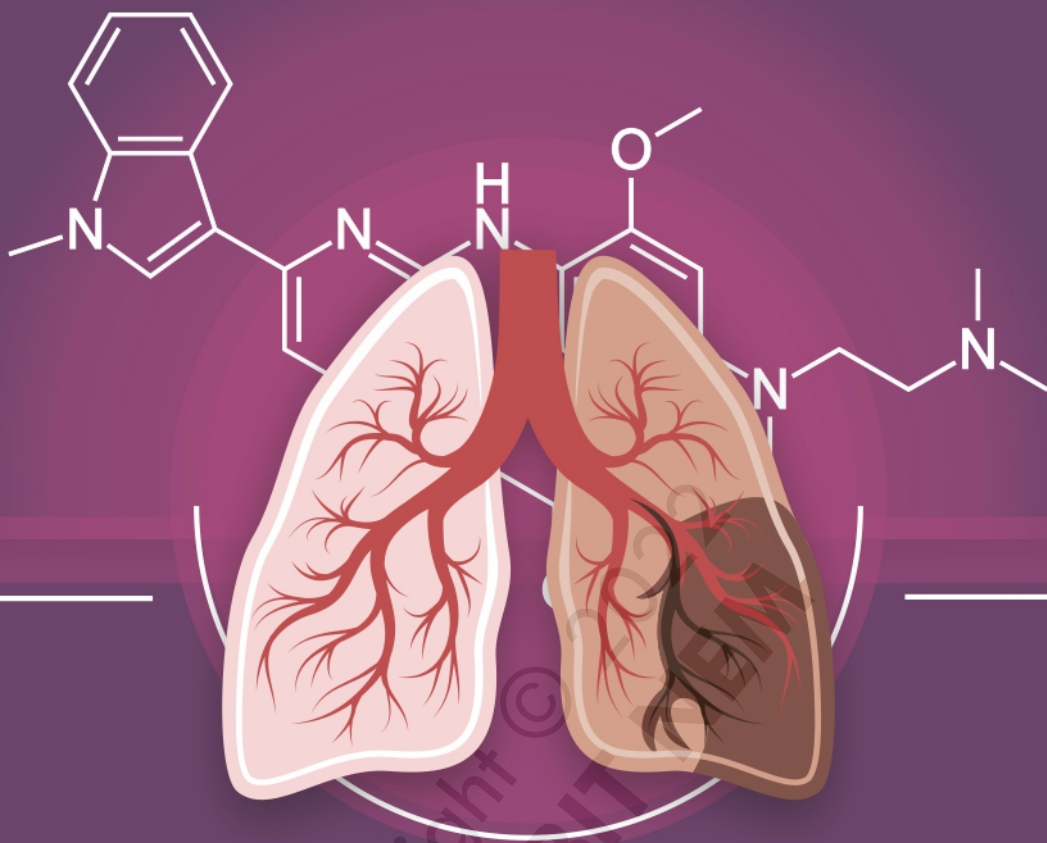




Sintesis Senyawa Osimertinib Teriodinasi Terkonjugasi Peptida (PDC) sebagai Kandidat Agen Terapi Kanker Paru Tipe NSCLC

apt. Nurmaya Effendi, S.Si., M.Sc., Ph.D.
Aminah, S.Farm., M.Sc.

Dr.rer.nat. Rien Ritawidya, S.Si., M.Farm.

apt. Faradiba, S.Si., M.Si., Ph.D.

apt. Dewi Yuliana, S.Si., M.Farm., Ph.D.



**Sintesis Senyawa Osimertinib
Teriodinasi Terkonjugasi Peptida (PDC)
sebagai Kandidat Agen Terapi Kanker Paru Tipe NSCLC**

KUTIPAN PASAL 72:
Ketentuan Pidana Undang-Undang Republik
Indonesia
Nomor 19 Tahun 2002 tentang HAK CIPTA

1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) atau Pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu Ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud dalam ayat 1, dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

apt. Nurmaya Effendi, S.Si., M.Sc., Ph.D.
Aminah, S.Farm., M.Sc.
Dr.rer.nat. Rien Ritawidya, S.Si., M.Farm.
apt. Faradiba, S.Si., M.Si., Ph.D.
apt. Dewi Yuliana, S.Si., M.Farm., Ph.D.

**Sintesis Senyawa Osimertinib
Teriodinasi Terkonjugasi Peptida (PDC)
sebagai Kandidat Agen Terapi Kanker Paru Tipe NSCLC**



Pekalongan - Indonesia

**Sintesis Senyawa Osimertinib
Teriodinasi Terkonjugasi Peptida (PDC)
sebagai Kandidat Agen Terapi Kanker Paru Tipe NSCLC**
Copyright © 2022

Penulis:

apt. Nurmaya Effendi, S.Si., M.Sc., Ph.D.
Aminah, S.Farm., M.Sc.
Dr.rer.nat. Rien Ritawidya, S.Si., M.Farm.
apt. Faradiba, S.Si., M.Si., Ph.D.
apt. Dewi Yuliana, S.Si., M.Farm., Ph.D.

Editor:

Moh. Nasrudin
(SK BNSP: No. Reg. KOM.1446.01749 2019)

Setting Lay-out & Cover:

Tim Redaksi

Diterbitkan oleh:

PT Nasya Expanding Management
(Penerbit NEM - Anggota IKAPI)

Jl. Raya Wangandowo, Bojong
Pekalongan, Jawa Tengah 51156
Telp. (0285) 435833, Mobile: 0853-2521-7257
www.penerbitnem.com / penerbitnem@gmail.com

Hak Cipta dilindungi oleh Undang-Undang.
Dilarang memperbanyak sebagian
atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari Penerbit

Cetakan ke-1, Oktober 2022

ISBN: 978-623-423-571-5

Prakata

Segala puji bagi Allah Swt. karena atas berkah rahmat dan hidayah-Nya lah sehingga tim penulis dapat menyelesaikan monograf ini. Selawat serta salam atas junjungan kami Nabi Muhammad saw., semoga kita semua mendapatkan syafaat beliau di *yaumul akhir*.

Monograf berjudul **“Sintesis Senyawa Osimertinib Teriodinasi Terkonjugasi Peptida (PDC) sebagai Kandidat Agen Terapi Kanker Paru Tipe NSCLC”** menyajikan prosedur sintesis PDC (*peptide-drug conjugate*) yang sekarang ini sedang berkembang di dunia kesehatan terutama untuk tujuan diagnosa dan terapi penyakit, yang diadopsi dari ADC (*antibody-drug conjugate*) yang beberapa di antaranya telah mendapatkan *approval* dari FDA (*Food and Drug Administration*) sebagai lembaga resmi di Amerika Serikat. Dalam monograf ini kami menguraikan metode sintesis **cRGD-Osimertinib conjugate** sebagai bentuk PDC. Osimertinib sebagai *drug* generasi ketiga yang telah mendapatkan *approval* dari FDA sejak 2022 untuk mengobati kanker paru tipe NSCLC dan cRGD merupakan salah satu *homing peptide* yang dapat menjadi pembawa beberapa molekul obat maupun radionuklida dan sudah terbukti mampu terakumulasi di kanker sebagai organ target diagnosa maupun terapi.

Buku ini tersaji dalam lima bab, yaitu pendahuluan yang terurai pada bab 1, uraian tentang kanker paru dapat dibaca secara detail pada bab 2, diikuti bab 3 yang membahas tentang

PDC dan metode sintesis Osimertinib teriodinasi, linker, dan cRGDfK dijelaskan secara terperinci di bab 4 termasuk hasil analisisnya dengan menggunakan ESI-MS dan H-NMR dan terakhir adalah bab 5 yang berisi kesimpulan.

Kami sangat menyadari minimnya monograf ataupun buku ajar yang menjelaskan tentang metode sintesis senyawa kimia obat maupun non-obat yang ditulis oleh peneliti Indonesia. Sehingga dengan diterbitkannya monograf ini diharapkan dapat menjadi motivasi positif bagi mahasiswa maupun insan peneliti Indonesia dalam mengembangkan senyawa-senyawa kandidat agen diagnosa dan terapi penyakit dalam rangka membantu program pemerintah mewujudkan kemandirian industri obat dan alat kesehatan di Indonesia.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian kepada Masyarakat, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi (SK No. 023.17.1.690523/2022, yang diturunkan pada nomor kontrak 033/E5/PG.02.00/2022; 253/LL.00.PG/2022; 2324d/B.07/UMI/VII/2022) yang telah memberikan bantuan dana dalam melaksanakan penelitian serta penerbitan monograf ini. Tim penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi kesempurnaan penulisan monograf ini. Semoga monograf ini bermanfaat untuk kemaslahatan kita semua. Selamat membaca!

Makassar, Oktober 2022

Tim Penulis

Daftar Isi

PRAKATA __ v

DAFTAR ISI __ vii

DAFTAR GAMBAR __ viii

BAB 1 PENDAHULUAN __ 1

BAB 2 KANKER PARU __ 4

- A. Definisi Kanker Paru __ 4
- B. Pengobatan dan Diagnosa Kanker Paru __ 5
- C. Peran Radiofarmaka dalam Diagnosa dan Pengobatan Kanker Paru __ 6

BAB 3 *PEPTIDE-DRUG CONJUGATE* (PDC) __ 8

BAB 4 SINTESIS SENYAWA OSIMERTINIB

TERIODINASI, LINKER, cRGDfK, DAN PDC __ 10

- A. Sintesis Senyawa Osimertinib Teriodinasi __ 10
- B. Sintesis Linker __ 32
- C. Sintesis Peptida cR(Pbf)GD(OtBu)fK __ 57
- D. Sintesis Osimertinib Teriodinasi-linker-cRGD __ 64

BAB 5 KESIMPULAN __ 74

DAFTAR PUSTAKA __ 76

TENTANG PENULIS

Daftar Gambar

Nomor	Judul Gambar	Halaman
Gambar 4.1	Skema sintesis Osimertinib teriodinasi. (a) CH_3I , K_2CO_3 , aseton, 40°C ; (b) $\text{Pd}(\text{C})$, H_2 , dry MeOH , rt; (c) H_2SO_4 , HNO_3 , DCM , 0°C ; (d) Boc_2O , DCM anhidrat; (e) CH_3I , KOH , DMSO , suhu kamar; (f) AlCl_3 , 2,4-dikloropirimidin, etilenglikol-dimetil eter, 80°C ; (g) A_3 , TsOH , <i>n</i> -butanol, 120°C ; (h) D_1 , C_1 , DIPEA , DMA , 120°C ; (i) C_2 , NH_4Cl , Fe , etanol, air, 100°C ; (j) C_3 , akrilol klorida, DIPEA , -40°C ; (k) TFA , suhu kamar.	11
Gambar 4.2	Skema sintesis Linker Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP. (a) NHS , DCC , rt; (b) NaHCO_3 , rt; (c) EEDQ , rt; (d) DIPEA , rt.	32
Gambar 4.3	Skema sintesis Linker Fmoc-Val-Ala-PABC-PNP. (a) NHS , DCC , rt; (b) NaHCO_3 , rt; (c) EEDQ , rt; (d) DIPEA , rt.	41
Gambar 4.4	Skema sintesis Linker Fmoc-Ala-Ala-PABC-PNP. (a) NHS , DCC , rt; (b) NaHCO_3 , rt; (c) EEDQ , rt; (d) DIPEA , rt.	48

Skema sintesis peptida
cR(Pbf)GD(OtBu)fK. (a) (i)
Fmoc-Gly-OH, DIPEA, DCM; (ii)
piperidin 20% dalam DMF; (iii)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH atau Fmoc-
Asp(OtBu)-OH atau Fmoc-D-
Phe-OH atau Fmoc-Lys(Alloc)-
OH, HOBt, DIPCI, DMF; (iv)
20% piperidin/DMF; (b) 30%
HFIP/DCM; (c) DPPA,
NaHCO₃, DMF; (d) Pd(PPh₃)₄,
fenilsilan, DMF

Bab 1

PENDAHULUAN

Di Indonesia kanker paru merupakan kanker dengan angka kasus baru mencapai 8,8% pada tahun 2020 berdasarkan data Globocan 2020. Kanker ini masih menjadi penyebab kematian tertinggi bagi penderitanya bukan hanya di Indonesia tetapi juga di dunia (Siegel et al., 2020; Sung et al., 2021). Beberapa penyebabnya adalah terbatasnya kapasitas deteksi dini di layanan kesehatan primer, masih rendahnya akses pasien terhadap pengobatan yang spesifik sesuai tipe kanker paru dan keterbatasan akses ke pemeriksaan biomarker kanker paru (Dewi et al., 2021). Tingkat kelangsungan hidup pasien kanker paru sangatlah rendah hanya sebesar 19% (Sung et al., 2021). Riset lain membuktikan bahwa penegakan diagnosa penderita kanker paru pada stadium awal berkaitan erat dengan tingkat kelangsungan hidup pasien (Alexander et al., 2020). Sehingga perlu dikembangkan agen diagnosa baru yang dapat digunakan untuk penegakan diagnosa kanker paru pada stadium awal sekaligus mengembangkan sistem pengobatannya yang dapat berkontribusi dalam mewujudkan pelaksanaan *personalized medicine* sehingga dapat menurunkan angka kematian sekaligus meningkatkan *survival rate* pasien kanker paru di Indonesia khususnya dan dunia umumnya.

Salah satu tantangan besar bidang kesehatan masyarakat di Indonesia adalah kecenderungan meningkatnya penyakit degeneratif, seperti kanker, jantung,

hipertensi, dan diabetes. Permasalahan ini erat kaitannya dengan pergeseran demografi di mana jumlah penduduk usia lanjut dan usia produktif yang terdiagnosa mengidap penyakit degeneratif, masih tingginya tingkat kesenjangan sosial, dan kondisi keamanan pangan yang belum stabil demikian pula halnya dalam industri farmasi nasional yang belum berdaulat. Untuk menjawab tantangan tersebut maka kami mengembangkan teknologi diagnostik secara *in vivo* untuk deteksi penyakit degeneratif kanker paru yang target akhir jangka panjang dari studi ini adalah terciptanya prototipe kit diagnosa untuk kanker paru.

Efektivitas Osimertinib, golongan inhibitor tirosin kinase generasi ketiga, sebagai lini pertama pengobatan kanker paru tipe NSCLS dengan status mutasi L858R/T790M telah dilaporkan oleh Ramalingam, dkk. (Ramalingam et al., 2020). Penggunaan Osimertinib pun telah mendapatkan izin edar dari FDA sejak tahun 2015. Penggunaan obat yang terikat pada ligan reseptor target memungkinkan meningkatkan kadar obat yang mencapai organ target misalnya kanker. Antibodi dan peptida adalah contoh ligan yang dapat dikonjugasikan secara kovalen menggunakan penghubung (linker) dengan obat dikenal dengan istilah berturut-turut *antibody-drug conjugate* (ADC) dan *peptide-drug conjugate* (PDC). Beberapa ADC dan PDC telah terbukti potensial sebagai agen pengobatan kanker yang efektif dan telah masuk ke uji praklinik dan klinik (Bardia et al., 2019; Bargh et al., 2019; Chau et al., 2019; He et al., 2019; Trail et al., 2018).

Tujuan desain obat ADC dan PDC adalah untuk meningkatkan efisiensi obat dan memperbaiki masalah farmakokinetik karena pendeknya waktu paruh dan efek

samping dari obat kimia. Tiga komponen utama dari ADC dan PDC adalah ligan (peptida atau antibodi), senyawa sitotoksik atau obat, dan penghubung (linker).

Tujuan pengembangan yang dipaparkan dalam monograf ini adalah mendesain dan mensintesis senyawa *peptide-drug conjugate* (PDC) di mana senyawa sitotoksik (Osimertinib teriodinasi) ditambatkan pada cRGD sebagai ligan peptida yang terbukti dapat terakumulasi pada sel kanker yang dihubungkan dengan linker dipeptida yang aktif terhadap enzim Catepsin-B yang diketahui terekspresi dalam jumlah besar pada sel kanker. Osimertinib *conjugate* suatu bentuk PDC yang mengabungkan Osimertinib (penghambat EGFR generasi ketiga) dan cRGD (siklik arginine-glisin-asam aspartat) sebagai pembawa menuju organ target yaitu kanker paru jenis NSCLC bermutasi yang meng-overekspresi-kan reseptor EGFR bermutasi untuk selanjutnya senyawa radiofarmaka tersebut dapat dimanfaatkan untuk diagnosa dan terapi kanker paru. Masalah yang dituangkan dalam monograf ini di antaranya bagaimana mendesain dan mensintesis PDC sebagai agen terapi kanker paru tipe NSCLC bermutasi ganda.

Desain tiga PDC yang disintesis dalam monograf ini, cRGD-Val-Cit-Osimertinib teriodinasi, cRGD-Val-Ala-Osimertinib teriodinasi, dan cRGD-Ala-Ala-Osimertinib teriodinasi merupakan agen terapi baru yang nantinya dapat diuji secara *in vitro* dan *in vivo* sebagai agen terapi kanker paru tipe NSCLC bermutasi ganda.

Bab 2

KANKER PARU

A. Definisi Kanker Paru

Berdasarkan data Globocan 2020, kanker paru merupakan penyebab kematian terbesar bagi para penderita kanker di Indonesia yang mencapai 13,2% pada tahun 2020 dan akan terus bertambah dan diprediksi akan mencapai 54.983 kasus pada tahun 2040 (Anonim, 2020; Sung et al., 2021). Penyebab utama dari besarnya angka kematian akibat kanker paru adalah seringnya pasien terdeteksi pada stadium akhir di mana sel kanker sudah mengalami metastatis. Hal lainnya adalah terbatasnya jenis terapi dan mahalnya biaya diagnosa biomarker dan pengobatan kanker paru di Indonesia (Dewi et al., 2021).

