

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



ALEKSANDER MILOŽIČ

**UPORABA WITTIGOVE REAKCIJE PRI SINTEZI NOVIH
DUALNIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN**

**USE OF WITTIG REACTION FOR SYNTHESIS OF NOVEL
ANTITHROMBOTICS WITH DUAL MECHANISM OF
ACTION**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Ilaša, mag. farm. Masnospektrometrične meritve so bile izvedene v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan. Del ^1H -NMR meritev in elementne analize so bile opravljene na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Del ^1H -NMR meritev, ^{13}C -NMR meritve, IR meritve, določanje tališča in HPLC analize so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Janezu Ilašu, mag. farm., za izkazano zaupanje, neprecenljivo strokovno vodenje in vsestransko pomoč pri nastajanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se Alešu Žuli, mag. farm., za pomoč pri delu v laboratoriju in praktične nasvete.

Prisrčna hvala moji družini, ki mi je tekom študija stala ob strani, me podpirala in spodbujala. Hvala tudi sošolcem in prijateljem za nesebično pomoč in lepe trenutke, ki ne bodo nikoli pozabljeni!

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Janeza Ilaša, mag. farm.

Aleksander Miložič

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	6
ABSTRACT.....	7
SEZNAM OKRAJŠAV	2
1 UVOD	9
1.1 Hemostaza	9
1.2 Tromboza	11
1.3 Trombin.....	13
1.3.1 Serinske proteaze.....	13
1.3.2 Struktura trombina.....	14
1.3.3 Funkcije trombina.....	16
1.4 Fibrinogeni receptor (integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$).....	17
1.4.1 Integrini	17
1.4.2 Fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa	17
1.4.3 Fibrinogen	19
1.5 Antitrombotične učinkovine z dualnim mehanizmom delovanja	19
1.5.1 Razvoj multiplih ligandov	19
1.5.2 Polifarmakologija	20
1.5.3 Dosedanje delo na področju dualnih antitrombotičnih učinkovin	21
2 NAMEN DELA	23
3 MATERIALI IN METODE	24
4 EKSPERIMENTALNI DEL.....	28
4.1 Sinteza nove dualne antitrombotične učinkovine	28
4.1.1 Sinteza etil 2-metil-7-nitro-3-okso-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-karboksilata	30
4.1.2 Sinteza etil 2,4-dimetil-7-nitro-3-okso-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-	
karboksilata.....	31
4.1.3 Sinteza (2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-il)metanola.....	32
4.1.4 Sinteza (2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-il)metil acetata	33
4.1.5 Sinteza metil (2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-	
il)metansulfonata	34

4.1.6	Sinteza 2-(bromometil)-2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazina	36
4.1.7	Poskus sinteze ((2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-il)metil)trifenilfosfonijevega bromida	37
4.1.8	Sinteza 2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-karbaldehida.....	38
4.1.9	Sinteza 2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-karbaldehida.....	39
4.1.10	Sinteza (4-cianobenzil)trifenilfosfonijevega bromida	40
4.1.11	Sinteza (Z)-4-(2-(2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin)-2-il)vinil)benzonitrila.....	42
4.1.12	Sinteza 4-(2-(7-amino-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-il)etil)benzonitrila	43
4.1.13	Sinteza 4-(2-(7-((4-fluorobenzil)amino)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-il)etil)benzonitrila.....	45
4.1.14	Sinteza etil 2-((2-(4-cianofenil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)acetata.....	46
4.1.15	Sinteza etil 2-((2-(4-cianofenil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)acetata.....	48
4.1.16	Sinteza 2-((2-(4-(amidinofenil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)ocetne kisline.....	49
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	50
5.1	Sinteza dualne antitrombotične učinkovine	50
5.1.1	Sinteza 1,4-benzoksazinonskega obroča (spojina 1)	50
5.1.2	N-alkiliranje 1,4-benzoksazinonskega dušikovega atoma (spojina 2).....	50
5.1.3	Redukcija laktama in estra (spojina 3)	51
5.1.4	Tvorba estra na hidroksi skupini (spojina 4)	51
5.1.5	Sinteza metilsulfonatnega estra (spojina 5).....	52
5.1.6	Sinteza bromida (spojina 6).....	53
5.1.7	Poskus sinteze alkil trifenilfosfonijevega bromida (spojina 7).....	53
5.1.8	Sprememba sintezne strategije	54
5.1.9	Swernova oksidacija alkohola (spojina 8).....	54
5.1.10	Disproporcionacija aldehida – Cannizzarova reakcija (spojina 9)	55
5.1.11	Sinteza alkil trifenilfosfonijevega bromida (spojina 10)	56
5.1.12	Tvorba dvojne vezi – Wittigova reakcija (spojina 11)	57
5.1.13	Redukcija dvojne vezi in nitro skupine (spojina 12)	58
5.1.14	Reduktivno aminiranje (spojina 13)	58
5.1.15	Alkiliranje sekundarnega amina z alkil halidom (spojina 14).....	58

5.1.16	Sinteza amidina – Pinnerjeva reakcija (spojina 15).....	59
5.1.17	Bazična hidroliza estra (spojina 16)	60
5.2	» <i>In silico</i> « simulacija z biokemijskim vrednotenjem	61
6	SKLEP	64
7	LITERATURA	65

POVZETEK

Srčnožilne bolezni so najpogostejši vzrok smrti na svetu in napovedi kažejo, da bo tako ostalo tudi v prihodnje. Vzrok njihovega nastanka so motnje hemostaze – za življenje nepogrešljivega procesa zaustavljanja krvavitev, ki lahko zaradi patoloških procesov iztiri in sproži nastajanje krvnih strdkov na eni oziroma obsežnih krvavitev na drugi strani. Obe skrajnosti predstavljata nevarnost za zdravje ljudi in osnovo za nastanek kardiovaskularnih zapletov. Osrednji temelj izboljšanja obstoječega stanja v prihodnosti je razvoj novih antitrombotičnih učinkovin, ki bodo v terapiji bolj učinkovite in bodo imele manj neželenih učinkov. Eden izmed novih pristopov iskanja antitrombotičnih učinkovin je uporaba multiplih ligandov – učinkovin, ki z različnimi funkcionalnimi skupinami delujejo na različne tarče in tako poskušajo preko različnih mehanizmov preprečiti nastanek kardiovaskularnih zapletov. H ključnim tarčam, ki sodelujejo v procesu strjevanja krvi spadata tudi trombin in fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa. Z načrtovanjem visoko integriranih farmakoforov smo sintetizirali spojini **15** (etil 2-((2-(4-cianofenil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)acetat in **16** (2-((2-(4-amidinoftenil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)ocetno kislino) in s tem poskusili v eni učinkovini združiti antikoagulantno in antiagregatorno delovanje. Izhodišče za načrtovanje spojine **16** sta bili aminokislinski sekvenci Arg-Gly-Asp (RGD) kot antagonist fibrinogenega receptorja in *D*-Phe-Pro-Arg (fPR) kot inhibitor trombina. Spojina **15** je predstopnja spojine **16** v obliki estra. Inhibitorno delovanje spojine **15** na trombin smo ovrednotili z encimsko amidolitično metodo in afiniteto vezave na fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa z modificiranim encimskoimunskim testom na izoliranih receptorjih. V primerjavi z referenčnim dabigatranom ($K_i = 6,3 \pm 1,1$ nM) je konstanta inhibicije trombina spojine **15** $K_i = 2,64 \pm 0,36$ μ M približno 400-krat višja in tako ne predstavlja izboljšanja aktivnosti novih spojin. V primerjavi z referenčnim tirofibanom ($IC_{50 \text{ (GP IIb/IIIa)}} = 0,37 \pm 0,11$ nM) je inhibitorna koncentracija spojine **15** $IC_{50 \text{ (GP IIb/IIIa)}} \approx 500$ μ M – spojina **15** je na fibrinogenem receptorju GP IIb/IIIa praktično neaktivna. Izvedli smo sintezo spojine **16**, a je žal nismo uspeli izolirati v količini, zadostni za analize in biološka testiranja, zato le-teh ni bilo mogoče izvesti. Pričakujemo pa, da je aktivnosti spojine **16** na trombin podobna aktivnosti spojine **15** in da je spojina **16** aktivna na fibrinogenem receptorju GP IIb/IIIa, a tega brez testiranja ne moremo potrditi.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of deaths worldwide and prognoses suggest that will remain so in the future. Their causes are disorders of hemostasis – indispensable life process of stopping the haemorrhage. Hemostasis can derail due to pathological processes and triggers formation of blood clots in one or extensive bleeding on the other side. Both extremes represent a threat to human health and the basis for development of cardiovascular events. Principal basis for improvement of the existing situation is the development of new antithrombotic substances with higher therapeutic efficiency and fewer side effects. One of the new approaches of discovering and designing new antithrombotic compounds is the use of multiple ligands – substances with different functional groups acting through different targets. In this way multiple ligands prevent cardiovascular complications through various mechanisms. The interesting targets in the coagulation cascade include thrombin and fibrinogen receptor GP IIb/IIIa. By designing highly integrated pharmacophores we have synthesized compounds **15** (ethyl 2-((2-(4-cyanophenethyl)-2,4-dimethyl-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-7-yl)(4-fluorobenzyl)amino)acetate) and **16** (2-((2-(4-amidinophenethyl)-2,4-dimethyl-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-7-yl)(4-fluorobenzyl)amino)acetic acid) and thus combined anticoagulant and antiaggregatory activity. The starting points for designing compound **16** were amino acid sequences Arg-Gly-Asp (RGD) for fibrinogen receptor GP IIb/IIIa and *D*-Phe-Pro-Arg (fPR) for an inhibitor of thrombin. Compound **15** is an ester-type precursor of compound **16**. Inhibition activity of compound **15** against thrombin was assessed by enzyme amidolytic method and binding affinity fibrinogen receptor GP IIb/IIIa with a modified enzyme-linked immunosorbent assay on isolated receptors. Compared to the reference drug dabigatran ($K_i = 6,3 \pm 1,1$ nM), the inhibition constant of compound **15** against thrombin $K_i = 2,64 \pm 0,36$ μ M is approximately 400-times higher and thus does not represent an improvement of the activity of the new compounds. Compared to the reference drug tirofiban ($IC_{50 \text{ (GP IIb/IIIa)}} = 0,37 \pm 0,11$ nM), the half maximal inhibitory concentration of compound **15** is $IC_{50 \text{ (GP IIb/IIIa)}} \approx 500$ μ M – compound **15** is practically inactive against fibrinogen receptor GP IIb/IIIa. We carried out the synthesis of compounds **16**, but unfortunately we were unable to isolate it in quantities sufficient for analysis and biological testing, which is why they could not be performed. We expect that the activity of compound **16** against thrombin is similar to activity of compound **15** and that compound **16** is active against fibrinogen receptor GP IIb/IIIa, but can only be verified by testing.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcOH – očetna kislina	J – sklopitvena konstanta
ADP – adenzin difosfat	K _i – konstanta inhibicije
Ar – aril	KLK – kalikrein
BAEE – N _α -benzil-L-arginin etilni ester	m – multiplet
BSA – goveji serumski albumin	MF – mobilna faza
(COCl) ₂ – oksalil klorid	Mr – molekulska masa
CDCl ₃ – devteriran kloroform	MS – masna spektrometrija
d – dublet	NaHMDS – natrijev heksametilidisilazan
dd – dublet dubleta	NIH – nacionalni zdravstveni inštitut
ddd – dublet dubleta dubleta	NMR – jedrska magnetna resonanca
DKM – diklorometan	P1 in P2 – farmakofora 1 in 2
DMF – dimetilformamid	PAR-1 – s proteazo aktiviran receptor 1
DMSO – dimetilsulfoksid	PKLK – prekalikrein
DMSO-d ₆ – devteriran dimetilsulfoksid	PL – fosfolipidi
ELISA – encimsko imunski test	ppm – en del na milijon delov
(»Enzyme-linked immuno sorbent assay«)	q – kvartet
EF dlan – strukturna domena proteina z zaporedjem heliks-zanka-heliks	R _f – retencijski faktor
ESI – elektrosprej ionizacija	RGD – zaporedje Arg-Gly-Asp
EtOAc – etil acetat	rpm – obrati na minuto
Et ₂ O – dietil eter	s – singlet
Et ₃ N – trietilamin	t – triplet
fPR – zaporedje D-Phe-Pro-Arg	TF – tkivni faktor
GVT – globoka venska tromboza	THF – tetrahidrofuran
HBSA – hepes goveji serumski albumin	TLC – tankoplastna kromatografija
HMWK – kininogen z visoko molsko maso	T _{tal} – temperatura tališča
HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	tPa – tkivni aktivator plazminogena
IC ₅₀ – inhibitorna koncentracije polovice maksimalnega odziva	TXA ₂ – tromboksan A ₂
IR – infrardeča spektrometrija	vWf – von Willebrandov faktor
	WHO – Svetovna zdravstvena organizacija
	YPPW – zaporedje Tyr-Pro-Pro-D-Trp

1 UVOD

Kardiovaskularne bolezni so v svetu vodilni vzrok smrti in letno povzročijo preko 17 milijonov smrtnih primerov. So vzrok za kar 30 % smrti, ki se letno zgodijo na Zemlji. Vodilni bolezni sta koronarna srčna bolezen, katere posledica je srčna kap (7,3 milijona) in možganska kap (6,2 milijona). Preko 80 % smrti se zgodi v državah v razvoju in se pojavljajo enakovredno med moškimi in ženskami. WHO ocenjuje, da bodo kardiovaskularne bolezni ostale vodilni vzrok smrti tudi v prihodnje in da bo leta 2030 zaradi kardiovaskularnih bolezni umrlo preko 23 milijonov ljudi (1).

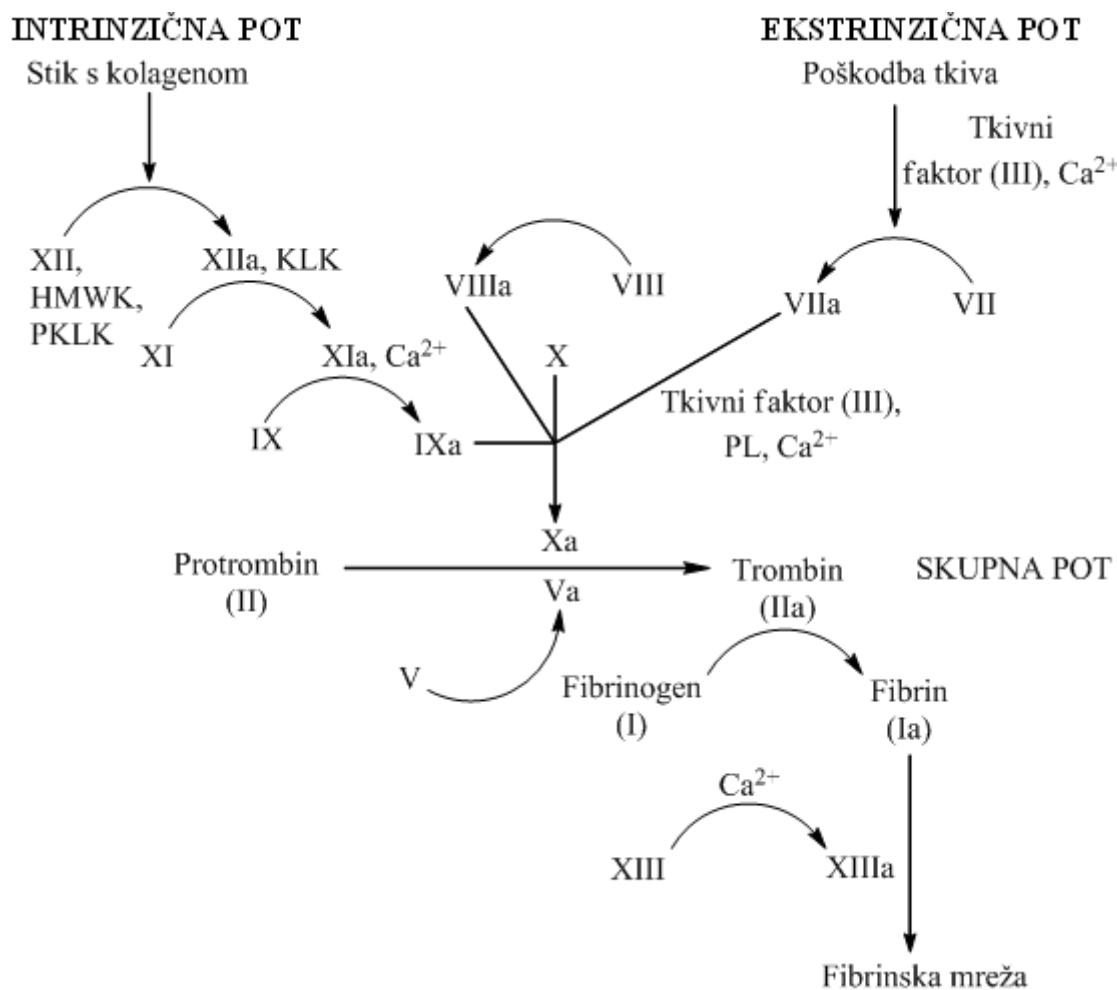
1.1 Hemostaza

Hemostaza je kompleksen, življenjsko pomemben proces, ki ustavi krvavitev po poškodbi žilne stene (2). Spodbujajo jo trije osnovni mehanizmi, ki potekajo hkrati in povezano:

- **primarna hemostaza** – opredeljena kot nastanek trombocitnega čepa
- **sekundarna hemostaza** – opredeljena kot tvorba fibrina v kaskadi strjevanja krvi
- **terciarna hemostaza** – opredeljena kot nastanek plazmina za razgradnjo strdka

Ob poškodbi krvne žile se sproži refleks krčenja gladkih mišičnih celic žilne stene, kar povzroči vazokonstrikcijo in zaustavi izgubo krvi. Primarni trombocitni čep nastane z adhezijo, ki ji sledita aktivacija in agregacija trombocitov, vključenih v trombocitni čep. Izpostavi se subendotelijski matriks in trombociti se preko površinskih receptorjev oprimejo izpostavljenih vlaken kolagena in von Willebrandovega faktorja (vWf). Oprijeti trombociti spremenijo svojo obliko iz ovalne v bolj sferično s površinskimi psevdopodiji, na katerih so številni fibrinogeni receptorji (integrini $\alpha_{IIb}\beta_3$), ki omogočijo adhezijo s kolagenom. Aktivirani trombociti začnejo izločati serotonin, adenzin difosfat (ADP) in tromboksan A_2 , ki spodbujajo agregacijo novih trombocitov in vodijo v nastanek trombocitnega čepa. Sproščena ADP in tromboksan A_2 aktivirata in pritegneta trombocite na mesto poškodbe. Na površini aktiviranih trombocitov se izrazijo fibrinogeni receptorji, ki se jim po konformacijski spremembi poveča vezavna afiniteta za fibrinogen – ključni ligand v agregaciji trombocitov. Združeni trombociti sprostijo tkivni faktor, le-ta pa vodi v nastanek strdka. Proces vključuje pretvorbo plazemskega proteina fibrinogena v netopen fibrin, ki je katalizirana s trombinom. Trombin trombocite tudi dodatno aktivira in pritegne na mesto poškodbe. Preplet fibrina tvori mrežo vlaken, ki ujame krvne celice in trombocite ter povzroči nastanek strdka (2).

Glede na začetni vzrok ločimo dve poti, ki pripeljeta do tvorbe strdka. Po poškodbi tkiva (ekstrinzična pot) se na površini celic izpostavi tkivni faktor (TF), na katerega se veže aktiviran faktor VII. Nastali kompleks TF/FVIIa katalizira tvorbo novega faktorja VII in skupaj s faktorjem FVIII aktivira faktor X ter tako krepi učinkovitost kaskade. Faktor Xa je osrednji element procesa koagulacije in vmesni člen med obema potema. Ob stiku z aktiviranimi trombociti ali kolagenom (intrinzična pot) in v prisotnosti prekalikreina ter kininogena z visoko molsko maso se aktivira faktor XII. Faktor XIIa v prisotnosti kalikreina aktivira faktor XI, ki nato aktivira faktor IX. Kompleks faktorja IXa s faktorjem VIIIa v prisotnosti Ca^{2+} in fosfolipidov aktivira faktor X v faktor Xa, ki povezuje intrinzično in ekstrinzično pot koagulacije. Faktor Xa tvori v povezavi s faktorjem Va protrombinazni kompleks, ki pretvori protrombin (faktor II) v trombin (faktor IIa). Trombin katalizira pretvorbo fibrinogena v fibrin in hkrati aktivira faktor XIII, ki s prečno povezavo monomernih vlaken fibrina stabilizira fibrinsko mrežo (3).



Slika 1: Koagulacijska kaskada.

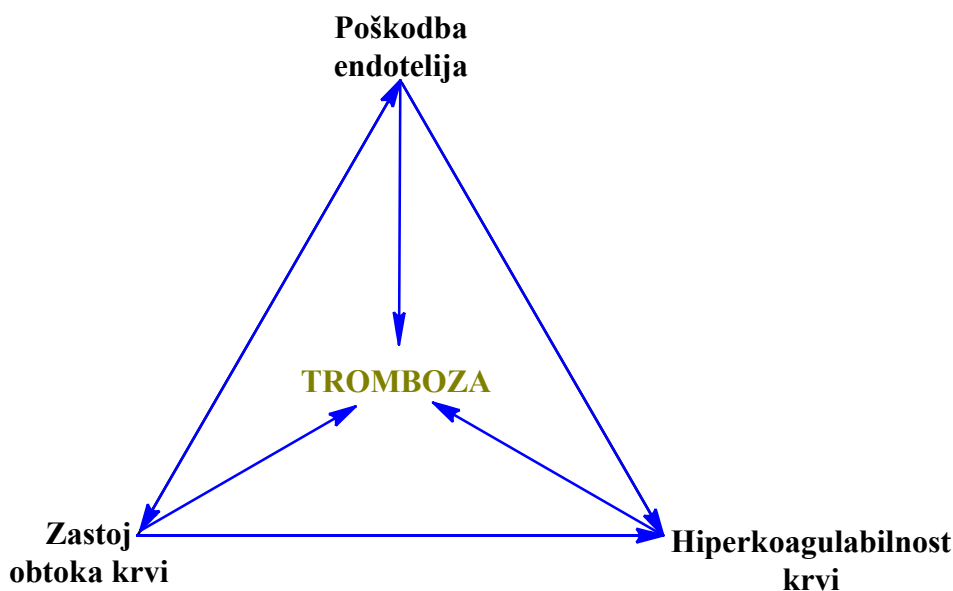
Sočasno z aktivacijo kaskade koagulacije se iz endotelijskih celic sprosti tkivni aktivator plazminogena (tPa), ki se znotraj strdka veže na plazminogen in ga pretvori v plazmin. Plazmin v strdku razgrajuje fibrinogen in fibrin v procesu fibrinolize, pri tem pa nastajajo fibrinogenški in fibrinski razgradnji produkti. Za pretvorbo plazminogena v plazmin je potrebna tudi prisotnost fibrina, ki poveča sposobnost tPa za aktivacijo plazmina. S tem je nastanek plazmina lokaliziran, kar je pomembno zaradi njegove nespecifične narave delovanja. Plazmin lahko ob fibrinu in fibrinogenu razgrajuje tudi druge faktorje strjevanja krvi, med njimi faktorja strjevanja V in VIII (4).

