

# Sinteza i svojstva varfarina

---

**Kurečić, Ivona**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:872458>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Ivona Kurečić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **SINTEZA I SVOJSTVA VARFARINA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zagreb, 2018.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

15. svibnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

7. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Nekad otrov za štakore, danas lijek.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Zgrušavanje krvi i antikoagulansi.....</b>	<b>3</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Svojstva varfarina .....</b>	<b>7</b>
2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva .....	8
2.1.2. Stereokemija.....	10
2.1.3. Tautomerni oblici varfarina.....	11
2.1.4. Farmakokinetika i farmakodinamika.....	13
2.1.5. Mehanizam djelovanja .....	16
2.1.6. Interakcije varfarina s drugim lijekovima i s hranom i pićem.....	18
2.1.7. Moguće nuspojave u terapiji varfarinom.....	19
<b>2.2. Sinteza racemata .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3. Asimetrična sinteza .....</b>	<b>23</b>
2.3.1. Prva asimetrična sinteza varfarina – katalitičko asimetrično hidrogeniranje .....	23
2.3.2. Asimetrična sinteza varfarina Diels-Alderovom reakcijom.....	26
<b>2.4. Zelena, enantioselektivna sinteza varfarina .....</b>	<b>27</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>31</b>



## § Sažetak

Varfarin je jedan od najpoznatijih i najčešće upotrebljivanih oralnih antikoagulansa. Na hrvatskom tržištu poznatiji je pod nazivom Martefarin – tablete čija je djelatna tvar natrijev varfarinat. Koristi se za sprječavanje i liječenje tromboembolije (krvnih ugrušaka) ili njezinih komplikacija. Antikoagulacijsko djelovanje mu se zasniva na inhibiciji sinteze faktora zgrušavanja krvi ovisnih o vitaminu K. Prije no što je uveden u kliničku primjenu proslavio se kao rodenticid.

Kiralna je molekula – razlikujemo *R*- i *S*-enantiomere varfarina. Prva sinteza bila je reakcijom Michaelove adicije, kojom je dobiven racemat varfarina. Kako se enantiomeri razlikuju u potentnosti, pojavio se interes za asimetričnom sintezom. Prva zabilježena asimetrična sinteza polazi od racemičog varfarina te koristi reakciju hidrogeniranja uz kiralni katalizator. *R*-Varfarin nastaje uporabom (*S,S*)-Et-DuPHOS katalizatora, a *S*-varfarin uporabom (*R,R*)-Et-DuPHOS. Asimetrična sinteza može biti provedena i Diels-Alderovom reakcijom, kojom nastaje potentniji *S*-enantiomer, ili se pak može provesti korištenjem vicinalnog diamina kao katalizatora.



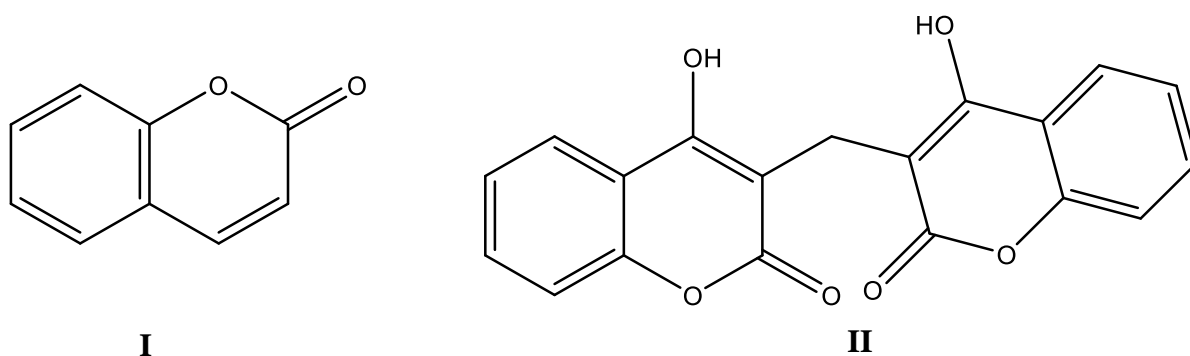


## § 1. UVOD

### 1.1. Nekad otrov za štakore, danas lijek

Otkriće varfarina vezano je uz pojavu ugibanja stoke od unutarnjeg krvarenja u Kanadi (Alberta) i SAD-u (Sjeverna Dakota) dvadesetih godina 20. stoljeća. Stoka zahvaćena unutarnjim krvarenjem pasla je na pašnjacima bogatima bijelim (*Melilotus albus*) i žutim (*Melilotus officinalis*) kokotcem koji je u to vrijeme imao rasprostranjenu uporabu kao sijeno, a u Ameriku je došao iz Europe početkom 20. stoljeća kao nova biljna vrsta. Zbog promjene klime i vlažnog ljeta, sijeno je postao vlažno i inficiralo se s plijesni *Penicillium nigricans* i *Penicillium jensi*. Hranjenje stoke nepravilno osušenim sijenom bogatim kokotcem dovelo je do poremećaja u koagulaciji krvi i uzrokovalo smrtonosnu bolest, koja je postala poznata pod nazivom „bolest slatkog kokotca“.<sup>1</sup>

Istraživanjem bolesti bavili su se u laboratoriju na Sveučilištu Wisconsin pod vodstvom Karl Paul Linka. Aktivna tvar iz vlažnog kokotca, odgovorna za smrtonosnu bolest krvarenja kod stoke, izolirana je 1940. godine te je postala poznata pod imenom dikumarol. Istraživanje je financirala fondacija WARF (The Wisconsin Alumni Research Foundation) kojoj je 1941. godine odobren patent na dikumarol. Dikumarol nastaje u trulom kokotcu oksidacijom kumarina odgovornog za slatkast miris biljke (slika 1).<sup>2</sup> Upravo se zbog slatkastog mirisa svježje note kumarin koristi u industriji parfema. Sastojak je oko 90 % mirisa, a u parfumerijskoj industriji poznat je pod nazivom evernyl.



Slika 1. Strukturne formule kumarina (I) i dikumarola (II)

Stoka hranjena dikumarolom sintetizira abnormalni protrombin, koji ne veže  $\text{Ca}^{2+}$ , što dovodi do nemogućnosti stvaranja krvnih ugrušaka i obilnog krvarenja.<sup>3</sup> Zbog svojstva da uzrokuje unutarnje krvarenje, Link je 1945. godine došao na ideju da se dikumarol počne koristiti kao

rodenticid, otrov za glodavce. No, pokazao se lošim rodenticidom jer djeluje presporo. Pokrenuto je sustavno istraživanje drugih derivata kumarina, a od preko sto sintetiziranih derivata najučinkovitijim pokazao se – varfarin. Ime je dobio po fondaciji WAFR koja je financirala projekt, a nastavak –arin dolazi od kumarina. Varfarin je patentiran 1948. godine te je pušten na tržište kao rodenticid, pesticid za trovanje štakora, miševa ili drugih glodavaca (slika 2).<sup>1</sup>



Slika 2. Karl Paul Link – promocija varfarina, novosintetiziranog otrova za štakore<sup>4</sup>

Iako je varfarin prvotno smišljen kao otrov za glodavce, nakon neuspješnog pokušaja samoubojstva američkog vojnika uzimanjem varfarina 1951. godine, koji se oporavio terapijom vitaminom K, započeo je interes da se uvede u kliničku primjenu. Osnovne prednosti varfarina nad dikumarolom i drugim tada poznatim antikoagulansima bili su da je 5 do 10 puta potentniji od dikumarola, može se primjenjivati oralno, intravenozno, intramuskularno ili rektalno, a predoziranje se može ispraviti terapijom vitaminom K. Prvo kliničko ispitivanje natrijevog varfarinata provedeno je 1955. godine, a iste godine je natrijevim varfarinatom liječen tadašnji predsjednik Amerike Eisenhower nakon srčanog udara.<sup>5</sup>

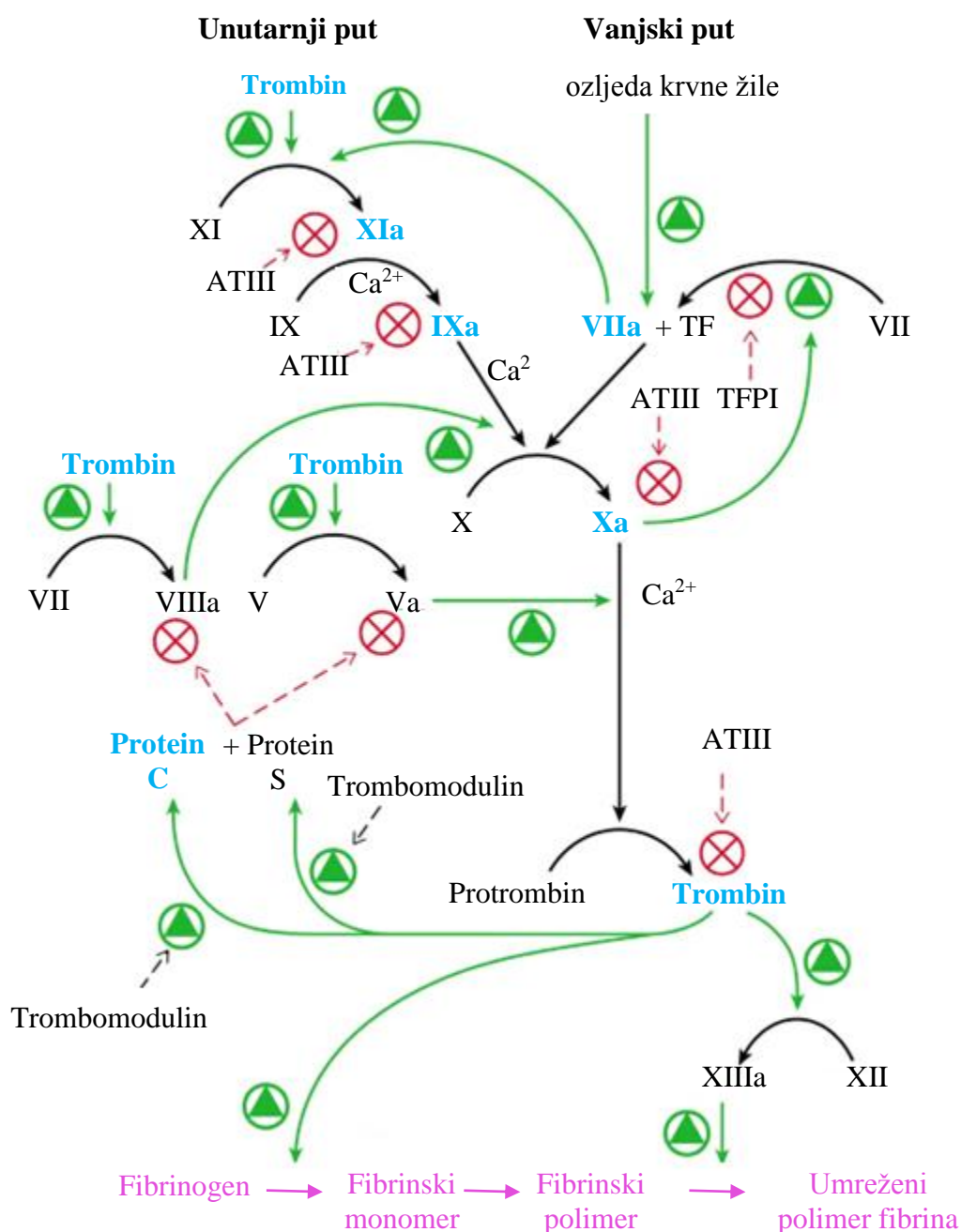
Varfarin je od otrova za štakore postao klinički upotrebljavan oralni antikoagulans, u Americi poznat pod imenom „Coumadin“. Koristi se za smanjenje rizika od stvaranja krvnih ugrušaka u tijelu, a samim time i za smanjenje vjerojatnosti od moždanog i srčanog udara koji nastaju zbog začepjenja dotoka krvi u jedno područje mozga (moždani udar) ili začepjenja jedne od koronarnih arterija, koje srce opskrbljuju krvlju (srčani udar).

## 1.2. Zgrušavanje krvi i antikoagulansi

Tvar koja sprječava stvaranje krvnih ugrušaka naziva se antikoagulans. Služi za liječenje određenih bolesti kardiovaskularnog sustava, kao na primjer poremećaje ritma srca, tromboze dubokih vena, plućne embolije i drugih. Varfarin je oralni antikoagulans, lijek koji djeluje tako što sprječava nastajanje faktora zgrušavanja – proteina o kojima ovisi zgrušavanje krvi. Osnova za proizvodnju faktora zgrušavanja je vitamin K (slovo K dolazi od riječi koagulacija, što znači zgrušavanje), koji čim se pojavi neka rana sudjeluje u pokretanju cijelog kaskadnog mehanizma zgrušavanja.

