

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACJO

**Aleš Žula**

**OPTIMIZACIJA SINTEZE POTENCIALNIH 1,4-  
BENZOKSAZINSKIH MODULATORJEV  
VITRONEKTINSKEGA RECEPTORJA**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Eksperimentalni del diplomske naloge sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner-Dolenc. Spektroskopske meritve in elementne analize so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Ištitutu Jožef Štefan.

#### ZAHVALA

- Mentorici prof. dr. Mariji Sollner-Dolenc za strokovne nasvete in vzpodbudo.
- Vsem sodelavcem Katedre za farmacevtsko kemijo za pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela, še posebej somentorju Žigi Jakopinu in ge. Damijani Zalar.
- Očetu, mami, bratu ter Nini za podporo tekom celotnega študija.

#### IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner-Dolenc

Ljubljana, junij, 2009

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar  
Član diplomske komisije:izr. prof. dr. Odon Planinšek

## VSEBINA

<b>I. POVZETEK.....</b>	<b>iv</b>
<b>II. SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>v</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 INTEGRINI .....	1
1.1.1 Delitev in značilnosti integrinov .....	1
1.1.2 Struktura integrinov .....	3
1.1.3 Aktivacija integrinov .....	5
1.1.4 Vezava ligandov na integrin .....	7
1.1.5 Signaliziranje integrinov .....	8
1.1.6 Vitronektinski receptor .....	9
1.1.6.1 <i>Struktura vitronektinskega receptorja</i> .....	9
1.1.6.2 <i>Vezava ligandov na vitronektinski receptor</i> .....	10
1.1.6.3 <i>Vloga <math>\alpha_v\beta_3</math> in <math>\alpha_v\beta_5</math> v patofizioloških procesih</i> .....	11
1.2 ANTAGONISTI INTEGRINSKIH RECEPTORJEV .....	12
1.2.1 Antagonisti vitronektinskega receptorja $\alpha_v\beta_3$ .....	14
1.2.2 Enojni ali multipli antagonisti .....	16
<b>2. NAČRT ZA DELO.....</b>	<b>17</b>
2.1 REAKCIJSKE SCHEME .....	21
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>26</b>
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>28</b>
4.1 SINTEZA 7-NITRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-3(4H)-ONA (1).....	28
4.2 SINTEZA 4-[(7-NITRO-3-OKSO-2,3-DIHIDRO-4H-1,4-BENZOKSAZIN-4-IL)METIL]BENZONITRILA (2) .....	29
4.3 SINTEZA 4-[(7-AMINO-3-OKSO-2,3-DIHIDRO-4H-1,4-BENZOKSAZIN-4-IL)METIL]BENZONITRILA (3) .....	30
4.4 SINTEZA ETIL 2-FENIL 3-{[4-(4-CIANOENZIL)-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL]AMINO}-3-OKSOPROPANOATA (4) .....	31
4.5 SINTEZA ETIL 2-BENZIL-3-{[4-(4-CIANOENZIL)-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL]AMINO}-3-OKSOPROPANOATA (5) .....	32
4.6 SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[4-{(4-[AMINO(HIDROKSIIIMINO)METIL]BENZIL)-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOATA (6).....	33
4.7 SINTEZA ETIL 2-BENZIL-3-[4-{(4-[AMINO(HIDROKSIIIMINO)METIL]BENZIL)-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOATA (7).....	35
4.8 SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-({3-OKSO-4-[4-(5-OKSO-4,5-DIHIDRO-1,2,4-OXSADIAZOL-3-IL)BENZIL]-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO)-3-OKSOPROPANOATA (8) .....	36
4.9 SINTEZA ETIL 2-BENZIL-3-({3-OKSO-4-[4-(5-OKSO-4,5-DIHIDRO -1,2,4-OXSADIAZOL-3-IL)BENZIL]-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO)-3-OKSOPROPANOATA (9) .....	37
SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO]-3-OKSOPROPANOATA V OBLIKI ACETATA (10).....	39
4.11 SINTEZA ETIL 2-BENZIL-3-[4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO]-3-OKSOPROPANOATA V OBLIKI ACETATA (11).....	40

4.12	SINTEZA 2-FENIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2 <i>H</i> -1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOJSKA KISLINA V OBLIKI TRIFLUOROACETATA (12).....	41
4.13	SINTEZA 2-BENZIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2 <i>H</i> -1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOJSKA KISLINA V OBLIKI TRIFLUOROACETATA (13).....	43
4.14	SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[(4-{4-[N-(ETOKSIKARBONILOKSI)KARBAIMIDOIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2 <i>H</i> -1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOATA (15).....	44
4.15	SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-({3-OKSO-4-[4-(5-OKSO-4,5-DIHIDRO-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL)BENZIL]-3,4-DIHIDRO-2 <i>H</i> -1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO)-3-OKSO PROPANOATA (8).....	46
4.16	SINTEZA 2-FENIL-3-[3-OKSO-(4-{4-[5-OKSO-4,5-DIHIDRO-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}-3,4-DIHIDRO-2 <i>H</i> -1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOJSKA KISLINA (14).....	47
4.17	SINTEZA 2-FENIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2 <i>H</i> -1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOJSKA KISLINA V OBLIKI TRIFLUOROACETATA (12).....	48
4.18	SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[(4-{4-(5-METIL-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL)BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2 <i>H</i> -1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOATA (16).....	49
4.19	SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2 <i>H</i> -1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO]-3-OKSOPROPANOATA V OBLIKI ACETATA (10).....	51
<b>5.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>53</b>
5.1	OPTIMIZACIJA ŽE ZNANE SINTEZNE POTI SPOJINE 13 .....	53
5.1.1	Prva stopnja sinteze – sinteza benzoksazinskega obroča (spojina 1) .....	53
5.1.2	Druga stopnja sinteze – alkiliranje 2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-3(4 <i>H</i> )-onov (spojina 2).....	54
5.1.3	Tretja stopnja sinteze – redukcija nitro skupine (spojina 3).....	54
5.1.4	Četrta stopnja sinteze – tvorba amidne vezi (spojina 5).....	55
5.1.5	Peta stopnja sinteze – sinteza amidoksima (spojina 7).....	56
5.1.6	Šesta stopnja sinteze – sinteza 1,2,4,-oksadiazolin-5(4 <i>H</i> )-ona (spojina 9) .....	57
5.1.7	Sedma stopnja sinteze – sinteza amidinov (spojina 11) .....	58
5.1.8	Osma stopnja sinteze – hidroliza estra (spojina 13).....	58
5.2	REZULTATI IN RAZPRAVA ISKANJA OPTIMALNE SINTEZNE POTI SPOJINE 12 .....	60
5.2.1	1. Alternativa .....	60
5.2.1.1	Četrta stopnja sinteze – tvorba amida (spojina 4) .....	60
5.2.1.2	Peta stopnja sinteze – sinteza amidoksima .....	61
5.2.1.3	Šesta stopnja sinteze – sinteza 1,2,4-oksadiazolin-5(4 <i>H</i> )-ona (spojina 8).....	61
5.2.1.4	Sedma stopnja sinteze – sinteza amidina (spojina 10).....	62
5.2.1.5	Osma stopnja sinteze – hidroliza estra (spojina 12) .....	62
5.2.2	2. Alternativa .....	62
5.2.1.1	Šesta stopnja sinteze – sinteza 1,2,4-oksadiazolin-5(4 <i>H</i> )-ona (spojina 8).....	62
5.2.1.2	Sedma stopnja sinteze – hidroliza estra (spojina 14).....	63
5.2.1.3	Osma stopnja sinteze – sinteza amidinov z redukcijo 1,2,4-oksadiazol-5(4 <i>H</i> )-onov (spojina 12).....	63
5.2.3	3. Alternativa .....	64
5.2.3.1.	Šesta stopnja sinteze – sinteza 1,2,4-oksadiazola (spojina 16).....	65
5.2.3.2	Sedma stopnja sinteze - sinteza amidina z redukcijo 1,2,4-oksadiazolov (spojina 10) .....	65
5.2.3.3.	Poskus sinteze amidina pod pogoji Pinnerjeve sinteze (spojina 10).....	66
<b>6.</b>	<b>SKLEP.....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>68</b>

## I. POVZETEK

Integrinski receptorji sodelujejo pri nastanku mnogih bolezenskih stanj, kot so osteoporoza, srčno-žilna obolenja, patološka angiogeneza, rakava obolenja ter obolenja imunskega sistema. Najobetavnejši integrini na področju terapije in diagnostike rakavih obolenj in osteoporoze postajajo vitronektinski receptorji, ki vežejo različne fiziološke ligande z RGD (arginil-glicil-asparaginska kislina) -prepoznavno sekvenco. Modulatorji vitronektinskih receptorjev preprečujejo vezavo naravnega substrata vitronektina na receptor in s tem zaustavitev patoloških procesov. Pripravili smo dva potencialna modulatorja, ki vsebujeta vse potrebne fragmente za vezavo na vitronektinske receptorje. Spojina 2-benzil-3-[(4-{4-[amino(imino)metil]benzil}-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-7-il)amino]-3-oksopropanojska kislina v obliki trifluoroacetata (**13**) je v prvih presejalnih testih pokazala zelo dobre rezultate v smislu vezave na vitronektinske receptorje. Da bi v prihodnje izvedli še ostala biološka testiranja, smo optimizirali že znano sintezno pot. Na pripravljenem benzoksazinskem sintonu smo na mestu 4 uvedli 4-cianobenzilni fragment, na mestu 7 pa smo preko aminolize estra z uporabo mikrovalov tvorili amid z dietil 2-benzilmalonatom. Sledila je pretvorba ciano skupine v amidinsko funkcionalno skupino preko tvorbe 1,2,4-oksadiazolin-5(4*H*)-onskega obroča, kateri je sledila redukcija do amidina. V zadnji stopnji smo z alkalno hidrolizo pretvorili etilni ester v končno spojino. Na ta način smo pripravili spojino z boljšim celokupnim izkoristkom v primerjavi z že znano sintezno potjo. Spojina vsebuje v svoji strukturi dve hidrofilni skupini, zaradi česar je bilo čiščenje zelo težavno. Kot zelo dobra metoda se je izkazala kolonska kromatografija z uporabo reverzne stacionarne faze, s katero smo uspeli doseči ustrezno čistoto. Pripravili smo tudi spojino 2-fenil-3-[(4-{4-[amino(imino)metil]benzil}-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-7-il)amino]-3-oksopropanojsko kislino v obliki trifluoroacetata (**12**), ki je analog spojine **13**. Zaradi bolj toge strukture od spojine **13** domnevamo na višjo afiniteto do vitronektinskega receptorja. Kljub temu, da je spojina **12** analog spojine **13**, sinteze nismo mogli izvajati po enaki sintezni poti. Iz tega razloga smo iskali druge optimalne načine priprave. Sinteza amidinov pod pogoji Pinnerjeve sinteze ali z redukcijo 1,2,4-oksadiazolov se je glede čistote in izkoristka pokazala kot neustrezna. Spojino smo uspeli pripraviti tako, da smo na pripravljenem benzoksazinskem sintonu na mestu 4 uvedli 4-cianobenzilni fragment, na mestu 7 pa smo preko aminolize estra z uporabo mikrovalov tvorili amid z dietil 2-fenilmalonatom. Nato smo ciano skupino pretvorili v 1,2,4-oksadiazolin-5(4*H*)-onski obroč, sledila je odstranitev etilnega estra v malonatnem fragmentu z alkalno hidrolizo. V zadnji stopnji smo oksadiazolinonski obroč reducirali do amidinske funkcionalne skupine spojine **12**. Spojino smo uspešno čistili z uporabo Isolera One kromatografskega sistema do ustrezne čistote.

## II. SEZNAM OKRAJŠAV

<b>BTEAC</b>	benziltriethylamonijev klorid
<b>c(RGDfV)</b>	ciklo (arginil-glicil-aspartil-D-fenilalanil-valin)
<b>d</b>	dublet
<b>DCC</b>	dicikloheksilkarbodiimid
<b>DMF</b>	<i>N, N</i> -dimetilformamid
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	devteriran dimetil sulfoksid
<b>ECM</b>	zunajcelični matriks
<b>EDC</b>	<i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilkarbodiimid
<b>EI</b>	elektronska ionizacija
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i> = epidermalni rastni faktor
<b>EM</b>	elektronska mikroskopija
<b>FAB</b>	<i>fast atom bombardment</i> = obstreljevanje s hitrimi atomi
<b>FAK</b>	<i>focal adhesion kinase</i> : fokalna adhezijska kinaza
<b>FGF</b>	fibroblastni rastni faktor
<b>HOBT</b>	<i>N</i> -hidroksibenzotriazol
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography</i> = visokoločljivostna tekočinska kromatografija
<b>HRMS</b>	<i>high resolution mass spectrometry</i> = masna spektrometrija visoke ločljivosti
<b>HUVEC</b>	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> = humane endotelijske celice
<b>IC<sub>50</sub></b>	50 odstotna inhibitorna koncentracija
<b>IR</b>	infrardeča spektroskopija
<b>LIBS</b>	<i>ligand-induced binding sites</i> : z ligandom inducirana vezavna mesta
<b>m</b>	multiplet
<b>MIDAS</b>	<i>metal-ion dependent adhesion site</i> = vezavno mesto, kjer sodelujejo kovinski ioni
<b>MF</b>	mobilna faza
<b>MMP</b>	matriksne metaloproteinaze
<b>MS</b>	masna spektroskopija
<b>MW</b>	mikrovalovi
<b>NMR</b>	<i>nuclear magnetic resonance</i> : jedrska magnetna resonanca
<b>PSI</b>	pleksin-semaforin-integrin
<b>Py</b>	piridin
<b>q</b>	kvartet
<b>Raf, akt kinaze</b>	proteinske kinaze
<b>Rf</b>	retencijski faktor
<b>Rho-GTPaza</b>	družina G proteinov
<b>RGD</b>	arginil-glicil-asparaginska kislina
<b>rs</b>	razširjen singlet
<b>s</b>	singlet
<b>t</b>	triplet
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TLC</b>	<i>thin layer chromatography</i> = tankoplastna kromatografija
<b>TMS</b>	tetrametilsilan
<b>VCAM</b>	<i>vascular cell adhesion molecule</i> : žilna celična adhezijska molekula
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i> : žilni endotelijski rastni faktor
<b>Vn</b>	vitronektin
<b>vWF</b>	von Willebrandov faktor
<b><math>\alpha_{IIb}\beta_3</math></b>	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ , fibrinogenski receptor
<b><math>\alpha_v\beta_3</math></b>	Integrin $\alpha_v\beta_3$ , vitronektinski receptor

## 1. UVOD

Integrini so heterodimerni transmembranski glikoproteini, ki omogočajo vzpostavitev interakcij med celicami (celica-celica) in vzpostavitev interakcij celic z zunajceličnim matriksom (celica-zunajcelični matriks).<sup>[1]</sup> Zaradi pomembnega dejavnika v ohranjanju integritete celic in tkiv jih je R. O. Hynes leta 1986 imenoval *integrini*. Ker integrini sodelujejo v procesih, ki so regulirani z adhezijo (“adhesion-mediated processes”), kot so celična migracija, celična proliferacija in diferenciacija ter aktivacija celic imunskega sistema, so nujni za razvoj in homeostazo večceličnih organizmov.<sup>[2]</sup> Sodelujejo pri prevajanju signalov, ekspresiji genov, regulaciji apoptoze, progresiji, invaziji in metastaziranju tumorskih celic ter angiogenezi. Kljub obsežnim raziskavam na tem področju pa so njihove vloge v fizioloških in patoloških procesih le delno pojasnjene. Prav tako ni povsem razjasnjen mehanizem delovanja spojin z delovanjem na integrine, ki v eksperimentalnem okolju zaustavijo patološki proces, zato se uveljavlja poimenovanje “modulator” integrinov.<sup>[3]</sup> Integrini so zaradi kompleksnih interakcij med seboj z drugimi receptorji in z zunajceličnimi ter znotrajceličnimi proteini primerni za načrtovanje učinkovin z dvojnimi ali trojnimi delovanjem, saj pogosto v bolezenskem procesu sodeluje več integrinov, ki koordinirano vodijo patološke procese. Najobetavnejši med integrinskimi receptorji na področju terapije in diagnostike rakavih obolenj in osteoporoze postajajo vitronektinski receptorji, ki kot tarčne molekule vežejo različne ligande z RGD-prepoznavno sekvenco.<sup>[4,5]</sup>

### 1.1 INTEGRINI

#### 1.1.1 Delitev in značilnosti integrinov

Integrini so heterodimerni transmembranski glikoproteini, sestavljeni iz nekovalentno povezane  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenote. Znanih je 18  $\alpha$ - in 8  $\beta$ -podenot, ki skupaj tvorijo 24 različnih heterodimerov.<sup>[6]</sup> Razvrstimo jih lahko v različne poddružine glede na skupne lastnosti.

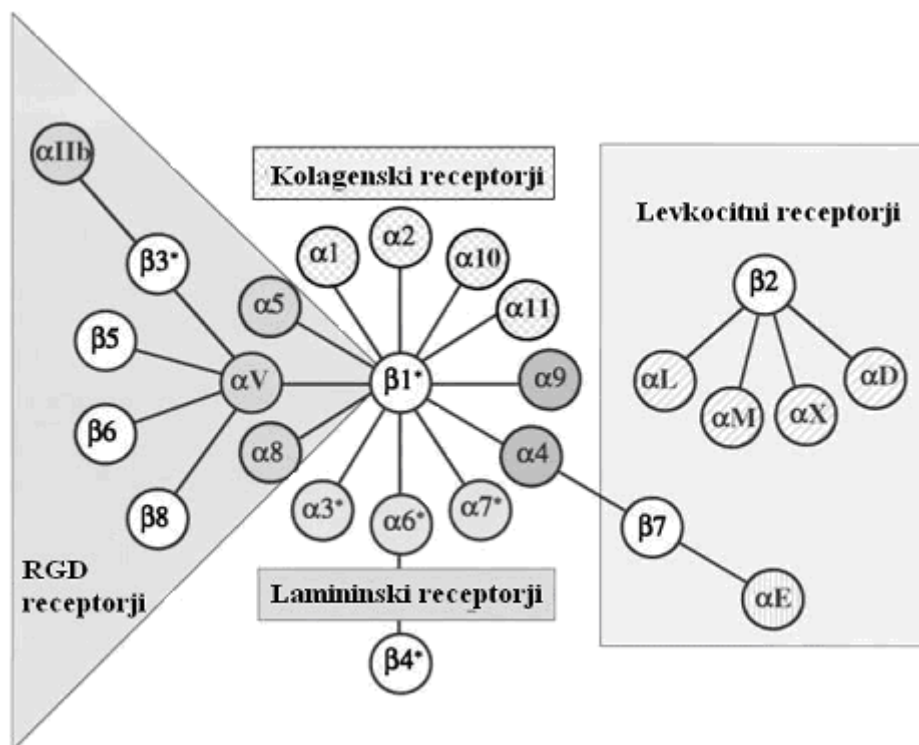
Glede na prisotnost I domene jih lahko razvrstimo v dve poddružini:<sup>[7]</sup>

- integrini, pri katerih  $\alpha$ -podenota vsebuje I domeno: podenote  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_D$ ,  $\alpha_E$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$  in  $\alpha_X$ ,
- integrini, ki I domene ne vsebujejo.

Integrine lahko razdelimo tudi glede na naravne ligande oz. vezavne sekvence na naslednje poddružine integrinov (slika 1):<sup>[6]</sup>

- nekateri vežejo laminin,
- drugi prepoznavajo Arg-Gly-Asp (RGD) zaporedje,
- tretji vežejo kolagen,

- četrti vežejo imunoglobulinsko (Ig) naddružino receptorjev na nasprotnih celicah in tako posredujejo heterotipsko povezovanje celic. Ker se izražajo na imunskih celicah, jim pravimo tudi levkocitni integrini.



Slika 1: Delitev integrinov glede na naravne ligande<sup>[1]</sup>

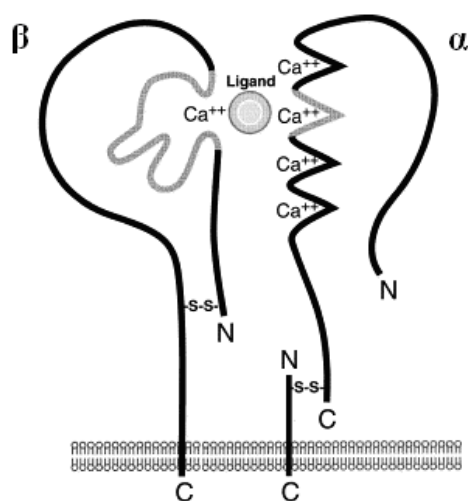
Preglednica I: Fiziološke in patofiziološke funkcije integrinov<sup>[2,8,9]</sup>

	FIZIOLOŠKE FUNKCIJE	PATOFIZIOLOŠKE FUNKCIJE
<b>β<sub>1</sub> INTEGRINI</b> α <sub>1</sub> β <sub>1</sub> , α <sub>2</sub> β <sub>1</sub> , α <sub>3</sub> β <sub>1</sub> , α <sub>4</sub> β <sub>1</sub> , α <sub>5</sub> β <sub>1</sub> , α <sub>6</sub> β <sub>1</sub> , α <sub>7</sub> β <sub>1</sub> , α <sub>8</sub> β <sub>1</sub> , α <sub>9</sub> β <sub>1</sub>	<b>ADHEZIJA CELIC</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> je receptor za vezavo trombocitov na kolagen</li> <li>▪ α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> receptor je prisoten v membrani fibroblastov, kjer regulira procese reorganizacije in obnove tkiv</li> <li>▪ α<sub>3</sub>β<sub>1</sub> inhibira migracijo keratinocitov</li> <li>▪ α<sub>4</sub>β<sub>1</sub> omogoča adhezijo limfocitov, eozinofilcev in monocitov</li> <li>▪ α<sub>5</sub>β<sub>1</sub> regulira procese adhezije raznih vrst celic</li> </ul> <b>REGULACIJA IMUNSKEGA SISTEMA:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ omogočajo adhezijo limfocitov T</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> je receptor za adhezijo celic nekaterih sarkomov na kolagen</li> <li>▪ α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> je receptor za adhezijo nekaterih patogenov</li> <li>▪ α<sub>3</sub>β<sub>1</sub> sodeluje pri akutni odpovedi ledvic</li> <li>▪ α<sub>2</sub>β<sub>1</sub>, α<sub>4</sub>β<sub>1</sub>, α<sub>5</sub>β<sub>1</sub> so prisotni v večjem obsegu na celicah raznih vrst tumorjev</li> <li>▪ α<sub>4</sub>β<sub>1</sub> omogoča adhezijo aktiviranih limfocitov T pri razvoju revmatoidnega artritisa, astme itd.</li> <li>▪ α<sub>5</sub>β<sub>1</sub> omogoča vezavo tumorskih celic na fibronektin v procesu migracije, invazije in metastaziranja tumorskih celic</li> </ul>
<b>β<sub>2</sub> INTEGRINI</b> α <sub>L</sub> β <sub>2</sub> , α <sub>M</sub> β <sub>2</sub> , α <sub>X</sub> β <sub>2</sub>	<b>REGULACIJA IMUNSKEGA SISTEMA</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ nahajajo se pretežno na levkocitih (omogočajo vezavo levkocitov na stene žil, migracijo skozi endotelij in vključevanje v imunske in inflamatorne procese), prav tako omogočajo adhezijo v procesih fagocitoze, uničenja bakterij in s celicami povzročene citotoksičnosti</li> </ul>	<b>KRONIČNE VNETNE BOLEZNI</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ α<sub>M</sub>β<sub>2</sub> vežejo ICAM na nasprotnih celicah in tako posredujejo povezovanje celic.</li> </ul>



<b><math>\beta_3</math> INTEGRINI</b>	$\alpha_{IIb}\beta_3$	<p><b>HEMOSTAZA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\alpha_{IIb}\beta_3</math> se nahaja na trombocitih in megakariocitih ter omogoča vezavo trombocitov na subendotelij ter agregacijo trombocitov v procesu hemostaze</li> </ul>	<p><b>TROMBOZE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nekontroliran proces nastanka krvnih strdkov vodi do tromboz, ki se klinično odražajo kot miokardni infarkt, možganska kap, nestabilna angina pectoris ipd.</li> </ul> <p><b>METASTAZIRANJE MELANOMOV</b></p>
	$\alpha_X\beta_3$	<p><b>REGULACIJA IMUNSKEGA SISTEMA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>sodeluje v adheziji, fagocitozi in kemotaksi ter omogoča oksidativni izbruh nevtrofilcev</li> </ul>	
<b><math>\alpha_V\beta_3</math></b>		<p><b>ADHEZIJA CELIC</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>je izražen le pri nekaterih celicah (osteoklasti, bistveno manj pogost je pri trombocitih, megakariocitih, nekaterih celicah gladke muskulature, endoteliju, ledvicah in placenti; njegova pojavnost poraste pri določenih patofizioloških stanjih)</li> </ul> <p><b>ANGIOGENEZA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\alpha_V\beta_3</math> je izražen na vaskularnih celicah v procesu angiogeneze in v procesih žilne remodelacije ter embriogeneze</li> <li>omogoča interakcijo žilnih endotelijskih celic z zunajceličnim matriksom pri tvorbi novega krvnega spleta po poškodbi žilnega sistema/žilna remodelacija in obnova tkiv po poškodbi</li> </ul>	<p><b>OSTEOPOROZA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Integrini so udeleženi v procesu resorpcije kosti, ki vodi v osteoporozo. Za resorpcijo kosti je pomembna interakcija osteoklasta s kostnim matriksom, ki se doseže z vezavo integrina <math>\alpha_V\beta_3</math> na kostni sialoprotein ali osteopontin in pa aktivacija osteoklasta, ki je regulirana z <math>\alpha_V\beta_3</math>.</li> </ul> <p><b>TUMORSKO METASTAZIRANJE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\alpha_V\beta_3</math> receptor stimulira produkcijo kolagenaze, ki razdeli ECM in omogoča invazijo tumorjev</li> <li>regulira proces angiogeneze in s tem tvorbo spleta krvnih žil (neovaskularizacijo), ki omogočajo prehranjevanje tumorskih celic in omogočajo nadaljnje metastaziranje</li> </ul> <p><b>ARTRITIS</b> <b>DIABETIČNA RETINOPATIJA</b></p>
	<b>OSTALI</b> $\alpha_6\beta_4$ , $\alpha_V\beta_5$ , $\alpha_V\beta_6$ , $\alpha_V\beta_7$ , $\alpha_4\beta_7$ , $\alpha_V\beta_8$	Natančna fiziološka ali patofiziološka funkcija teh integrinov še ni povsem znana, povezuje pa se s pojavnostjo in porazdelitvijo teh integrinov na določenih vrstah celic.	

