

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GAŠPER POKLUKAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GAŠPER POKLUKAR

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA TIAZOLINONSKIH ZAVIRALCEV KSANTIN-
OKSIDAZE**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF THIAZOLINONE XANTHINE OXIDASE
INHIBITORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. Masno spektroskopske meritve so opravili na Inštitutu Jožef Stefan. Biološka testiranja so izvedli na Medicinski fakulteti Univerze v Nišu v Srbiji.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju Marku Anderluhu za usmerjanje, nasvete in podporo tekom dveh let raziskovalnega dela. Zahvala gre delovnemu mentorju Marku Jukiču, ki je v tem obdobju name prenesel velik del svojega teoretičnega in praktičnega znanja s področja farmacevtske kemije in laboratorijskega dela. Skupaj z Alešem Žulo je poskrbel za prijetno vzdušje v laboratoriju in zdrave delovne odnose. Zahvaljujem se tudi staršem, ki so mi med študijem vedno stali ob strani in prijateljem, ki so poskrbeli, da mi bodo študentska leta za vedno ostala v najlepšem spominu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Marka Anderluha.

Ljubljana, 2015

Gašper Poklucar

Komisija za zagovor

Predsednik: prof. dr. Odon Planinšek

Mentor: izr. prof. dr. Marko Anderluh

Članica: asist. dr. Simon Mencej Bedrač

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1. KSANTIN-OKSIDAZA	1
1.2. BOLEZENSKA STANJA, V KATERIH JE UDELEŽENA KSANTIN-OKSIDAZA	4
1.2.1. Protin	4
1.2.2. Ishemijsko-reperfuzijska poškodba	6
1.2.3. Srčno-žilne in vnetne bolezni	6
1.3. ZAVIRALCI KSANTIN-OKSIDAZE.....	7
1.3.1. Alopurinol in oksipurinol	7
1.3.2. Nepurinski sintezni zaviralci - febuksostat, niraksostat in topiroksostat	8
1.4. TIAZOLIDINONI	10
1.4.1. Sinteza tiazolidinonov	10
1.4.2. Delovanje tiazolidinonov na ksantin-oksidozo.....	11
1.4.3. Delovanje tiazolidinonov na druge tarče	11
1.5. PROBLEMATIKA PAINS SPOJIN.....	11
2. NAČRT DELA.....	13
2.1. DOKAZOVANJE SPECIFIČNEGA MEHANIZMA DELOVANJA.....	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1. MATERIALI.....	16
3.1.1. Reagenti in topila.....	16
3.2. Metode	16
3.2.1. Sinteza s pomočjo mikrovalov	16
3.2.2. Odstranjevanje topil.....	16
3.2.3. Kromatografske metode	16
3.2.4. Spektroskopske metode	17
3.2.5. Določanje tališč.....	17
3.2.6. Določanje prisotnosti agregatov	17
3.2.7. Molekulsko sidranje	17
3.2.8. Ostala programska oprema	18
3.2.9. Biološka testiranja	18
4. EKSPERIMENTALNO DELO.....	20
4.1. SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPKI	20
4.1.1. Splošni postopek sinteze in izolacije 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onov	20
4.2. SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ.....	21
4.2.1. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-tioksotiazolidin-4-ona (1).....	21
4.2.2. Sinteza (Z)-4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzojske kisline (2) 22	