Zgrušavanje krvi obuhvaća složen proces aktivacije faktora zgrušavanja, koji u konačnici rezultira nastajanjem krvnih ugrušaka. Krvni ugrušci stvaraju se kako bi spriječili iskrvarenje. Oni su agregati trombocita isprepletenih i stabiliziranih proteinskim vlaknima koja se uglavnom sastoje od fibrina. Fibrin ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) nastaje proteolitičkom aktivacijom fibrinogena – trećeg najbrojnijeg tipa proteina u krvnoj plazmi nakon albumina i globulina. Proteolitička aktivacija fibrinogena katalizirana je serinskom proteazom – enzimom trombinom. On katalizira uklanjanje 16 aminokiselinskih ostataka iz amino kraja peptida svake  $\alpha$  podjedinice i 14 aminokiselinskih ostataka iz amino kraja peptida svake  $\beta$  podjedinice. Novonastali amino-krajevi  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice dolaze na karboksilni kraj  $\gamma$  i  $\beta$  podjedinice drugog fibrinskog proteina. Fibrin se tako polimerizira kako bi stvorio ugrušak. Aktivacija fibrinogena je krajnja točka u mehanizmu nastanka krvnih ugrušaka koji se naziva kaskadom zgrušavanja krvi (slika 3). Kaskada je isprepletana dvama putevima – intrinzičnim (unutrašnjim) i ekstrinzičnim (vanjskim). Sve komponente intrinzičnog puta nalaze se u krvnoj plazmi za razliku od ekstrinzičnog puta čija se glavna komponenta ne nalazi u krvi.<sup>6</sup>

Zgrušavanje krvi započinje na mjestu rane aktiviranjem cirkulirajućih trombocita – staničnih fragmenata koji nemaju jezgru. Oštećenje tkiva uzrokuje da molekule kolagena, prisutne ispod epitelnog staničnog sloja, postaju izložene krvi. Aktivacija cirkulirajućih trombocita je primarno potaknuta interakcijom s tim molekulama kolagena te ona dovodi do pojave anionskih fosfolipida na površini svakog trombocita i do otpuštanja signalnih molekula kao što su tromboksani. Aktivirani trombociti agregiraju na mjestu rane stvarajući labavi ugrušak za čiju stabilizaciju je potreban fibrin, koji se stvara kaskadom zgrušavanja.<sup>6</sup>



Slika 3. Kaskada zgrušavanja krvi. Plavom bojom prikazane su aktivne serinske proteaze, zelene strelice označuju aktivacijske korake, a crvene inhibicijske procese. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>6</sup>

Vanjski put kaskade počinje tako da se oštećenjem tkiva krvna plazma izlaže regulatornom proteinu – *tkivnom faktoru* (TF) ugrađenom u membrane fibroblasta i glatkih mišićnih stanica ispod endotelnog sloja. Početni kompleks stvara se između proteina TF i faktora VII –

zimogena serinske proteaze prisutnog u krvnoj plazmi. Faktor VII se pretvara u svoj aktivni oblik, faktor VIIa, proteolitičkim cijepanjem koje vrši faktor Xa. Kompleks TF-VIIa zatim cijepa faktor X stvarajući aktivni oblik - faktor Xa. Ovaj proces je moguć zato što u krvi uvijek postoji mala količina faktora VIIa dovoljna da stvori malu količinu aktivnog kompleksa VIIa-TF neposredno nakon oštećenja tkiva. To omogućava stvaranje faktora Xa i uspostavlja pokretanje povratne petlje. Kada se razina faktora Xa počne povećavati, on u kompleksu sa faktorom Va cijepa protrombin pri čemu nastaje trombin, koji zatim cijepa fibrinogen.<sup>6</sup>

Kompleks TF-VIIa ne ostaje dugo aktivan. Inhibira ga protein *inhibitor puta tkivnog faktora* (TFPI), no zgrušavanje krvi ostaje neprekinuto aktiviranjem komponenti unutarnjeg puta kaskade. Faktor IX se djelovanjem TF-VIIa proteaze prevodi u aktivnu serinsku proteazu – faktor IXa. Zatim, faktor IXa u kompleksu s regulatornim proteinom VIIIa proteolitički pretvara faktor X u Xa. Aktivirani IXa može nastati i djelovanjem faktora XIa, koji nastaje cijepanjem faktora XI trombinom.<sup>6</sup>

Regulacija zgrušavanja krvi vrlo je bitna jer nekontrolirano zgrušavanje krvi može dovesti do začepjenja krvnih žila, uzrokujući srčani ili moždani udar. Kada se stvori ugrušak, regulatorni putevi ograničavaju vrijeme tijekom kojeg je koagulacijska kaskada aktivna. Trombin, osim što cijepa fibrinogen, formira kompleks sa proteinom trombomodulinom. Taj kompleks cijepa serinsku proteazu, protein C. Aktivirani protein C u kompleksu s regulatornim proteinom S cijepa i inaktivira faktore Va i VIIIa. Time dolazi do gašenja cjelokupne kaskade. Inhibitor serinskih proteaza, protein *antitrombin III* (ATIII) radi kovalentni 1:1 kompleks između argininskog kraja na proteinu ATIII i serinskog kraja serinskih proteaza aktivnog mjesta (pretežno trombina i faktora Xa). Dva regulacijska puta unutar kaskade u suradnji sa TFPI pomažu u održavanju praga ili razine izlaganja proteinu TF potrebnog za aktivaciju kaskade. Osobe s genetskim defektima koji mogu ukloniti ili smanjiti razinu proteina C ili proteina ATIII u krvi imaju povišeni rizik od tromboze.<sup>6</sup>

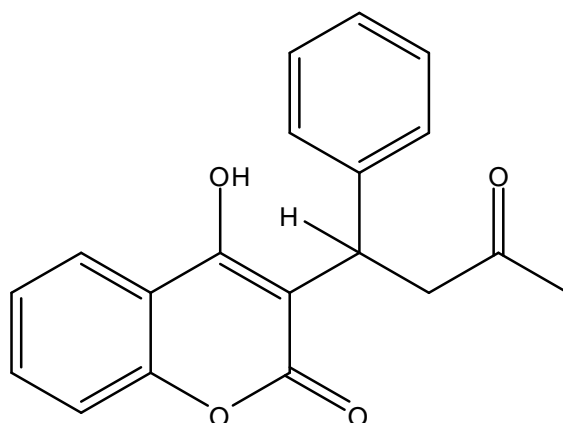
U ovom radu bit će obrađena kemijska svojstva varfarina uz osvrt na njegovu kliničku primjenu kao antikoagulansa te će biti prikazani neki od mogućih načina sinteze varfarina – sinteza racemata i tri asimetrične sinteze.



## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Svojstva varfarina

Varfarin, spoj kemijske formule  $C_{19}H_{16}O_4$ , organska je molekula koja pripada skupini kumarina – derivat je 4-hidroksikumarina (slika 4). Sustavno ime mu je 4-hidroksi-3-(3-okso-1-fenilbutil)-2H-kromen-2-on.



Slika 4. Strukturna formula varfarina

Koristi se u medicini kao oralni antikoagulans te se najčešće koristi za: liječenje tromboze dubokih vena (krvni ugrušci u venama donjih udova) i plućne embolije (krvni ugrušci u plućnim arterijama), sprječavanje stvaranja krvnih ugrušaka tijekom srčane aritmije, sprječavanje stvaranja ili ponovne pojave krvnih ugrušaka nakon infarkta miokarda i za sprječavanje stvaranja krvnih ugrušaka nakon zamjene srčanih zalistaka. Dolazi u formi tableta koje su po sastavu natrijev varfarinat. Na hrvatskom tržištu su to Martefarin tablete od 3 ili 5 mg djelatne tvari po tableti. Tableta od 3 mg je svijetloplave boje s oznakom „ORN 17“, dok je tableta od 5 mg ružičasta s oznakom „ORN 18“.<sup>7</sup> Potrebna doza određuje se mjerenjem protrombinskog vremena – to je vrijeme potrebno da plazma stvori ugrušak nakon dodatka tkivnog faktora i fosfolipida. Izmjereni protrombinski vrijeme stavi se u omjer s referentnim te se time dobi IRN (internacionalni normalizirani omjer). Tijekom početka terapije, IRN se kontrolira češće, do postizanja njegove ciljane vrijednosti od oko dva. Ciljna vrijednost postiže se unutar četiri do pet dana nakon početka terapije. Nakon toga IRN se



održava u ciljanom rasponu. Ako su vrijednosti IRN manje od ciljnog raspona potrebno je povišenje doze, a ako su IRN vrijednosti veće od ciljnog raspona potrebno je smanjenje doze.<sup>8</sup>

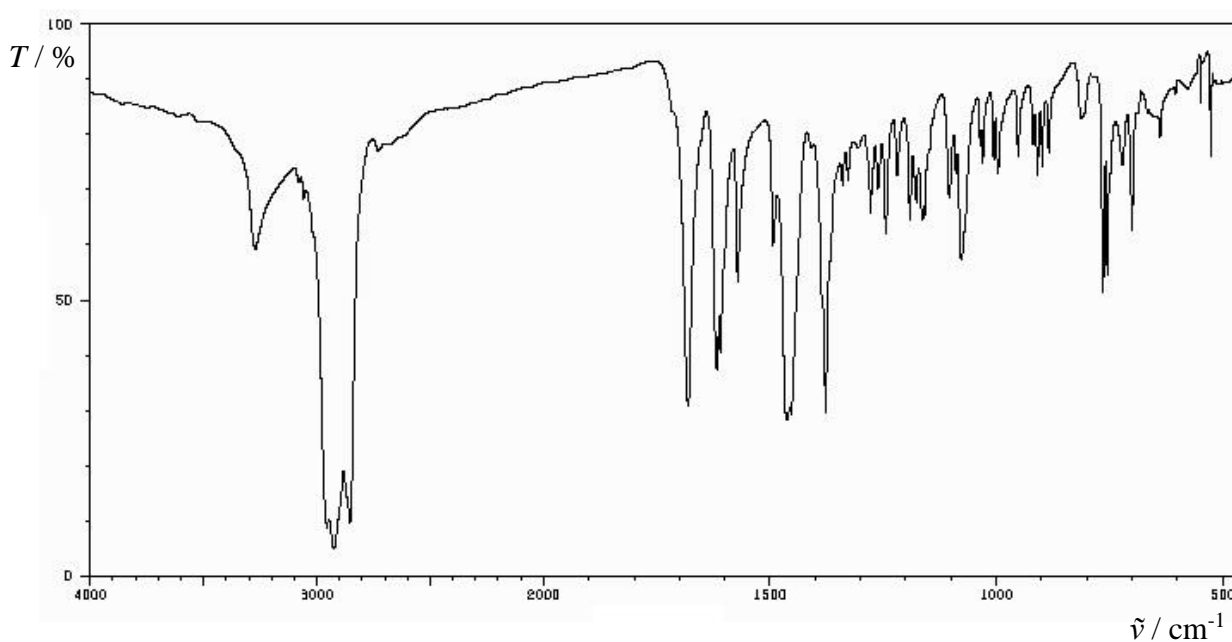
### 2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva

Varfarin je bezbojna krutina, bez okusa i mirisa. Tali se pri 161 °C. Dobro je topljiv u acetonu i dioksanu, a djelomično topljiv u metanolu, etanolu i izopropanolu. Netopljiv je u benzenu i cikloheksanu. Neka od fizikalno-kemijskih svojstava varfarina navedena su u tablici 1.<sup>9</sup>

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva varfarina.<sup>9</sup>

Svojstvo	Vrijednost
Molekularna masa / g mol <sup>-1</sup>	308,333
Broj donora vodikove veze	1
Broj akceptora vodikove veze	4
Broj rotirajućih veza	4
Područje polarne površine / A <sup>2</sup>	63,6
log <i>P</i>	2,70
p <i>K</i> <sub>a</sub>	5,08

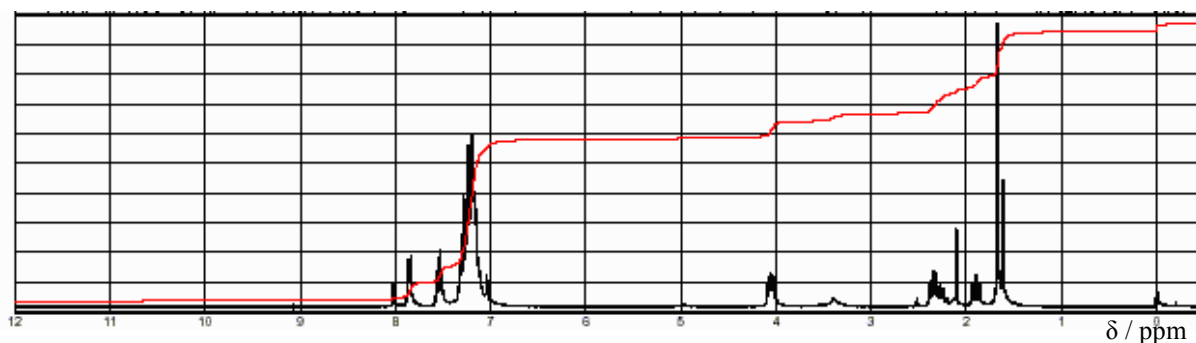
Infracrveni spektar varfarina prikazan je na slici 5.<sup>10</sup>



Slika 5. Infracrveni spektar varfarina<sup>10</sup>

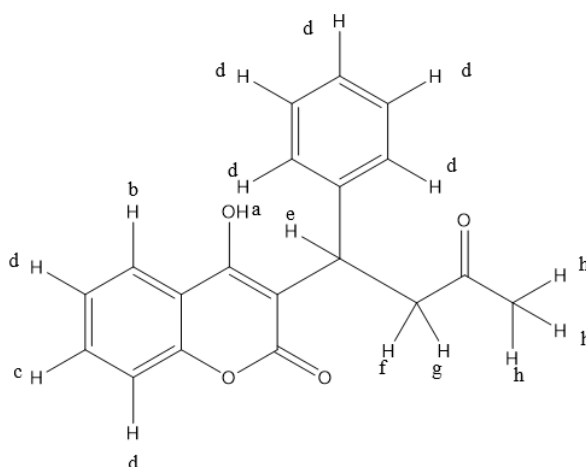
Vibracijska vrpca koja se pojavljuje pri  $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$  odgovara vibracijama istezanja hidroksilne skupine. Vrpca malog intenziteta pri  $3050\text{ cm}^{-1}$  upućuje na istezanje C-H veze aromatskog sustava, dok vrpca jakog intenziteta od  $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$  odgovara istezanju C-H veze alifatskog sustava. Pri  $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$  pojavljuje se karakteristična vibracijska vrpca koja odgovara istezanju karbonilne skupine. Postojanje vibracijskih vrpca pri  $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$  i  $1450\text{ cm}^{-1}$  posljedica je C=C istezanja aromatskog sustava.