### 1.1.2 Struktura integrinov



Integrini so sestavljeni iz nekovalentno povezanih  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenot. Vsaka podenota sestoji iz večje ekstracelularne domene, transmembranske domene in krajše citoplazemske domene.<sup>[10]</sup> Vsaka struktura integrina sestoji iz globularne "glave" in dveh "nog", ki prebadata celično membrano (slika 2). C-Terminalna dela obeh podenot ( $\alpha$  in  $\beta$ ) tvorita citoplazemski del, ki predstavlja mesto za signalizacijo preko membrane. Ta del omogoča povezavo receptorja s citoskeletom, citoplazemskimi proteini (aktin, miozin,  $\alpha$ -aktinin, talin in skemelin) in transmembranskimi črpalkami.<sup>[7,9-12]</sup>

Slika 2: Splošna struktura integrina<sup>[2]</sup>

### ***$\alpha$ -podenota***

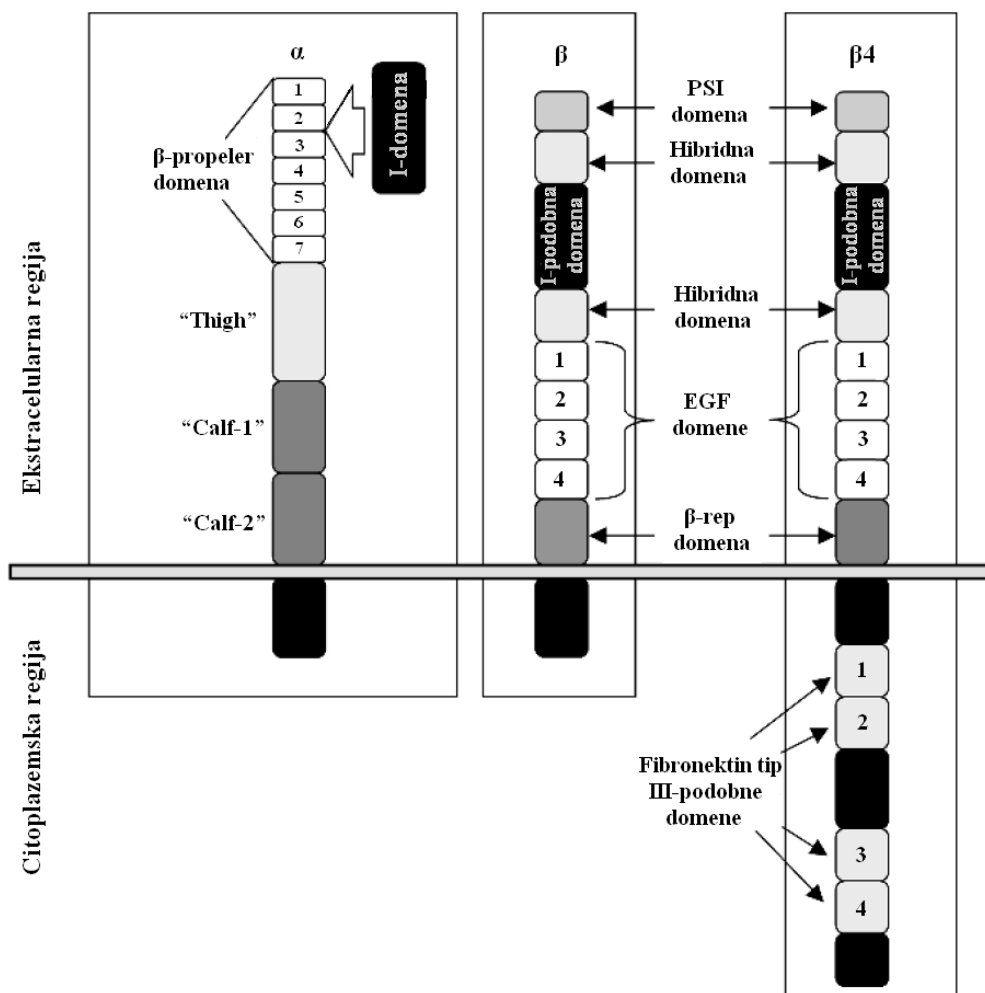
Sestavljena je iz približno 1000 aminokislin, pogosto iz dveh verig različnih dolžin (t.i. lahka in težka veriga), ki sta med seboj povezani z disulfidnimi vezmi. Večina  $\alpha$ -podenote je zunajcelična, s kratko transmembransko domeno (20 – 30 aminokislin) in kratko intracelularno domeno (20 – 50 aminokislin). Zunajcelični (N-terminalni) del  $\alpha$ -podenote je pri večini integrinov sestavljen iz sedmih segmentov po 60 aminokislin v obliki zavrtih ponovitev ( $\beta$ -propeler domena), ki veže večvalentne katione ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) in sodeluje pri funkcionalnosti cele podenote.  $\beta$ -Propeler domena je preko "Thigh", "Calf 1" in "Calf 2" domen vezana na kratko transmembransko domeno. Med "Thigh" in "Calf 1" domeno je visoko upogljiva kolenska regija. Približno polovica  $\alpha$ -podenot vsebuje v globularni glavi t.i. I-domeno ali  $\alpha$ A-domeno iz 200 aminokislin, ki se nahaja med drugo in tretjo zanko  $\beta$ -propeler domene. I-Domena ali  $\alpha$ A domena je največje ligand vezavno mesto. Kristalna struktura domene A ( $\alpha$ A) vsebuje od kovinskih ionov odvisna vezavna mesta oz. mesta MIDAS ("metal ion dependent adhesion site"). V primeru odsotnosti te podenote je za vezavo liganda odgovorna  $\beta$ -propeler domena. Znotrajcelično domeno  $\alpha$ -podenote (C-terminalni del) sestavlja okoli 30 aminokislin. C-Terminalna regija  $\beta$ -propelerske domene obsega tudi velik del ekstracelularne domene iz približno 500 aminokislin, ki pripadajo  $\alpha$ -podenoti.<sup>[7,9-12]</sup>

### ***$\beta$ -podenota***

Sestavlja jo približno 700 aminokislin z izjemo  $\beta_4$ -podenote, ki je precej daljša zaradi daljšega intracelularnega dela (1000 aminokislin), ki vsebuje štiri fibronektin tip III-podobne ponovitve.  $\beta$ -Veriga ima obročno medveržno disulfidno povezavo. N-Terminalni del  $\beta$ -podenote vsebuje s cisteinom bogato regijo, imenovano domena PSI (pleksin-semaforin-integrin). Pomembna je pri vzdrževanju neaktivne konformacije integrina. Vse  $\beta$ -podenote vsebujejo razvojno zelo ohranjeno I-domeni podobno domeno ali  $\beta$ A-domeno iz približno 200 AK, ki tako kot  $\alpha$ A-domena tvori del vezavnega mesta za ligand. Nad in pod I-domeni podobno domeno sta imunoglobulinska zavoja imenovana hibridna domena. Ključni del  $\beta$ A-domene je mesto MIDAS s specifičnim sekvenčnim motivom DXSXS (Asp-X-Ser-X-Ser), katerega sekundarna struktura je podobna I-domeni in veže dvovalentne katione. Kationi so v neveznem stanju integrina povezani s funkcionalnimi skupinami aminokislinskih ostankov Asp, Glu in Ser. V neveznem stanju integrina je prisotna tudi molekula vode, ki jo med vezavo nadomesti ligand s karboksilno skupino vsebujočimi AK-ostanki ali Glu ostanek receptorja. Med hibridno domeno, prvima dvema EGF-ponovitvama (kjer se nahajajo vezavna mesta za  $\text{Ca}^{2+}$  ione) in domeno PSI je upogljiva kolenska regija, ki se lahko zasuče vse do  $135^\circ$ , in je pomembna za tvorbo upognjene konformacije integrinov. Vse  $\beta$ -podenote vsebujejo tudi  $\beta$ -rep domeno, ki igra pomembno vlogo pri regulaciji aktivnosti integrina.<sup>[7,9-12]</sup>

## Glava

Tvorita jo EF-domena  $\alpha$ -podenote in N-terminalna regija  $\beta$ -podenote. Glavna funkcija glave je vezava liganda. Žep, v katerega se veže ligand, je na mestu združitve  $\beta$ -propelerja in  $\beta$ A-domene na integrinski glavi (slika 3).<sup>[7,10]</sup>

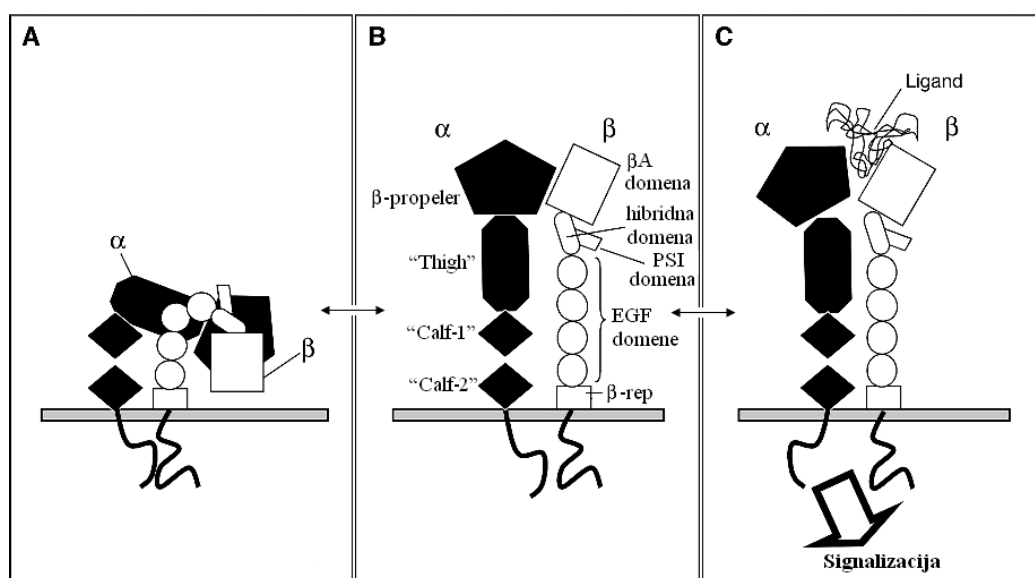


Slika 3: Organizacija domen znotraj primarne strukture integrina<sup>[10]</sup>

### 1.1.3 Aktivacija integrinov

Z EM so izvedli več eksperimentov in dokazali, da so integrini v več različnih stanjih, ki se razlikujejo po afiniteti do naravnih ligandov in RGD peptidov. Nahajajo se lahko v neaktivni konformaciji (stanje nizke afinitete do liganda) ali v aktivni konformaciji (stanje visoke afinitete do liganda).<sup>[10]</sup> Aktivacija je lahko posledica znotrajceličnih signalov ali pa vezave RGD ligandov (proteinov, peptidov, mimetikov) oz.  $Mn^{2+}$ . Nekateri integrini so lahko prisotni na površini celic v že aktivirani konformaciji. Zaradi te lastnosti integrini vežejo svoje ligande le takrat, ko je to potrebno oz. kadar iz notranjosti celice dobijo primeren signal.<sup>[1,13,14]</sup> Integrini naj bi bili sposobni vezave ligandov tako v upognjeni kot

tudi v iztegnjeni obliki, pri čemer pa igra pomembno vlogo razporeditev obeh koncev  $\alpha$ -in  $\beta$ -podenot, ki tvorita "glavo" integrina. Glava je lahko odprta in tako dovzetna za vezavo ligandov, lahko pa je zaprta, kar povzroči upad afinitete do liganda. V neaktivnem stanju je glava integrina preko kolenske regije zvrta k repu, zaradi tega je zakrito vezavno mesto in s tem onemogočena vezava liganda (t.i. upognjena konformacija z nizko afiniteto do liganda), citoplazemski domeni pa sta tesno skupaj. V tem stanju se lahko na integrine vežejo majhne molekule z RGD-vsebujočim zaporedjem. Aktivacija integrinskega receptorja povzroči spremembo konformacije, pri čemer se ekstracelularni domeni podaljšata in zravnata, citoplazemski domeni pa se oddaljita. V visoko aktivnem stanju je glava integrina odprta in omogoča vezavo ligandov (t.i. iztegnjena konformacija z visoko afiniteto do liganda).<sup>[1,3,10]</sup> Na citoplazemski domeni, ki sta ločeni, se vežejo regulatorni proteini, kar privede do znotrajceličnega signaliziranja (slika 4).

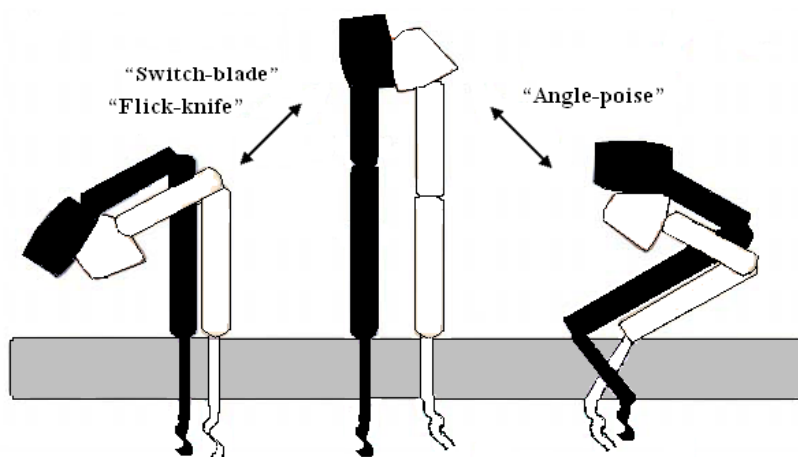


Slika 4: Konformacijske spremembe med aktivacijo integrina.<sup>[10]</sup> stanje nizke afinitete do liganda, upognjena konformacija (A), stanje srednje afinitete do liganda (B), stanje visoke afinitete do liganda, iztegnjena konformacija (C).

Za aktivacijo integrinov, kjer prehaja upognjena konformacija integrina v iztegnjeno, sta predlagana dva mehanizma (slika 5):

- "Switch-blade" oz. "Flick-knife",
- "Angle-poise".

"Switch-blade" oz. "Flick-knife" se od "Angle-poise" mehanizma aktivacije razlikuje v načinu vezave C-terminalnega dela podenot s transmembranskimi segmenti, kar je še nepojasnjeno. Pri "Angle-poise" mehanizmu lahko transmembranska domena spremeni orientacijo oz. se premakne v ali izven membrane. Ta mehanizem naj bi omogočal postavitev vezavnega mesta v ugodnejši položaj za vezavo makromolekulskih ligandov.<sup>[1]</sup>



Slika 5: “Switch-blade” in “Angle-poise” mehanizma aktivacije<sup>[1]</sup>

#### 1.1.4 Vezava ligandov na integrin

Vsaka nekovalentna povezava  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenot tvori edinstven heterodimer s selektivnostjo za proteine ECM, plazemske proteine, receptorje (npr. E-kadherin), encime (npr. matriksne metaloproteinaze, MMP) in sestavine mikroorganizmov (npr. HIV Tat protein). K selektivnosti prispevajo tudi dvovalentni kationi, prisotni v strukturi integrina. Znano je, da je  $\beta$ -citoplazemska domena potrebna za signaliziranje integrinov in odgovorna za žariščno povezavo receptorjev,  $\alpha$ -citoplazemska domena pa je pomembna za regulacijo specifičnosti interakcije z ligandi.<sup>[15]</sup> Nekateri integrini lahko interagirajo samo s specifično tarčno molekulo, drugi pa lahko prepoznavajo več ligandov (kot je  $\alpha_V\beta_3$ ) (preglednica II). Različne kombinacije integrin-ligand sprožijo različne učinke. Nekateri integrini lahko vežejo receptorje na površini celic in tako sprožijo interakcijo med celicami (npr.  $\alpha_4\beta_1$  veže VCAM-1 na sosednjih celicah).<sup>[10]</sup>

Ligandi se vežejo na integrinsko glavo, v žep, ki ga tvorijo nepovezana področja N-terminalnih delov obeh podenot. Ligand-vezavna mesta so  $\beta$ -propeler  $\alpha$ -podenote, I-domena  $\alpha$ - in  $\beta$ -verige in  $\beta$ A-domena  $\beta$ -podenote pri integrinih, ki ne vsebujejo I-domene. Poznamo pa tudi alosterična vezavna mesta, kot so: N-terminalni del PSI-domene, hibridna domena in EGF-ponovitve.<sup>[3,16]</sup> Integrini specifično prepoznavajo in vežejo ligande preko kratkih aminokislinskih zaporedij, med katera uvrščamo tudi tripeptidno zaporedje RGD (arginil-glicil-asparaginska kislina).<sup>[4]</sup>

Preglednica II: *Naravni ligandi integrinov; vitronektinski receptorji so označeni odebeljeno*<sup>[8,10]</sup>

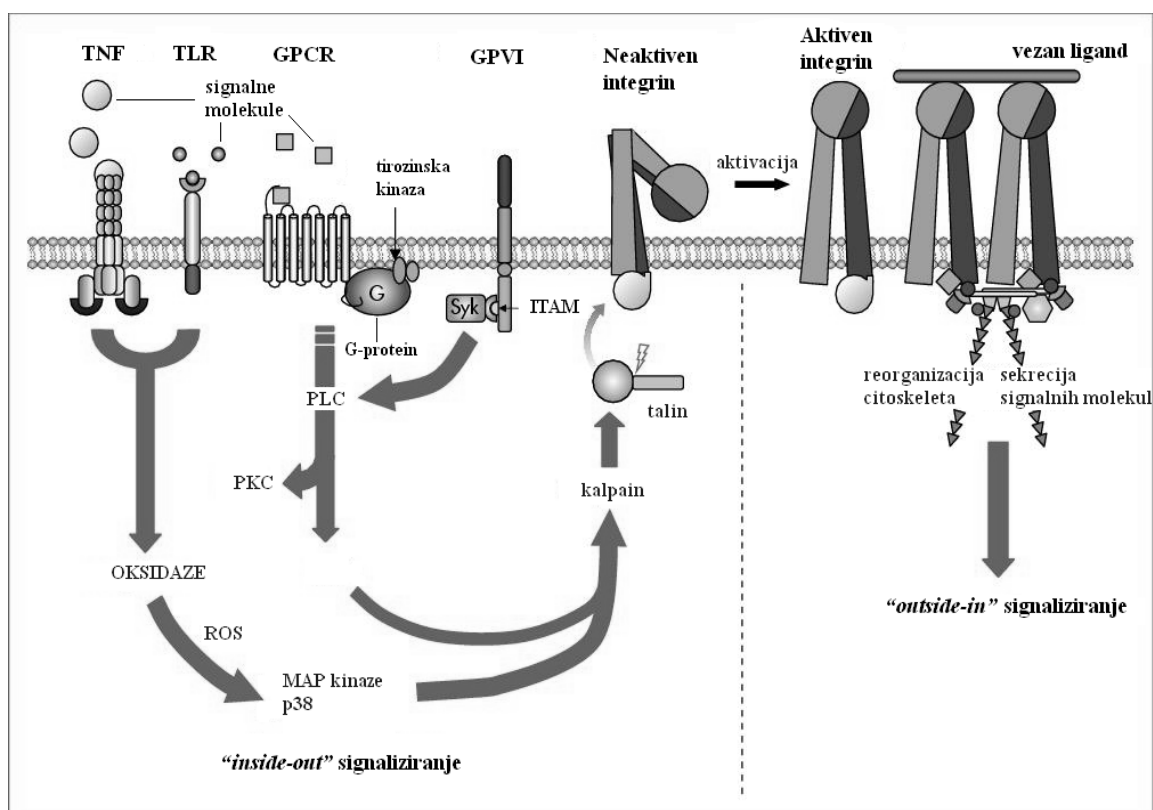
Ligand	Integrin	Ligand	Integrin
Adenovirusna kapsida	$\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$	Fibrinogen	$\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_{IIb}\beta_3$ , $\alpha_5\beta_1$ , $\alpha_M\beta_2$
Kostni sialoprotein	$\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$	HIV Tat protein	$\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$
<i>Borrelia burgdorferi</i>	$\alpha_{IIb}\beta_3$	ICAM-1	$\alpha_M\beta_2$ , $\alpha_L\beta_2$
<i>Candida albicans</i>	$\alpha_M\beta_2$	Invazin	$\alpha_3\beta_1$ , $\alpha_4\beta_1$ , $\alpha_5\beta_1$ , $\alpha_6\beta_1$ ,
Kolageni	$\alpha_{IIb}\beta_3$ , $\alpha_1\beta_1$ , $\alpha_2\beta_1$ , $\alpha_{11}\beta_1$	Laminin	$\alpha_1\beta_1$ , $\alpha_2\beta_1$ , $\alpha_6\beta_1$ , $\alpha_7\beta_1$ , $\alpha_6\beta_4$ , $\alpha_v\beta_3$
Denaturiran kolagen	$\alpha_{IIb}\beta_3$ , $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_5\beta_1$	MMP-2	$\alpha_v\beta_3$
Citotaktin/tenascin-C	$\alpha_v\beta_3$	Osteopontin	$\alpha_v\beta_3$
Dezintegrini	$\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_{IIb}\beta_3$	Plazminogen	$\alpha_{IIb}\beta_3$
E kaderin	$\alpha_E\beta_7$	Protrombin	$\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_{IIb}\beta_3$
Echovirus 1	$\alpha_2\beta_1$	Trombospondin	$\alpha_3\beta_1$ , $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,
Epiligrin	$\alpha_3\beta_1$	VCAM-1	$\alpha_4\beta_1$ , $\alpha_4\beta_7$
Faktor X	$\alpha_M\beta_2$	Vitronektin	$\alpha_v\beta_1$ , $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$ , $\alpha_{IIb}\beta_3$
Fibronektin	$\alpha_2\beta_1$ , $\alpha_3\beta_1$ , $\alpha_4\beta_1$ , $\alpha_5\beta_1$ , $\alpha_4\beta_7$ , $\alpha_8\beta_1$ , $\alpha_v\beta_1$ , $\alpha_5\beta_1$ , $\alpha_{IIb}\beta_3$ , $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$ , $\alpha_v\beta_6$	von Willebrandov faktor	$\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_{IIb}\beta_3$

### 1.1.5 Signaliziranje integrinov

Za vezavo vitronektina na  $\alpha_v\beta_3$  receptor in potek procesov, ki jih omogoča, je potrebna predhodna aktivacija  $\alpha_v\beta_3$  receptorja ("inside-out" signalizacija). **Signalizacija iz celice** ("*inside-out*" **signalizacija**) omogoča regulacijo konformacije  $\alpha_v\beta_3$  receptorja in modulacijo njegove afinitete za vezavo ligandov. Aktivacijo  $\alpha_v\beta_3$  receptorja povzroči stimulacija z raznimi agonisti, kot so fibronektin, fibrinogen, osteopontin ali trombospondin z raznimi imunskimi kompleksi. Receptorji za navedene agoniste posredujejo signal preko heterotrimernih G-proteinov ali z aktivacijo tirozinskih kinaz. Gre za kompleksne biokemijske signalne poti, ki tudi danes še niso povsem raziskane. Velja, da za različne agoniste obstajajo različne signalne poti za aktivacijo. Pri določenih poteh aktivacije se signal prenaša s fosforilacijo z raznimi fosfolipazami; postavljene pa so bile tudi hipoteze o aktivaciji citoplazemskih domen receptorja, najverjetneje z reorganizacijo

cytoskeletnih strukturnih proteinov (talin). Tako se sproži kaskada kompleksnih internih celičnih signalov (slika 6). Nastale signalne molekule spremenijo konformacijo  $\alpha_v\beta_3$  receptorja v visoko afinitetno konformacijo za ligand. Ker lahko pride tudi do deaktivacije receptorja, je tovrstno signaliziranje pomembno za zaščito gostitelja pred patološko adhezijo; deaktiviran receptor onemogoči vezavo patogena.<sup>[1,6,8,10,13,17]</sup>

Začetek fiziološkega učinka po predhodni aktivaciji vitronektinskega receptorja omogoča prenašanje signalov iz zunanosti celice – ECM v notranjost (“outside-in” signalizacija). **Signalizacija v celico** (“*outside-in*” signalizacija), kjer ob vezavi liganda (vitronektin) na aktiviran vitronektinski receptor pride do dodatne konformacijske spremembe receptorja, ki izpostavi nova vezavna mesta (LIBS-“ligand-induced binding site”) na ekstracelularni domeni receptorja. Po tej poti zunajcelični signali aktivirajo znotrajcelične poti. Z aktivacijo protein kinaz, vezanih na citoskeletne proteine ali direktno na integrine, proteinskih ali lipidnih fosfataz ali heterotrimernih G-proteinov se tvorijo razni sekundarni prenašalci, ki izražajo različne efekte. Rezultat je pospešena sekrecija mediatorjev, reorganizacija citoskeleta in združevanje  $\alpha_v\beta_3$  receptorjev, kar se odraža v indukciji angiogeneze (slika 6).<sup>[1,6,8,10,13,17]</sup>



Slika 6: “Inside-out” in “outside-in” signalizacija<sup>[18]</sup>

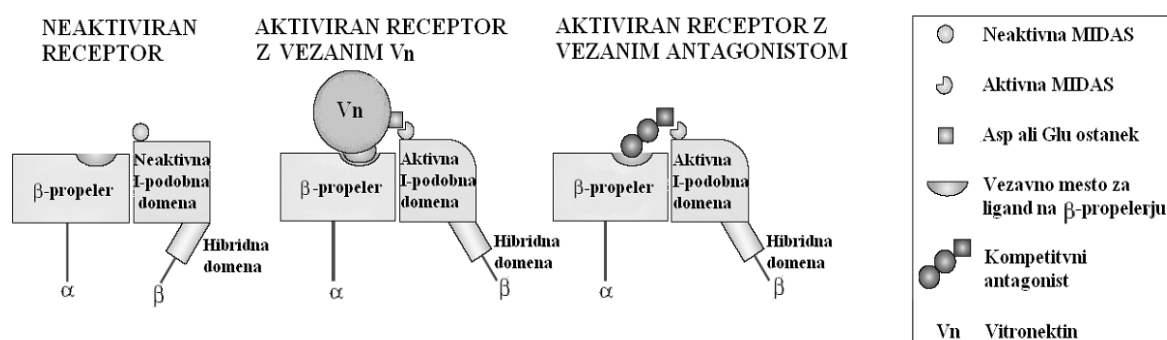
### 1.1.6 Vitronektinski receptor

### 1.1.6.1 Struktura vitronektinskega receptorja

Najbolje poznana vitronektinska receptorja sta  $\alpha_V\beta_3$  in  $\alpha_V\beta_5$ , ki sta udeležena v vrsti obolenj. Tako kot ostali integrini, je tudi vitronektinski receptor heterodimerni transmembranski glikoprotein.  $\alpha_V$ -Podenota je lahko nekovalentno povezana z različnimi  $\beta$ -podenotami ( $\beta_1, \beta_3, \beta_5, \beta_6, \beta_8$ ). Leta 2001 je bila objavljena prva kristalna struktura zunajceličnega segmenta integrina  $\alpha_V\beta_3$  v prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$ , z ločljivostjo 3.1 Å,<sup>[19]</sup> nato pa še zunajceličnega segmenta  $\alpha_V\beta_3$  v kompleksu s ciklo (Arg-Gly-Asp-{D-Phe}-{N-metil}-Val-) (ciklo(RGDf=N{Me}V)).<sup>[20]</sup> N-Terminalni segmenti  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenote tvorijo ovalno "glavo", ki se nadaljuje v dve "nogi". Glava je sestavljena iz  $\beta$ -propelerja  $\alpha_V$ -podenote in  $\beta A$ -domene  $\beta_3$ -podenote.  $\alpha_V$  noga je sestavljena iz treh  $\beta$ -sendvič domen "Thigh", "Calf-1" in "Calf-2", medtem ko je  $\beta_3$  noga sestavljena iz PSI-domene, štirih domen EGF in domene  $\beta$  noge (sliki 2,3).<sup>[19,20,21]</sup>

### 1.1.6.2 Vezava ligandov na vitronektinski receptor

Integrina  $\alpha_V\beta_3$  in  $\alpha_V\beta_5$  poleg vitronektina prepoznavata in vežeta še druge glikoproteine (preglednica II). Vezava ligandov temelji na prepoznavni sekvenci RGD.<sup>[22]</sup> Nedavno določena struktura kompleksa integrina  $\alpha_V\beta_3$  s cikličnim peptidom, ki vsebuje RGD sekvenco, kaže vezavo na  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenoto oziroma na mesto stika  $\beta$ -propelerja in "I-podobne" domene. Karboksilna skupina stranske verige aspartata RGD se koordinira s kovinskim ionom MIDAS "I-podobne" domene (Asp  $\beta_3$ ), gvanidinska skupina arginina pa tvori ionske interakcije z Asp ostanki iz zank  $\beta$ -propelerja (Arg  $\alpha_V$ ). Glicin RGD sekvence ne vzpostavi pomembnejših interakcij in ima pretežno vlogo distančnika.<sup>[4,20,23]</sup> Prisotnost dvovalentnih kationov pomembno vpliva na vezavo ligandov. Vitronektin se veže na  $\alpha_V\beta_3$  v prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  ali  $\text{Mn}^{2+}$ , medtem ko se osteopontin veže na  $\alpha_V\beta_3$  v prisotnosti  $\text{Mn}^{2+}$ , ne pa tudi v prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>[8,24]</sup>

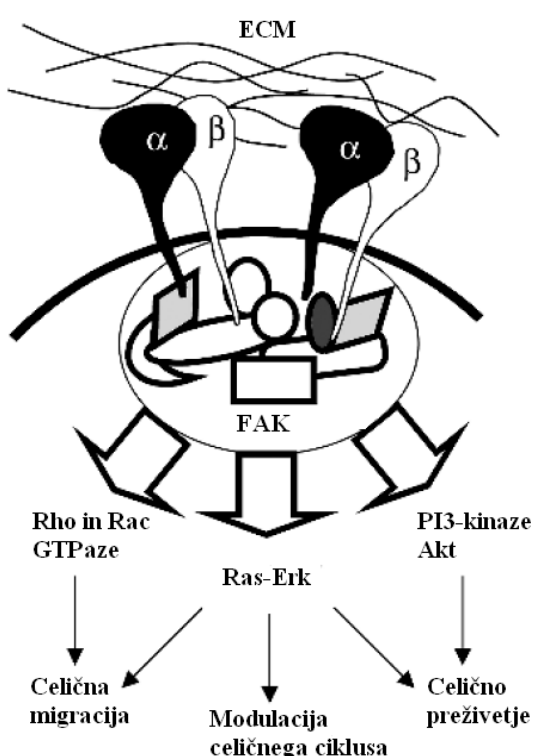


Slika 7: Shematski prikaz vezave ligandov na I-podobno domeno in  $\beta$ -propeler domeno vitronektinskega receptorja<sup>[7]</sup>



### 1.1.6.3 Vloga $\alpha_v\beta_3$ in $\alpha_v\beta_5$ v patofizioloških procesih

$\alpha_v\beta_3$  receptor ima pomembno vlogo v fiziološkem procesu angiogeneze, remodelaciji kosti in fagocitozi celic v procesu apoptoze.<sup>[10,17]</sup> V patoloških procesih je receptor udeležen v razvoju artritisa, osteoporoze, akutni odpovedi ledvic ter omogoča metastaziranje in rasti tumorjev (preglednica I). Nahaja se na več različnih tipih celic: osteoklastih, trombocitih, aktiviranih levkocitih, makrofagih, endotelijskih celicah, intestinalnih, žilnih in uterinih gladkomišičnih celicah, ledvicah in placenti.  $\alpha_v\beta_5$