4.2.3. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-(piperidin-1-il)tiazol-4(5H)-ona (3)	23
4.2.4. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-morfolinotiazol-4(5H)-ona (4)	24
4.2.5. Sinteza (Z)-5-(4-hidroksibenziliden)-2-morfolinotiazol-4(5H)-ona (5)	25
4.2.6. Sinteza (Z)-5-(4-klorobenziliden)-2-morfolinotiazol-4(5H)-ona (6)	26
4.2.7. Sinteza (Z)-4-((2-morfolino-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)benzoničila (7) .	27
4.2.8. Sinteza (Z)-2-morfolino-5-(4-nitrobenziliden)tiazol-4(5H)-ona (8)	28
4.2.9. Sinteza (Z)-3-((2-morfolino-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)benzoničila (9) .	29
4.2.10. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-(3-(hidroksimetil)piperidin-1-il)tiazol-4(5H)-ona (10)	30
4.2.11. Sinteza (Z)-4-((2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)- metil)benzojske kisline (11)	31
4.2.12. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-((4-metilpiperazin-1-il)amino)tiazol-4(5H)-ona (12)	32
4.2.13. Sinteza (Z)-2-(benzilamino)-5-benzilidentiazol-4(5H)-ona (13).....	33
4.2.14. Sinteza (Z)-2-(benzilamino)-5-(4-hidroksibenziliden)tiazol-4(5H)-ona (14) .	34
4.2.15. Sinteza (Z)-4-((2-(benzilamino)-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)-benzojske kisline (15).....	35
4.2.16. Sinteza (Z)-2-(benzilamino)-5-(4-klorobenziliden)tiazol-4(5H)-ona (16)	36
4.2.17. Sinteza (Z)-4-((2-(benzilamino)-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)benzo- nitrila (17)	37
4.2.18. Sinteza (Z)-2-(benzilamino)-5-(4-nitrobenziliden)tiazol-4(5H)-ona (18).....	38
4.2.19. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-((4-hidroksifenetil)amino)tiazol-4(5H)-ona (19) .	39
4.2.20. Sinteza (Z)-5-(4-hidroksibenziliden)-2-((4-hidroksifenetil)amino)tiazol-4(5H)- ona (20).....	40
4.2.21. Sinteza (Z)-4-((2-((4-hidroksifenetil)amino)-4-oksotiazol-5(4H)- iliden)metil)benzojske kisline (21).....	41
4.2.22. Sinteza (Z)-5-(4-klorobenziliden)-2-((4-hidroksifenetil)amino)tiazol-4(5H)- ona (22).....	42
4.2.23. Sinteza (Z)-4-((2-((4-hidroksifenetil)amino)-4-oksotiazol-5(4H)- iliden)metil)benzoničila (23)	43
4.2.24. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-((4-klorofenetil)amino)tiazol-4(5H)-ona (24).....	44
4.2.25. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-((furan-2-ilmetil)amino)tiazol-4(5H)-ona (25)	45
4.2.26. Sinteza <i>terc</i> -butil (2-merkaptetil)karbamata (26).....	46
4.3. DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI SPOJIN.....	47
4.3.1. Testiranje reaktivnosti spojin	47
4.3.2. Testiranje agregacije spojin	47
4.3.3. Merjenje absorpcijskega UV-VIS spektra spojin	47
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	48
5.1. SINTEZA KONČNIH SPOJIN.....	48
5.2. MOLEKULSKO SIDRANJE.....	52
5.3. BIOLOŠKA TESTIRANJA	54

5.4. ŠTUDIJ FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI SPOJIN	55
5.4.1. Testiranje reaktivnosti spojin	56
5.4.2. Testiranje agregacije spojin	56
5.2.3. Merjenje absorpcijskega UV-VIS spektra spojin	57
5.2.4. Analiza rezultatov testov nespecifičnih mehanizmov	58
6. SKLEP	59
7. LITERATURA	61
8. PRILOGE.....	64
Priloga 1: Validacija protokola sidranja	64
Priloga 2: Poročilo sidranja spojin v vezavno mesto XO	65
Priloga 3: Grafi analize agregacije spojine 21	66