$^1\text{H}$  NMR spektar varfarina prikazan je na slici 6. Spektar je ponešto kompliciran zbog tautomerije, zato što varfarin postoji u brzom ravnoteži s diastereomernim hemiketalom. Varfarin ima devet aromatskih protona čiji se signali nalaze na kemijskom pomaku između 7 i 8 ppm. Osim aromatskih protona postoji šest protona na bočnom lancu – protoni metilne skupine ( $\text{CH}_3$ ), dvije vrste protona metilenske skupine ( $\text{CH}_2$ ) i proton metinske skupine ( $\text{CH}$ ). Uz te protone varfarin posjeduje i proton hidroksilne skupine čiji je kemijski pomak iznad 9 ppm.



Slika 6.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ ) spektar varfarina<sup>10</sup>

U tablici 2 dana je asignacija  $^1\text{H}$  NMR spektra keto vrste varfarina (slika 7).



Slika 7. Varfarin s oznakama korištenim u asignaciji  $^1\text{H}$  NMR spektra

Tablica 2. Asignacija  $^1\text{H}$  NMR kemijskih pomaka varfarina<sup>11</sup>

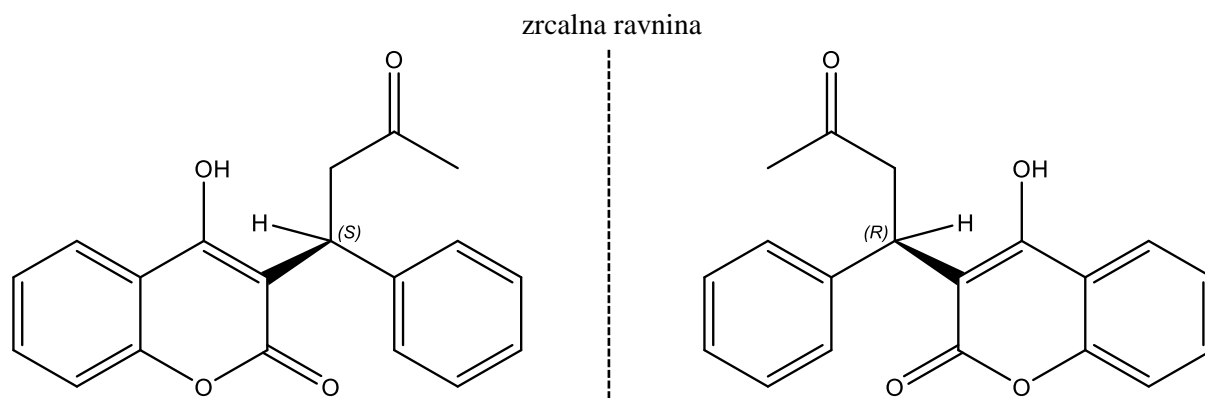
$\delta$ / ppm	Multipletnost i intenzitet	H-atom
9,52	s, 1H	H <sub>a</sub>
7,93	dd, 1H	H <sub>b</sub>
7,60 - 7,42	m, 1H	H <sub>c</sub>
7,35 - 7,15	m, 7H	H <sub>d</sub>
4,71	dd, 1H	H <sub>e</sub>
3,83	dd, 1H	H <sub>f</sub>
3,31	dd, 1H	H <sub>g</sub>
1,67	s, 3H	H <sub>h</sub>

Ostali signali vidljivi u spektru odgovaraju dijastereomernom hemiketalu.

### 2.1.2. Stereokemija

Molekule koje se međusobno odnose kao predmet i njegova zrcalna slika nazivaju se enantiomerima. Lijeva i desna ruka ne mogu se preklopiti jedna preko druge te za njih kažemo da su kiralne (grč. *cheir* = ruka). Enantiomeri se odnose jedan prema drugom kao desna i lijeva ruka pa se nazivaju kiralnim molekulama. Kiralnost je posljedica asimetrije – odsutnosti bilo kojeg od elementa simetrije (osi simetrije, ravnine simetrije ili centra simetrije). Molekula koja sadrži jedan ugljikov atom na koji su vezane četiri različite skupine kiralna je, jer nema ravninu simetrije, a takav ugljikov atom naziva se kiralnim centrom ili asimetričnim ugljikom. Enantiomeri se razlikuju u prostornom rasporedu skupina vezanih na kiralni centar, a mogu biti *R*- ili *S*-, što se određuje primjenom CIP (Chan-Ingold-Prelog) pravila prioriteta. Smjesa koja sadrži jednaku količinu enantiomera naziva se racemat. Takva smjesa nije optički aktivna, budući da svaki enantiomer zakreće ravninu polariziranog svjetla za isti iznos, ali u suprotnom smjeru.<sup>12</sup>

Varfarin je kiralna molekula, sadrži jedan asimetrični ugljikov atom, a odgovarajući enantiomeri su *R*- i *S*-varfarin (slika 8). Oni imaju slična fizikalna svojstva, ali zakreću ravninu linearno polariziranog svjetla za jednak kut u suprotnim smjerovima. Oba izomera vrše svoj antikoagulacijski učinak inhibiranjem istog ciljnog receptora, no pokazuju različitu farmakokinetiku te ih metaboliziraju različiti enzimi.



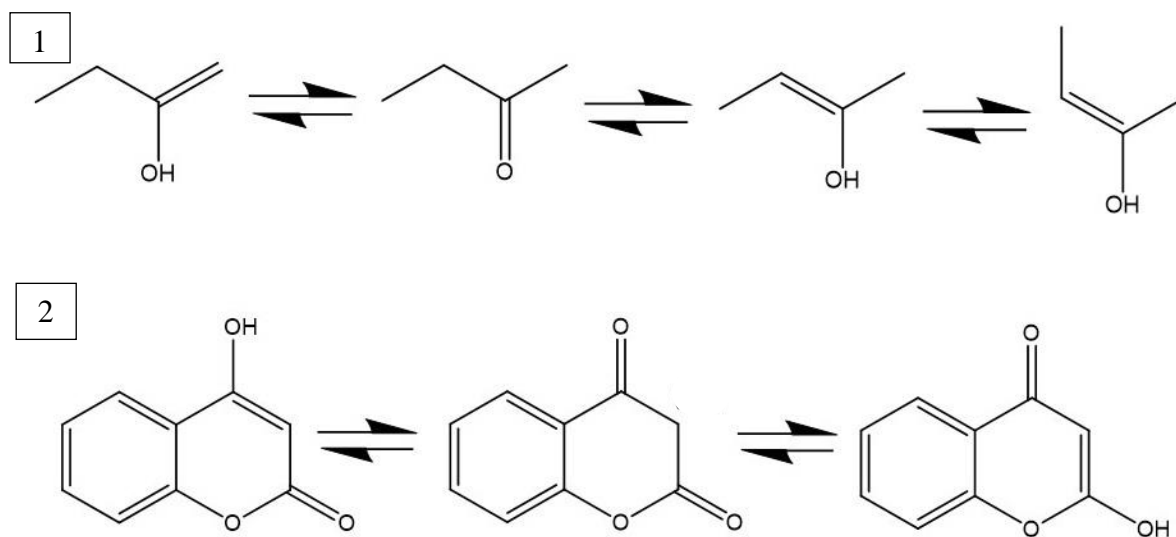
Slika 8. Enantiomeri varfarina

### 2.1.3. Tautomerni oblici varfarina

Tautomerizacija je proces premještanja vodikovog atoma s jednog položaja u molekuli na drugi uz istodobno premještanje dvostruke veze. Pojava da se neka molekula javlja u dva ili više tautomernih oblika naziva se tautomerija.<sup>13a</sup> Tautomeri su vrsta konstitucijskih izomera koji imaju istu molekularnu formulu, a razičitu konektivnost. Molekule koje podliježu tautomerizaciji imaju sposobnost prilagodbe okruženju, a na tautomernu ravnotežu utječu pH, temperatura, otapalo i okruženje (npr. unutar lipidnog dvosloja, proteina, micle i slično). Tautomeri se razlikuju u svojim fizikalno-kemijskim svojstvima.

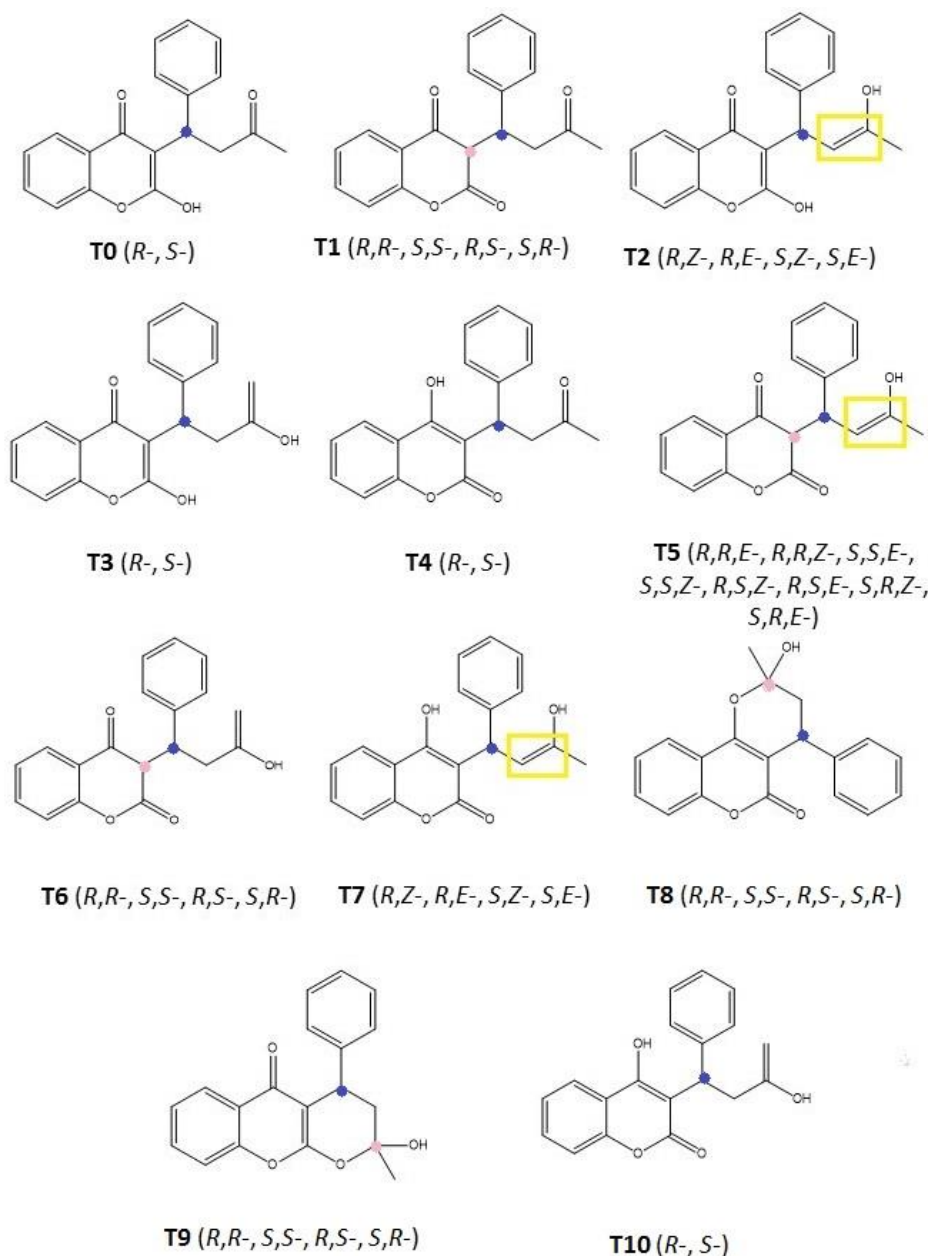
Varfarin u otopini može postojati u 40 različitih tautomernih oblika. On podliježe tautomerizaciji u kojoj dolazi do intramolekulskog premještanja vodikovog atoma s jednog položaja na drugi i tautomerizaciji u kojoj je premještanje vodikovog atoma praćeno otvaranjem ili zatvaranjem prstena. Tautomere varfarina možemo podjeliti na tautomere otvorenog i tautomere zatvorenog oblika. Tautomeri otvorenog oblika jesu oni kod kojih postoji bočni lanac, a zatvorenog oblika su oni kod kojih dolazi do intramolekularne ciklizacije, tj do zatvaranja bočnog lanca u prsten. Tautomeri otvorenog oblika, koji sadrže keto skupinu na bočnom lancu i  $\beta$ -keto laktonsku skupinu na izokromenskoj jezgri, podliježu keto-enolnoj tautomeriji. Obje skupine mogu postojati u bilo kojoj od tri tautomerne forme prikazane na slici 9. Pošto jedna od tautomernih formi  $\beta$ -keto laktonske skupine posjeduje kiralni centar, zapravo postoje četiri forme te pošto enolna forma bočnog lanca, kod koje je

terminalna skupina metilna, može imati *E*- i *Z*- konfiguraciju i tu zapravo postoje četiri forme.<sup>14</sup>