1.2 Tromboza

Tromboza je patološki proces, ki v odsotnosti krvavitve znotraj krvne žile aktivira proces hemostaze. Pri tem nastane krvni strdek oziroma trombus. Trije glavni faktorji, ki pomembno prispevajo k nastanku trombusa so:

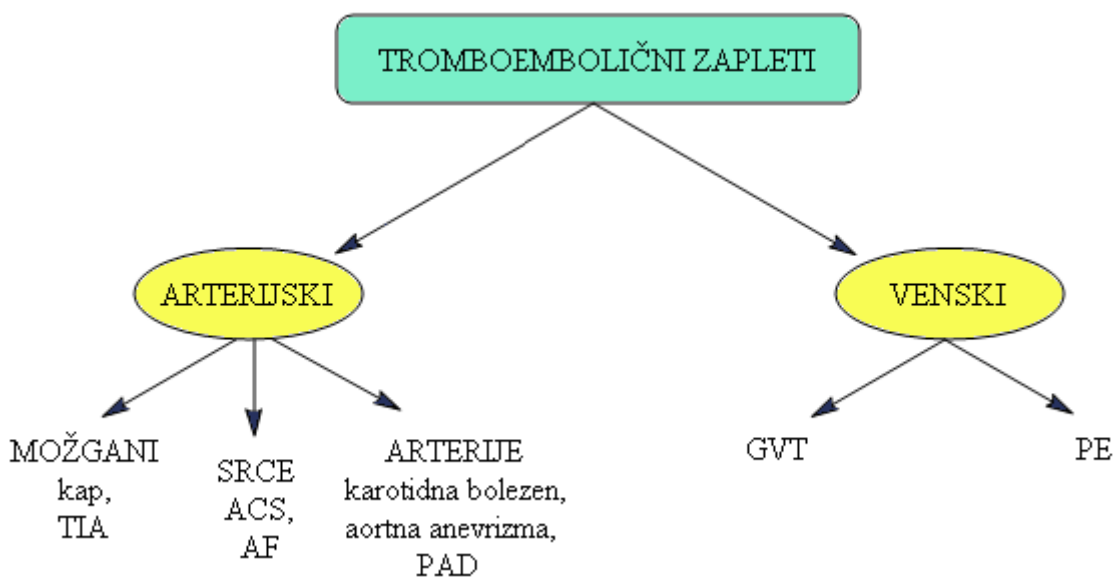
- **poškodba endotelija žilne stene**
- **zastoj v obtoku krvi – staza**
- **nenormalno strjevanje krvi – hiperkoagulabilnost**

Medsebojno so močno povezani in poznani pod imenom Virchowa triada (5).



Slika 2: Virchowa triada.

Do tromboemboličnih zapletov lahko pride tako v arterijskem kot venskem krvnem obtoku (6). Vzroki, ki pripeljejo do arterijske tromboze, so ateroskleroza, motnje v fibrinolizi, maligne bolezni in antifosfolipidni sindrom (7). Vodilna med njimi je napredovana ateroskleroza, ki vodi do trombotičnih zapletov, kot je na primer akutni koronarni sindrom (8). Arterijska zapora, ki je najbolj nevarna posledica nenadnega razpoka aterosklerotičnega plaka, lahko vodi do srčne kapi, možganske kapi ali kritične ishemije udov (9). Najpogostejši vzroki za nastanek venskega tromboembolizma so poškodbe žilne stene (operativne ali iatrogene poškodbe), staza (pooperativna ali kot posledica dolgotrajne imobilizacije) in hiperkoagulabilnost (10). Trombofilija je nagnjenost k nastanku venskih trombusov in je posledica pridobljenih ali podedovanih biokemijskih motenj (11). Posledica podedovanih motenj so okvare naravnih inhibitorjev koagulacije in so izražene kot pomanjkanje antitrombina, proteina C, proteina S ali mutacija faktorja V (faktor V Leiden), ki je vzrok za rezistenco na aktiviran protein C. Med vzroke za pridobljeno nagnjenost h globoki venski trombozi (GVT) pa spadajo antifosfolipidna protitelesa, terapija z estrogeni, maligna obolenja in zapleti ob operacijah (12).



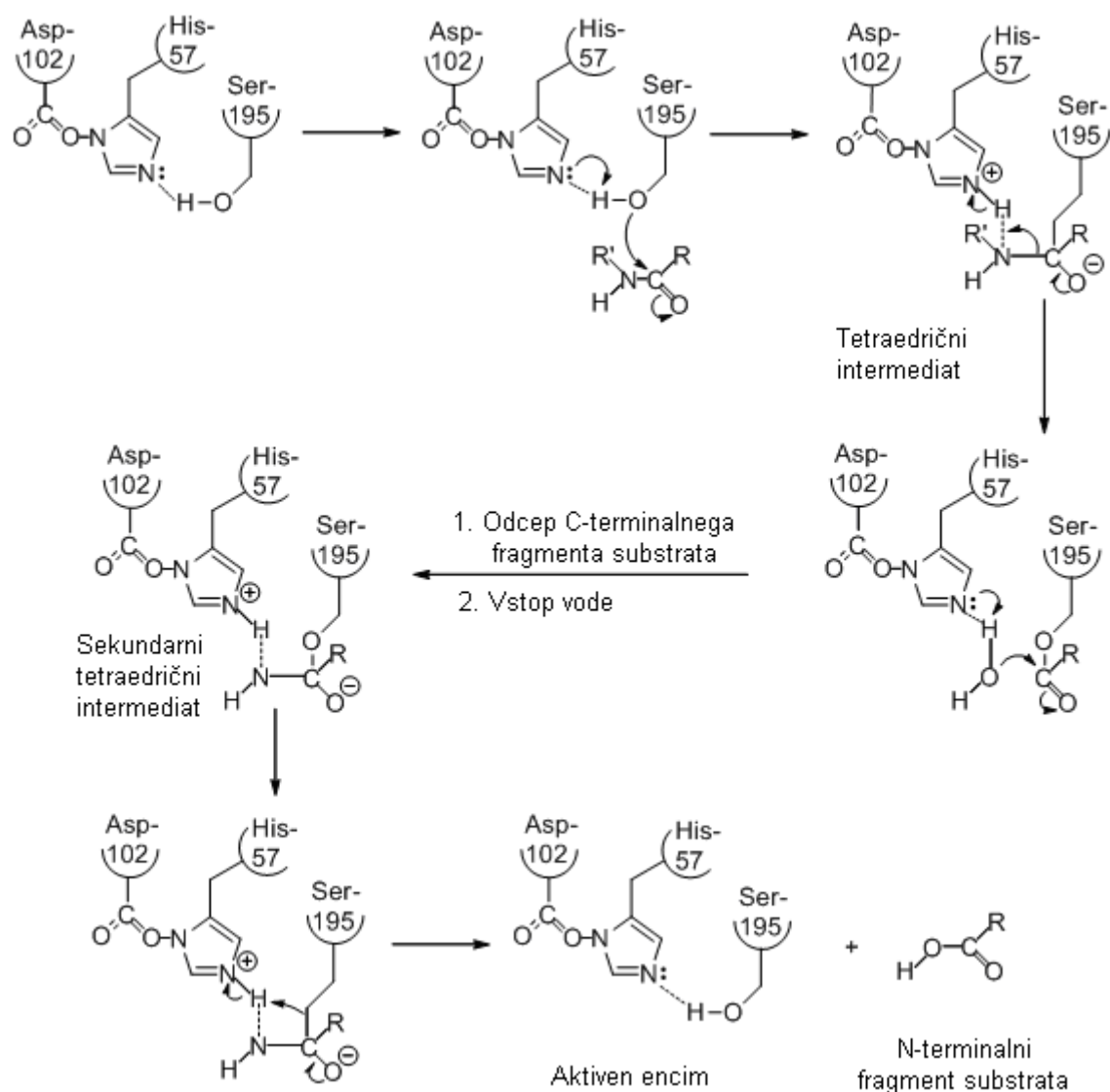
Slika 3: Tromboembolični zapleti. TIA – prehodna ishemična motnja; ACS – akutni koronarni sindrom; AF – atrijska fibrilacija; PAD – periferna arterijska bolezen; GVT – globoka venska tromboza; PE – pljučna embolija

1.3 Trombin

1.3.1 Serinske proteaze

Proteaze so encimi, ki katalizirajo cepitev peptidnih vezi. Serinske proteaze imajo za razliko od ostalih proteaz v aktivno mesto vključeno aminokislino serin, ki je ključna za delovanje encima. Ob serinu sta v aktivno mesto encima vključeni še aminokislini histidin in aspartat, vse skupaj pa predstavljajo tako imenovano katalitično triado. Poznamo 20 družin serinskih proteaz, ki jih ločimo glede na substratno specifičnost. Le-ta je odvisna od aminokislinskega ostanka substrata, ki se ob cepitvi umesti v selektivnostni P_1 žep. Trombin spada v tripsinsko družino serinskih proteaz, ki cepijo peptidno vez za P_1 aminokislinskimi ostanki s pozitivnim nabojem – Lys in Arg. Sem spadajo tudi presnovni encim tripsin, koagulacijski faktorji trombin (IIa), faktor VIIa, faktor IXa, faktor Xa, faktor XIIa, KLK, trombolitični encimi urokinaza, plazmin, tPa in aktiviran protein C. Ker večina faktorjev koagulacijske kaskade spada v družino tripsinskih serinskih proteaz, imajo visoko stopnjo strukturne podobnosti aktivnega mesta in analogen mehanizem cepitve peptidne vezi (13).

Ob vezavi substrata v aktivno mesto se izpostavi karbonilna skupina peptidne vezi, ki jo napade nukleofilna OH skupina Ser-195. Reakcija je bazično katalizirana z imidazolskim obročem His-57. Po tvorbi vodikove vezi med His-57 in Asp-102 pride do aktivacije OH skupine Ser-195 za nukleofilni napad na peptidno vez substrata, ki mu sledi nastanek tetraedričnega intermedata z oksanionsko luknjo, ki jo stabilizirata vodikovi vezi s peptidnima protonoma Ser-195 in Gly-193. Po prenosu protona iz His-57 na amino skupino substrata se odcepi C-terminalni fragment substrata in tvori aciliran encim. Z napadom vode na intermedat acil-encim se tvori sekundarni tetraedrični intermedat. Po odtegnitvi protona vode s pomočjo His-57 sekundarni intermedat razpade, odcepi se N-terminalni del substrata in regenerira se Ser-195 (14).



Slika 4: Mehanizem delovanja serinskih proteaz.

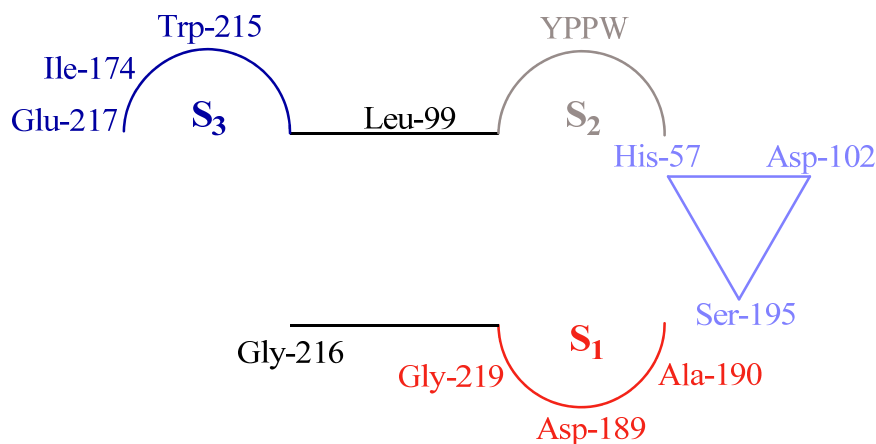
1.3.2 Struktura trombina

Trombin je sestavljen iz verige A s 36 in verige B z 259 aminokislinami, ki sta medsebojno povezani z disulfidno vezjo in tvorita skoraj sferično molekulo. Veriga B je homologna s prebavnim encimom tripsinom, a je zaradi strukturnih posebnosti aktivnega mesta trombin veliko bolj selektiven in razen v redkih primerih katalizira le hidrolizo vezi arginin-glicin v zaporedju Pro-Arg-Gly, medtem ko tripsin katalizira cepitev vezi med argininom ali lizinom in poljubno aminokislino (Arg-X, Lys-X). Na verigi B se nahaja katalitična triada, sestavljena iz aminokislinskih ostankov His-57, Asp-102 in Ser-195. Aktivno mesto lahko razdelimo na tri različna področja oziroma žepe. Selektivnostni ali S_1 žep je omejen z Gly-219, Ala-190 in Asp-189. Karboksilna skupina aspartata interagira s pozitivno nabitimi skupinami, ki se vežejo v ta žep, med njimi tudi z gvanidinsko skupino arginina.

Proksimalni ali S₂ žep omejuje zanka Tyr-60A-Pro-60B-Pro-60C-Trp-60D (zanka YPPW), ki sterično ovira dostop do aktivnega mesta in s tem močno povečuje selektivnost v primerjavi s tripsinom. S₂ žep je od S₁ področja ločen z imidazolnim obročem His-57 katalitične triade in od S₃ področja s stransko verigo Leu-99, ki mu skupaj z zanko YPPW daje hidrofoben značaj. Na to področje se umestijo prolin in druge manjše hidrofobne skupine. Distalni ali S₃ žep poleg Leu-99 omejujejo Ile-174, Trp-215 in Glu-217, ki mu prav tako dajejo hidrofoben značaj. Vanj se običajno umestijo aromatske skupine, kot je na primer fenilni obroč D-fenilalanina, zato ga imenujemo tudi »aril-vezavno mesto«. K vezavi substrata na aktivno mesto prispeva še Gly-216, ki lahko s peptidnim ogrodjem tvori dve vodikovi vezi (15, 16).

Terciarna struktura omogoča trombinu specifične vezavne lastnosti, saj sta ob vezavnem mestu za substrate in inhibitorje tudi dve dodatni vezavni mesti. Na obeh verigah je veliko neenakomerno porazdeljenih aminokislinskih ostankov, ki so na površini specifično prostorsko orientirani in tvorijo področja s prebitkom pozitivnega in negativnega naboja. Mesta s prebitkom naboja so pomembna pri vezavi na negativno nabite površine (koagulacijska kaskada) in pri orientaciji, pritegnitvi ter vezavi substratov ali inhibitorjev. Imenujemo jih glede na vezavo ključnih substratov oziroma inhibitorjev (15, 17):

- **Vezavno mesto za fibrinogen ali vezavno mesto za anione I** (*»anion-binding exosite I«*) je omejeno z zanko Lys-70-Glu-80 in delno stabilizirano z ionskimi interakcijami skupin Glu-77 in Glu-80. Sodeluje pri vezavi fibrina, hirudina, trombomodulina, heparinskega kofaktorja II in cepitvi fibrinogena ter fibrinogenskega receptorja.
- **Vezavno mesto za heparin ali vezavno mesto za anione II** (*»anion-binding exosite II«*) je omejeno s stranskimi skupinami Arg-93, Arg-126, Lys-236, Lys-240 in je pomembno za vezavo heparina, protrombina in antitrombina III.



Slika 5: Struktura trombina.

1.3.3 Funkcije trombina

Trombin ima prokoagulantne, antikoagulantne in ostale funkcije. Nastane z encimsko cepitvijo dveh mest protrombina, ki jo povzroči aktivirani faktor X. V koagulacijski kaskadi pretvori fibrinogen v fibrin, aktivira faktorje V, VIII, XI in XIII, kar predstavlja dodatne pozitivne povratne zanke, ki pospešujejo odzivnost in učinkovitost procesa koagulacije. S tem uravnava tudi lastno proizvodnjo, saj aktivirani faktorji Va, VIIIa in XIa povečujejo njegovo nastajanje. Hkrati z aktivacijo faktorja XI preprečuje fibrinolizo fibrinskih strdkov, z aktivacijo faktorja XIII pa povečuje prečno povezovanje fibrinskih monomerov, kar ima za posledico nastanek trdnega fibrinskega strdka. Trombin prav tako proteolitsko aktivira receptor za trombin, imenovan PAR-1 (*»protease-activated receptor 1«*), ki se nahaja na površini trombocitov. Pri tem se odkrije nov *N*-terminalni konec, ki se kot ligand veže na receptor in ga aktivira.

Antikoagulantno deluje v kompleksu s trombomodulinom, saj nastali kompleks aktivira protein C, ki inaktivira faktorja Va in VIIIa in predstavlja negativno povratno zanko ter mehanizem uravnavanja neustrezne koagulacije. Zraven vlog v hemostazi ima trombin še številne druge funkcije, saj sodeluje v procesih celične diferenciacije in proliferacije, imunskem odzivu ter vnetju (15, 18).

1.4 Fibrinogeni receptor (integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$)

1.4.1 Integrini

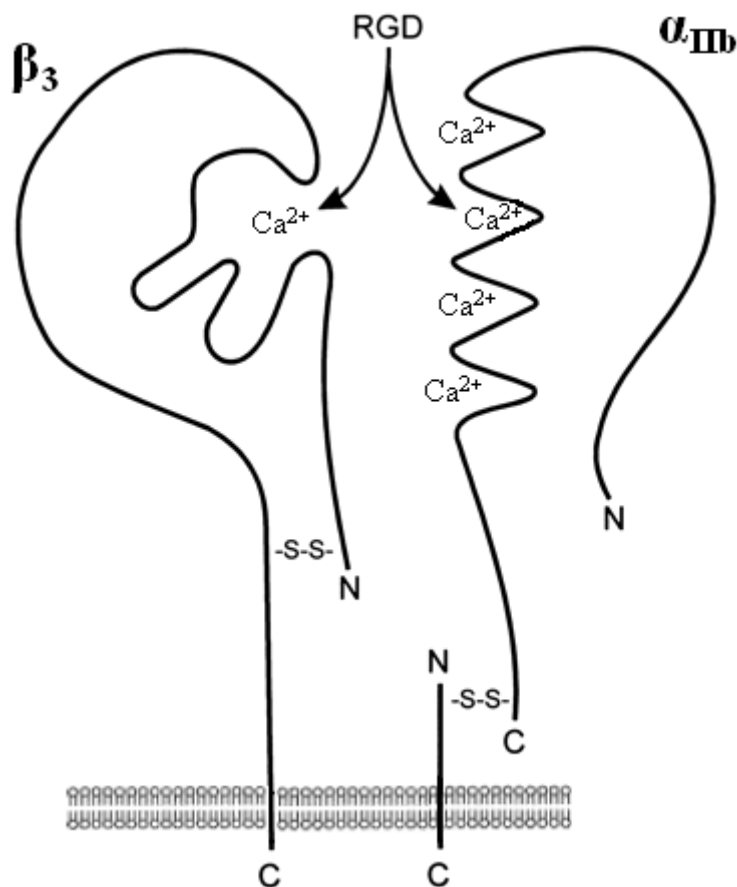
Adhezijo in agregacijo trombocitov omogočajo glikoproteinski receptorji na površini trombocitov. Interakcije teh receptorjev z adhezivnimi glikoproteini, prisotnimi v subendoteliju in plazmi, omogočajo vezavo trombocitov na poškodovano površino žil ali na ostale trombocite. Glikoproteinski receptorji, odgovorni za adhezijo, so GP Ia/IIa (receptor za kolagen), GP Ic/IIa (receptor za laminin), GP Ic*/IIa (receptor za fibronektin), GP Ib (receptor za von Willebrandov faktor) in receptor GP IIb/IIIa, ki ima sposobnost vezave več glikoproteinov in je primarno odgovoren za agregacijo. Najpogosteje se nanj veže fibrinogen. V nasprotju z ostalimi adhezivnimi glikoproteinskimi receptorji vezavna mesta receptorja GP IIb/IIIa v normalnih fizioloških pogojih niso izpostavljena, ampak je njihova aktivacija zadnji korak v verigi dogodkov, ki vodi do aktivacije in agregacije trombocitov. Velika gostota aktiviranih receptorjev na površini trombocitov (50000) zagotavlja, da agregacija poteče hitro (19).

Receptor GP IIb/IIIa skupaj z ostalimi adhezivnimi receptorji pripada družini strukturno sorodnih glikoproteinskih receptorjev, ki so prisotni v številnih celicah in jih imenujemo integrini oziroma citoadhezini. Integrini so nekovalentno povezani heterodimeri, ki so sestavljeni iz podenot α in β ter jih razvrščamo v integrinske družine glede na tip β podenote. Kolagenski, lamininski in fibronektinski receptorji pripadajo β_1 družini, medtem ko receptorja za vWf in fibrinogen spadata v β_3 družino integrinskih receptorjev. Številni integrini prepoznajo aminokislinsko zaporedje Arg-Gly-Asp (RGD), ki je prisotno v večini adhezivnih glikoproteinov. Pomen tega zaporedja je bil potrjen z inhibicijo adhezije glikoproteinov v prisotnosti majhnih peptidov, ki so vsebovali zaporedje RGD. Kljub splošnemu prepoznavnemu zaporedju pa integrini zelo specifično interagirajo z različnimi glikoproteini (19).

1.4.2 Fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa

Fibrinogeni receptor (integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$; receptor GP IIb/IIIa) je sestavljen iz dveh nekovalentno povezanih podenot – GP IIb ali α_{IIb} (α -podenote) in GP IIIa ali β_3 (β -podenote). Za ohranjanje identitete njegove heterodimerne strukture je potreben Ca^{2+} . N-terminalna konca obeh verig segata v izvencelični matriks in sta mesto interakcije s

proteinskimi ligandi, C-terminalna konca pa tvorita citoplazemske repe, ki interagirajo s citoskeletom. α -podenota fibrinogenskega receptorja je sestavljena lahke in težke verige, ki skupaj vsebujeta 1170 aminokislin in sta med seboj povezani z disulfidnim mostom in ogljikovimi hidrati. Težka veriga leži izven celice in na N-terminalnem delu vsebuje domeno imenovano β -propeler, ki ji sledijo štiri domene vijačnica-zanka-vijačnica (EF dlani), na katerih se nahajajo vezavna mesta za Ca^{2+} . β -podenota je sestavljena iz 762 aminokislin in ima v izvencelični domeni na proteaze odporno regijo bogato s cisteinom in veliko disulfidno zanko, ki povezuje končno aminokislino s sredino izvencelične domene. V kompleksu z α -podenoto tvori kompleks, ki prepozna zaporedje RGD (19, 20, 21).



Slika 6: Struktura fibrinogenskega receptorja.

Receptor GP IIb/IIIa se mora pred vezavo fibrinogena predhodno aktivirati. Aktivirajo ga različni agonisti (kolagen, trombin, ADP in TXA_2), ki povzročijo konformacijsko spremembo receptorja in povečajo afiniteto fibrinogenskega receptorja do fibrinogena. Vezava fibrinogena na fibrinogeni receptor povzroči ponovno konformacijsko

spremembo in pospešeno izločanje trombocitnih mediatorjev, reorganizacijo celičnega skeleta ter združevanje fibrinogenских receptorjev, kar vodi v obsežno trombocitno agregacijo. Vezava liganda z RGD zaporedjem sproži vnovično konformacijsko spremembo po kateri se na izvencelični domeni receptorja izpostavijo nova vezavna mesta (20, 21).