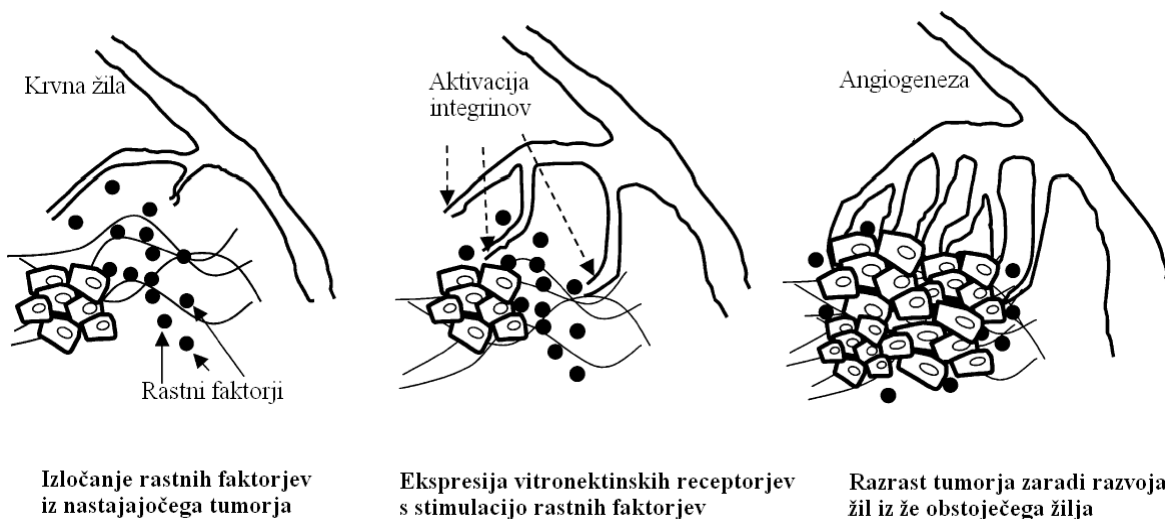
receptorje pa najdemo na osteoklastih in astrocitih. V splošnem je ekspresija  $\alpha_v\beta_3$  receptorja na večini celičnih tipov nizka, povečana pa je v transformirajočih in rastočih tkivih. Zaradi tega sodeluje pri celični adheziji, proliferaciji, migraciji in rasti celic.<sup>[5,10,13]</sup> Po vezavi vitronektina na aktiviran receptor lahko te procese povzroči signaliziranje zaradi fosforilacije FAK ("outside-in" signalizacija) (slika 8). Celično migracijo receptor stimulira z aktivacijo Rho in Rac GTPaze, z vezavo aktinskih filamentov na membrano in z Ras-Erk potjo. Preko Ras-Erk poti se tudi modulira celični cikel. Signaliziranje  $\alpha_v\beta_3$  receptorja omogoča preživetje celic z aktivacijo Akt- in Raf-signalnih kaskad, ki lahko blokirajo apoptozo.<sup>[10,25]</sup>

Slika 8: "Outside-in" signalizacija  $\alpha_v\beta_3$  receptorja<sup>[10]</sup>

Vitronektinski receptorji so tudi sposobni sodelovati z receptorji rastnih faktorjev pri regulaciji celičnih procesov. Ko so receptorji združeni in aktivirani z ECM-proteini, ojačajo delovanje rastnih faktorjev. Takšen sinergistični učinek med vitronektinskimi receptorji in receptorji rastnih faktorjev je pomemben za progresijo celičnega cikla in migracijo celic. Tako ekspresija rastnih faktorjev in njihovih receptorjev stimulira rast in razmnoževanje celic tumorja in aktivira vitronektinske receptorje, ti pa povečajo adhezijo in migracijo celic.<sup>[5,6,17]</sup> Fibroblastni rastni faktor (FGF) in dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$

(TNF- $\alpha$ ) vplivata na aktivacijo  $\alpha_v\beta_3$  receptorja, žilni endotelijski rastni faktor (VEGF) in transformirajoči rastni faktor (TGF) pa na aktivacijo  $\alpha_v\beta_5$  receptorja. Ti rastni faktorji povečajo ekspresijo integrinov na endotelijskih celicah in s tem stimulirajo proces angiogeneze in posledično razrast tumorjev.<sup>[10]</sup> Angiogeneza je proces razvoja žil iz že obstoječega žilja, zaradi česar je tumor dobro prekrvavljen (slika 9).<sup>[10,25]</sup>

Vitronektinski receptorji sodelujejo pri rakavih obolenjih, pri katerih je značilno, da celična rast ni regulirana s signali iz okolja, celice pa imajo sposobnost invazije in metastaziranja. Invazivnost je sposobnost vdiranja malignih celic v okolno tkivo. Celice sproščajo proteaze, ki kolagen delno razgradijo in tako razkrijejo zakrita RGD mesta, na katera se celice vežejo preko  $\alpha_v\beta_3$  integrinov. Vezava  $\alpha_v\beta_3$  poveča invazivnost malignih celic, poveča se sproščanje proteaz, prav tako se poveča ekspresija in izločanje MMP-2, ki sodeluje pri invaziji tumorskih celic v okolna tkiva. Vezava  $\alpha_v\beta_3$  pomeni tudi signal za preživetje, ki ščiti celice pred apoptozo, vendar je to pomembno predvsem na mestih slabše prekrvavljenosti tumorja, saj podoben signal za preživetje posredujejo tudi proteini seruma in inzulin.<sup>[3,25]</sup> Nevezan  $\alpha_v\beta_3$  povzroči aktivacijo kaspaze-8, ki povzroči z integrin-povzročeno celično smrt (IMD).<sup>[13]</sup> Vitronektinski receptorji so pogosto prisotni na tumorskih celicah (dojk in prostate) in sodelujejo v različnih fazah metastaziranja tumorjev: omogočajo odtrganje tumorske celice od primarnega tumorja, migracijo v žilni ali limfatični sistem, adhezijo na distalnem mestu v žilnem sistemu, prehod skozi žilno steno in adhezijo na tarčnem tkivu, invazijo v tarčno tkivo s stimulacijo kolagenaze ter razraščanje tumorja s stimulacijo angiogeneze.<sup>[8,13]</sup>



Slika 9: Vitronektinski receptorji regulirajo razrast tumorja in angiogenezo<sup>[10]</sup>

## 1.2 ANTAGONISTI INTEGRINSKIH RECEPTORJEV

Razvoj antagonistov integrinskih receptorjev temelji v glavnem na RGD (Arg-Gly-Asp) vezavni sekvenci s katero se na receptor vežejo naravni ligandi. Na integrinske receptorje

se vežejo tudi dezintegrini, ki so pogosto uporabljeni kot spojine vodnice pri načrtovanju antagonistov integrinskih receptorjev. Dezintegrini so polipeptidi, dolgi 41 do 83 aminokislin, ki jih vsebujejo nekateri živalski strupi. Ime so dobili zaradi sposobnosti vezave in zelo učinkovite inhibicije integrinskih receptorjev.<sup>[26]</sup> Antagoniste lahko razdelimo na monoklonska protitelesa, ciklične peptide in nepeptidne antagoniste.

Preglednica III: *Antagonisti  $\alpha_{IIb}\beta_3$  receptorja, ki se že uporabljajo v terapijah in trenutno potekajoča klinična testiranja učinkovin z delovanjem na integrine  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_5$  in  $\alpha_5\beta_1$* <sup>[10]</sup>

Ime učinkovine	Tip učinkovine	Tarča	Bolezen	Status
Abciximab (ReoPro <sup>R</sup> )	monoklonsko protitelo	$\alpha_{IIb}\beta_3$	perkutana žilna intervencija	odobren leta 1995
Eptifibatid (Integrelin <sup>R</sup> )	ciklični peptid	$\alpha_{IIb}\beta_3$	akutni koronarni sindrom, perkutana žilna intervencija	odobren leta 1998
Tirofiban (Aggrastat <sup>R</sup> )	nepeptidni antagonist	$\alpha_{IIb}\beta_3$	akutni koronarni sindrom	odobren leta 1998
MEDI-522 (Vitaxin)	monoklonsko protitelo	$\alpha_V\beta_3$	metastatski maligni melanom, revmatoidni artritis, metastatski od androgenov neodvisni rak prostate, psoriaza	II faza kliničnih testiranj
MEDI-525	monoklonsko protitelo	$\alpha_V\beta_3$	refraktarni napredovali solidni tumorji, levkemija, limfom, rak tankega črevesa	I faza kliničnih testiranj
M 200 (Volociximab)	monoklonsko protitelo	$\alpha_5\beta_1$	metastaze karcinoma ledvičnih celic, metastaze melanoma (kombinacija z DTIC)	II faza kliničnih testiranj
Talidomid	sintezna spojina	$\alpha_V\beta_3$	maligni gliom	II faza kliničnih testiranj
EMD121974 (Cilengitide)	ciklični peptid	$\alpha_V\beta_3$ $\alpha_V\beta_5$	kaposijev sarkom glioblastom multiforme, prvi relaps glioblastoma multiforme, neresektabilen stadij III ali IV melanom, akutna mieloična levkemija karcinom ledvičnih celic, rak kolona, možganski tumorji	II faza kliničnih testiranj II faza kliničnih testiranj I faza kliničnih testiranj
ATN-161	peptid	$\alpha_5\beta_1$		predklinična testiranja
S247	nepeptidni antagonist	$\alpha_V\beta_3$		predklinična testiranja

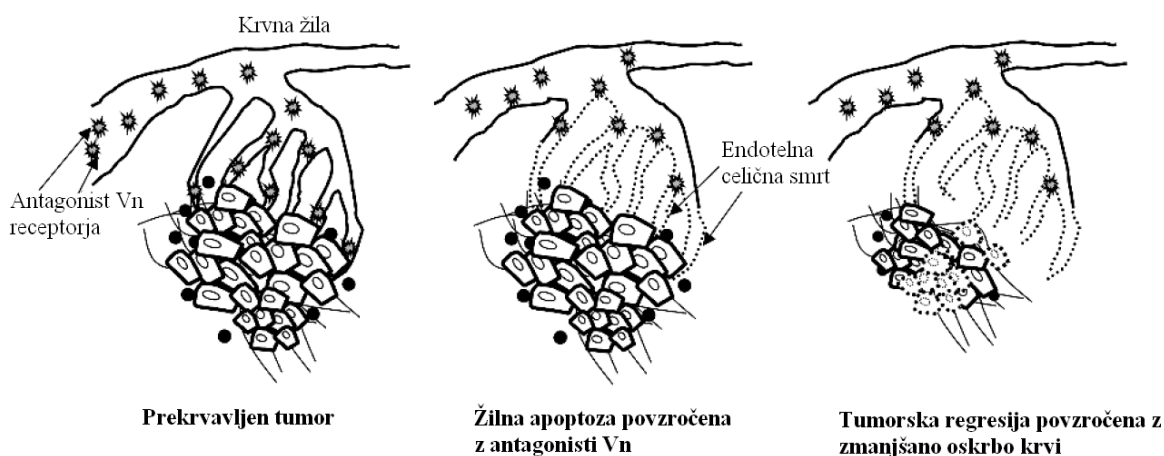
Majhni RGD-vsebujoči peptidi so se pokazali kot močni integrinski antagonisti. Vendar so zanje značilne slabe farmakokinetične lastnosti, kot so: slabo prehajanje skozi biološke membrane, hitro izločanje preko ledvic in jeter, nizka presnovna stabilnost in multipotentnost. Zaradi nizke biološke uporabnosti peptidnih učinkovin po peroralni aplikaciji je primerna le intravenska uporaba le-teh.<sup>[27]</sup> Tako je šel razvoj v pripravo sinteznih učinkovin – t.i. peptidomimetikov z RGD kot osnovnim motivom z določenimi strukturnimi modifikacijami, ki bodo oponašale naravne ligande in imele višjo afiniteto do integrinov. Osnovne farmakoforne zahteve sinteznih antagonistov so:<sup>[26,27]</sup>

- Kationski center (gvanidinska, amidinska, piperidinska, piperazinska skupina idr.), ki nadomešča N-terminalno gvanidinsko skupino arginina. Ta center tvori ionske in vodikove interakcije z vezavnim mestom receptorja.
- Anionski center (karboksilna skupina), ki nadomešča C-terminalno karboksilno skupino asparaginske kisline in tvori ionske interakcije z vezavnim mestom.
- Distančnik z ustrezno razdaljo med kationskim in anionskim centrom, ki zagotavlja ustrezno prostorsko usmerjenost obeh centrov.

Antagonisti fibrinogenkega receptorja (integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) se že uporabljajo v terapijah<sup>[7]</sup>, medtem ko za antagoniste  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  in  $\alpha_5\beta_1$  integrinov še vedno potekajo predklinična in klinična testiranja (preglednica III).<sup>[25]</sup>

### 1.2.1 Antagonisti vitronektinskega receptorja $\alpha_v\beta_3$

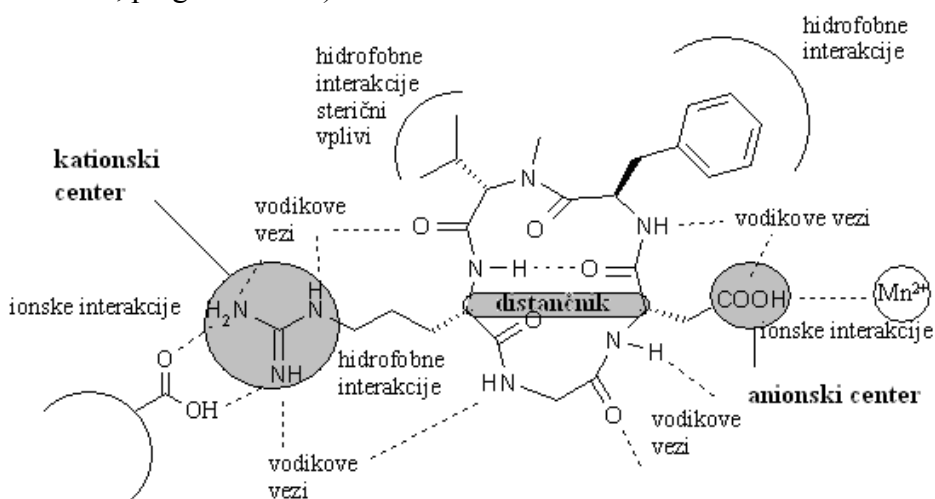
Antagonisti receptorja  $\alpha_v\beta_3$  imajo med drugim pomembno vlogo tudi pri preprečevanju tumorskega metastaziranja, saj zavirajo proces angiogeneze in tako onemogočijo prehranjevanje tumorskih celic in nadaljnje metastaziranje. Antagonisti  $\alpha_v\beta_3$  receptorja torej povzročijo propad nastalega žilja v tumorju (slika 10).



Slika 10: Zaviranje rasti tumorjev z antagonisti vitronektinskega receptorja<sup>[10]</sup>

Razvoj antagonistov  $\alpha_v\beta_3$  receptorjev je potekal v smeri iskanja selektivnih, presnovno stabilnih in peroralno učinkovitih spojin od preprostih linearnih peptidov do nepeptidnih spojin. Prvi antagonisti s selektivnim delovanjem na  $\alpha_v\beta_3$  receptor so bili ciklični RGD-peptidi (c(RGDfV) in c(RGDfMeV)). Ciklizacija RGD-peptidov je povečala rigidnost peptidov in pripomogla k izboljšanju učinkovitosti.<sup>[4]</sup> Z njihovo pomočjo so bile določene strukturne zahteve za bolj selektivno delovanje antagonistov na  $\alpha_v\beta_3$  receptorju, in sicer:<sup>[3,28]</sup>

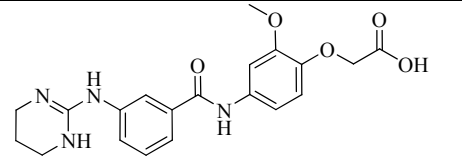
- Distančnik z optimalno dolžino 1.1 – 1.3 nm.
- Prisotnost hidrofobnega substituenta v bližini Asp-ostanka, s katerim se poveča afiniteta do  $\alpha_v\beta_3$  receptorja.
- Vsaj ena peptidna vez (verjetno med Gly in Asp).
- Aromatski in manj bazični mimetiki gvanidinske skupine na kationskem centru (benzamidinska, aminopiridinska, benzimidazolska ali imidazolska skupina) (slika 11, preglednica IV).



Slika 11: Model vezave cRGDfV na  $\alpha_v\beta_3$  receptor<sup>[3]</sup>

Preglednica IV: Nekateri nepeptidni  $\alpha_v\beta_3$ -specifični antagonisti<sup>[3,16]</sup>

Strukturna formula	IC <sub>50</sub> (nM)	Strukturna formula	IC <sub>50</sub> (nM)
	0.86		1.4
	0.6		0.055
	0.3		
	0.033		

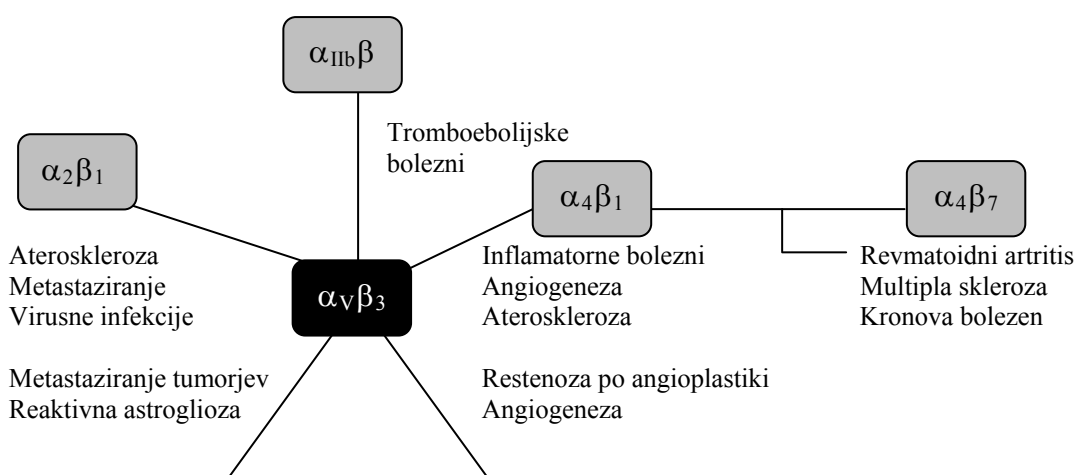
			0.43
--	--	--	------

Ker antagonisti v svoji strukturi vsebujejo za delovanje potrebna kationski in anionski center, je pri določenih spojinah problem prevelika hidrofilnost spojine, kljub nizkim  $IC_{50}$ -vrednostim. Oba centra zaradi velike polarnosti in naboja močno zmanjšata prehajanje spojine skozi sluznico v kri. To lahko pri nekaterih sinteznih nepeptidnih antagonistih  $\alpha_v\beta_3$  receptorjev predstavlja velik problem pri peroralni uporabi le-teh. Temu se lahko izognemo s pripravo predzdravil in tako povečamo biološko uporabnost teh učinkovin. Predzdravilne oblike lahko pripravimo z naslednjimi strukturnimi modifikacijami:<sup>[11,29]</sup>

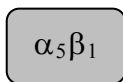
- Zaestrenje kisle karboksilne skupine z nizkomolekulskimi alkoholi (metilni, etilni).
- Zaščita bazične benzamidinske skupine v obliki amidoksima, oksadiazolinona, ki se po absorpciji reaktivno presnovijo v amidinsko skupino.
- Povezava obeh polarnih skupin v obroč do cikličnega predzdravila.

## 1.2.2 Enojni ali multipli antagonisti

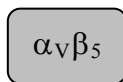
Vse bolj se uveljavlja koncept načrtovanja učinkovin z dvojnimi ali trojnimi delovanjem. Integrini so zaradi kompleksnih interakcij med seboj, z drugimi receptorji kot tudi z zunajceličnimi ter znotrajceličnimi proteini primerni za tako načrtovanje učinkovin, saj pogosto v bolezenskem procesu sodeluje več integrinov, ki koordinirano vodijo patološke procese. Načrtovanje učinkovin z dvojnimi ali trojnimi delovanjem pa je tudi v skladu s sodobnim trendom zmanjševanja števila predpisanih zdravil v terapiji sodobnih bolnikov, za katere je značilna polimorbidnost. Polifarmacija vpliva tudi na uspešnost terapije, saj je jemanje 10 in več vrst zdravil večkrat dnevno povezano z manjšo komplianco bolnikov, ki težko sledijo navodilom. Prav tako pa so znane številne interakcije med posameznimi učinkovinami ali drugimi sestavinami zdravil, ki imajo lahko ogrožujoče posledice za življenje in jih pri predpisovanju kombinacij zdravil zlahka spregledamo. Učinkovine z delovanjem na več terapevtskih tarč hkrati bi lahko ta problem elegantno rešile.<sup>[3,11,16]</sup>



Angiogeneza



Osteoporoza, infekcije



Slika 12: *Vplivi dveh različnih integrinskih receptorjev na iste patofiziološke procese*<sup>[16]</sup>

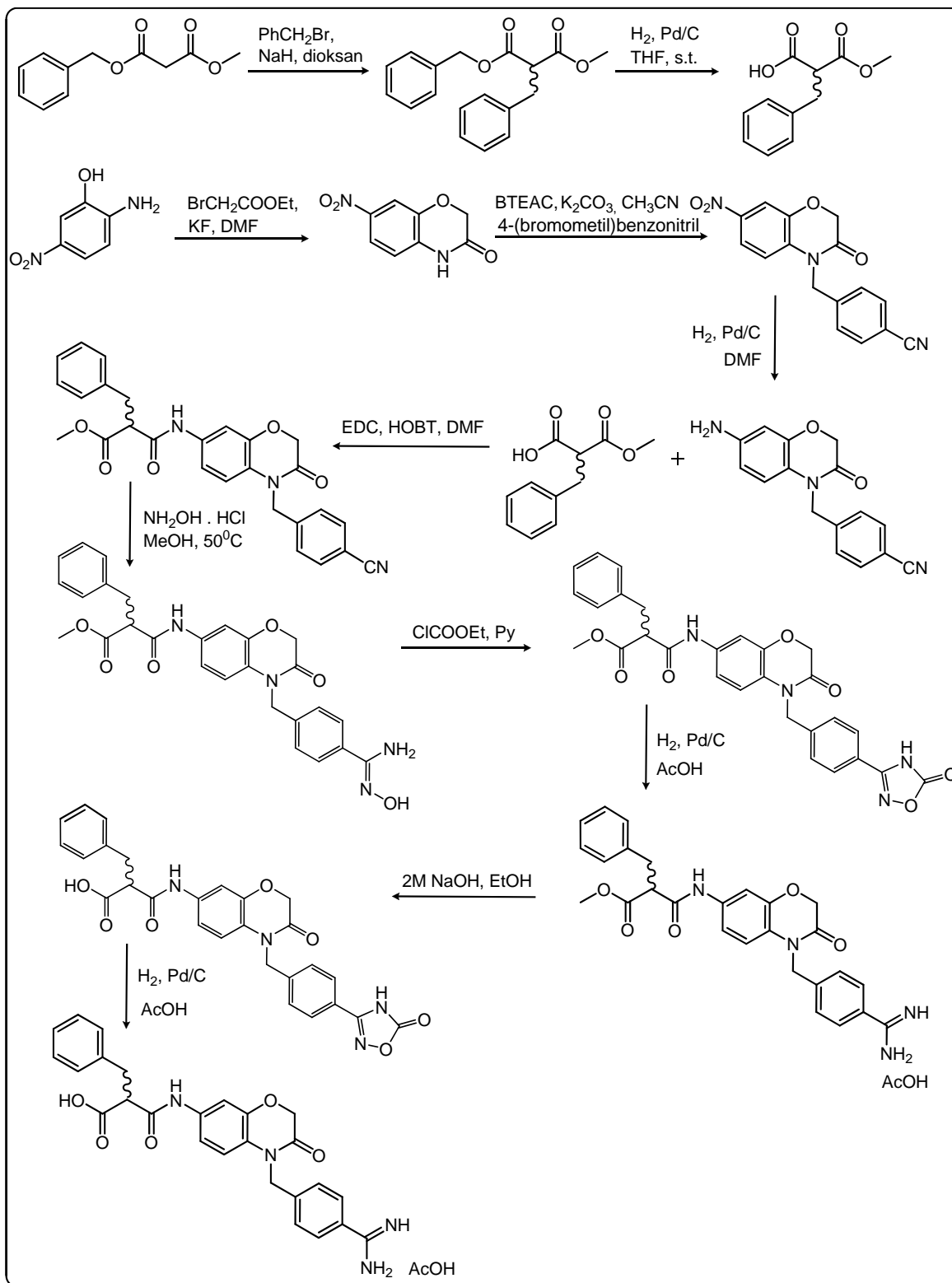
## 2. NAČRT ZA DELO

Rezultati raziskovalnih skupin, predvsem objavljena kristalna struktura zunajceličnega segmenta  $\alpha_V\beta_3$  in zunajceličnega segmenta  $\alpha_V\beta_3$  v kompleksu z cRGDFV, so privedli do postavitve vezavnega modela potencialnega modulatorja vitronektinskega receptorja. Na podlagi vezavnega modela so bili do sedaj razviti peptidni antagonisti z ohranjeno prepoznavno aminokislinsko sekvenco. Zaradi njihove slabe biološke uporabnosti, je cilj raziskovalnih inštitucij po celem svetu razvoj nepeptidnih antagonistov - t.i. peptidomimetikov RGD – aminokislinskega zaporedja. V okviru diplomskega dela bomo poskušali optimizirati sintezi dveh potencialnih nepeptidnih modulatorjev, ki vsebujeta vse potrebne fragmente za vezavo in moduliranje vitronektinskih receptorjev.

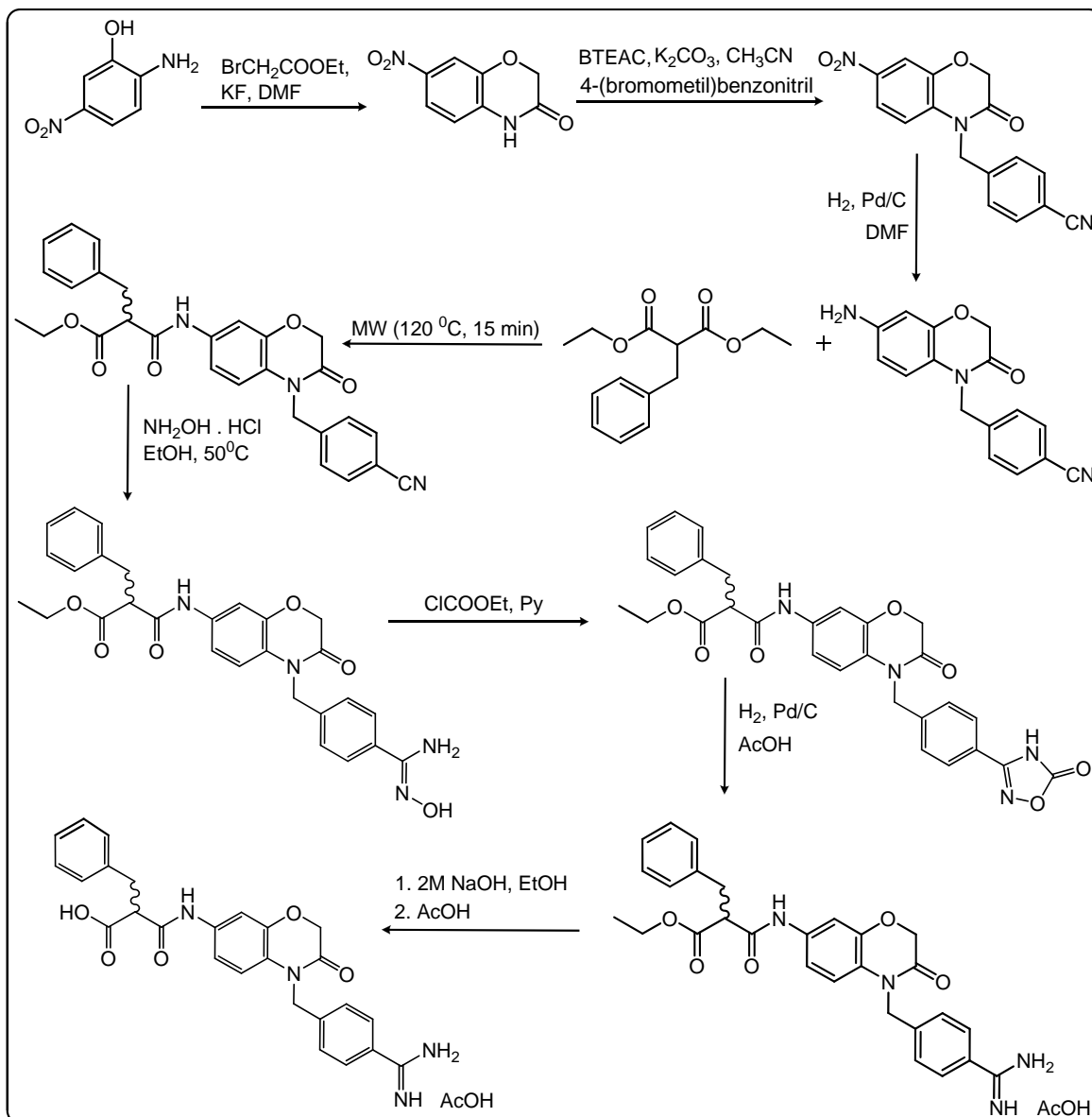
Izbor potencialnih modulatorjev za njuno optimizacijo sinteze temelji na:

1. Prvi presejalni testi spojine 2-benzil-3-[(4-{4-[amino(imino)metil]benzil}-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)amino]-3-oksopropanojske kisline v obliki trifluoroacetata (spojina **13**) na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo so pokazali zelo dobre rezultate v smislu vezave na vitronektinske receptorje. Kot merilo *in vitro* afinitete do integrinov so uporabili test določanja afinitete na izoliranih receptorjih. Za to spojino bi bilo potrebno na HUVEC celicah izvesti še *ex vivo* preizkušanje na sposobnost moduliranja prenosa signala po vezavi na vitronektinski receptor. Iz tega razloga bomo poizkušali optimizirati že znano sintezno pot spojine **13** (načrt 1), predvsem v smislu izboljšanja izkoristkov reakcij in zagotovitve čistote končne spojine, pri čemer bomo za čiščenje uporabili kolonsko kromatografijo z uporabo reverzne stacionarne faze (Isolera One).
2. Poizkušali bomo pripraviti tudi spojino 2-fenil-3-[(4-{4-[amino(imino)metil]benzil}-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)amino]-3-oksopropanojske kisline v obliki trifluoroacetata (spojina **12**), ki je analog spojine **13**. Za to spojino domnevamo, da bi v testih vrednotenja biološke aktivnosti lahko podala boljše rezultate. Fenilni fragment vezan na malonat na mestu 2 namreč poveča rigidnost molekule in s tem zmanjša število konformacijskih stanj, zaradi česar domnevamo na višjo afiniteto do vitronektinskega receptorja. Spojino bomo poizkušali pripraviti na enak način kot spojino **13** (načrt 2). Iskali bomo tudi druge sintezne poti in jih primerjali v izkoristkih (načrt 3). Čistoto končne spojine bomo tudi tukaj poizkušali zagotoviti s kolonsko kromatografijo z uporabo reverzne stacionarne faze.