Slika 9. Tautomerizacija keto skupine bočnog lanca varfarina (1) i  $\beta$ -keto laktonske skupine varfarina (2)

Kombinacijom mogućih tautomernih formi keto skupine bočnog lanca i  $\beta$ -keto laktonske skupine dobiva se ukupno 32 tautomera otvorenog lanca. Ostalih 8 od 40 tautomera su tautomeri zatvorenog lanca. Zatvaranjem prstena nastaje novi kiralni centar koji ima dva moguća dijastereoizomera za svaki oblik cikličkog hemiketala. Na slici 10 prikazano je svih 40 tautomera varfarina. Tautomeri T8 i T9 su tautomeri zatvorenog oblika, a svi ostali su tautomeri otvorenog oblika. Računom provedenim na B32LYP / 6-311++G(d,p) razini teorije dobiveno je da je najstabilniji tautomer u otopini tautomer zatvorenog oblika T8, a u vakuumu tautomer otvorenog oblika T4.<sup>14</sup>



Slika 10. Tautomerni oblici varfarina. U zagradama su napisani svi mogući stereoisomeri za pojedini tautomer. Kružićima su na strukturama označeni kiralni centri. Plavi kružić predstavlja *R*- ili *S*-enantiomer varfarina, a ružičasti kružić predstavlja ostale kiralne centre u tautomerima. Žutim pravokutnikom označena je dvostruka veza koja predstavlja *E*-,*Z*- izomeriju.

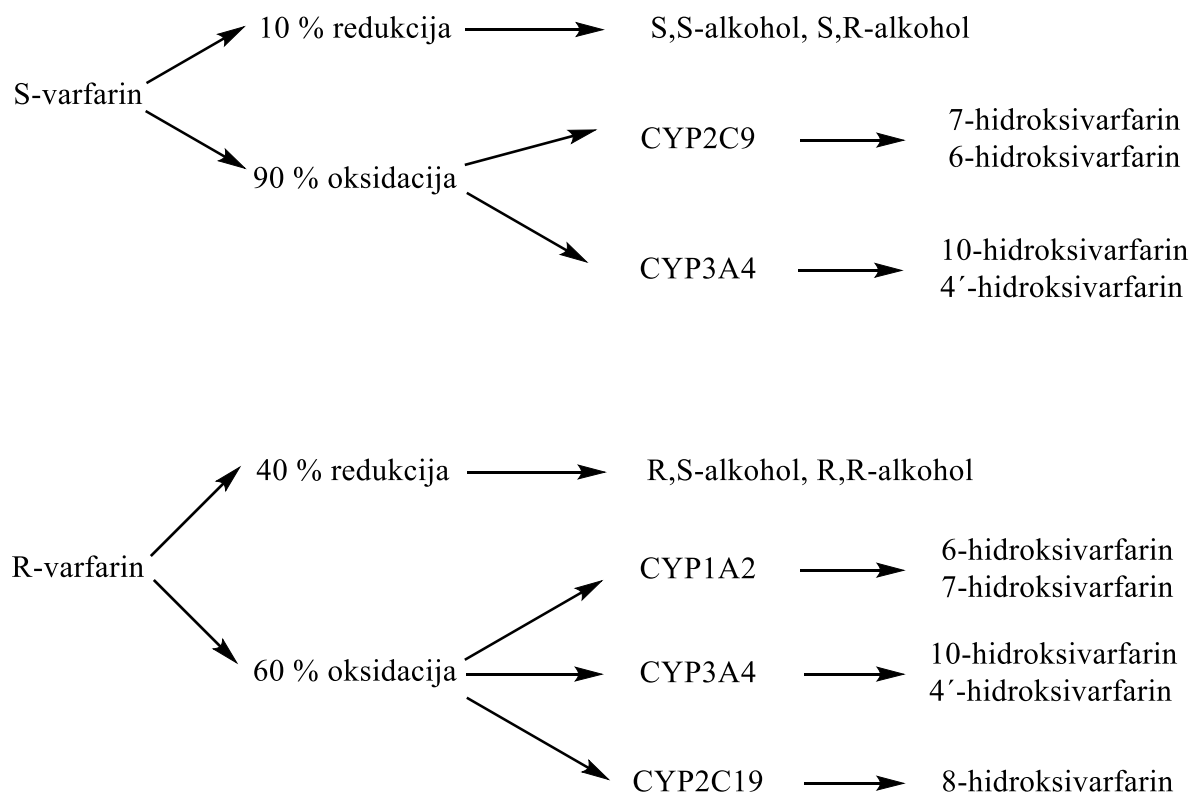
#### 2.1.4. Farmakokinetika i farmakodinamika

Sudbina lijeka u organizmu, apsorpcija, distribucija, vrijeme poluživota, prolaz kroz membrane, vezanje za proteine, putovi izmjene tvari i izlučivanje lijeka iz organizma svojstva

su koja proučava farmakokinetika, a mehanizmom djelovanja lijeka te biološkim i terapijskim učincima bavi se farmakodinamika.

Varfarin se klinički pripisuje kao racemat – smjesa *R*- i *S*- izomera u približno jednakom omjeru. Brzo se apsorbira iz želuca i tankog crijeva nakon oralne primjene, a najveću koncentraciju u krvi postiže za 90 minuta. Biodostupnost mu je gotovo 100%-tna, i oralna i intravenozna primjena imaju slična farmakokinetička svojstva. Enantiomeri varfarina se ne razlikuju u razini apsorpcije ni u biodostupnosti. Volumen distribucije, koji predstavlja odnos između količine lijeka u tijelu i koncentracije u krvnoj plazmi za enantiomere je sličan. Prosječna vrijednost za svaki enantiomer je  $0,15 \text{ L kg}^{-1}$ , a za racemični varfarin je od  $0,11$  do  $0,18 \text{ L kg}^{-1}$ . U krvi se veže na plazma proteine, pretežno albumin. Nakon vezanja je farmakološki aktivna samo preostala slobodna, tj. nevezana frakcija. Slobodna frakcija proporcionalno se povećava sa smanjenjem koncentracije albumina. Vrijednosti za slobodnu frakciju *S*-varfarina kreću se od  $0,29$  do  $0,82 \%$ , a za *R*-varfarin od  $0,26$  do  $0,96 \%$ .<sup>15</sup>

Varfarin se nakuplja u jetri gdje podliježe stereoselektivnom i regioselektivnom metabolizmu (slika 11). Enantiomere metabolizira jetreni enzim citokrom P450 u endoplazmatskom retikulumu jetrenih stanica.



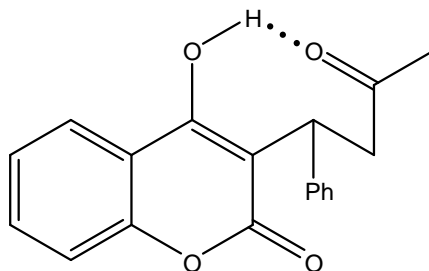
Slika 11. Stereoselektivan i regioselektivan metabolizam varfarina

Citokrom P450 pripada skupini enzima monooksigenaza, koje utječu na diferencijaciju, homeostazu i smrt stanice. Najčešće izoforme citokrom P450 enzima bitne za metabolizam lijeka su CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2 i CYP2C19. Stereoselektivan metabolizam moguć je jer varfarin posjeduje kiralni ugljikov atom, a regioselektivan metabolizam odnosi se na hidroksilirana mjesta u molekuli. *S*-Enantiomer se može oksidirati do 90 % djelovanjem dvaju enzimima – CYP2C9 i CYP3A4. Rezultat oksidacije enzimom CYP2C9 su produkti 7-hidroksivarfarin i 6-hidroksivarfarin u omjeru 3:1, dok su produkti oksidacije enzimom CYP3A4 10-hidroksivarfarin i 4'-hidroksivarfarin. Redukcijom *S*-enantiomera nastaje diastereomerni alkohol, koji pokazuje manju aktivnost. Za razliku od *S*-enantiomera, *R*- se može oksidirati 60 % djelovanjem triju enzima – CYP1A2, CYP3A4 i CYP2C19. Rezultat oksidacije enzimom CYP1A2 su primarno 6-hidroksivarfarin i manjim djelom 7-hidroksivarfarin, produkti oksidacije enzimom CYP3A4 su 10-hidroksivarfarin i 4'-hidroksivarfarin, a enzimom CYP2C19 8-hidroksivarfarin. *R*-Varfarin se najvećim djelom reducira do *R,S*-alkohola uz nastajanje male količine *R,R*-alkohola. Ovako nastali metaboliti izlučuju se mokraćom. *S*-Varfarin se izlučuje brže od *R*-varfarina zbog njihovog različitog vremena poluživota. Za *S*-varfarin prosječno vrijeme poluživota je 29 sati – interval od 18 do 52 sati, a za *R*-varfarin prosječno vrijeme poluživota je 45 sati – interval od 20 do 70 sati.<sup>15</sup>

Enantiomeri varfarina razlikuju se u svojoj potentnosti. *S*-Varfarin je 2,7 do 3,8 puta potentniji od *R*-varfarina. Razlika u potentnosti između enantiomera je uzrokovana njihovim različitim afinitetom prema enzimima koje inhibiraju – vitamin K epoksid reduktaza i vitamin K<sub>1</sub> reduktaza. *S*-Enantiomer jače inhibira enzim vitamin K epoksid reduktazu nego *R*-enantiomer, iako je u krvnoj plazmi prisutan u manjim koncentracijama.<sup>15</sup>

Razlika u aktivnosti enantiomera varfarina pripisuje se i steričkom utjecaju. Varfarin stvara intramolekularnu vodikovu vezu (slika 12) između karbonilne skupine bočnog lanca i 4-hidroksilne skupine izokromenske jezgre. Formiranjem intramolekularne vodikove veze varfarin se dovodi u povoljnu konfiguraciju za vezanje u aktivno mjesto enzima, što igra ulogu u biološkoj aktivnosti. Oba enantiomera mogu stvarati intramolekularnu vodikovu vezu, ali vezanje *S*-enantiomera u konformaciji s vodikovom vezom u aktivno mjesto enzima je povoljnije i manje sterički ometano pa mu se stoga pripisuje veća antikoagulativna aktivnost.<sup>16</sup>