1.4.3 Fibrinogen

Fibrinogen je dimer, sestavljen iz treh polipeptidnih verig ($A\alpha$, $B\beta$ in γ), ki so organizirane v tri globularne enote. Globularne enote so med seboj povezane z dvema verigama sestavljenima iz trojno prepletene α -vijačnice. Takšna dimerna struktura omogoča vezavo dveh trombocitov hkrati in s tem omogoči agregacijo. Vsaka od $A\alpha$ verig fibrinogena vsebuje dve RGD zaporedji (RGDF na $A\alpha$ 95-98 in RGDS na $A\alpha$ 572-575), medtem ko je na C-terminalnem delu γ verige specifično GP IIb/IIIa-prepoznavno dodekapeptidno zaporedje. Ob vezavi na fibrinogenški receptor se fibrinogen z RGD zaporedjem veže na β -podenoto GP IIb/IIIa receptorja oziroma s specifičnim dodekapeptidnim zaporedjem na α verigo integrinskega receptorja. Istočasni vezavi obeh zaporedij se vzajemno izključujeta (19).

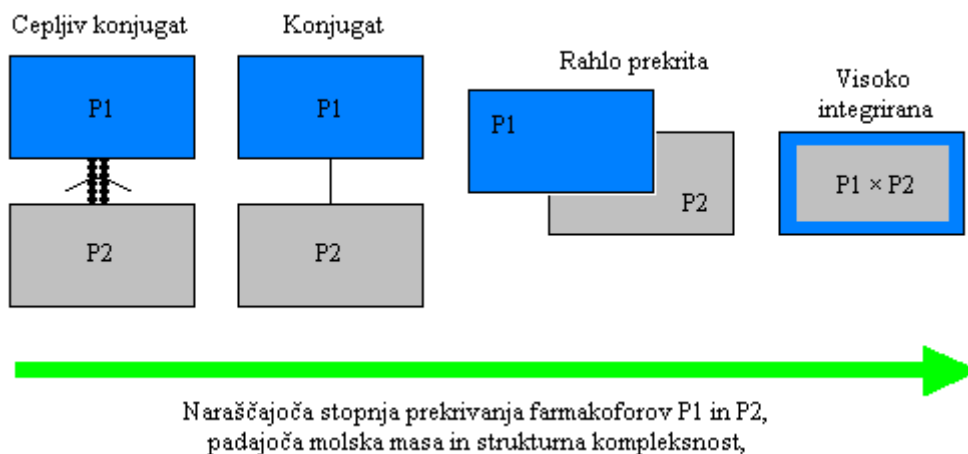
1.5 Antitrombotične učinkovine z dualnim mehanizmom delovanja

1.5.1 Razvoj multiplih ligandov

Pri načrtovanju novih učinkovin prevladuje princip ena bolezen – ena tarča. Ker ta pristop kljub velikemu trudu in racionalnemu pristopu načrtovanja učinkovin s pomočjo računalniških tehnik pogosto ni prinesel želenih rezultatov, je farmacevtska industrija začela iskati nove strategije razvoja učinkovin. Učinkovine z delovanjem na več tarč (multipli ligandi) lahko z ustrezno kombinacijo farmakoforov v eni sami molekuli dosežejo sinergističen učinek. Medtem ko so multiple ligande včasih odkrili le po naključju, pa danes prevladuje racionalen razvoj ligandov z delovanjem na specifične tarče (22).

Uravnavanje afinitete do dveh ali več tarč in hkratno ohranjanje fizikalno-kemijskih ter farmakokinetičnih lastnosti skupaj z možnostjo peroralne uporabe je velik izziv za farmacevtsko kemijo. Prednosti uporabe učinkovin z multiplim delovanjem v primerjavi s klasično polifarmakologijo so manj kompleksna in bolj predvidljiva farmakokinetika, manj zahtevne klinične študije, enostavnejši postopek registracije in nižje tveganje za nastanek

interakcij med zdravilnimi učinkovinami (23). V uporabi sta dva načina ustvarjanja oziroma pridobivanja učinkovin z delovanjem na več različnih tarč: reševanje (»*screening*«) knjižnic poznanih učinkovin in racionalni (»*knowledge-based*«) pristop, ki temelji na kombiniranju pogosto uporabljenih farmakoforov (24). Farmakofori so lahko konjugirani (s cepljivimi ali necepljivimi vmesniki), lahko se le delno prekrivajo ali pa so visoko integrirani, kar je posledica visoke podobnosti spojin vodnic.



Slika 7: Različni pristopi k načrtovanju multiplih ligandov (22).

1.5.2 Polifarmakologija

Poznamo tri različne pristope k polifarmakologiji. Tradicionalno je najpogostejše v rabi uporaba kombinacije dveh ali več zdravilnih učinkovin. Tak pristop ima nekatere slabosti, med njimi slabo komplianco s strani bolnikov in interakcije med učinkovinami. Zato je razmišljanje vodilo v smeri izdelave zdravila, ki bi vsebovalo dve ali več zdravilnih učinkovin v eni sami farmacevtski obliki. Omejena prilagodljivost odmerkov, fiziološko variabilen metabolizem med pacienti in drage klinične študije so razlogi, da monoterapija še vedno prevladuje. Eno izmed možnosti, ki bi omenjene težave zmanjšala oziroma odpravila, predstavljajo multipli ligandi (22, 23, 24, 25).



Slika 8: Različni pristopi k polifarmakologiji.

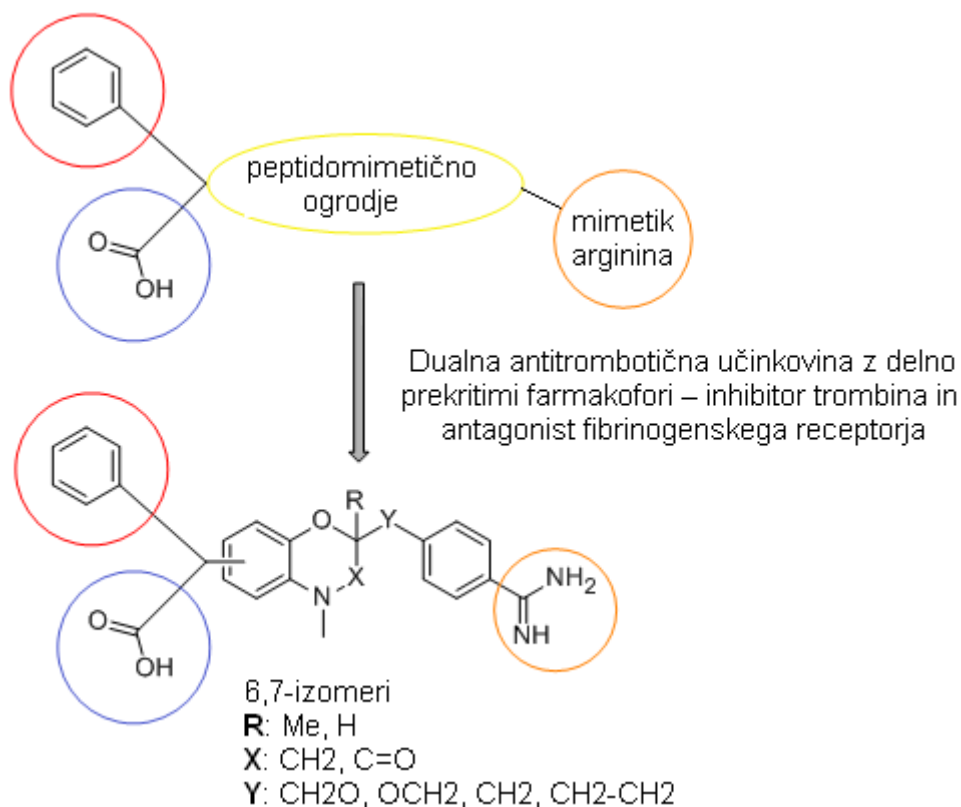
1.5.3 Dosedanje delo na področju dualnih antitrombotičnih učinkovin

V klinični praksi za učinkovito preprečevanje in zdravljenje kardiovaskularnih bolezni, kot so globoka venska tromboza, srčna kap, možganska kap in pljučna embolija, uporabljamo različne kombinacije antikoagulantnih (npr. varfarin ali heparin) in antiagregatornih (npr. acetilsalicilna kislina ali tiklodipin) učinkovin (26). S tem dosežemo sočasno inhibicijo dveh ali več faktorjev koagulacijske kaskade in posledično boljše učinke zdravljenja kot pri monoterapiji (27). Slabosti polifarmakološkega zdravljenja, ki se pogosto pojavita pri bolnikih po kardiovaskularnih zapletih sta neskladnost jemanja več zdravil v skladu z navodili in možnost nastanka interakcij med predpisanimi učinkovinami (28). Odprava teh nevarnosti zahteva nove pristope pri načrtovanju in odkrivanju novih učinkovin. Kombiniranje dveh ali več učinkovin v eni molekuli postaja vedno pogostejše uporabljani pristop farmacevtskih kemikov, ki s tem poskušajo ustvariti nov razred antitrombotičnih učinkovin (29). Zanimiv terapevtski potencial ponujajo učinkovine, ki bi imele hkrati antikoagulantno in antiagregatorno delovanje. Kot primerni tarči takšnega načrtovanja se ponujata trombin in fibrinogeni receptor, katerih tridimenzionalni strukturi sta dobro poznani in zato omogočata strukturno podprto načrtovanje novih učinkovin (30).

Na Fakulteti za farmacijo že skoraj 20 let potekajo raziskave na področju antitrombotičnih učinkovin. V zadnjih letih veliko časa posvečajo raziskavam dualnih antitrombotičnih učinkovin, kjer poskušajo z združevanjem farmakoforov antiagregatornih in antikoagulantnih učinkovin doseči sinergističen učinek delovanja. Molekula z dualnim delovanjem – inhibitornim na trombin in antagonističnim na fibrinogeni receptor mora vključevati naslednje strukturne zahteve:

- mimetik arginina, ki interagira z Asp-189 v S₁ žepu trombina in predstavlja kationski center za vezavo na fibrinogenški receptor
- prosto karboksilno skupino, ki omogoča ionske in dipol-dipol interakcije s fibrinogenškim receptorjem
- osrednje ogrodje, ki interagira z YPPW zanko trombina in je 1,5 nm velik distančnik med dvema nabitima skupinama, ki se vežeta na fibrinogenški receptor
- aromatski obroč v bližini proste karboksilne skupine, ki interagira s S₃ žepom trombina in tvori hidrofobne interakcije z nepolarnim vezavnim mestom fibrinogenskega receptorja

Učinkovine, ki ustrezajo navedenim zahtevam, so zasnovali z združitvijo farmakoforov – D-Phe-Pro-Arg (fPR) in Arg-Gly-Asp (RGD) v eno nepeptidno molekulo, ki se hkrati veže na aktivno mesto trombina in na fibrinogenški receptor (31).



Shema 1: Pristop k načrtovanju učinkovin z dualnim delovanjem.

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je z uporabo Wittigove reakcije sintetizirati nove spojine benzoksazinskega tipa, ki bodo predvidoma delovale dualno – inhibitorno na trombin in antagonistično na fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa. Z uspešno izvedbo Wittigove reakcije bomo uvedli novo sintezno pot, ki bo v prihodnosti služila kot osnova za sintezo strukturnih analogov z visoko biološko aktivnostjo. Sintetizirali bomo spojine, ki vstopajo v Wittigovo reakcijo in nato Wittigovo reakcijo tudi izvedli. S prvenstveno izvedbo Wittigove reakcije na področju dualnih antitrombotičnih učinkovin bomo v strukturo molekule vključili dodatni ogljikov atom. »*In silico*« simulacije končnih molekul z vključenim dodatnim ogljikovim atomom v programu AvtoDock 4.0 predvidevajo boljšo biološko aktivnost sintetiziranih spojin in predstavljajo naslednji korak h končnemu cilju – sintezi zdravilne učinkovine.

Končni produkt sinteze bo spojina **16** (2-((2-(4-(amidinofenetil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)ocetna kislina)), katere delovanje na trombin in fibrinogeni receptor bomo ovrednotili z »*in vitro*« testiranjem na biološkem sistemu. Inhibicijo encimske aktivnosti trombina bomo določili z merjenjem absorbance produkta, ki bo nastal po encimski cepitvi iz kromogenega substrata. Za določitev antagonističnega delovanja na receptorju GP IIb/IIIa bomo uporabili modificiran encimsko imunski test (»*ELISA*«). Učinkovitost naše spojine bomo primerjali s tržno uveljavljenima učinkovinama – dabigatranom, ki je direktni inhibitor trombina in tirofibanom, ki je antagonist fibrinogenkega receptorja GP IIb/IIIa. Na koncu bomo iz bioloških rezultatov ocenili skladnost med napovedano in dejansko aktivnostjo spojine in podali mnenje o nadaljnjih korakih optimizacije.

3 MATERIALI IN METODE

- **AutoDock 4.0**

Za optimizacijo in virtualno umeščanje sintetizirane spojine v aktivno mesto trombina in na fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa smo uporabili za akademsko uporabo prosto dostopen program AutoDock 4.0.

- **Določanje tališča**

Temperature tališč spojin smo določali s talilnim mikroskopom znamke Leica z ogrevalno mizico in jih nismo korigirali.

- **Elementna analiza (CHN)**

Vsebnosti elementov C, H in N so bile izmerjene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.

- **Encimski test inhibicije serinskih proteaz**

Encimska amidolitična metoda za določanje inhibicije serinskih proteaz je osnovana na spektrofotometrični določitvi absorbance nastalega produkta po cepitvi amidne vezi kromogenega substrata v prisotnosti encima. Konstanto inhibicije (K_i), ki je običajno kvantitativna mera jakosti inhibitorja, smo določili iz kinetike hidrolize substrata z in brez dodatka inhibitorja (32). Meritve (s spektrofotometrom BioTek Synergy H4) smo izvedli na mikrotitrirnih ploščicah s 96 vdolbinicami in končnim volumnom 200 μ L. Trombin smo testirali pri končni koncentraciji 0,5 NIH E/mL s končnima koncentracijama substrata S-2238 (Chromogenix) 20 in 40 μ M, faktor Xa pa pri končni koncentraciji 1 mBAEE E/mL s končnima koncentracijama substrata S-2222 (Chromogenix) 100 in 200 μ M. Vsebnost tripsina smo določili pri končni koncentraciji 0,5 nkat/mL z uporabo substrata S-2222 (Chromogenix) pri končnih koncentracijah 50 in 100 μ M. Inhibitorje smo raztopili v DMSO (koncentracija osnovne raztopine, 10 mmol/L) in razredčili z destilirano vodo do koncentracij med 0,5 in 100 μ M. Reakcijske hitrosti smo določili v prisotnosti in odsotnosti inhibitorja. Nato smo v vdolbinice mikrotitrirnih ploščic odpipetirali 50 μ M pufra HBSA, 50 μ M raztopine inhibitorjev različnih koncentracij (oziroma pufra HBSA v primeru slepe meritve) in 50 μ M raztopine encimov. Ploščice smo 15 minut inkubirali pri 25 °C in dodali 50 μ L kromogenega substrata. Nato smo v 10 sekundnih časovnih intervalih merili absorbanco pri $\lambda = 405$ nm in 25 °C. Meritve smo izvedli v trojniku s tremi koncentracijami inhibitorja in dvema koncentracijama substrata. Za vsako kombinacijo koncentracij smo iz spremembe absorbance začetnega, linearnega dela

absorpcijske krivulje z izračunali K_i z uporabo metode Chenga in Prusoffa in končne rezultate podali kot povprečno vrednost. Za kontrolo smo uporabili dabigatran (trombin, $K_i = 6,3 \pm 1,1$ nM).

- **Infrardeča spektrometrija (IR)**

IR spektre smo posneli s spektrometrom Perkin Elmer 1600 FT-IR, Spectrum BX na Fakulteti za farmacijo.

- **»In vitro« inhibicija vezave fibrinogena na izolirane receptorje GP IIb/IIIa**

Afiniteto vezave na receptorje GP IIb/IIIa smo določili s modificiranim ELISA testom (33). Humani fibrinogen (100 mg) smo raztopili v vodni raztopini NaCl (0,3 M, 5 mL) pri 30 °C in nato razredčili z 0,1 M vodno raztopino NaHCO₃ do končne koncentracije 1 mg/mL. Biotin *N*-hidroksisukcinimidni ester (2 mg) smo raztopili v DMF (2 mL) in ga dodali k 6 mL raztopine fibrinogena. Reakcijsko mešanico smo 90 minut inkubirali pri 30 °C in jo 3 ure dializirali pri sobni temperaturi proti *pufri* 1 (3 L, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4). Po dializi smo raztopino 5 minut centrifugirali pri 5400 rpm, ji dodali Tween-20 (0,005 %) in dobili osnovno raztopino. Humani integrin (10 µL raztopine receptorjev GP IIb/IIIa (Calbiochem) smo razredčili z 10,2 mL *pufri* 2 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, pH 7,4) in preko noči pri 4 °C adsorbirali na visoko vezavne mikrotitrirne ploščice (Greiner, Lumitrac 600) z volumnom vdolbinice 100 µL. Nespecifična receptorska vezavna mesta smo blokirali z 1 % BSA v *pufri* 2 (200 µL/vdolbinico). Po enurni inkubaciji pri sobni temperaturi smo ploščice dvakrat sprali s *pufrom* 3 (*pufrom* 2, ki vsebuje 0,1 % Tween-20). Potencialne antagoniste smo razredčili s *pufrom* 2, ki je vseboval 0,1 % BSA in v vsako vdolbinico dodali testno raztopino (50 µL/vdolbinico) in biotiniliran fibrinogen (50 µL/vdolbinico, 1:42 osnovna raztopina : *pufri* 2, ki vsebuje 0,1 % BSA). Ploščice smo 2 uri inkubirali pri sobni temperaturi in jih nato dvakrat sprali s *pufrom* 3. Na koncu smo v vsako vdolbinico dodali s peroksidazo konjugirana kozja protitelesa (100 µL/vdolbinico, 1:1000 kupljene raztopine (Calbiochem) : *pufri* 2, ki vsebuje 0,1 % BSA) in inkubirali še eno uro pri sobni temperaturi, nato pa ploščice trikrat sprali s *pufrom* 3. Na koncu smo v vsako vdolbinico dodali kemiluminiscenčni substrat (100 µL/vdolbinico, POD, Roche Diagnostics, Boehringer Mannheim) in izmerili luminiscenco s čitalcem BioTek Synergy H4 (opravili smo tri meritve v času desetih minut). K pozitivni kontroli nismo dodali inhibitorjev, k negativni pa ne receptorjev. Kot interni standard smo uporabili tirofiban (IC_{50} (GP IIb/IIIa) = $0,37 \pm 0,11$ nM). Testiranja smo izvedli v dvojniku in jih ob različnih dnevih ponovili

najmanj trikrat. Srednje eksperimentalne vrednosti smo vstavili v sigmoidni model in iz krivulje odmerok-odziv izračunali vrednosti IC_{50} (OriginPro, OriginLab, verzija 7.5).

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

Del 1H -NMR spektrov je bil posnet na spektrometru Bruker AVANCE DPX₃₀₀ pri 300,15 MHz za Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, del 1H -NMR spektrov in ^{13}C -NMR spektri pa na spektrometru Bruker AVANCE III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo. Za računalniško obdelavo spektrov smo uporabili program MestRe-C 4.8.6 proizvajalca Mestrelab Research.

- **Masna spektrometrija (MS)**

Masni spektri in HR-MS spektri so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan.

- **Normalnofazna kolonska kromatografija**

Pri ločevanju spojin smo kot stacionarno fazo uporabili Kieselgel 60 proizvajalca Merck s premerom delcev 0,040-0,063 mm. Kot mobilno fazo smo uporabili različna topila, ki so navedena pri vsaki sintezi posebej.

- **OriginPro 7.5**

Za izračun IC_{50} fibrinogenskega receptorja smo uporabili za akademsko uporabo prosto dostopen program OriginPro proizvajalca OriginLab.

- **Poimenovanje in risanje spojin**

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

- **Reagenti in topila**

Pri sintezah in kromatografskih ločitvah smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka, Janssen in Merck in smo jih uporabljali brez čiščenja in sušenja, razen če je navedeno drugače.

- **Reverznofazna kolonska kromatografija**

Končno spojino smo čistili z reverznofazno kolonsko kromatografijo na sistemu IsoleraTM proizvajalca Biotage[®]. Gre za adsorpcijsko flash kromatografijo, pri kateri se uporabljajo štiri različne stacionarne faze: Silica, HP-SIL, KP-NH in KP-C18-HS. Mobilna faza je bila sestavljena iz vode in acetonitrila. Gradient acetonitrila smo zvezno povečevali iz začetnih 20 % do 80 % po preteku 20 minut.

- **Tankoplastna kromatografija (TLC)**

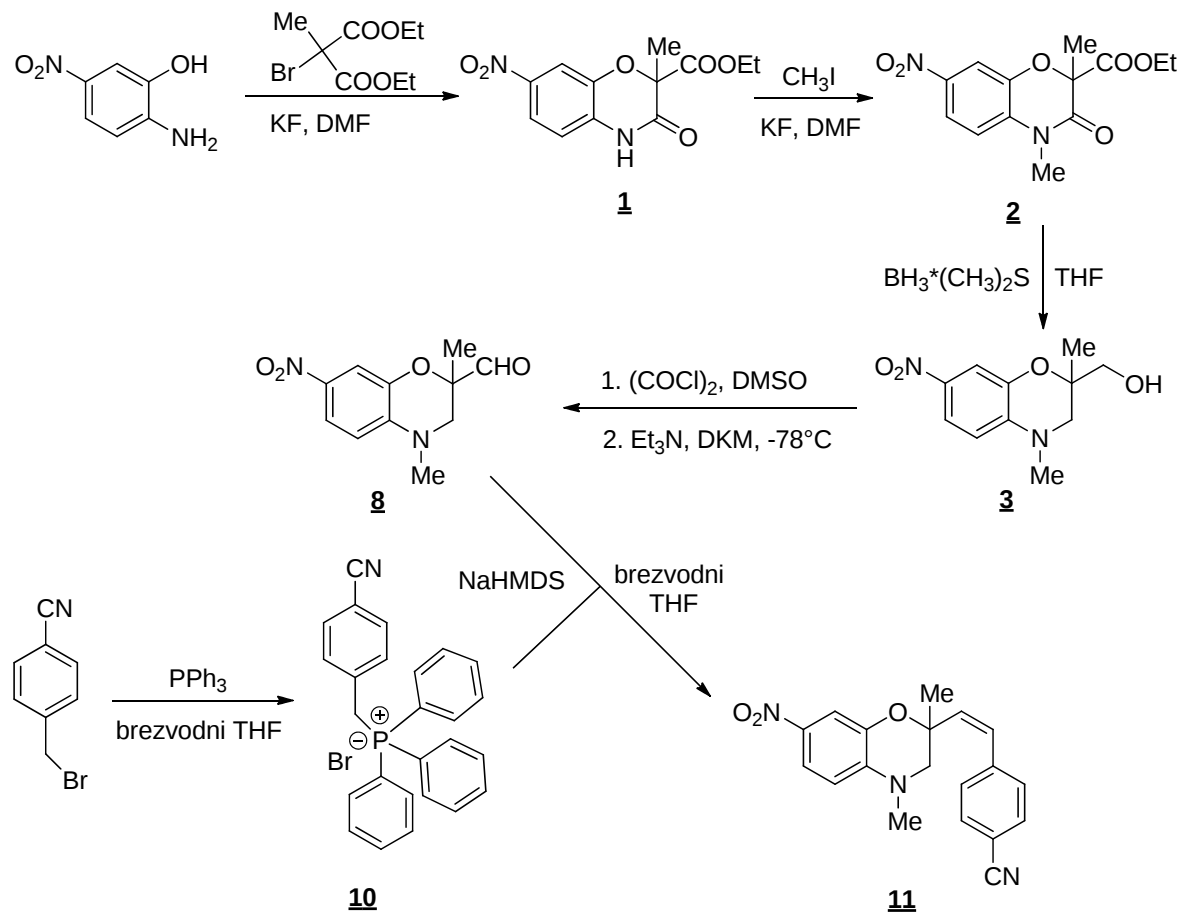
Uporabljali smo plošče DC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino $\lambda = 254$ nm in orositveni reagent ninhidrin za detekcijo aminov.