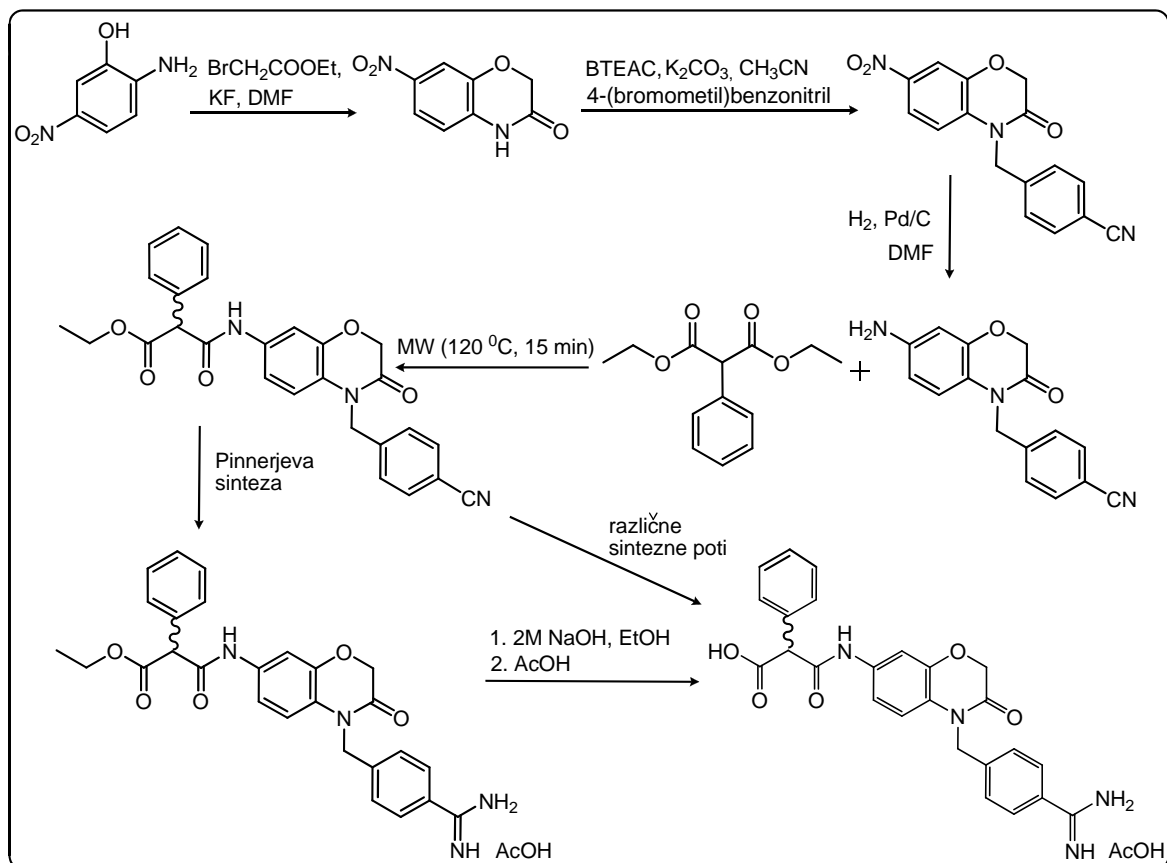


Načrt 1: Opisana sintezna pot spojine **13** po literaturi<sup>[8]</sup>

## Načrt 2: Predlagana optimizacija sintezne poti spojine 13



Načrt 3: Predlagana optimizacija sintezne poti spojine 12

**Delo bo potekalo na naslednji način (reakcijske sheme 1-5):**

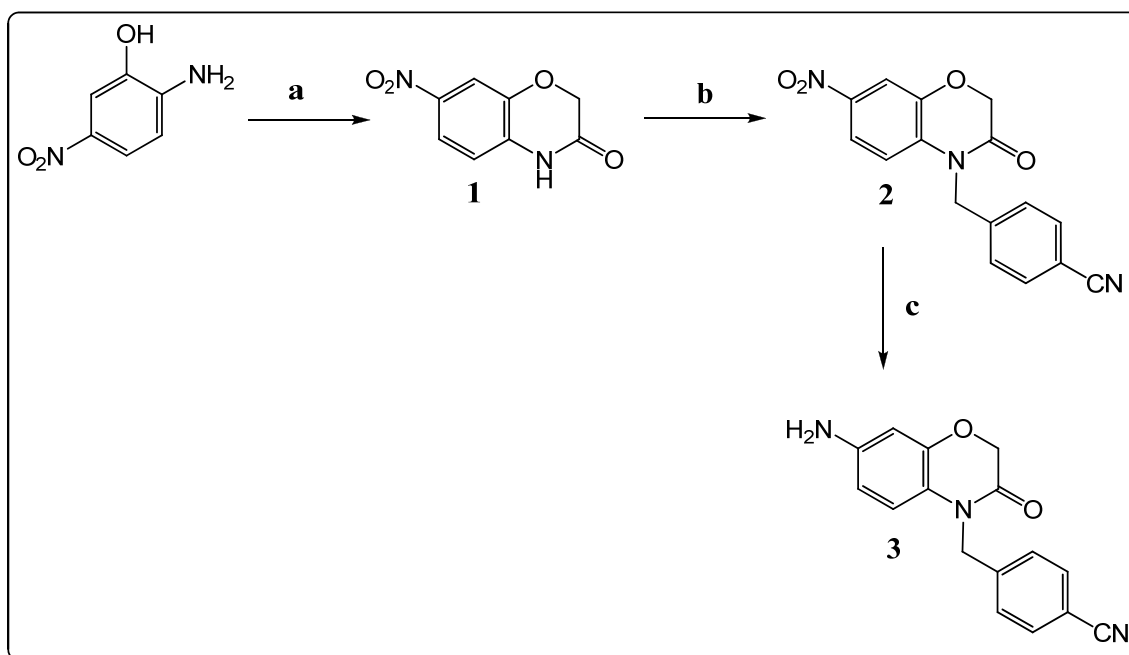
- Pripravili bomo benzoksazinski skelet, spojino 7-nitro-2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-on (**1**), tako da bomo izvedli ciklizacijo 2-amino-5-nitrofenola z etilbromoacetatom. Sledi priprava distančnika **3** zelenih končnih spojin, pri čemer bomo alkilirali amidni dušik 7-nitro benzoksazinskega derivata **1** z 4-(bromometil)benzocyanidom do spojine **2**, nato pa bomo nitro skupino benzoksazina na mestu 7 reducirali v amsko skupino s katalitskim hidrogeniranjem.
- Na amsko skupino pripravljenega distančnika **3** bomo z aminolizo estra uvedli dietil 2-benzilmalonat, pri čemer dobimo spojino **5**. Sledila bo sinteza amidina preko nitrila po naslednji poti: Z uporabo hidroksilamonijevega klorida bomo iz nitrila **5** pripravili amidoksim **7**. Sledi O-aciliranje amidoksima z etilkloroformatom in ciklizacija v piridinu pri temperaturi vrelišča do spojine **9**. Nastali 1,2,4-oksadiazol-5(4*H*)-on **9** bomo s katalitskim hidrogeniranjem reducirali v amidin **11**. V zadnji stopnji bomo z alkalno hirolizo pretvorili etilni ester v končno spojino **13**.
- Pripravili bomo tudi spojino **12**, pri čemer kot izhodno spojino uporabimo etil 2-fenil-3-[[4-(4-cianobenzil)-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-7-il]amino]-3-oksopropanoat (**4**), ki jo pripravimo z aminolizo estra dietil 2-fenilmalonata in

distančnika **3**. Sintezo nadaljujemo do končne spojine **12** po postopku navedenem v načrtu točke 2.

4. Za pripravo spojine **12** bomo iskali tudi druge sintezne poti. Pri načrtu točke 3 sta problematični zadnji dve stopnji sinteze spojine **12**; to sta redukcija 1,2,4-oksadiazol-5(4*H*)-on v amidin in nato še alkalna hidroliza etilnega estra. Zamenjali bomo vrstni red zadnjih dveh stopenj, tako da bomo najprej izvedli alkalno hidrolizo, sledila pa ji bo redukcija do amidina. Pripravili bomo spojino **8** še po drugem splošnem predpisu za sintezo 1,2,4-oksadiazol-5(4*H*)-onov, pri čemer bomo izhajali iz spojine **6**. Sintezo bomo do končne spojine **12** nadaljevali z alkalno hidrolizo etilnega estra in nato z redukcijo s katalitskim hidrogeniranjem 1,2,4-oksadiazol-5(4*H*)-ona v amidin.
5. Za pripravo končne spojine **12** bomo uporabili tudi naslednjo sintezno pot: spojino **6** bomo O-acetilirali z acetanhidridom in nato reducirali s katalitskim hidrogeniranjem do amidina **10**. Spojino **10** bomo poskušali pripraviti tudi tako, da bomo ciano skupino spojine **4** pretvorili v amidinsko funkcionalno skupino s Pinnerjevo sintezo. V končni stopnji bomo izvedli hidrolizo etilnega estra in dobili spojino **12**.

## 2.1 REAKCIJSKE SCHEME

**Reakcijska shema 1:** *Sinteza 4-[(7-amino-3-okso-2,3-dihidro-4*H*-1,4-benzoksazin-4-il)metil]benzonitrila*

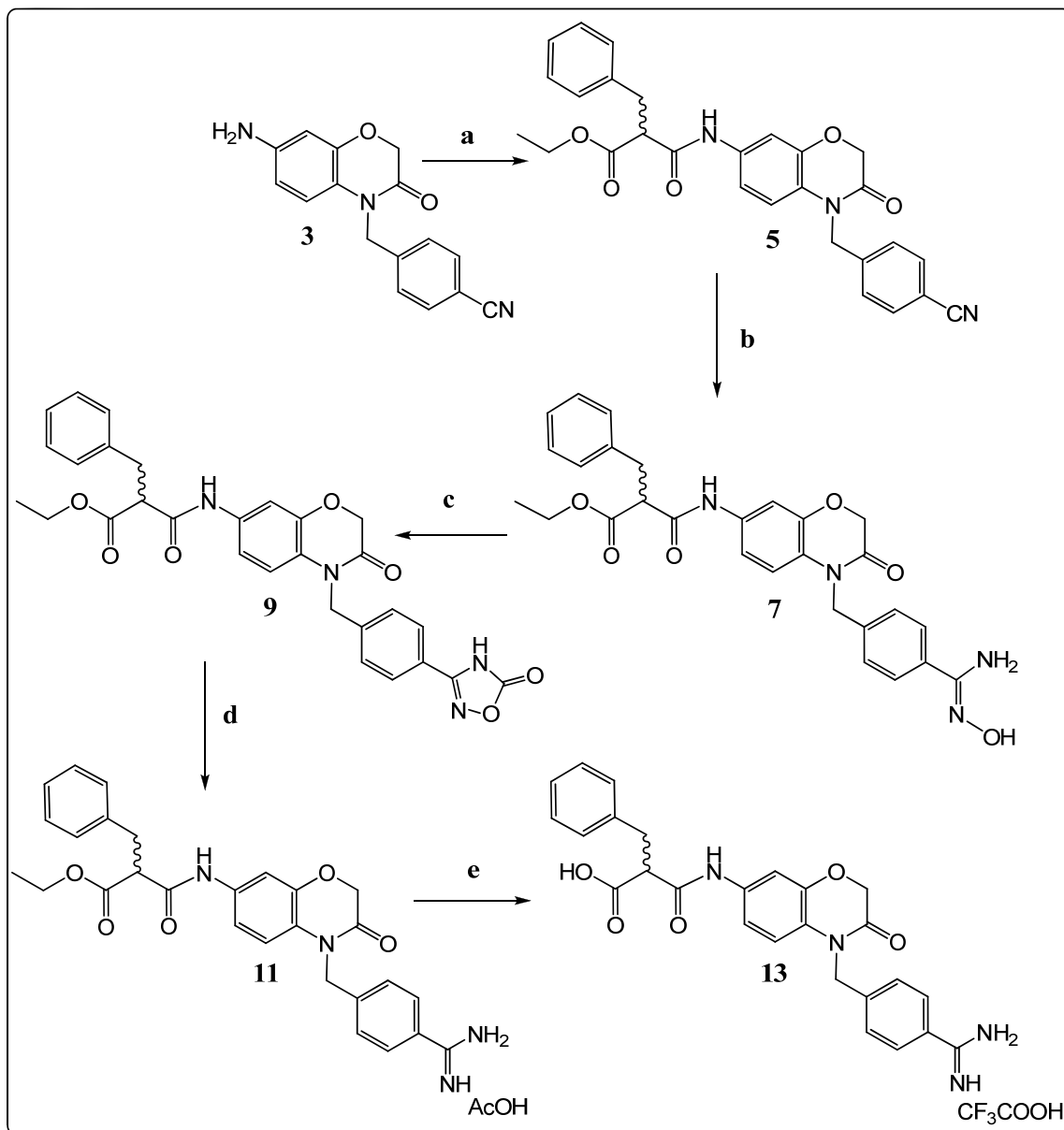


**a:** *etilbromoacetat, KF, DMF*

**b:** *4-(bromometil)benzonitril, benziltriethylamonijev klorid, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>*

**c:** *H<sub>2</sub>, Pd/C*

**Reakcijska shema 2:** *Sinteza 2-benzil-3-[(4-{4-[amino(imino)metil]benzil}-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)amino]-3-oksopropanojska kislina v obliki trifluoroacetata*



**a:** dietil 2-benzilmalonat, MW ( $T=120^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 15 \text{ min}$ )

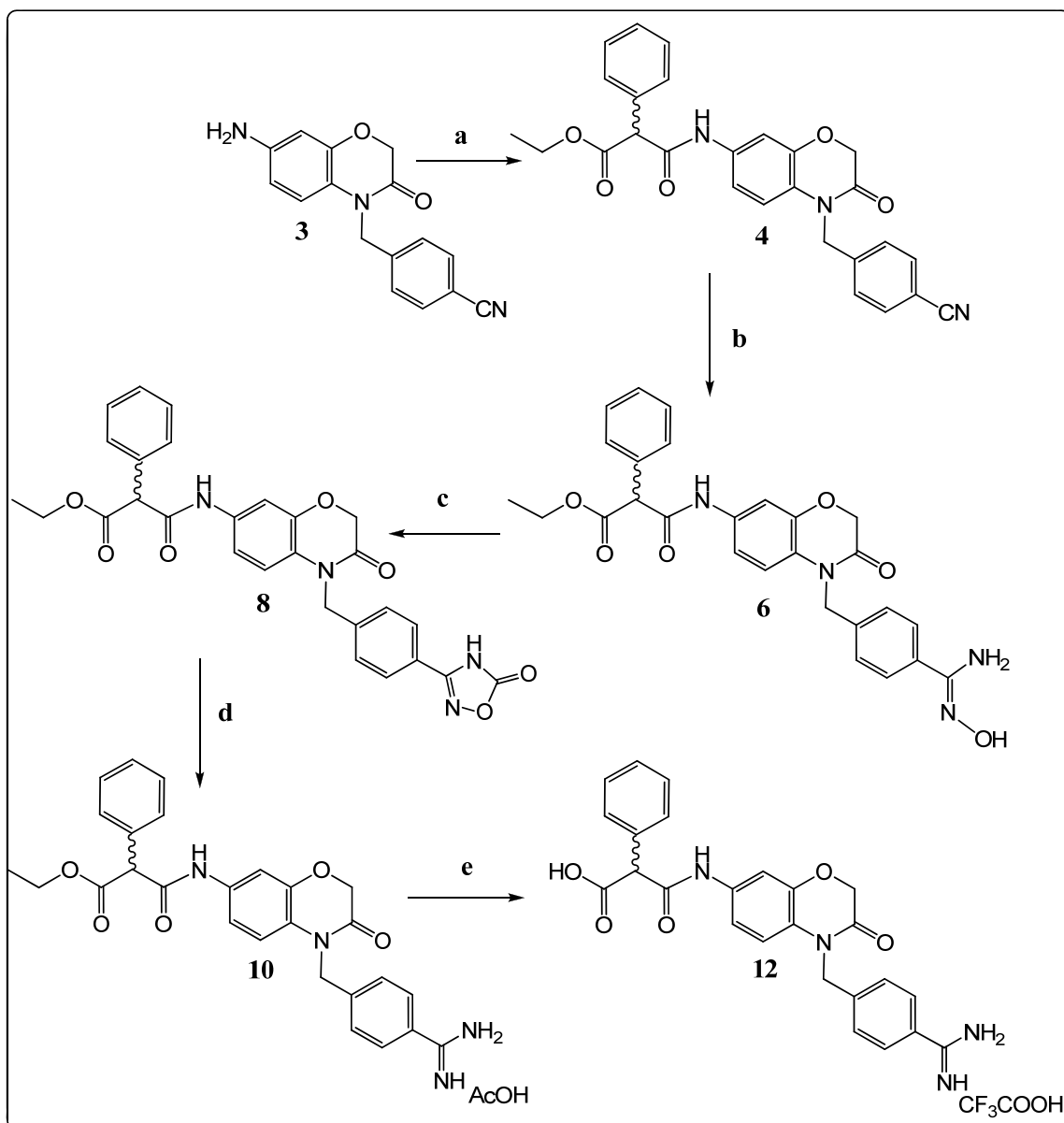
**b:** hidrosilamonijev klorid, trietilamin

**c:** 1.) etilkloroformat, Py ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) 2.)  $\Delta$

**d:**  $\text{H}_2$ , Pd/C

**e:** 2M NaOH/etanol

**Reakcijska shema 3:** *Sinteza 2-fenil-3-[(4-{4-[amino(imino)metil]benzil}-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)amino]-3-oksopropanojska kislina v obliki trifluoroacetata*



**a:** dietil 2-fenilmalonat, MW ( $T=120^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 15 \text{ min}$ )

**b:** hidroksilamonijev klorid, trietilamin

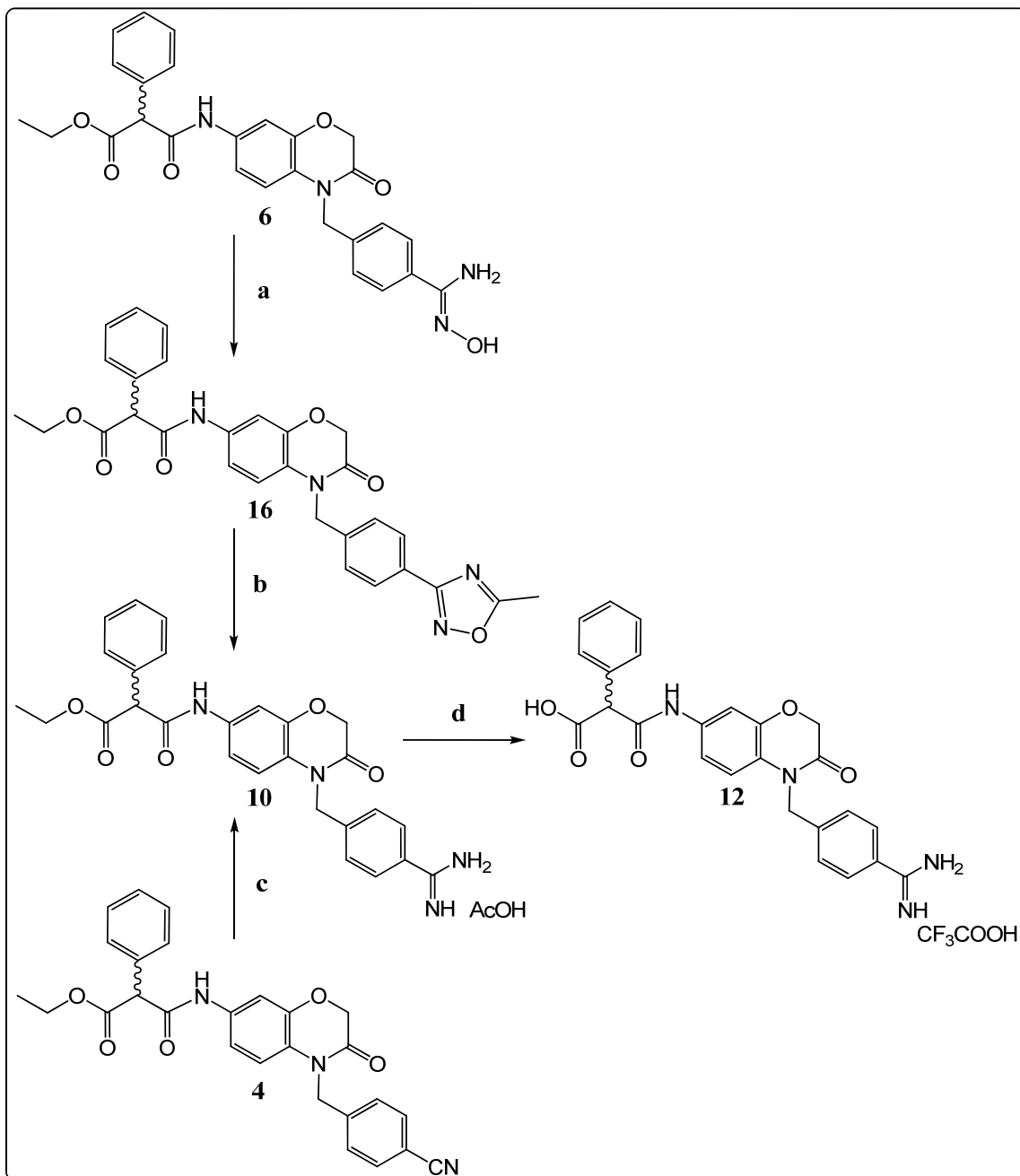
**c:** 1.) etilkloroformat, Py ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) 2.)  $\Delta$

**d:**  $\text{H}_2$ , Pd/C

**e:** 2M NaOH/etanol



**Reakcijska shema 5:** *Sinteza 2-fenil-3-[(4-{4-[amino(imino)metil]benzil}-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)amino]-3-oksopropanojska kislina v obliki trifluoroacetata*



**a:**  $Ac_2O$ ,  $AcOH$

**b:**  $H_2$ ,  $Pd/C$

**c:** 1.)  $HCl_{(g)}$ /brezvodni etanol

2.) amonijev acetat

**d:**  $2M NaOH$ /etanol



### 3. MATERIALI IN METODE

#### Reagenti in topila

Pri sinteznem delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Acros, Aldrich, Bachem, Carlo Erba, Fluka, Janssen, Kemika in Merck. Brezvodna topila (DMF, Py, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, toluen) smo pripravili po standardnih postopkih in jih shranjevali nad molekularnimi siti z velikostjo por 0.3 ali 0.4 nm. Amonijev acetat smo pred uporabo sprali z etrom in posušili na zraku. Reagente etilkloroformat in trietilamin smo pred uporabo predestilirali.

#### Kromatografske metode

- S *tankoplastno kromatografijo (TLC)* smo spremljali poteke reakcij, izolacij in kolonskih kromatografij. Uporabljali smo plošče DC Fertigplatten Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck) z 0.22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino  $\lambda = 254$  nm in naslednje orositvene reagente: ninhidrin za detekcijo aminov, bromkrezolzeleno za detekcijo –COOH skupine in FeCl<sub>3</sub> v metanolu za detekcijo amidoksimske –OH skupine, ki smo jih pripravili po standardnih postopkih.
- *Kolonska kromatografija* je služila kot separacijska tehnika pri čiščenju spojin. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti in silikagel proizvajalca Merck s premerom delcev 0.063-0.200 mm, kot stacionarno fazo. Za čiščenje končnih spojin smo uporabili aparaturo Isolera One, proizvajalca Biotage<sup>R</sup>, na Fakulteti za farmacijo. Gre za metodo kolonske kromatografije, pri čemer se uporabljajo plastične kolone različnih velikosti, s štirimi različnimi stacionarnimi fazami. To so; Silica, HP-SIL, KP-NH in KP-C18-HS. S suhim nanosom se vzorčki pred ločbo nanašajo na predkolono štirih različnih velikosti (1 g, 3 g, 10 g, 34 g silikagela), lahko pa raztopino tudi direktno injiciramo na kolono. Pri Isolera One aparaturi gre za adsorpcijsko flash kromatografijo. Spojine v odvisnosti od polarnosti mobilne faze in same spojine različno potujejo po stolpcu silikagela. Po ločbi se posamezne spojine detektirajo z merjenjem absorbanc pri različnih valovnih dolžinah.
- Mobilne faze, ki smo jih uporabljali, so bile:
  - MF1:** diklorometan
  - MF2:** diklorometan/metanol = 9/1
  - MF3:** diklorometan/metanol = 19/1
  - MF4:** diklorometan/metanol = 49/1
  - MF5:** diklorometan/metanol = 99/1
  - MF6:** etilacetat/heksan = 1/1
  - MF7:** acetonitril/voda = 3/1
  - MF8:** acetonitril/voda/metanol = 3/1/1
  - MF9:** etilacetat/metanol = 9/1
  - MF10:** etilacetat

**MF11:** 0.1 %  $CF_3COOH$ /acetonitril = 1/1

**MF12:** diklorometan/metanol = 3/1

**MF13:** kloroform/metanol = 16/1

**MF14:** etilacetat/heksan = 4/1

### **Določevanje tališč:**

Tališča smo določevali na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica.

### **Spektroskopske metode:**

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR):** NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance DPX<sub>300</sub> v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Vzorci so posneti v devteriranih topilih DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> in metanol s tetrametilsilanom (TMS) kot internim standardom pri 302 K. Spektre smo procesirali s programom MestReC Version 4.8.6.0.
- **Infrardeča spektroskopija (IR):** IR spektri so posneti na spektrometru Perkin Elmer 1600 Series FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.
- **Masna spektrometrija (MS):** Masni spektri so bili posneti na spektrometru AUTOSPEC Q (VG-Analytical) z EI- ali FAB- tehniko na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

### **Elementne analize:**

Vsebnosti ogljika, dušika in vodika je bila določena s pomočjo analizatorja Perkin Elmer 240 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

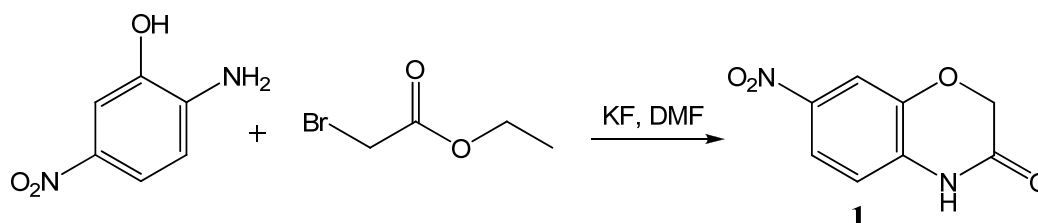
### **Nomenklatura in risanje spojin:**

Strukturne formule spojin smo narisali in z IUPAC kemijskimi imeni poimenovali s programom ChemBioDraw Ultra 11.0.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1 SINTEZA 7-NITRO-2*H*-1,4-BENZOKSAZIN-3(4*H*)-ONA (1)

#### REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

Suspenzijo 8.72 g (150.0 mmol) kalijevega fluorida in 6.68 mL etilbromoacetata (60.0 mmol) v brezvodnem DMF topilu (240 mL) mešamo pri sobni temperaturi 15 minut. Med mešanjem dodamo 9.25 g (60.0 mmol) 2-amino-5-nitrofenola ter segrevamo pri 60 °C, dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Reakcijsko zmes zlijemo v 200 mL zmesi ledu in vode, ob tem izpade oborina, ki jo odfiltriramo in prekrizaliziramo iz etanola.