Slika 12. Intramolekularna vodikova veza u varfarinu

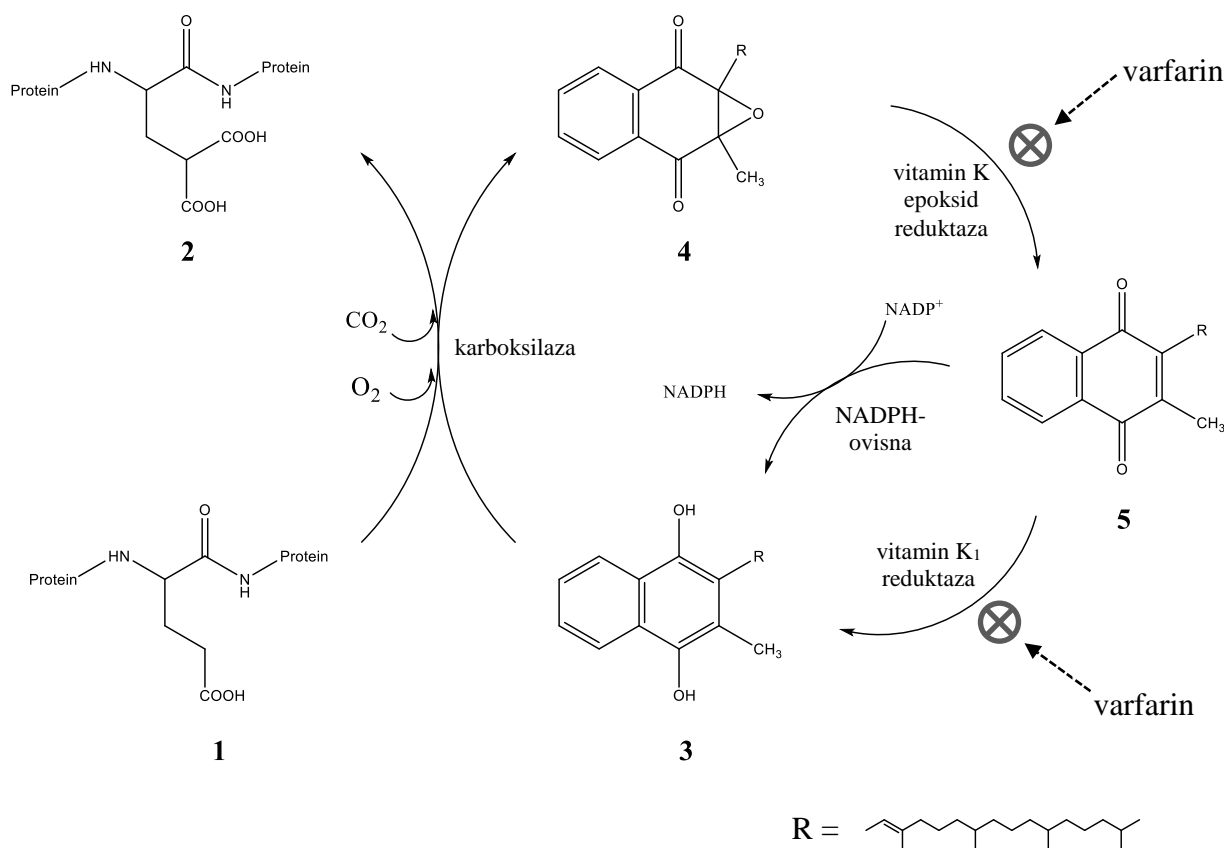
### 2.1.5. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja varfarina i drugih derivata kumarina, koji su poznati kao antagonisti vitamina K, temelji se na inhibiciji enzima vitamin K epoksid reduktaze i vitamin K<sub>1</sub> reduktaze, koji sudjeluju u ciklusu vitamina K važnog za sintezu faktora zgrušavanja II (protrombin), VII, IX i X. Vitamin K – antihemoragijski naftokinon porodica je od nekoliko vitamina (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>, K<sub>5</sub>, K<sub>6</sub> i K<sub>7</sub>).<sup>17</sup> Najviše ga ima u tamnozelenom lisnatom povrću, a njegov deficit kod ljudi i životinja dovodi do krvarenja.

Sinteza faktora zgrušavanja II (protrombin), VII, IX i X, ovisnih o vitaminu K i antikoagulacijskih proteina C i S zahtjeva  $\gamma$ -karboksilaciju prekursora tih tvari. Taj je proces spregnut s oksidacijom vitamina K, a odvija se u jetri. Oksidirani vitamin K tijelo ne može ponovno upotrijebiti, zato ga reciklira redukcijom. Antagonisti vitamina K sprječavaju recikliranje vitamina K tako što blokiraju pretvorbu oksidiranog vitamina K natrag u reducirani oblik. Blokira se  $\gamma$ -karboksilacija proteina ovisnih o vitaminu K, a to rezultira sintezom proteina sa smanjenom aktivnosti.<sup>8</sup> Mehanizam djelovanja varfarina i ciklus vitamina K prikazan je na shemi 1. Reakcijom karboksiliranja ovisnom o vitaminu K prevode se glutamatni ostaci u amino-terminalnom području prekursora faktora zgrušavanja (1) u  $\gamma$ -karboksiglutamat (2). Za tu reakciju potrebni su kisik, ugljikov dioksid i reducirani oblik vitamina K – vitamin KH<sub>2</sub> (3). Reakcija je katalizirana specifičnom karboksilazom. U reakciji se vitamin KH<sub>2</sub> (3) oksidira u neaktivni oblik vitamina K – vitamin K 2,3-epoksid (4). Kako se vitamin K 2,3-epoksid (4) ne može ponovno upotrijebiti, jetra ga reducira vitamin K epoksid reduktazom do vitamina K (5), koji se reducira vitamin K<sub>1</sub> reduktazom i NADPH ovisnom reduktazom natrag do vitamina KH<sub>2</sub> (3).<sup>15</sup>

Faktori zgrušavanja II (protrombin), VII, IX i X te proteini C i S posjeduju vezna mjesta za Ca<sup>2+</sup> presudna za njihovu funkciju. Vezna mjesta za Ca<sup>2+</sup> nastaju karboksilacijom višestrukih glutamatnih ostataka u  $\gamma$ -karboksiglutamatne ostatke u amino-terminalnom

području faktora zgrušavanja. Vežanje  $\text{Ca}^{2+}$  povezuje faktore zgrušavanja i proteine s fosfolipidnom membranom oslobođenom iz krvnih stanica zbog ozlijede. Kod faktora II (protrombina) je vežanje na fosfolipidnu membranu bitno jer se tako protrombin dovodi u blizinu dvaju proteina koji kataliziraju njegovu pretvorbu u trombin. Aktivacijom faktora zgrušavanja odstranjuje se domena odgovorna za vežanje  $\text{Ca}^{2+}$  te se ioni oslobađaju s membrane. Oslobođeni trombin može hidrolizirati fibrinogen i ostale ciljne proteine, kao što je ranije navedeno u kaskadi zgrušavanja krvi.<sup>3</sup>



Shema 1. Mehanizam djelovanja varfarina i ciklus vitamina K. Varfarin inhibira vitamin K epoksid reduktazu i vitamin K<sub>1</sub> reduktazu.

Rezultat inhibicije enzima vitamin K epoksid reduktaze i vitamin K<sub>1</sub> reduktaze varfarinom je nakupljanje vitamin K 2,3-epoksida te smanjenje količine vitamina KH<sub>2</sub>. Time se inhibira aktivnost karboksilaze, što dovodi do gomilanja djelomično karboksiliranih ili nekarboksiliranih prekursora faktora zgrušavanja sa smanjenom aktivnosti.<sup>15</sup>

Mehanizam djelovanja varfarina ukazuje da varfarin ima zakašnjelo djelovanje. Potpuni učinak varfarina postiže se nakon što se faktori zgrušavanja ovisni o vitaminu K

metaboliziraju i izluče iz organizma prema njihovom vremenu poluživota navedenom u tablici 3. Zbog dugog vremena poluživota faktora zgrušavanja potrebno je i do nekoliko dana da se postigne maksimalan učinak varfarina. Prvi će biti potrošen faktor VII, koji ima najkraće vrijeme poluživota (4-6 h), a zadnji faktor II čije je vrijeme poluživota do 72 sata. Maksimalni učinak varfarina stoga se postiže u toku 36-72 sata.<sup>8</sup>

Tablica 3. Eliminacijsko vrijeme poluživota proteina ovisnih o vitaminu K

<b>Protein</b>	<b>Vrijeme poluživota / h</b>
Faktor II	42-72
Faktor VII	4-6
Faktor IX	21-30
Faktor X	27-48
Protein C	9
Protein S	60

#### 2.1.6. Interakcije varfarina s drugim lijekovima i s hranom i pićem

U skladu sa svojim farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima, varfarin može često stupiti u interakciju s drugim lijekovima, pa i s hranom i pićem. Iz tih je razloga važno pratiti terapiju varfarinom kod pacijenata. Do interakcija dolazi ako se istodobno primjenjuje više različitih lijekova. Primjenom više različitih lijekova može doći do utjecaja jednog lijeka na drugi, što dovodi do promjene učinkovitosti lijeka.<sup>15</sup>

Uzimanje drugih lijekova u terapiji varfarinom može povećati ili smanjiti njegov učinak. Lijekovi mogu utjecati tako da smanjuju protrombinsko vrijeme i povećavaju rizik od tromboembolije (krvnih ugrušaka) ili mogu utjecati tako da povećavaju protrombinsko vrijeme i povećavaju rizik od krvarenja. Lijekovi koji smanjuju protrombinsko vrijeme i povećavaju rizik od tromboembolije povećavaju sintezu faktora zgrušavanja krvi i smanjuju katabolizam faktora zgrušavanja, dok oni koji povećavaju protrombinsko vrijeme imaju obrnut učinak – smanjuje se sinteza, a povećava se katabolizam faktora zgrušavanja krvi.<sup>15</sup> Većina analgetika ne smije se uzimati istodobno uz varfarin, no za privremeno ublažavanje boli ili snižavanje povišene tjelesne temperature mogu se koristiti pripravci koji sadrže samo paracetamol.<sup>7</sup>

Na liječenje varfarinom utječe također i unos vitamina K. Potrebno je imati ustaljen unos hrane bogate vitaminom K. Sok ili neki drugi proizvodi od brusnice mogu pojačati učinak varfarina pa ih treba izbjegavati. Na djelotvornost varfarina utječe i pušenje.<sup>7</sup>

### 2.1.7. *Moguće nuspojave u terapiji varfarinom*

Terapija varfarinom može uzrokovati neke nuspojave, no one se neće javiti kod svakoga. Česte nuspojave mogu se javiti u manje od jedne na deset osoba. One su blago krvarenje (krvarenje iz nosa ili zubnog mesa, ili stvaranje modrica); također krv u urinu, crna ili krvava stolica, povećana ili produljena mjesečnica ili drugi oblici krvarenja. Mučnina, povraćanje, proljev.

Rijetke nuspojave su one koje mogu javiti u manje od jedne na tisuću osoba. Neke od njih su kumarinska nekroza i sindrom ljubičastog stopala – ljubičaste i bolne lezije kože stopala ili nožnih prstiju.

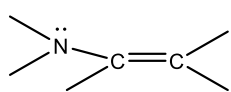
Nuspojave koje se mogu javiti u manje od jedne na deset tisuća osoba spadaju u vrlo rijetke, a neke od njih su reakcije preosjetljivosti koje se javljaju u obliku kožnog osipa, reverzibilno povišenje vrijednosti jetrenih enzima, žučna bol, razvoj vaskulitisa, reverzibilan gubitak kose, prijelaz, kalcifikacija traheja, kolesterolska embolija, nakupljanje kalcija u stjenkama krvnih žila, što vodi do progresivnih i bolnih kožnih čireva.<sup>7</sup>

## 2.2. **Sinteza racemata**

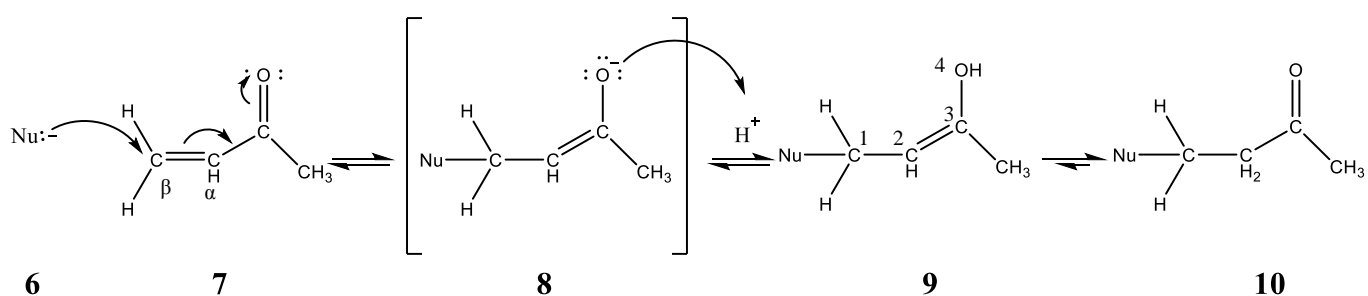
Varfarin je prvi put sintetiziran na Sveučilištu Winsconsin između 1940. i 1944. godine, za vrijeme istraživanja aktivnosti i strukture derivata kumarina. Tada je sintetizirano preko sto drugih derivata kumarina, koji su bili poredani po brojevima u manje grupe na temelju kemijske strukture. Ukupno je bilo sedam grupa i 106 sintetiziranih derivata, a varfarin je bio poznat kao derivat broj 42 u skupini 4-hidroksikumarina supstituiranih na položaju tri. Sintetiziran je Michaelovom reakcijom 4-hidroksikumarina i  $\alpha,\beta$ -nezasićenog ketona.<sup>18</sup>

Michaelova reakcija (Michaelova adicija) je reakcija 1,4-adicije (konjugirana adicija) rezonantno stabiliziranog karbaniona, ili sličnih vrsta (Michaelovih donora), na dvostruku vezu  $\alpha,\beta$ -nezasićenih karbonilnih spojeva ili na druge elektron-akceptorske skupine (Michaelove akceptore). Michaelovi donori daju par elektrona, a Michaelovi akceptori prihvaćaju par elektrona – neki od njih navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. Michaelovi donori i akceptori

Michaelovi donori	Michaelovi akceptori
$R_2Cu$ Lilitij dialkil kuprat	$H_2C=CH-C(=O)-H$ konjugirani aldehid
 enamin	$H_2C=CH-C(=O)-R$ konjugirani keton
$R-C(=O)-\overset{\ominus}{C}H-C(=O)-R'$ $\beta$ -diketon	$H_2C=CH-C(=O)-OR$ konjugirani ester
$R-C(=O)-\overset{\ominus}{C}H-C(=O)-OR'$ $\beta$ -ketoester	$H_2C=CH-C(=O)-NH_2$ konjugirani amid
$R-C(=O)-\overset{\ominus}{C}H-C\equiv N$ $\beta$ -ketonitril	$H_2C=CH-C\equiv N$ konjugirani nitril
$R-C(=O)-\overset{\ominus}{C}H-NO_2$ $\alpha$ -nitroketon	$H_2C=CH-NO_2$ nitroetilen

Ugljikov atom na  $\beta$  položaju  $\alpha,\beta$ -nezasićenog karbonilnog spoja dijeli parcijalno pozitivni naboj karbonilnog ugljikovog atoma preko rezonancije, što ga čini elektrofilnim. Mehanizam 1,4-adicije prikazan je na shemi 2.



