)H+1) +  313.3 (R2NHCONHC6H4)+ |
| **14** |  |  | 3437, 3352, 3140, 2929, 1712, 1647, 1608, 1561, 1509, 1486, 1462, 1420, 1354, 1329, 1304, 1279, 1258, 1225, 1192, 1143, 1076, 1032, 1019, 915, 894, 845, 688, 664, 641, 513 | 991.3 (2M+1)+  518.2 (M+23)+  496.3 (M+1)+ |
| **15** |  |  | 3382, 3294, 3115, 3081, 2963, 2875, 1711, 1658, 1604, 1549, 1509, 1485, 1460, 1327, 1195, 1133, 1023, 840, 661, 513 | 520.1 (M+1)+ |
| **16** |  |  | 3394, 3322, 3122, 3082, 2928, 2857, 1711, 1660, 1595, 1513, 1481, 1421, 1310, 1227, 1143, 1033, 844, 576, 515 | 534.4 (M+1)+  381.5 (M-R1-CF3)+  313.3 (R2NHCONHC6H4)+ |
| **17** |  |  | 3353, 3123, 1689, 1593, 1532, 1506, 1482, 1463, 1421, 1353, 1321, 1274, 1261, 1230, 1185, 1138, 1113, 1034, 1020, 835, 665 | 630.2 (M+1)+  409.2 ((M-CONHR1)H +1)+  381.4 (M-R1-CF3)+ |
| **18** |  |  | 3351, 3073, 1678, 1595, 1547, 1506, 1486, 1460, 1420, 1349, 1330, 1280, 1230, 1194, 1137, 1033, 1017, 912, 839, 753, 701, 664, 636, 532, 516 | 558.2 (M+1)+  381.4 (M-R1-CF3)+  341.4 ((M-CONHR1-CF3)H+1)+ |
| **19** |  |  | 3341, 3070, 3052, 2952, 2867, 1660, 1606, 1571, 1505, 1461, 1408, 1349, 1316, 1284, 1242, 1194, 1023, 897, 835, 626, 527, 502 | 841.4 (2M+23)+  819.4 (2M+1) +  432.2 (M+23) +  410.2 (M+1) + |