- **Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

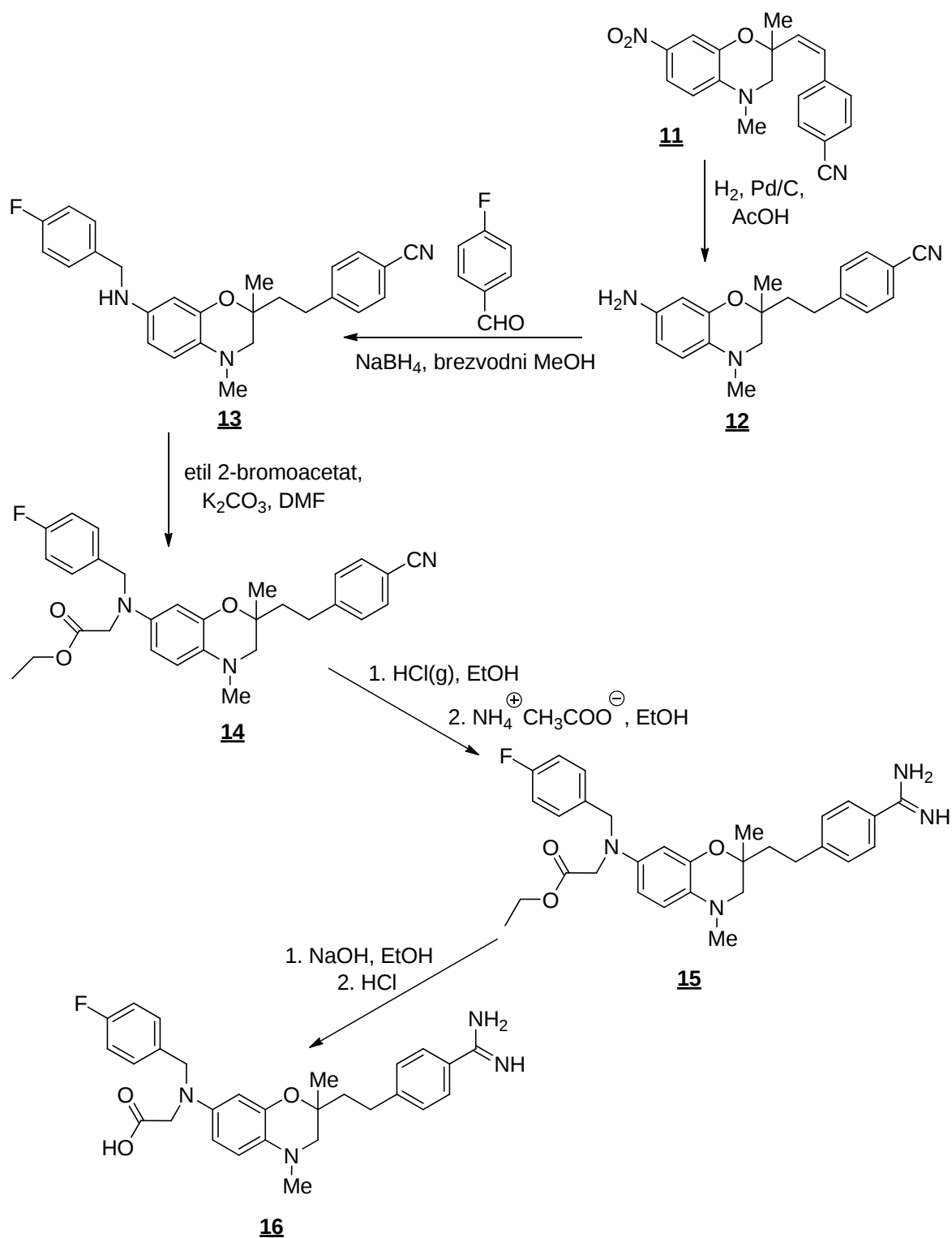
Visokotlačno tekočinsko kromatografijo smo izvedli na instrumentu Agilent Technologies HP 1100, opremljenim z G1365B UV-VIS detektorjem ($\lambda = 254$ nm) in kolono Eclipse Plus C18 (4,6 × 150 mm) pri pretoku 1 mL/min. Mobilna faza je bila sestavljena iz vode in acetonitrila. Gradient acetonitrila smo zvezno povečevali iz začetnih 20 % do 80 % po preteku 20 minut.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Sinteza nove dualne antitrombotične učinkovine

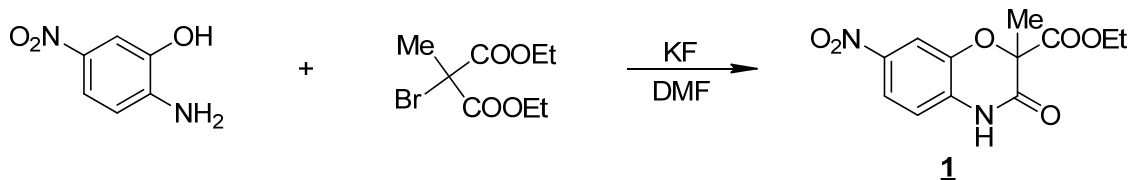


Shema 1: Shema sinteze končne spojine s potencialnim dualnim antitrombotičnim delovanjem.



Shema 1 (nadaljevanje): Shema sinteze končne spojine s potencialnim dualnim antitrombotičnim delovanjem.

4.1.1 Sinteza etil 2-metil-7-nitro-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilata

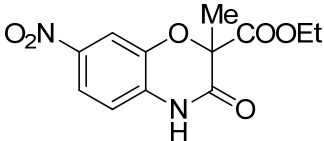


Postopek:

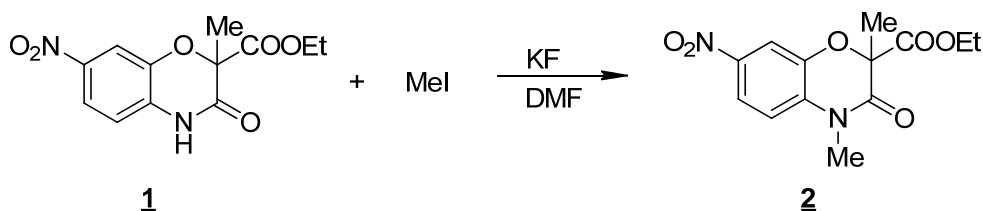
25,31 g (100,0 mmol) dietil 2-bromo-2-metilmalonata in 11,62 g (2 eq, 200,0 mmol) kalijevega fluorida smo suspendirali v 200 mL DMF. Po 15 minutah mešanja pri sobni temperaturi smo dodali 15,41 g (1 eq, 100,0 mmol) 2-amino-5-nitrofenola. Reakcijsko mešanico smo segreli na 60 °C in jo mešali 5 ur. S tankoplastno kromatografijo smo zaznali konec reakcije. Nastalo suspenzijo smo zlili na zmes led/voda (130 g) in jo preko noči postavili v hladilnik, kjer so se izpadli drobni, svetlo rjavi kristali. Naslednje jutro smo produkt odfiltrirali in preko noči sušili v sušilniku pri 60 °C.

Izkoristek reakcije: 25,84 g (92,2 %)

Rf (DKM:MeOH = 20:1) = 0,30

Etil 2-metil-7-nitro-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilat		Mr = 280,23 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	svetlo rjavi kristali	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 1,19 (t, 3H, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 1,91 (s, 3H, 2-CH ₃), 4,19 (m, 2H, CH ₂ -CH ₃), 6,94 (d, 1H, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H ⁵), 7,94 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,6, 2,4 Hz, Ar-H ⁶), 7,97 (d, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, Ar-H ⁸), 8,82 (s, 1H, NH)	
MS (ESI)	m/z (%) = 281,1 (MH ⁺ , 100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3198, 3086, 2988, 2944, 1748, 1695, 1605, 1539, 1509, 1380, 1340, 1237	
T _{tal}	198-200 °C T _{tal} po literaturi: 194-195 °C (34)	

4.1.2 Sinteza etil 2,4-dimetil-7-nitro-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilata

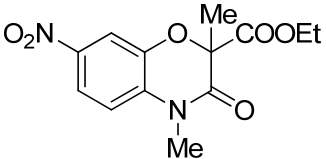


Postopek:

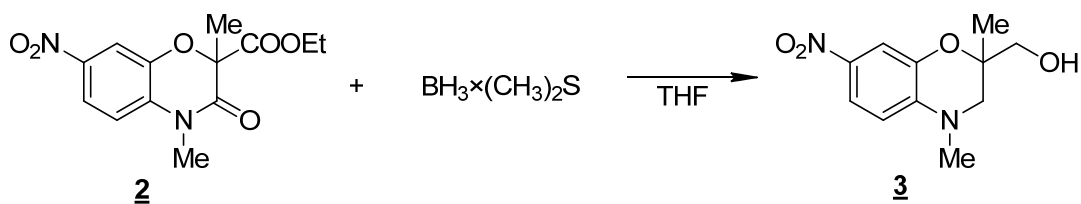
Natehtali smo 12,00 g (42,86 mmol) spojine **1** in 4,98 g (2 eq, 85,71 mmol) kalijevega fluorida in ju suspendirali v 100 mL DMF. Po 15 minutah mešanja smo dodali 2,80 mL (1,05 eq, 45 mmol) metiljodida in reakcijo pustili teči preko noči pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo s tankoplastno kromatografijo preverili, da je reakcija končana. Vsebino bučke smo zlili na zmes led/voda (150 g) in pustili preko noči pri sobni temperaturi. Izpadli so rdeči kristali, ki smo jih odfiltrirali in preko noči posušili v sušilniku pri 60 °C.

Izkoristek reakcije: 11,92 g (94,6 %)

R_f (DKM:MeOH = 20:1) = 0,75

Etil 2,4-dimetil-7-nitro-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin karboksilat		Mr = 294,26 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	rdeči kristali	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 1,17 (t, 3H, J = 7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 1,90 (s, 3H, 2-CH ₃), 3,46 (s, 3H, N-CH ₃), 4,16 (m, 2H, CH ₂ -CH ₃), 7,05 (d, 1H, J = 8,8 Hz, Ar-H ⁵), 7,95 (d, 1H, J = 2,5 Hz, Ar-H ⁸), 7,99 (dd, 1H, J = 8,8, 2,5 Hz, Ar-H ⁶)	
MS (ESI)	m/z (%) = 295,1 (MH ⁺ , 100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3122, 2976, 2481, 1728, 1602, 1525, 1339, 1291, 1242	
T _{tal}	115-117 °C T _{tal} po literaturi: 118-120 °C (35)	

4.1.3 Sinteza (2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)metanola

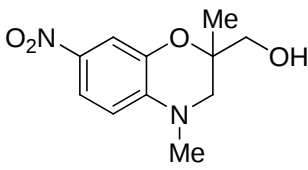


Postopek:

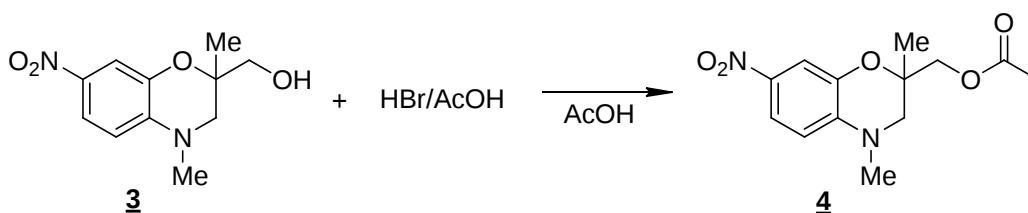
Natehtali smo 11,82 g (40,21 mmol) spojine **2**, jo raztopili v 100 mL THF in počasi dodali 40,2 mL (2 eq, 80,42 mmol) boran-dimetilsulfidnega kompleksa. Bučko smo preko noči refluktirali na oljni kopeli pri 80 °C. Naslednji dan smo izvedli tankoplastno kromatografijo. Ob lisi produkta je bila prisotna tudi lisa izhodne spojine, zato smo dodali še 30,15 mL (1,5 eq, 60,32 mmol) boran-dimetilsulfidnega kompleksa in pustili refluktirati preko noči pri 80 °C. Topilo smo odparili pri znižanem tlaku in v bučko dodali 17 mL (17 mmol) 1 M HCl, ki smo jo predhodno razredčili z vodo do 50 mL. Bučko smo pol ure segrevali pod refluxom pri 110 °C, nato pa ohladili do 0 °C. Izpadli so oranžni kristali, ki smo jih odfiltrirali in sprali z ledeno mrzlo vodo. Kristale smo preko noči posušili v sušilniku pri 50 °C in dobili rdečo amorfno snov.

Izkoristek reakcije: 7,93 g (82,8 %)

R_f (EtOAc:heksan = 1:1) = 0,11

(2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)metanol		Mr = 238,24 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	rdeča amorfna snov	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 1,31 (s, 3H, 2-CH ₃), 1,90 (s, 1H, CH ₂ -OH), 3,06-3,12 (m, 4H, N-CH ₃ , 3-H), 3,50 (d, 1H, J = 12,1 Hz, 3-H), 3,66 (ddd, 2H, J = 11,6, 6,4 Hz, 2-CH ₂), 6,60 (d, 1H, J = 9,0 Hz, Ar-H ⁵), 7,68 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Ar-H ⁸), 7,83 (dd, 1H, J = 9,0, 2,6 Hz, Ar-H ⁶)	
MS (ESI)	m/z (%) = 239,1 (MH ⁺ , 100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3783, 3515, 3086, 2739, 2362, 1603, 1534, 1310, 1285, 1220	
T _{tal}	120-122 °C T _{tal} po literaturi: 125-127 °C (31)	

4.1.4 Sinteza (2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)metil acetata



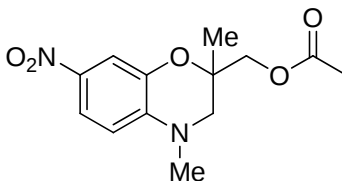
Postopek:

0,476 g (2,00 mmol) spojine **3** smo natehtali v 100 mL bučko, dodali 25 mL 100 % očetne kisline in mešali pri 0 °C na ledu, dokler se spojina ni popolnoma raztopila. Dodali smo 5 mL 33 % HBr v očetni kislini in preko noči mešali pri sobni temperaturi. Konec reakcije smo določili s tankoplastno kromatografijo. Vsebino bučke smo zlili na zmes led/voda (50 g) in počakali, da se je led stalil. Nastalo suspenzijo smo ekstrahirali s 3 x 50 mL EtOAc in organsko fazo zaporedoma sprali s 50 mL 5 % vodne raztopine NaHCO₃ in 50 mL

nasičene raztopine NaCl ter posušili z dodatkom Na₂SO₄. Organsko fazo smo filtrirali in topilo odstranili pri znižanem tlaku. Dobili smo oranžen oljnat produkt, ki se je na zraku strdil v rumeno amorfno snov.

Izkoristek reakcije: 0,473 g (84,4 %)

R_f (DKM:MeOH = 100:1) = 0,45

(2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)metil acetat		Mr = 280,28 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	rumena amorfna snov	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 300 MHz)	δ [ppm] = 1,29 (s, 3H, 2-CH ₃), 2,03 (s, 3H, CO-CH ₃), 2,98 (s, 3H, N-CH ₃), 3,08 (d, 1H, <i>J</i> = 12,1 Hz, 3-H), 3,25 (d, 1H, <i>J</i> = 12,1 Hz, 3-H), 4,06 (s, 2H, 2-CH ₂), 6,53 (d, 1H, <i>J</i> = 9,0 Hz, Ar-H ⁵), 7,62 (d, 1H, <i>J</i> = 2,6 Hz, Ar-H ⁸), 7,75 (dd, 1H, <i>J</i> = 9,0, 2,6 Hz, Ar-H ⁶)	
MS (ESI)	m/z (%) = 281,1 (MH ⁺ , 100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3712, 3430, 3152, 2882, 2085, 1748, 1600, 1529, 1491, 1313, 1279, 1223	
T _{tal}	84-86 °C	

4.1.5 Sinteza metil (2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)metansulfonata

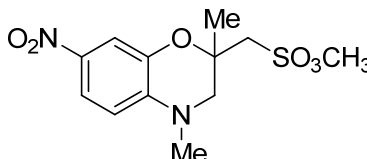


Postopek:

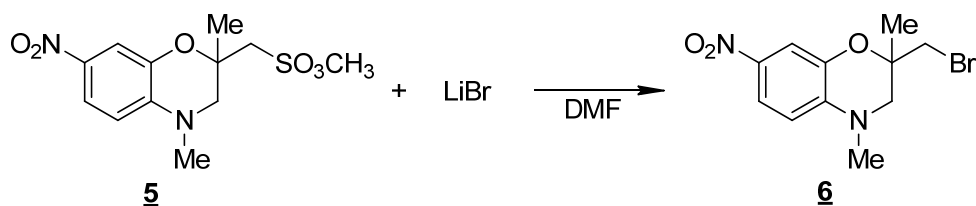
Natehtali smo 1,877 g (7,88 mmol) spojine **3**, jo raztopili v 100 mL DKM, dodali 1,215 mL (1,1 eq, 8,67 mmol) Et₃N in ohladili na ledu do -10 °C. Med mešanjem smo v bučko po kapljicah dodali 0,674 g (1,1 eq, 8,67 mmol) metansulfonil klorida, ki smo ga raztopili v 50 mL DKM. Pri sobni temperaturi smo mešali 24 ur in konec reakcije določili s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko mešanico smo najprej sprali s 60 mL vode, nato pa še s 60 mL 5 % vodne raztopine NaHCO₃. Organsko fazo smo posušili z 10 g Na₂SO₄ in topilo odstranili pri znižanem tlaku. Dobili smo rumeno olje, ki se je na zraku strdilo v oranžno amorfno snov.

Izkoristek reakcije: 2,480 g (99,5 %)

Rf (Et₂O) = 0,56

Metil (2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)metansulfonat		Mr = 316,33 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	oranžna amorfna snov	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 300 MHz)	δ [ppm] = 1,42 (s, 3H, 2-CH ₃), 1,47 (s, 3H, SO ₃ -CH ₃), 3,02 (s, 3H, N-CH ₃), 3,15 (d, 1H, J = 12,3 Hz, 3-H), 3,29 (d, 1H, J = 10,4 Hz, 2-CH ₂), 3,37 (d, 1H, J = 10,4 Hz, 2-CH ₂), 3,46 (d, 1H, J = 12,3 Hz, 3-H), 6,56 (d, 1H, J = 9,0 Hz, Ar-H ⁵), 7,62 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Ar-H ⁸), 7,76 (dd, 1H, J = 9,0, 2,6 Hz, Ar-H ⁶)	
MS (ESI)	m/z (%) = 317,1 (MH ⁺ , 100), 239,1 (65)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3435, 3083, 2739, 2365, 1604, 1529, 1596, 1314, 1222	
T _{tal}	74-77 °C	
Elementna analiza (CHN)	Izmerjeno	Izračunano
	C 47,89 %	C 45,56 %
	H 5,39 %	H 5,10 %
	N 9,29 %	N 8,86 %

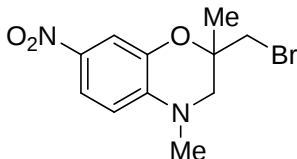
4.1.6 Sinteza 2-(bromometil)-2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazina

**Postopek:**

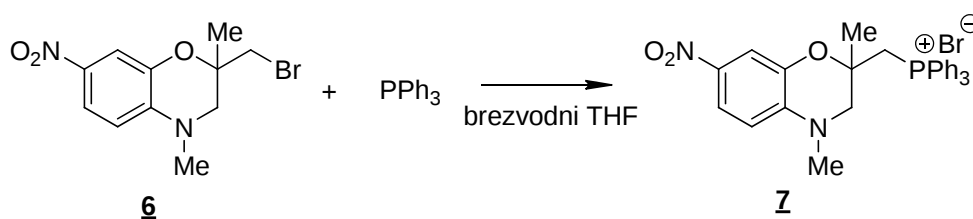
0,478 g (1,51 mmol) spojine **5** smo raztopili v 100 mL DMF. Dodali smo 0,657 g (5 eq, 7,57 mmol) litijevega bromida in 3 dni refluktirali pri 120 °C. Konec reakcije smo določili s tankoplastno kromatografijo. Po ohladitvi smo vsebino bučke koncentrirali z odparevanjem topila pri znižanem tlaku do približno 50 mL. Dodali smo 150 mL vode in izpadla je rumeno-oranžna oborina, ki smo jo odfiltrirali in preko noči posušili v sušilniku pri 60 °C. Dobili smo rumene kristale.

Izkoristek reakcije: 0,365 g (80,3 %)

R_f (Et₂O) = 0,19

2-(bromometil)-2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin		Mr = 301,14 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	rumeni kristali	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 300 MHz)	δ [ppm] = 1,39 (s, 3H, 2-CH ₃), 3,01 (s, 3H, N-CH ₃), 3,11 (d, 1H, J = 12,3 Hz, 3-H), 3,40-3,55 (m, 3H, 2-CH ₂ , 3-H), 6,55 (d, 1H, J = 9,0 Hz, Ar-H ⁵), 7,61 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Ar-H ⁸), 7,75 (dd, 1H, J = 9,0, 2,6 Hz, Ar-H ⁶)	
MS (ESI)	m/z (%) = 301,0 (MH ⁺ , 100), 303,0 (MH ⁺ , 90)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3772, 3399, 2871, 2461, 1603, 1526, 1492, 1304, 1274, 1222	
T _{tal}	124-126 °C	
Elementna analiza (CHN)	Izmerjeno	Izračunano
	C 46,32 %	C 43,87 %
	H 4,65 %	H 4,35 %
	N 9,34 %	N 9,30 %

4.1.7 Poskus sinteze ((2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)metil)trifenilfosfonijevega bromida

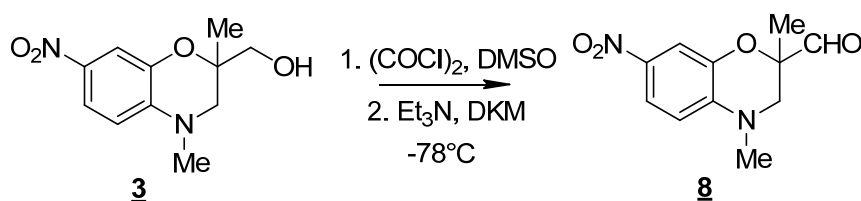


Postopek:

0,100 g (0,33 mmol) spojine **6** smo raztopili v 40 mL brezvodnega THF in ohladili na 0 °C. Počasi smo dodali 0,088 g (1 eq, 0,33 mmol) trifenilfosfina, ki smo ga predhodno raztopili v 15 mL brezvodnega THF in ohladili na 0 °C. Reakcijsko zmes smo 10 minut prepihovali z argonom in segrevali ob refluxu 3 dni pri 80 °C. S tankoplastno kromatografijo smo preverili potek reakcije. Prisotni sta bili le lisi izhodnih spojin, zato smo reakcijo pustili pri

enakih pogojih še naslednjih 7 dni. Ponovno smo izvedli tankoplastno kromatografijo, ki ni pokazala prisotnosti produkta. V reakcijski mešanici sta bili tudi po 10 dneh prisotni le izhodni spojini. Kljub večkratnim poskusom, z optimizacijo topila in temperature segrevanja reakcija ni potekla.