Perokok sangat rentan terserang kanker paru dan kematian akibat kanker paru pada perokok mencapai 80% dan perokok pasif mencapai 20%. Penyebab terbesar penderita kanker paru adalah gas radon, selain itu adalah karena terpapar asap rokok (perokok pasif), asbestos, logam tertentu (arsen, kromium, kadmium), senyawa organik tertentu, radiasi, polusi udara, dan limbah buangan dari industri diesel. Faktor genetik pun menjadi salah satu penyebab dari penderita kanker paru.

B. Pengobatan dan Diagnosa Kanker Paru

Pemilihan tipe pengobatan untuk pasien kanker paru adalah berdasarkan tipe sel kanker penyebabnya yang dalam hal ini terbagi atas dua, yaitu *non-small cell lung cancer* (NSCLC) sebagai penyebab terbesar (> 80%) dan *small cell lung cancer* (SCLC) (< 20%) (Polanski et al., 2016). Reseptor tirosin kinase golongan EGFR terbukti diekspresikan dalam jumlah besar dan menjadi salah satu biomarker kanker paru NSCLC (Korpanty et al., 2014). Oleh karenanya, EGFR menjadi target penting untuk diagnosa dan pengobatan kanker paru (Goto et al., 2012; Xu et al., 2017). Gefitinib dan Erlotinib adalah obat antikanker golongan penghambat EGFR generasi pertama yang masih menjadi pilihan utama pengobatan kanker (Ellis et al., 2015), sayangnya laporan penelitian tentang mutasi EGFR pada kanker paru tipe NSCLC erat kaitannya dengan resistensi obat penghambat EGFR generasi pertama yang menyebabkan tidak efektifnya golongan obat tersebut dan mengharuskan para peneliti dunia kesehatan untuk terus berupaya mencari jenis obat baru dan metode pengobatan baru bagi penderita kanker paru di dunia utamanya di Indonesia (Gao et al., 2019; Robichaux et al., 2021).

Pada praktiknya diperlukan diagnosa penegas untuk penegakan status mutasi gen EGFR pasien kanker paru tipe NSCLC. Beberapa di antaranya adalah analisis pengurutan DNA (*sequencing DNA*), imunohistokimia, dan *Fluorescence in Situ Hybridization* (FISH) setelah dilakukannya biopsi sebagai pilihan utama untuk mendiagnosa penderita kanker paru NSCLC (Park et al., 2020). Permasalahan selanjutnya yang timbul adalah keterbatasan dari metode biopsi ini untuk mendeteksi secara lengkap jenis mutasi dari kanker tersebut karena keterbatasan jaringan kanker yang dapat dianalisis di

sampling itu re-biopsi yang bersifat invasif tentunya akan menjadi penyebab traumatik tersendiri bagi pasien baik fisik maupun mental. Meskipun demikian, metode *liquid biopsy* telah terbukti dapat menjadi alternatif diagnosa NSCLC menggantikan *solid biopsy* yang saat ini (McLean et al., 2018). Dalam kedokteran nuklir, pencitraan target aksi telah dilaporkan dapat menjadi alternatif yang menawarkan metode diagnosa penegas yang dapat menunjukkan jenis mutasi yang terjadi pada reseptor target dalam hal ini EGFR tanpa melakukan pengambilan sampel jaringan kanker. Level ekspresi target molekul dan status mutasi reseptor EGFR pada pasien NSCLC dapat diketahui dengan menggunakan metode visualisasi *non-invasive*, yaitu *Positron Emission Tomography* (PET) maupun *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) (Mu et al., 2020; Wang et al., 2019).

C. Peran Radiofarmaka dalam Diagnosa dan Pengobatan Kanker Paru

Pengembangan radiofarmaka untuk penegasan diagnosa mutasi pada NSCLC dan pengobatannya terus dikembangkan oleh kelompok peneliti kesehatan dan kedokteran (Effendi et al., 2018; Effendi et al., 2019; Effendi et al., 2017; Mishiro et al., 2022; Sun et al., 2018; Wang et al., 2019; Yeh et al., 2021). Meskipun terbilang baru di Indonesia tetapi sediaan radiofarmaka untuk diagnosa dan pengobatan berbagai penyakit termasuk kanker dengan memanfaatkan radiasi radioaktif yang diemisikan oleh radioisotope untuk diagnosa dan pengobatan terus berkembang bahkan beberapa di antaranya sudah diproduksi di skala industri dan telah mendapat izin edar, misalnya ^{131}I -MIBG (2014), ^{153}Sm -EDTMP (2016), kit MDP (2014).

Food and Drug Administration (FDA) Amerika Serikat dan *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)* di Jepang telah menyetujui penggunaan Osimertinib sebagai obat antikanker golongan penghambat EGFR generasi ketiga untuk mengobati kanker paru NSCLC dengan mutasi tipe L858R/T790M yang telah resisten terhadap Gefitinib karena terbukti efisien sebagai obat pilihan pertama bagi pasien yang kanker paru tipe *mutated*-NSCLC (Ramalingam et al., 2020). Ini berarti pemanfaatan Osimertinib yang spesifik untuk NSCLC bermutasi sebagai pembawa radionuklida dapat digunakan untuk mendiagnosa pasien kanker paru yang tentunya akan sangat bermanfaat untuk pemilihan jenis pengobatan dan memprediksi efek terapi pengobatan yang dipilih untuk sang pasien untuk menerapkan konsep pengobatan *personalized medicine*.

~oOo~

Bab 3

PEPTIDE-DRUG CONJUGATE (PDC)

Peptide-drug conjugate (PDC) merupakan desain modalitas pengobatan, di mana senyawa sitotoksik (obat) dikonjugasikan via linker dengan pembawa peptida yang merupakan ligan bagi reseptor tertentu yang umumnya diekspresikan secara berlebih pada organ target misalnya kanker. PDC ini mengadopsi prinsip *antivody-drug conjugate* (ADC) yang sedikitnya hingga saat ini paling sedikit ada delapan ADC yang telah mendapatkan izin pakai oleh FDA untuk terapi penyakit tertentu. Posisi PDC dalam pengembangan pengobatan saat ini sudah masuk ke tahap uji praklinik dan uji klinik (Fu et al., 2022).

Linker adalah salah satu komponen penting dalam PDC. Senyawa sitotoksik harus dapat terlepas dari linker setelah uptake intraseluler untuk selanjutnya berikatan dengan reseptor yang diekspresikan pada sel kanker dan melaksanakan fungsinya untuk membunuh sel kanker tersebut. Dalam sintesisnya, linker menjadi penghubung antara peptida dengan senyawa sitotoksik. Idealnya ikatan antara senyawa sitotoksik (obat) dengan linker harus dapat dirusak untuk melepaskan obat (tanpa modifikasi atau perubahan struktur) pada target. Selain itu, ikatan antara linker dengan peptida tidak memengaruhi afinitas peptida terhadap reseptornya. Gugus fungsi yang umumnya

digunakan sebagai linker dapat dibagi dalam empat kelompok (Alas et al., 2021), yaitu:

1. Linker yang dapat dirusak oleh enzim (ester, amida, dan karbamat)
2. Linker yang dapat dirusak oleh asam (hidrazon dan karbonat)
3. Linker mengandung ikatan disulfida yang dapat direduksi
4. Linker yang tidak dapat dirusak (non-cleavable) (tioeter, oksim, dan tiazol).

~oOo~

Bab 4

SINTESIS SENYAWA OSIMERTINIB TERIODINASI, LINKER, cRGDfK, DAN PDC

Sintesis senyawa osimertinib teriodinasi, linker, dan cRGFfK disiapkan dengan beberapa tahap. Diawali dengan penyiapan alat dan bahan di antaranya:

Bahan-bahan:

Semua reagen dan pelarut dengan *grade* pro-analisis dibeli dari *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, AS), *Wako Pure Chemical Industries* (Osaka, Jepang), *Nacalai Tesque, Inc.*, (Kyoto, Jepang), *Tokyo Chemical Industry, Co., Ltd.*, (Tokyo, Jepang) dan *Kanto Chemical, Co., Inc.*

Alat-alat:

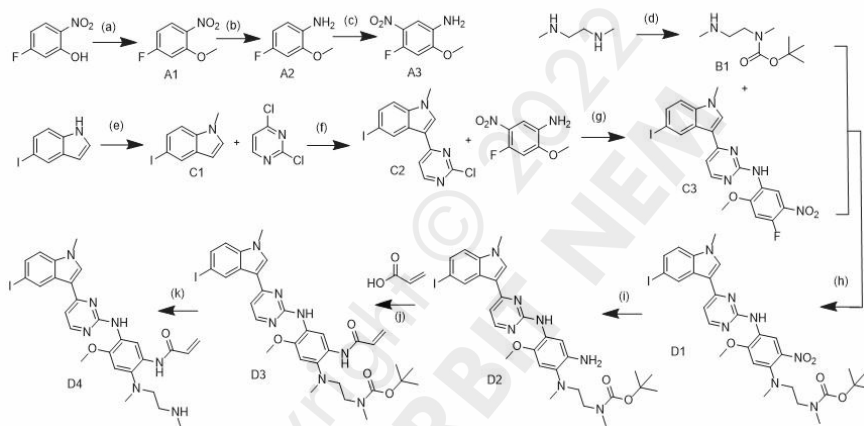
Spektrofotometer (^1H -NMR JEOL) JNM-ECS400 (JEOL Ltd, Tokyo, Jepang); spektrofotometer massa (tipe DART-MS) JEOL JMS-T100TD (JEOL Ltd, Tokyo, Jepang); Kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik (RP-HPLC); Plat silika TLC (Art 5553, Merck, Darmstadt, Jerman).

A. Sintesis Senyawa Osimertinib Teriodinasi

Penyiapan senyawa Osimertinib teriodinasi dilakukan dengan mengikuti tahapan sintesis seperti yang tergambar dalam skema sintesis pada Gambar 4.1. Tahapan tersebut dibagi dalam tiga bagian yaitu penyiapan 4-fluoro-2-

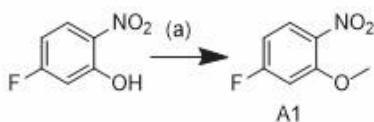
methoxy-5-nitroaniline (A3), *tert*-butyl methyl(2-(methylamino)ethyl)carbamate (B1), penyiapan *N*-(4-fluoro-2-methoxy-5-nitrophenyl)-4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-amine (C3), untuk selanjutnya digabungkan untuk menghasilkan Osimertinib teriodinasi (D4) yang akan digunakan dalam penyiapan PDC.

Skema Sintesis Osimertinib teriodinasi



Gambar 4.1 Skema sintesis Osimertinib teriodinasi. (a) CH_3I , K_2CO_3 , aseton, 40°C ; (b) $\text{Pd}(\text{C})$, H_2 , dry MeOH, rt; (c) H_2SO_4 , HNO_3 , DCM, 0°C ; (d) Boc_2O , DCM anhidrat; (e) CH_3I , KOH, DMSO, suhu kamar; (f) AlCl_3 , 2,4-dikloropirimidin, etilenglikol-dimetil eter, 80°C ; (g) A3, TsOH, *n*-butanol, 120°C ; (h) D1, C1, DIPEA, DMA, 120°C ; (i) C2, NH_4Cl , Fe, etanol, air, 100°C ; (j) C3, akrilolil klorida, DIPEA, -40°C ; (k) TFA, suhu kamar.

1. Sintesis 4-fluoro-2-methoxy-1-nitrobenzene (A1)



Produk : 4-fluoro-2-methoxy-1-nitrobenzene

Rendamen : 1,4 g; 50,7%

Reaktan : 5-fluoro-2-nitrophenol

Reagen : metiliodida (CH₃I) dan kalium karbonat (K₂CO₃)

Pelarut : aseton

Prosedur :

- Suspensikan 5-fluoro-2-nitrophenol (2,5 g) dan kalium karbonat (4,4 g) dalam aseton (40 mL).
- Homogenkan suspensi tersebut selama 30 menit menggunakan stirrer pada suhu 0°C (dalam mantel es).
- Tambahkan iometan (CH₃I) tetes demi tetes sambil terus diaduk dalam mantel es.
- Lepaskan mantel es dan ganti dengan mantel minyak dan biarkan campuran bereaksi pada suhu 40°C.
- Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen heksan (Hex):etil asetat (EtOAc) (9:1).
- Setelah 2,5 jam, uapkan aseton dengan menggunakan evaporator.
- Tambahkan etil asetat (EtOAc) ke dalam residu dan pindahkan ke dalam corong pisah.

- h. Selanjutnya cuci pelarut organik dengan menggunakan air suling dan larutan jenuh natrium klorida ($\text{NaCl}_{(\text{aq})}$).
- i. Bebas-air-kan produk dalam pelarut organik dengan menggunakan magnesium sulfat (MgSO_4) anhidrat berlebih.
- j. Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- k. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

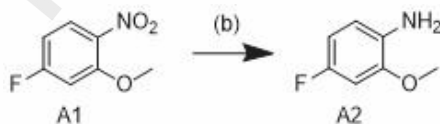
Bentuk: Padatan berwarna kuning muda

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CDCl_3): δ 3,97 (s, 3H), 6,74 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,80 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 7,97 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 172,0$ dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_7\text{H}_7\text{FNO}_3$ adalah 172,0.

Rf TLC: 0,28 (Hex:EtOAc = 9:1)

2. Sintesis 4-fluoro-2-methoxyaniline (A2)



Produk : 4-fluoro-2-methoxyaniline

Rendamen : 1,1 g; 96,2%

Reaktan : 4-fluoro-2-methoxy-1-nitrobenzene

Reagen : 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ dan gas hidrogen

Pelarut : metanol (MeOH) anhidrat

Prosedur :

- a. Larutkan 4-fluoro-2-methoxy-1-nitrobenzene (1,4 g; 8,1 mmol) dalam MeOH anhidrat (30 mL).
- b. Homogenkan menggunakan stirrer pada suhu kamar dalam lingkungan bebas udara dan air (inert) menggunakan gas nitrogen.
- c. Tambahkan 20% Pd(OH)₂/C (0,1 g) ke dalam larutan tersebut sambil terus diaduk.
- d. Setelah 15 menit, gantikan gas nitrogen dengan gas hidrogen.
- e. Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen Hex:EtOAc (5:1).
- f. Setelah 4,5 jam, pisahkan Pd(OH)₂/C dari campuran reaksi dengan penyaringan menggunakan celite®.
- g. Uapkan pelarut dari filtrat dengan menggunakan evaporator.
- h. Gunakan produk 4-fluoro-2-methoxyaniline untuk reaksi berikutnya tanpa melalui proses pemurnian.
- i. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan ¹H-NMR.

Karakterisasi:

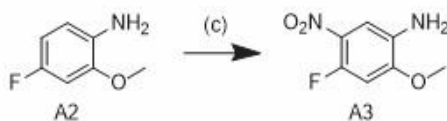
Bentuk: cairan berwarna hitam

¹H-NMR data (400 Mhz, CDCl₃): δ 3,83 (s, 3H), 6,47 - 6,58 (m, 2H), 6,62 - 6,65 (m, 1H).

ESI-MS (LRMS): [M+H]⁺ m/z = 142,1 dengan hasil perhitungan untuk C₇H₉FNO adalah 142,1.

Rf TLC: 0,25 (Hex:EtOAc = 5:1)

3. Sintesis 4-fluoro-2-methoxy-5-nitroaniline (A3)



Produk : 4-fluoro-2-methoxy-5-nitroaniline

Rendamen : 1,1 g; 83%

Reaktan : 4-fluoro-2-methoxyaniline

Reagen : asam sulfat (H_2SO_4) dan asam nitrat (HNO_3)

Pelarut : diklorometan (DCM)

Prosedur :

- a. Suspensikan 4-fluoro-2-methoxyaniline (1 g; 7,1 mmol) dalam diklorometan (35 mL).
- b. Homogenkan suspensi tersebut selama 30 menit menggunakan stirrer pada suhu 0°C (dalam mantel es).
- c. Tambahkan asam sulfat (3,7 mL) dan asam nitrat (0,5 mL) berturut-turut tetes demi tetes sambil terus diaduk dalam mantel es.
- d. Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen Hex:EtOAc (5:3).
- e. Setelah 4 jam, tambahkan larutan jenuh natrium bikarbonat ($\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$) hingga pH campuran menjadi 8,0.
- f. Ekstraksi produk dilanjutkan dengan mencuci pelarut organik menggunakan larutan $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ jenuh.
- g. Bebas-air-kan produk dalam pelarut organik dengan menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.

- h. Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- i. Murnikan produk dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase gerak Hex:EtOAc = 3:1).
- j. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

Bentuk: Padatan berwarna merah bata

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CDCl_3): δ 3,90 (brs, 2H), 3,95 (s, 3H), 6,63 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H), 7,40 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 187,1$ dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_7\text{H}_8\text{FN}_2\text{O}_3$ adalah 187,1.

Rf TLC: 0,35 (Hex:EtOAc = 5:3)

4. Sintesis *tert*-butyl methyl[2-(methylamino)ethyl]carbamate (B1)



Produk : *tert*-butyl methyl[2-(methylamino)ethyl]carbamate

Rendamen : 2,8 g; 80%

Reaktan : N^1, N^2 -dimethylethane-1,2-diamine

Reagen : dimetiletilendiamin, di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc_2O)

Pelarut : diklorometan (DCM) anhidrat

Prosedur :

- a. Larutkan dimetiletilendiamin (2,0 mL; 18,6 mmol; 3,5 eq) dengan DCM anhidrat (10 mL) dalam mantel es.
- b. Tambahkan larutan (Boc₂O) (1,2 g; 5,3 mmol; 1,0 eq) dalam DCM anhidrat (15 mL) ke dalam larutan tersebut tetes per tetes.
- c. Reaksikan campuran tersebut dalam mantel es selama 30 menit dalam lingkungan inert (gas nitrogen).
- d. Lepaskan mantel es dan lanjutkan reaksi pada suhu kamar semalaman.
- e. Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen metanol (100%).
- f. Setelah bereaksi semalaman, pindahkan produk tersebut ke dalam corong pisah dan tambahkan air selanjutnya dilakukan ekstraksi.
- g. Lanjutkan pencucian produk dalam DCM dengan larutan jenuh natrium klorida (NaCl_(aq)).
- h. Bebaskan air dari produk dalam pelarut organik dengan menggunakan MgSO₄ anhidrat berlebih.
- i. Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- j. Produk digunakan untuk reaksi berikutnya tanpa melalui pemurnian.
- k. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan ¹H-NMR.