#### REZULTATI:

**Izgled:** sivi igličasti kristali

**Izkoristek:** 80.8 % (9.41 g), 81.0 %<sup>[8]</sup>

**Rf:** 0.38 (MF1), 0.65 (MF2)

**Tališče:** 236-239 °C, 220-226 °C<sup>[8]</sup>

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3056, 2920, 1697, 1598, 1509, 1390, 1340, 1221, 1133, 1043, 930, 863, 826, 792, 742, 525.

#### <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ [ppm] = 4.73 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CONH-)  
 7.05 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.75 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.88 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.5 Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 11.29 (s, 1H, -CHNHCOCH<sub>2</sub>-).

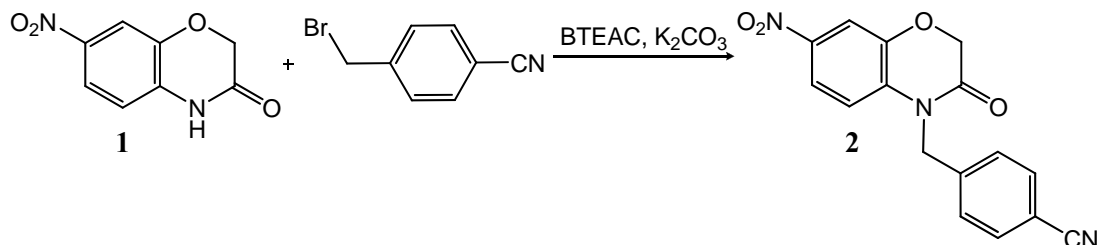
**MS (ESI):** 193 (M-H), **Mr (izračunana):** 194

**HR MS:** 194.0253 (izračunana: 194.0249)

**Elementna sestava:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

## 4.2 SINTEZA 4-[(7-NITRO-3-OKSO-2,3-DIHIĐRO-4H-1,4-BENZOKSAZIN-4-IL)METIL]BENZONITRILA (2)

### REAKCIJA:



### POSTOPEK:

Suspenziji 3.88 g (20.0 mmol) spojine **1**, 4.56 g (20.0 mmol) benziltriethylamonijevega klorida in 6.91 g (50.0 mmol) kalijevega karbonata v acetonitrilu (120 mL) med mešanjem dodamo 4.31 g (10.0 mmol) 4-(bromometil)benzonitrila ter segrevamo pri 60 °C, dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Suspenzijo prefiltriramo in matičnico uparimo pod znižanim tlakom. Preostanek raztopimo v 200 mL diklorometana ter speremo z 10 % citronsko kislino (2 x 100 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 x 100 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 100 mL). Organsko fazo sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom.

### REZULTATI:

**Izgled:** rumeno-oranžni kristali

**Izkoristek:** 79.3 % (4.90 g), 84.0 %<sup>[8]</sup>

**Rf:** 0.78 (MF2), 0.56 (MF4)

**Tališče:** 188-192 °C, 190-193 °C<sup>[8]</sup>

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3431, 2232, 1687, 1602, 1503, 1424, 1392, 1344, 1242, 1150, 1043, 926, 880, 829, 808, 746, 592, 523.

### <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ [ppm] = 4.99 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CONH-)  
 5.32 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 7.16 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.51 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, (4-CN)-Ar-H)  
 7.81-7.84 (m, 3H, Ar-H<sub>6</sub>, (4-CN)-Ar-H)  
 7.87 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, Ar-H<sub>8</sub>).

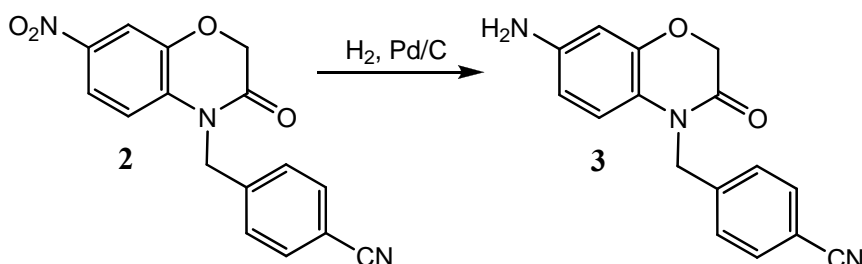
**MS (ESI):** 308 (M-H), **Mr (izračunana):** 309

**HR MS:** 309.0681 (izračunana: 309.0671)

**Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

### 4.3 SINTEZA 4-[(7-AMINO-3-OKSO-2,3-DIHIDRO-4H-1,4-BENZOKSAZIN-4-IL)METIL]BENZONITRILA (3)

#### REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

4.80 g (15.5 mmol) spojine **2** raztopimo v 70 mL brezvodnega DMF topila in preprihomo z argonom. Dodamo katalizator Pd/C (10 % mase spojine) in še enkrat preprihomo z argonom. Pri sobni temperaturi ob mešanju uvajamo vodik v bučko, opremljeno z balonom, napolnjenim z vodikom. Po končani reakciji dodani Pd/C odfiltriramo in matičnico uparimo pod znižanim tlakom. Oljni preostanek prelijemo z mešanico topil metanol/eter in izpadli produkt (spojino **3**) odfiltriramo.

#### REZULTATI:

**Izgled:** rumeno-rjavi kristali

**Izkoristek:** 73.8 % (3.20 g), 73.0 %<sup>[8]</sup>

**Rf:** 0.49 (MF5), 0.60 (MF2), orositveni reagent: ninhidrin

**Tališče:** 180-184 °C, 179-183 °C<sup>[8]</sup>

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3433, 3343, 2228, 1676, 1515, 1402, 1326, 1310, 1177, 1148, 1041, 858, 806, 617, 574.

#### <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ [ppm] = 4.67 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CONH-)  
 5.01 (rs, 2H, Ar-NH<sub>2</sub>)  
 5.14 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 6.12 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.4 Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 6.25 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
 6.61 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.44 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, (4-CN)-Ar)  
 7.80 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, (4-CN)-Ar).

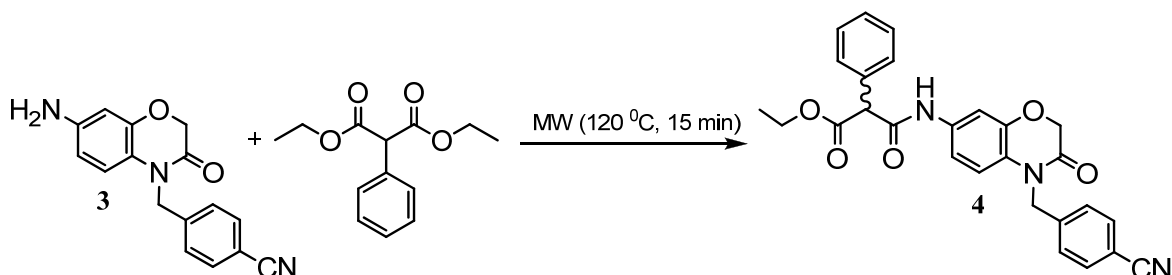
**MS (ESI):** 280 (MH<sup>+</sup>), **Mr (izračunana):** 279

**HR MS:** 279.1082 (izračunana: 279.1086)

**Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.4 SINTEZA ETIL 2-FENIL 3-{[4-(4-CIANO BENZIL)-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL]AMINO}-3-OKSOPROPANOATA (4)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.93 g (3.0 mmol) spojine **3** in 7.08 g (30.0 mmol) dietil 2-fenilmalonata prenesemo v 10 mL procesno vialo in segrevamo v mikrovalovnem reaktorju 15 min pri 120 °C. Reakcijski zmesi dodamo 15 mL diklorometana in produkt oborimo z dodatkom 140 mL petroletra. Trdni produkt raztopimo v 9 mL diklorometana in ponovno tvorimo oborino s 140 mL petroletra. Oborino (spojino **4**) odfiltriramo in posušimo pod vakuumom. Celoten postopek še enkrat ponovimo.

##### REZULTATI:

**Izgled:** rumeni kristali

**Izkoristek:** 81.0 % (2.28 g)

**Rf:** 0.75 (MF2), 0.41 (MF4)

**Tališče:** 73-77 °C

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3321, 2229, 1688, 1609, 1513, 1402, 1328, 1222, 1051, 895, 808, 727, 547.

##### <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  [ppm] = 1.29 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.27 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.61 (s, 1H, -CHPh)  
 4.72 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
 5.20 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 6.68 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.05 (dd, 1H,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.33-7.39 (m, 5H, -Ph)  
 7.42 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, (4-CN)-Ar-H)  
 7.45 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.63 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, (4-CN)-Ar-H)  
 9.11 (s, 1H, -CONH-).

**MS (ESI):** 470 (MH<sup>+</sup>), **Mr (izračunana):** 469

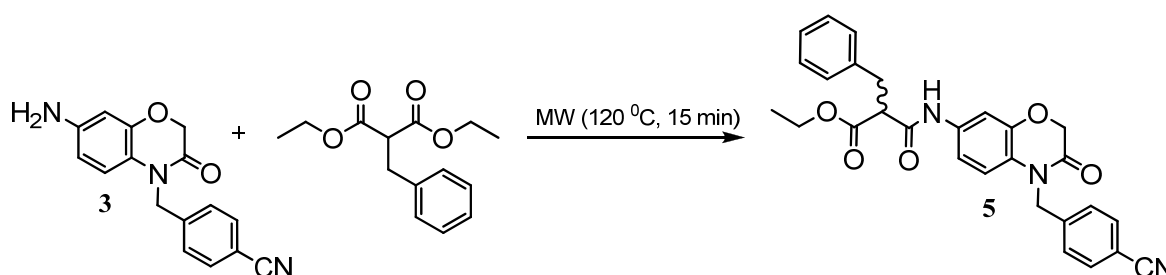
**HR-MS:** 469.1726 (izračunana: 469.1716)

**Elementna sestava:**

$C_{27}H_{23}N_3O_5 \times \frac{1}{2}$ $H_2O$	izračunana	dobljena
% C	67.78	67.52
% H	5.02	5.05
% N	8.79	8.94

#### 4.5 SINTEZA ETIL 2-BENZIL-3-{[4-(4-CIANO BENZIL)-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL]AMINO}-3-OKSO-PROPANOATA (5)

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

0.92 g (3.0 mmol) spojine **3** in 7.50 g (30.0 mmol) dietil 2-benzilmalonata prenesemo v 10 mL procesno vialo in segrevamo v mikrovalovnem reaktorju 15 min pri 120 °C. Reakcijski zmesi dodamo 15 mL diklorometana in produkt oborimo z dodatkom 140 mL petroletra. Trdni produkt raztopimo v 9 mL diklorometana in ponovno tvorimo oborino s 140 mL petroletra. Oborino (spojino **5**) odfiltriramo in posušimo pod vakuumom.

**REZULTATI:**

**Izgled:** bež kristali

**Izkoristek:** 80.7% (1.17 g)

**Rf:** 0.81 (MF2), 0.38 (MF4)

**Tališče:** 63-66 °C

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3326, 2229, 1685, 1609, 1513, 1403, 1328, 1223, 1052, 807, 750, 701, 547.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

δ [ppm] = 1.14 (t, 3H, J = 7.1 Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

3.21-3.39 (m, 2H, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
 3.59-3.64 (m, 1H, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
 4.10 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.74 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
 5.20 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 6.69 (d, 1 H,  $J = 8.7$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.01 (dd, 1H,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 2.3$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.17-7.29 (m, 5H, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
 7.31 (d, 1H,  $J = 2.3$  Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.36 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, (4-CN)-Ar-H)  
 7.63 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, (4-CN)-Ar-H)  
 8.55 (s, 1H, -CONH-).

**MS (ESI):** 482 (M-H), **Mr (izračunana):** 483

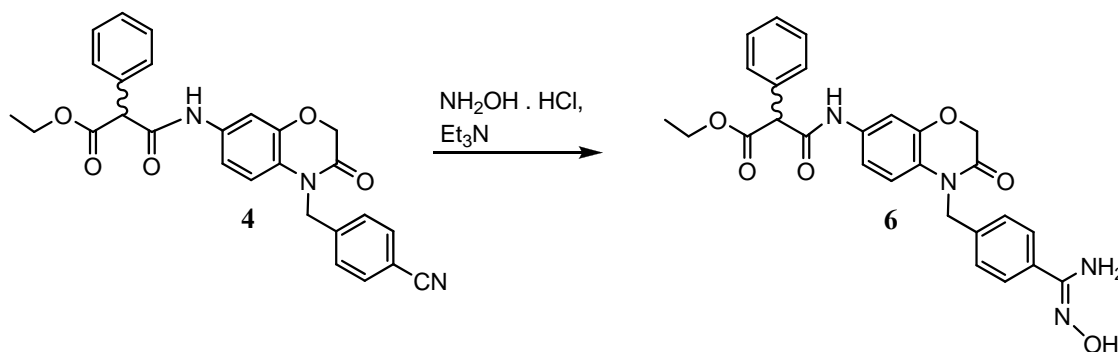
**HR-MS:** 483.1719 (izračunana: 483.1716)

**Elementna sestava:**

C <sub>28</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	izračunana	dobljena
% C	69.55	69.83
% H	5.21	5.88
% N	8.69	8.41

#### 4.6 SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[(4-{4-[AMINO(HIDROKSIIMINO)METIL] BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOATA (6)

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

1.30 g (18.7 mmol) hidrosilamonijevega klorida raztopimo v 200 mL brezvodnega metanola in ob mešanju dodamo 2.6 mL (18.7 mmol) trietilamina. Nato dodamo 2.20 g (4.7 mmol) spojine **4** raztopljene v 50 mL brezvodnega metanola ter segrevamo pri 50 °C, dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Topilo



uparimo, oljast preostanek raztopimo v 200 mL diklorometana ter speremo z 10 % citrsko kislino (2 x 100 mL). Organsko fazo sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Čisto spojino **6** sušimo pod vakuumom.

**REZULTATI:****Izgled:** rumeni kristali**Izkoristek:** 74.2 % (1.75 g)**Rf:** 0.41 (MF2), orositveni reagent: ninhidrin, FeCl<sub>3</sub> v MeOH**Tališče:** 108-112 °C

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3345, 1735, 1678, 1513, 1404, 1221, 1150, 1050, 895, 805, 698, 612, 539.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

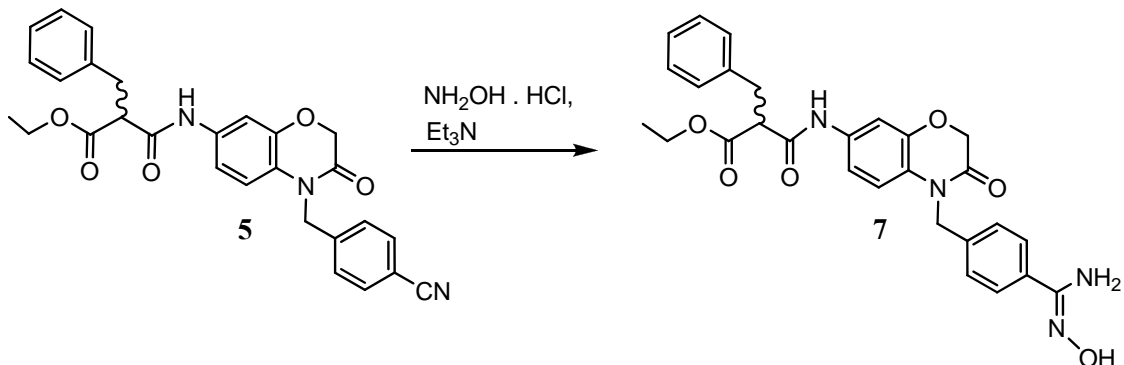
δ [ppm] = 1.16 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.12 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.78 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
 4.83 (s, 1H, -CHPh)  
 5.13 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 5.75 (s, 2H, -C(=NOH)NH<sub>2</sub>)  
 6.95 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.05 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.0 Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.24 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, (4-amidoksim)-Ar)  
 7.30-7.41 (m, 6H, -Ph+Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.60 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, (4-amidoksim)-Ar)  
 9.59 (s, 1H, =N-OH)  
 10.34 (s, 1H, -CONH-).

**MS (ESI):** 503 (MH<sup>+</sup>), **Mr (izračunana):** 502**HR-MS:** 502.1917 (izračunana: 502.1931)**Elementna sestava:**

<b>C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> x 1/3 H<sub>2</sub>O</b>	<b>izračunana</b>	<b>dobljena</b>
<b>% C</b>	63.78	64.01
<b>% H</b>	5.25	5.54
<b>% N</b>	11.02	10.61

#### 4.7 SINTEZA ETIL 2-BENZIL-3-[4-{4-[AMINO(HIDROKSIIMINO)METIL] BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOATA (7)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.64 g (9.2 mmol) hidrosilamonijevega klorida raztopimo v 100 mL brezvodnega etanola in ob mešanju dodamo 1.3 mL (9.2 mmol) trietilamina. Nato dodamo 1.12 g (2.3 mmol) spojine **5** raztopljene v 25 mL brezvodnega etanola ter segrevamo pri 50 °C, dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Topilo uparimo in oljast preostanek raztopimo v 100 mL diklorometana ter speremo z 10 % citrsko kislino (2 x 60 mL). Organsko fazo sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Spojino **7** dodatno speremo z dietiletrom.

##### REZULTATI:

**Izgled:** belo-rumeni kristali

**Izkoristek:** 88.0 % (1.05 g)

**Rf:** 0.43 (MF2), 0.36 (MF3), orositveni reagent: ninhidrin, FeCl<sub>3</sub> v MeOH

**Tališče:** 97-101 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3410, 1670, 1512, 1405, 1149, 1051, 895, 808, 700, 615, 540.

##### <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

$\delta$  [ppm] = 1.12 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 3.11 (d, 2H,  $J = 7.2$  Hz, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
 3.77 (t, 1H,  $J = 7.2$  Hz, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
 4.07 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.78 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
 5.13 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 5.88 (s, 2H, -C(=NOH)NH<sub>2</sub>)  
 6.93 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)

7.01 (dd, 1H,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.15-7.27 (m, 7H, -CHCH<sub>2</sub>Ph + (4-amidoksim)-Ar)  
 7.30 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.60 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, (4-amidoksim)-Ar)  
 9.65 (s, 1H, =N-OH)  
 10.13 (s, 1H, -CONH-).

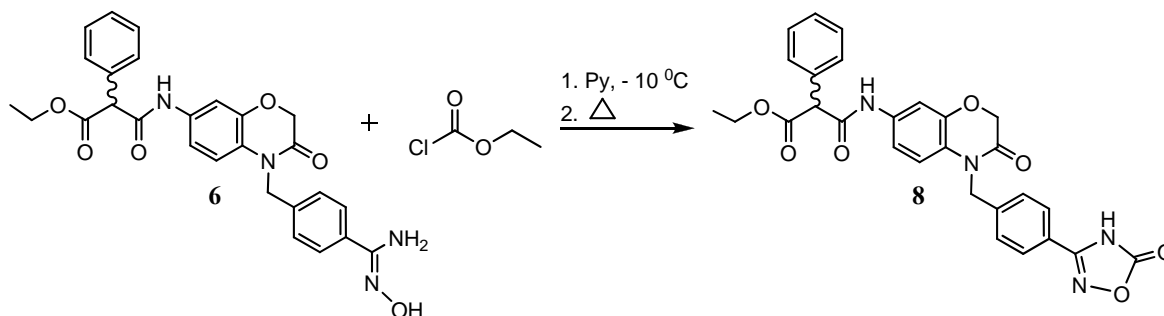
**MS (ESI):** 515 (M-H), **Mr (izračunana):** 516

**HR MS:** 516.1937 (izračunana: 516.1931)

**Elementna sestava:** C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>

#### 4.8 SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-({3-OKSO-4-[4-(5-OKSO-4,5-DIHIDRO-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL)BENZIL]-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO)-3-OKSOPROPANOATA (8)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.83 g (1.6 mmol) spojine **6** raztopimo v 20 mL piridina, nato zmes na ledeni kopeli ohladimo na -10 °C in med mešanjem postopoma dodamo 0.16 mL (1.6 mmol) etilkloroformata raztopljenega v 5 mL piridina ter pustimo mešati 30 minut pri tej temperaturi. Nato odstavimo kopel ter pustimo, da se temperatura dvigne do sobne temperature in segrevamo ob vrenju, dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Reakcijsko zmes ohladimo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Trdni zaostanek prelijemo z zmesjo metanol/eter, netopne nečistoče odfiltriramo, matičnico pa uparimo pod znižanim tlakom.

##### REZULTATI:

**Izgled:** rjavi kristali

**Izkoristek:** 61.3 % (0.54 g)

**Rf:** 0.32 (MF2)

**Tališče:** 131-135 °C

**IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3412, 1735, 1676, 1613, 1512, 1403, 1220, 1183, 1150, 1023, 895, 808, 748, 679, 537.

**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):**

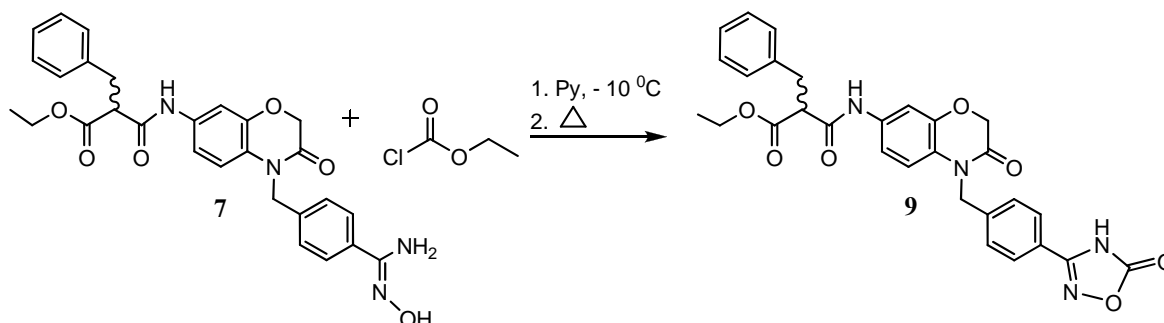
$\delta$  [ppm] = 1.17 (t, 3H,  $J = 6.9$  Hz,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ )  
 4.13 (q, 2H,  $J = 6.9$  Hz,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ )  
 4.79 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{CON}-$ )  
 4.92 (s, 1H,  $-\text{CHPh}$ )  
 5.20 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-(4\text{-CN})\text{-Ar}$ )  
 6.91 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.05 (dd, 1H,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 1.8$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.25-7.31 (m, 5H,  $-\text{Ph}$ )  
 7.38 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.45 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, (4-oks)-Ar-H)  
 7.67 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, (4-oks)-Ar-H)  
 10.22 (s, 1H,  $-\text{CONH}-$ )  
 12.93 (rs, 1H, oksadiazolinonski NH).

**MS (ESI):** 487 ( $\text{MH}^+ - \text{CO}_2$ ), **Mr (izračunana):** 528

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7$

#### 4.9 SINTEZA ETIL 2-BENZIL-3-({3-OKSO-4-[4-(5-OKSO-4,5-DIHIDRO -1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL)BENZIL]-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO)-3-OKSOPROPANOATA (9)

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

1.00 g (1.9 mmol) spojine **7** raztopimo v 20 mL piridina, nato zmes na ledeni kopeli ohladimo na -10 °C in med mešanjem postopoma dodamo 0.19 mL (1.9 mmol) etilkloroformata raztopljenega v 5 mL piridina ter pustimo mešati 30 minut pri tej temperaturi. Nato odstavimo kopel ter pustimo, da se temperatura dvigne do sobne temperature in segrevamo ob vrenju, dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Reakcijsko zmes ohladimo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Oljni preostanek prelijemo z dietiletrom in izpadli produkt (spojino **9**) odfiltriramo. Spojino dodatno čistimo s spiranjem z dietiletrom.

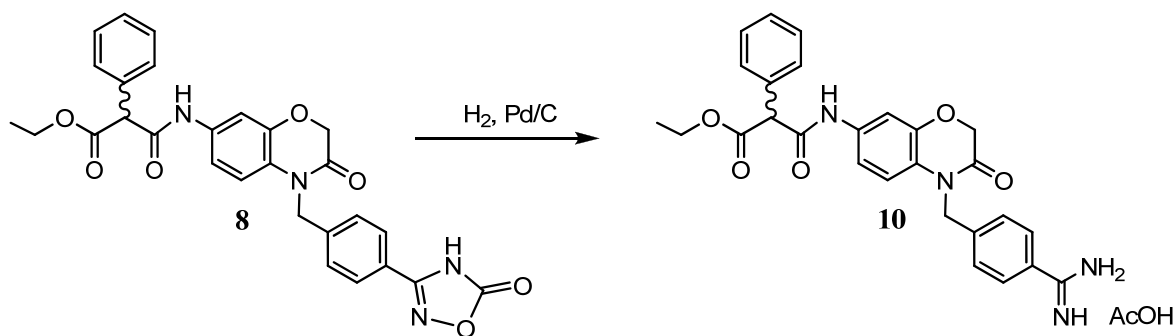
**REZULTATI:****Izgled:** belo-rumeni kristali**Izkoristek:** 81.8 % (0.86 g)**Rf:** 0.41 (MF2)**Tališče:** 173-177 °C**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3413, 1734, 1616, 1510, 1403, 1149, 1049, 894, 808, 749, 609.**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

δ [ppm] = 1.11 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
3.06-3.11 (m, 2H, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
3.86 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
4.07 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
4.79 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
5.22 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
6.93 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
7.06 (dd, 1H,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 2.2$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
7.13-7.27 (m, 5H, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
7.32 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
7.45 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz, (4-oks)-Ar-H)  
7.68 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz, (4-oks)-Ar-H)  
10.39 (s, 1H, -CONH-)  
11.11 (rs, 1H, oksadiazolinonski NH).

**MS (ESI):** 515 (MH<sup>+</sup>-CO), **Mr (izračunana):** 542**Elementna sestava:** C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

#### 4.10 SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO)]-3-OKSOPRO- PANOATA V OBLIKI ACETATA (10)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.50 g (0.1 mmol) spojine **8** raztopimo v 20 mL očetne kisline in prepriamo z argonom. Dodamo katalizator Pd/C (10 % mase spojine) in še enkrat prepriamo z argonom. Pri sobni temperaturi ob mešanju uvajamo vodik v bučko, opremljeno z balonom, napolnjenim z vodikom. Po končani reakciji dodani Pd/C odfiltriramo s presesavanjem in uparimo matičnico pod znižanim tlakom. Oljni preostanek prelijemo z dietiletom in izpadli produkt (spojino **10**) odfiltriramo. Spojino dodatno čistimo s spiranjem z dietiletom.

##### REZULTATI:

**Izgled:** bež kristali

**Izkoristek:** 77.3 % (0.40 g)

**Rf:** 0.72 (MF5), orositveni reagent: ninhidrin

**Tališče:** 123-126 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3412, 1676, 1616, 1513, 1405, 1329, 1223, 1150, 1051, 937, 896, 807, 727, 621, 539.

##### <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

$\delta$  [ppm] = 1.28 (t, 3H,  $J = 6.9$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COOH)  
 4.26 (q, 2H,  $J = 6.9$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.61 (s, 1H, -CHPh)  
 4.71 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
 5.20 (AB sistem, 2H,  $J = 10.8$  Hz, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 6.74 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)

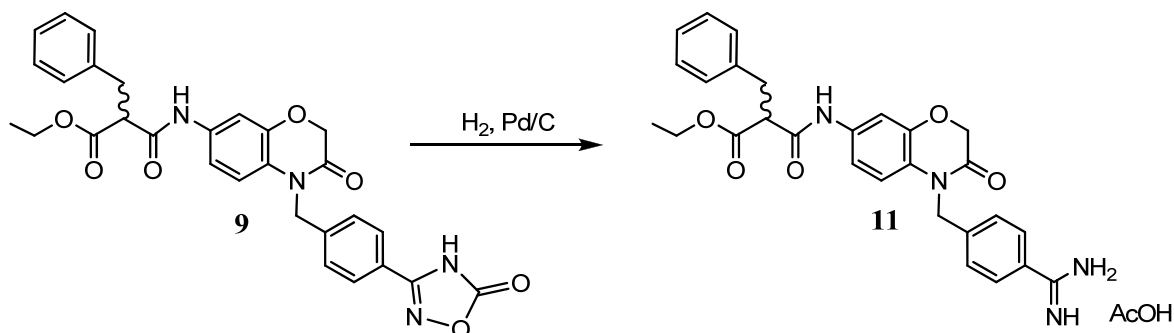
7.03 (dd, 1H,  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 1.8$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.25-7.38 (m, 6H, -Ph + Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.43 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, (4-amidino)-Ar-H)  
 7.59 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, (4-amidino)-Ar-H)  
 9.09 (s, 1H, -CONH-).