4.1.8 Sinteza 2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-karbaldehida

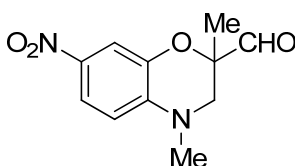


Postopek:

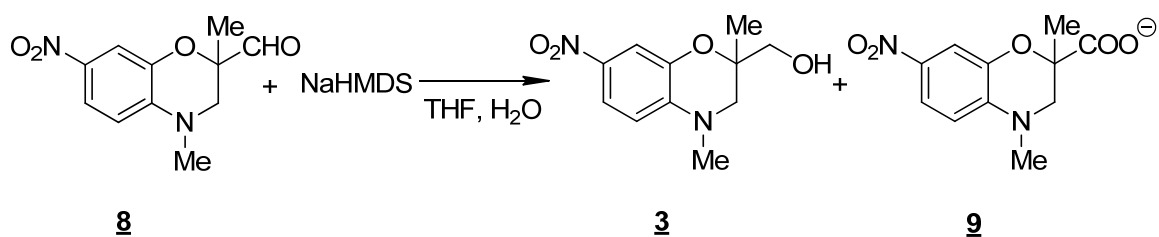
V 500 mL trogrlno bučko smo odpipetirali 3,944 mL (45,0 mmol) oksalil klorida in ga raztopili v 15 mL DKM. V kopeli acetona smo bučko ohladili na -78°C , jo 10 minut prepihovali z argonom in nato dodali 6,390 mL (90,0 mmol) DMSO, raztopljenega v 40 mL DKM. Vsebinsko bučke smo 5 minut mešali pri -78°C in nato dodali 5,00 g (21,0 mmol) spojine **3**, raztopljene v 100 mL DKM. Vsebinsko bučke smo mešali 90 minut pri -78°C in nato dodali 21,090 mL (150 mmol) Et_3N . Ugasnili smo hlajenje in mešali še 15 minut, nato pa odstranili kopel acetona in počakali, da se je bučka segrela na sobno temperaturo. Topilo smo odparili pri znižanem tlaku in spojino čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc:heksan = 1:1). Dobili smo rumeno amorfno snov, ki smo jo posušili z vakuumsko črpalko in prekristalizirali iz etanola. Dobili smo oranžne kristale.

Izkoristek reakcije: 4,516 g (91,1 %)

Rf (EtOAc:heksan = 1:1) = 0,36

2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-karbaldehid		Mr = 236,22 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	oranžni kristali	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm] = 1,38 (s, 3H, 2-CH ₃), 2,95 (s, 3H, N-CH ₃), 3,19 (d, 1H, J = 12,2 Hz, 3-H), 3,55 (d, 1H, J = 12,2 Hz, 3-H), 6,55-6,50 (m, 2H, Ar-H ⁵ , Ar-H ⁸), 7,76 (dd, 1H, J = 7,8, 2,2 Hz, Ar-H ⁶), , 9,50 (d, 1H, J* = 1,2 Hz, C-CHO)	
MS (ESI)	m/z (%) = 237,1 (MH ⁺ , 100), 255,1 ((M + H ₂ O) ⁺ , 90)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3772, 3390, 2835, 2464, 1739, 1600, 1528, 1499, 1294, 1223	
T _{tal}	76-78 °C	
Elementna analiza (CHN)	Izmerjeno	Izračunano
	C 55,68 %	C 55,93 %
	H 5,14 %	H 5,12 %
	N 11,56 %	N 11,86 %

4.1.9 Sinteza 2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-karbaldehida



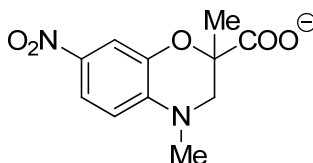
Postopek:

V 250 mL bučko smo natehtali 4,198 g (17,77 mmol) spojine **8** in jo suspendirali v 30 mL THF, v katerem so bili prisotni sledovi vode. Med mešanjem smo pri sobni temperaturi dodali 20 mL (40,00 mmol) NaHMDS in bučko za 15 minut vpeli v ultrazvočno kopel, da smo suspenzijo homogenizirali. Preko noči smo mešali pri sobni temperaturi in naslednji

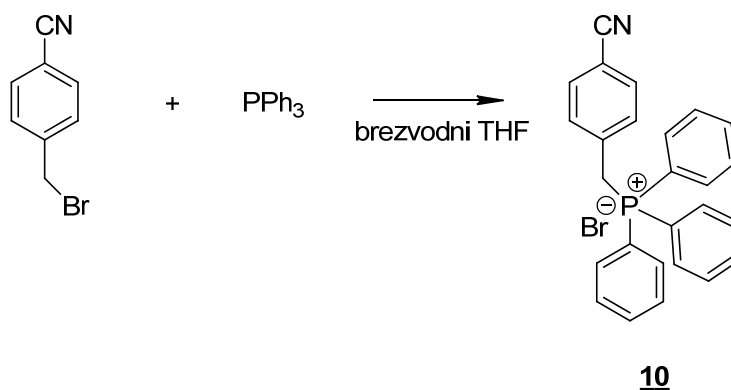
dan s tankoplastno kromatografijo določili končno točko reakcije. Dodali smo 150 g zmesi led/voda in počakali, da se je led stalil. Izpadli produkt smo odfiltrirali in sprali z ledeno hladnim THF. Po sušenju v sušilniku pri 50 °C preko noči smo dobili 2,018 g rumeno rjave amorfne snovi.

Izkoristek reakcije: 2,019 g (45,2 %)

Rf (EtOAc:heksan = 3:1) = 0 (sol)

2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilat		Mr = 251,22 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	rumeno rjava amorfna snov	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ [ppm] = 1,35 (s, 3H, 2-CH ₃), 2,98 (s, 3H, N-CH ₃), 3,16 (d, 1H, J = 11,7 Hz, 3-H), 3,69 (d, 1H, J = 11,7 Hz, 3-H), 6,63 (d, 1H, J = 9,1 Hz, Ar-H ⁵), 7,45 (d, 1H, J = 2,7 Hz, Ar-H ⁸), 7,67 (dd, 1H, J = 9,1, 2,7 Hz, Ar-H ⁶)	
MS (ESI)	m/z (%) = 251,2 (M ⁻ , 100) 275,1 (MNa ⁺ , 100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3408, 2487, 2080, 1625, 1604, 1534, 1492, 1286, 1218	
T _{tal}	nad 350 °C	

4.1.10 Sinteza (4-cianobenzil)trifenilfosfonijevega bromida

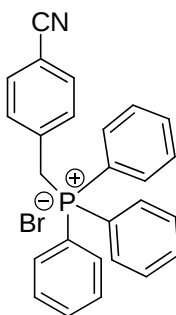


Postopek:

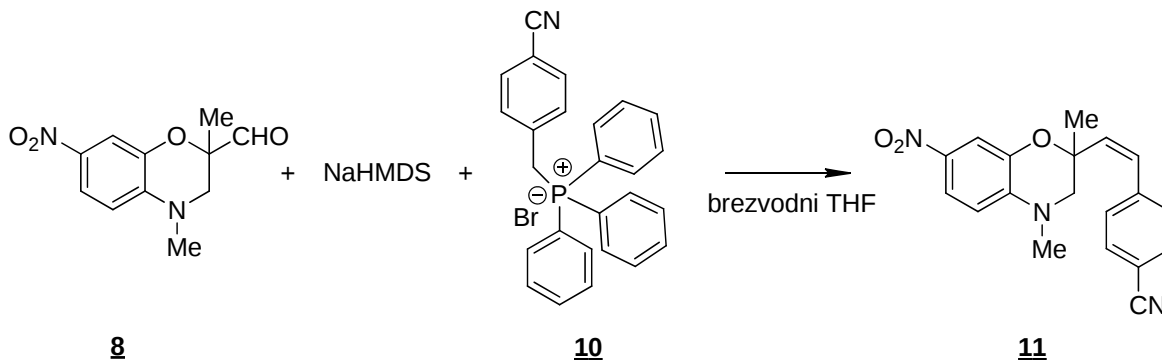
Natehtali smo 0,980 g (5,00 mmol) 4-(bromometil)benzonitrila, ga raztopili v 80 mL brezvodnega THF in ohladili na 0 °C. Počasi smo dodali 1,324 g (1,0 eq, 5,00 mmol) trifenilfosfina, ki smo ga raztopili v 20 mL brezvodnega THF in ohladili na 0 °C. Reakcijsko zmes smo 15 minut prepihovali z argonom in 24 ur segrevali ob refluksu pri 80 °C. Naslednji dan smo izvedli tankoplastno kromatografijo, ki je pokazala prisotnost izhodne spojine, zato smo dodali 0,132 g (0,1 eq, 0,50 mmol) trifenilfosfina. Reakcijsko zmes smo pustili pri enakih pogojih še nadaljnjih 24 ur in ponovno izvedli tankoplastno kromatografijo, ki je pokazala odsotnost izhodne spojine. Nastala je bela oborina, ki smo jo odfiltrirali in preko noči posušili v sušilniku pri 50 °C. Dobili smo drobne bele kristale.

Izkoristek reakcije: 2,185 g (95,3 %)

R_f (Et₂O) = 0 (sol)

(4-cianobenzil)trifenilfosfonijev bromid		Mr = 458,33 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	drobni beli kristali	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ [ppm] = 5,33 (d, 2H, <i>J</i> = 16,4 Hz, Ar-CH ₂), 7,13 (dd, 2H, <i>J</i> = 8,5, 2,4 Hz, Ph), 7,76-7,62 (m, 14H, Ph), 7,91-7,96 (m, 3H, Ar-H ^{4'} , Ar-H ^{4''} , Ar-H ^{4'''})	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3853, 3694, 3005, 2847, 2769, 2229, 1600, 1500, 1437	
T _{tal}	nad 350 °C	

4.1.11 Sinteza (Z)-4-(2-(2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin)-2-il)vinil)benzonitrila

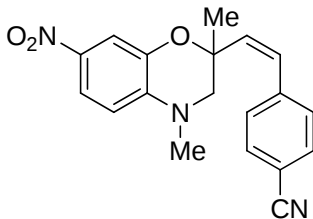


Postopek:

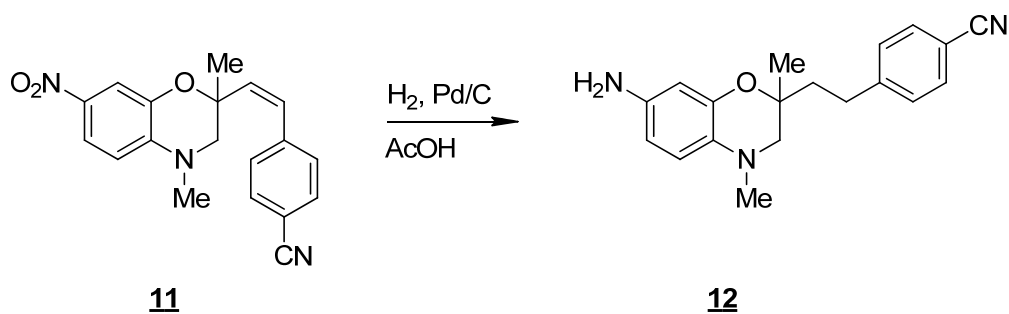
V bučko smo natehtali 2,000 g (4,36 mmol) spojine **10** in jo suspendirali v 15 ml brezvodnega THF. Bučko smo 15 minut prepihovali z argonom in suspenziji med mešanjem pri sobni temperaturi dodali 5 mL (10,00 mmol) NaHMDS. Nastal je oranžno obarvan ilid. Suspenzijo z ilidom smo mešali 15 minut (za 10 minut smo bučko vpeli v ultrazvočno kopel), da smo suspenzijo homogenizirali. Ilidu smo pri sobni temperaturi po kapljicah dodali 1,031 g (1 eq, 4,36 mmol) spojine **8**, raztopljene v 30 mL brezvodnega THF. Vsebino bučke smo 15 minut prepihovali z argonom in preko noči mešali pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo s tankoplastno kromatografijo določili končno točko reakcije. V bučko smo med mešanjem dodali 120 g zmesi led/voda in počakali, da se je led stalil. Ugasnili smo magnetno mešalo in na dno bučke so sedimentirali drobni kristali, ki smo jih odfiltrirali in sprali s hladno prečiščeno vodo. Po sušenju v sušilniku pri 50 °C preko noči smo dobili drobne rumene kristale. Tankoplastna kromatografija je pokazala prisotnost produkta tudi v vodnem preostanku, zato smo topilo odstranili pri znižanem tlaku in produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc:heksan = 3:1). Mobilno fazo združenih izbranih frakcij produkta smo odstranili pri znižanem tlaku in po sušenju v sušilniku preko noči pri 50 °C dobili drobne rumene kristale.

Izkoristek reakcije: 745 mg (50,9 %)

Rf (EtOAc:heksan = 3:1) = 0,53

(Z)-4-(2-(2,4-dimetil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin)-2-il)vinil)benzonitril		Mr = 335,36 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	drobni rumeni kristali	
Rezultati analize		
¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ [ppm] = 1,61 (s, 3H, 2- <u>CH</u> ₃), 3,02 (s, 3H, N- <u>CH</u> ₃), 3,22 (d, 1H, <i>J</i> = 12,2 Hz, 3-H), 3,55 (d, 1H, <i>J</i> = 12,2 Hz, 3-H), 5,78 (d, 1H, <i>J</i> = 12,7 Hz, 2- <u>CH</u>), 6,31 (d, 1H, <i>J</i> = 2,6 Hz, Ar-H ⁸), 6,50 (d, 1H, <i>J</i> = 12,7 Hz, 2-CH= <u>CH</u>), 6,69 (d, 1H, <i>J</i> = 9,1 Hz, Ar-H ⁵), 7,35 (d, 2H, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar-H ^{2'} , Ar-H ^{6'}), 7,64 (dd, 1H, <i>J</i> = 9,1, 2,6 Hz, Ar-H ⁶), 7,71 (d, 2H, <i>J</i> = 8,3 Hz, Ar-H ^{3'} , Ar-H ^{5'})	
¹³C-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)	δ [ppm] = 24,56 (2-CH ₃), 38,01 (N-CH ₃), 57,29 (C-3), 75,34 (C-2), 109,47 (C-5), 109,58 (C-4'), 110,23 (C-8), 118,56 (C-6), 118,88 (CN), 129,80 (2-CH= <u>CH</u>), 129,91 (C-3', C-5'), 130,98 (C-2', C-6'), 134,54 (2-CH), 136,07 (C-8a), 139,72 (C-7), 141,50 (C-4a, C-1')	
MS (ESI)	<i>m/z</i> (%) = 336,1 (MH ⁺ , 100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3772, 3404, 2865, 2460, 2227, 1593, 1525, 1502, 1287, 1229	
T_{tal}	189-191 °C	
Elementna analiza (CHN)	Izmerjeno	Izračunano
	C 66,97 %	C 68,05 %
	H 4,94 %	H 5,11 %
	N 12,19 %	N 12,53 %

4.1.12 Sinteza 4-(2-(7-amino-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)etil)benzonitrila

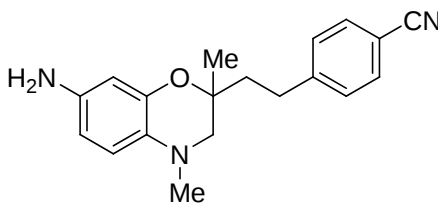


Postopek:

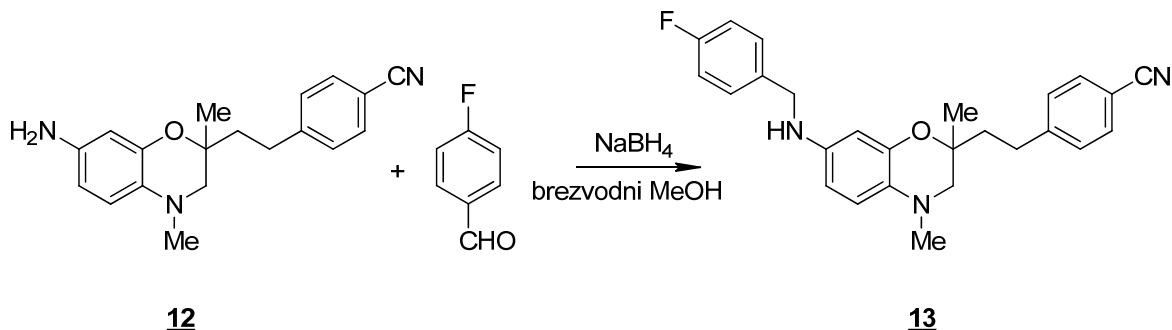
V 50 mL trogrlno bučko smo natehtali 629 mg (1,88 mmol) spojine **11** in jo suspendirali v 25 ml 100 % očetne kisline. Suspenzijo smo prepihali z argonom in dodali 63 mg paladija na ogljiku. Na bučko smo priključili balon z vodikom in v vodikovi atmosferi 24 ur intenzivno mešali pri sobni temperaturi. Po 24 urah se je suspenzija zbistrila in produkt smo filtrirali skozi celit. Očetno kislino smo odstranili pri znižanem tlaku in preostanek raztopili v 50 mL EtOAc. Organsko fazo smo zaporedoma spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 50 mL) ter posušili z dodatkom Na₂SO₄. EtOAc fazo smo filtrirali in topilo odstranili pri znižanem tlaku. Dobili smo 561 mg temno rjavega olja. Zaradi oksidativne nestabilnosti smo produkt opredelili le z metodo NMR in ga takoj, brez čiščenja, uporabili v naslednji stopnji sinteze.

Izkoristek reakcije: 561 mg (97,3 %)

Rf (EtOAc:heksan = 1:1) = 0,55

4-(2-(7-amino-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)etil)benzonitril		Mr = 307,39 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	temno rjavo olje	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ [ppm] = 1,28 (s, 3H, 2-CH ₃), 2,64-2,72 (m, 5H, N-CH ₃ , 2-CH ₂), 2,79 (d, 1H, J = 11,4 Hz, 3-H), 2,89 (d, 1H, J = 11,4 Hz, 3-H), 3,37 (t, 4H, J = 6,5, 6,5 Hz, -NH ₂ , 2-CH ₂ -CH ₂), 6,02 (d, 1H, J = 2,5 Hz, Ar-H ⁸), 6,07 (dd, 1H, J = 8,4, 2,5 Hz, Ar-H ⁶), 6,46 (d, 1H, J = 8,4 Hz, Ar-H ⁵), 7,41 (dd, 2H, J = 8,4, 4,7 Hz, Ar-H ^{2'} , Ar-H ^{6'}), 7,73 (dd, 2H, J = 8,4, 4,7 Hz, Ar-H ^{3'} , Ar-H ^{5'})	

4.1.13 Sinteza 4-(2-(7-((4-fluorobenzil)amino)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazin-2-il)etil)benzonitrila

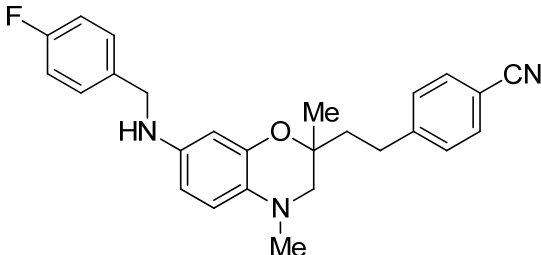


Postopek:

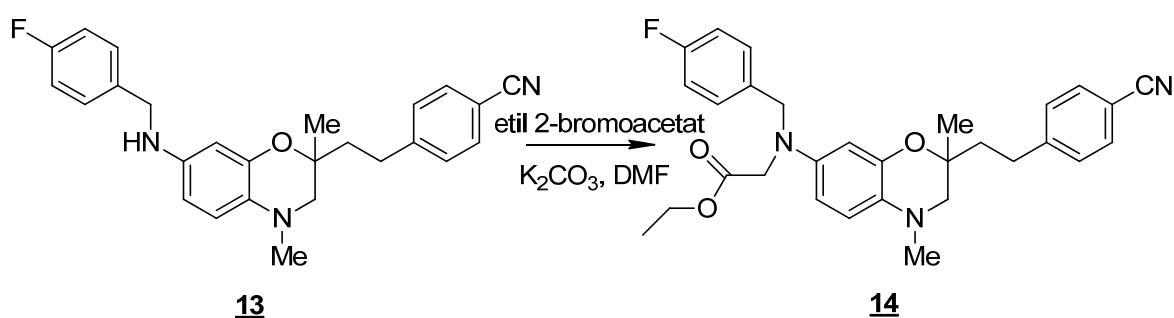
Natehtali smo 561 mg (1,82 mmol) spojine **12** in jo raztopili v 20 mL brezvodnega MeOH. Raztopino smo 10 minut prepihovali z argonom in dodali 0,230 mL (1,1 eq, 2,01 mmol) 4-fluorobenzaldehida. Po 5 urah intenzivnega mešanja pri sobni temperaturi smo počasi dodali 104 mg (1,5 eq, 2,74 mmol) NaBH₄ in mešali preko noči pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo s pomočjo tankoplastne kromatografije določili končno točko reakcije. Topilo smo odstranili pri znižanem tlaku in preostanek raztopili v 50 ml EtOAc. Organsko fazo smo zaporedoma spirali s 5 % raztopino citronske kisline (1 x 50 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 50 mL). EtOAc smo odstranili pri znižanem tlaku in dobili črno-rjavo olje, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM). Ustrezne frakcije smo združili in topilo odstranili pri znižanem tlaku. Dobili smo 574 mg blede rumenega olja.