Tablica 12. 1H NMR spektroskopski podaci za urea-eter-amide **13**-**19**



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **R2** | **1H NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm, *J*/Hz)** |
| **13** |  |  | 9.18 (s, 1H, 14), 8.91 (s, 1H, 12), 8.69 (s, 2H, 3, 1'), 8.53 (s, 1H, 5), 8.12 (s, 1H, 20), 7.68-7.60 (m, 2H, 16, 17), 7.54 (d, 2H, 8, 10, *J* = 8.73), 7.19 (d, 2H, 7, 11, *J* = 8.70), 2.82 (d, 3H, 2', *J* = 4.56) |
| **14** |  |  | 9.26 (s, 1H, 14), 9.00 (s, 1H, 12), 8.70 (d, 1H, 3, *J =* 1.30), 8.56 (t, 1H, 1', *J* = 5.85), 8.54 (d, 1H, 5, *J* = 1.31), 8.12 (d, 1H, 20, *J* = 2.32), 7.68-7.59 (m, 2H, 16, 17), 7.56-7.51 (m, 2H, 8, 10), 7.22-7.17 (m, 2H, 7, 11), 4.77 (t, 1H, 4', *J* = 5.47), 3.56-3.50 (q, 2H, 3', *J* = 5.85), 3.41-3.35 (q, 2H, 2', *J* = 5.74) |
| **15** |  |  | 9.20 (s, 1H, 14), 8.95 (s, 1H, 12), 8.69 (d, 1H, 3, *J* = 1.20), 8.53 (d, 1H, 5, *J* = 1.26), 8.49 (d, 1H, 1', *J* = 7.98), 8.12 (d, 1H, 20, *J* = 2.46), 7.67-7.65 (m, 1H, 16), 7.63-7.61 (m, 1H, 17), 7.55-7.53(m, 2H, 8, 10), 7.21-7.18 (m, 2H, 7, 11), 4.27-4.22 (m, 1H, 2'), 1.91-1.85 (m, 2H, 3'), 1.72-1.68 (m, 2H, 6'), 1.62-1.53 (m, 4H, 4', 5') |
| **16** |  |  | 9.19 (s, 1H, 14), 8.93 (s, 1H, 12), 8.69 (d, 1H, 3, *J* = 1.20), 8.52 (d, 1H, 5, *J* = 1.20), 8.40 (d, 1H, 1', *J* = 8.52), 8.12 (d, 1H, 20, *J* = 2.13), 7.68-7.60 (m, 1H, 16, 17), 7.56-7.51(m, 2H, 8, 10), 7.22-7.17 (m, 2H, 7, 11), 3.84-3.73 (m, 1H, 2'), 1.80-1.70, 1.62-1.58, 1.48-1.25, 1.19-1.07 (4m, 10H, 3'-7') |
| **17** |  |  | 11.09 (s, 1H, 1'), 9.20 (s, 1H, 14) 8.95 (s, 1H, 12), 8.86 (d, 1H, 3, *J* = 1.26), 8.65 (d, 1H, 5, *J* = 2.46), 8.24 (dd, 1H, 3', *J* = 2.40, *J* = 6.42), 8.12 (d, 1H, 7', *J* = 2.22), 7.73 (d, 1H, 6', *J* = 8.89), 7.68-7.60 (m, 2H, 16, 17), 7.58-7.53 (m, 2H, 8, 10), 7.26-7.21 (m, 2H, 7, 11) |
| **18** |  |  | 12.10 (s, 1H, 1'), 9.20 (s, 1H, 14), 8.94 (s, 1H, 12), 8.68 (d, 1H, 3, *J* = 1.23), 8.52 (d, 1H, 5, *J* = 1.29), 8.12 (d, 1H, 20, *J* = 2.28), 7.68-7.60 (m, 2H, 16, 17), 7.57-7.51 (m, 2H, 8, 10), 7.49-7.45, 7.42-7.35 (2m, 5H, 4'-8'), 7.22-7.17 (m, 2H, 7, 11), 4.94 (s, 2H, 2') |
| **19** |  |  | 8.67 (d, 1H, 3, *J* = 1,29), 8.48 (d, 1H, 5, *J* = 1.32), 8.43 (d, 1H, 1', *J* = 2.88), 8.32 (s, 1H, 12), 7.46-7.41 (m, 2H, 8, 10), 7.12-7.07 (m, 2H, 7, 11), 6.15 (d, 1H, 14, *J* = 7.23), 4.31-4.19 (m, 1H, 2'), 4.00-3.89 (m, 1H, 15), 1.93-1.79, 1.72-1.50, 1.42-1.32 (3m, 16H, 3'-6', 16-19) |