KAZALO SLIK

Slika 1 Metabolizem purinov do sečne kisline (povzeto po 3).....	1
Slika 2 Reakcijska shema pretvorbe hipoksantina v ksantin in sečno kislino.....	2
Slika 3 Struktura XO dimera (povezeto po 1).....	2
Slika 4 Mehanizem encimske reakcije hidroksilacije ksantina do sečne kisline prek XO (povzeto po 5).....	3
Slika 5 Strukturni formuli alopurinola in oksipurinola	7
Slika 6 Oksipurinol v vezavnem mestu (PDB koda 3BDJ; povzeto po 13).....	8
Slika 7 Nepurinski sintezni inhibitorji XO.....	8
Slika 8 Niraksostat v vezavnem mestu (PDB koda 1VDV; povzeto po 16).....	9
Slika 9 Sintezne poti 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onov iz rodanina (povzeto po 19).....	10
Slika 10 (Z)-4-((2-benzilamino-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)-metil)benzonitril.....	14
Slika 11 Sintezni načrt.....	14
Slika 12 Mehanizem Knoevenagelove kondenzacije.....	48
Slika 13 Mehanizem nukleofilne adicije amina na C=S skupino s sledečo eliminacijo	49
Slika 14 Mehanizem nukleofilne adicije amina na aldehid s sledečo eliminacijo	51
Slika 15 Spojina 21 (obarvana sivo), sidrana v vezavno mesto XO s kokristaliziranim febuksostatom (obarvan zeleno).....	53
Slika 16 Spojina 16 (obarvana sivo), sidrana v vezavno mesto XO s kokristaliziranim febuksostatom (obarvan zeleno).....	53
Slika 17 Graf absorbance spojine 21 v odvisnosti od valovne dolžine	57
Slika 18 Računalniško generirana molekula febuksostata (obarvana sivo), sidrana v vezavno mesto XO s kokristaliziranim febuksostatom (obarvan zeleno)	64
Slika 19 Korelacijska krivulja za raztopino 21 v DMSO	66
Slika 20 Porazdelitev velikosti delcev v 10 mM raztopini 21 v DMSO	66
Slika 21 Korelacijska krivulja za raztopino 21 v sistemu DMSO:H ₂ O = 9:1	67
Slika 22 Porazdelitev velikosti delcev v 10 mM raztopini 21 v DMSO:H ₂ O = 1:9.....	67

KAZALO TABEL

Tabela I IC ₅₀ vrednosti [μM] spojin 4-25 na komercialni XO	54
Tabela II IC ₅₀ vrednosti [μM] spojin 4-25 na XO v homogenatu podganjih jeter	55
Tabela III Rezultati analize prisotnosti delcev v raztopinah spojine 21, pridobljeni z zetasizerjem	57
Tabela IV Poročilo sidranja spojin v vezavno mesto XO	65

POVZETEK

Ksantin-oksidaza je encim, vpleten v patofiziologijo protina, raziskave pa kažejo, da verjetno igra pomembno vlogo tudi pri ishemijsko-reperfuzijski poškodbi in nekaterih drugih bolezenskih stanjih. V terapiji se uporablja malo zaviralcev ksantin-oksidaze. Na svetovnem trgu sta prisotna le alopurinol in febuksostat. Zato obstaja interes za razvoj novih zaviralcev ksantin-oksidaze, še posebej ker se incidenca protina v zadnjih nekaj desetletjih povečuje, kaže pa se tudi njihov potencial za uporabo v terapiji ishemijsko-reperfuzijske poškodbe, srčno-žilnih in vnetnih bolezni.

V okviru magistrske naloge smo na podlagi nedavno objavljenih 2-amino-5-alkilidenciazol-4-onkih zaviralcev ksantin-oksidaze sintetizirali manjšo knjižnico 22 spojin z enakim osnovnim skeletom, a drugačnim naborom substituentov, pripetim nanj. S tem smo dodatno raziskali kemijski prostor teh zaviralcev. Ustreznost spojin smo ovrednotili z uporabo tehnik kemijske analitike. Z *in silico* metodami smo jih sidrali v vezavno mesto ksantin-oksidaze in ugotovili, da obstajata dva možna načina vezave, bodisi zaminskim delom molekule globoko v notranjosti in z benzilidenskim delom obrnjenim proti topilu bodisi obratno. Celotno knjižnico smo nato poslali na biološka testiranja zaviranja ksantin-oksidaze na dveh po metodologiji različnih testnih sistemih, kjer so se kot najboljši izkazali derivati s *para*-karboksi skupino na benzilidenskem delu molekule. Najmočnejši spojini sta izkazali visoko afiniteto do ksantin-oksidaze in jakost zaviralnega delovanja, primerljivo z alopurinolom.

Ker so tiazolinoni in sorodne spojine v literaturi pogosto označeni kot t.i. PAINS, smo preučili možnost neselektivnega delovanja sintetiziranih spojin, pri čemer smo posebno pozornost namenili našemu najmočnejšemu zaviralcu. Preizkusili smo njegovo reaktivnost v prisotnosti biološko relevantnih nukleofilov in analizirali njegovo sposobnost tvorbe agregatov v raztopinah ter absorpcije svetlobe v UV-vidnem delu spektra. Naši rezultati kažejo, da spojina najverjetneje ne deluje po nespecifičnem mehanizmu in da je njena aktivnost posledica nekovalentnih specifičnih interakcij s tarčnim proteinom.