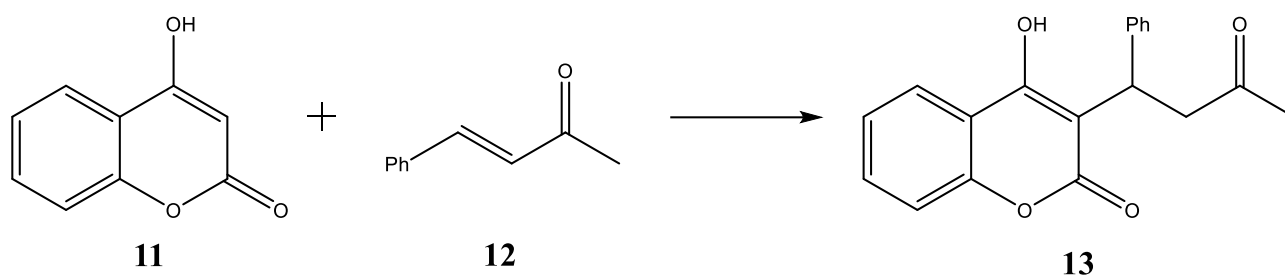
Shema 2. Mehanizam 1,4-adicije (Michaelove adicije)

Nukleofilnim napadom **6** na  $\alpha,\beta$ -nezasićeni karbonilni spoj **7** generira se rezonancijski stabiliziran enolatan anion **8**, a zatim dolazi do njegove protonacije i nastanka enola **9**, koji podliježe tautomerizaciji, pri čemu nastaje keto oblik **10**. Adicija se naziva 1,4-adicijom zato

što je prilikom nukleofilnog napada kisikov atom četvrti po redu od mjesta napada nukleofila. Reakcija se najčešće provodi u alkoholnom mediju uz kiseli ili bazni katalizator.<sup>13b</sup>

Reakcija Michaelove adicije čest je postupak u organskoj sintezi za tvorbu veze ugljik-ugljik, a primjenjuje se i kao prvi korak u Robinsonovoj anelaciji, koja vodi ka tvorbi kompleksnih cikličkih sustava u sintezi mnogih prirodnih spojeva.

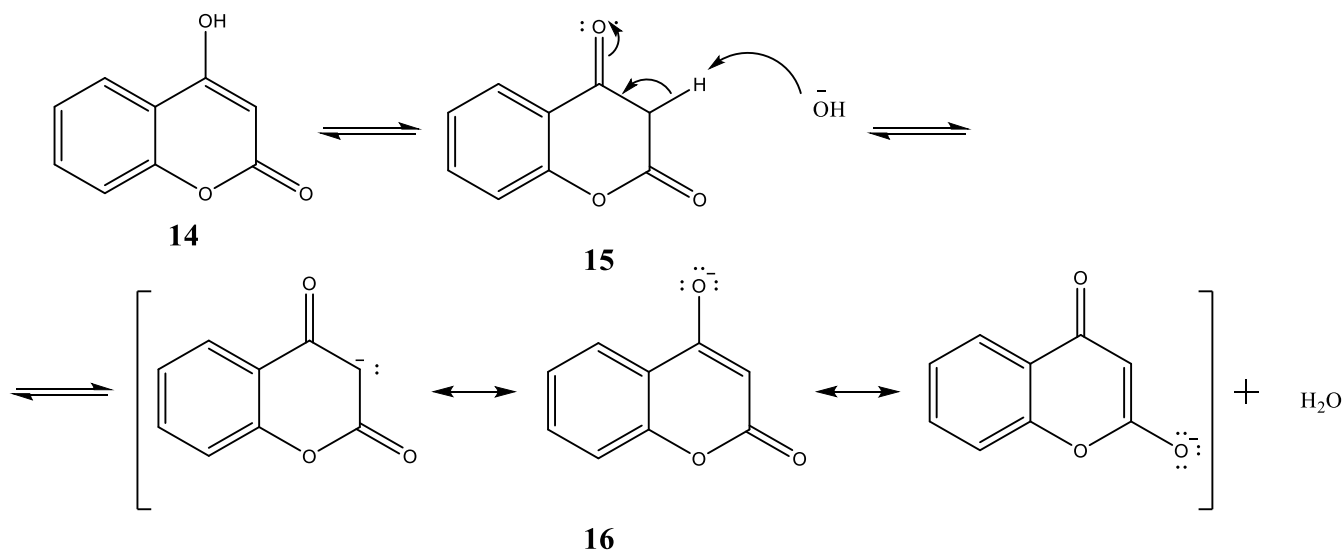
Michaelovom adicijom odvija se sinteza racemata varfarina prikazana shemom 3.



Shema 3. Sinteza racemata varfarina Michaelovom adicijom

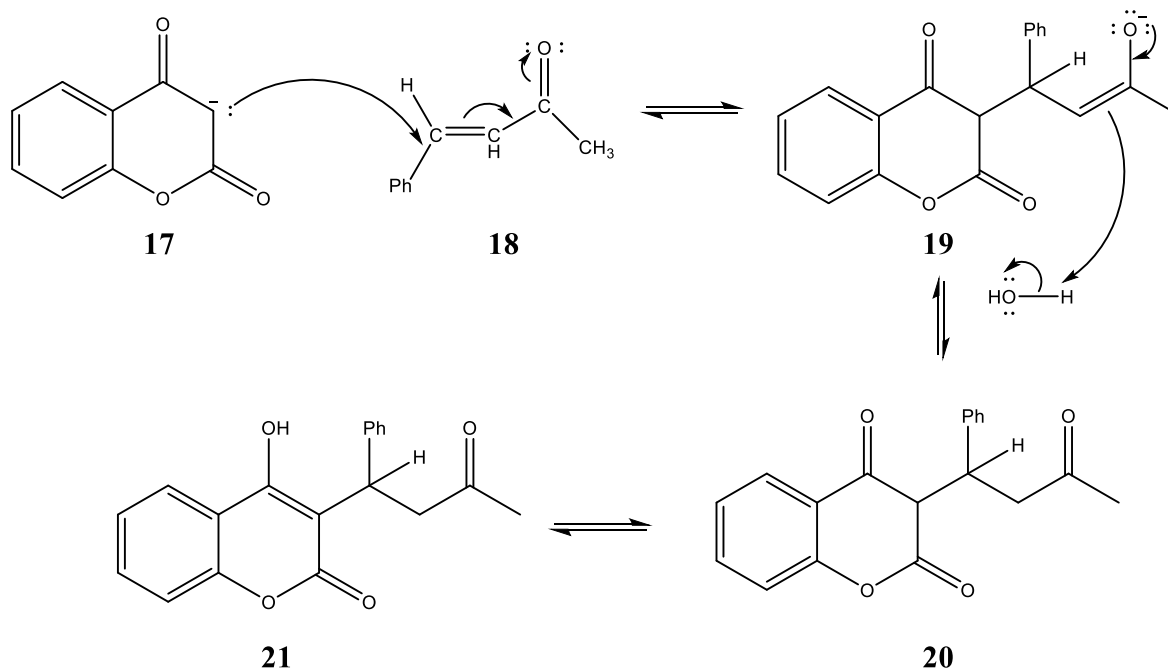
Reaktanti za sintezu racemata varfarina (**13**) su 4-hidroksikumarin (**11**) i 4-fenil-3-buten-2-on (**12**) – oni se pomiješaju u ekvimolarnim količinama te se zagrijavaju u vodi uz povrat dvanaest sati. Smjesa se zatim hladi dvanaest sati na 0 °C, pri čemu se dolazi do taloženja produkta. Vodena faza se oddekantira, a dobiveni talog prekrizalizira iz smjese acetona i vode. Tim je postupkom provedena prva sinteza varfarina te je njome dobiven varfarin u iskorištenju od 48 %.<sup>19</sup>

Da bi reakcija započela potrebno je generirati Michaelov donor, koji će nukleofilno napasti  $\beta$ -ugljikov atom spoja **12**. Michaelov donor generira se enolizacijom prikazanom na shemi 4. Najprije  $\beta$ -keto laktonska skupina 4-hidroksikumarina **14** tautomerizira u keto oblik **15**. Zatim se kiseli  $\alpha$ -vodikov atom spoja **15** odcjepljuje pomoću baze. Time se generira rezonancijski stabiliziran enolat-anion **16** – Michaelov donor za konjugiranu adiciju.



Shema 4. Generiranje Michaelovog donora

Nakon što je generiran Michaelov donor kreće konjugirana adicija, čiji je mehanizam prikazan na shemi 5. Michaelov donor, enolat-anion **17**, nukleofilno napada  $\beta$ -ugljikov atom 4-fenil-3-buten-2-ona (**18**) – Michaelov akceptor. Adicijski produkt **19** je rezonancijski stabiliziran enolat-anion. Protoniranjem nastaje spoj **20**, koji podliježe keto-enolnoj tautomerizaciji –  $\beta$ -keto laktonska skupina tautomerizira te nastaje konačni produkt sinteze – varfarin (**21**).



Shema 5. Mehanizam Michaelove adicije pri sintezi racemata varfarina

Veća iskorištenja reakcije, do 93 %, postižu se ako se 4-hidroksikumarin i 4-fenil-3-buten-2-on griju uz povrat u metanolu dvadeset sati uz dodatak klorovodične kiseline za hidrolizu.<sup>20</sup>

### 2.3. Asimetrična sinteza

Lijekovi se najčešće prepisuju kao racemati, no često je jedan enantiomer aktivniji od drugog pa se u farmaceutskoj industriji javio interes da lijekove koji su racemati zamjene čistim enantiomernim oblicima. Također, ako djelovanje oba enantiomera ne prouzrokuje isti efekt lijek se mora proizvoditi kao jedan enantiomer. Primjer za to je lijek talidomid, koji je početkom šezdesetih godina 20. stoljeća uzrokovao jednu od najvećih medicinskih katastrofa. Pripisivan je u formi racemata kao sedativ protiv mučnine kod trudnica. Njegovo korištenje uzrokovalo je rađanje velikog broja djece s prirođenim manama. Naime, *R*-enantiomer bio je lijek, a *S*-enantiomer je imao teratogena svojstva. Upravo je zato važno lijek moći proizvoditi kao jedan enantiomer. Jedan od načina kojim je moguće proizvoditi samo jedan enantiomer je asimetrična sinteza. Asimetrična ili enantioselektivna sinteza je kemijska reakcija kojom nastaju nejednake količine dvaju enantiomera. Racemat se može direktno pretvoriti u čisti enantiomer kiralom zamjenom – ako se neželjeni enantiomer selektivnom inverzijom pretvori u željeni, ili ako se racemat pretvori u prokiralnu molekulu u kojoj se kiralni centar može povratiti asimetričnom sintezom, koja će dati čisti enantiomer.<sup>21</sup>

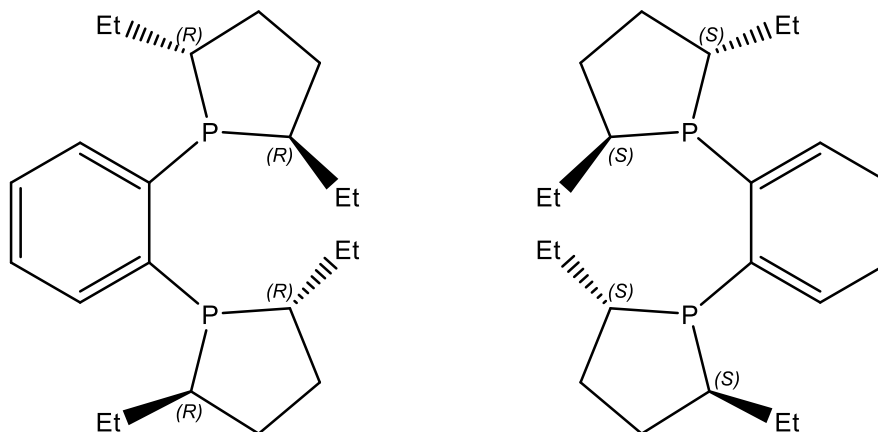
#### 2.3.1. Prva asimetrična sinteza varfarina – katalitičko asimetrično hidrogeniranje

Varfarin se klinički pripisuje kao racemat. Na tržištu je poznat pod brendom Coumadin – natrijev varfarinat, ali i mnogim drugim brendovima, kao na primjer Teva-Warfarin, Martefarin itd. Ovisno o jačini, tablete dolaze u različitim bojama, od 1 mg (roza boja) do 10 mg (bijela boja).