Tablica 13. 13C NMR spektroskopski podaci za urea-eter-amide **13**-**19**



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Spoj** | **R1** | **R2** | **13C NMR (DMSO-*d*6, *δ* ppm)** |
| **13** |  |  | 162.94 (4), ¸161.16 (1), 152.47 (13), 147.25 (6), 140.64 (5), 139.61 (15), 139.35 (2), 136.68 (9), 133.63 (3), 131.96 (17), 126.99-126.38 (q, 19, *J* = 30.48), 125.51-120.28 (q, 21, *J* =273.27), 123.10 (16), 122.27 (18), 121.75 (8, 10), 120.04 (7, 11), 116.82-116.71 (q, 20, *J* = 5.44), 25.89 (2') |
| **14** |  |  | 162.39 (4), 161.17 (1), 152.42 (13), 147.24 (6), 140.73 (5), 139.40 (15), 139.30 (2), 136.63 (9), 133.58 (3), 131.91 (17), 126.55 (t, 19, *J* = 30.33), 125.46-120.03 (q, 21, *J* = 272.95), 123.01 (16), 122.23 (18), 121.63 (8, 10), 120.01 (7, 11), 116.80-116.68 (q, 20, *J* = 5.68), 59.55 (3'), 41.48 (2') |
| **15** |  |  | 162.02 (4), 161.14 (1), 152.48 (13), 147.28 (6), 140.84 (5), 139.70 (15), 139.35 (2), 136.67 (9), 133.51 (3), 131.97 (17), 126.99-126.39 (q, 19, *J* = 30.50), 125.52-120.09 (q, 21, *J* = 273.44), 123.05 (16), 122.28 (18), 121.71 (8, 10),120.04 (7, 11), 116.81-116.70 (q, 20, *J* = 4.39), 50.50 (2'), 32.01 (3', 6'), 23.52 (4', 5') |
| **16** |  |  | 161.43 (4), 161.17 (1), 152.48 (13), 147.30 (6) 140.90 (5) 139.67 (15) 139.36 (2), 136.68 (9) 133.55 (3), 131.99 (17) 128.25-117.41 (q, 21, *J* = 273.26) 127.31-126.09 (q, 19, *J* = 30.29),123.54 (16), 122.27 (18), 122.18 (8, 10), 120.53 (7, 11) 116.88-116.65 (q, 20, *J* = 5.82), 47.93 (2'), 32.13 (3', 7'), 25.08 (5'), 24.82 (4', 6') |
| **17** |  |  | 161.97 (4) 161.60 (1) 152.47 (13), 147.10 (6) 142.02 (5), 139.34 (15), 138.91 (2), 137.97 (2'), 136.83 (9), 133.76 (3), 131.98 (17), 131.96 (6'), 128.23-117.37 (q, 21, *J* = 273.33), 128.18-117.32 (q, 8', *J* = 273.33), 127.30-126.08 (q, 19, *J* = 30.59), 127.24-126.02 (q, 4', *J* = 30.77), 125.26 (16) 124.71 (d, 5', *J* = 1.66) 123.06 (7'), 122.29 (d, 18, *J* = 1.65), 121.79 (8, 10), 120.04 (7,11) 119.44-119.21 (q, 20, *J* = 5.71), 116.88-116.65 (q, 3', *J* = 5.71) |
| **18** |  |  | 161.35 (4), 160.17 (1), 152.48 (13), 147.15 (6), 140.93 (5), 139.35 (15), 138.83 (2), 136.74 (9), 135.73 (3'), 133.92 (3), 131.99 (17), 128.78 (4', 8'), 128.28 (5'-7'), 128.24-117.38 (q, 18, *J* = 272.87), 127.30-126.09 (q, 19, *J* = 30.54), 123.07 (16), 121.78 (8, 10), 120.05 (7, 11), 116.88-116.66 (q, 20, *J* = 5.53), 77.11 (2') |
| **19** |  |  | 162.01 (4), 161.21 (1), 154.78 (13), 146.18 (6), 140.82 (5), 139.57 (2), 138.06 (9), 133.87 (3), 121.45 (8, 10), 118.70 (7, 11), 50.86 (15), 50.48 (2'), 32.78 (3', 6'), 31.99 (16, 19), 23.49 (4', 5'), 23.62 (17, 18) |

1. **ZAKLJUČAK**

U ovom radu razvijen je novi put sinteze difenil-urea, koji je općenitiji i jeftiniji put od ranije opisanog u literaturi. Tim sintetskim putem, koristeći benzotriazolsku metodu, pripravljeni su novi, do sada neopisani spojevi, analozi sorafeniba **13-19**, počevši od 5-hidroksi-2-pirazinkarboksilne kiseline. Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim spektroskopskim metodama (IR, 1H i 13C NMR, MS). Ispitivanje potencijalnog antitumorskog djelovanja spojeva **13-19** je u tijeku.

# ZAHVALE

Zahvaljujemo se svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu na vodstvu i podršci.

# Literatura

Amiri P, Aikawa ME, Dove J. CHIR-265 is a potent selective inhibitor of C-Raf/B-Raf/mutB-Raf that effectively inhibits proliferation and survival of cancer cell lines with Ras/Raf pathway mutations. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2006; 47:Abstract 4855.

Babić Ž, Crkvenčić M, Rajić Z, Mikecin A, Kralj M, Balzarini J, Petrova M, Vanderleyden J, Zorc B. New sorafenib derivatives: synthesis, antiproliferative activity against tumour cell lines and antimetabolic evaluation. Molecules 2012; 17:1124–1137.

Bankston D, Dumas J, Natero R, Riedl B, Monahan M, Sibley R. A scaleable synthesis of BAY 43-9006: A potent Raf kinase inhibitor for the treatment of cancer. Org. Process Res. Dev. 2008; 6:777–781.

[Carlomagno](http://jnci.oxfordjournals.org/search?author1=Francesca+Carlomagno&sortspec=date&submit=Submit) F, [Anaganti](http://jnci.oxfordjournals.org/search?author1=Suresh+Anaganti&sortspec=date&submit=Submit) S, [Guida](http://jnci.oxfordjournals.org/search?author1=Teresa+Guida&sortspec=date&submit=Submit) T, [Salvatore](http://jnci.oxfordjournals.org/search?author1=Giuliana+Salvatore&sortspec=date&submit=Submit) G, [Troncone](http://jnci.oxfordjournals.org/search?author1=Giancarlo+Troncone&sortspec=date&submit=Submit) G, [Wilhelm](http://jnci.oxfordjournals.org/search?author1=Scott+M.+Wilhelm&sortspec=date&submit=Submit) SM, [Santoro](http://jnci.oxfordjournals.org/search?author1=Massimo+Santoro&sortspec=date&submit=Submit) M. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. J. Natl. Cancer Inst*.* 2006; 98:326–334.