Uspelo nam je torej načrtovati in sintetizirati učinkovite zaviralce ksantin-oksidaze. Njihova struktura predstavlja osnovo za nadaljnje delo z namenom povečanja njihove jakosti in izboljšanja fizikalno-kemijskih lastnosti. Pokazali smo tudi, da z ustreznim profilom substituentov lahko PAINS strukture spremenimo v takšne, ki to niso.

ABSTRACT

Xanthine oxidase is an enzyme involved in the pathophysiology of gout. Recent research implicates its role in ischaemic-reperfusion injury and some other diseases. There are only a few xanthine oxidase inhibitors in therapeutic use. Only allopurinol and febuxostat are used worldwide. Consequently there is much interest in the development of new xanthine oxidase inhibitors, especially since the incidence of the gout has been increasing in the past few decades. Additionally there is potential in their use in the therapy of ischaemic-reperfusion injury, cardiovascular and inflammatory diseases.

Based on recently published 2-amino-5-alkylidene-thiazole-4-one xanthine oxidase inhibitors we have synthesized a small library of 22 compounds with the same basic structure, yet a different set of substituted scaffolds. By doing so we have explored the chemical space of these inhibitors. We have evaluated the compounds using standard analytical techniques. The compounds were bound *in silico* to the binding site of xanthine oxidase. Results show that there are two possible binding modes, either with the amine moiety deep within the binding pocket and the benzylidene moiety facing the bulk solvent or vice versa. The entire library was then assayed on xanthine oxidase with two methodologically different assay systems. Derivatives with a *para*-carboxy group on the benzylidene moiety have turned out to be the most potent inhibitors. The two derivatives with the highest potency have shown high affinity towards xanthine oxidase and inhibit the enzyme with inhibitory constants comparable to allopurinol.

Since thiazolinones and related compounds are often labelled as PAINS in literature we have studied the possibility of non-selective mechanisms of action of synthesized compounds. Special attention was given to the hit compound. We have tested its reactivity towards biologically relevant nucleophiles, analyzed its tendency to form aggregates in solutions and evaluated its UV-VIS absorbance. Our results point that the compound probably does not act through a non-specific mechanism and that its activity is a consequence of non-covalent specific interactions with the target protein.

We have thus managed to design and synthesize potent xanthine oxidase inhibitors. Their structure presents an excellent basis of further work with the intention of increasing their potency and improving their physicochemical properties. We have also shown that PAINS can be turned into non-PAINS with a suitable substituent profile.