Farmaceutska američka tvrtka DuPont je devedesetih godina 20. stoljeća financirala istraživanje i razvoj novih liganada koji bi se mogli koristiti u asimetričnim sintezama. Ligandi su nazvani DuPhos ligandima, pripadaju organofosforim spojevima, a građeni su od dva fosfaciklopentanska prstena vezana na benzen. DuPhos ligandi su kiralni, posjeduju  $C_2$  simetriju te formiraju enantioselektivne katalizatore za hidrogeniranje. Glavnu ulogu igraju i pri asimetričnoj sintezi varfarina razvijenoj 1996. godine, koja se odvija katalitičkim

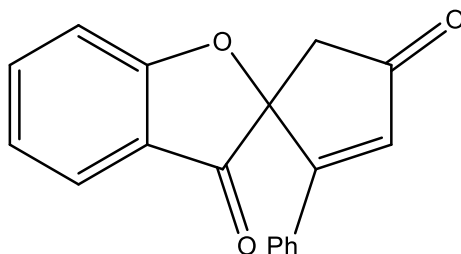


hidrogeniranjem pomoću kompleksa DuPhos-Rh(I). Na slici 13 prikazani su katalizatori za hidrogeniranje pri asimetričnoj sintezi varfarina.<sup>21</sup>



Slika 13. Katalizatori (*R,R*)-Et-DuPHOS i (*S,S*)-Et-DuPHOS

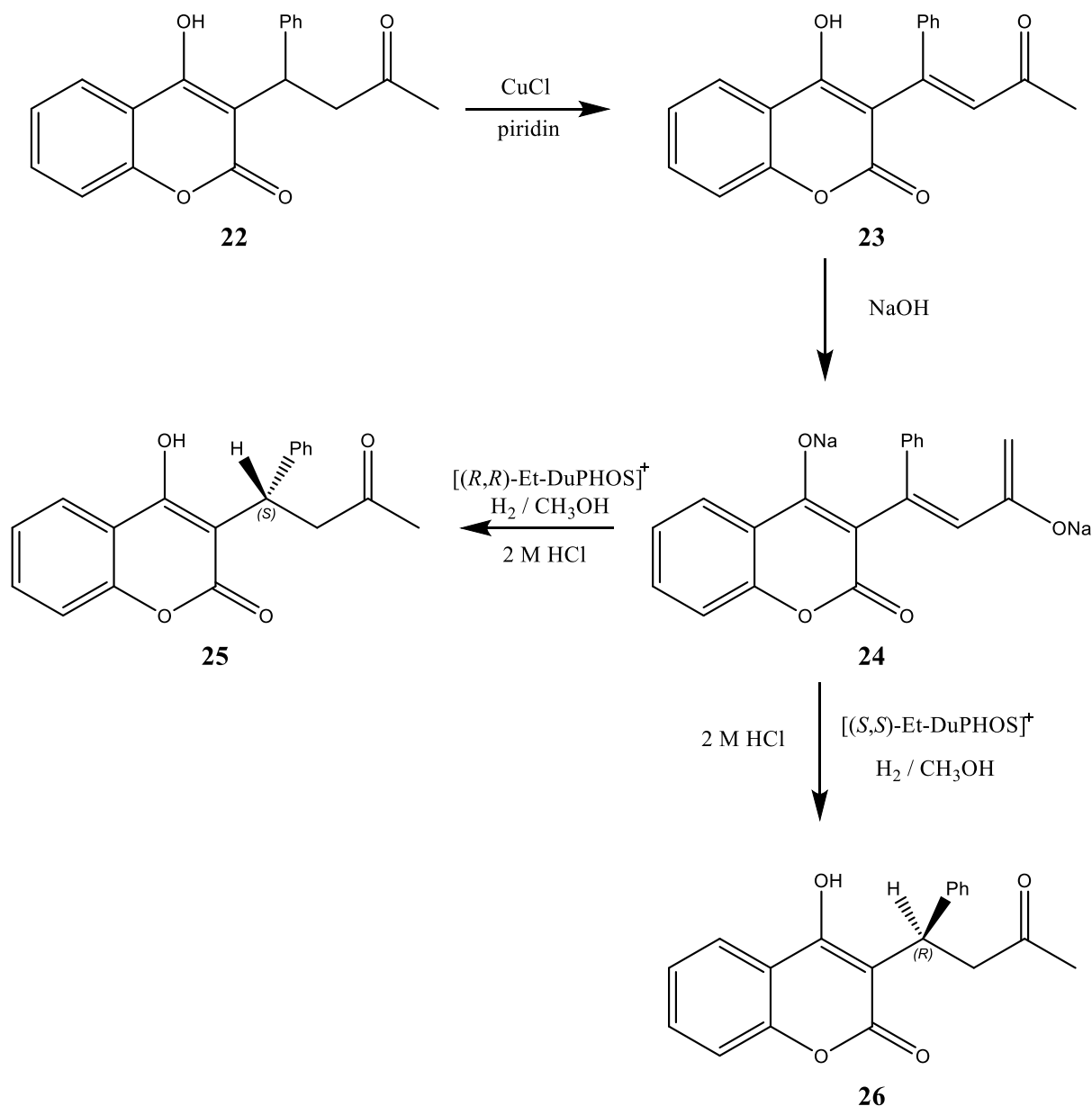
Ovom enantioselektivnom sintezom moguće je pripraviti *R*- ili *S*-enantiomer varfarina. Sinteza se bazira na kiralnoj zamjeni i provodi se u dva koraka reakcijom asimetričnog hidrogeniranja  $\alpha,\beta$ -nezasićenog bočnog lanca varfarina uz DuPhos-Rh(I) kao katalizator. Shematski prikaz sinteze prikazan je na shemi 6. Polazni materijal za sintezu je racemat varfarina (**22**). Spoj **22** oksidira se do dehidrovarfarina **23** oksidacijom u piridinu uz CuCl kao katalizator. Oksidacija se provodi kontinuiranim propuhivanjem zraka kroz reakcijsku smjesu tri do pet sati pri temperaturi od 55 do 60 °C. Reakciju oksidacije potrebno je pratiti kako ne bi nastao neželjeni nusprodukt – spiro benzofuranociklopenten (slika 14). On nastaje ako se spoj **23** produženo izlaže oksidaciji. Mehanizam oksidacije uključuje nastajanje reaktivnih vrsta Cu(III).<sup>21</sup>



Slika 14. Nusprodukt oksidacije – spiro benzofuranociklopenten

U sljedećem koraku se **23** prevede u natrijevu sol **24**, koja se hidrogenira uz [(*S,S*)-Et-DuPhos]<sup>+</sup> kao katalizator za dobivanje *R*-varfarina (**26**) ili uz [(*R,R*)-Et-DuPhos]<sup>+</sup>

kako bi se dobio *S*-varfarin (**25**). Hidrogeniranje se provodi u metanolu. *R*-Varfarin je dobiven u iskorištenju od 98 % i s enantiomernom čistoćom od 86 %, a *S*-varfarin u iskorištenju od 96 % i s enantiomernom čistoćom od 83 %. Enantiomerna čistoća veća je nakon prekrizalizacije iz acetona i vode te iznosi 98 % za oba enantiomera.<sup>21</sup>



Shema 6. Enantioselektivna sinteza varfarina katalitičkim asimetričnim hidrogeniranjem

Sinteza *S*-varfarina (**25**) može teći i tako da se hidrogenira spoj **23** u tetrahydrofuranu. Korištenjem tetrahydrofurana kao otapala izbjegava se ciklizacija spoja **23** u hemiketal, koja bi rezultirala nastajanjem nereaktivne dvostruke veze. Tada se koristi (*R,R*)-Me-DuPhos kao

katalizator, a *S*-varfarin se dobiva u iskorištenju od 98 % i s enantiomernom čistoćom od 70 %.<sup>21</sup>

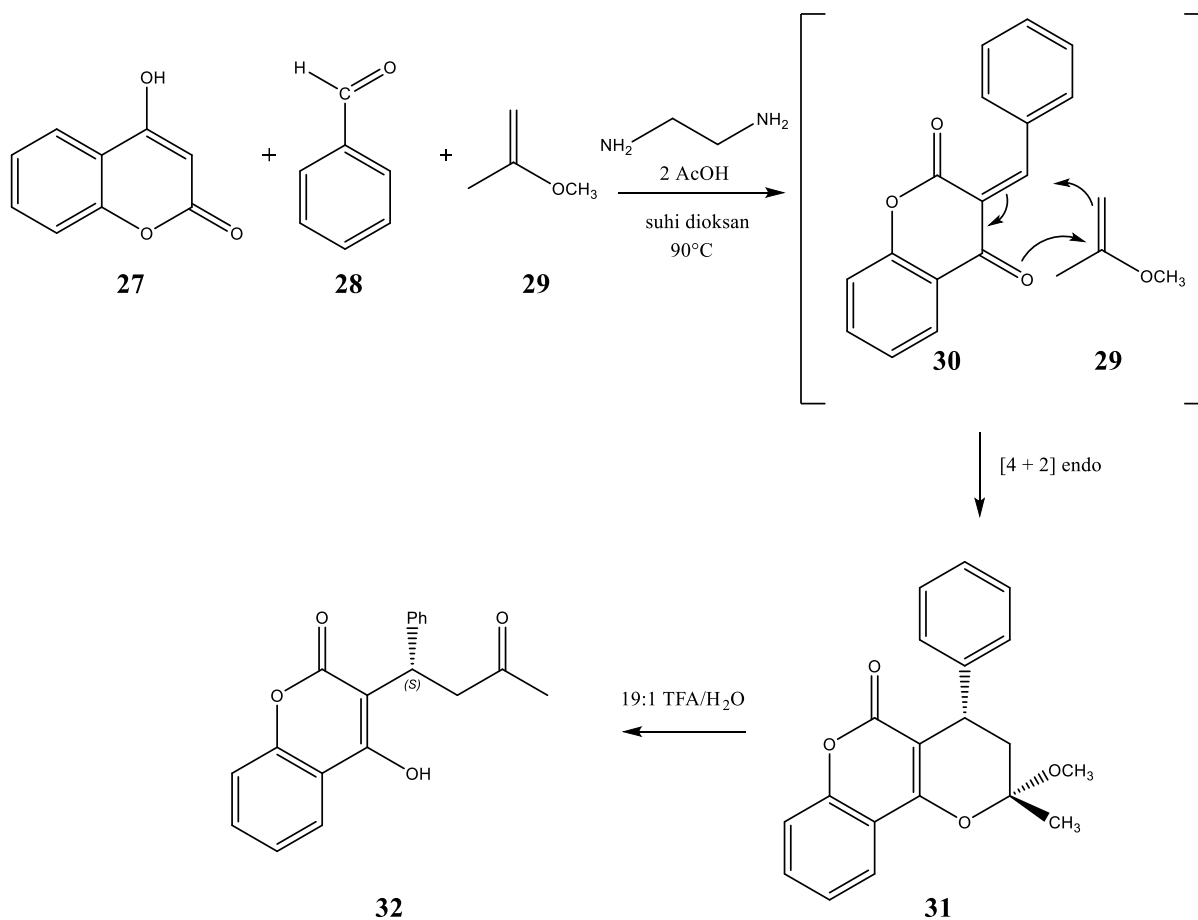
### 2.3.2. Asimetrična sinteza varfarina Diels-Alderovom reakcijom

Asimetrična sinteza Diels-Alderovom reakcijom još je jedan od primjera kako dobiti samo *R*- ili *S*-varfarin. Ova sinteza razvijena je 2001. godine, a polazi od tri reaktanta. Diels-Alderovom reakcijom između dvije komponente dolazi do nastanka *S*-varfarina.<sup>22</sup>

Diels-Alderova reakcija je reakcija ciklizacije jednog ili više nezasićenih spojeva. Pripada skupini pericikličkih reakcija. U reakciji dolazi do tvorbe prstena u jednom stupnju na usklađeni način (ili prividno usklađeni). Do tvorbe prstena dolazi interakcijom četiri  $\pi$ -elektrona diena sa dva  $\pi$ -elektrona dienofila pa se reakcija naziva i [4 + 2]-cikloadicijom. Nezasićeni spojevi mogu imati dvostruke ili trostruke veze ugljik-ugljik ili ugljik-heteroatom. Diels-Alderove reakcije imaju tri važna stereokemijska obilježja: dien mora imati *s-cis* prostorno usmjerenje, *syn*-stereokemija i endo pravilo. Kada bi dien imao *s-trans* prostorno usmjerenje p-orbitale bile bi preudaljene od p-orbitala dienofila pa ne bi došlo do preklapanja. Diels-Alderova reakcija je *syn*-adicija te se odvija stereospecifično na jednoj strani dienofila. Endo pravilo govori kako će se elektron-odvlačeći supstituenti pojaviti u endo-položaju. Ove reakcije uglavnom daju endo-produnkte. Kemičari Otto Diels i Kurt Alder za svoj su rad na cikloadicijskim reakcijama 1950. godine dobili Nobelovu nagradu za kemiju.<sup>13c</sup>