Chabner BA, Barnes J, Neal J, Olson E, Mujagic H, Sequist L, Wilson W, Longo DL, Mitsiades C, Richardson P. Tagreted therapies: tyrosine kinase inhibitors, monoclonal antibodies, and cytokines. Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics. 12. izdanje, The McGraw-Hill Companies, SAD, 2011.

Cooper GM., Hausman RE. Stanica, 5. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2010.

Dabrafenib, http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ ucm354477.htm; pristupljeno 16. travnja 2014.

Dabrafenib (Rx) – Tafinlar, http://reference.medscape.com/drug/dabrafenib-999853#4; pristupljeno 16. travnja 2014.

FDA Approval for Regorafenib, http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-regorafenib; pristupljeno 18. travnja 2014.

**FDA approves Zelboraf and companion diagnostic test for late-stage skin cancer,** http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm268241.htm; pristupljeno 16. travnja 2014.

García-Echeverría C. Protein and lipid kinase inhibitors as targeted anticancer agents of the RAS/Raf/MEK and PI3K/PKB pathways. Purinergic Signal. 2009: 5117–125.

Holladay MW, Campbell BT, Rowbottom MW, Chao Q, Sprangle KG, Lai AG, Abraham S, Setti E, Faraoni R, Tran L, Armstrong RC, Gunawardane RN, Gardner MF, Cramer MD, Gitnick D, Ator MA, Dorsey BD, Ruggeri BR, Williams M, Bhagwat S, James J. 4-Quinazolinyloxy-diaryl ureas as novel B-Raf V600Einhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011; 21:5342–5346.

Hwang YH, Choi JY., Kim S, Chung ES, Kim T, Koh SS, Lee B, Bae SH, Kim J, Park YM. Over-expression of *c-raf-1* protooncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatol. 2004; 29:113–121.

Kalčić I, Zovko M, Jadrijević-Mladar Takač M, Zorc B, Butula I.Synthesis and reactions of some azolecarboxylic acid derivatives. Croat. Chem. Acta 2003; 76:217−228.

Kasid U, Dritschilo A. Raf antisense oligonucleotide as a tumor radiosensitizer. Oncogene 2003; 22:5876–5884.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, Hrvatska 2011.

Kolch W, Kotwailwale A, Vass K, Janosch P. The role of Raf kinases in malignant transformation.Expert. Rev. Mol. Med.2002**;** 2002:1–18.

Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, Kolch W. Raf familiy kinases: old dogs have learned new tricks, Genes & Cancer 2011; 2: 232–295.

Meyer H, Graf R. Über die Einwirkung von Thionylchlorid auf die Pyridin-monocarbonsäuren. Chem. Ber. 2006; 61:2202–2215.

Nexavar approval history, http://www.drugs.com/history/nexavar.html; pristupljeno 25. travnja 2014.

Oka H, Chatani Y, Hoshino R, Ogawa O, Kakehi Y, Terachi T, Okada Y, Kawaichi M, Kohno M, Yoshida O. Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. Cancer Res*.* 1995; **55:**4182–4187.

Panka DJ, Wang W, Atkins MB, Mier JW. The Raf inhibitor BAY 43-9006 (sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells. Cancer Res. 2006; 66:1611–1619.

RAF265, http://www.novartisoncology.com/us/research-innovation/oncology-pipeline/raf-265.jsp?disease\_type\_hidden=null&accordionID1=1&accordionID2=-1&compound=RAF265; pristupljeno 27.travnja 2014.

Ramurthy S, Costales A, Jansen JM, Levine B, Renhowe PA, Shafer CM, Subramnian S. Design and synthesis of 6,6-fused heterocyclic amides as Raf kinase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012; 21:1678–1681.

Ramurthy S, Aikawa M, Amiri P, Costales A, Hashash A, Jansen JM, Lin S, Ma S, Renhowe PA, Shafer CM, Subramnian S, Sung L, Verhagen J. Design and synthesis of 5,6-fused heterocyclic amides as Raf kinase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011; 21:3289–3289.