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

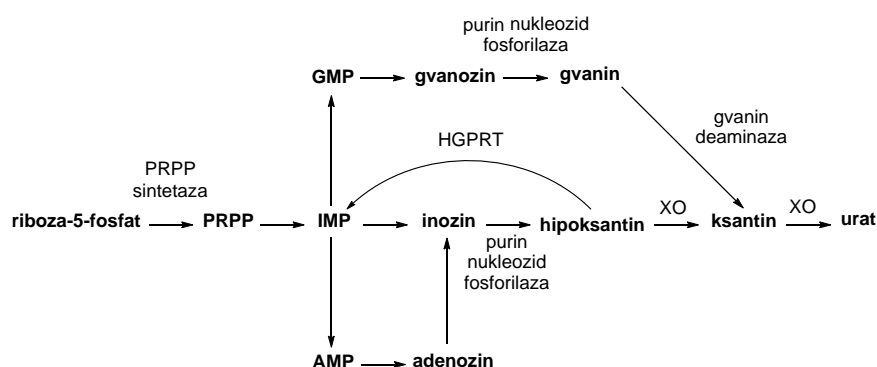
Å	Angstroem, 10^{-10} m (šv. ångström)
AcOH	ocetna kislina
Ala	alanin
AMP	adenozin monofosfat
Arg	arginin
Asn	asparagin
CDCl₃	devteriran kloroform
d	dublet
dd	dublet dubletov
Da	dalton
DKM	diklorometan
DMSO-d₆	devteriran dimetil sulfoksid
EtOAc	etil acetat
EtOH	etanol
FAD	flavin adenin dinukleotid
FDA	Uprava ZDA za hrano in zdravila (<i>ang.</i> Food and Drug Administration)
Glu	glutaminska kislina
HGPRT	hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaza
HR-MS	masna spektroskopija visoke ločljivosti (<i>ang.</i> high-resolution mass spectroscopy)
HTS	rešetanje visoke zmogljivosti (<i>ang.</i> high throughput screening)
IC₅₀	koncentracija, pri kateri učinkovina doseže 50 % inhibicijo encima
IMP	inozin monofosfat
i-PrOH	izopropanol
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstantna
Leu	levcin
m	multiplet
MeOD-₄	devteriran metanol
MeOH	metanol
MS	masna spektroskopija
MW	mikrovalovni reaktor (<i>ang.</i> microwave reactor)
NAD⁺/NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirana/reducirana oblika)
NMR	jedrska magnetna resonanca (<i>ang.</i> nuclear magnetic resonance)
PAINS	pan assay interference compounds
Phe	fenilalanin
ppm	število delcev na milijon, 10^{-6} (<i>ang.</i> parts-per-million)
PRPP	fosforibozil pirofosfat
PSA	<i>ang.</i> polar surface area
s	singlet
t	triplet
Thr	treonin
TMS	tetrametil silan
TLC	tankoplastna kromatografija (<i>ang.</i> thin-layer chromatography)
UV	ultravijolično
UV-VIS	ultravijolična in vidna spektrofotometrija (<i>ang.</i> ultraviolet-visible spectrophotometry)

Val	valin
XDH	ksantin-dehidrogenaza
XO	ksantin-oksidaža
XOR	ksantin-oksido-reduktaza
η	izkoristek kemijske reakcije
δ	kemijski premik
v	valovno število

1. UVOD

1.1. KSANTIN-OKSIDAZA

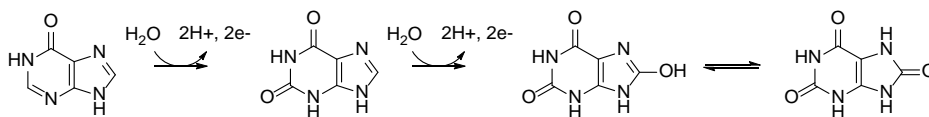
Ksantin-oksido-reduktaza (XOR) je encim, ki katalizira hidroksilacijo različnih purinskih, pirimidinskih, pterinskih in aldehydnih substratov. Pri sesalcih med drugim katalizira pretvorbo hipoksantina v ksantin in ksantina v sečno kislino (slika 1, slika 2). Nahaja se v številnih organizmih od bakterij do človeka. Oblike encima iz različnih organizmov so si med seboj zelo podobne v aminokislinskem zaporedju (1). Pri človeku so koncentracije visoke zlasti v hepatocitih, Kupferjevih celicah jeter, enterocitih, čašastih celicah jejunuma in v mlečnih žlezah. Poleg tega je encim prisoten v kapilarnem endoteliju jejunuma, skeletnih mišic in ledvic, našli pa so ga tudi v makrofagih in mastocitih. Raziskave na sesalskih celicah kažejo, da je lokaliziran v citosolu v veziklih in na zunanji površini celične membrane (2).



Slika 1 Metabolizem purinov do sečne kisline (povzeto po 3)