Karakterisasi:

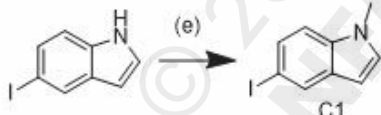
Bentuk: Cairan tak berwarna

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CDCl_3): δ 1,46 (s, 9H), 1,83 (brs, 1H), 2,45 (s, 1H), 2,73 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,88 (s, 3H), 3,27 – 3,40 (m, 2H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 189,2$ dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ adalah 189,1.

R_f TLC: 0,20 (MeOH =100%).

5. Sintesis 5-iodo-1-methyl-1H-indole (C1)



Produk : 5-iodo-1-methyl-1H-indole

Rendamen : 1,03 g; 98%

Reaktan : 5-iodo-1H-indole

Reagen : CH_3I dan K_2CO_3

Pelarut : dimetilsulfoksida (DMSO)

Prosedur :

- Larutkan KOH (1,1 g; 16,4 mmol; 4 eq) dengan DMSO (27 mL).
- Lakukan pengadukan konstan dengan menggunakan magnetik stirer pada suhu kamar.
- Tambahkan 5-iodo-1H-indole (500 mg; 2,1 mmol; 0,5 eq), setelah 15 menit bereaksi tambahkan lagi 5-iodo-1H-indole (500 mg; 2,1 mmol; 0,5 eq).
- Lanjutkan pengadukan konstan pada suhu kamar hingga 1 jam berikutnya.

- e. Tambahkan CH_3I (1,2 g; 8,2 mmol; 2 eq) tetes demi tetes ke dalam campuran tersebut
- f. Lanjutkan pengadukan konstan tersebut pada suhu kamar sambil memonitor progress reaksi dengan menggunakan plat TLC dengan eluen Hex:EtOAc (10:1).
- g. Setelah 2 jam, tambahkan air ke dalam tabung reaksi untuk menghentikan reaksi.
- h. Selanjutnya pindahkan produk ke dalam corong pisah dan ekstraksi produk dengan menggunakan dietil eter sebanyak (3 x 50 mL).
- i. Cuci produk dalam dietil eter selanjutnya dicuci dengan menggunakan air suling (1x)
- j. Bebaskan air dari produk dalam pelarut organik dengan menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
- k. Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- l. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

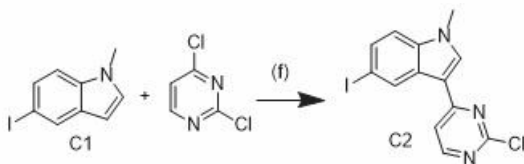
Bentuk: padatan berwarna orange

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CDCl_3): δ 3,76 (s, 3H), 6,40 (dd, $J = 1,2$ Hz, 3,2Hz, 1H), 7,00 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 7,10 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,46 (dd, $J = 1,2$ Hz, 8,8 Hz, 1H), 7,95 (s, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 258,0$ dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_9\text{H}_9\text{IN}$ adalah 258,0.

Rf TLC: 0,33 (Hex:EtOAc =10:1).

6. Sintesis 3-(2-chloropyrimidin-4-yl)-5-iodo-1-methyl-1H-indole (C2)



Produk : 3-(2-chloropyrimidin-4-yl)-5-iodo-1-methyl-1H-indole

Rendamen : 680 mg; 47,4%

Reaktan : 2,4-dikloropirimidin dan 5-iodo-1-methyl-1H-indole

Reagen : aluminium klorida (AlCl₃)

Pelarut : etilenglikoldimetileter (DME)

Prosedur :

- Suspensikan AlCl₃ (516 mg; 3,9 mmol; 1,0 eq) dalam DME (6 mL)
- Tambahkan 2,4-dikloropirimidin (1,0 g; 7,8 mmol; 2,0 eq) ke dalam campuran tersebut sambil dilakukan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 10 menit.
- Tambahkan 5-iodo-1-methyl-1H-indole (1,0 g; 3,9 mmol; 1,0 eq) ke dalam campuran.
- Lakukan reaksi dengan pengadukan konstan pada suhu 80°C menggunakan mantel minyak.
- Monitor jalannya reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen Hex:EtOAc (1:1)
- Setelah 2 jam, dinginkan campuran hingga suhunya mencapai suhu kamar, selanjutnya campuran reaksi dituang perlahan-lahan ke

- dalam gelas kimia berisi es sambil dilakukan pengadukan konstan hingga 30 menit.
- g. Pisahkan $\text{Al}(\text{OH})_3$ dari campuran reaksi dengan penyaringan, dan pindahkan filtrat (hasil penyaringan) ke dalam corong pisah.
 - h. Ekstraksi dengan menggunakan EtOAc (3 x 50 mL)
 - i. Pisahkan pengotor yang terlarut dalam air dengan mencuci produk dalam pelarut organik menggunakan air suling diikuti dengan menggunakan $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ jenuh masing-masing sebanyak (1 x 50 mL).
 - j. Bebas-air-kan pelarut organik dengan menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
 - k. Saring dan upakan pelarut organik EtOAc dengan menggunakan evaporator hingga diperoleh campuran produk (C2) yang belum murni.
 - l. Murnikan 3-(2-chloropyrimidin-4-yl)-5-iodo-1-methyl-1*H*-indole dari campuran dengan menggunakan kolom kromatografi dengan fase gerak Hex:EtOAc (1:1).
 - m. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan ^1H -NMR.

Karakterisasi:

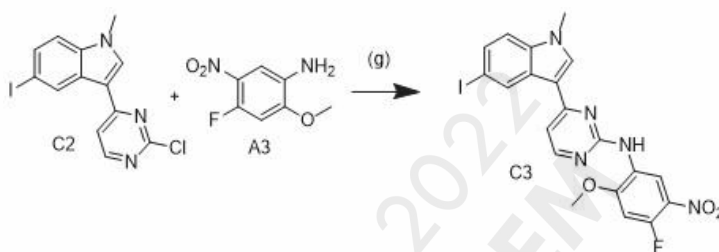
Bentuk: Padatan berwarna kuning muda

^1H -NMR data (400 Mhz, CDCl_3): δ 3,87 (s, 3H), 7,17 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,45 (dd, J = 1,6 Hz, 5,6 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,89 (s, 1H), 8,48 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 8,67 (s, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 370,0$ dengan hasil perhitungan untuk $C_{13}H_{10}ClIN_3$ adalah 370,0.

Rf TLC: 0,23 (Hex:EtOAc =1:1).

7. Sintesis *N*-(4-fluoro-2-methoxy-5-nitrophenyl)-4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-amine (C3)



Produk : *N*-(4-fluoro-2-methoxy-5-nitrophenyl)-4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-amine

Rendamen : 288 mg; 77,6%

Reaktan : 4-fluoro-2-methoxy-5-nitroaniline (A3) dan 3-(2-chloropyrimidin-4-yl)-5-iodo-1-methyl-1*H*-indole (C2)

Reagen : asam *p*-toluenasulfonat (TsOH)

Pelarut : *n*-butanol

Prosedur :

- Larutkan 4-fluoro-2-methoxy-5-nitroaniline (264 mg; 0,72 mmol; 1,0 eq), 3-(2-chloropyrimidin-4-yl)-5-iodo-1-methyl-1*H*-indole (133 mg; 0,72 mmol; 1,0 eq), dan TsOH (163 mg; 0,86 mmol; 1,2 eq) dalam *n*-butanol (7 mL).
- Reaksikan campuran tersebut dengan pengadukan konstan pada suhu 105°C dalam mantel minyak.

- c. Monitor jalannya reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen EtOAc (100%).
- d. Setelah 2,5 jam, hentikan reaksi dan dinginkan campuran reaksi hingga mencapai suhu kamar.
- e. Saring produk lalu cuci residu berturut-turut dengan menggunakan dietil eter, larutan $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ jenuh, dan asetonitril.
- f. Keringkan produk menggunakan desikator bertekanan untuk membebaskan produk dari pelarut.
- g. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS.

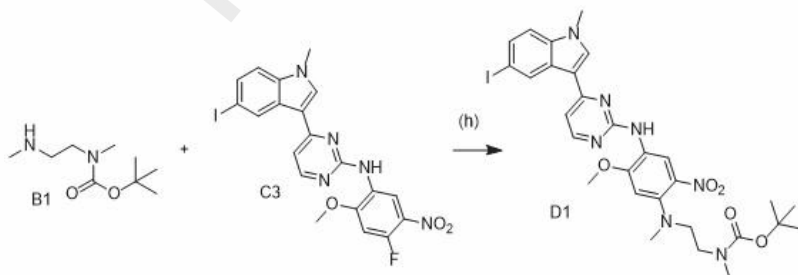
Karakterisasi:

Bentuk: Padatan berwarna hijau muda

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 520,1$ dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{FIN}_5\text{O}_3$ adalah 520,0.

Rf TLC: 0,55 (Etil asetat (100%)).

8. Sintesis *tert*-butyl {2-[(4-[(4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino}-5-methoxy-2-nitrophenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate (D1)



Produk : *tert*-butyl {2-[(4-[(4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino}-5-methoxy-2-

nitrophenyl)(methylamino)ethyl}(methyl)carbamate

Rendamen : 300 mg; 79,3 %

Reaktan : *tert*-butyl methyl[2-(methylamino)ethyl]carbamate (B1) dan *N*-(4-fluoro-2-methoxy-5-nitrophenyl)-4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-amine (C3)

Reagen : *N, N*-diisopropiletilamin (DIPEA)

Pelarut : dimetiasetamida (DMA)

Prosedur :

- Larutkan *N*-(4-fluoro-2-methoxy-5-nitrophenyl)-4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-amine (288 mg; 0,55 mmol; 1,0 eq) dan *tert*-butyl methyl[2-(methylamino)ethyl]carbamate (283 mg; 1,50 mmol, 2,0 eq) dalam dimetilasetamida (8 mL).
- Tambahkan DIPEA (326 μ L; 1,87 mmol; 2,5 eq) ke dalam campuran tersebut.
- Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan dalam mantel minyak bersuhu 100°C.
- Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen kloroform:metanol (CHCl_3 :MeOH = 30:1).
- Setelah 5 jam ditandai dengan terjadinya perubahan warna campuran reaksi dari suspensi menjadi larutan berwarna jingga, dinginkan campuran reaksi hingga mencapai suhu kamar, lalu pindahkan ke dalam corong pisah.
- Ekstraksi produk dengan EtOAc sebanyak 3 x 25 mL dan lanjutkan dengan mencuci pelarut organik menggunakan air dan larutan $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ jenuh.

- g. Bebas-air-kan pelarut organik dengan menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
- h. Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- i. Murnikan produk dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase gerak kloroform (100%).
- j. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

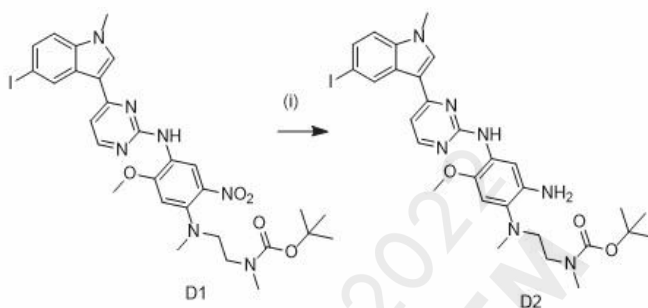
Bentuk: Padatan berwarna orange

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CDCl_3): δ 1,44 (s, 9H), 2,84 – 2,87 (m, 3H), 2,94 (s, 3H), 3,25 – 3,33 (m, 2H), 3,93 (s, 3H), 4,02 (s, 3H), 6,58 – 6,75 (m, 1H), 7,12 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 7,18 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,57 (dd, $J = 1,2$ Hz, 8,8 Hz, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,42 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H), 8,47 (s, 1H), 9,58 (s, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 688,0$ dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{IN}_7\text{O}_5$ adalah 688,2.

Rf TLC: 0,55 ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 30:1$).

9. Sintesis *tert*-butyl {2-[(2-amino-4-[[4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]-5-methoxyphenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate (D2)



Produk : *tert*-butyl {2-[(2-amino-4-[[4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]-5-methoxyphenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate

Rendamen : 280 mg; 96,6%

Reaktan : *tert*-butyl {2-[(4-[[4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]-5-methoxy-2-nitrophenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate (D1)

Reagen : ammonium klorida, serbuk besi

Pelarut : etanol dan air

Prosedur :

- Suspensikan senyawa antara D1, *tert*-butyl {2-[(4-[[4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]-5-methoxy-2-nitrophenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate, (300 mg; 0,44 mmol; 1,0 eq), ammonium klorida

(126 mg; 2,42 mmol; 5,5 eq), serbuk besi (146 mg; 2,64 mmol; 6,0 eq) dalam campuran etanol:air (3:1) sebanyak 20 mL.

- b. Reaksikan campuran tersebut dengan pengadukan konstan dalam mantel minyak bersuhu 100°C.
- c. Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen kloroform:metanol ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 30:1$).
- d. Setelah 1 jam, dinginkan campuran reaksi hingga mencapai suhu kamar lalu uapkan pelarut dengan menggunakan evaporator.
- e. Triturasi residu dengan menggunakan campuran DCM:MeOH (10:1) sebanyak 30 mL lalu saring, lakukan sebanyak 2x
- f. Filtrat hasil penyaringan digabung lalu dipindahkan ke dalam corong pisah.
- g. Tambahkan larutan jenuh $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ sebanyak 50 mL lalu lakukan ekstraksi.
- h. Bebas-air-kan sampel dalam pelarut organik dengan menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
- i. Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- j. Gunakan produk untuk reaksi berikutnya tanpa pemunian lebih lanjut.
- k. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

Bentuk: Padatan berwarna abu-abu

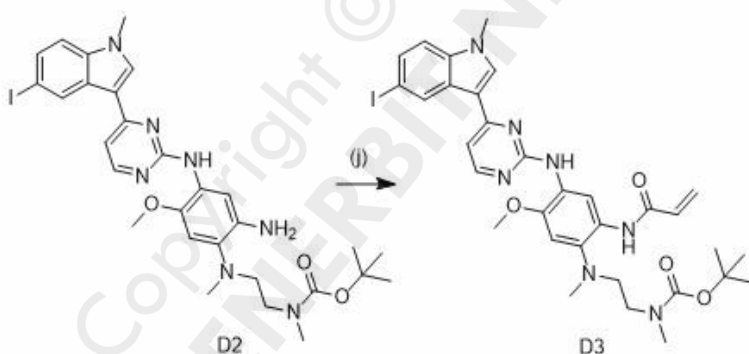
$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CDCl_3): δ 1,46 (s, 9H), 1,59 (brs, 2H), 2,68 (s, 3H), 2,82 – 2,90 (m, 3H), 2,99 – 3,02

(m, 3H), 3,29 – 3,41 (m, 3H), 3,81 – 3,92 (m, 6H), 6,70 (s, 1H), 6,95 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,57 (dd, $J = 1,2$ Hz, 8,4 Hz, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,72 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 8,34 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 8,78 (s, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 658,2$ dengan hasil perhitungan untuk $C_{29}H_{37}IN_7O_3$ adalah 658,2.

Rf TLC: 0,40 ($CHCl_3:MeOH = 30:1$).

10. Sintesis *tert*-butyl {2-[(2-acrylamido-4-[[4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino}-5-methoxyphenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate (D3)



Produk : *tert*-butyl {2-[(2-acrylamido-4-[[4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino}-5-methoxyphenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate

Rendamen : 230 mg; 76,2%

Reaktan : *tert*-butyl {2-[(2-amino-4-[[4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino}-5-

methoxyphenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate (D2)

Reagen : acryloic chloride (akriloid klorida), DIPEA

Pelarut : DCM anhidrat

Prosedur :

- a. Larutkan *tert*-butyl {2-[(2-amino-4-{[4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino}-5-methoxyphenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate (280 mg; 0,42 mmol; 1,0 eq) dalam DCM anhidrat sebanyak 10 mL.
- b. Tambahkan DIPEA ke dalam larutan tersebut.
- c. Homogenkan larutan dengan pengadukan konstan dalam mantel es bersuhu -30°C selama 10 menit
- d. Tambahkan akriloid klorida tetes demi tetes ke dalam campuran sambil terus dilakukan pengadukan homogen.
- e. Lanjutkan reaksi dalam mantel es bersuhu -30°C
- f. Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen kloroform:metanol ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 30:1$).
- g. Setelah 3 jam, lepaskan mantel es dan tambahkan larutan jenuh $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ untuk menghentikan reaksi.
- h. Pindahkan campuran reaksi ke dalam corong pisah dan tambahkan kloroform.
- i. Ekstraksi produk sebanyak 3x dengan kloroform ($3 \times 30 \text{ mL}$).
- j. Bebas-air-kan produk dalam pelarut oranik dengan menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.