Reakcijska shema enantioselektivne sinteze *S*-varfarina prikazana je na shemi 7. Polazni supstrati za asimetričnu sintezu Diels-Alderovom reakcijom su 4-hidroksikumarin (**27**), benzaldehid (**28**) i 2-metoksipropen (**29**). Spojevi **27** i **28** kondenziraju se Knoevenagelovom reakcijom dajući 3-benzilidenkroman-2,4-dion (**30**). Reakcija se provodi četiri sata u suhom dioksanu uz etilendiamin i octenu kiselinu kao katalizator pri 90 °C te molekularna sita od 5 Å. Knoevenagelova reakcija provodi se u dva koraka. Najprije se pomoću etilendiamina generira enolat-anion. Octena kiselina pri tome služi za neutralizaciju i za sprječavanje enolizacije benzaldehida. Generirani enolat-anion spoja **27** nukleofilno napada spoj **28**. Zatim dehidratacijom nastaje nezasićeni spoj **30**, koji ima 4  $\pi$ -elektrona te je on u Diels-Alderovoj reakciji dien i stupa u reakciju s dienofilom **29**, koji ima 2  $\pi$ -elektrona. Tri strelice pokazuju usklađeni pomak tri elektronska para. Dien **30** i dienofil **29** u reakciji stvaraju novi šesteročlani prsten. Terminalne dvostruke veze diena formirale su nove veze na krajevima dienofila, a središnja jednostruka veza diena postala je dvostruka. Također je dvostruka veza dienofila postala jednostruka. Keto-skupina u Diels-Alderovom produktu **31**

je u obliku cikličkog acetala, koji se hidrolizira sa smjesom trifluoroctene kiseline i vode u omjeru 19:1 dajući *S*-varfarin **32**. Time se uklanja novonastali kiralni centar iz spoja **31**.



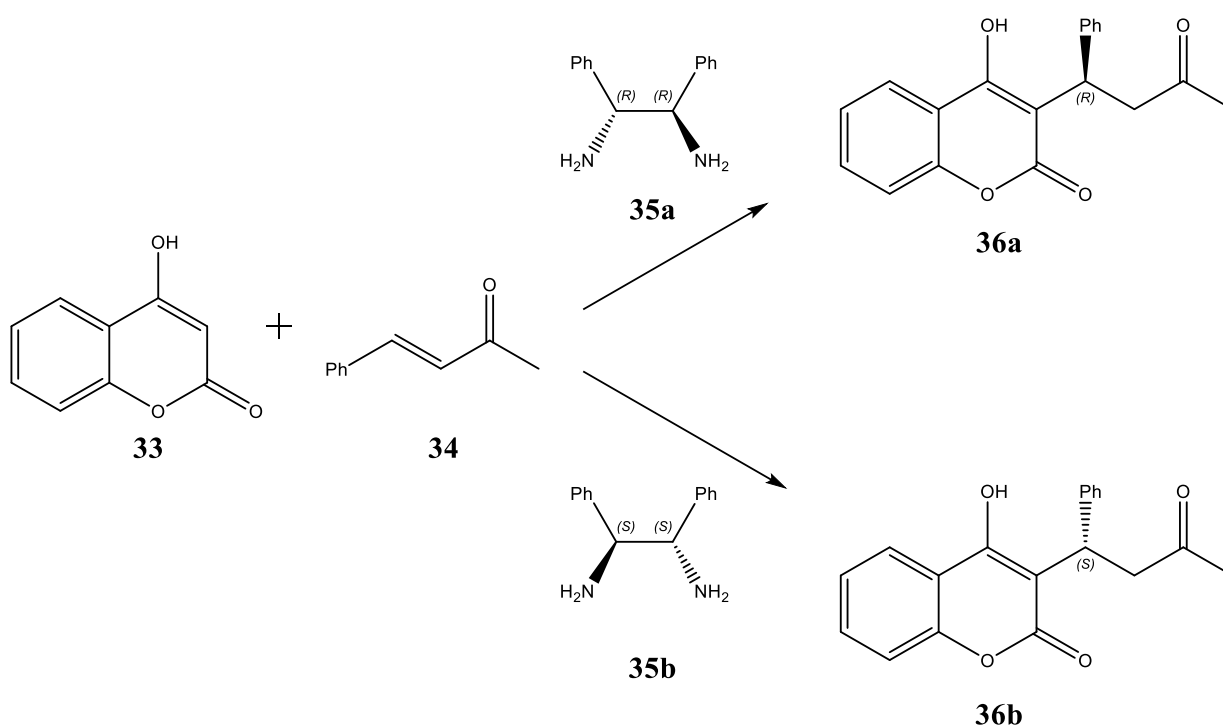
Shema 7. Enantioselektivna sinteza *S*-varfarina Diels-Alderovom reakcijom

Ovom sintezom dobiven je *S*-varfarin enantiomerne čistoće 95 %. Ukupno iskorištenje reakcije je 61 %.<sup>22</sup>

## 2.4. Zelena, enantioselektivna sinteza varfarina

Zelena kemija je pristup koji se bavi razvojem i primjenom kemijskih proizvoda i metoda s ciljem da se reducira ili eliminira upotreba ili proizvodnja tvari opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš. Sintaza koja će biti prikazana primjer je zelene sinteze jer koristi neke od principa zelene kemije. Reakcija se provodi pri sobnoj temperaturi i tlaku te ne zahtijeva inertnu atmosferu. Reagensi nisu skupi. Difeniletilendiamin (dpen) se koristi u katalitičkim količinama i može se ponovno iskoristiti ako ga se ekstrahira iz reakcijske smjese.<sup>23</sup>

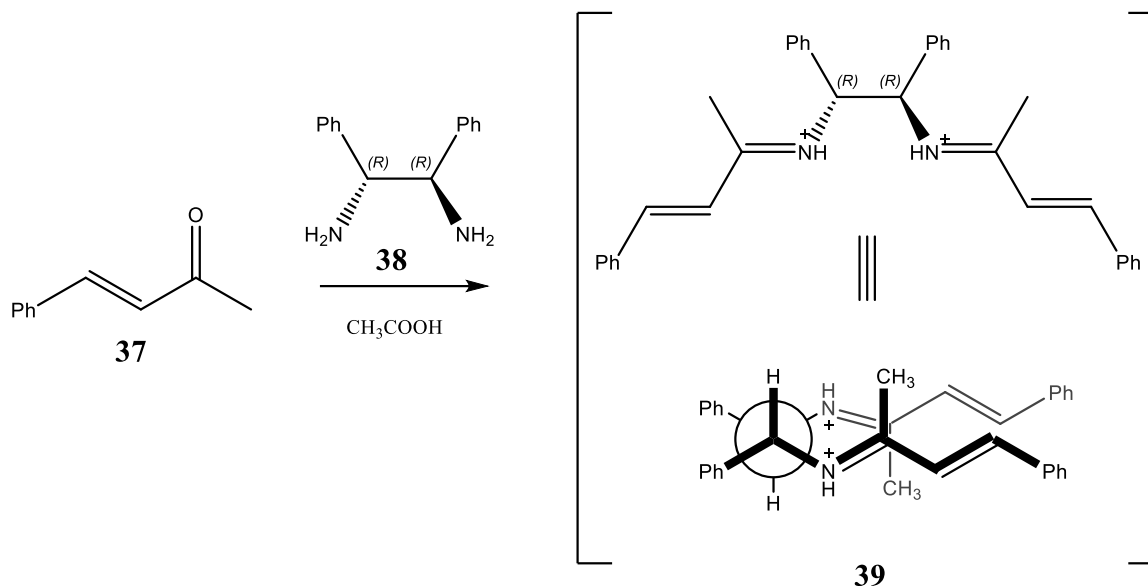
Ova sinteza je također jedan od primjera enantioselektivne sinteze kojom se selektivno može dobiti *R*- ili *S*-enantiomer. Odvija se mehanizmom Michaelove adicije, što je ranije opisano (§2.3.1). Polazni materijal za sintezu (shema 8) su 4-hidroksikumarin (**33**) i *trans*-4-fenil-3-buten-2-on (**34**). Reakcija se provodi u smjesi tetrahidrofurana i octene kiseline. Octena kiselina služi kako kokatalizator – karboksilna skupina povećava stereoselektivnost reakcije. Kako bi se dobio samo *R*- ili *S*-enantiomer, u reakciji se koristi katalizator s kiralnim centrom – difeniletilendiamin (dpen). Za sintezu *R*-varfarina (**36a**) potrebno je pomiješati reagense **33** i **34** s tetrahidrofuranom i octenom kiselinom, a reakcijskoj smjesi je zatim potrebno dodati 10 mol % *R,R*-dpen (**35a**). Za sintezu *S*-varfarina (**36b**) postupak je identičan, uz razliku što se koristi katalizator suprotne apsolutne konfiguracije – *S,S*-dpen (**35b**). Reakcija se odvija pri sobnoj temperaturi uz miješanje ili bez miješanja. Kad reakcija završi, reakcijska smjesa se pomoću tankoslojne kromatografije uspoređi sa standardom – racemičnim varfarinom, otapalo se ukloni iz smjese, a produkt se pročisti kolonskom kromatografijom ili prekrizacijom.<sup>23</sup>



Shema 8. Priprava *R*- i *S*-varfarina zelenom sintezom

Mehanizam sinteze uključuje nastanak diiminskog međuprodukta, koji nastaje iz dvije molekule ketona **37** i jedne molekule diamina **38** (shema 9). Na shemi 9 prikazan je protonirani diiminski međuprodukt (**39**) nastao iz (*R,R*)-diamina. Međuprodukt se sastoji od

dvije iminske skupine pozicionirane paralelno jedne u odnosu na drugu. U reakciji dolazi do Michaelove adicije napadom 4-hidroksikumarina na *re* stranu međuprodukta **39**. Nakon adicije slijedi hidroliza imina te je dobiven konačni produkt, *R*-varfarin.<sup>24</sup>



Shema 9. Nastanak diiminskog međuprodukta **39**

Ovako provedena sinteza primjer je moderne sinteze u jednom koraku. Njome se dobivaju iskorištenja od 40-95 %, a čistoća enantiomera je 30-90 % nakon kolonske kromatografije te 80-100 % nakon prekriztalizacije.<sup>23</sup>



## § 3. LITERATURNI IZVORI

---

1. D. Wardrop, D. Keeling, *Br. J. Haematol.* **141** (2008) 757-763.
2. E. Ravina, *The Evolution of Drug Discovery*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011, str. 164-149.
3. J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 295-296.
4. <https://www.warf.org/about-us/succes-stories/karl-paul-link/karl-paul-link.cmsx> (datum pristupa 13.5.2018.)
5. K. P. Link, *Circulation* **19** (1959) 97-107.
6. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2017, str. 657-663.
7. <http://www.halmed.hr/> (datum pristupa 15.8.2018.)
8. J. Hirish, V. Fuster, J. Anstell, J. L. Halperin, *J. Am. Coll. Cardiol.* **41** (2003) 1632-1652.
9. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54678486> (datum pristupa 7.8.2018.)
10. <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/bhonoah/characterisation.html> (datum pristupa 29.8.2018.)
11. T. E. Kristensen, K. Vestli, F. K. Hansen, T. Hansen, *Eur. J. Org. Chem.* (2009) 5185-5191.
12. S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1994, str. 158-168.
13. L. G. Wade, *Organic Chemistry*, Pearson Prentice Hall, New York, 2010, str. (a) 1047, (b) 1085-1087, (c) 684-695.
14. L. Guasch, M. L. Peach, M. C. Nicklaus, *J. Org. Chem.* **80** (2015) 9900-9909.
15. A. K. Wittkowsky, *Semin. Vasc. Med.* **3** (2003) 221-230.
16. D. W. Hutchinson, J. A. Tomlinson, *Tetrahedron* **25** (1969) 2531-2537.
17. R. A. O'Reilly, *Annu. Rev. Med.* **27** (1976) 245-261.
18. R. S. Overman, M. A. Stahmann, C. Huebner, W. R. Sullivan, L. Spero, D. G. Doherty, M. Ikawa, L. Graf, S. Roseman, K. P. Link, *J. Biol. Chem.* **153** (1944) 5-24.
19. M. Ikawa, M. A. Stahmann, K. P. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **66** (1944) 902-906.
20. E. Bush, W. F. Trager, *J. Pharm. Sci.* **72** (1983) 830-831.
21. A. Robinson, H. Li, *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 8321-8324.



- 
22. G. Cravotto, G. M. Nano, G. Palmisano, S. Tagliapietra, *Tetrahedron* **12** (2001) 707-709.
  23. T. C. Wong, C. M. Sultana, D. A. Vosburg, *J. Chem. Educ.* **87** (2010) 194-195.
  24. H. Kim, C. Yen, P. Preston, J. Chin, *Org. Lett.* **8** (2006) 5239-5242.