Izkoristek reakcije: 574 mg (75,7 %)

$$\mathbf{Rf} \text{ (DKM)} = 0,44$$

4-(2-(7-amino-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-2-il)etil)benzonitril		Mr = 415,50 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	bledo rumeno olje	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ [ppm] = 1,37 (s, 3H, 2-CH ₃), 1,85 (ddd, 1H, J = 13,7, 10,4, 7,0 Hz, 2-CH ₂), 2,03 (ddd, 1H, J = 13,7, 10,4, 7,0 Hz, 2-CH ₂), 2,80-2,96 (m, 7H, CH ₂ -CH ₂ -Ar, N-CH ₃ , 3-H), 3,64 (s, 1H, NH), 4,22 (s, 2H, N-CH ₂ -Ar), 6,07 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Ar-H ⁸), 6,17 (dd, 1H, J = 8,6, 2,6 Hz, Ar-H ⁶), 6,58 (d, 1H, J = 8,6 Hz, Ar-H ⁵), 7,19-7,26 (m, 2H, Ar-H ^{3''} , Ar-H ^{5''}), 7,41-7,51 (m, 4H, Ar-H ^{2'} , Ar-H ^{6'} , Ar-H ^{2''} , Ar-H ^{6''}), 7,78-7,84 (m, 2H, Ar-H ^{3'} , Ar-H ^{5'})	
MS (ESI, HR-MS)	m/z (%) = 415,2 (M ⁺ , 100), 307,2 (90)	
IR (KB)	ν [cm ⁻¹] = 3716, 3370, 2962, 2853, 2447, 1957, 1511, 1261, 1221	

4.1.14 Sinteza etil 2-((2-(4-cianofenetil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)acetata



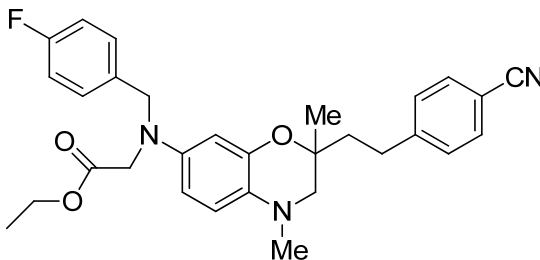
Postopek:

V 100 mL bučko smo natehtali 526 mg (1,27 mmol) spojine **13** in 525 mg (3 eq, 3,81 mmol) kalijevega karbonata ter ju raztopili v 50 mL DMF. Vsebino bučke smo 15 minut prepihovali z argonom in med mešanjem dodali 0,245 mL (1,7 eq, 2,16 mmol) etil 2-

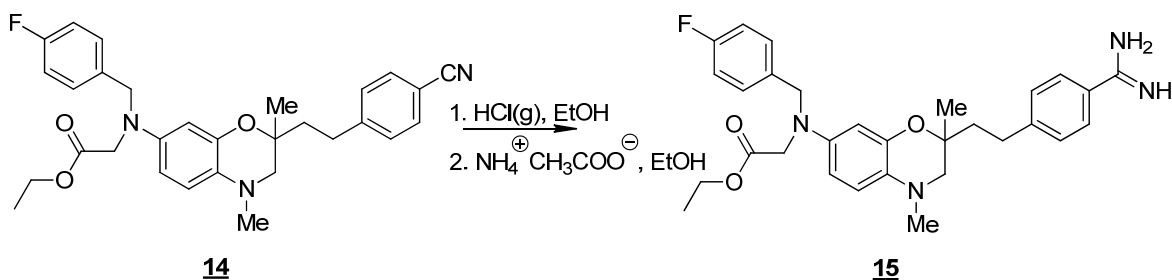
bromoacetata. Bučko smo med intenzivnim mešanjem refluktirali preko noči na oljni kopeli pri 100 °C. Naslednji dan smo s tankoplastno kromatografijo določili končno točko reakcije. Topilo smo odparili pri znižanem tlaku in preostanek raztopili v 50 mL EtOAc. Organsko fazo smo zaporedoma spirali s prečiščeno vodo (2 x 50 mL), 10 % citronska kislina (2 x 50 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 x 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 50 mL). EtOAc smo posušili z Na₂SO₄ in sušilno sredstvo odfiltrirali. Topilo smo odstranili pri znižanem tlaku in produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM). Dobili smo 397 mg blede rumenega olja.

Izkoristek reakcije: 397 mg (62,5 %)

R_f (DKM) = 0,59

Etil 2-((2-(4-cianofenetil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)acetat		Mr = 501,59 g/mol
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	bledo rumeno olje	
Rezultati analize		
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm] = 1,25 (t, 3H, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 1,36 (s, 3H, 2-CH ₃), 1,84 (ddd, 1H, <i>J</i> = 13,8, 10,3, 7,0 Hz, 2-CH ₂), 2,00 (ddd, 1H, <i>J</i> = 13,8, 10,3, 7,0 Hz, 2-CH ₂), 2,74-2,82 (m, 5H, N-CH ₃ , 2-CH ₂ -CH ₂), 2,86 (d, 1H, <i>J</i> = 11,2 Hz, 3-H), 2,91 (d, 1H, <i>J</i> = 11,2 Hz, 3-H), 3,95 (s, 2H, N-CH ₂ -CO), 4,18 (q, 2H, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,51 (s, 2H, N-CH ₂ -Ar ^{''}), 6,22-6,27 (m, 2H, Ar-H ⁶ , Ar-H ⁸), 6,57-6,60 (m, 1H, Ar-H ⁵), 6,96-7,03 (m, 2H, Ar-H ^{3''} , Ar-H ^{5''}), 7,23-7,30 (m, 4H, Ar-H ^{2'} , Ar-H ^{6'} , Ar-H ^{2''} , Ar-H ^{6''}), 7,52-7,56 (m, 2H, Ar-H ^{3'} , Ar-H ^{5'})	
MS (ESI, HR-MS)	m/z (%) = 502,2 (MH ⁺ , 100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3772, 3400, 2856, 2563, 2093, 1740, 1605, 1518, 1187	
Elementna analiza (CHN)	Izmerjeno	
	C	71,82 %
	H	6,26 %
	N	8,16 %
	Izračunano	
	C	71,84 %
	H	6,43 %
	N	8,38 %

4.1.15 Sinteza etil 2-((2-(4-cianofenil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)acetata

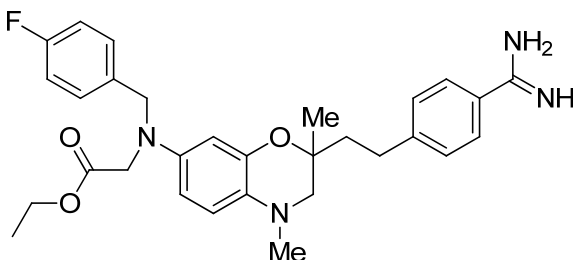


Postopek:

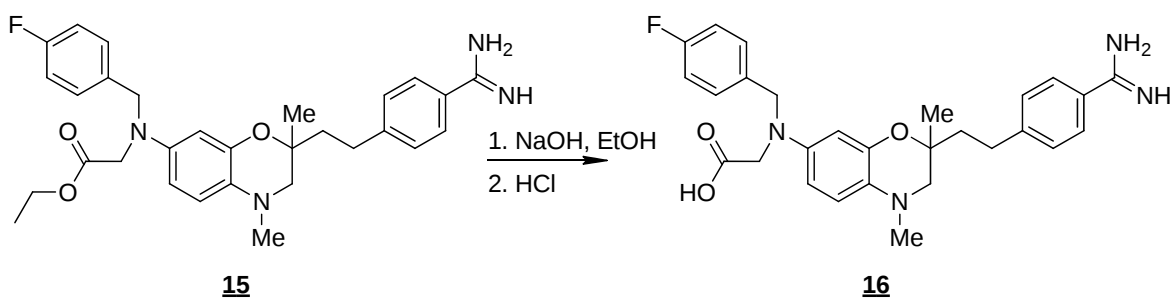
V dvogrlo bučko smo natehtali 139 mg (0,277 mmol) spojine **14** in jo raztopili v 25 mL brezvodnega EtOH. Vsebino bučke smo ob mešanju 15 minut prepihovali z argonom in nato v ledeni kopeli ohladili do 0 °C. Pri 0 °C smo bučko 15 minut prepihovali s plinastim HCl, zatesnili s parafilmom in pustili mešati 48 ur pri sobni temperaturi. Topilo smo odstranili pri znižanem tlaku in produkt sprali z brezvodnim etrom. Eter smo odstranili pri znižanem tlaku in preostanek raztopili v 25 ml brezvodnega etanola. Dodali smo 76 mg (3,56 eq, 0,99 mmol) amonijevega acetata, ki smo ga predhodno čistili s spiranjem z brezvodnim etrom. Bučko smo zatesnili s parafilmom in 48 ur mešali pri 40 °C. Topilo smo odstranili pri znižanem tlaku in produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM:MeOH:NH₃ = 4:1; nasičena z amoniakom). Ustrezne frakcije smo združili, topilo odstranili pri znižanem tlaku in posušili z vakuumsko črpalko. Dobili smo 43 mg blede rumenega olja in posneli HPLC kromatogram. Izolirano spojino **15** smo zaradi nizke mase v celoti, brez opravljenih dodatnih analiz, uporabili v zadnji stopnji sinteze.

Izkoristek reakcije: 43 mg (29,9 %)

R_f (DKM:MeOH:NH₃ = 4:1; nasičena z amoniakom) = 0,20

Etil 2-((2-(4-amidinofenetil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)acetat		Mr = 518,62 g/mol
Struktura spojine: 		
Izgled spojine	bledo rumeno olje	

4.1.16 Sinteza 2-((2-(4-(amidinofenetil)-2,4-dimetil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin-7-il)(4-fluorobenzil)amino)ocetne kisline



Postopek:

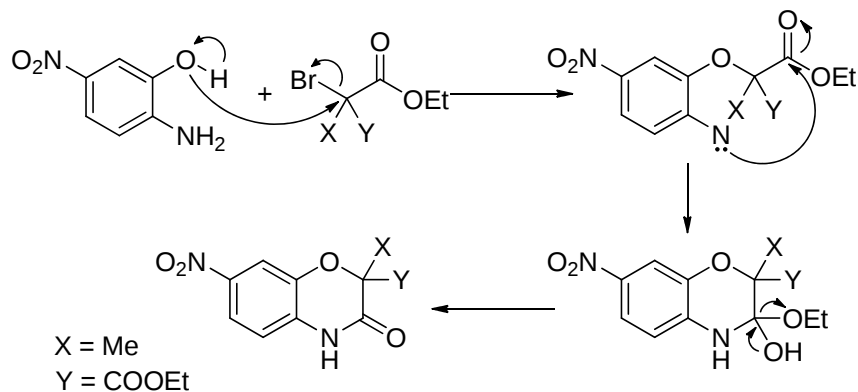
V 50 mL bučko smo natehtali 43 mg (0,083 mmol) spojine **15** in jo raztopili v 20 mL brezvodnega etanola. Po 10 minutah mešanja smo dodali 0,180 mL (2,2 eq, 0,180 mmol) sveže pripravljene raztopine 1 M NaOH in vsebino bučke mešali preko noči pri sobni temperaturi. Topilo smo odstranili pri znižanem tlaku in produkt čistili z reverznofazno kolonsko kromatografijo. Ustrezne frakcije smo združili, posneli HPLC spekter in topilo ponovno odparili pri znižanem tlaku. Spojine **16** nismo uspeli izolirati v ustrezni količini in čistoči, ki je potrebna za analize in biološko testiranje.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Sinteza dualne antitrombotične učinkovine

5.1.1 Sinteza 1,4-benzoksazinonskega obroča (spojina **1**)

V prvi stopnji sinteze smo pripravili 2-metil-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazinonski skelet, ki je osrednji gradnik končne spojine. Spojino smo pripravili iz 2-amino-5-nitrofenola in dietil 2-bromo-2-metilmalonata v prisotnosti kalijevega fluorida kot katalizatorja (36). Potekla je dvojna nukleofilna substitucija. Kalijev fluorid je povečal nukleofilnost fenolne skupine 2-amino-5-nitrofenola in prišlo je do nukleofilne substitucije na osrednjem ogljikovem atomu dietil 2-bromo-2-metilmalonata. Nato je amino skupina nukleofilno napadla karbonilni ogljikov atom ene izmed estrskih skupin malonata. Po odcepitvi EtOH se je tvoril laktam in nastal je osnovni 1,4-benzoksazinonski skelet. Izkoristek reakcije je bil visok, produkt pa smo izolirali z dodatkom vode, saj je v njej netopen. Izpadle kristale smo sprali z ledeno hladno vodo – s tem smo odstranili ostanke izhodnih spojin in katalizatorja (34).



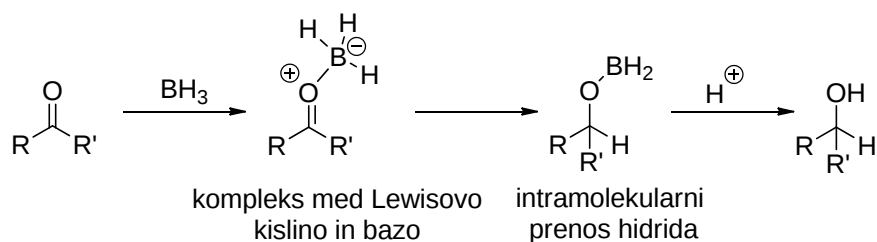
Slika 9: Mehanizem nastanka benzoksazinonskega skeleta.

5.1.2 N-alkiliranje 1,4-benzoksazinonskega dušikovega atoma (spojina **2**)

Na dušik na mestu 4 benzoksazinonskega skeleta spojine **1** smo uvedli metilno skupino. Z dodatkom kalijevega fluorida smo povečali nukleofilnost amidnega dušikovega atoma in po dodatku metiljodida je potekla nukleofilna substitucija na obročnem dušikovem atomu. Produkt smo izolirali in sprali z vodo, saj je v vodi netopen in se obori. Reakcija je potekla z visokim izkoristkom (34).

5.1.3 Redukcija laktama in estra (spojina **3**)

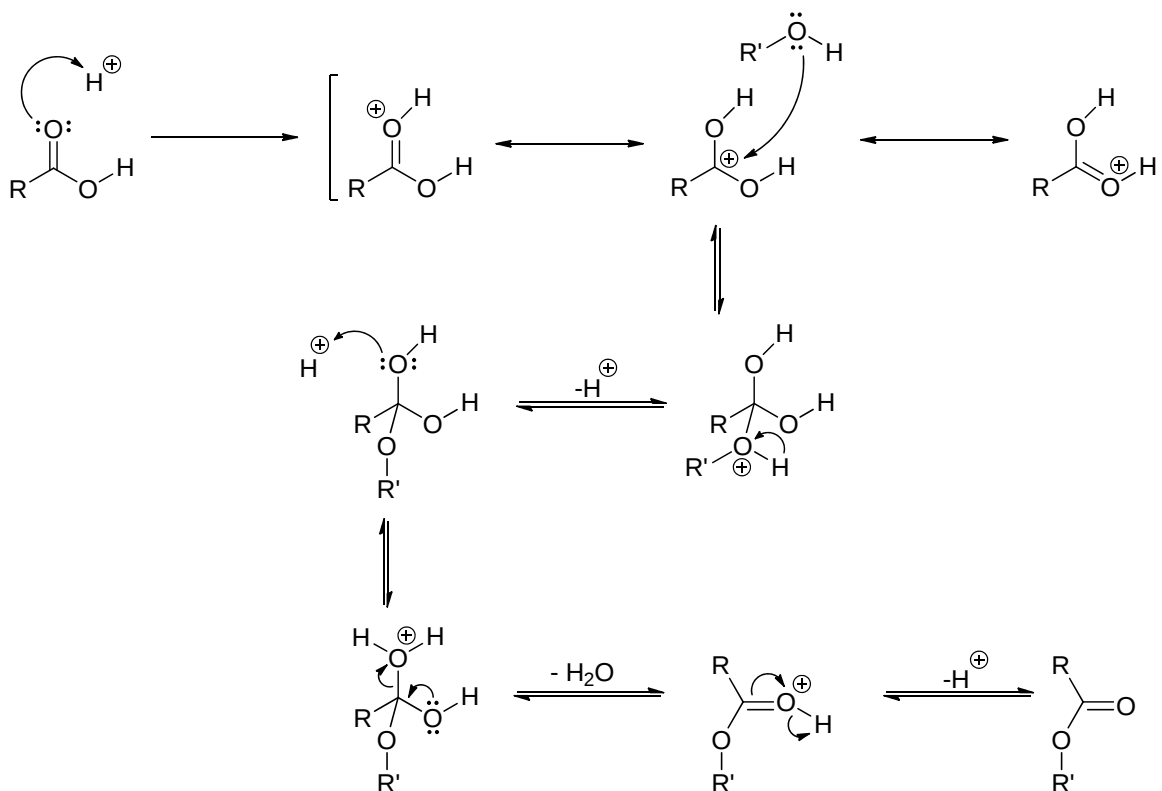
Z boran-dimetilsulfidnim kompleksom smo reducirali laktamsko in estersko skupino spojine **2** do alkohola in amina. Pri reakciji je boran predstavljal Lewisovo kislino, karbonylna kisika laktama in estra pa zaradi prostih elektronskih parov Lewisovo bazo. Boran se je adiral na karbonylni kisik in intramolekularno doniral hidridne ione v nastali kompleks, ki je bil precej stabilen, zato smo ga razbili z refluktiranjem po dodatku 1 M HCl (37). Izkoristek reakcije je bil visok.



Slika 10: Mehanizem redukcije z boranom (37).

5.1.4 Tvorba estra na hidroksi skupini (spojina **4**)

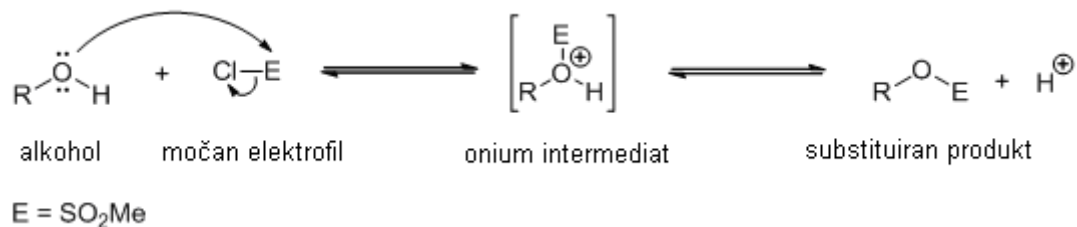
Z nukleofilno substitucijo smo poskusili zamenjati hidroksi skupino spojine **3** z bromidom. Medij za reakcijo je bila očetna kislina, ki smo ji dodali HBr. Reakcija med izhodnim alkoholom in HBr ni potekla, je pa prišlo do Fischerjeve esterifikacije med alkoholom in očetno kislino, ki jo katalizira kislina (38). Reakcija je imela visok izkoristek.



Slika 11: Mehanizem Fischerjeve esterifikacije (38).

5.1.5 Sinteza metilsulfonatnega estra (spojina 5)

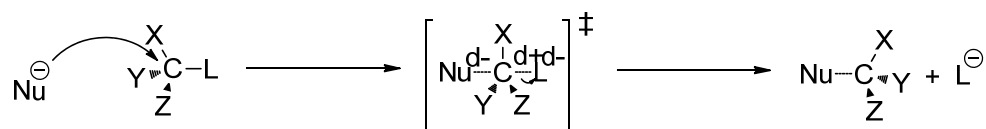
Slabo izstopajočo hidroksi skupino spojine 3 smo pretvorili v metilsulfonatni ester, ki je dobro izstopajoča skupina. Prišlo je do nukleofilne substitucije na žveplovem atomu sulfonil halida, pri kateri sta nastala metilsulfonatni ester in HCl. Nastalo kislino je nevtraliziral Et₃N, ki je baza brez nukleofilnih lastnosti. Odsotnost nukleofilnih lastnosti namreč preprečuje možnost kompetitivne reakcije med bazo in elektrofilom (39). Reakcija je potekla skoraj kvantitativno.



Slika 12: Mehanizem nastanka metilsulfonatnega estra.

5.1.6 Sinteza bromida (spojina 6)

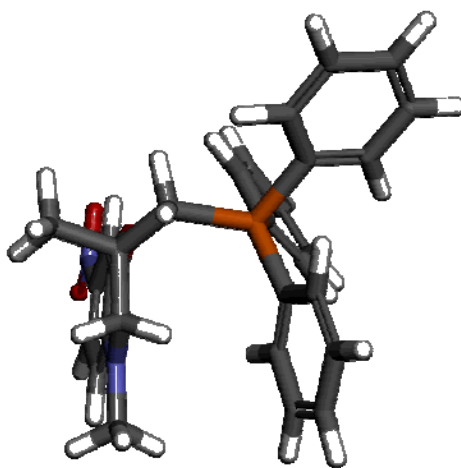
Dobro izstopajočo metilsulfonatno skupino smo zamenjali z atomom broma in tvorili alkilbromid. Potekla je reakcija nukleofilne substitucije po S_N2 mehanizmu.



Slika 13: Potek nukleofilne substitucije po S_N2 mehanizmu (40).

5.1.7 Poskus sinteze alkil trifenilfosfonijevega bromida (spojina 7)

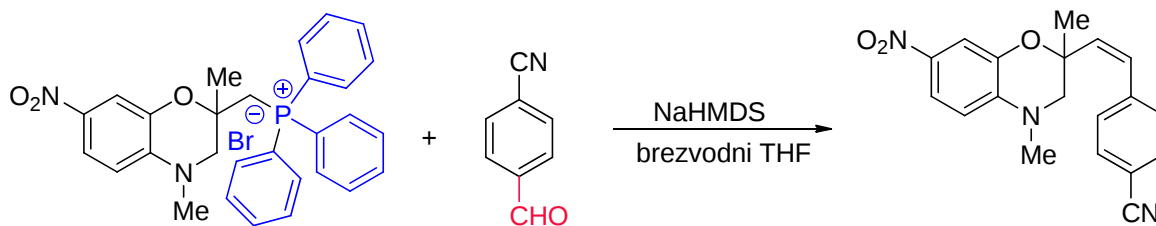
Spojino 6 smo poskusili pretvoriti v ustrezen alkil trifenilfosfonijev bromid. Gre za reakcijo nukleofilne substitucije po S_N2 mehanizmu, ki poteče preko trigonalnega bipiramidalnega prehodnega stanja, v katerem je centralni ogljikov atom pentakoordiniran (40). Za nastanek pentakoordiniranega prehodnega stanja je pomembna prostorska koordinacija posameznih substituent centralnega ogljikovega atoma. V primeru sinteze ustreznega alkil trifenilfosfonijevega bromida spojine 6 do te prostorske razporeditve ni prišlo zaradi steričnih ovir, zato sinteze kljub več ponovitvam in optimizaciji pogojev nismo uspeli izvesti.



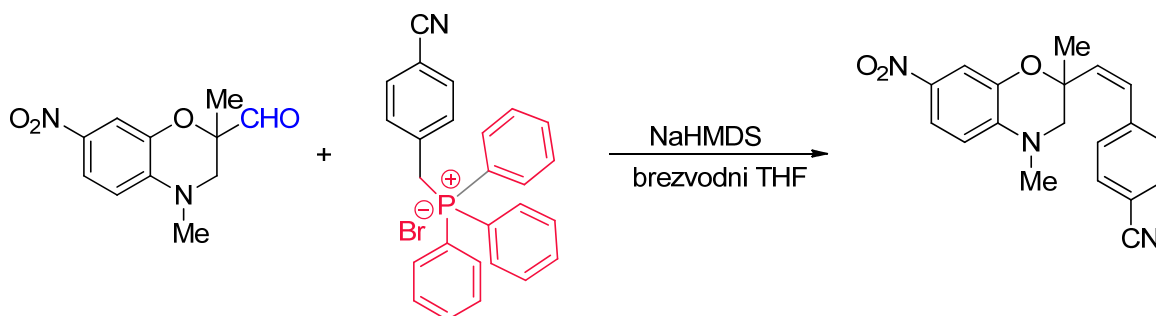
Slika 14: Tridimenzionalna prostorska razporeditve atomov spojine 6.

5.1.8 Sprememba sintezne strategije

Ker ene izmed izhodnih spojin Wittigove reakcije nismo bili zmožni sintetizirati, smo razmislili o alternativnih poteh sinteze. Ena izmed idej je bila inverzija funkcionalnih skupin fragmentov, ki smo jih imeli namen povezati v Wittigovi sintezi, saj so sterične ovire za nastanek alkil trifenilfosfonijevega bromida veliko manjše.



Slika 15: Predvidena izvedba Wittigove reakcije.



Slika 16: Spremenjena izvedba Wittigove reakcije.