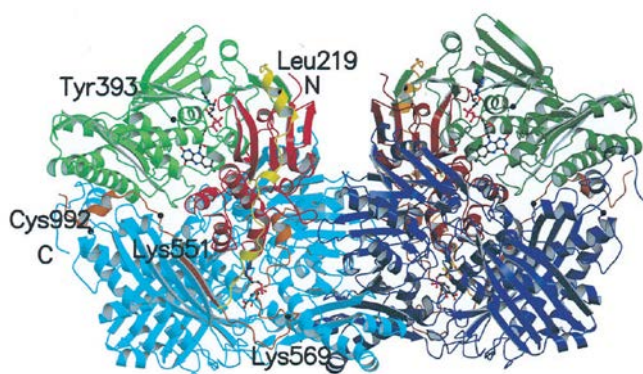
V celici se nahaja v dveh oblikah. Sintetizira se kot ksantin-dehidrogenaza (XDH), ki prevladuje *in vivo*. Končni prejemnik elektronov pri tej obliki je v glavnem NAD^+ , v manjši meri pa lahko elektrone preda tudi molekularnemu kisiku. S tvorbo intramolekularne disulfidne vezi med dvema cisteinskima tiolnima skupinama se reverzibilno, s proteolizo pa ireverzibilno pretvori v ksantin-oksidazo (XO), ki reducira izključno molekularni kisik. Pri redukciji kisika prek obeh oblik se tvori superoksidni anion in vodikov peroksid. Omenjene reaktivne kisikove zvrsti so vpletene v patofiziologijo številnih bolezenskih stanj, kot je ishemijsko-reperfuzijska poškodba (1). V znanstvenih člankih se ime ksantin-oksidaza pogosto uporablja namesto XOR, torej zajema obe obliki encima. Tega načina poimenovanja se poslužujemo tudi v tej nalogi, razen kjer

je govora o pretvorbi XDH v XO. V tem primeru poimenovanji pomenita dve različni obliki.



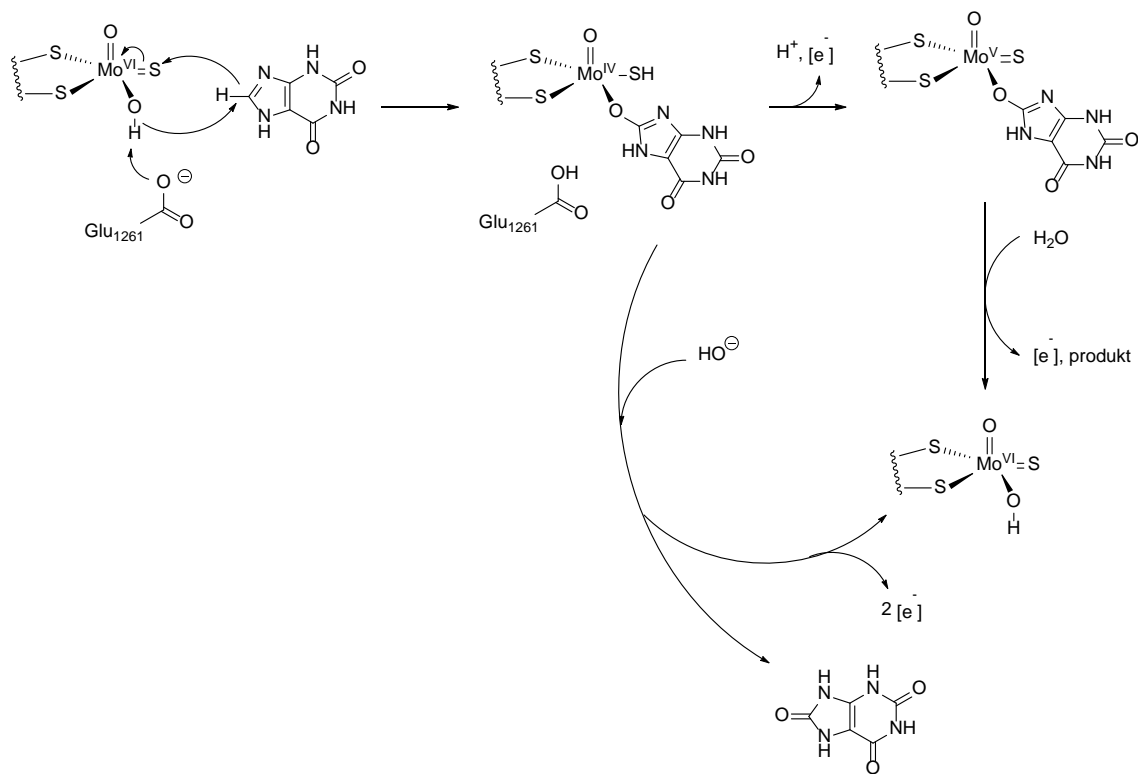
Slika 2 Reakcijska shema pretvorbe hipoksantina v ksantin in sečno kislino