- k. Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- l. Murnikan produk D3 menggunakan kromatografi kolom dengan fase gerak $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 60:1$.
- m. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

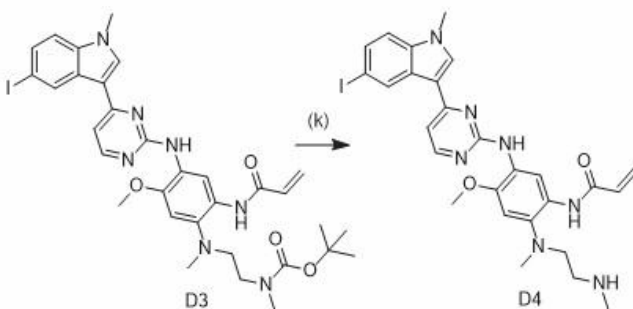
Bentuk: Padatan berwarna kuning tua

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CDCl_3): δ 1,46 (s, 9H), 2,69 (s, 3H), 2,85 (s, 3H), 2,91 – 3,05 (m, 2H), 3,36 – 3,39 (m, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 5,72 – 5,80 (m, 1H), 6,40 – 6,45 (m, 2H), 6,78 (s, 1H), 7,12 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 7,16 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,53 (dd, $J = 1,2$ Hz, 8,8 Hz, 1H), 7,72 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,40 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 8,75 – 8,95 (m, 1H), 9,04 (s, 1H), 9,83 (s, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 712,2$ dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{IN}_7\text{O}_4$ adalah 712,2.

Rf TLC: 0,58 ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 30:1$).

11. Sintesis *N*-(5-([4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino)-4-methoxy-2-{methyl[2-(methylamino)ethyl]amino}phenyl)acrylamide (D4)



Produk : *N*-(5-([4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino)-4-methoxy-2-{methyl[2-(methylumino)ethyl]amino}phenyl)acrylamide

Rendamen : 160 mg; 81,3%

Reaktan : *tert*-butyl {2-[(2-acrylamido-4-([4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino)-5-methoxyphenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate (D3)

Reagen : asam trifluoroasetat (TFA)

Pelarut : TFA

Prosedur :

- tert*-butyl {2-[(2-acrylamido-4-([4-(5-iodo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino)-5-methoxyphenyl)(methyl)amino]ethyl}(methyl)carbamate (230 mg; 0.32 mmol; 1,0 eq) dalam labu alas bulat ditambahkan TFA sebanyak 5 mL.
- Homogenkan larutan dengan pengadukan konstan pada suhu kamar.
- Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen kloroform:metanol (CHCl₃:MeOH = 20:1).
- Setelah 1 jam, hilangkan TFA dengan mengalirkan gas nitrogen ke dalam sampel di labu alas bulat.
- Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS.

Karakterisasi:

Bentuk: Padatan berwarna kuning

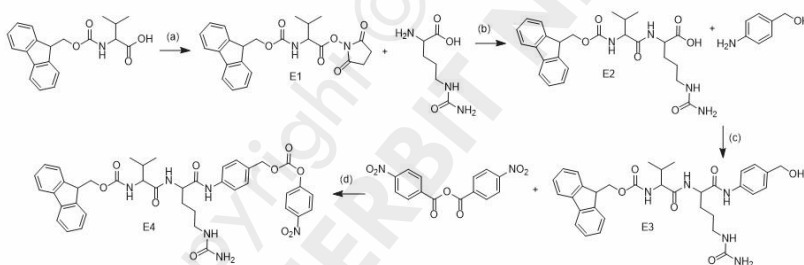
ESI-MS (LRMS): [M+H]⁺ *m/z* = 612,2 dengan hasil perhitungan untuk C₃₇H₃₁IN₇O₂ adalah 612,2.

Rf TLC: 0,08 (CHCl₃:MeOH =20:1).

B. Sintesis Linker

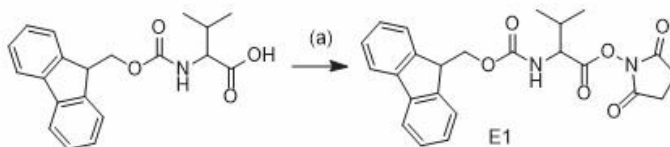
Penyiapan senyawa linker, Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP, Fmoc-Val-Ala-PABC-PNP, dan Fmoc-Ala-Ala-PABC-PNP, dilakukan dengan mengikuti tahapan sintesis yaitu penyiapan peptida yang dikonjugasikan dengan para-amino benzil alkohol yang diaktivasi dengan menggunakan bis(4-nitrofenil)karbonat. Linker ini nantinya akan menjadi penghubung antara cRGDfK dengan Osimertinib teriodinasi (D4) dalam penyiapan PDC.

1. Sintesis Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP



Gambar 4.2 Skema sintesis Linker Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP. (a) NHS, DCC, rt; (b) NaHCO₃, rt; (c) EEDQ, rt; (d) DIPEA, rt.

- a. Sintesis 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl {[*(9H*-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}valinate (Fmoc-Val-NHS, E1)



- Produk** : 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl {[*(9H*-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}valinate
- Rendamen** : 580 mg; 90,5%
- Reaktan** : {[*(9H*-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}valine (Fmoc-Val-OH)
- Reagen** : *N*-hidroksisuksinimide (NHS) dan dicyclohexylcarbodiimide (DCC)
- Pelarut** : tetrahidrofuran (THF) anhidrat
- Prosedur** :
- Larutkan Fmoc-Val-OH (500 mg; 1,47 mmol; 1,0 eq) dan NHS (194 mg; 1,76 mmol; 1,2 eq) dalam THF anhidrat sebanyak 10 mL).
 - Dinginkan larutan tersebut selama 30 menit menggunakan pengadukan konstan dalam mantel es bersuhu 0°C.
 - Tambahkan DCC (320 mg; 1,62 mmol; 1,1 eq) sedikit demi sedikit ke dalam larutan tersebut sambil terus diaduk dalam mantel es.
 - Lanjutkan reaksi pada suhu kamar dalam lingkungan inert (gas nitrogen).
 - Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen CHCl₃:MeOH (5:1)
 - Keesokan harinya, saring produk samping 1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene (DBU) dan pisahkan dari produk utama.
 - Uapkan filtrat menggunakan evaporator.
 - Tambahkan 25 mL DCM dan lanjutkan pengadukan konstan selama 30 menit untuk mengendapkan sisa DBU yang masih ada.
 - Saring DBU yang terbentuk.

- j. Uapkan pelarut organik dari filtrat menggunakan evaporator.
- k. Murnikan produk dengan menggunakan kromatografi kolom flash dengan fase gerak kloroform (100%). **Catatan:** produk tidak stabil dalam silika sehingga kolom kromatografi harus dilakukan sesingkat mungkin.
- l. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$

Karakterisasi:

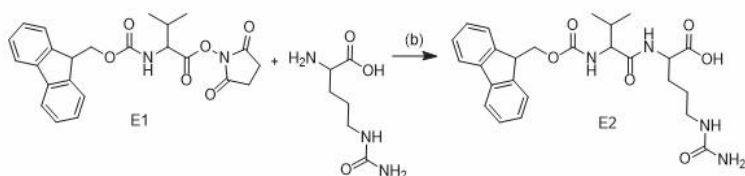
Bentuk: Padatan berwarna putih

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CDCl_3): δ 1,04 – 1,08 (m, 6H), 2,33 – 2,38 (m, 1H), 2,85 (s, 4H), 4,23 – 4,27 (m, 1H), 4,42 – 4,46 (m, 2H), 4,67 – 4,71 (m, 1H), 5,27 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,32 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,41 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,59 – 7,61 (m, 2H), 7,77 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 437,2$ dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6$ adalah 437,2.

R_f TLC: 0,75 ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 5:1$).

- b. Sintesis 2-[2-([(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl)amino)-3-methylbutanamido]-5-ureidopentanoic acid (Fmoc-Val-Cit-OH, E2)



- Produk** : 2-[2-({[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}amino)-3-methylbutanamido]-5-ureidopentanoic acid
- Rendamen** : 490 mg; 64,1%
- Reaktan** : 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl {[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}valinate (Fmoc-Val-NHS) dan citrulin (Cit-OH)
- Reagen** : natrium bikarbonat (Na_2CO_3)
- Pelarut** : air suling, tetrahidrofuran (THF), dimetoksietan (DME)
- Prosedur** :
- Larutkan Cit-OH (296 mg; 1,69 mmol, 1,1 eq) dan NaHCO_3 (142 mg; 1,69 mmol; 1,1 eq) dalam campuran air (10 mL) dan THF (3 mL).
 - Dinginkan campuran sambil lakukan pengadukan konstan dalam mantel es bersuhu 0°C .
 - Tambahkan larutan Fmoc-Val-NHS (673 mg; 1,54 mmol; 1,0 eq) dalam 5 mL DME tetes demi tetes sambil terus dilakukan pengadukan konstan.
 - Reaksikan campuran tersebut pada suhu kamar dalam keadaan terlindung dari cahaya (labu alas bulat dilindungi dengan aluminium foil sehingga cahaya tidak dapat menembus dan mengganggu reaksi).
 - Monitor jalannya reaksi menggunakan TLC dengan eluen MeOH (100%).
 - Setelah bereaksi selama 4 hari, tambahkan larutan asam sitrat 15% dalam air untuk

- menghentikan reaksi lalu pindahkan campuran ke dalam corong pisah.
- g. Tambahkan 2-propanol (10%) dalam EtOAc.
 - h. Ekstraksi produk sebanyak 2 x 30 mL.
 - i. Cuci pelarut organik dengan air sebanyak 50 mL.
 - j. Bebas-air-kan dari pelarut organik yang mengandung produk menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
 - k. Saring dan uapkan pelarut organik dengan evaporator.
 - l. Keringkan residu dari pelarut yang masih tersisa dalam produk dalam desikator bertekanan.
 - m. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

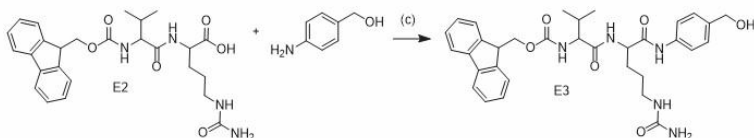
Bentuk: Padatan berwarna putih

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 0,84 – 0,88 (m, 6H), 1,34 – 1,44 (m, 2H), 1,57 – 1,61 (m, 1H), 1,65 – 1,73 (m, 1H), 1,93 – 2,01 (m, 1H), 2,86 – 2,94 (m, 2H), 3,89 – 3,91 (m, 1H), 4,13 – 4,32 (m, 4H), 5,36 (brs, 2H), 5,91 – 5,93 (m, 1H), 7,30 – 7,89 (m, 9H), 8,17 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 497,3$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 519,3$; $[\text{M}+\text{K}]^+$ $m/z = 535,3$; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_6$ adalah 497,2.

Rf TLC: 0,73 (MeOH (100%)).

- c. Sintesis (9H-fluoren-9-yl)methyl {1-[(1-[[4-(hydroxymethyl)phenyl]amino]-1-oxo-5-ureidopentan-2-yl)amino]-1-oxopropan-2-yl}carbamate (Fmoc-Val-Cit-PABOH, E3)



Produk : (9H-fluoren-9-yl)methyl {1-[(1-[[4-(hydroxymethyl)phenyl]amino]-1-oxo-5-ureidopentan-2-yl)amino]-1-oxopropan-2-yl}carbamate

Rendamen : 85 mg; 70%

Reaktan : 2-[2-((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl]amino)-3-methylbutanamido]-5-ureidopentanoic acid (Fmoc-Val-Cit-OH) dan para amino benzylalkohol (PABOH)

Reagen : 2-etoksi-1-etoksikarbonil-1,2-dihidroquinolin (EEDQ)

Pelarut : metanol dan kloroform

Prosedur :

- Larutkan Fmoc-Val-Cit-OH (100 mg; 0,2 mmol, 1,0 eq), para amino benzylalkohol (49,6 mg; 0,4 mmol; 2,0 eq), dan EEDQ (99,6 mg; 0,4 mmol; 2,0 eq) dalam campuran pelarut CHCl_3 :MeOH (1:2) sebanyak 3 mL.
- Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 2 hari dalam lingkungan inert dan terlindung dari cahaya.

- c. Setelah 2 hari, uapkan pelarut campuran reaksi dengan evaporator.
- d. Tambahkan dietil eter ke dalam residu selanjutnya sonikasi selama 15 menit hingga produk yang menempel pada dinding dalam labu alas bulat terlepas.
- e. Sentrifugasi campuran tersebut hingga pelarut dan endapan terpisah, setelah pelarut dibuang dilakukan lagi hal yang sama sebanyak 2 kali.
- f. Bebaskan produk dari pelarut dalam desikator bertekanan.
- g. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

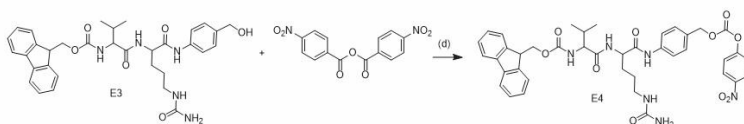
Karakterisasi:

Bentuk: Padatan berwarna orange

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, DMSO d_6): δ 0,81 – 0,88 (m, 6H), 1,28 – 1,49 (m, 2H), 1,51 – 1,62 (m, 1H), 1,64 – 1,74 (m, 1H), 1,93 – 2,04 (m, 1H), 2,87 – 3,05 (m, 2H), 3,89 – 3,94 (m, 1H), 4,21 – 4,30 (m, 3H), 4,36 – 4,43 (m, 3H), 5,09 – 5,12 (m, 1H), 5,38 – 5,41 (m, 2H), 5,86 – 5,97 (m, 1H), 7,21 – 7,93 (m, 13H), 8,09 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 9,98 (s, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 602,3$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 624,3$; $[\text{M}+\text{K}]^+$ $m/z = 640,3$; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_6$ adalah 602,3.

- d. Sintesis (9*H*-fluoren-9-yl)methyl [3-methyl-1-({1-[4-{{(4-nitrophenoxy)carbonyl}oxy}methyl)phenyl}amino}-1-oxo-5-ureidopentan-2-yl)amino]-1-oxobutan-2-yl)carbamate (Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP, E4)



Produk : (9*H*-fluoren-9-yl)methyl [3-methyl-1-({1-[4-{{(4-nitrophenoxy)carbonyl}oxy}methyl)phenyl}amino}-1-oxo-5-ureidopentan-2-yl)amino]-1-oxobutan-2-yl)carbamate

Rendamen : 12 mg; 52,2%

Reaktan : (9*H*-fluoren-9-yl)methyl {1-[(1-{{4-(hydroxymethyl)phenyl}amino}-1-oxo-5-ureidopentan-2-yl)amino]-1-oxopropan-2-yl}carbamate dan bis(4-nitrofenil)karbonat (bis(pnp) karbonat)

Reagen : *N, N*-diisopropiletilamin (DIPEA)

Pelarut : diklorometan anhidrat dan dimetilformamida (DMF) anhidrat

Prosedur:

- Suspensikan Fmoc-Val-Cit-PABOH (17 mg; 0,03 mmol; 1,0 eq) dan bis(pnp) karbonat (27,4 mg; 0,09 mmol; 3,0 eq) dalam DCM anhidrat sebanyak 0,8 mL.
- Tambahkan DIPEA (16 μ L; 0,09 mmol; 3,0 eq) sambil dilakukan pengadukan konstan pada

- suhu kamar dalam lingkungan inert (gas nitrogen).
- c. Tambahkan DMF anhidrat sebanyak 0,2 mL ke dalam suspensi hingga semua campuran terlarut.
 - d. Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 1 hari dalam lingkungan inert.
 - e. Setelah bereaksi selama 1 hari, tambahkan air sebanyak 5 mL ke dalam campuran untuk menghentikan reaksi.
 - f. Pindahkan campuran ke dalam corong pisah dan tambahkan DCM baru sebanyak 5 mL lalu lakukan ekstraksi sebanyak 4 x 5 mL DCM.
 - g. Bebas-air-kan produk pada pelarut organik dengan menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
 - h. Saring dan uapkan pelarut organik dengan evaporator.
 - h. Tambahkan dietil eter ke dalam residu selanjutnya sonikasi selama 5 menit hingga produk tersuspensikan ke dalam dietil eter.
 - i. Sentrifugasi campuran tersebut hingga pelarut dan endapan terpisah, setelah pelarut dibuang dilakukan lagi hal yang sama sebanyak 2 kali.
 - j. Bebaskan produk dari pelarut dalam desikator bertekanan.
 - k. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

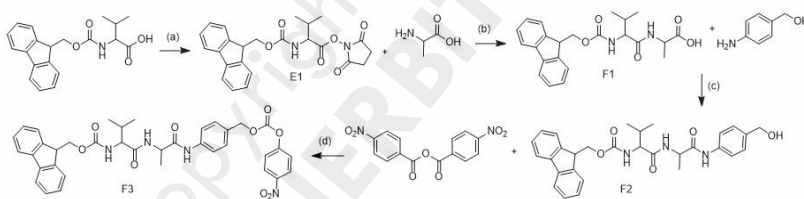
Karakterisasi:

Bentuk: Padatan berwarna orange muda

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, DMSO d_6): δ 0,85 – 0,89 (m, 6H), 1,36 – 1,45 (m, 2H), 1,59 – 1,62 (m, 1H), 1,67 – 1,69 (m, 1H), 1,97 – 2,02 (m, 1H), 2,92 – 3,04 (m, 2H), 3,91 – 3,95 (m, 1H), 4,21 – 4,31 (m, 3H), 4,40 – 4,43 (m, 1H), 5,25 (s, 2H), 5,41 (s, 2H), 5,96 – 5,99 (m, 1H), 7,30 – 7,91 (m, 15H), 8,11 – 8,17 (m, 1H), 8,29 – 8,33 (m, 2H), 10,14 (s, 1H)

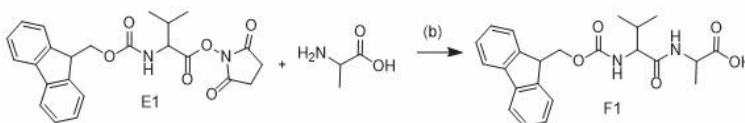
ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 767,4$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 789,3$; $[\text{M}+\text{K}]^+$ $m/z = 805,3$; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{40}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_{10}$ adalah 767,3.