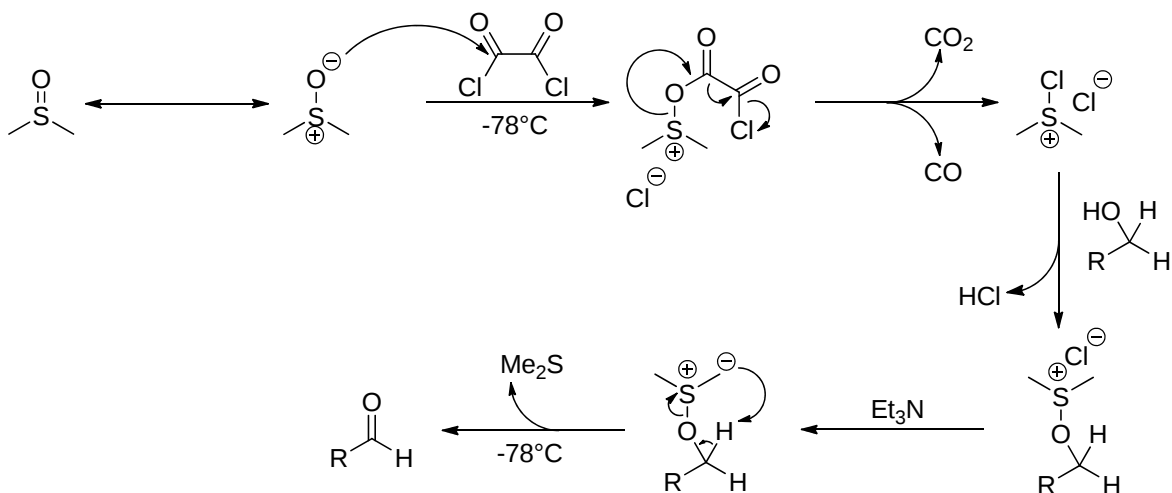
Sinteze, ki so izhajale iz spremembe sintezne strategije:

- oksidacija alkohola (spojine **3**) v aldehyd z uporabo Swernove oksidacije
- pretvorba 4-(bromometil)benzonitrila v ustrezen alkil trifenilfosfonijev bromid

5.1.9 Swernova oksidacija alkohola (spojina **8**)

V osmi stopnji sinteze smo alkoholno skupino spojine **3** oksidirali do aldehydne skupine z uporabo Swernove oksidacije. V prvi stopnji sta reagirala na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohlajena DMSO in oksalil klorid. Po odcepcitvi plinastih CO in CO_2 je nastal dimetilklorosulfonijev klorid, ki je v drugi stopnji reagiral z alkoholom in prišlo je do tvorbe alkoksisulfonijevega ionskega intermediata. Po dodatku baze se je alkoksisulfonijev ion deprotoniral in nastal je žveplov ilid, ki je v petčlenskem obročnem prehodnem stanju razpadel na dimetil sulfid in ustrezen aldehyd – spojino **8** (41). Reakcijo smo izvedli v brezvodnem acetonu (ki pri $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ne

zmrzne) in argonovi atmosferi, saj oksalil klorid ob stiku z vodo razpade, pri tem pa nastajajo toksični in vnetljivi plini (42). Reakcijo smo izvedli pri zelo nizki temperaturi, saj se pri uporabi oksalil klorida kot dehidracijskega sredstva pri temperaturah nad $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ pojavi možnost stranskih reakcij (43).

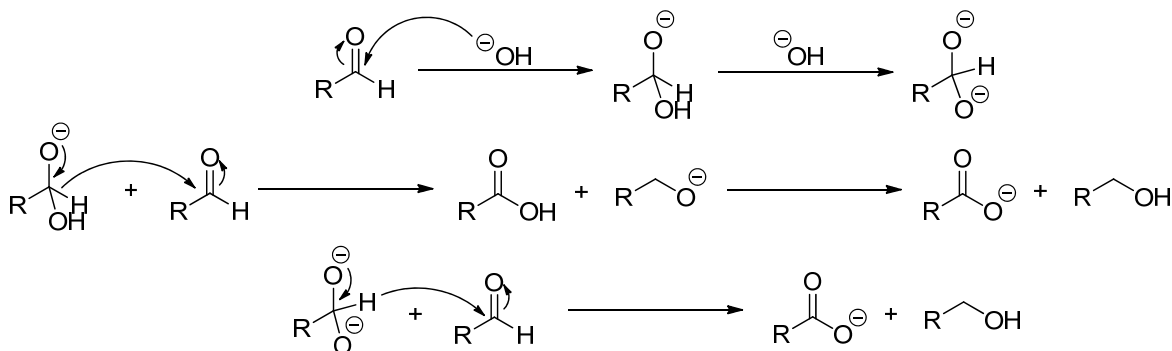


Slika 17: Mehanizem Swernove oksidacije primarnega alkohola (44).

5.1.10 Disproporcionacija aldehida – Cannizzarova reakcija (spojina 9)

V deveti stopnji sinteze je v močno alkalnih pogojih prišlo do disproporcionacije spojine 8 – Cannizzarove reakcije. Cannizzarova reakcija poteče v močno bazičnih pogojih pri spojinah, ki imajo aldehydno skupino vezano na kvarterni ogljikov atom. Pri reakciji pride do disproporcionacije – prenosa α vodikovega atoma z ene molekule aldehida na drugo, pri čemer iz aldehida nastane alkohol in karboksilna kislina (v obliki karboksilata) (45). Reakcija spada med organske redoks reakcije, pri kateri se polovica izhodne spojine oksidira (do karboksilata), polovica pa reducira (do alkohola). Pri aldehydih, ki imajo karbonilno skupino vezano na terciarni ogljikov atom ($\text{R}_1\text{R}_2\text{CH}-\text{CHO}$), prednostno poteče aldolna kondenzacija, pri kateri se vodik odcepi s terciarnega ogljikovega atoma in ne iz aldehydne skupine (46). V prvi stopnji Cannizzarove reakcije pride do nukleofilne adicije baze (npr. hidroksilnega aniona) na karbonilni ogljik aldehida. Po odcepitvi vodika iz alkoksida nastane di-anion, imenovan Cannizzarov intermediat, ki se tvori le v močno alkalnih pogojih. Pri reakciji alkoksida in Cannizzarovega intermedrata z aldehydom pride do prenosa hidridnega iona H^- na kisikov atom karbonilne skupine. Pri tem nastane alkohol in karboksilat. Izkoristek reakcije je bil visok, saj se je v alkohol in karboksilat pretvorilo več kot 90 % izhodnega aldehida. Ker do disproporcionacije pride le pri

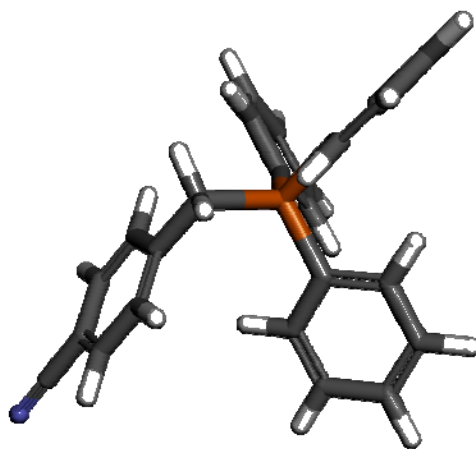
aldehidih brez terciarnega ogljikovega atoma, ki v laboratoriju niso zelo pogostosti, te reakcije nismo pričakovali. Za izvedbo Wittigove reakcije je bilo ključno, da raziščemo vzroke in potek Cannizzarove reakcije preprečimo. Po pregledu literature smo odkrili vzrok za disproporcionacijo – prisotnost vode oz. vlage v reakcijski bučki.



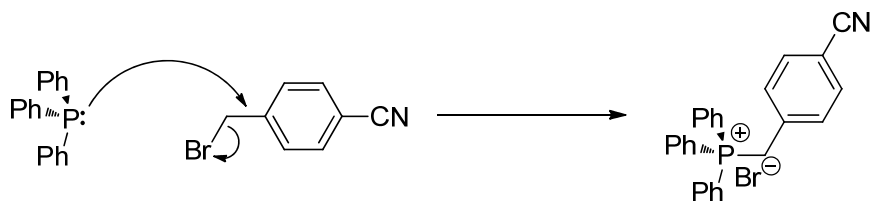
Slika 18: Mehanizem Cannizzarove reakcije (47).

5.1.11 Sinteza alkil trifenilfosfonijevega bromida (spojina **10**)

Pretvorba 4-(bromometil)benzonitrila v ustrezen alkil trifenilfosfonijev bromid je potekla po S_N2 mehanizmu preko trigonalnega bipiramidalnega prehodnega stanja, pri katerem je centralni ogljikov atom pentakoordiniran (40). Ker so bile sterične ovire v prehodnem stanju manjše kot v primeru poskusa sinteze spojine **7**, je substitucija potekla. Reakcijo smo izvedli v argonovi atmosferi, ker bi se trifenilfosfin ob refluktiranju oksidiral z zračnim kisikom, nastali trifenilfosfin oksid pa ne reagira do alkil trifenilfosfonijeve soli. Reakcija je potekla skoraj kvantitativno, izolacija produkta pa je bila enostavna, saj se je produkt v THF oboril, izhodni spojini pa sta bili dobro topni.



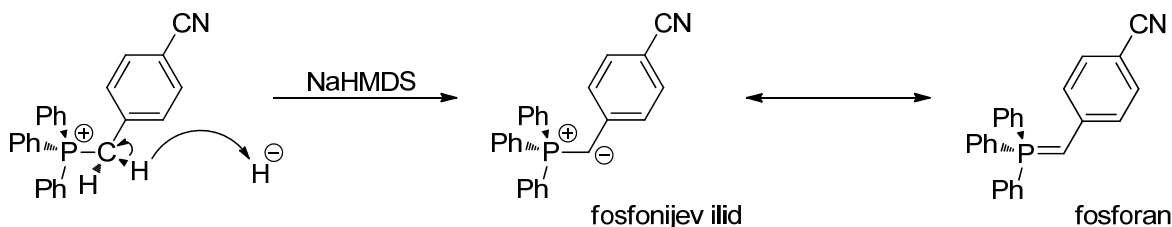
Slika 19: Tridimenzionalna prostorska razporeditve atomov spojine **10**.



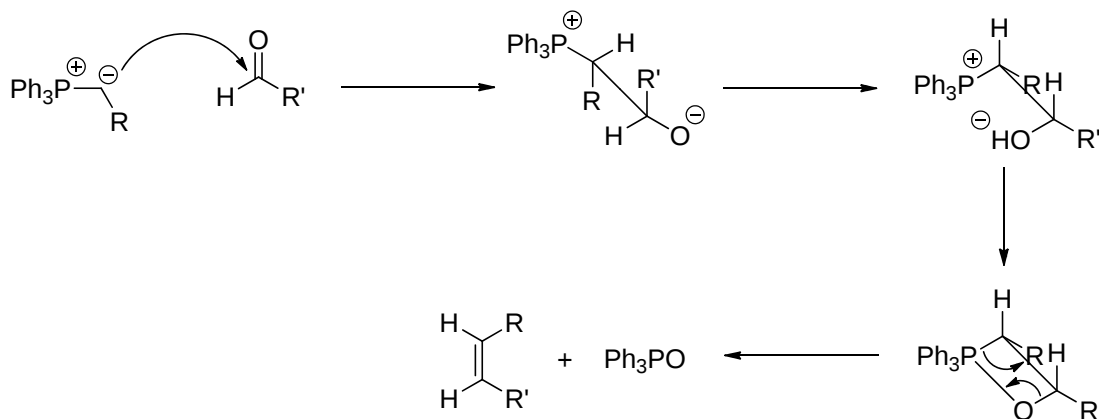
Slika 20: Tvorba trifenilfosfonijeve soli (48).

5.1.12 Tvorba dvojne vezi – Wittigova reakcija (spojina **11**)

V enajsti stopnji sinteze smo z Wittigovo reakcijo tvorili alken. V prvi stopnji Wittigove sinteze smo z dodatkom močne baze odcepili proton z metilenske skupine spojine **10** in tvorili fosfonijev ilid. Po dodatku spojine **8** je fosfonijev ilid nukleofilno napadel karbnilno skupino aldehida in nastal je betain, ki je po rotaciji okrog vezi ogljik-ogljik cikliziral v štiričlenki oksafosfetan. Po eliminaciji sta nastala alken in trifenilfosfin oksid (49, 50). Reakcijo smo izvedli v argonovi atmosferi in brezvodnem THF ter tako preprečili potek Cannizzarove disproporcionacije aldehida v močno alkalnih pogojih. Produkt smo izolirali z dodatkom zmesi led/voda, saj je v vodi netopen. Reakcija je potekla z le polovičnim izkoristkom, kar smo pripisali steričnim oviram, ki so prisotne ob nukleofilni adiciji ilida na aldehyd.



Slika 21: Pretvorba trifenilfosfonijeve soli v ilid (48).



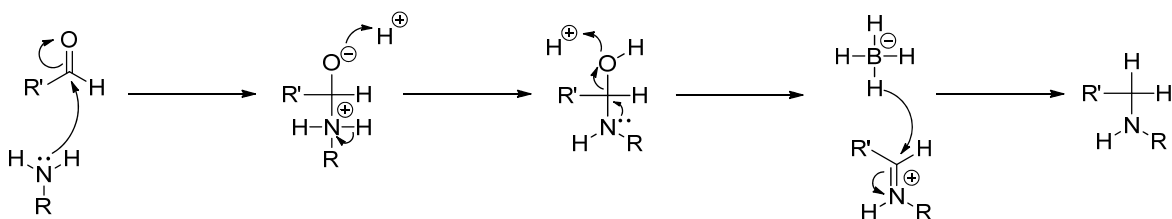
Slika 22: Mehanizem Wittigove reakcije (51).

5.1.13 Redukcija dvojne vezi in nitro skupine (spojina **12**)

Redukcijo dvojne vezi alkena do alkana in nitro skupine do amino skupine smo izvedli s katalitskim hidrogeniranjem, pri katerem smo kot katalizator uporabili paladij na ogljiku. Spojino **11** smo suspendirali v 100 % očetni kislini, ker se v brezvodnem MeOH ni topila. Absolutno očetno kislino in argonovo atmosfero smo uporabili, ker prisotnosti vode in kisika v reakcijski zmesi zmanjšata reaktivnost katalizatorja. Pri izvedbi reakcije smo bili pozorni zaradi uporabe reaktivnega katalizatorja, saj lahko ob neprevidnem delu v prisotnosti vodika pride do eksplozije. Potek redukcije nitro skupine smo spremljali z orositvenim reagentom ninhidrinom, ki daje barvno reakcijo z amino skupino. Redukcija je na obeh mestih potekla skoraj kvantitativno, pri izolaciji pa so se pojavile težave s stabilnostjo nastalega produkta. Nastala amino skupina se je v prisotnosti zračnega kisika pospešeno oksidirala in spojina je potemnela. Zato smo bučko s produktom prepihali z argonom in zatesnili, strukturo produkta pa potrdili le z analizo $^1\text{H-NMR}$.

5.1.14 Reduktivno aminiranje (spojina **13**)

Na amino skupini spojine **12** smo v argonovi atmosferi in brezvodnih pogojih izvedli reakcijo reduktivnega aminiranja. V prvi stopnji je potekla nukleofilna adicija amina na aldehydno skupino 4-fluorobenzaldehida in nastal je imin, ki se je nato v drugi stopnji reduciral v prisotnosti NaBH_4 . NaBH_4 je močen reducent iz skupine hidridov, ki ob dodatku burno reagira, zato smo ga dodajali počasi (52).



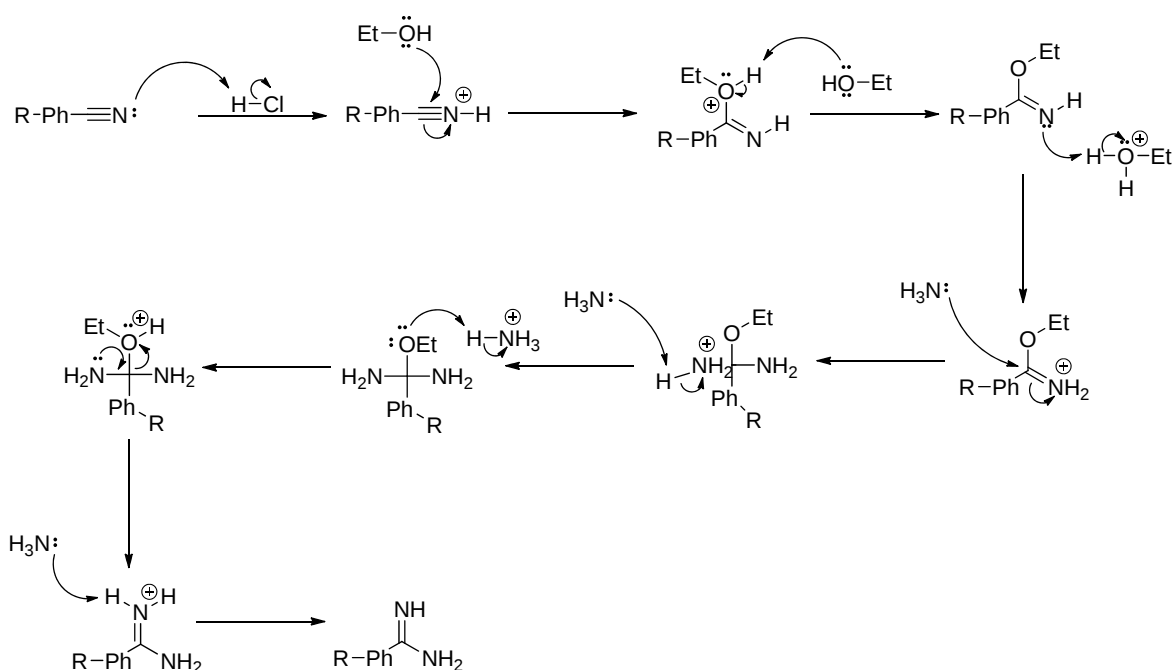
Slika 23: Mehanizem reduktivnega aminiranja (52).

5.1.15 Alkiliranje sekundarnega amina z alkil halidom (spojina **14**)

Na sekundarni amino skupini spojine **13** smo v argonovi atmosferi izvedli reakcijo alkiliranja. Reakcija je potekla po $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmu. Pri reakciji je nastajala HBr , ki jo je nevtraliziral K_2CO_3 (53).

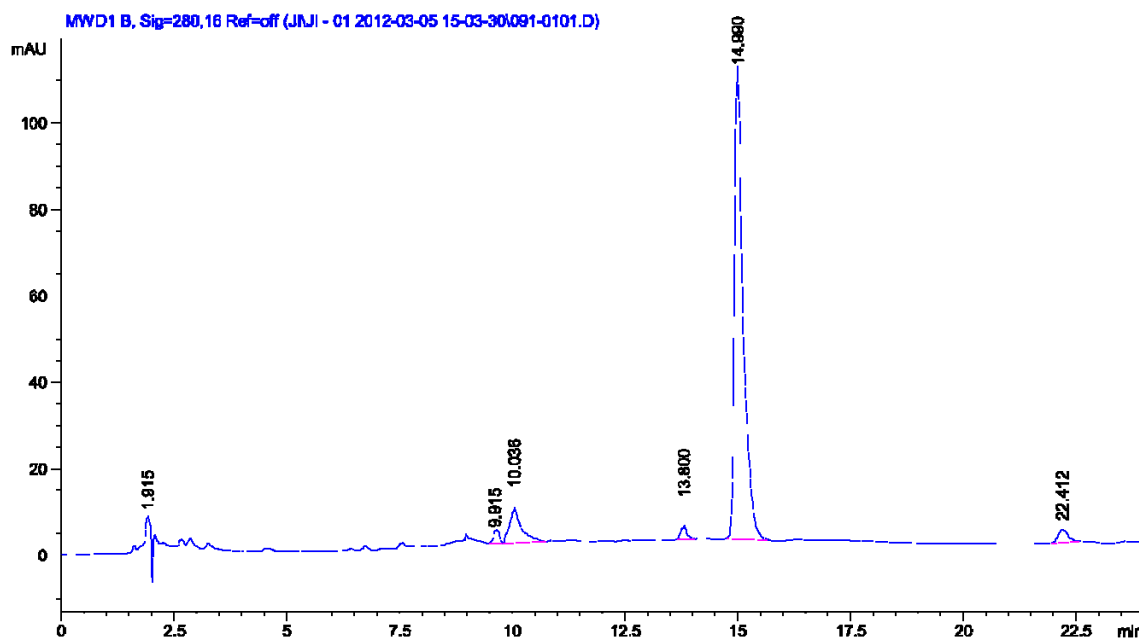
5.1.16 Sinteza amidina – Pinnerjeva reakcija (spojina **15**)

Za pretvorbo ciano skupine spojine **14** v amidinsko skupino smo uporabili dvostopenjsko Pinnerjevo sintezo. V prvi stopnji smo z uvajanjem plinaste HCl pretvorili ciano skupino v imino eter (imino ester/imidat). Pri tem je potekla kislinsko katalizirana adicija alkohola na elektrofilni ogljikov atom ciano skupine. V drugi stopnji smo z amonijevim acetatom dodali amin (amoniak), ki je nukleofilno napadel imino eter in po sledeči eliminaciji alkoksi skupine je nastal amidin. Ker imino etri hitro reagirajo z vodo, kar vodi do nastanka amida, smo reakcijo izvedli v brezvodnih pogojih – v argonovi atmosferi in brezvodnem etanolu. Za povečanje topnosti plina HCl in s tem celotne HCl v reakcijski zmesi smo reakcijsko zmes hladili z ledom. Prva stopnja sinteze se je pokazala kot problematična v smislu nekvantitativnega poteka reakcij in je vodila do nizkega izkoristka Pinnerjeve sinteze.



Slika 24: Mehanizem Pinnerjeve reakcije (54).

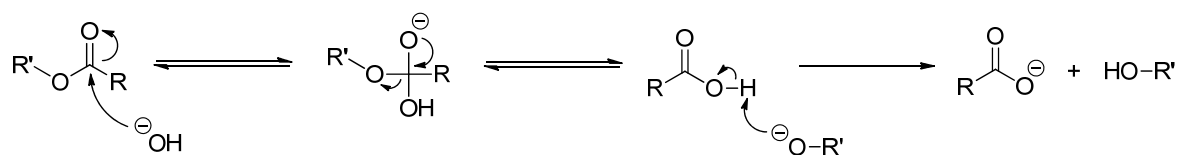
Posneli smo HPLC spekter izolirane spojine **15** in iz njega določili njeno čistost – spojina je bila približno 85 % čista in je imela retencijski faktor 14,99 min.



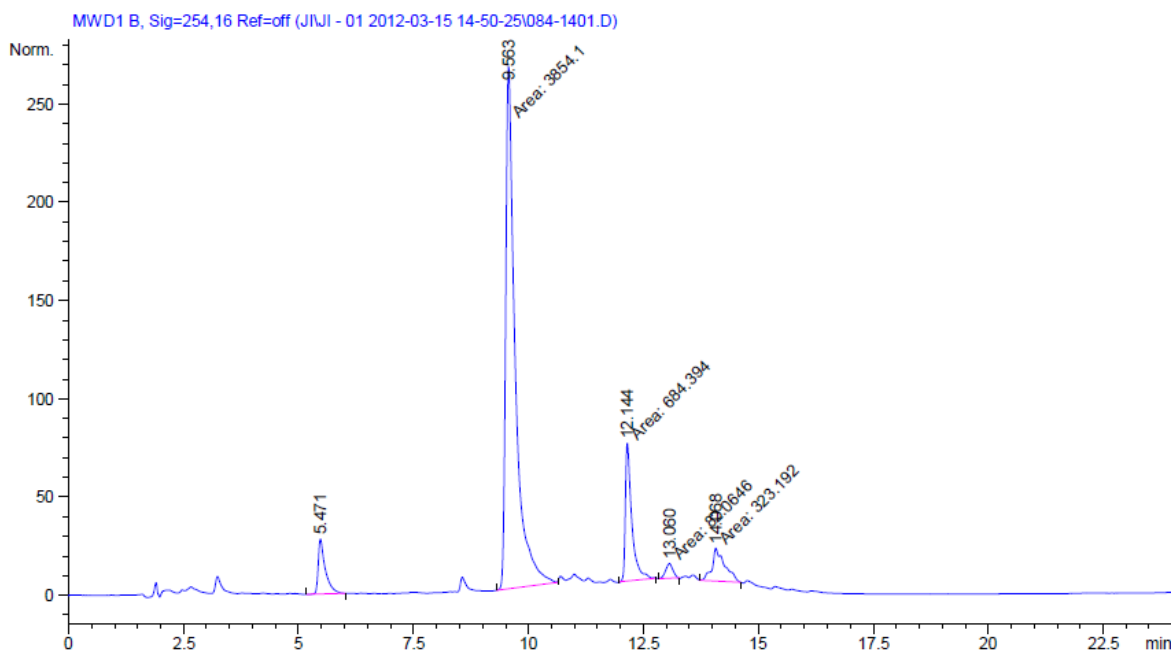
Slika 25: HPLC spekter spojine **15**.