[Ramurthy](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Ramurthy%2C+S&qsSearchArea=author) S, [Subramanian](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Subramanian%2C+S&qsSearchArea=author) S, [Aikawa](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Aikawa%2C+M&qsSearchArea=author) M, [Amiri](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Amiri%2C+P&qsSearchArea=author) P, [Costales](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Costales%2C+A&qsSearchArea=author) A, [Dove](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Dove%2C+J&qsSearchArea=author) J, [Fong](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Fong%2C+S&qsSearchArea=author) S, [Jansen](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Jansen%2C+J+M&qsSearchArea=author) MJ, [Levine](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Levine%2C+B&qsSearchArea=author) B, [Ma](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Ma%2C+S&qsSearchArea=author) S, [McBride](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=McBride%2C+C+M&qsSearchArea=author) CM, [Michaelian](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Michaelian%2C+J&qsSearchArea=author) J, [Pick](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Pick%2C+T&qsSearchArea=author) T, [Poon](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Poon%2C+D+J&qsSearchArea=author) DJ, [Girish](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Girish%2C+S&qsSearchArea=author) S, [Shafer](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Shafer%2C+C+M&qsSearchArea=author) CM, [Stuart](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Stuart%2C+D&qsSearchArea=author) D, [Sung](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Sung%2C+L&qsSearchArea=author) L, [Renhowe](http://pubs.acs.org/action/doSearch?action=search&author=Renhowe%2C+P+A&qsSearchArea=author) PA. Design and synthesis of orally bioavailable benzimidazoles as Raf Kinase inhibitors, J. Med. Chem. 2008; 51:7049–7052.

Rawling T, McDonagh AM, Tattam B, Murray M. Synthesis of unsymmetrical biaryl ureas from *N*-carbamoylimidazoles: kinetics and application. Tetrahedron 2012; 68:6065–6070.

Regorafenib (Rx) – Stivarga, http://reference.medscape.com/drug/stivarga-regorafenib-999774; pristupljeno 19. travnja 2014.

[Sharma](http://cancerres.aacrjournals.org/search?author1=Arati+Sharma&sortspec=date&submit=Submit) A, [Trivedi](http://cancerres.aacrjournals.org/search?author1=Nishit+R.+Trivedi&sortspec=date&submit=Submit) NR, [Zimmerman](http://cancerres.aacrjournals.org/search?author1=Melissa+A.+Zimmerman&sortspec=date&submit=Submit) MA, [Tuveson](http://cancerres.aacrjournals.org/search?author1=David+A.+Tuveson&sortspec=date&submit=Submit) DA, [Smith](http://cancerres.aacrjournals.org/search?author1=Charles+D.+Smith&sortspec=date&submit=Submit) CD, [Robertson](http://cancerres.aacrjournals.org/search?author1=Gavin+P.+Robertson&sortspec=date&submit=Submit) GP. Mutant V599E B-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. Cancer Res. 2005; 65:2412–2421.

Sun M, Xiaoqing W, Chen J, Cai J, Cao M, Ji M. Design, synthesis, and *in vitro* antitumor evaluation of novel diaryl ureas derivatives. Eur. J. Med. Chem. 2010; 45:2299–2306.

Vemurafenib (Rx) – Zelboraf, http://reference.medscape.com/drug/zelboraf-vemurafenib-999679#4 ; pristupljeno 16. travnja 2014.

Wan PTC, Garentt MJ, Roe SM., Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Bradford D, Marais R. Mechanism of activation of the Raf-Erk signaling pathway by oncogenic mutations of B-Raf. Cell 2004; 855–867.

Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov, Kelley S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. Nature Rev. Drug Discov. 2006; 5:835–844.

Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith R A, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral anti-tumor activity and targets the Raf/MEK/Erk pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. Cancer Res*.* 2004; 64:7099–7109.

Yao J, Chen J, Zuopeng H, Sun W, Xu W. Design, synthesis and biological activitiesof thiourea containing sorafenib analogs as antitumor agents. Bioorg. Med. Chem. 2012; 20:2923–2929.

Yao J, Chen J, Zuopeng H, Sun W, Xu W, Fang W. Design, synthesis and biological activities of sorafenib derivatives as antitumor agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012; 22:6549–6553.

Yu C, Bruzek LM, Meng XW, Gores GJ, Carter CA, Kaufmann SH, Adjei AA. The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. Oncogene 2005; 24:6861–6869.

Zhan W, Li Y, Huang W, Zhao Y, Yao Z, Yu S, Yuan S, Jiang F, Yao S, Li S. Design, synthesis and antitumor activities of novel bis-aryl ureas derivatives as Raf kinase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 2012; 20:4323–4329.