2. Sintesis Fmoc-Val-Ala-PABC-PNP



Gambar 4.3 Skema sintesis Linker Fmoc-Val-Ala-PABC-PNP. (a) NHS, DCC, rt; (b) NaHCO_3 , rt; (c) EEDQ, rt; (d) DIPEA, rt.

- Sintesis $\{[(9\text{-fluoren-9-yl)methoxy}]\text{carbonyl}\}$ valylalanine (Fmoc-Val-Ala-OH, F1)



Produk : {[*(9H*-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}valylalanine

Rendamen : 540 mg; 57,9%

Reaktan : 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl {[*(9H*-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}valinate (Fmoc-Val-NHS) dan alanin (Ala-OH)

Reagen : natrium bikarbonat (Na_2CO_3)

Pelarut : air suling, tetrahidrofuran (THF) anhidrat, dietil eter.

Prosedur :

- a. Larutkan Ala-OH (224 mg; 2,5 mmol, 1,1 eq) dan NaHCO_3 (210 mg; 2,5 mmol; 1,1 eq) dalam air suling sebanyak 7 mL.
- b. Dinginkan campuran sambil lakukan pengadukan konstan dalam mantel es bersuhu 0°C .
- c. Tambahkan larutan Fmoc-Val-NHS (1,0 g; 2,3 mmol; 1,0 eq) dalam THF anhidrat sebanyak 10 mL tetes demi tetes sambil terus lakukan pengadukan konstan.
- d. Tambahkan campuran pelarut air suling:dietil eter:THF (1:1:1) sebanyak 30 mL ke dalam campuran.
- e. Reaksikan campuran tersebut pada suhu kamar dalam keadaan terlindung dari cahaya (labu alas bulat dilindungi dengan aluminium foil sehingga cahaya tidak dapat menembus dan mengganggu reaksi).
- f. Monitor jalannya reaksi menggunakan TLC dengan eluen MeOH (100%).

- g. Setelah bereaksi selama 3 hari, tambahkan larutan asam sitrat 15% dalam air untuk menghentikan reaksi lalu pindahkan campuran ke dalam corong pisah.
- h. Tambahkan EtOAc.
- i. Ekstraksi produk sebanyak 2 x 50 mL.
- j. Cuci pelarut organik dengan air sebanyak 50 mL.
- k. Bebas-air-kan dari pelarut organik yang mengandung produk menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
- l. Saring dan uapkan pelarut organik dengan evaporator.
- m. Keringkan residu dari pelarut yang masih tersisa dalam produk dalam desikator bertekanan.
- n. Murnikan produk dengan kromatografi kolom dengan fase gerak kloroform (100%).
- o. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

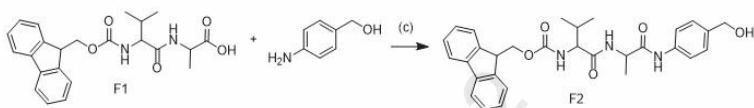
Bentuk: Padatan berwarna putih

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CD_3OD): δ 0,93 – 0,99 (m, 6H), 1,39 – 1,40 (m, 3H), 1,96 – 2,12 (m, 1H), 3,82 – 3,91 (m, 1H), 4,15 – 4,24 (m, 1H), 4,27 – 4,41 (m, 3H), 7,26 – 7,28 (m, 2H), 7,32 – 7,36 (m, 2H), 7,61 – 7,68 (m, 2H), 7,75 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 411,2$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 433,2$; $[\text{M}+\text{K}]^+$ $m/z = 449,2$; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$ adalah 411,2.

Rf TLC: 0,43 (MeOH = 100%).

- b. Sintesis (9*H*-fluoren-9-yl)methyl (1-{1-([4-(hydroxymethyl)phenyl]amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamate (Fmoc-Val-Ala-PABOH, F2)



Produk : (9*H*-fluoren-9-yl)methyl (1-{1-([4-(hydroxymethyl)phenyl]amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamate

Rendamen: 270 mg; 40,2%

Reaktan : [(9*H*-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}valylalanine (Fmoc-Val-Ala-OH) dan para amino benzylalkohol (PABOH)

Reagen : 2-etoksi-1-etoksikarbonil-1,2-dihidroquinolin (EEDQ)

Pelarut : metanol dan kloroform

Prosedur :

- Larutkan Fmoc-Val-Ala-OH (535,4 mg; 1,3 mmol, 1,0 eq), para amino benzylalkohol (195 mg; 1,6 mmol; 1,2 eq), dan EEDQ (488 mg; 2,0 mmol; 1,5 eq) dalam campuran pelarut CHCl_3 :MeOH (1:2) sebanyak 10 mL.
- Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 2 hari dalam lingkungan inert dan terlindung dari cahaya.

- c. Setelah 2 hari, uapkan pelarut campuran reaksi dengan evaporator.
- d. Tambahkan dietil eter ke dalam residu selanjutnya sonikasi selama 15 menit hingga produk yang menempel pada dinding dalam labu alas bulat terlepas.
- e. Sentrifugasi campuran tersebut hingga pelarut dan endapan terpisah, setelah pelarut dibuang dilakukan lagi hal yang sama sebanyak 2 kali.
- f. Bebaskan produk dari pelarut dalam desikator bertekanan.
- g. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

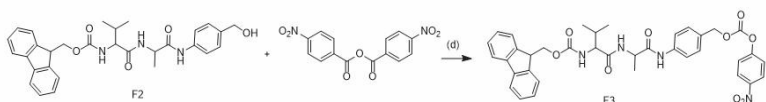
Karakterisasi:

Bentuk: Padatan berwarna putih

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, DMSO d_6): δ 0,84 – 0,89 (m, 6H), 1,28 – 1,30 (m, 3H), 1,96 – 2,04 (m, 1H), 3,88 – 3,94 (m, 1H), 4,20 – 4,35 (m, 3H), 4,41 – 4,46 (m, 3H), 5,08 – 5,15 (m, 1H), 7,21 – 7,89 (m, 13H), 8,12 – 8,21 (m, 1H), 9,82 – 9,98 (m, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 516,2$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 538,2$; $[\text{M}+\text{K}]^+$ $m/z = 554,2$; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5$ adalah 516,2.

- c. Sintesis (9H-fluoren-9-yl)methyl {3-methyl-1-[(1-{[4-((4-nitrophenoxy)carbonyl]oxy)methyl)phenyl]amino}-1-oxopropan-2-yl)amino]-1-oxobutan-2-yl}carbamate (Fmoc-Val-Ala-PABC-PNP, F3)



Produk : (9H-fluoren-9-yl)methyl {3-methyl-1-[(1-{[4-((4-nitrophenoxy)carbonyl]oxy)methyl)phenyl]amino}-1-oxopropan-2-yl)amino]-1-oxobutan-2-yl}carbamate

Rendamen : 10 mg; 50,2%

Reaktan : (9H-fluoren-9-yl)methyl (1-{1-([4-(hydroxymethyl)phenyl]amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl}carbamate (Fmoc-Val-Ala-PABOH) dan bis(4-nitrofenil)karbonat (bis(pnp) karbonat)

Reagen : *N, N*-diisopropiletilamin (DIPEA)

Pelarut : diklorometan anhidrat dan dimetilformamida (DMF) anhidrat

Prosedur:

- Suspensikan Fmoc-Val-Ala-PABOH (15,5 mg; 0,03 mmol; 1,0 eq) dan bis(pnp) karbonat (27,4 mg; 0,09 mmol; 3,0 eq) dalam DCM anhidrat sebanyak 0,8 mL.
- Tambahkan DIPEA (16 μ L; 0,09 mmol; 3,0 eq) sambil dilakukan pengadukan konstan pada

- suhu kamar dalam lingkungan inert (gas nitrogen).
- c. Tambahkan DMF anhidrat sebanyak 0,2 mL ke dalam suspensi hingga semua campuran terlarut.
 - d. Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 1 hari dalam lingkungan inert.
 - e. Setelah bereaksi selama 1 hari, tambahkan air sebanyak 5 mL ke dalam campuran untuk menghentikan reaksi.
 - f. Pindahkan campuran ke dalam corong pisah dan tambahkan DCM baru sebanyak 5 mL lalu lakukan ekstraksi sebanyak 4 x 5 mL DCM.
 - g. Bebas-air-kan produk pada pelarut organik dengan menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
 - h. Saring dan uapkan pelarut organik dengan evaporator.
 - i. Tambahkan dietil eter ke dalam residu selanjutnya sonikasi selama 5 menit hingga produk tersuspensikan ke dalam dietil eter.
 - j. Sentrifugasi campuran tersebut hingga pelarut dan endapan terpisah, setelah pelarut dibuang dilakukan lagi hal yang sama sebanyak 2 kali.
 - k. Bebaskan produk dari pelarut dalam desikator bertekanan.
 - l. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

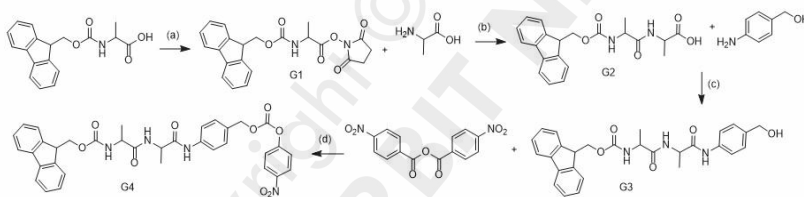
Karakterisasi:

Bentuk: Padatan berwarna kuning muda

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, DMSO d_6): δ 0,85 – 0,91 (m, 6H), 1,31 – 1,35 (m, 3H), 1,96 – 2,06 (m, 1H), 3,89 – 3,95 (m, 1H), 4,20 – 4,47 (m, 4H), 5,24 – 5,28 (m, 2H), 7,30 – 7,91 (m, 15H), 8,21 – 8,33 (m, 3H), 10,09 – 10,11 (m, 1H).

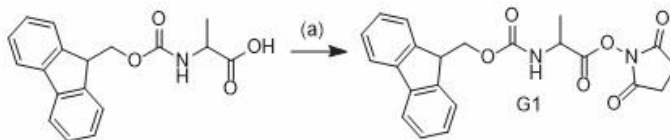
ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 681,4$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 703,3$; $[\text{M}+\text{K}]^+$ $m/z = 719,3$; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_9$ adalah 681,3.

3. Sintesis Fmoc-Ala-Ala-PABC-PNP



Gambar 4.4 Skema sintesis Linker Fmoc-Ala-Ala-PABC-PNP. (a) NHS, DCC, rt; (b) NaHCO_3 , rt; (c) EEDQ, rt; (d) DIPEA, rt.

- a. Sintesis 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl {[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}alaninate (Fmoc-Ala-NHS, G1)



Produk : 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl {[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}alaninate

Rendamen : 733 mg; 90,5%

Reaktan : {[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}alanine (Fmoc-Ala-OH)

Reagen : *N*-hidroksisuksinimide (NHS) dan dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

Pelarut : tetrahidrofuran (THF) anhidrat

Prosedur :

- a. Larutkan Fmoc-Ala-OH (500 mg; 1,61 mmol; 1,0 eq) dan NHS (213 mg; 1,93 mmol; 1,2 eq) dalam THF anhidrat sebanyak 10 mL).
- b. Dinginkan larutan tersebut selama 30 menit menggunakan pengadukan konstan dalam mantel es bersuhu 0°C.
- c. Tambahkan DCC (350 mg; 1,77 mmol; 1,1 eq) sedikit demi sedikit ke dalam larutan tersebut sambil terus diaduk dalam mantel es.
- d. Lanjutkan reaksi pada suhu kamar dalam lingkungan inert (gas nitrogen).
- e. Monitor reaksi dengan menggunakan TLC dengan eluen CHCl₃:MeOH (5:1)
- f. Keesokan harinya, saring produk samping 1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene (DBU) dan pisahkan dari produk utama.
- g. Uapkan filtrat menggunakan evaporator.
- h. Tambahkan 25 mL DCM dan lanjutkan pengadukan konstan selama 30 menit untuk mengendapkan sisa DBU yang masih ada.
- i. Saring DBU yang terbentuk.
- j. Uapkan pelarut organik dari filtrat menggunakan evaporator.

- k. Murnikan produk dengan menggunakan kromatografi kolom flash dengan fase gerak kloroform (100%). **Catatan:** produk tidak stabil dalam silika sehingga kolom kromatografi harus dilakukan sesingkat mungkin.
- l. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$

Karakterisasi:

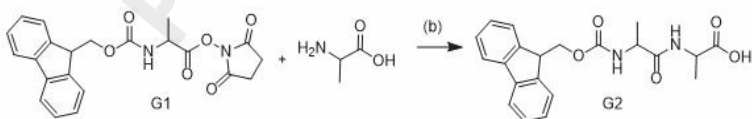
Bentuk: Padatan berwarna putih

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, CDCl_3): δ 1,59 – 1,63 (m, 3H), 2,85 (s, 4H), 4,00 – 4,28 (m, 1H), 4,42 – 4,44 (m, 2H), 4,75 – 4,83 (m, 1H), 5,26 – 5,31 (m, 1H), 7,30 – 7,78 (m, 8H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 409,1$ dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6$ adalah 409,1.

Rf TLC: 0,75 ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 10:1$).

- b. Sintesis {[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}alanylalanine (Fmoc-Ala-Ala-OH, G2)



Produk : {[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}alanylalanine

Rendamen : 582 mg; 85%

Reaktan : 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl {[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}alaninate (Fmoc-Ala-NHS) dan alanin (Ala-OH)

Reagen : natrium bikarbonat (Na_2CO_3)

Pelarut : air suling, tetrahidrofuran (THF) anhidrat, dietil eter.

Prosedur :

- a. Larutkan L-Ala-OH (177 mg; 1,97 mmol, 1,1 eq) dalam THF anhidrat dan NaHCO_3 (166 mg; 1,97 mmol; 1,1 eq) dalam air suling sebanyak 7 mL.
- b. Dinginkan campuran sambil lakukan pengadukan konstan dalam mantel es bersuhu 0°C .
- c. Tambahkan larutan Fmoc-Ala-NHS (733 mg; 1,79 mmol; 1,0 eq) dalam THF anhidrat sebanyak 7 mL tetes demi tetes sambil terus lakukan pengadukan konstan.
- d. Tambahkan campuran pelarut air suling:dietil eter:THF (1:1:1) sebanyak 30 mL ke dalam campuran.
- e. Reaksikan campuran tersebut pada suhu kamar dalam keadaan terlindung dari cahaya (labu alas bulat dilindungi dengan aluminium foil sehingga cahaya tidak dapat menembus dan mengganggu reaksi).
- f. Monitor jalannya reaksi menggunakan TLC dengan eluen MeOH (100%).
- g. Setelah bereaksi selama 3 hari, tambahkan larutan asam sitrat 15% dalam air untuk menghentikan reaksi lalu pindahkan campuran ke dalam corong pisah.
- h. Tambahkan EtOAc.
- i. Ekstraksi produk sebanyak 2×50 mL.

- j. Cuci pelarut organik dengan air sebanyak 50 mL.
- k. Bebas-air-kan dari pelarut organik yang mengandung produk menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
- l. Saring dan uapkan pelarut organik dengan evaporator.
- m. Keringkan residu dari pelarut yang masih tersisa dalam produk dalam desikator bertekanan.
- n. Murnikan produk dengan kromatografi kolom dengan fase gerak kloroform (100%).
- o. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

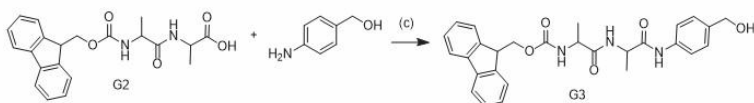
Bentuk: Padatan berwarna putih

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, DMSO, d_6): δ 1,19 – 1,27 (m, 6H), 4,15 – 4,31 (m, 5H), 7,29 – 7,89 (m, 9H), 8,13 – 8,15 (m, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 383,2$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 405,2$; $[\text{M}+\text{K}]^+$ $m/z = 421,2$; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$ adalah 383,2.

Rf TLC: 0,7 (MeOH = 100%).

- c. Sintesis (9H-fluoren-9-yl)methyl {1-[(1-[[4-(hydroxymethyl)phenyl]amino]-1-oxopropan-2-yl)amino]-1-oxopropan-2-yl}carbamate (Fmoc-Ala-Ala-PABOH, G3)



Produk : (9H-fluoren-9-yl)methyl {1-[(1-[[4-(hydroxymethyl)phenyl]amino]-1-oxopropan-2-yl)amino]-1-oxopropan-2-yl}carbamate

Rendamen : 314 mg; 49%

Reaktan : [(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl}alanylalanine (Fmoc-Ala-Ala-OH) dan para amino benzylalkohol (PABOH)

Reagen : 2-etoksi-1-etoksikarbonil-1,2-dihidroquinolin (EEDQ)

Pelarut : metanol dan kloroform

Prosedur :

- Larutkan Fmoc-Ala-Ala-OH (500 mg; 1,31 mmol, 1,0 eq), para amino benzylalkohol (200 mg; 1,57 mmol; 1,2 eq), dan EEDQ (490 mg; 1,97 mmol; 1,5 eq) dalam campuran pelarut CHCl_3 :MeOH (1:1) sebanyak 12 mL.
- Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan pada 40°C selama 2 hari dalam lingkungan inert dan terlindung dari cahaya.
- Setelah 2 hari, uapkan pelarut campuran reaksi dengan evaporator.