5.1.17 Bazična hidroliza estra (spojina **16**)

V zadnji stopnji sinteze je potekla nukleofilna acilna substitucija – bazično katalizirana hidroliza estra karboksilne kisline (**55**). Spojino **15** smo raztopili v brezvodnem etanolu in dodali sveže pripravljeno raztopino NaOH. Hidroksilni ion je nukleofilno napadel karbnilno skupino estra in nastal je tetrahedralni alkoksid. Po eliminaciji etoksi skupine in odtegnitvi protona je nastal karboksilat, dobili smo spojino **16** v obliki iona dvojčka (Zwitter iona).



Slika 26: Mehanizem bazične hidrolize estra.



Slika 27: HPLC spekter spojine **16**.

5.2 »In silico« simulacija z biokemijskim vrednotenjem

V skladu s postavljenimi farmakofornimi zahtevami smo izvedli »in silico« simulacijo vezave spojine **16** na tarčni mesti – aktivno mesto trombina in fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa. Sidranje spojine **16** v programu AutoDock 4.0 v aktivno mesto trombina je pokazalo:

- da se je benzamidinski preostanek se je umestil v selektivnostni S_1 žep trombina
- da se je osrednje benzoksazinsko ogrodje v vezalo v proksimalni S_2 žep z lipofilno zanko YPPW
- da se je 4-fluorofenilni obroč umestil v distalni lipofilni S_3 žep ob aktivnem mestu

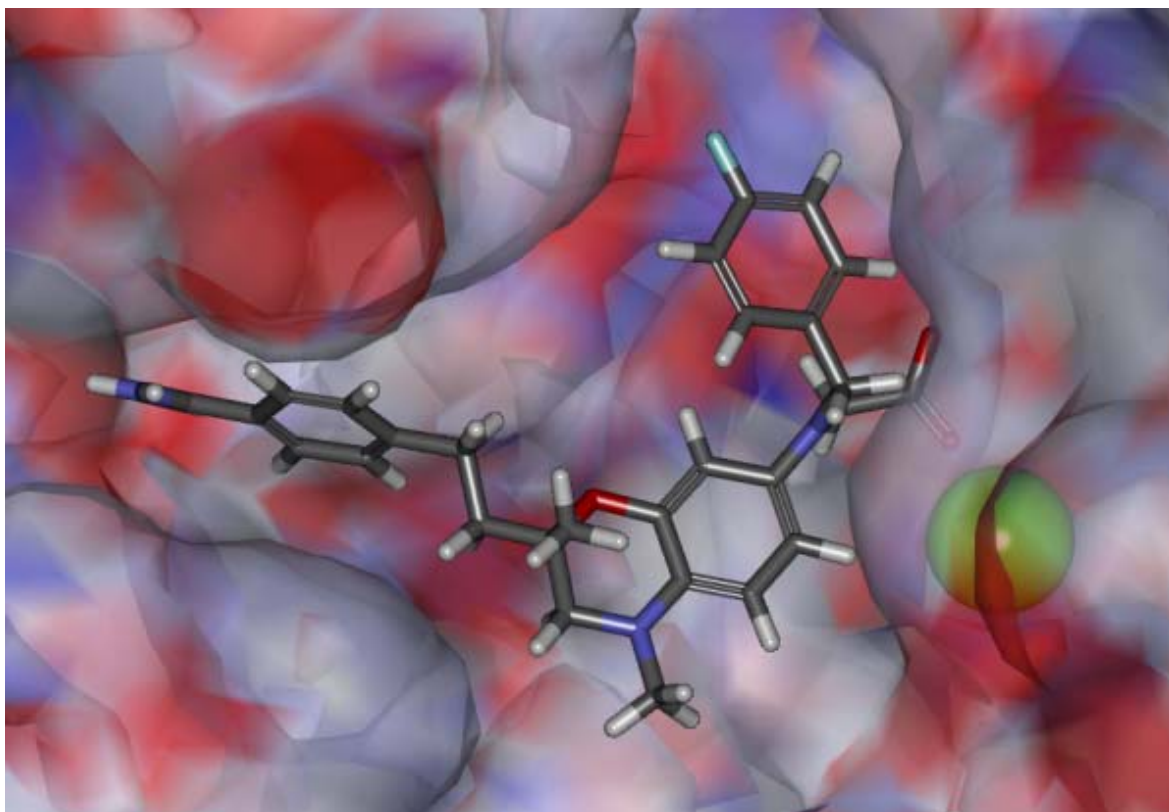
Spojino **16** smo sidrali tudi na fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa. Rezultati analize so pokazali:

- da kationski center na benzamidinskem preostanku oponaša strukturo arginina v aminokislinski sekvenci Arg-Gly-Asp (RGD), ki jo prepozna fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa
- da tvori prosta karboksilna kislina na fibrinogenskem receptorju GP IIb/IIIa ionske in dipol-dipol interakcije
- da predstavlja benzoksazinsko ogrodje ustrezno širok ($\sim 1,5$ nm) distančnik med ionskima centroma, odgovornima za vezavo na receptor GP IIb/IIIa

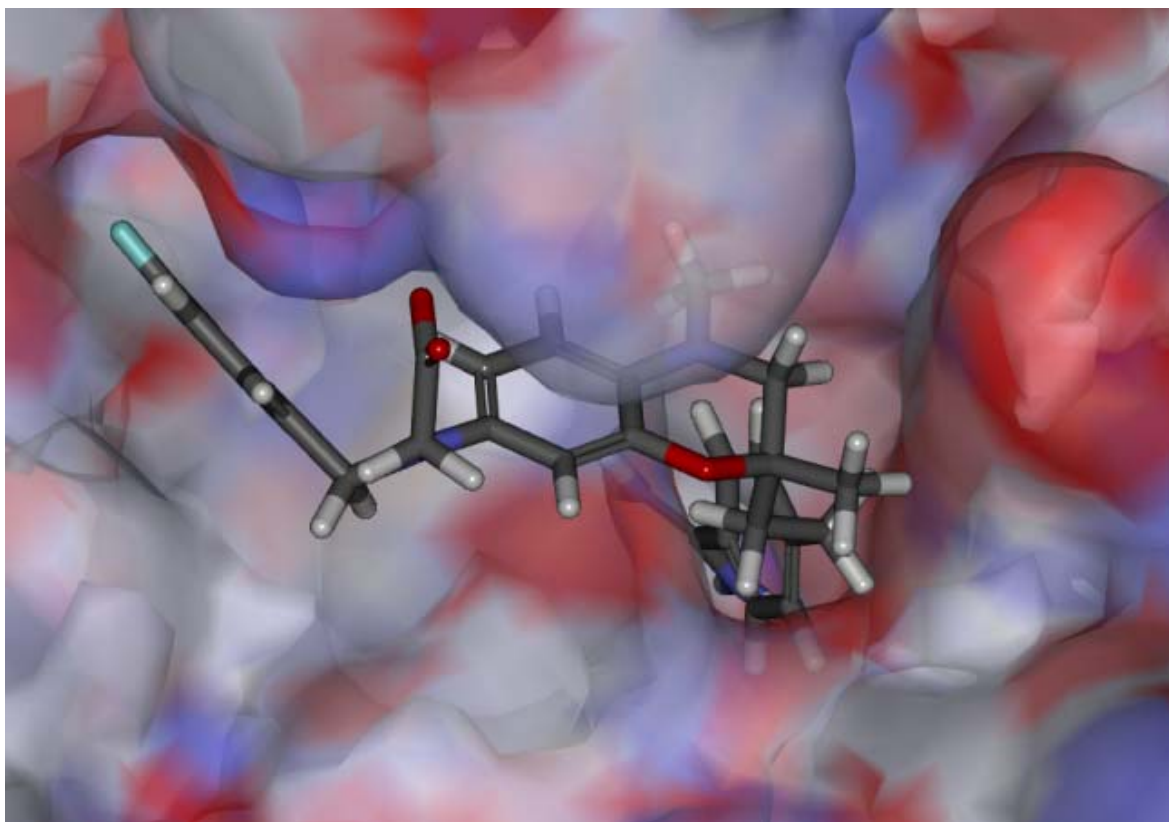
Biološko učinkovitost spojine **15** in **16** smo ovrednotili z »*in vitro*« testiranjem na izoliranih serinski proteazah in glikoproteinskih receptorjih. Pri tem smo testiranja izvedli v dvojniku in jih ob različnih dnevih ponovili najmanj trikrat, rezultate pa primerjali s tržno uveljavljenima učinkovinama dabigatranom in tirofibanom. Spojina **15** ima potencialno inhibitorno delovanje na trombin, spojina **16** pa potencialno dualno delovanje – inhibitorno na trombin in antagonistično na fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa.

Stopnjo inhibicije serinskih proteaz smo določili z encimsko amidolitično metodo, osnovano na spektrofotometrični določitvi absorbance nastalega produkta po cepitvi amidne vezi kromogenega substrata v prisotnosti encima. Iz dobljenih vrednosti smo iz kinetike hidrolize substrata z in brez dodatka inhibitorja določili konstanto inhibicije (K_i). Spojini **15** smo določili povprečno vrednost $K_i = 2,64 \pm 0,36 \mu\text{M}$. V primerjavi s K_i inhibitorja trombina dabigatrana ($K_i = 6,3 \pm 1,1 \text{ nM}$), je K_i spojine **15** 400-krat višji.

Antagonistično delovanje spojine **15** na fibrinogeni receptor GP IIb/IIIa smo določili z modificiranim ELISA testom, pri katerem smo merili luminiscenco nastalega produkta. Izmerjene srednje eksperimentalne vrednosti smo vstavili v sigmoidni model in iz krivulje odmerek-odziv izračunali vrednosti IC_{50} . Inhibitorna koncentracija receptorjev GP IIb/IIIa spojine **15** $\text{IC}_{50} (\text{GP IIb/IIIa}) \approx 500 \mu\text{M}$, medtem ko je IC_{50} tirofibana (antagonist fibrinogenih receptorjev GP IIb/IIIa) $0,37 \pm 0,11 \text{ nM}$. Spojina **15** je na fibrinogenem receptorju GP IIb/IIIa pričakovano neaktivna. Testiranja spojine **16** s serinskimi proteazami in fibrinogenim receptorjem GP IIb/IIIa nismo izvedli, ker nam je ni uspelo izolirati v zadostni količini. Pričakujemo, da bo spojina **16** podobno aktivna na trombin kot spojina **15**. Glede aktivnosti spojine 16 na fibrinogenem receptorju GP IIb/IIIa pričakujemo, da bo spojina **16** aktivna, a brez testiranja ni mogoče oceniti, kakšna ta aktivnost bo.



Slika 28: Sidranje spojine **16** na aktivno mesto trombina (AutoDock 4.0).



Slika 29: Sidranje spojine **16** na aktivno mesto fibrinogenskega receptorja (AutoDock 4.0).

6 SKLEP

Z uporabo Wittigove reakcije smo iz preprostih sintonov sintetizirali spojini **15** in **16**. Spojini smo zasnovali s kombiniranjem razumevanja odnosa med strukturo in delovanjem do sedaj sintetiziranih antitrombotičnih učinkovin in rezultatov »*in silico*« simulacij v programu AutoDock 4.0. Pridobljene ugotovitve smo združili in na osnovi dognanj v 10 oziroma 11 stopnjah sintetizirali spojini **15** in **16**. Spojina **15** ima potencialno inhibitorno delovanje na trombin, spojina **16** pa potencialno dualno delovanje – inhibitorno na trombin in antagonistično na fibrinogenški receptor GP IIb/IIIa.

Biološko učinkovitost obeh spojin smo ovrednotili z »*in vitro*« testiranjem na izoliranih encimih in receptorjih ter rezultate primerjali s tržno uveljavljenima učinkovinama. V primerjavi z referenčno spojino dabigatranom (inhibitor trombina, $K_i = 6,3 \pm 1,1$ nM) ima spojina **15** $K_i = 2,64 \pm 0,36$ μ M. Konstanta inhibicije spojine **15** je tako približno 400-krat višja kot konstanta inhibicije dabigatrana. V primerjavi s tirofibanom (antagonist fibrinogenškega receptorja GP IIb/IIIa, $IC_{50} \text{ (GP IIb/IIIa)} = 0,37 \pm 0,11$ nM) ima spojina **15** $IC_{50} \text{ (GP IIb/IIIa)} \approx 500$ μ M in je s tem praktično neaktivna. Spojine **16** nismo uspeli pripraviti v ustrezni količini in čistosti, da bi lahko izvedli analize in biološko vrednotenje. Pričakujemo pa, da je aktivnost spojine **16** na trombinu podobna aktivnost spojine **15** in da bo spojina **16** aktivna tudi na fibrinogenškem receptorju GP IIb/IIIa.

Na osnovi pridobljenih rezultatov lahko povzamemo, da je aktivnost sintetizirane spojine slabša od pričakovane in ni primerljiva z aktivnostmi tržno uveljavljenih učinkovin. V prihodnje je potrebno sintetizirati in ovrednotiti spojino **16**, saj lahko le tako potrdimo ali ovržemo njeno dualno aktivnost. Ob tem bi veljalo poizkusiti tudi s sintezo strukturnih analogov na mestu 6 benzoksazinskega obroča in variacijo substituentov, ki so odgovorni za antagonistično delovanje na fibrinogenškem receptorju GP IIb/IIIa.

7 LITERATURA

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> (2.4.2012)
2. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Flower R.J.: Rang and Dale's Pharmacology, 7th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, **2011**: 294–297.
3. Colman R.W., Clowes A.W., George J.N., Goldhaber S.Z., Marder V.J.: Hemostasis and thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2006**: 3–16.
4. Cesarman-Maus K.G., Hajjar K.A.: Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Brit. J. Haematol.*, **2005**; 129: 307–321.
5. Pathy M.S.J., Sinclair A.J., Morley E.J.: Principles and Practice of Geriatric Medicine, vol. 2, 4th ed., John Wiley & Sons Inc., New York, **2006**: 437–444.
6. Lowe G.D.O.: Virchow's triad revisited: Abnormal flow, *Pathophysiol. Haemo. T.*, **2003**; 33: 455–457.
7. Lippi G., Franchini M., Targher G.: Arterial thrombus formation in cardiovascular disease, *Nat. Rev. Cardiol.*, **2011**; 8: 502–512.
8. Wettinger S.B., Reitsma P.H.: Atherosclerosis and its acute consequences: Insights from genetic association studies. *Curr. Genomics*, **2005**; 6: 411–429.
9. Fuster V., Stein B., Ambrose J.A., Badimon L., Badimon J.J., Chesebro J.H.: Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts., *Circulation*, **1990**; 82: II47–59.
10. Jain M., Schmidt G.A.: Venous thromboembolism: Prevention and prophylaxis. *Semin. Resp. Crit. Care*, **1997**; 18: 79–90.
11. Rhodes, E.G.H.: Thrombophilia and the surgeon. *Ann. Roy. Coll. Surg.*, **1996**; 78: 331–335.
12. Konecny F.: Inherited trombophilic states and pulmonary embolism. *J. Res. Med. Sci.*, **2009**; 14: 43–56.
13. http://biochem.wustl.edu/~protease/ser_pro_overview.html (2.4.2012)
14. Böhm H.-J., Klebe G., Kubinyi H.: Wirkstoffdesign. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, **1996**: 560–565.
15. Voet D., Voet J. G.: Biochemistry, 4th ed., John Wiley & Sons Inc., New York, **2011**: 525–538.
16. Ripka W. C.: New thrombin inhibitors in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1997**; 1: 242–253.

17. Kimball D.: Thrombin active site inhibitors. *Curr. Pharm. Design*, **1995**; 1: 441–468.
18. Narayanan S.: Multifunctional roles of thrombin. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **1999**; 29: 275–280.
19. Ojima I., Chakravarty S., Dong Q.: Antithrombotic agents: from RGD to peptide mimetics. *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**; 3: 337–360.
20. Topol E. J., Byzova T. V., Plow E. F.: Platelet GP IIb/IIIa blockers. *Lancet*, **1999**; 353: 227–231.
21. Frishman W. H., Burns B., Atac B., Alturk N., Altajar B., Lerrick K.: Novel antiplatelet therapies for treatment of patients with ischemic heart disease: Inhibitors of the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor. *Am. Heart J.*, **1995**; 130: 877–892.
22. Morphy R., Kay C., Rankovic Z.: From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discovery Today*, **2004**; 9: 641–651.
23. Morphy R., Rankovic Z.: Designing multiple ligands - Medicinal chemistry strategies and challenges. *Curr. Pharm. Design.*, **2009**; 15: 587–600.
24. Morphy R., Rankovic Z.: The physicochemical challenges of designing multiple ligands. *J. Med. Chem.*, **2006**; 49: 4961–4970.
25. Morphy R., Rankovic Z.: Fragments, network biology and designing multiple ligands. *Drug Discovery Today*, **2007**; 12: 156–160.
26. Hermosillo A.J., Spinler S.A.: Aspirin, clopidogrel, and warfarin: Is the combination appropriate and effective or inappropriate and too dangerous? *Ann. Pharmacother.*, **2008**; 42: 790–805.
27. Kranjc A., Kikelj D.: Dual inhibitors of the blood coagulation enzymes. *Curr. Med. Chem.*, **2004**; 11: 2535–2547.
28. Delaney J.A., Opatrny L., Brophy J.M.: Drug-drug interactions between antithrombotic medications and the risk of gastrointestinal bleeding. *Can. Med. Assoc. J.*, **2007**; 177: 347–351.
29. Hopkins A.L.: Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Biol.*, **2008**; 4: 682–690.
30. Anderluh Štefanič P., Anderluh M., Ilaš J., Mravljak J., Sollner Dolenc M., Stegnar M., Kikelj D.: Toward a novel class of antithrombotic compounds with dual function. Discovery of 1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one derivatives possessing thrombin inhibitory and fibrinogen receptor antagonistic activities. *J. Med. Chem.*, **2005**; 48: 3110–3113.

31. Ilas J., Jakopin Z., Borstnar T., Stegnar M., Kikelj D.: 3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine derivatives combining thrombin inhibitory and glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonistic activity as a novel class of antithrombotic compounds with dual function. *J. Med. Chem.*, **2008**; 51: 5617–5629.
32. Cheng Y., Prusoff W.H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.*, **1973**; 22: 3099–3108.
33. Addicks E., Mazitschek R., Giannis A.: Synthesis and biological investigation of novel tricyclic benzodiazepinedione-based RGD analogues. *ChemBioChem*, **2002**; 3: 1078–1088.
34. Kikelj D., Suhadolc E., Urleb U., Žbontar U.: A convenient synthesis of 3,4-dihydro-2-methyl-3-oxo-2*H*-1,4-benzoxazine-2-carboxylic acids and 3,4-dihydro-2-methyl-3-oxo-2*H*-pyrido-1,4-oxazine-2-carboxylic acid, *J. Heterocyclic Chem.*, **1993**; 30: 597–602.
35. Anderluh M., Cesar J., Štefanič P., Kikelj D., Janeš D., Murn J., Nadrah, K., Tominc M., Addicks E., Giannis A., Stegnar M., Dolenc M.S.: Design and synthesis of novel platelet fibrinogen receptors antagonists with 2*H*-1,4-benzoxazine-3(4*H*)-one scaffold. A systematic study. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**: 25–49.
36. Štefanič P.: Načrtovanje in sinteza peptidomimetičnih antitrombotičnih učinkovin s 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazinskim skeletom in dualnim mehanizmom delovanja: doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, **2005**
37. http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/OCP/ch/chb/oc5/Reduction_Reactions-08.pdf (2.4.2012)
38. Otera J.: Esterification methods, reactions and applications, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**: 6–18.
39. http://chemwiki.ucdavis.edu/organic_chemistry/virtual_textbook_of_ochem/alcohols/electrophilic_substitution_at_oxygen (2.4.2012)
40. Carey F.A., Sundberg R.J.: Advanced organic chemistry: Part B, reactions and synthesis, 5th ed., Springer, New York, **2007**: 263–269.
41. Mancuso A. J., Swern D.: Activated dimethyl sulfoxide: Useful reagents for synthesis (Review). *Synthesis*, **1981**; 3: 165–185.
42. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Aldrich/Bulletin/al_techbull_al110.P ar,0001.File.tmp/al_techbull_al110.pdf (2.4.2012)

43. Wirth. T.: *Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis*, 1st ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2008**: 80.
44. Omura K., Swern D.: Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide. A preparative steric and mechanistic study. *Tetrahedron*, **1978**; 34: 1651–1660.
45. Cannizzaro S.: Ueber den der Benzoësäure entsprechenden Alkohol. *Liebigs Annalen*, **1853**; 88: 129–130.
46. Geissman T. A.: The Cannizzaro Reaction. *Org. React.*, **1944**; 2: 94–113 (Review)
47. Kürti L., Czako B.: *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*, 1st ed., Elsevier Academic Press, Burlington-San Diego-London, **2005**: 74–75.
48. <http://www.chemtube3d.com/Nucleophilic%20substitution%20at%20the%20carbonyl%20group%20-%20Wittig%20reaction%20%28Ylid%20formation%29.html> (2.4.2012)
49. (a) Wittig G., Schöllkopf U.: Über Triphenyl-phosphin-methylene als olefinbildende Reagenzien I., *Chemische Berichte*, **1954**; 87: 1318–1330. (b) Wittig G., Haag W.: Über Triphenyl-phosphin-methylene als olefinbildende Reagenzien II. *Chemische Berichte*, **1955**; 88: 1654–1666.
50. Vedejs E., Marth C.F., Ruggeri R.: Substituent effects and the Wittig mechanism: the case of stereospecific oxaphosphetane decomposition. *J. Am. Chem.*, **1988**; 110: 3940–3948.
51. http://en.wikipedia.org/wiki/Wittig_reaction (2.4.2012)
52. Abdel-Magid A.F., Carson K.G., Harris B.D., Maryanoff C.A., Shah R.D.: Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. *J. Org. Chem.*, **1996**; 61: 3849–3862.
53. Ilić M., Kontogiorgos C., Hadjipavlou-Litina D., Ilaš J., Kikelj D.: Thrombin inhibitors with lipid peroxidation and lipoxygenase inhibitory activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2011**; 16: 4705–4709.
54. Roger R., Neilson D.G.: The chemistry of imidates. *Chem. Rev.*, **1961**; 61: 179–211
55. *Organic syntheses*, Coll. vol. 1, Organic Syntheses, Inc., **1926**: 66.