[Zhang](http://www.tandfonline.com/action/doSearch?Contrib=Zhang%2C+L) L, [Xia](http://www.tandfonline.com/action/doSearch?Contrib=Xia%2C+W) W, [Wang](http://www.tandfonline.com/action/doSearch?Contrib=Wang%2C+B) B, [Luo](http://www.tandfonline.com/action/doSearch?Contrib=Luo%2C+Y) Y, [Lu](http://www.tandfonline.com/action/doSearch?Contrib=Lu%2C+W) W. Convenient synthesis of sorafenib and its derivatives. Synth. Commun. 2011; 41:3140–3146.

Zhao C, Wang R, Li G, Xue X, Sun C, Qu X, Li W. Synthesis of indazole based diarylurea derivatives and their antiproliferative activity against tumor cell lines.Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013; 23:1989–1992.

Zitko J, Servusová B, Petrová P, Mandíková J, Kubíček V, Kučera R, Hrabcová V, Kuneš J, Soukup O, Doležal M. Synthesis, antimycrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of 5-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. Molecules 2013; 18:14807–14825.

Zorc B, Rajić Džolić Z, Butula I. Benzotriazole as a synthetic auxiliary. Croat. Chem. Acta. 2012; 85:595–602.

1. **SAŽETAK**

Maja Beus, Tomislav Ubrekić, Josipa Vidović

**SINTEZA PIRAZINSKIH ANALOGA ANTITUMORSKOG LIJEKA SORAFENIBA**

Sorafenib je noviji citostatik, inhibitor više kinaza uključenih u staničnu proliferaciju i preživljavanje. Prema svojoj strukturi sorafenib je difenil-urea, te je u ovom radu razvijen novi put sinteze te skupine spojeva, koji je općenitiji i jeftiniji od ranije opisanog sintetskog puta u literaturi. Tim sintetskim putem, koristeći benzotriazolsku metodologiju, pripravljeni su novi, do sada neopisani spojevi, derivati sorafeniba **13–19**. Početni spoj u sintezi je 5-hidroksi-2-pirazinkarboksilna kiselina, koja se pomoću tionil-klorida, te kasnije odgovarajućeg amina, prevodi u amide **1–6**. Amidi **1–6** korišteni su za pripravu difenil-urea pomoću Metode A (analogne opisanoj u literaturi) i nove Metode B. U Metodi B, klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **7** reagira s *p*-aminofenolom te nastaje odgovarajući benzotriazolid **8**, koji u idućoj reakciji s aminima daje uree **9** i **10**. U posljednjem sintetskom koraku uree **9** i **10** reagiraju s amidima **1–6** i daju konačne produkte **13–19**. Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim spektroskopskim metodama (IR, 1H i 13C NMR, MS). Produkti **13–19** su potencijalni citostatici te je ispitivanje njihovog antitumorskog djelovanja u tijeku.



Ključne riječi: sorafenib, citostatik, sinteza, pirazin

1. **SUMMARY**

Maja Beus, Tomislav Ubrekić, Josipa Vidović

**SYNTHESIS OF THE PYRAZINE ANALOGUES OF THE ANTITUMOR DRUG SORAFENIB**

Sorafenib is a cytostatic, inhibitor of several protein kinases involved in cell proliferation and survival. As sorafenib bears bisphenyl-urea moiety in its structure, here we describe a new synthetic pathway leading to bisphenyl-ureas, which is more general and cheaper than the one discribed in the literature. Using that methodology, new sorafenib analogues **13–19** were prepared. The starting compound 5-hydroxy-2-pyrazinecarboxylic acid was converted first to acyl chloride, and then in the reaction with an appropriate amine to amides **1–6**. Amides **1–6** were used in both Method A (analogous to the one int he literature) and the new Method B. In the Method B, 1-benzotriazolecarboxylic acid chloride **7** in the reaction with *p*-aminophenol yields benzotriazolide **8**, which in the subsequent reaction with amines gave ureas **9** and **10**. In the final reaction step, **9** and **10** were coupled with amides **1–6** to give the final products **13–19**. Their structures were defined by usual spectroscopic methods (IR, 1H and 13C NMR, MS). The synthesized compounds **13–19** are potential cytostatics. Testing of their antitumor activity is in progress.



Keywords: sorafenib, cytostatic, synthesis, pyrazine

1. **PRILOZI**