- d. Tambahkan dietil eter ke dalam residu selanjutnya sonikasi selama 15 menit hingga produk yang menempel pada dinding dalam labu alas bulat terlepas.
- e. Sentrifugasi campuran tersebut hingga pelarut dan endapan terpisah, setelah pelarut dibuang dilakukan lagi hal yang sama sebanyak 2 kali.
- f. Bebaskan produk dari pelarut dalam desikator bertekanan.
- g. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

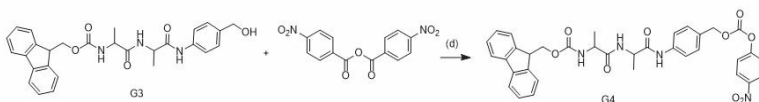
Karakterisasi:

Bentuk: Padatan berwarna putih kekuningan

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, DMSO d_6): δ 1,21 – 1,30 (m, 6H), 4,04 – 4,29 (m, 4H), 4,37 – 4,46 (m, 3H), 5,08 – 5,14 (m, 1H), 7,21 – 7,91 (m, 13H), 8,15 – 8,24 (m, 1H), 9,85 – 9,91 (m, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 488,2$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 510,2$; $[\text{M}+\text{K}]^+$ $m/z = 526,2$; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_5$ adalah 488,2.

- d. Sintesis (9H-fluoren-9-yl)methyl {1-[(1-[[4-((4-nitrophenoxy)carbonyl]oxy)methyl]phenyl]amino}-1-oxopropan-2-yl)amino]-1-oxopropan-2-yl}carbamate (Fmoc-Ala-Ala-PABC-PNP, G4)



Produk : (9*H*-fluoren-9-yl)methyl {1-[(1-{[4-((4-nitrophenoxy)carbonyl)oxy}methyl)phenyl]amino}-1-oxopropan-2-yl)amino]-1-oxopropan-2-yl}carbamate

Rendamen : 10 mg; 51 %

Reaktan : (9*H*-fluoren-9-yl)methyl {1-[(1-{[4-(hydroxymethyl)phenyl]amino}-1-oxopropan-2-yl)amino]-1-oxopropan-2-yl}carbamate (Fmoc-Ala-Ala-PABOH) dan bis(4-nitrofenil)karbonat (bis(pnp) karbonat)

Reagen : *N, N*-diisopropiletilamin (DIPEA)

Pelarut : diklorometan anhidrat dan dimetilformamida (DMF) anhidrat

Prosedur :

- a. Suspensikan Fmoc-Ala-Ala-PABOH (14,6 mg; 0,03 mmol; 1,0 eq) dan bis(pnp) karbonat (27,4 mg; 0,09 mmol; 3,0 eq) dalam DCM anhidrat sebanyak 0,8 mL.
- b. Tambahkan DIPEA (16 μ L; 0,09 mmol; 3,0 eq) sambil dilakukan pengadukan konstan pada suhu kamar dalam lingkungan inert (gas nitrogen).
- c. Tambahkan DMF anhidrat sebanyak 0,2 mL ke dalam suspensi hingga semua campuran terlarut.
- d. Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 1 hari dalam lingkungan inert.

- e. Setelah bereaksi selama 1 hari, tambahkan air sebanyak 5 mL ke dalam campuran untuk menghentikan reaksi.
- f. Pindahkan campuran ke dalam corong pisah dan tambahkan DCM baru sebanyak 5 mL lalu lakukan ekstraksi sebanyak 4 x 5 mL DCM.
- g. Bebas-air-kan produk pada pelarut organik dengan menggunakan MgSO_4 anhidrat berlebih.
- h. Saring dan uapkan pelarut organik dengan evaporator.
- i. Tambahkan dietil eter ke dalam residu selanjutnya sonikasi selama 5 menit hingga produk tersuspensikan ke dalam dietil eter.
- j. Sentrifugasi campuran tersebut hingga pelarut dan endapan terpisah, setelah pelarut dibuang dilakukan lagi hal yang sama sebanyak 2 kali.
- k. Bebaskan produk dari pelarut dalam desikator bertekanan.
- l. Analisis produk dengan menggunakan ESI-MS dan $^1\text{H-NMR}$.

Karakterisasi:

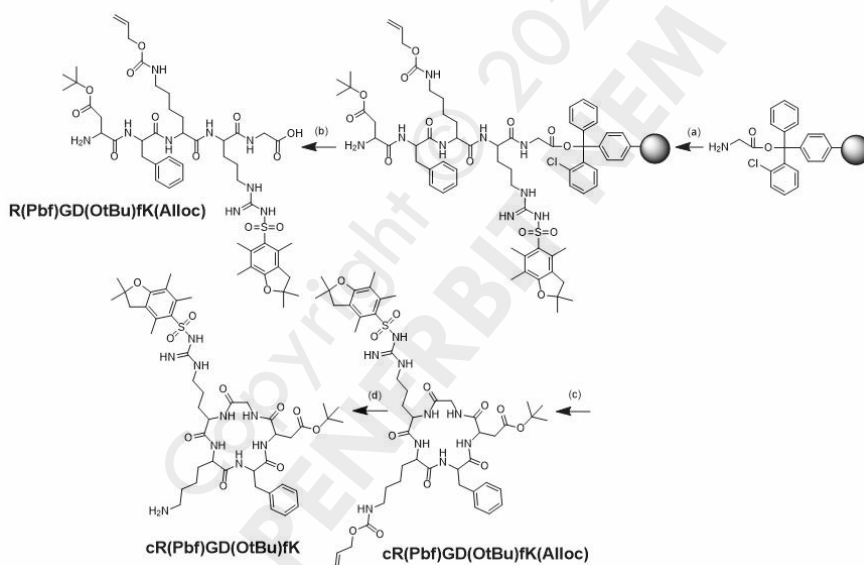
Bentuk: Padatan berwarna kuning muda

$^1\text{H-NMR}$ data (400 Mhz, DMSO d_6): δ 1,21 – 1,30 (m, 6H), 4,03 – 4,28 (m, 4H), 4,38 – 4,45 (m, 3H), 7,20 – 7,94 (m, 15H), 8,15 – 8,24 (m, 3H), 9,80 – 9,89 (m, 1H).

ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 653,3; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z = 675,2; $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z = 691,2; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_9$ adalah 653,2.

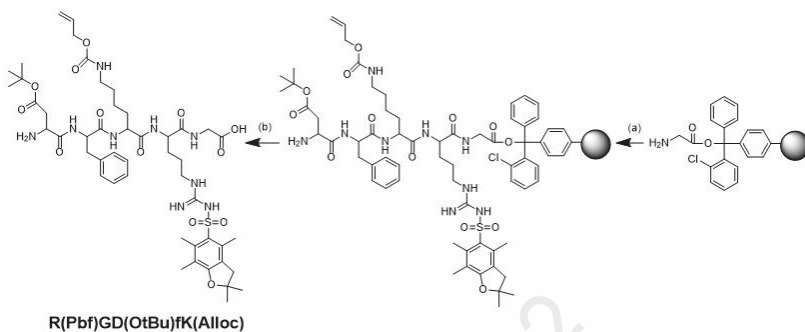
C. Sintesis Peptida cR(Pbf)GD(OtBu)fK

Sintesis senyawa peptida, cR(Pbf)GD(OtBu)fK, dilakukan dengan metode SPPS (*solid phase peptide synthesis*). Sintesis ini dimulai dari gugus karboksilat yang dilindungi dengan resin-klorida berakhir di gugus amin asam amino. Langkah penyiapannya sebagaimana tersaji pada Gambar 4.5 skema sintesis peptida cR(Pbf)GD(OtBu)fK. Peptida ini dalam PDC berfungsi sebagai pembawa Osimertinib ke target molekul dalam hal ini sel kanker.



Gambar 4.5 Skema sintesis peptida cR(Pbf)GD(OtBu)fK. (a) (i) Fmoc-Gly-OH, DIPEA, DCM; (ii) piperidin 20% dalam DMF; (iii) Fmoc-Arg(Pbf)-OH atau Fmoc-Asp(OtBu)-OH atau Fmoc-D-Phe-OH atau Fmoc-Lys(Alloc)-OH, HOBt, DIPCI, DMF; (iv) 20% piperidin/DMF; (b) 30% HFIP/DCM; (c) DPPA, NaHCO₃, DMF; (d) Pd(PPh₃)₄, fenilsilan, DMF

1. Sintesis linear R(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc)



Produk : Peptida linear R(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc)

Reaktan : Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Lys(Alloc)-OH, resin-2-klorotritil

Reagen : DIPEA, 20% piperidin/DMF, *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide (DIPCI), Hydroxybenzotriazole (HOBt),

Pelarut : DMF, DCM.

Prosedur :

- Masukkan resin-2-klorida (62,2 mg; 0,1 mmol; 1,0 eq) dan Fmoc-Gly-OH (119 mg; 0,4 mmol; 4,0 eq) ke dalam wadah sintesis peptida.
- Tambahkan DCM sebanyak 0,8 mL diikuti dengan penambahan DIPEA sebanyak 19 μ L.
- Setelah pengadukan konstan selama 15 menit, tambahkan DIPEA sebanyak 38 μ L ke dalam campuran tersebut.
- Lanjutkan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 2 jam.
- Setelah 2 jam bereaksi, pelarut DCM dihilangkan dari campuran digantikan dengan pelarut MeOH

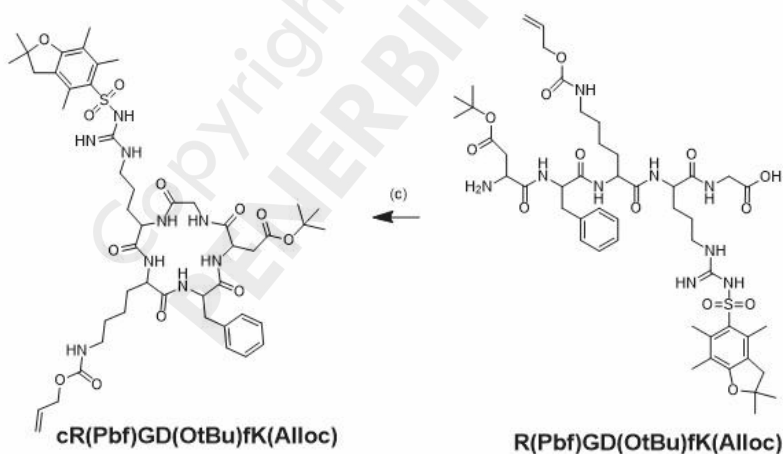
sebanyak 2 mL, diikuti dengan pengadukan konstan selama 30 menit.

- f. Hilangkan pelarut MeOH dari campuran reaksi, lalu cuci campuran reaksi dengan DMF hingga semua reagen dan reaktan yang tidak ikut bereaksi keluar dari campuran reaksi tersebut.
- g. Lakukan Kaiser Test. Masukkan sejumlah kecil Fmoc-Gly-resin ke dalam Eppendorf® yang berisi 50 μ L campuran 80% fenol dalam etanol, kalium sianida (KCN) dalam air, dan 6% ninhidrin dalam etanol. Panaskan campuran tersebut pada suhu 100°C selama 5 menit. Pada uji ini larutan tidak berubah menjadi warna biru tua karena tidak terdapat amin primer.
- h. Tambahkan 20% piperidin dalam DMF sebanyak 4 mL ke dalam campuran (f) lalu lakukan pengadukan konstan selama 10 menit.
- i. Hilangkan pelarut dari campuran tersebut lalu cuci dengan DMF hingga semua reagen dan reaktan yang tidak ikut bereaksi keluar dari campuran reaksi tersebut.
- j. Lakukan Kaiser test, sebagaimana yang dijelaskan pada point (g). Pada saat ini terjadi perubahan warna menjadi biru tua setelah pemanasan dikarenakan gugus pelindung amin, Fmoc, telah dihilangkan dengan menggunakan 20% piperidin dalam DMF.
- k. Masukkan Fmoc-Arg(Pbf)-OH (162 mg; 0,25 mmol; 2,5 eq), HOBt (38,2 mg; 0,25 mmol; 2,5 eq), DIPCI (39 μ L; 0,25 mmol; 2,5 eq), dan 0,8 mL DMF ke dalam tabung reaksi yang berisi NH₂-Gly-resin.

- l. Reaksikan campuran tersebut pada suhu kamar selama 2 jam.
- m. Setelah DMF dihilangkan dari campuran reaksi dan dilakukan pencucian dengan menggunakan pelarut DMF yang baru selanjutnya dilakukan Kaiser test sebagaimana yang dijelaskan pada point (g).
Note: tidak terjadi perubahan warna dari larutan uji
- n. Tambahkan 20% piperidin dalam DMF sebanyak 4 mL ke dalam campuran (f) lalu lakukan pengadukan konstan selama 10 menit.
- o. Hilangkan pelarut dari campuran tersebut lalu cuci dengan DMF hingga semua reagen dan reaktan yang tidak ikut bereaksi keluar dari campuran reaksi tersebut.
- p. Lakukan Kaiser test kembali.
Note: terjadi perubahan warna dari larutan uji menjadi biru tua karena adanya amin primer.
- m. Ulangi langkah (k) sampai (p) dengan menggantikan Fmoc-Arg(Pbf)-OH dengan asam amino berikut berturut-turut Fmoc-Lys(Alloc)-OH (113 mg; 0,25 mmol; 2,5 eq), Fmoc-D-Phe-OH (97 mg; 0,25 mmol; 2,5 eq), dan Fmoc-Asp(OtBu)-OH (103 mg; 0,25 mmol; 2,5 eq) hingga diperoleh produk peptida linear R(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc) yang terikat pada resin.
- n. Cuci campuran peptida linear R(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc)-resin menggunakan DCM.
- o. Bebaskan campuran dari pelarut dengan menggunakan pompa vakum bertekanan selama 30 menit.

- p. Tambahkan 30% heksafloroisopropanol (HFIP) dalam DCM ke dalam peptida tersebut lalu reaksi selama 5 menit pada suhu kamar (ditandai dengan terbentuknya warna merah pada campuran).
- q. Saring produk yang terlarut dan cuci residu dengan DCM.
- r. Uapkan pelarut dari peptida linear R(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc) menggunakan evaporator.
- s. Gunakan produk untuk reaksi selanjutnya tanpa pemurnian.

2. Sintesis cR(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc)



Produk : cR(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc)

Reaktan : peptida linear R(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc)

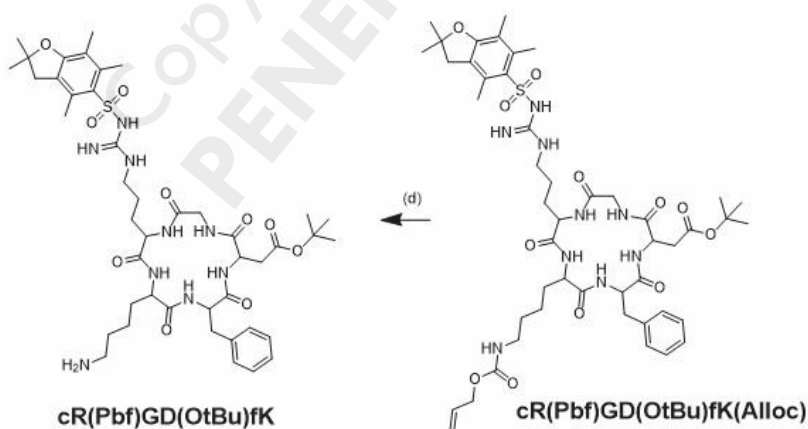
Reagen : Difenil fosforil azide (DPPA), NaHCO₃

Pelarut : DMF

Prosedur :

- Larutkan peptida linear R(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc) (0,1 mmol; 1,0 eq) dalam DMF sebanyak 20 mL lalu tambahkan DPPA (3,0 eq) dan NaHCO₃ (5,0 eq).
- Reaksikan campuran pada suhu kamar dengan pengadukan konstan.
- Setelah 24 jam, saring produk reaksi untuk memisahkan NaHCO₃ dari campuran.
- uapkan filtrat menggunakan evaporator
- Bebas-pelarut-kan sampel dengan menggunakan vakum bertekanan untuk mendapatkan produk cR(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc).
- Gunakan produk untuk reaksi selanjutnya tanpa pemurnian.

3. Sintesis cR(Pbf)DG(OtBu)fK



Produk : cR(Pbf)DG(OtBu)fK

Reaktan : cR(Pbf)DG(OtBu)fK(Alloc)

Reagen : Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)
($\text{Pd(PPh}_3)_4$), asam asetat (AcOH),
morpholin

Pelarut : kloroform

Prosedur :

- Larutkan $\text{cR(Pbf)DG(Obu)fK(Alloc)}$ (0,1 mmol; 1,0 eq) dalam campuran $\text{CHCl}_3\text{:AcOH:morpholin}$ (37:2:1) sebanyak 8 mL.
- Tambahkan $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (578 mg; 0,5 mmol; 5,0 eq) kedalam campuran tersebut.
- Reaksikan campuran pada suhu kamar dengan pengadukan konstan dalam lingkungan bebas air dan udara (inert) dan terlindung dari cahaya.
- Setelah 2 jam, pisahkan $\text{Pd(PPh}_3)_4$ dari campuran reaksi dengan penyaringan menggunakan celite®.
- Konsentratkan produk dengan menggunakan evaporator.
- Murnikan cR(Pbf)DG(Obu)fK dengan RP-HPLC dengan sistem:

Kolom : $5\text{C}_{18}\text{-AR-II}$ (10 ID x 250 mm)

Fase gerak : 55-75% (0 - 20 menit) MeOH
dalam air mengandung 0,1% TFA

Laju alir : 4,0 mL/menit

Temperatur : 40°C

Waktuambat: 9,28 menit

- Konsentratkan hasil isolat dengan evaporator dan liofilisasi produk semalaman hingga terbentuk produk padatan berwarna kuning muda.

Karakterisasi:

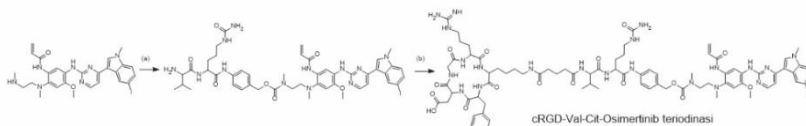
Bentuk: Padatan berwarna kuning muda

ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 912,5$; dengan hasil perhitungan untuk $C_{44}H_{65}N_9O_{10}S$ adalah 912,5.