**MS (ESI):** 487 (MH<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>COOH), **Mr (izračunana):** 546, **Mr (M-CH<sub>3</sub>COOH):** 486  
**HR-MS:** 486.1966 (izračunana: 486.1981)

**Elementna sestava:** C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

#### 4.11 SINTEZA ETIL 2-BENZIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO)]-3-OKSO-PROPANOATA V OBLIKI ACETATA (11)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.82 g (1.5 mmol) spojine **9** raztopimo v 25 mL oetne kisline in prepriamo z argonom. Dodamo katalizator Pd/C (10 % mase spojine) in še enkrat prepriamo z argonom. Pri sobni temperaturi ob mešanju uvajamo vodik v bučko, opremljeno z balonom, napoljenim z vodikom. Po končani reakciji dodani Pd/C odfiltriramo s presesavanjem in uparimo matičnico pod znižanim tlakom. Oljni preostanek prelijemo z dietiletrom in izpadli produkt (spojino **11**) odfiltriramo. Spojino dodatno čistimo s spiranjem z dietiletrom.

##### REZULTATI:

**Izgled:** bež kristali

**Izkoristek:** 77.8 % (0.65 g)

**Rf:** 0.73 (MF5), orositveni reagent: ninhidrin

**Tališče:** 146-150 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3412, 1685, 1615, 1513, 1405, 1233, 1150, 1051, 895, 809, 752, 700, 619, 539.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

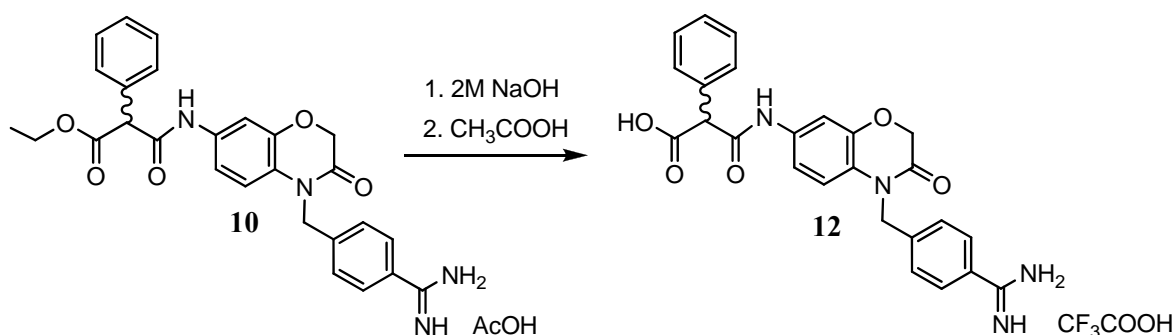
$\delta$  [ppm] = 1.11 (t, 3H,  $J = 6.9$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 1.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COOH)  
 3.10 (d, 2H,  $J = 7.0$  Hz, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
 3.88 (t, 1H,  $J = 7.0$  Hz, -CHCH<sub>2</sub>Ph)  
 4.07 (q, 2H,  $J = 6.9$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.77 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
 5.13 (AB sistem, 2H,  $J = 20.4$  Hz, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 6.93 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.05 (dd, 1H,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.17-7.28 (m, 6H, -CHCH<sub>2</sub>Ph + Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.35 (d, 2H,  $J = 7.8$  Hz, (4-amidino)-Ar-H)  
 7.61 (d, 2H,  $J = 7.8$  Hz, (4-amidino)-Ar-H)  
 10.43 (s, 1H, -CONH-).

**MS (ESI):** 501 (MH<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>COOH), **Mr (izračunana):** 560, **Mr (M-CH<sub>3</sub>COOH):** 500

**HR MS:** 500.2143 (izračunana: 500.2151)

**Elementna sestava:** C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

**4.12 SINTEZA 2-FENIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSO-PROPANOJSKA KISLINA V OBLIKI TRIFLUOROACETATA (12)**

**REAKCIJA:****POSTOPEK:**

0.35 g (0.6 mmol) spojine **10** raztopimo v 10 mL etanola, dodamo 0.64 mL (1.3 mmol) 2M NaOH in mešamo pri sobni temperaturi, dokler s tankoplastno kromatografijo ne



detektiramo konca poteka reakcije. Reakcijski zmesi po končani hidrolizi delno uparimo topilo (do približno 1/3 volumna) in dodamo 3 ekvivalente očetne kisline ter pustimo štiri dni pri 4 °C. Izpadle kristale (spojino **12**) odfiltriramo in speremo z etrom. Spojino dodatno čistimo s pomočjo flash kromatografije z uporabo reverzne stacionarne faze (Isolera One).

**REZULTATI:****Izgled:** rjavi kristali**Izkoristek:** 14.6 % (0.05 g)**Rf:** 0.39 (MF12), orositveni reagent: ninhidrin, bromkrezol zeleno**Tališče:** /**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3428, 1640, 1560, 1412, 1187, 1123, 1104, 1051, 1020, 926, 807, 644, 522.**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** Opomba: zaradi nečiste spojine NMR ni zanesljivδ [ppm] = 4.74 (s, 1H, -CHPh)4.78 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)5.17 (AB sistem, 2H, *J* = 12.3 Hz, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)6.92 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, Ar-H<sub>5</sub>)7.06 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.2 Hz, Ar-H<sub>6</sub>)7.25-7.40 (m, 6H, -Ph + Ar-H<sub>8</sub>)7.80 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, (4-amidino)-Ar-H)7.92 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, (4-amidino)-Ar-H)

10.35 (s, 1H, -CONH-)

12.68 (rs, 1H, -COOH).

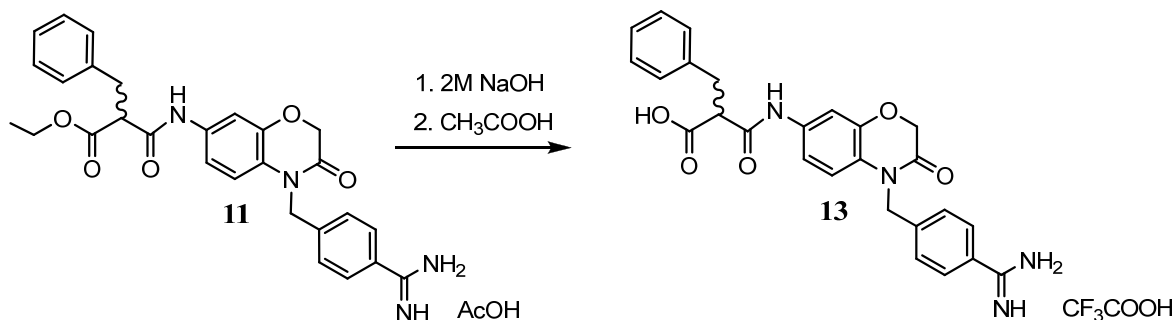
**MS (ESI):** 459 (MH<sup>+</sup>-CF<sub>3</sub>COOH), **Mr (izračunana):** 572, **Mr (M-CF<sub>3</sub>COOH):** 458**HR-MS:** 458.1657 (izračunana: 458.1668)**Elementna sestava:** C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub>**HPLC:** *pogoji:* gradient = 10 % - 75 % (0.1 % TFA - acetonitril) v 15 min,

pretok = 1.2 mL/min, V = 10 μl, λ = 220 nm, kolona z reverzno stacionarno fazo

*vsebnost:* 51.06 % (t<sub>r</sub> = 9.703)

#### 4.13 SINTEZA 2-BENZIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSO-PROPANOJSKA KISLINA V OBLIKI TRIFLUOROACETATA (13)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.61 g (1.1 mmol) spojine **11** raztopimo v 10 mL etanola, dodamo 1.1 mL (2.2 mmol) 2M NaOH in mešamo pri sobni temperaturi, dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Reakcijski zmesi po končani hidrolizi delno uparimo topilo (do približno 1/3 volumna) in dodamo 3 ekvivalente očetne kisline ter pustimo štiri dni pri 4 °C. Izpadle kristale (spojino **13**) odfiltriramo in speremo z dietiletom. Spojino dodatno čistimo s pomočjo flash kromatografije z uporabo reverzne stacionarne faze (Isolera One). Čisto spojino **13** sušimo v vakuumu.

##### REZULTATI:

**Izgled:** rumeni kristali

**Izkoristek:** 20.2 % (0.13 g)

**Rf:** 0.68 (MF7), orositveni reagent: ninhidrin, bromkrezol zeleno

**Tališče:** 114-117 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 1641, 1409, 1202, 1141, 1052, 896, 798, 700, 620.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

- δ [ppm] = 3.08 (d, 2H,  $J = 7.2$  Hz, -CHCH<sub>2</sub>Ph)
- 3.68 (t, 1H,  $J = 7.5$  Hz, -CHCH<sub>2</sub>Ph)
- 4.79 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)
- 5.13 (AB sistem, 2H,  $J = 10.8$  Hz, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)
- 6.92 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)
- 7.03 (dd, 1H,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)
- 7.16-7.25 (m, 5H, -CHCH<sub>2</sub>Ph)
- 7.28 (d, 1H,  $J = 2.1$  Hz, Ar-H<sub>8</sub>)

7.43 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, (4-amidino)-Ar-H)  
 7.64 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, (4-amidino)-Ar-H)  
 8.46 (rs, 1H, -C(=NH)NH<sub>2</sub>)  
 10.09 (s, 1H, -CONH-)  
 10.90 (rs, 1H, CF<sub>3</sub>COOH)  
 12.75 (rs, 1H, -COOH).

**MS (ESI):** 473 (MH<sup>+</sup>-CF<sub>3</sub>COOH), **Mr (izračunana):** 586, **Mr (M-CF<sub>3</sub>COOH):** 472

**HR-MS:** 472.1816 (izračunana: 472.1825)

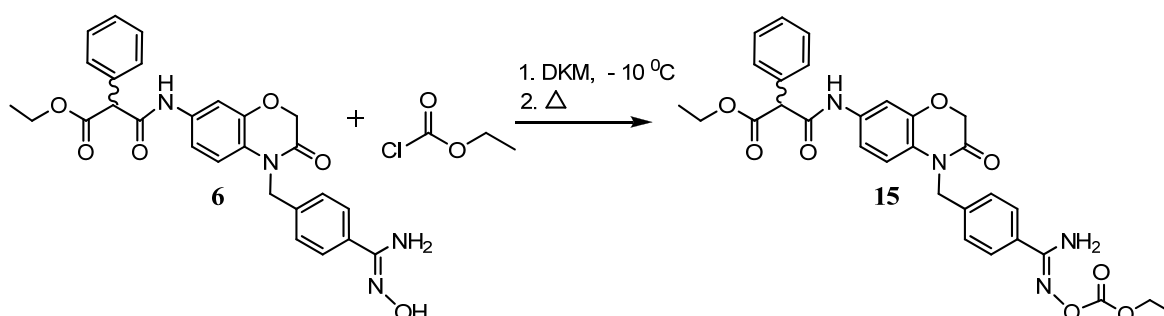
#### Elementna sestava:

<b>C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub> x 0.9 CF<sub>3</sub>COOH</b>	<b>izračunana</b>	<b>dobljena</b>
<b>% C</b>	51.94	52.05
<b>% H</b>	3.79	3.88
<b>% N</b>	8.13	8.27

**HPLC:** *pogoji:* gradient = 10 % - 75 % (0.1 % TFA - acetonitril) v 15 min,  
 pretok = 1.2 mL/min, V = 10 µl, λ = 220 nm, kolona z reverzno stacionarno fazo  
 vsebnost: 95.01 % (t<sub>r</sub> = 9.138)

#### 4.14 SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[(4-{4-[N-(ETOKSIKARBONILOKSI)KARBAMIDOIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOATA (15)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.45 g (0.9 mmol) spojine **6** raztopimo v brezvodnem diklorometanu (14 mL), nato zmes na ledeni kopeli ohladimo na -10 °C in med mešanjem postopoma dodamo trietilamin (1.35 mL, 0.9 mmol) ter etilkloroformat (0.9 mL, 0.9 mmol), raztopljen v brezvodnem diklorometanu (4 mL), in pri -10 °C pustimo mešati dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Nato odstavimo kopel in pustimo, da se temperatura

dvigne do sobne temperature. Reakcijski zmesi dodamo 10 mL brezvodnega diklorometana in spiramo z 10 % citrsko kislino (2 x 20 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Trden preostanek ločimo s kolonsko kromatografijo (MF3). Čisto spojino **15** sušimo pod vakuumom.

### REZULTATI:

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 87.0 % (0.45 g)

**Rf:** 0.64 (MF2), 0.30 (MF3)

**Tališče:** 172-175 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3419, 1764, 1638, 1618, 1543, 1513, 1406, 1369, 1244, 934, 620.

### <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

δ [ppm] = 1.16 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 1.25 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, -NOCOOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.13 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.19 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, -NOCOOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.78 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
 4.83 (s, 1H, -CHPh)  
 5.16 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 6.76 (s, 2H, -C(=NOCOOEt)NH<sub>2</sub>)  
 6.93 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.04 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.2 Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.30-7.36 (m, 5H, -Ph)  
 7.38 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, (4-CN(NH<sub>2</sub>)OCOOEt)-Ar)  
 7.41 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.62 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, (4-CN(NH<sub>2</sub>)OCOOEt)-Ar)  
 10.33 (s, 1H, -CONH-).

**MS (ESI):** 575 (MH<sup>+</sup>), **Mr (izračunana):** 574

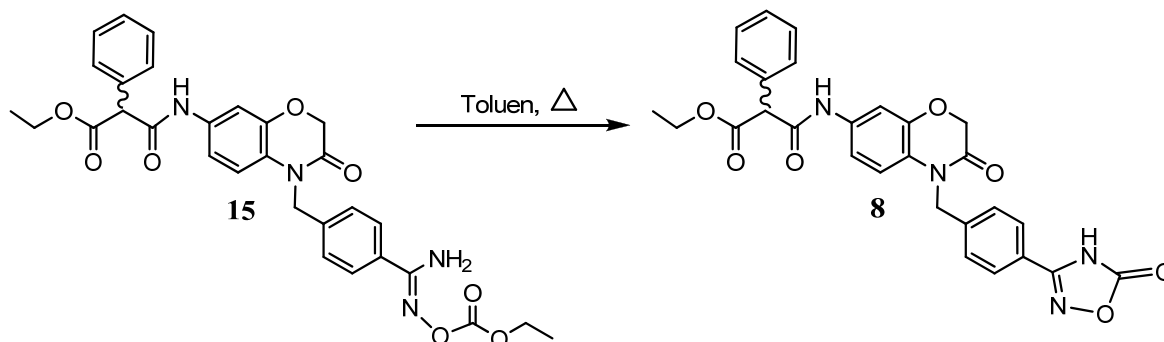
**HR-MS:** 574.2133 (izračunana: 574.2142)

### Elementna sestava:

C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	izračunana	dobljena
% C	62.71	62.75
% H	5.26	5.29
% N	9.75	9.62

#### 4.15 SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-({3-OKSO-4-[4-(5-OKSO-4,5-DIHIDRO-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL)BENZIL]-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO)-3-OKSOPROPANOATA (8)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.41 g (0.7 mmol) spojine **15** raztopimo v 10 mL toluena, prepriamo z argonom in segrevamo ob vrenju ( $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Reakcijsko zmes ohladimo in topilo uparimo. Trden preostanek ločimo s kolonsko kromatografijo. Najprej uporabimo MF13, nato pa združene frakcije še enkrat ločimo s kolonsko kromatografijo (MF14).

##### REZULTATI:

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 42.0% (0.16 g)

**Rf:** 0.38 (MF2)

**Tališče:**  $131\text{--}135\text{ }^{\circ}\text{C}$

**IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3410, 1720, 1674, 1603, 1505, 1330, 1215, 1140, 1015, 892, 815, 750, 650.

##### $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):

$\delta$  [ppm] = 1.18 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ )  
 4.13 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ )  
 4.79 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{CON}-$ )  
 4.92 (s, 1H,  $-\text{CHPh}$ )  
 5.20 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-(4\text{-CN})\text{-Ar}$ )  
 6.92 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, Ar- $\text{H}_5$ )  
 7.05 (dd, 1H,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, Ar- $\text{H}_6$ )  
 7.30-7.38 (m, 5H,  $-\text{Ph}$ )  
 7.45 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, (4-oks)-Ar-H)

7.42 (d, 1H,  $J = 2.1$  Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.76 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, (4-oks)-Ar-H)  
 10.34 (s, 1H, -CONH-)  
 12.93 (s, 1 H, oksadiazolinonski NH).

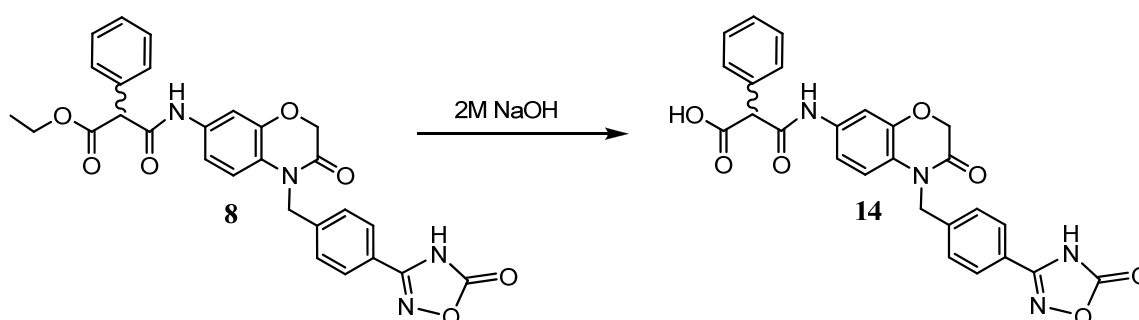
**MS (ESI):** 529 (MH<sup>+</sup>), **Mr (izračunana):** 528

**HR-MS:** 528.1733 (izračunana: 528.1723)

**Elementna sestava:** C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

#### 4.16 SINTEZA 2-FENIL-3-[3-OKSO-(4-{4-[5-OKSO-4,5-DIHDRO-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}-3,4-DIHDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOJSKA KISLINA (14)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.12 g (0.2 mmol) spojine **8** raztopimo v 5 mL dioksana, dodamo 0.2 mL 2 M NaOH in mešamo pri sobni temperaturi, dokler s tankoplastno kromatografijo ne detektiramo konca poteka reakcije. Reakcijski zmesi pri znižanem tlaku odparimo topilo in oljni zaostanek raztopimo v 30 mL vode. Nastalo raztopino ekstrahiramo z dietiletom (3 x 20 mL), vodno fazo pa nakisamo z 1 M HCl do pH 2. Izpadle kristale (spojino **14**) odfiltriramo in speremo z dietiletom.

##### REZULTATI:

**Izgled:** sivi kristali

**Izkoristek:** 88.0 % (0.10 g)

**Rf:** 0.68 (MF7), orositveni reagent: bromkrezol zeleno

**Tališče:** 135-139 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3416, 1774, 1666, 1514, 1407, 1331, 1223, 1148, 1052, 949, 897, 764, 701, 620.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 4.80 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
 4.92 (s, 1H, -CHPh)  
 5.20 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 6.92 (d, 1H,  $J = 9.0$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.07 (dd, 1H,  $J_1 = 9.0$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.30-7.42 (m, 6H, -Ph + Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.46 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, (4-oks)-Ar-H)  
 7.78 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, (4-oks)-Ar-H)  
 10.33 (s, 1H, -CONH-)  
 12.89 (s, 1 H, oksadiazolinonski NH).

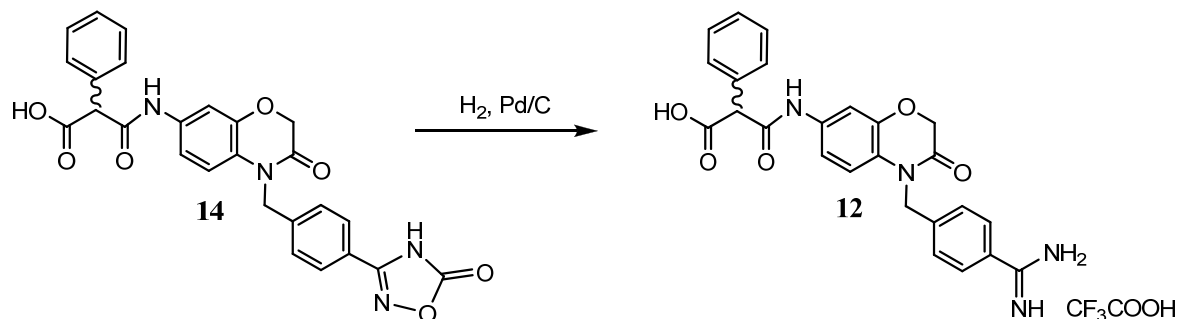
**MS (ESI):** 501 (MH<sup>+</sup>), **Mr (izračunana):** 500

**HRMS:** 500.1410 (izračunana: 500.1397)

**Elementna sestava:** C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

#### 4.17 SINTEZA 2-FENIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSO-PROPANOJSKA KISLINA V OBLIKI TRIFLUOROACETATA (12)

##### REAKCIJA:



##### POSTOPEK:

0.08 g (0.16 mmol) spojine **14** raztopimo v 5 mL očetne kisline in prepihomo z argonom. Dodamo katalizator Pd/C (20 % mase spojine) in še enkrat prepihomo z argonom. Pri sobni temperaturi ob mešanju uvajamo vodik v bučko, opremljeno z balonom, napolnjenim z vodikom. Po končani reakciji dodani Pd/C odfiltriramo s presesavanjem in uparimo matičnico pod znižanim tlakom. Oljni preostanek prelijemo z dietiletom in izpadli produkt (spojino **12**) odfiltriramo. Spojino dodatno čistimo s pomočjo flash kromatografije z uporabo reverzne stacionarne faze (Isolera One).

##### REZULTATI:

**Izgled:** rumeni kristali

**Izkoristek:** 10.9 % (0.01 g)

**Rf:** 0.43 (MF7), orositveni reagent: ninhidrin, bromkrezol zeleno

**Tališče:** 236-239 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3410, 1685, 1609, 1406, 1225, 1133, 1050, 935, 808, 712, 645, 529.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

δ [ppm] = 3.28 (s, 1H, -CHPh)

4.85 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)

5.28 (AB sistem, 2H, *J* = 12.6 Hz, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)

7.03 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, Ar-H<sub>5</sub>)

7.29 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.1 Hz, Ar-H<sub>6</sub>)

7.49-7.63 (m, 5H, -Ph)

7.75-7.78 (m, 3H, (4-amidino)-Ar-H + Ar-H<sub>8</sub>)

8.03 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, (4-amidino)-Ar-H)

9.15 (rs, 4H, -C(=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)NH<sub>2</sub>)

10.93 (s, 1H, -CONH-).

**MS (ESI):** 459 (MH<sup>+</sup>-CF<sub>3</sub>COOH), **Mr (izračunana):** 572, **Mr (M-CF<sub>3</sub>COOH):** 458

**HR-MS:** 458.1669 (izračunana: 458.1668)

**Elementna sestava:** C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub>

**HPLC:** *pogoji:* gradient = 20 % - 80 % (0.1 % TFA - acetonitril) v 30 min,

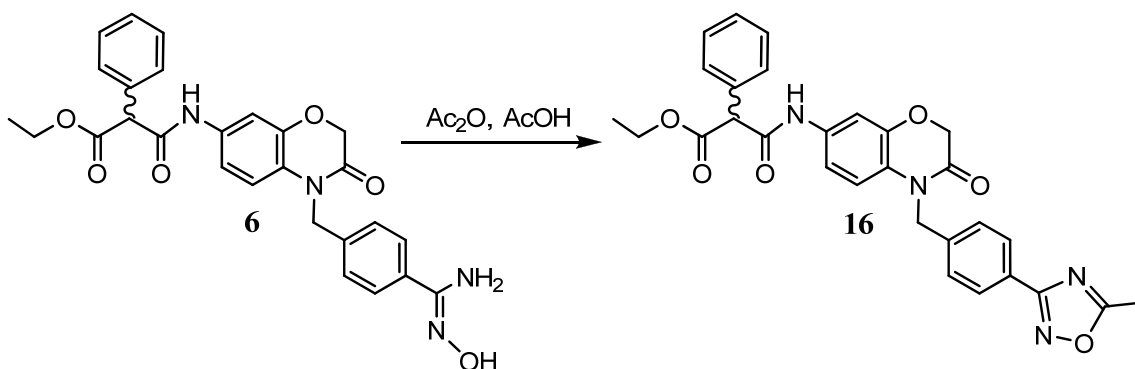
pretok = 1.2 mL/min, V = 20 μl, λ = 254 nm, kolona z reverzno stacionarno fazo

*vsebnost:* 95.85 % (t<sub>r</sub> = 12.498)

#### 4.18 SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[(4-{4-(5-METIL-1,2,4-OXSADIAZOL-3-IL) BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL)AMINO]-3-OKSOPROPANOATA (16)

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

0.20 g (0.4 mmol) spojine **6** raztopimo v 6 mL oetne kisline in ob mešanju počasi dodamo 0.15 mL (1.6 mmol) acetanhidrida ter pustimo mešati pri 60 °C 12 ur. Reakcijski zmesi pri znižanem pritisku odparimo topilo in trden preostanek ločimo s kolonsko kromatografijo (MF4). Čisto spojino **16** posušimo v vakuumu.

**REZULTATI:**

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 83.1 % (0.18 g)

**Rf:** 0.84 (MF2), 0.49 (MF4), 0.26 (MF6)

**Tališče:** 85-89 °C

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3326, 1736, 1685, 1610, 1513, 1405, 1364, 1265, 1218, 1153, 1051, 898, 743.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 1.16 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 2.65 (s, 3H, -NOC(CH<sub>3</sub>)N-)  
 4.13 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
 4.79 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
 4.84 (s, 1H, -CHPh)  
 5.20 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
 6.96 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
 7.05 (dd, 1H,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
 7.30-7.39 (m, 6H, -Ph + Ar-H<sub>8</sub>)  
 7.44 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, (4-oks)-Ar-H)  
 7.94 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, (4-oks)-Ar-H)  
 10.37 (s, 1H, -CONH-).

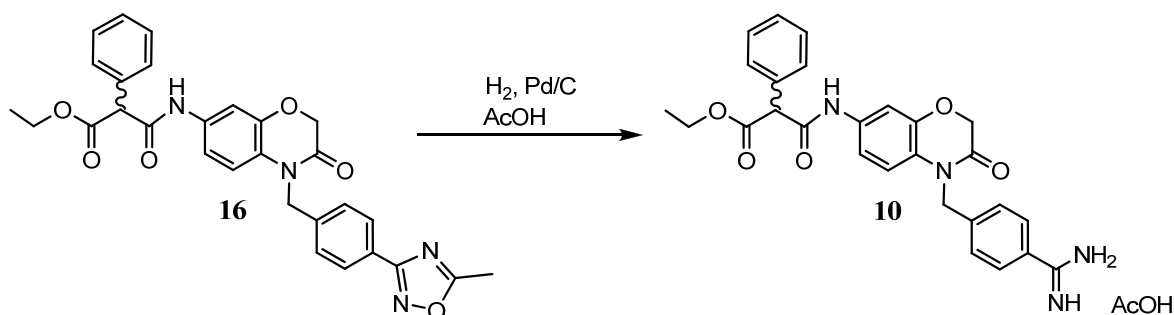
**MS (ESI):** 527 (MH<sup>+</sup>), **Mr (izračunana):** 526

**HR-MS:** 526.1926, (izračunana: 526.1931)

**Elementna sestava:**

$C_{29}H_{26}N_4O_6$	izračunana	dobljena
% C	66.15	65.88
% H	4.98	5.00
% N	10.64	10.35

**4.19 SINTEZA ETIL 2-FENIL-3-[(4-{4-[AMINO(IMINO)METIL]BENZIL}-3-OKSO-3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZIN-7-IL}AMINO)]-3-OKSO-PROPANOATA V OBLIKI ACETATA (10)**

**REAKCIJA:****POSTOPEK:**

0.14 g (0.27 mmol) spojine **16** raztopimo 5 mL oetne kisline in prepihamo z argonom. Dodamo katalizator Pd/C (30 % mase spojine) in še enkrat prepihamo z argonom. Pri temperaturi 60 °C ob mešanju uvajamo vodik v bučko, opremljeno z balonom, napolnjenim z vodikom. Po končani reakciji reakcijsko zmes ohladimo, dodani Pd/C odfiltriramo z odsesavanjem in matičnico uparimo pod znižanim tlakom. Oljni preostanek prelijemo z dietiletrom in izpadle kristale odfiltriramo. Kristale dodatno spiramo z vodo in nastali raztopini pri znižanim pritiskom odparimo topilo. Dodatno čistimo spojino **10** s spiranjem z diklorometanom in dietiletrom.

**REZULTATI:**

**Izgled:** rjavi kristali

**Izkoristek:** 12.2% (0.02 g)

**Rf:** 0.06 (MF12), orositveni reagent: ninhidrin

**Tališče:** /

**IR (KBr,  $cm^{-1}$ ):** /

**$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):**

$\delta$  [ppm] = 1.24 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz,  $-COOCH_2CH_3$ )

1.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COOH)  
4.23 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
4.74 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CON-)  
4.81 (s, 1H, -CHPh)  
5.31 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-(4-CN)-Ar)  
6.45 (s, 2H, -C(=NH)NH<sub>2</sub>)  
6.91 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>)  
7.09 (dd, 1H,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>)  
7.31-7.46 (m, 5H, -Ph)  
7.51 (d, 1H,  $J = 2.1$  Hz, Ar-H<sub>8</sub>)  
7.76 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, (4-amidino)-Ar-H)  
7.85 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, (4-amidino)-Ar-H)  
10.33 (s, 1H, -CONH-).

**MS (ESI):** 487 (MH<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>COOH), **Mr (izračunana):** 546, **Mr (M-CH<sub>3</sub>COOH):** 486

**HR-MS:** 486.1992 (izračunana: 486.1981)

**Elementna sestava:** C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo izvedli:

- Optimizacijo že znane sintezne poti spojine **13**, ki je opisana v literaturi.<sup>[8]</sup>
- Iskali smo optimalno sintezno pot spojine **12**

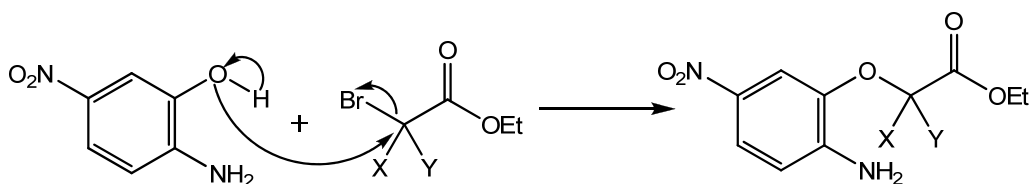
### 5.1 OPTIMIZACIJA ŽE ZNANE SINTEZNE POTI SPOJINE 13

#### 5.1.1 Prva stopnja sinteze – sinteza benzoksazinskega obroča (spojina 1)

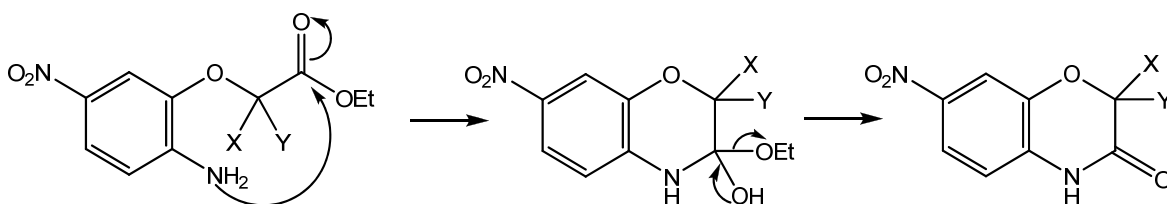
Pri pripravi končnih spojin smo v diplomskem delu najprej sintetizirali ustrezne benzoksazinske sintone, ki predstavljajo osnovno ogrodje zelenih spojin. Pripravili smo ga po znanem sinteznem postopku iz 2-amino-5-nitrofenola in etilbromoacetata s KF kot katalizatorjem.<sup>[8]</sup> Pri reakciji gre za dvojno nukleofilno substitucijo.

Mehanizem reakcije je sledeč:

1. Najprej poteče reakcija O-alkiliranja med hidroksilno skupino 2-amino-5-nitrofenola in aktiviranim kvarternim C-atomom acetata z izstopom HBr v prisotnosti kalijevega fluorida.



2. V naslednji stopnji poteče nukleofilna adicija amino skupine nastalega derivata 2-amino-5-nitrofenola na karbonylni C-atom etilbromoacetata (*in situ* intramolekularna ciklizacija):



X: H, Y: H

Obe stopnji sta termodinamsko ugodni, saj sta tako bromo- kot etoksi- skupina dobro izstopajoči skupini, poleg tega ima nastali obročni sistem stabilno konformacijo. Natančen mehanizem tvorbe etrov s kalijevim fluoridom ni znan, predvidevajo pa nastanek kompleksov s fluoridnimi ioni kot intermediati.<sup>[30]</sup>

Pri sintezi benzoksazinov bi v prvi stopnji lahko reagirali obe nukleofilni skupini 2-amino-5-nitrofenola, kar bi vodilo do nastanka N-, O-dialkiliranega stranskega produkta, vendar smo se temu izognili z izbiro primerne topila (DMF), z dodatkom enega ekvivalenta etilbromoacetata in dodatkom močno bazičnega KF, ki s selektivno odtegnitvijo protona poveča nukleofilnost hidroksilne skupine. Nastali produkt smo ustrezno očistili s prekristalizacijo iz etanola. Spojino **1** smo sintetizirali brez posebnih zapletov in z enakim izkoristkom (81%), kot je zapisan v literaturi.<sup>[8]</sup> Strukturo smo potrdili z NMR, IR, MS in HRMS.

### 5.1.2 Druga stopnja sinteze – alkiliranje 2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-onov (spojina 2)

Alkiliranje obročnega amidnega dušikovega atoma je pomemben sintezni pristop za uvedbo raznih fragmentov in funkcionalnih skupin v 2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-onski sistem. V splošnem lahko alkiliramo amide na najrazličnejše načine, ki jih izberemo glede na njihove prednosti in slabosti. Za alkiliranje 2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-onskega sistema smo uporabili preprost in učinkovit postopek alkiliranja z reakcijo faznega prenosa.<sup>[8,31]</sup> Alkiliranje izvajamo z 7-nitro-2*H*-1,4-benzoksazin-3(4*H*)-onom (spojina **1**) in 4-(bromometil)benzonitrilom (alkil halid) ob prisotnosti kalijevega karbonata in benziltriethylamonijevega klorida v acetonitrilu. Derivat benzoksazinona in alkilirno sredstvo sta raztopljena v acetonitrilu, medtem ko kalijev karbonat, ki omogoča odcepitev protona s –CONHR skupine in nukleofilni napad nastalega aniona na elektropozitiven ogljikov atom alkil halida, predstavlja drugo (trdno) fazo reakcijskega sistema. Benziltriethylamonijev klorid služi kot katalizator faznega prenosa, ki omogoča stik obeh faz in pospešuje izmenjavo protona.<sup>[32]</sup> Reakcijo faznega prenosa smo uspešno uporabili pri sintezi *N*-alkiliranega benzoksazina- 4-[(7-nitro-3-okso-2,3-dihidro-4*H*-1,4-benzoksazin-4-il)metil]benzonitrila (spojina **2**), ki je potekla z visokim izkoristkom (79.3%) in brez nastanka stranskih produktov, zaradi česar smo produkt izolirali le z ekstrakcijo. Najprej s spiranjem z 10 % citrsko kislino, nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo ugotovili, da je zaostalo nekaj naše spojine v vodnih fazah, zato smo jih dodatno ekstrahirali z organskim topilom. Iz tega razloga je tudi izkoristek te stopnje za 5 % nižji kot navaja literatura.<sup>[8]</sup> Strukturo spojine **2** smo potrdili z NMR, IR, MS, HRMS.

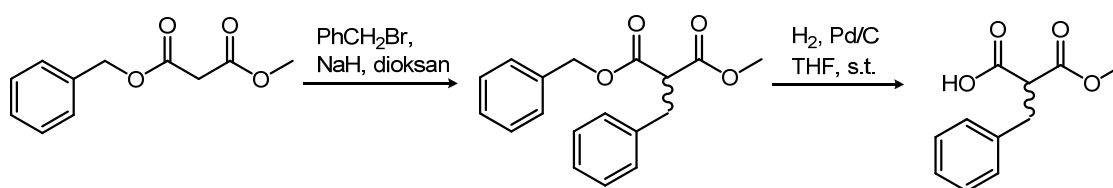
### 5.1.3 Tretja stopnja sinteze – redukcija nitro skupine (spojina 3)

Reakcijo redukcije nitro skupine do amino skupine smo izvajali s katalitskim hidrogeniranjem z uporabo paladija na ogljiku kot katalizatorja. Izvedba reakcije zahteva nekaj več pozornosti zaradi uporabe izredno reaktivnega katalizatorja. Reakcije redukcije nitro skupine s katalitskim hidrogeniranjem veljajo za precej kvantitativne reakcije z

visokimi izkoristki. Med potekom reakcije se je pojavljala le ena lisa na TLC-kromatogramu, ki je bila nižje od izhodne spojine, saj daje amino skupina večji prispevek k polarnosti spojine kot nitro skupina. Kot topilo smo uporabili brezvodni DMF, ker lahko prisotna voda v reakcijski zmesi zmanjša reaktivnost katalizatorja. DMF je imel tako dobre kot tudi slabe lastnosti: omogočil je odlično raztapljanje izhodne spojine in hiter potek redukcije, pri čemer ni bilo potrebno dodajati katalizatorja. Nekaj več težav smo imeli z odstranjevanjem katalizatorja po končani reakciji. Ugotovili smo, da je najbolje reakcijsko zmes filtrirati preko vate in stolpca silikagela. Izkoristek redukcije je bil enak izkoristku v literaturi (74 %).<sup>[8]</sup> Strukturo spojine **3** smo potrdili z NMR, IR, MS in HRMS. S tem smo za sintezo spojin **12** in **13** po načrtu 1 v treh stopnjah brez težav in z visokim izkoristkom pripravili distančnik **3** potencialnih modulatorjev vitronektinskih receptorjev.

#### 5.1.4 Četrta stopnja sinteze – tvorba amidne vezi (spojina **5**)

Na stopnji tvorbe amida smo sintezo po načrtu 1 optimizirali tako, da smo izvajali reakcijo aminolize estra. S tem smo skrajšali naše delo za dve stopnji, saj ni bilo potrebno sintetizirati fragmenta 2-benzil 3-metoksi-3-oksopropanojske kisline (slika 13). Za tvorbo amida spojine **5** smo namesto tega fragmenta uporabili reagent dietil 2-benzilmalonat in pripravljeno spojino **3**.



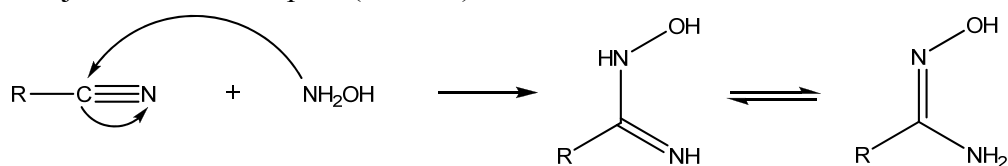
Slika 13: Sintezna pot 2-benzil 3-metoksi-3-oksopropanojske kisline

Reakcijo smo izvedli v mikrovalovnem reaktorju pri temperaturi 120 °C in tlaku 18 barov. Reakcija aminolize estra je ugodna zato, ker ni potrebno najprej pripraviti spojine s prosto karboksilno skupino in le-to nato aktivirati z aktivirnimi sredstvi, kot so EDC in DCC. Prosta aminska skupina se pri povišani temperaturi najprej adira na karbonilni C-atom esterske skupine, iz nastalega intermedija pa izstopi OEt skupina. Pri tem nastane amid (spojina **5**) in etanol. Pogoj za takšno izbiro tvorbe amida je termostabilnost obeh reagentov, saj reakcija poteka pri visoki temperaturi. Za to reakcijo smo se odločili, ker poteče zelo hitro (15 min), izolacija je zelo enostavna, pri čemer čiščenja ni bilo potrebno izvajati. Čistoto spojine **5** smo potrdili z elementno analizo in temperaturo tališča. Pri ostalih reakcijah tvorbe amida je potrebno produkt čistiti bodisi s kolonsko kromatografijo bodisi z ekstrakcijo. V našem primeru pa je bila izolacija hitra in enostavna, pri čemer smo reakcijsko zmes prelili s petroletrom, v katerem je bil malonat topen, želeni produkt pa se je oboril. Spojino **5** smo uspeli pripraviti z visokim izkoristkom (81 %), zato je ta sintezna

pot tvorbe amida veliko primernejša kot po načrtu 1, po katerem so pripravili amid z le 33 % izkoristkom.

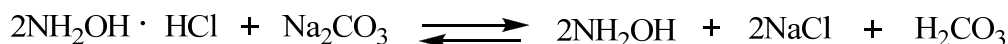
### 5.1.5 Peta stopnja sinteze – sinteza amidoksima (spojina 7)

Na pripravljenem nitrilu spojine **5** smo izvajali reakcijo tvorbe amidoksima. Amidoksimi se lahko uporabljajo kot oblika predzdravil, ki se v telesu reduktivno presnavljajo do aktivnega amidina in tako lahko služijo kot kationski center antagonistov integrinskega receptorja. Najbolj pogost način priprave amidoksimov je adicija hidroksilamina na polarno trojno vez ciano skupine (slika 14).<sup>[33]</sup>



Slika 14: Adicija hidroksilamina na ciano skupino

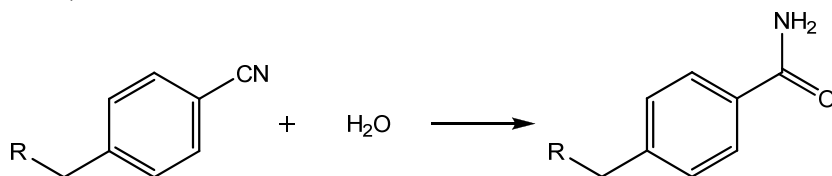
V prvi stopnji smo hidroksilamonijev klorid z bazo pretvorili v prosto obliko. Sledila je nukleofilna adicija hidroksilamina na ciano skupino izhodne spojine **5** in s tem sinteza ustreznega amidoksima (spojina **7**). V originalnem predpisu se kot baza uporablja  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  v več kot 3-kratnem prebitku glede na izhodno spojino in v ekvivalentni količini s hidroksilamonijevim hidrokloridom.<sup>[33]</sup> Pri pretvorbi hidroksilamonijevega hidroklorida v prosto obliko pride do nastanka ogljikove kisline:



Ogljikova kislina pa daje ravnotežno reakcijo s  $\text{CO}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ :



Prisotna voda v reakcijski zmesi pri  $50\text{ }^\circ\text{C}$  pa je lahko vzrok za nastanek stranskega produkta (slika 15).



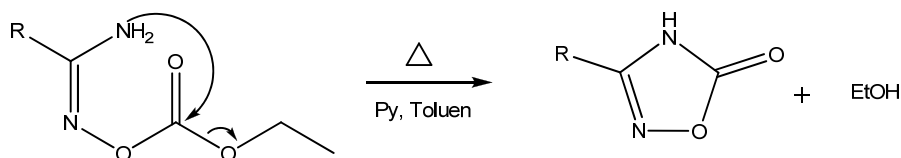
Slika 15: Hidroliza ciano skupine do amidne skupine

Zato smo namesto  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  uporabili  $\text{Et}_3\text{N}$ . V reakciji  $\text{Et}_3\text{N}$  in  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  ne nastaja voda in smo s tem izključili možnost nastanka karboksamida iz ciano skupine izhodne spojine. Reakcijo tvorbe spojine **7** smo zaradi prisotnega etilnega estera na malonatu izvajali

v brezvodnem etanolu in ne v metanolu kot opisuje načrt 1.<sup>[8]</sup> Uporaba metanola kot topila bi lahko povzročila preestrenje karboksilne skupine na malonatu, pri čemer bi nastal metilni ester. Zaradi visoke higroskopnosti hidroksilamina v obliki hidroklorida, ki je kot tak komercialno dostopen zaradi večje stabilnosti, je priporočljivo reagent pred reakcijo dodatno posušiti. Reakcija je potekla po 24 urah brez posebnih težav, seveda z upoštevanjem prej navedenih pogojev. Po končani reakciji smo uparili topilo in zaostanek raztopili v diklorometanu. Po prelitju zaostanka z diklorometanom so izpadli drobni kristali nezreagirane hidroksilamonijevega klorida ali  $\text{Et}_3\text{NH}^+\text{Cl}^-$ , ki je nastal pri reakciji hidroksilamonijevega klorida in  $\text{Et}_3\text{N}$ . Organsko fazo smo nato spirali z 10 % citronske kisline in s tem odstranili nezreagiran  $\text{NH}_2\text{OH}$ . Reakcija tvorbe spojine **7** je potekla z visokim izkoristkom (88 %) in brez nastanka stranskih produktov. Če primerjamo dobljeni izkoristek z izkoristkom podobne spojine (karboksilna skupina je zaščitena z metilnim estrom) pridobljene po načrtu 1 (78 %), ugotovimo, da je izkoristek naše reakcije višji. Z izbiro etilne skupine kot zaščite karboksilne skupine smo na tej stopnji uspeli izboljšati izkoristek reakcije. Strukturo spojine **7** smo potrdili z NMR, IR, MS in HRMS.

### 5.1.6 Šesta stopnja sinteze – sinteza 1,2,4-oksadiazolin-5(4*H*)-ona (spojina **9**)

1,2,4-Oksadiazolin-5-oni so zaščitne skupine za amidine, lahko pa nastopajo tudi kot oblika predzdravila, saj se v jetrih presnovijo do amidinov. Spojino **9** smo pripravili po splošnem predpisu tvorbe 1,2,4-oksadiazolin-5(4*H*)-onov v piridinu.<sup>[8,33]</sup> Izhodni amidoksim **7** smo O-acilirali z etil kloroformatom. Reakcijo aciliranja izvedemo pri nizki temperaturi ( $-10\text{ }^\circ\text{C}$ ), da zagotovimo selektivnost aciliranja. Reakcijo smo izvajali v brezvodnem piridinu 1 uro, pri čemer dobljenega produkta nismo izolirali in smo po tem, ko smo s TLC detektirali konec poteka reakcije, izvedli ciklizacijo do oksadiazolinona ob vrenju v piridinu. Pri reakciji gre za tvorbo cikličnega karbamata (slika 16). Spojino **9** smo sintetizirali brez posebnih zapletov z visokim izkoristkom (82 %), strukturo pa potrdili z NMR, IR in MS. Analogno spojino (zaščita karboksilne skupine v obliki etilnega estra je zamenjana z metilnim estrom) so pripravili po enakem sinteznem postopku, po načrtu 1, z izkoristkom 67 %. Zaščita karboksilne skupine v obliki etilnega estra vpliva na boljši potek reakcije.



Slika 16: Mehanizem tvorbe 1,2,4-oksadiazolin-5(4*H*)-onskega obroča



### 5.1.7 Sedma stopnja sinteze – sinteza amidinov (spojina 11)

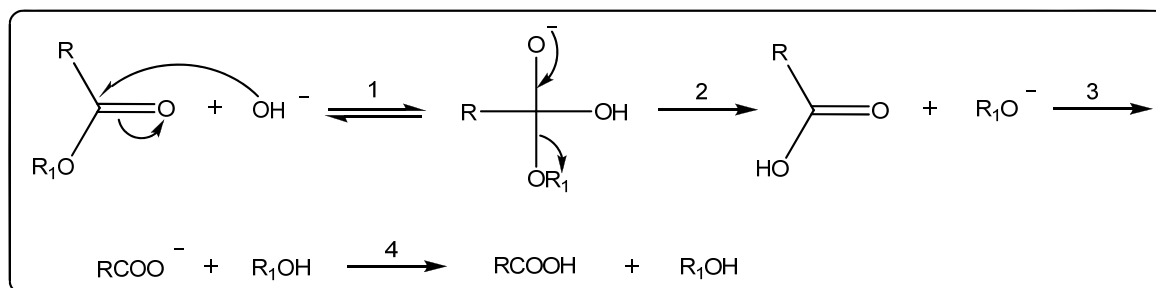
V okviru diplomskega dela smo amidine pripravljali po treh sinteznih postopkih, in sicer pod pogoji Pinnerjeve sinteze, z redukcijo 1,2,4-oksadiazol-5(4*H*)-onov in z redukcijo 5-metil-1,2,4-oksadiazolov.

Amidin (spojino **11**) smo pripravili s katalitskim hidrogeniranjem 1,2,4-oksadiazolin-5-onov v očetni kislini.<sup>[8]</sup> Kot alternativno možnost bi lahko uporabili redukcijo 1,2,4-oksadiazolin-5-ona z Zn v očetni kislini ali z železovimi opilki v HCl. Kot možnost priprave amidinov je v literaturi opisan postopek redukcije 1,2,4-oksadiazolin-5-ona z amonijevim formatom pri povišani temperaturi.<sup>[3]</sup> Spojini **9** smo fragment 1,2,4-oksadiazolin-5-on v očetni kislini reducirali v amidin **11**. Kot katalizator smo uporabili paladij na ogljiku (10 ut %). Ponovno zahteva izvedba reakcije nekaj več pozornosti zaradi uporabe zelo reaktivnega katalizatorja. Reakcija redukcije oksadiazolinona **9** v amidin **11** je potekla v 5 dneh, brez stranskih produktov in z visokim izkoristkom (78 %). S pomočjo MS in NMR spektra smo ugotovili, da reakcija poteka najprej do nastanka amidoksima, ki se reducira v amidin. Očetna kislina se je izkazala kot ustrezno topilo, saj je redukcija potekla dokaj hitro in kvantitativno. Spojino **11** smo uspeli pripraviti z izkoristkom, podobnim kot so po načrtu 1 pripravili analogno spojino. Strukturo spojine **11** smo potrdili z NMR, IR, MS in HRMS.

### 5.1.8 Osma stopnja sinteze – hidroliza estra (spojina 13)

Hidrolize estrov so nezapletene nukleofilne substitucije. Večinoma so kislinsko ali bazično katalizirane, lahko pa potekajo v prisotnosti nukleofilov ali encimov. Kot topilo se uporabljajo dioksan, THF, voda, etanol. Alkalna hidroliza poteka po naslednjem mehanizmu (slika 17):

1. napad nukleofilne -OH skupine na estrsko karbonilno skupino,
2. prerazporeditev elektronov, kar vodi do nastanka kisline in alkoholatnega aniona,
3. ireverzibilen nastanek karboksilatnega aniona in alkohola,
4. pretvorba soli karboksilne kisline v nedisociirano obliko v kislem.<sup>[34]</sup>



Slika 17: Mehanizem alkalne hidrolize

Zaradi slabe topnosti spojine **13** smo kot topilo v reakciji hidrolize estrov uporabili etanol. Teorija opredeli alkalno hidrolizo kot ravnotežno reakcijo, v kateri nastajata karboksilna kislina in alkohol.<sup>[34]</sup> Čeprav smo izvajali reakcijo v topilu, ki pravzaprav predstavlja enega od produktov reakcije in zato vpliva na pomik ravnotežja v smeri nastanka reaktantov, je reakcija hidrolize potekala kvantitativno. Ob dodatku 2-3 ekvivalentov očetne kisline smo nevtralizirali natrijev hidroksid in pretvorili dobljeni amidin v ustrezni acetat, ki je čez čas izpadel v obliki oborine. Oborino (spojino **13**) smo odfiltrirali in spirali s hladnim etanolom. Pri tem pa se je etanol pokazal kot neustrezno topilo, saj se je pojavil v izpadli oborini tudi natrijev acetat, ki smo ga z orositvenim reagentom bromkrezol zelenim detektirali na kromatografski ploščici (nastala je modro obarvana lisa z  $R_f = 0.40$  v MF7). Spojino **13** smo čistili s flash kromatografijo z uporabo reverzne stacionarne faze (Isolera One).

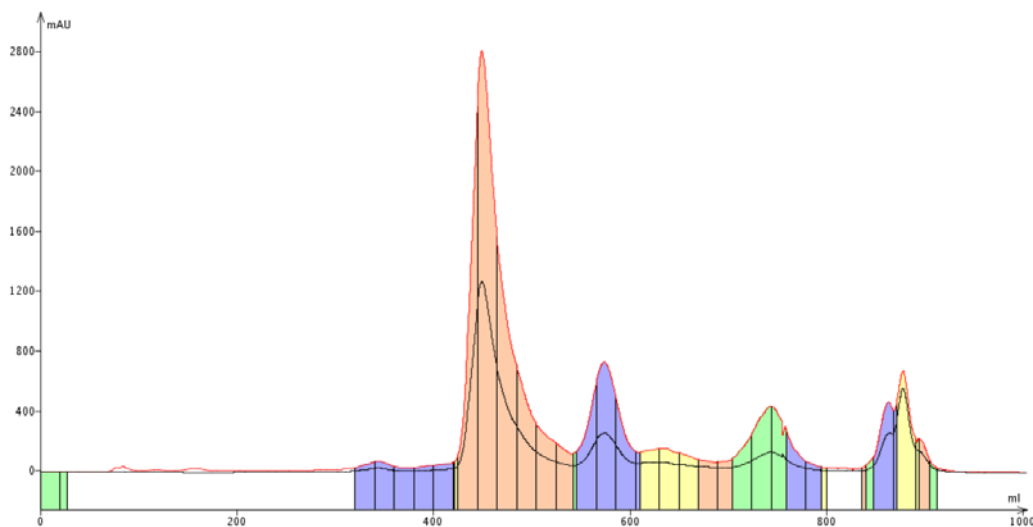
*Čiščenje spojine 13 z uporabo Isolera One kromatografskega sistema:*

Pri čiščenju končnih spojin smo uporabljali kolono z reverzno stacionarno fazo KP-C18-HS. Kolona je bila napolnjena s 50 g silikagela, s premerom delcev 0.040-0.063  $\mu\text{m}$ . Uporabili smo metodo suhega nanosa, pri čemer smo spojino raztopili v 5 mL mešanice topil metanola, acetonitrila in TFA in nanесли na C18 "samplet". Velika prednost reverzne stacionarne faze je v tem, da lahko čistimo tudi tako hidrofilne spojine, kot so amidini. Uporablja se lahko gradient topil, ki ga spreminjamo tudi tekom ločbe.

*Pogoji:*

Kolona: SNAP KP-C18-HS  
 Pretok: 40 ml/min  
 Topilo A: 0.1% TFA v H<sub>2</sub>O  
 Topilo B: Acetonitril  
 "Slope mode": srednje  
 Stojalo za epruvete: 16x150 mm

Detekcija: UV1  
 UV1 (zbiranje frakcij): 220 nm  
 UV2 (Monitor): 254 nm  
 Meja zbiranja frakcij: 30 mAU  
 Nanos vzorca: suhi nanos  
 Volumen zbiranja: 20 ml



Slika 18: Grafični prikaz ločbe zmesi na aparaturi Isolera One

*Gradient:*

	topilo	razmerje
izenačevanje	A/B	0 %
ločba 1	A/B	0 % – 50 %
ločba 2	A/B	50 %
ločba 3	A/B	50 – 78 %
ločba 4	A/B	78 – 100 %

Na grafu se nahaja spojina **13** pod površino prvega vrha (slika 18). HPLC analiza je pokazala 95 % vsebnost spojine **13** v čistih frakcijah. Izkoristek zadnje stopnje sinteze spojine **13** je zaradi stranskih produktov in združenja le čistih frakcij znašal 20 %. Višji izkoristek bi lahko dobili, če bi ponovili postopek čiščenja še preostalih frakcij z vsebujočo spojino **13**. Izkoristek hidrolize analogne spojine, ki so jo izvedli po načrtu 1, pa je znašal 95 %. Analize spojine **13**, predvsem NMR in MS spekter, so pokazale, da v stopnji hidrolize na amidinu ni prišlo do tvorbe 1,2,4-oksadiazol-5(4*H*)-ona, kot navaja načrt 1. Iz tega razloga smo celotno sintezno pot skrajšali še za eno stopnjo. Uspeli smo pripraviti končno spojino **13**, ki je dovolj čista za vrednotenje biološke aktivnosti, ob tem pa smo sintezo še optimizirali. Sintezo smo izvedli v osmih sinteznih stopnjah in s tem znano sintezno pot spojine **13** (načrt 1) skrajšali za tri stopnje. S tem smo uspeli pripraviti spojino z boljšim celokupnim izkoristkom. Izbira etilnega estra kot zaščita karboksilne skupine se je izkazala kot dobra.

## 5.2 ISKANJE OPTIMALNE SINTEZNE POTI SPOJINE 12

Spojino **12** smo poizkušali pripraviti na različne načine:

- Alternativa 1: glej 3. točko poteka dela v 2. poglavju (reakcijska shema 3)
- Alternativa 2: glej 4. točko poteka dela v 2. poglavju (reakcijska shema 4)
- Alternativa 3: glej 5. točko poteka dela v 2. poglavju (reakcijska shema 5)

### 5.2.1 Alternativa 1

Izhajali smo iz pripravljenege distančnika - spojine **3**. Sintezo smo nadaljevali po načrtu 2, po katerem smo pripravili spojino **13**.

#### 5.2.1.1 Četrta stopnja sinteze – tvorba amida (spojina 4)

Spojino **4** smo pripravili po istem postopku, kot je opisan v poglavju 5.1.4. Amid (spojino **4**) smo tvorili med spojino **3** in dietil 2-fenilmalonatom. Reakcija je potekla zelo hitro, brez nastanka stranskih produktov in z visokim izkoristkom 81%. Čistoto spojine smo potrdili z

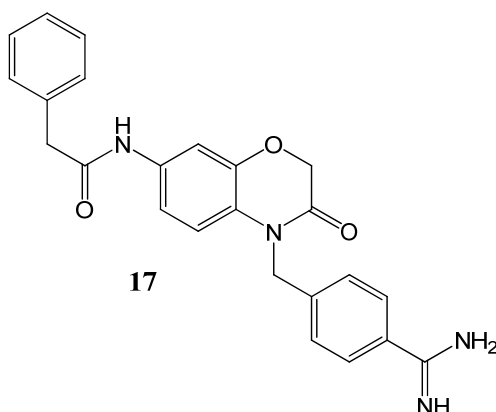
elemntno analizo in s temperaturo tališča. Strukturo spojine **4** pa smo potrdili z NMR, IR, MS in HRMS.