D. Sintesis Osimertinib Teriodinasi-linker-cRGD

Langkah dalam mensintesis senyawa PDC, cRGD-linker-Osimertinib teriodinasi, yang diuraikan dalam monograf ini ada tiga, yaitu sintesis cRGD-Val-Cit-Osimertinib teriodinasi, cRGD-Val-Ala-Osimertinib teriodinasi, dan cRGD-Ala-Ala-Osimertinib teriodinasi. Adapun tahapan secara umum adalah pertama-tama Osimertinib teriodinasi dikonjugasikan dengan linker, Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP, Fmoc-Val-Ala-PABC-PNP, atau Fmoc-Ala-Ala-PABC-PNP. Langkah ini diikuti dengan pemutusan gugus pelindung Fmoc dengan menggunakan 20% piperidin dalam DMF. Selanjutnya produk tersebut direaksikan dengan glutaric anhidrat dalam DMF yang diikuti dengan cRGDfK terproteksi gugus pelindung. Pembebasan PDC dari gugus pelindung dilakukan dengan menggunakan TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5). Skema sintesis PDC tersebut terurai dalam skema sintesis penyiapan PDC.

1. Sintesis cRGD-Val-Cit-Osimertinib teriodinasi



Produk : cRGD-Val-Cit-Osimertinib teriodinasi

Reaktan : Osimertinib teriodinasi (D4), glutaric anhidrat

Reagen : DIPEA, 20% piperidin/DMF, (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate) (HATU)

Pelarut : DMF

Prosedur :

- Larutkan Osimertinib teriodinasi (D4) (10 mg; 16,4 μ mol; 1,1 eq) dalam DMF anhidrat sebanyak 2 mL.
- Masukkan Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP (11,4 mg; 14,9 μ mol; 1,0 eq) dan DIPEA (4,6 μ L, 24,6 mmol; 1,5 eq) ke dalam larutan tersebut.
- Reaksikan campuran tersebut pada suhu kamar semalaman dalam lingkungan inert.
- Setelah campuran bereaksi sempurna, tambahkan EtOAc sebanyak 30 mL, lalu cuci berturut-turut dengan larutan kalium hidrogen sulfat 1 M (2 x 15 mL), larutan jenuh NaHCO_3 (2 x 15 mL), dan larutan jenuh NaCl (1 x 15 mL).
- Bebas-air-kan produk dalam pelarut organik dengan menggunakan magnesium sulfat (MgSO_4) anhidrat berlebih.
- Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- Purifikasi produk dengan menggunakan RP-HPLC dan analisis produk dengan menggunakan ESI-MS.

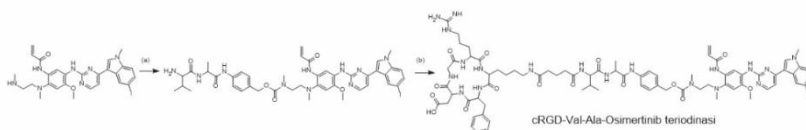
Note: ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 1.239,4; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{61}\text{H}_{68}\text{IN}_{12}\text{O}_9$ adalah 1.239,4.

- h. Produk hasil purifikasi (g) (10 mg; 8 μ mol; 1,0 eq) dilarutkan dengan 1 mL 20% piperidin dalam DMF.
- i. Lakukan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 2 jam untuk menghilangkan gugus Fmoc.
- j. Konsentratkan produk dengan evaporator lalu tritulasi dengan menggunakan dietil eter.
- k. Analisis produk menggunakan ESI-MS.
Note: ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 1.017,5$; dengan hasil perhitungan untuk $C_{46}H_{58}IN_{12}O_7$ adalah 1.017,4.
- l. Produk (j) (8 mg; 8 μ mol; 1,0 eq) dan glutarik anhidrat (1,8 mg; 16 μ mol; 2,0 eq) dilarutkan dengan DMF anhidrat (1 mL).
- m. Tambahkan DIPEA (2,8 μ L; 16 μ mol; 2,0 eq) ke dalam campuran tersebut.
- n. Setelah pengadukan konstan selama 2 jam pada suhu kamar dalam lingkungan inert, selanjutnya konsentratkan produk dengan evaporator.
- o. Purifikasi produk dengan menggunakan RP-HPLC dan analisis produk dengan menggunakan ESI-MS.
Note: ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 1.131,3$; dengan hasil perhitungan untuk $C_{51}H_{64}IN_{12}O_{10}$ adalah 1.131,4.
- p. Produk (o) (6 mg; 5,3 μ mol; 1,0 eq) dilarutkan dengan DMF anhidrat (1 mL).
- q. Tambahkan HATU (1,8 mg; 4,8 μ mol; 0,9 eq) dan DIPEA (1,2 μ L; 10,6 μ mol; 2,0 eq)

- r. Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 30 menit dalam lingkungan inert.
- s. Tambahkan cR(Pbf)DG(OtBu)fK (4,8 mg; 5,3 μmol ; 1,0 eq) ke dalam campuran.
- t. Lanjutkan pengadukan konstan pada suhu kamar semalaman dalam lingkungan inert.
- u. Konsentratkan produk dengan evaporator.
- v. Ke dalam konsentrat tersebut ditambahkan campuran TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5) sebanyak 2 mL, lalu dilakukan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 2 jam. Setelah sampel bereaksi sempurna pelarut dihilangkan dengan menggunakan gas nitrogen berlebih.
- w. Purifikasi produk dengan menggunakan RP-HPLC dan analisis produk cRGD-Val-Cit-Osimertinib teriodinasi dengan menggunakan ESI-MS.

Note: ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 1.716,8$; dengan hasil perhitungan untuk C₇₈H₁₀₃IN₂₁O₁₆ adalah 1.716,7.

2. Sintesis cRGD-Val-Ala-Osimertinib teriodinasi



Produk : cRGD-Val-Ala-Osimertinib teriodinasi

Reaktan : Osimertinib teriodinasi (D4), glutaric anhidrat

Reagen : DIPEA, 20% piperidin/DMF, (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate) (HATU)

Pelarut : DMF

Prosedur :

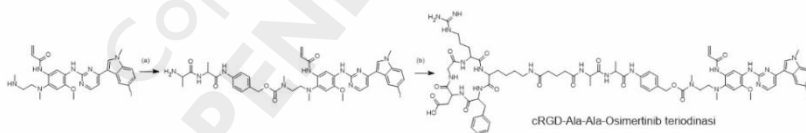
- a. Larutkan Osimertinib teriodinasi (D4) (10 mg; 16,2 μ mol; 1,1 eq) dalam DMF anhidrat sebanyak 2 mL.
- b. Masukkan Fmoc-Val-Ala-PABC-PNP (10 mg; 14,7 μ mol; 1,0 eq) dan DIPEA (4,1 μ L, 22 μ mol; 1,5 eq) ke dalam larutan tersebut.
- c. Reaksikan campuran tersebut pada suhu kamar semalaman dalam lingkungan inert.
- d. Setelah campuran bereaksi sempurna, tambahkan EtOAc sebanyak 30 mL, lalu cuci berturut-turut dengan larutan kalium hidrogen sulfat 1 M (2 x 15 mL), larutan jenuh NaHCO_3 (2 x 15 mL), dan larutan jenuh NaCl (1 x 15 mL).
- e. Bebas-air-kan produk dalam pelarut organik dengan menggunakan magnesium sulfat (MgSO_4) anhidrat berlebih.
- f. Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- g. Purifikasi produk dengan menggunakan RP-HPLC dan analisis produk dengan menggunakan ESI-MS.
Note: ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 1.153,4; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{58}\text{H}_{62}\text{N}_{10}\text{O}_8$ adalah 1.153,4.
- h. Produk hasil purifikasi (g) (9,2 mg; 8 μ mol; 1,0 eq) dilarutkan dengan 1 mL 20% piperidin dalam DMF.

- i. Lakukan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 2 jam untuk menghilangkan gugus Fmoc.
- j. Konsentratkan produk dengan evaporator lalu tritulasi dengan menggunakan dietil eter.
- k. Analisis produk menggunakan ESI-MS.
Note: ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 931,4$; dengan hasil perhitungan untuk $C_{43}H_{52}IN_{10}O_6$ adalah 931,3.
- l. Produk (j) (7,4 mg; 8 μ mol; 1,0 eq) dan glutarik anhidrat (1,8 mg; 16 μ mol; 2,0 eq) dilarutkan dengan DMF anhidrat (1 mL).
- m. Tambahkan DIPEA (2,8 μ L; 16 μ mol; 2,0 eq) ke dalam campuran tersebut.
- n. Setelah pengadukan konstan selama 2 jam pada suhu kamar dalam lingkungan inert, selanjutnya konsentratkan produk dengan evaporator.
- o. Purifikasi produk dengan menggunakan RP-HPLC dan analisis produk dengan menggunakan ESI-MS.
Note: ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 1.045,3$; dengan hasil perhitungan untuk $C_{48}H_{58}IN_{10}O_9$ adalah 1.045,3
- p. Produk (o) (5,2 mg; 5,0 μ mol; 1,0 eq) dilarutkan dengan DMF anhidrat (1 mL).
- q. Tambahkan HATU (1,7 mg; 4,5 μ mol; 0,9 eq) dan DIPEA (1 μ L; 9,0 μ mol; 2,0 eq)
- r. Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 30 menit dalam lingkungan inert.
- s. Tambahkan cR(Pbf)DG(OtBu)fK (4,5 mg; 5,0 μ mol; 1,0 eq) ke dalam campuran.

- t. Lanjutkan pengadukan konstan pada suhu kamar semalaman dalam lingkungan inert.
- u. Konsentratkan produk dengan evaporator.
- v. Ke dalam konsentrat tersebut ditambahkan campuran TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5) sebanyak 2 mL, lalu dilakukan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 2 jam. Setelah sampel bereaksi sempurna pelarut dihilangkan dengan menggunakan gas nitrogen berlebih.
- w. Purifikasi produk dengan menggunakan RP-HPLC dan analisis produk cRGD-Val-Ala-Osimertinib teriodinasi dengan menggunakan ESI-MS.

Note: ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 1.630,8$; dengan hasil perhitungan untuk C₇₅H₉₇IN₁₉O₁₅ adalah 1.630,7.

3. Sintesis cRGD-Ala-Ala-Osimertinib teriodinasi



Produk : cRGD-Ala-Ala-Osimertinib teriodinasi

Reaktan : Osimertinib teriodinasi (D4), glutaric anhidrat

Reagen : DIPEA, 20% piperidin/DMF, (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate) (HATU)

Pelarut : DMF

Prosedur :

- a. Larutkan Osimertinib teriodinasi (D4) (10,4 mg; 16,9 μmol ; 1,1 eq) dalam DMF anhidrat sebanyak 2 mL.
- b. Masukkan Fmoc-Ala-Ala-PABC-PNP (10 mg; 15,4 μmol ; 1,0 eq) dan DIPEA (4,3 μL , 23,1 μmol ; 1,5 eq) ke dalam larutan tersebut.
- c. Reaksikan campuran tersebut pada suhu kamar semalaman dalam lingkungan inert.
- d. Setelah campuran bereaksi sempurna, tambahkan EtOAc sebanyak 30 mL, lalu cuci berturut-turut dengan larutan kalium hidrogen sulfat 1 M (2 x 15 mL), larutan jenuh NaHCO_3 (2 x 15 mL), dan larutan jenuh NaCl (1 x 15 mL).
- e. Bebas-air-kan produk dalam pelarut organik dengan menggunakan magnesium sulfat (MgSO_4) anhidrat berlebih.
- f. Saring dan uapkan pelarut organik dengan menggunakan evaporator.
- g. Purifikasi produk dengan menggunakan RP-HPLC dan analisis produk dengan menggunakan ESI-MS.
Note: ESI-MS (LRMS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 1.125,4$; dengan hasil perhitungan untuk $\text{C}_{56}\text{H}_{58}\text{IN}_{10}\text{O}_8$ adalah 1.125,4.
- h. Produk hasil purifikasi (g) (7,1 mg; 8 μmol ; 1,0 eq) dilarutkan dengan 1 mL 20% piperidin dalam DMF.
- i. Lakukan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 2 jam untuk menghilangkan gugus Fmoc.

- j. Konsentratkan produk dengan evaporator lalu tritulasi dengan menggunakan dietil eter.
- k. Analisis produk menggunakan ESI-MS.
Note: ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 903,3$; dengan hasil perhitungan untuk $C_{41}H_{48}IN_{10}O_6$ adalah 903,3.
- l. Produk (j) (7,2 mg; 8,0 μmol ; 1,0 eq) dan glutarik anhidrat (1,8 mg; 16,0 μmol ; 2,0 eq) dilarutkan dengan DMF anhidrat (1 mL).
- m. Tambahkan DIPEA (2,8 μL ; 16,0 μmol ; 2,0 eq) ke dalam campuran tersebut.
- n. Setelah pengadukan konstan selama 2 jam pada suhu kamar dalam lingkungan inert, selanjutnya konsentratkan produk dengan evaporator.
- o. Purifikasi produk dengan menggunakan RP-HPLC dan analisis produk dengan menggunakan ESI-MS.
Note: ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 1.017,4$; dengan hasil perhitungan untuk $C_{46}H_{54}IN_{10}O_9$ adalah 1.017,3
- p. Produk (o) (5,0 mg; 5,0 μmol ; 1,0 eq) dilarutkan dengan DMF anhidrat (1 mL).
- q. Tambahkan HATU (1,7 mg; 4,5 μmol ; 0,9 eq) dan DIPEA (1,0 μL ; 9,0 μmol ; 2,0 eq)
- r. Reaksikan campuran dengan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 30 menit dalam lingkungan inert.
- s. Tambahkan $cR(Pbf)DG(OtBu)fK$ (4,5 mg; 5,0 μmol ; 1,0 eq) ke dalam campuran.
- t. Lanjutkan pengadukan konstan pada suhu kamar semalaman dalam lingkungan inert.

- u. Konsentratkan produk dengan evaporator.
- v. Ke dalam konsentrat tersebut ditambahkan campuran TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5) sebanyak 2 mL, lalu dilakukan pengadukan konstan pada suhu kamar selama 2 jam. Setelah sampel bereaksi sempurna pelarut dihilangkan dengan menggunakan gas nitrogen berlebih.
- w. Purifikasi produk dengan menggunakan RP-HPLC dan analisis produk cRGD-Ala-Ala-Osimertinib teriodinasi dengan menggunakan ESI-MS.

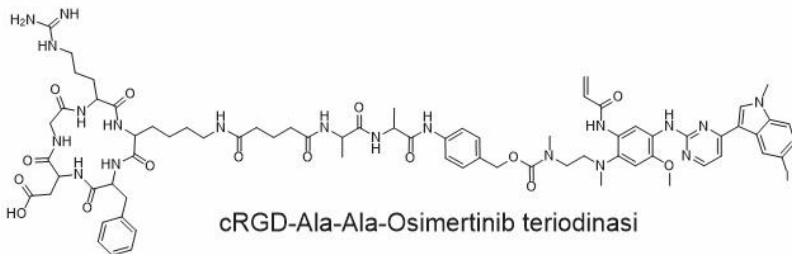
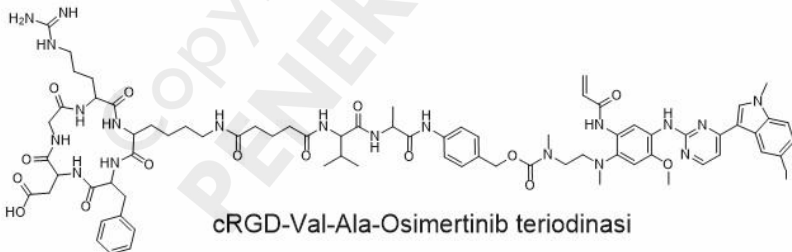
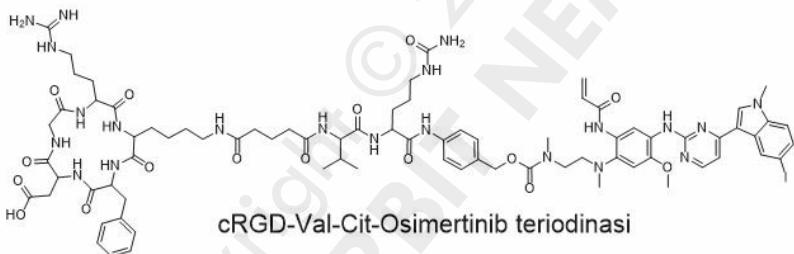
Note: ESI-MS (LRMS): $[M+H]^+$ $m/z = 1.602,7$; dengan hasil perhitungan untuk C₇₃H₉₃IN₁₉O₁₅ adalah 1.602,6.

~oOo~

Bab 5 KESIMPULAN

Berdasarkan data yang kami paparkan dan bahas dalam monograf ini maka kami menyimpulkan bahwa:

1. Sebanyak tiga kandidat agen pengobatan kanker paru PDC (cRGD-linker-Osimertinib teriodinasi) telah berhasil didesain.



2. Ketiga PDC tersebut disintesis yang terbagi dalam empat bagian, yaitu sintesis Osimertinib teriodinasi, sintesis linker, sintesis cRGD (dengan gugus pelindung), dan mengkonjugasikan ketiganya dengan menggunakan reagen tertentu yang diawali dengan penggabungan Osimertinib teriodinasi dengan linker lalu dengan cRGD untuk membentuk PDC (cRGD-linker-Osimertinib teriodinasi).