### 5.2.1.2 Peta stopnja sinteze – sinteza amidoksima (spojina **6**)

Na pripravljenem nitrilu **4** smo izvajali reakcijo tvorbe amidoksima. Reakcijo smo izvajali na enak način, kot je opisan v poglavju 5.1.5. Reakcijo tvorbe spojine **6** smo morali zaradi slabe topnosti v etanolu izvajati v brezvodnem metanolu. Uporaba metanola kot topila bi lahko povzročila preestrenje karboksilne skupine na malonatu, pri čemer bi namesto etilnega estra dobili metilni. S pomočjo NMR in MS spektra smo ugotovili, da do preestrenja zaščitene karboksilne skupine malonata ni prišlo. Uspeli smo pripraviti spojino **6** z visokim izkoristkom (74 %). Čistoto spojine **6** smo potrdili z elemntno analizo in s temperaturo tališča, strukturo pa z NMR, IR, MS in HRMS.

### 5.2.1.3 Šesta stopnja sinteze – sinteza 1,2,4-oksadiazolin-5(4H)-ona (spojina **8**)

Na spojini **8** smo 1,2,4-oksadiazolin-5(4H)-onski obroč tvorili na pripravljenem amidoksimu **6** na enak način, kot smo pripravili spojino **9** (poglavje 5.1.6). Med reakcijo je bilo razvidno iz TLC-kromatograma, da je ob segrevanju v piridinu nastala še ena lisa z  $R_f = 0$  v MF2, ki se je po orositvi z ninhidrinom obarvala rjavo. S pomočjo MS in NMR spektra smo ugotovili, da gre za spojino **17** (slika 19). Ob segravanju je namreč prišlo do dekarboksilacije na malonatnem fragmentu ter tudi na oksadiazolinonskem obroču, kjer je nastal amidin. Spojino **8** smo uspeli ločiti od spojine **17** z dodatkom zmesi metanola in etra. Zaradi nastanka stranskega produkta (spojine **17**) smo pripravili spojino **8** s slabšim izkoristkom (61 %). Strukturo spojine **8** smo potrdili z NMR, IR, MS in HRMS.



Slika 19: Produkt dekarboksilacije na malonatnem fragmentu in oksadiazolinonskega obroča pri sintezi spojine **8**

#### 5.2.1.4 Sedma stopnja sinteze – sinteza amidina (spojina 10)

Amidinsko skupino smo v spojino **8** uvedli s katalitskim hidrogeniranjem 1,2,4-oksadiazolin-5(4*H*)-onskega obroča v očetni kislini na način, kot je opisan v poglavju 5.1.7. Reakcija redukcije oksadiazolinona spojine **8** v amidinsko skupino spojine **10** je potekla v petih dneh brez stranskih produktov, brez posebnih težav in z visokim izkoristkom (77 %). S pomočjo NMR in MS spektra smo tudi v tem primeru ugotovili, da reakcija poteka najprej do nastanka amidoksima, ki se reducira v amidin. Strukturo spojine **10** smo potrdili z NMR, IR, MS in HRMS.

#### 5.2.1.5 Osmo stopnja sinteze – hidroliza estra (spojina 12)

Alkalno hidrolizo zaščitene karboksilne skupine v obliki etilnega estra (spojina **10**) do spojine **12** smo izvajali po istem postopku, kot smo hidrolizirali spojino **11** do spojine **13** (poglavje 5.1.8). Pri reakciji smo naleteli na vzporedne reakcije in s tem tudi na nastanek več stranskih produktov. To je bilo razvidno tudi iz TLC-kromatograma, na katerem je bilo prisotnih pet lis. Tudi s čiščenjem z uporabo Isolera One kromatografskega sistema nismo uspeli doseči ustrezne čistote. Iz tega razloga smo za pripravo spojine **12** iskali še druge načine priprave.

### 5.2.2 Alternativa 2

Kot izhodno spojino smo uporabili pripravljeni amidoksim **6**. Sintezo spojine **12** smo nadaljevali na način, kot je prikazan v reakcijski shemi 4.

#### 5.2.2.1 Šesta stopnja sinteze – sinteza 1,2,4-oksadiazolin-5(4*H*)-ona (spojina 8)

Sintezo spojine **8** smo izvedli še na drugačen način, ki je opisan v poglavju 5.1.6. Najprej smo spojino **6** O-acilirali (spojina **15**) z etil kloroformatom pri temperaturi  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pri čemer smo zagotovili selektivnost aciliranja. Iz TLC-kromatograma je bilo razvidno, da je nastalo tudi nekaj spojine, ki je imela višji retencijski faktor kot spojina **15**. S pomočjo NMR spektra smo ugotovili, da je bila to spojina, ki je imela tako N- kot tudi O-acilirano amidoksimko skupino, čeprav smo reakcijo izvajali pri nizki temperaturi. Zmes smo uspešno ločili s kolonsko kromatografijo. Spojino **15** smo tako pripravili z 87 % izkoristkom, strukturo pa potrdili z NMR, IR, MS in HRMS. Čistoto spojine smo potrdili z elementno analizo in temperaturo tališča. Pri tvorbi derivata 1,2,4-oksadiazolin-5(4*H*)-ona **8** iz spojine **15** smo naleteli na vzporedne reakcije in s tem tudi na nastanek več stranskih produktov. Zmes smo uspešno ločili tako, da smo uvedli dve ločbi na koloni, najprej z

MF13 in nato še z MF14. Kljub nastanku več stranskih produktov smo uspeli pripraviti spojino **8** z 42 % izkoristkom. Strukturo spojine smo potrdili z NMR, IR, MS in HRMS.

#### **5.2.2.2 Sedma stopnja sinteze – hidroliza estra (spojina 14)**

Zaščiteno karboksilno skupino spojine **8** v obliki etilnega estra smo hidrolizirali po znanih postopkih alkalne hidrolize z 2 ekvivalentoma raztopine natrijevega hidroksida v zmesi dioksana in etanola.<sup>[8,34]</sup> Hidroliza je potekala pri sobni temperaturi, vendar tudi po petih dneh in po dodatku 8 ekvivalentov raztopine natrijevega hidroksida ni potekla do konca. Razlog je najverjetneje v tem, da smo kot sotopilo uporabili etanol, ki pravzaprav predstavlja enega od produktov reakcije in zato vpliva na pomik ravnotežja v smeri nastanka reaktantov. Iz reakcijske zmesi smo izhodno spojino odstranili z večkratnim spiranjem z etrom. Na-sol karboksilne kisline je bila raztopljena v vodi, ki smo jo v nedisociirano obliko pretvorili z nakisanjem z 1M HCl do pH 2. Po nakisanju so izpadli kristali (spojina **14**), ki smo jih odfiltrirali, strukturo pa potrdili z NMR, IR, MS in HRMS. Spojino **14** smo pripravili z 88 % izkoristkom.

#### **5.2.2.3 Osmo stopnja sinteze - sinteza amidinov z redukcijo 1,2,4-oksadiazol-5(4H)-onov (spojina 12)**

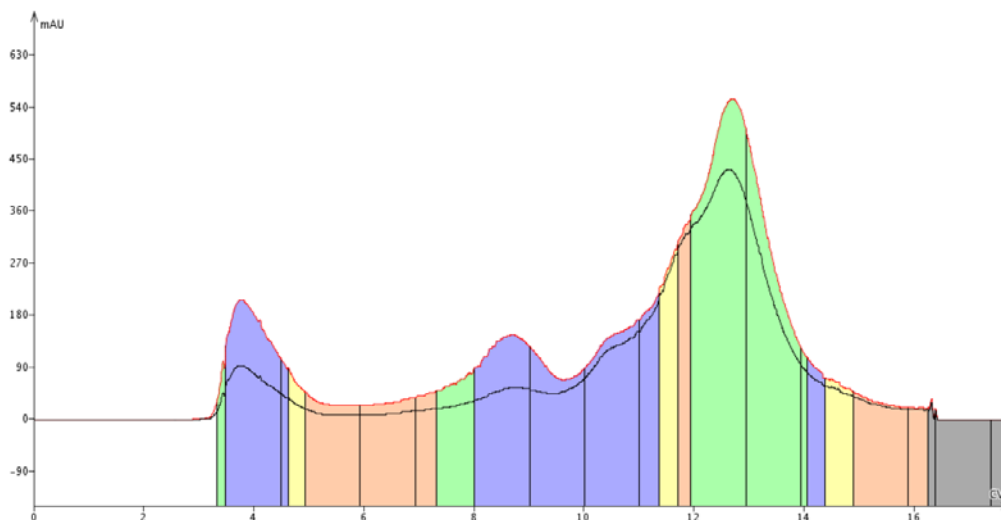
Pri redukciji spojine **14** smo 1,2,4-oksadiazol-5(4H)-onski obroč reducirali do amidina **12**.<sup>[29]</sup> Kot katalizator smo uporabili paladij na ogljiku, saj se je v redukcijah oksadiazolinonskega obroča izkazal kot ustrezen (poglavji 5.1.6. in 5.2.1.3). Reakcija je potekla kvantitativno že v treh dneh, kar je hitreje kot prejšnje redukcije oksadiazolinonskega obroča (poglavji 5.1.6. in 5.2.1.3). K temu je najverjetneje pripomogel dodatek večje mase katalizatorja (20 % mase spojine) in dodatek DMF kot sotopila, za katerega smo ugotovili, da je zelo primeren za potek katalitskega hidrogeniranja (poglavje 5.1.3). Najverjetneje pa tudi sama struktura spojine **14** ugodno vpliva na hitrejši potek redukcije. Pri spremljanju reakcije s TLC-kromatogrami smo ugotovili, da v prvih urah ni prišlo do nastanka amidoksima kot pri prejšnjih redukcijah oksadiazolinonskega obroča. Ponovno lahko razloge iščemo v dodatku večje mase katalizatorja, v dodatku DMF topila in v naravi spojine **14**. Zaradi prisotnega DMF smo pri odstranitvi katalizatorja iz reakcijske raztopine postopali enako kot pri redukciji nitro skupine spojine **2** v aminske skupine spojine **3** (poglavje 5.1.3). Nastale belorumene kristale (spojino **12**) smo čistili na aparaturi Isolera One.

Čiščenje spojine 12 z uporabo Isolera One kromatografskega sistema:

Pogoji:

Kolona: SNAP KP-C18-HS  
 Pretok: 10 ml/min  
 Topilo A: 0.1% TFA v H<sub>2</sub>O  
 Topilo B: Acetonitril  
 "Slope mode": blago  
 Stojalo za epruvete: 16x150 mm

Detekcija: UV1  
 UV1 (zbiranje frakcij): 254 nm  
 UV2 (Monitor): 280 nm  
 Meja zbiranja frakcij: 50 mAU  
 Nanos vzorca: injiciranje raztopine  
 Volumen zbiranja: 18 ml



Slika 20: Grafični prikaz ločbe zmesi na aparaturi Isolera One

Gradient:

	topilo	razmerje
izenačevanje	A/B	20 %
ločba 1	A/B	20 – 50 %
ločba 2	A/B	50 %

Na grafu se spojina **12** nahaja pod površino tretjega vrha (slika 18). Ločba je bila uspešna, saj smo s HPLC potrdili ustrezno čistoto (96 %). Zaradi nizkega izkoristka (11 %) zadnje stopnje sinteze **12** bi postopali enako, kot je opisano v poglavju 5.1.8. Uspeli smo pripraviti spojino **12**, ki je dovolj čista za biološka testiranja. Druga alternativna pot sinteze, se je kljub težavam na stopnji tvorbe 1,2,4-oksadiazol-5(4H)-ona, izkazala kot ustrezna.

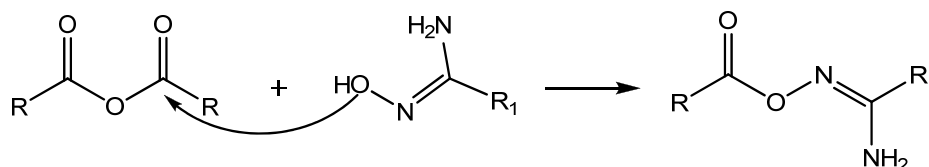
### 5.2.3 Alternativa 3

Spojino **12** smo poizkušali pripraviti tudi na način, kot je predstavljen v reakcijski shemi 5. Pri sintezi smo izhajali iz pripravljene nitrila **4** in pripravljene amidoksima **6**.

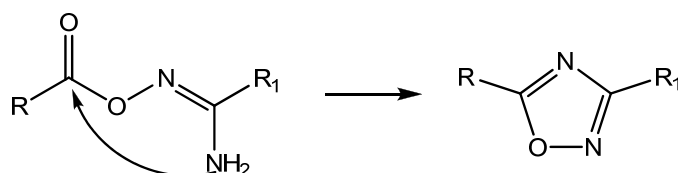
### 5.2.3.1 Šesta stopnja sinteze - sinteza 1,2,4-oksadiazola (spojina 16)

Na pripravljenemu amidoksimu spojine **6** smo po postopku opisanem v literaturi pripravili 1,2,4-oksadiazolski obroč spojine **16**.<sup>[35]</sup> Mehanizem nastanka 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola je sledeč:<sup>[36]</sup>

1. Nukleofilna adicija -OH skupine amidoksima na karbonilno skupino acetanhidrida in nastanek O-acetiliranega amidoksima:



2. Sledi adicija aminske skupine na karbonilno skupino O-acetiliranega amidoksima oz. intramolekularna ciklizacija in nastanek 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola.



Reakcija ni potekala pri sobni temperaturi kot navaja literatura, temveč pri povišani temperaturi (60 °C). Reakcija je potekla brez nastanka stranskih produktov in z visokim izkoristkom 83 %. Strukturo spojine smo potrdili z NMR, IR, MS in HRMS, čistoto pa s temperaturo tališča in elementno analizo.

### 5.2.3.2 Sedma stopnja sinteze - sinteza amidina z redukcijo 1,2,4-oksadiazolov (spojina 10)

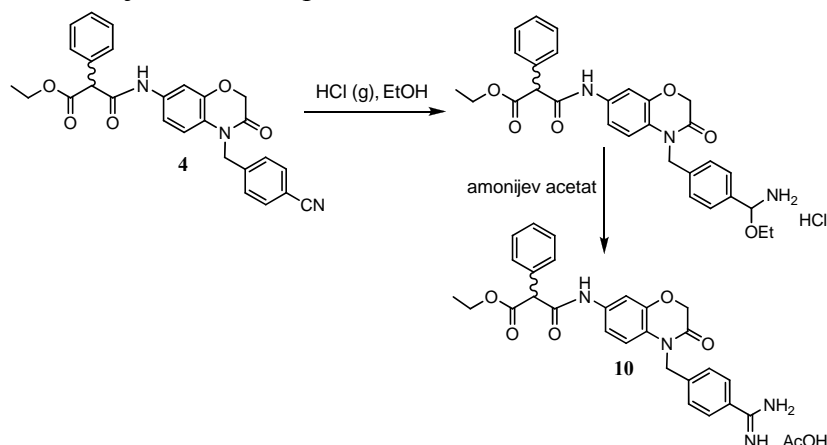
Amidinsko skupino spojine **10** smo poizkušali pripraviti tudi z redukcijo 1,2,4-oksadiazola spojine **16**, pri čemer smo uporabili katalitsko hidrogeniranje v kislem.<sup>[11,35]</sup> Reakcijo smo izvajali v očetni kislini pri tlaku 250 psi v Parrovem hidrogenatorju s paladijem na ogljiku kot katalizatorjem. Reakcija tudi po petih dneh ni potekla kvantitativno, zato smo reakcijsko zmes prenesli v dvogrlo bučko opremljeno z balonom, napolnjenim z vodikom. Reakcijo smo izvajali pri povišani temperaturi (70 °C). Reakcija je v tem primeru bolje potekla, vendar ponovno nekvantitativno. Vzroke lahko iščemo v zasičenosti katalizatorja, v morebitni slabi topnosti izhodne spojine ali produkta ali pa je vzrok v tem, da aromatski obročni sistem, neposredno vezan na oksadiazolski planarni obroč, s pomočjo vpliva II-elektronskega oblaka dodatno stabilizira oksadiazolski obroč, tako da težje reagira pod pogoji katalitskega hidrogeniranja. V prihodnje bi bilo zanimivo preučiti stabilnost tega 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola pod pogoji katalitskega hidrogeniranja v kombinaciji povišanega tlaka in temperature. Strukturo spojine **10** smo potrdili z NMR,



MS in HRMS. Izkoristek redukcije je bil le 13 % in zato neprimeren za nadaljno sintezo spojine **12**.

### 5.2.3.3 Poskus sinteze amidina pod pogoji Pinnerjeve sinteze (spojina **10**)<sup>[8,37]</sup>

Pri Pinnerjevi sintezi gre v prvi stopnji za pretvorbo ciano skupine z alkoholom in plinastim HCl do imino etra (imino etra/imidata). Ob tem poteče kislinsko katalizirana adicija alkohola na elektrofilni ogljikov atom ciano skupine. Drugo stopnjo sinteze izvedemo z ustreznim aminom, kjer le-ta kot nukleofil napade imino eter, ki mu sledi eliminacija alkoksi skupine.



Slika 21: Prikaz Pinnerjeve sinteze amidinov

Pri prvi stopnji sinteze smo pripravljene nitril **4** raztopili v brezvodnem etanolu in v reakcijsko zmes 45 minut uvajali plinasti HCl. Med uvajanjem smo reakcijsko zmes hladili z namenom povečanja topnosti HCl plina in s tem količine celotnega HCl v reakcijski zmesi. Ta stopnja Pinnerjeve sinteze se je pokazala kot problematična v smislu nekvantitativnega poteka reakcij. V drugi stopnji sinteze smo kot amin uporabili amonijev acetat. Reakcijski zmesi smo zaradi nekvantitativnega poteka reakcije dodali 8 ekvivalentov amonijevega acetata in pustili na sobni temperaturi mešati en teden. Ugotovili smo, da je sinteza amidinov pod pogoji Pinnerjeve sinteze neprimerna, predvsem v smislu nečistote in nekvantitativnega poteka reakcije (8 % izkoristek). Strukturo spojine **10** smo potrdili z NMR in MS spektrom.

Kot tretja alternativna možnost sinteze spojine **12** se je izkazala kot neprimerna, saj smo pripravili spojino **10** v zelo nizkih izkoristkih (zgolj 10 %). Pripravljene spojine **10** bi bilo potrebno čistiti na aparaturi Isolera One, kar pa se zaradi majhne količine spojine ni izplačalo. Iz tega razloga tudi nismo izvajali hidrolize etilnega estra spojine **10** do spojine **12**.

## 6. SKLEP

- V okviru diplomskega dela smo optimizirali sintezi spojine 2-benzil-3-[(4-{4-[amino(imino)metil]benzil}-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-7-il)amino]-3-oksopropanojske kisline v obliki trifluoroacetata (**13**) in spojine 2-fenil-3-[(4-{4-[amino(imino)metil]benzil}-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-7-il)amino]-3-oksopropanojska kislina v obliki trifluoroacetata (**12**). Spojini vsebujeta vse potrebne farmakoforne skupine za interakcijo z vitronektinskim receptorjem. Togi benzoksazinski skelet predstavlja distančnik, na katerem je pripeta na eni strani benzamidinska skupina kot mimetik arginina, na drugi pa karboksilna skupina kot mimetik aspartata.
- Tvorba amida z aminolizo estra z uporabo mikrovalov je dober sintezni pristop, saj je reakcija potekla že v 15 min z visokim izkoristkom in z zelo enostavno izolacijo, brez potrebe po čiščenju.
- Uspeli smo pripraviti spojino **13**, ki je dovolj čista za vrednotenje biološke aktivnosti, ob tem pa smo sintezo še optimizirali. Sintezo smo izvedli v osmih sinteznih stopnjah in s tem znano sintezno pot spojine **13** (načrt 1) skrajšali za tri stopnje. S tem smo uspeli pripraviti spojino z boljšim celokupnim izkoristkom. Čiščenje spojine z uporabo Isolera One kromatografskega sistema je odlična metoda separacije, brez katere zaradi velike hidrofilitnosti spojine ne bi uspeli pridobiti ustrezne elementne analize in potrditi vsebnosti spojine nad 95 % s HPLC metodo.
- Spojino **12**, ki je analog spojine **13**, smo poizkušali pripraviti po sinteznem načrtu 2, a se je izkazal kot neuporaben. Velike težave smo imeli v zadnji stopnji, v izvedbi hidrolize estra, saj smo dobili zelo nečist produkt. Zelene čistosti nismo uspeli doseči tudi po čiščenju na aparaturi Isolera One, zato smo uporabili alternativne sinteze poti.
- Spojino **12** smo uspeli pripraviti tako, da smo na spojini z oksadiazolinonskem obroču najprej hidrolizirali etilni ester, sledila pa je redukcija oksadiazolinonskega obroča do amidina. Spojino **12** smo uspešno očistili s kolonsko kromatografijo z uporabo reverzne stacionarne faze in dosegli vsebnost 96 % določeno s HPLC metodo.
- Ugotovili smo, da je priprava amidina iz ciano skupine po Pinnerjevi sintezi neugodna, saj je potekla zgolj z 8 % izkoristkom, poleg tega čistoste nismo uspeli potrditi z elementno analizo. Iz tega razloga tudi sinteze do spojine **12** nismo nadaljevali.
- Tudi priprava amidina z redukcijo 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola pod pogoji katalitskega hidrogeniranja ni bila primerna. Benzilni substituent stabilizira obroč, tako da ta težje reagira pod pogoji katalitskega hidrogeniranja. V prihodnje bi bilo potrebno preučiti stabilnost tega 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola pod pogoji katalitskega hidrogeniranja v kombinaciji povišanega tlaka in temperature.
- Zaradi povečane možnosti dekarboksilacije karboksilne skupine v malonatnem fragmentu pri sintezi spojine **8**, bi bilo smiselno spremeniti celotni načrt sinteze spojine **12**. Najprej bi spojini **3** zaščitili aminske skupino s *tert*-butiloksikarbonilno skupino. Na ciano skupini bi nato preko amidoksima tvorili oksadiazolinonski obroč. Sledila bi

odščita aminske skupine in tvorba amida z dietil 2-fenilmalonatom po postopku aminolize estra z uporabo mikrovalovov. Tako bi dobili spojino **8**, na kateri bi izvedli še hidrolizo etilnega estra in nato redukcijo oksadiazolinonskega obroča do amidina spojine **12**.

## 7. LITERATURA

1. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, **2002**, *110*, 673-687.
2. Cox, D.; Aoki, T.; Seki, J.; Motoyama, Y.; Yoshida, K. The pharmacology of the integrins. *Med. Res. Rev.*, **1994**, *14*, 195-228.
3. Nadrah, K. Načrtovanje, sinteza in biološko vrednotenje delovanja modulatorjev integrinskih receptorjev. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, **2005**.
4. Cini, N.; Trabocchi, A.; Menchi, G.; Bottoncetti, A.; Raspanti, S.; Pupi, A.; Guarna, A. Morpholine-based-RGD-cyclopentapeptides as  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$  integrin ligands: Role of configuration towards receptor binding affinity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*, 1542-1549.
5. Schwartz, M. A.; Ginsberg, M. H. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nature Cell Biology*, **2002**, *4*: 65-68.
6. Stupack, D. G. Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *Death and differentiation*, **2005**, *12*, 1021-1030.
7. Shimaoka, M.; Springer, T.A. Therapeutic antagonist and conformational regulation of integrin function. *Drug Discovery*, **2003**, *2*, 703-715.
8. Štefanič, P. Načrtovanje in sinteza peptidomimetičnih antitrombotičnih učinkovin s 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazinskim skeletom in dualnim mehanizmom delovanja. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, **2005**.
9. Eliceiri, B. P.; Cheresh, D. A. Adhesion events in angiogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **2001**, *13*, 563-568.
10. Aparna, R.; Varner, A.; Varner, J. The Role of Integrins in Tumor Angiogenesis. *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy*, **2005**, *1*, 49-71.
11. Jurković, S. Sinteza mimetikov tripeptidnega zaporedja arginil-glicil-asparaginska kislina. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, **2005**.
12. Humpries, M. J.; Mcewan, P. A.; Barton, S. J.; Buckley, P. A.; Balla, J.; Mould, A. P. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem.*, **2003**, *28*, 313-320.

13. Hood, J. D.; Cheresch, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Cancer*, **2002**, *2*, 91-99.
14. Constant, F. C.; Colognato, H. Integrins: Versatile Integrators of extracellular signals. *Trends in Cell Biol.*, **2004**, *14(12)*, 678-686
15. Duong, L. T.; Roden, G. A. *Integrin*-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Front. Biosci.*, **1998**, 757-768.
16. Nadrah, K.; Sollner Dolenc, M. Dual Antagonist of integrins. *Current Medicinal Chemistry*, **2005**, *12*, 1449-1466.
17. Guo, W.; Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nature Rev.*, **2004**, *5*, 816-826.
18. [www.jle.com/en/revues/medecine/hma/e-docs/00/04/16/F0/article.md?fichier=images.htm](http://www.jle.com/en/revues/medecine/hma/e-docs/00/04/16/F0/article.md?fichier=images.htm) (marec **2009**)
19. Xiong, J. P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D. L.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, A. M. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*, **2001**, *294*, 339-345.
20. Xiong, J.P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, A. M. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, **2002**, *296*, 151-155.
21. Xiao, T.; Takagi, J.; Collier, B.S.; Wang, J.H.; Springer, T. A. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature*, **2004**, *432*, 59-67.
22. Heckmann, D.; Meyer, A.; Marinelli, L.; Zahn, G.; Stragies, R.; Kessler, H. Probing Integrin Selectivity: Rational Design of Highly Active and Selective Ligands for the  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_V\beta_3$  Integrin Receptor. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 3571–3574.
23. Shimaoka, M.; Takagi, J.; Springer, A. T. Conformational Regulation of Integrin Structure and Function. *Annu. Rev. Biophys. Struct.*, **2002**, *31*, 485-516.
24. Suehiro, K.; Smith, J. W.; Plow, E. F. The ligand recognition specificity of beta3 integrins. *J Biol Chem.*, **1996**, *271(17)*, 10365-10371.
25. Ramjaun, A. R.; Hodivala, K. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **2009**, *41*, 521-530.

26. Ojima, I.; Chakravarty, S.; Dong, Q. Antithrombotic Agents: From RGD to Peptide Mimetics. *Bioorg. and Med. Chem.*, **1995**, *3(4)*, 337-360.
27. Giannis, A.; Rübsam, F. Peptidomimetics in Drug Design. *Adv. Drug Res.*, **1997**, *29*, 1-77.
28. Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. Stereoisomeric Peptide Libraries and Peptidomimetics for Designing Selective Inhibitors of the  $\alpha_v\beta_3$  Integrin for a New Cancer Therapy. *Angew. Chem.*, **1997**, *36*, 1374-1389.
29. Bolton, R. E.; Coote, S. J.; Finch, H.; Lowdon, A.; Pegg, N.; Vinader, M. V. 3-Substituted-1,2,4-Oxadiazolin-5-on; A useful Amidine Precursor and Protecting Group. *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36(25)*, 4471-4474.
30. Kikelj, D.; Suhadolc, E.; Urleb, U.; Žbontar, U. A Convenient Synthesis of 3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2H-pyrido [3,2-b]-1,4-oxazine-2-carboxylic Acid. *J. Heterocyclic Chem.*, **1993**, *30*, 597-602.
31. Rutar, A.; Kikelj, D. Selective alkylation of 3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine-2-carboxylates. *Synth. Commun.*, **1998**, *28*, 2737-2749.
32. Dehmlow, E.; Dehmlow, S. Phase Transfer Catalysis. *Inc. New York, 3rd Ed*, 29-64.
33. Chiou, S.; Shine, H. J. A simplified procedure for preparing 3,5-disubstituted-1,2,4-oxadiazoles by reaction of amidoximes with acyl chlorides in pyridine solution. *J. Heterocyclic Chem.*, **1989**, *26*, 125-128.
34. Tišler, M. Organska kemija. DZS, Ljubljana, **1982**, 114-119.
35. Ismail, M. A.; Arafa, R. K.; Wenzler, T.; Brun, R.; Tanious, F. A.; Wilson, D. W.; Boykin, D. W. Synthesis and antiprotozoal activity of novel bis-benzamidinoimidazo[1,2-a]pyridines and 5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2008**, *16*, 683-691.
36. Coffey, S.; Adsell, F. Oxadiazoles, Heterocyclic compounds. *Rodds Chemistry of carbon compounds*, **1986**, *4(D)*, 63-116.
37. Dow, A. Organic Synthesis. Coll. Vol. 1, John Wiley & Sons Inc., editor Gilman H.; New York, **1951**, 5-7.