~oOo~

Copyright © 2022
PENERBIT NEM

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (2020). *World Health Organization. Indonesia. Burden of Cancer. Cancer Country Profile 2020.*
- Bardia, A., Mayer, I. A., Vahdat, L. T., Tolaney, S. M., Isakoff, S. J., Diamond, J. R., O'Shaughnessy, J., Moroosse, R. L., Santin, A. D., Abramson, V. G., Shah, N. C., Rugo, H. S., Goldenberg, D. M., Sweidan, A. M., Iannone, R., Washkowitz, S., Sharkey, R. M., Wegener, W. A., & Kalinsky, K. (2019, Feb 21). Sacituzumab Govitecan-hziy in Refractory Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*, 380(8), 741-751.
- Bargh, J. D., Isidro-Llobet, A., Parker, J. S., & Spring, D. R. (2019, Aug 12). Cleavable linkers in antibody-drug conjugates. *Chem Soc Rev*, 48(16), 4361-4374.
- Dewi, A., Thabrany, H., Satrya, A., Puteri, G., Fattah, R., & Novitasari, D. (2021). *Kanker Paru, Kanker Paling Mematikan di Indonesia: Apa Saja Yang Telah Kita Atasi dan Apa Yang Kita Bisa Lakukan.* Pusat Kajian Jaminan Sosial Universitas Indonesia, PKJS-UI.
- Dubowchik, G. M., Firestone, R. A., Padilla, L., Willner, D., Hofstead, S. J., Mosure, K., Knipe, J. O., Lasch, S. J., & Trail, P. A. (2002, Jul-Aug). Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity. *Bioconj Chem*, 13(4), 855-869.

- Effendi, N., Mishiro, K., Takarada, T., Makino, A., Yamada, D., Kitamura, Y., Shiba, K., Kiyono, Y., Odani, A., & Ogawa, K. (2018, Jul 10). Radiobrominated benzimidazole-quinoline derivatives as Platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) imaging probes. *Sci Rep*, 8(1), 10369.
- Effendi, N., Mishiro, K., Takarada, T., Yamada, D., Nishii, R., Shiba, K., Kinuya, S., Odani, A., & Ogawa, K. (2019, Jan 15). Design, synthesis, and biological evaluation of radioiodinated benzo[d]imidazole-quinoline derivatives for platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) imaging. *Bioorg Med Chem*, 27(2), 383-393.
- Effendi, N., Ogawa, K., Mishiro, K., Takarada, T., Yamada, D., Kitamura, Y., Shiba, K., Maeda, T., & Odani, A. (2017, Oct 15). Synthesis and evaluation of radioiodinated 1-2-[5-(2-methoxyethoxy)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl]quinolin-8-ylpiperidin-4-amine derivatives for platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) imaging. *Bioorg Med Chem*, 25(20), 5576-5585.
- Ellis, P. M., Coakley, N., Feld, R., Kuruvilla, S., & Ung, Y. C. (2015, Jun). Use of the epidermal growth factor receptor inhibitors gefitinib, erlotinib, afatinib, dacomitinib, and icotinib in the treatment of non-small-cell lung cancer: a systematic review. *Curr Oncol*, 22(3), e183-215.
- Fu, C., Yu, L., Miao, Y., Liu, X., Yu, Z., & Wei, M. (2022). Peptide-Drug Conjugates (PDCs): A Novel Trend of Research and Development on Targeted Therapy, Hype or Hope? *Acta Pharmaceutica Sinica B*.
- Gao, J., Li, H. R., Jin, C., Jiang, J. H., & Ding, J. Y. (2019, Oct). Strategies to overcome acquired resistance to EGFR TKI

in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol*, 21(10), 1287-1301.

Goto, K., Satouchi, M., Ishii, G., Nishio, K., Hagiwara, K., Mitsudomi, T., Whiteley, J., Donald, E., McCormack, R., & Todo, T. (2012, Nov). An evaluation study of EGFR mutation tests utilized for non-small-cell lung cancer in the diagnostic setting. *Ann Oncol*, 23(11), 2914-2919.

Korpanty, G. J., MGraham, D., Vincent, M. D., & BLEighl, N. (2014). Biomarkers that Currently Affect Clinical Practice in Lung Cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS. *Frontiers in Oncology*, 4, 204.

Mishiro, K., Nishii, R., Sawazaki, I., Sofuku, T., Fuchigami, T., Sudo, H., Effendi, N., Makino, A., Kiyono, Y., Shiba, K., Taki, J., Kinuya, S., & Ogawa, K. (2022). Development of Radiohalogenated Osimertinib Derivatives as Imaging Probes for Companion Diagnostics of Osimertinib. *Journal Medicinal Chemistry*, 65(3), 1835 - 1847.

Mu, W., Jiang, L., Zhang, J., Shi, Y., Gray, J. E., Tunali, I., Gao, C., Sun, Y., Tian, J., Zhao, X., Sun, X., Gillies, R. J., & Schabath, M. B. (2020, Oct 16). Non-invasive decision support for NSCLC treatment using PET/CT radiomics. *Nat Commun*, 11(1), 5228.

Polanski, J., Jankowska-Polanska, B., Rosinczuk, J., Chabowski, M., & Szymanska-Chabowska, A. (2016). Quality of life of patients with lung cancer. *Onco Targets Ther*, 9, 1023-1028.

Ramalingam, S. S., Vansteenkiste, J., Planchard, D., Cho, B. C., Gray, J. E., Ohe, Y., Zhou, C., Reungwetwattana, T., Cheng, Y., Chewaskulyong, B., Shah, R., Cobo, M., Lee, K. H., Cheema, P., Tiseo, M., John, T., Lin, M. C.,

- Imamura, F., Kurata, T., Todd, A., Hodge, R., Saggese, M., Rukazenkov, Y., & Soria, J. C. (2020, Jan 2). Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med*, 382(1), 41-50.
- Robichaux, J. P., Le, X., Vijayan, R. S. K., Hicks, J. K., Heeke, S., Elamin, Y. Y., Lin, H. Y., Udagawa, H., Skoulidis, F., Tran, H., Varghese, S., He, J., Zhang, F., Nilsson, M. B., Hu, L., Poteete, A., Rinsurongkawong, W., Zhang, X., Ren, C., Liu, X., Hong, L., Zhang, J., Diao, L., Madison, R., Schrock, A. B., Saam, J., Raymond, V., Fang, B., Wang, J., Ha, M. J., Cross, J. B., Gray, J. E., & Heymach, J. V. (2021, Sep). Structure-based classification predicts drug response in EGFR-mutant NSCLC. *Nature*, 597(7878), 732-737.
- Schuster, S., Juhasz, E., Halmos, G., Neundorff, I., Gennari, C., & Mezo, G. (2022, May 3). Development and Biochemical Characterization of Self-Immolative Linker Containing GnRH-III-Drug Conjugates. *Int J Mol Sci*, 23(9).
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021, May). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249.
- Sun, X., Xiao, Z., Chen, G., Han, Z., Liu, Y., Zhang, C., Sun, Y., Song, Y., Wang, K., Fang, F., Wang, X., Lin, Y., Xu, L., Shao, L., Li, J., Cheng, Z., Gambhir, S. S., & Shen, B. (2018, Mar 7). A PET imaging approach for determining EGFR mutation status for improved lung cancer patient management. *Sci Transl Med*, 10(431).
- Wang, S., Shi, J., Ye, Z., Dong, D., Yu, D., Zhou, M., Liu, Y., Gevaert, O., Wang, K., Zhu, Y., Zhou, H., Liu, Z., &

- Tian, J. (2019, Mar). Predicting EGFR mutation status in lung adenocarcinoma on computed tomography image using deep learning. *Eur Respir J*, 53(3).
- Yeh, S. H., Lin, M. H., Leo Garcia, F., II, Mukhopadhyay, U., Young, D., Ogawa, K., Jeong, J. H., Tong, W., Gelovani, J. G., & Fukumitsu, N. (2021). In Vivo Evaluation of the Combined Anticancer Effects of Cisplatin and SAHA in Nonsmall Cell Lung Carcinoma Using [^{18}F]FAHA and [^{18}F]FDG PET/CT Imaging. *Mol Imaging*, 2021, 6660358.
- Xu, M. J., Johnson, D. E., & Grandis, J. R. (2017, Sep). EGFR-targeted therapies in the post-genomic era. *Cancer Metastasis Rev*, 36(3), 463-473.
- Trail, P. A., Dubowchik, G. M., & Lowinger, T. B. (2018, Jan). Antibody drug conjugates for treatment of breast cancer: Novel targets and diverse approaches in ADC design. *Pharmacol Ther*, 181, 126-142.
- McLean, A. E. B., Barnes, D. J., & Troy, L. K. (2018, Jun 29). Diagnosing Lung Cancer: The Complexities of Obtaining a Tissue Diagnosis in the Era of Minimally Invasive and Personalised Medicine. *J Clin Med*, 7(7).
- He, R., Finan, B., Mayer, J. P., & DiMarchi, R. D. (2019, May 14). Peptide Conjugates with Small Molecules Designed to Enhance Efficacy and Safety. *Molecules*, 24(10).
- Chau, C. H., Steeg, P. S., & Figg, W. D. (2019, Aug 31). Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet*, 394(10200), 793-804.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020, Jan). Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 70(1), 7-30.

- Park, H. J., Lee, S. H., & Chang, Y. S. (2020, Mar). Recent advances in diagnostic technologies in lung cancer. *Korean J Intern Med*, 35(2), 257-268.
- Alexander, M., Kim, S. Y., & Cheng, H. (2020, Dec). Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung*, 198(6), 897-907.
- Alas, M., Saghaeidehkordi, A., & Kaur, K. (2021, Jan 14). Peptide-Drug Conjugates with Different Linkers for Cancer Therapy. *J Med Chem*, 64(1), 216-232.

~oOo~

Tentang Penulis



apt. Nurmaya Effendi, S.Si., M.Sc., Ph.D., lahir di Sabah, Malaysia pada 4 September 1982. Sejak 2006 penulis bergabung sebagai dosen di Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia, salah satu Universitas terakreditasi unggul di Kota Makassar. Penulis menempuh pendidikan tinggi mulai dari S-1 di Program Studi Ilmu Farmasi (2000-2004) dan Profesi Apoteker (2004-2005) di Universitas Hasanuddin, pascasarjana di Universitas Gadjah Mada (UGM) dengan Konsentrasi Penjaminan Kualitas Obat dan Makanan (2009-2011), dan meraih gelar Ph.D. dari Kanazawa University dalam bidang Pengembangan dan Pengujian Sediaan Radiofarmaka untuk diagnosa dan terapi kanker (2014-2017). Penulis menjabat sebagai asisten profesor di Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University, Japan (2018-2021). Penulis mendapatkan hibah penelitian baik nasional maupun internasional di antaranya Hibah Kakenhi dari Pemerintah Jepang skim *Grant-in-Aid for Early-Career Scientists* dan hibah PDKN-DRTPM sebagai *Principal Investigator* (PI). Beberapa karya tulis ilmiah penulis telah dimuat dalam berbagai jurnal internasional bereputasi maupun jurnal nasional terakreditasi SINTA. Jalin kerja sama dengan penulis via surel nurmaya82@gmail.com.

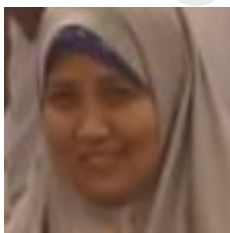


Aminah, S.Farm., M.Sc., lahir di Sorong, 27 Oktober 1987. Saat ini penulis tinggal di Moncongloe, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan. Pendidikan tinggi ditempuh mulai dari S-1 di Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia (UMI) Makassar (lulus 2009), pascasarjana di Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta dengan magister sains dan teknologi (lulus 2015). Aktivitas penulis saat ini selain mengajar pada jenjang sarjana di

Fakultas Farmasi UMI, juga aktif di pengurusan KAHMI Rayon UMI Periode 2022-2026, serta pengurus di MASIKA ICMI Provinsi Sulawesi Selatan periode 2022-2026. Jalin kerja sama dengan penulis via surel aminah.aminah@umi.ac.id.



Dr. rer.nat. Rien Ritawidya, S.Si., M.Farm., lahir di Jakarta, 29 Desember 1982. Sejak 2006 penulis bergabung sebagai salah satu peneliti aktif di BATAN, saat ini bernama Pusat Riset Teknologi Radioisotop, Radiofarmaka, dan Biodosimetri (PRTRRB-BRIN). Penulis menyelesaikan pendidikan S-1 di Jurusan Kimia (2005) di Universitas Indonesia, pascasarjana di Universitas yang sama di Fakultas Farmasi (2012), dan pendidikan doktoral penulis selesaikan di Universität Leipzig, Jerman (2020). Pengembangan radiofarmaka sebagai agen diagnosa dan terapi kanker adalah bidang yang digeluti penulis saat ini. Di tahun 2022, penulis dipercayakan sebagai salah satu penerima dana RIIM-BRIN-LPDP dan PDKN-DRTPM. Beberapa hasil penelitian penulis telah dipatenkan dan karya tulis ilmiah penulis telah dimuat dalam berbagai jurnal internasional bereputasi maupun jurnal nasional terakreditasi SINTA. Jalin kerja sama dengan penulis via surel rien001@brin.go.id.



apt. Faradiba, S.Si., M.Si., Ph.D., lahir di Makassar, 31 Juli 1976. Saat ini penulis tinggal di Makassar, Sulawesi Selatan. Pendidikan tinggi ditempuh mulai dari S-1 dan Apoteker serta Magister Farmasi di Universitas Hasanuddin dengan tahun kelulusan berturut-turut 1999, 2000, dan 2007. Penulis meraih gelar Ph.D di Universitas Kanazawa Jepang Bidang Farmasi Bahan alam (lulus 2017). Aktivitas penulis sebagai dosen aktif di bidang pengembangan dan isolasi senyawa bahan alam yang potensial dalam pengobatan. Saat ini menjabat sebagai Wakil

Dekan 1 (2022-2026) di Fakultas Farmasi UMI. Jalin kerja sama dengan penulis via surel faradiba.faradiba@umi.ac.id.



apt. Dewi Yuliana, S.Si., M.Farm., Ph.D., lahir di Watansoppeng, 27 Juli 1981. Saat ini penulis tinggal di Makassar, Sulawesi Selatan. Sebagai salah satu staf pengajar di Universitas Muslim Indonesia (2006-sekarang). Menempuh jenjang Pendidikan Studi Ilmu Farmasi (2000-2004) dan Profesi Apoteker (2004-2005) di Universitas Hasanuddin, pascasarjana di Universitas Airlangga (UNAIR) dengan Konsentrasi Biomedik (2009-2011), dan meraih gelar Ph.D. di dalam bidang *cancer medicine* di Laboratorium Molecular Cell Signaling Cancer Research Institute Kanazawa University (2014-2021). Penulis saat ini menjabat sebagai Ketua Program Studi S1 FF-UMI. Selain mengajar pada jenjang sarjana di Fakultas Farmasi dan program Pascasarjana Farmasi Universitas Muslim Indonesia (UMI), penulis juga aktif dalam melakukan kajian di bidang pemodelan molekul, dan kajian farmasi klinik. Jalin kerja sama dengan penulis via surel dewi.yuliana@umi.ac.id.

Sintesis Senyawa Osimertinib Teriodinasi Terkonjugasi Peptida (PDC) sebagai Kandidat Agen Terapi Kanker Paru Tipe NSCLC

Kanker paru sampai saat ini tetap menjadi penyebab kematian terbanyak bagi penderitanya bukan hanya di Indonesia bahkan di dunia berdasarkan data daya yang di-release Globocon 2020. Penyebab utama dari besarnya angka kematian akibat kanker paru adalah karena seringnya pasien terdeteksi pada stadium akhir di mana sel kanker sudah mengalami metastatis sehingga pengobatan menjadi kurang efektif dan efisien dan tentunya akan lebih kompleks. Hal lainnya adalah terbatasnya jenis terapi dan mahal biaya diagnosa biomarker dan pengobatan kanker paru utamanya di Indonesia.

Kami mengembangkan PDC (*peptide-drug conjugate*) yang uraian mendetail tentang sintesisnya dijabarkan dalam monograf ini. PDC terbukti dapat memperbaiki farmakokinetik dari senyawa sitotoksik (obat) dan meminimalkan efek sampingnya sehingga dapat menjadi sebagai agen terapi baru bagi penderita kanker paru. PDC saat ini sedang berkembang di dunia kesehatan terutama untuk tujuan diagnosa dan terapi penyakit, yang diadopsi dari ADC (*antibody-drug conjugate*) yang beberapa di antaranya telah mendapatkan *approval* dari FDA (*Food and Drug Administration*) sebagai lembaga resmi di Amerika Serikat. Dalam monograf ini kami menguraikan metode sintesis **cRGD-Osimertinib conjugate** sebagai bentuk PDC. Osimertinib sebagai *drug* generasi ketiga yang telah mendapatkan *approval* dari FDA sejak 2022 untuk mengobati kanker paru tipe NSCLC dan cRGD merupakan salah satu *homing peptide* yang dapat menjadi pembawa beberapa molekul obat maupun radionuklida dan sudah terbukti mampu terakumulasi di kanker sebagai organ target diagnosa maupun terapi. Buku ini tersaji dalam lima bab, yaitu pendahuluan (bab 1), diikuti tentang uraian kanker paru di bab 2, penjelasan tentang *peptide-drug conjugate* (PDC) terurai di bab 3, sedangkan metode sintesis Osimertinib teriodinasi, linker, dan cRGDfK dijelaskan secara terperinci di bab 4 termasuk hasil analisisnya dengan menggunakan ESI-MS dan H-NMR, dan terakhir bab 5 berisi kesimpulan.

Minimnya monograf ataupun buku ajar yang menjelaskan tentang metode sintesis senyawa kimia obat maupun non-obat yang ditulis oleh peneliti Indonesia mendorong kami menulis monograf ini. Sehingga dengan diterbitkannya monograf ini diharapkan dapat menjadi motivasi positif bagi mahasiswa maupun insan peneliti Indonesia dalam mengembangkan senyawa-senyawa kandidat agen diagnosa dan terapi penyakit dalam rangka membantu program pemerintah mewujudkan kemandirian industri obat dan alat kesehatan di Indonesia. Semoga monograf ini bermanfaat untuk kemaslahatan kita semua.