Najbolje je opredeljena in raziskana XO iz govejega mleka (2). Stopnja homologije med govejim in človeškim encimom znaša 90 %. Sesalski encim je v aktivni obliki prisoten kot homodimer z molekularno maso 290 kDa (slika 3). Njegove dimenzije so 155 Å x 90 Å x 70 Å. Vsaka podenota pri katalizi deluje neodvisno. Sestavljena je iz 1330 aminokislin in razdeljena na tri domene. N-terminalna domena (aminokislinski ostanki 1-165 v XO iz govejega mleka, molekularna masa 20 kDa) vsebuje dva [2Fe-2S] kofaktorja (Fe/S I in Fe/S II), koordinirana s po štirimi cisteinskimi ostanki. Osrednja domena (ostanki 226-531, 40 kDa) veže FAD. C-terminalna domena (ostanki 590-1332, 85 kDa) vsebuje molibdopterinski kofaktor (1).



Slika 3 Struktura XO dimera (povezeto po 1)

Vežavno mesto substrata tvori več ohranjenih aminokislin (oštevilčenje glede na govejo XO, PDB koda 1N5X): Phe 914, Phe 1009, Glu 802, Glu 1261, Gln 767 in Arg 880 (4, 5). V aktivnem mestu najdemo molibdopterinski kofaktor, ki ga sestavljata molekula molibdopterina in atom molibdena v oksidacijskem stanju Mo(VI). (4). Slednji je koordiniran s petimi ligandi, ki so okoli njega razporejeni v obliki kvadratne piramide. V apikalni legi je na molibdenov atom z dvojno vezjo vezan kisikov atom (Mo=O), v ekvatorialni pa oba 1,2-ditiolenska žveplove atoma molibdopterina, hidroksilna skupina (Mo-OH) in z dvojno vezjo žveplov atom (Mo=S) (4, 6).



Slika 4 Mehanizem encimske reakcije hidroksilacije ksantina do sečne kisline prek XO (povzeto po 5)

Reakcija katalize (slika 4) poteka tako, da se substrat (npr. ksantin) vrine med benzenova obroča Phe 914 in Phe 1009 (4), ki ga zadržita v ravnini, vzporedni z apikalno Mo=O skupino (5). Glu 1261 odcepi proton z Mo-OH skupine. Sledi nukleofilni napad deprotonirane Mo-O⁻ skupine na C-8 ogljikov atom ksantina in premestitev hidridnega iona s C-8 atoma na žveplo Mo=S skupine, pri čemer dobimo Mo-SH skupino. V tem koraku se molibdenov atom reducira z Mo(VI) v Mo(IV) obliko. Nastali reakcijski intermediat razpade tako, da se hidroksidni ion iz okoliške vode veže na molibdenov atom, s čimer se regenerira Mo-OH skupina, izstopi pa produkt (v tem primeru sečna kislina). Zatem se elektroni premestijo z Mo(IV) vzdolž redoks verige, zopet dobimo stanje Mo(VI). V nekaterih primerih se lahko Mo(IV) reducira z oddajo enega elektrona do Mo(V) že pred vezavo hidroksidnega iona, kar je odvisno od narave substrata (4). Mo-SH se deprotonira do Mo=S. Za encimsko reakcijo je ključen aminokislinski ostanek Glu 1261, ki po protoniranju tvori vodikovo vez z N-9 atomom purinskega substrata. Glu 802 prenese proton z N-3 na N-9, pri čemer kompenzira negativni naboj, ki se nabere na imidazolnem obroču po nukleofilnem napadu Mo-O⁻ skupine. Arg 880 pa stabilizira prehodno stanje z negativnim nabojem, ki se porazdeli po obročnem sistemu (5).

Sama molekula molibdopterina ne sodeluje neposredno pri hidroksilaciji substrata. Služi prenosu elektronov z molibdenskega centra. Distalna amino skupina molibdopterina je namreč prek vodikove vezi povezana z enim od cisteinskih ligandov kofaktorja Fe/S I. Elektroni, ki jih substrat preda atomu molibdena, po tej povezavi preidejo na Fe/S I (4), od tam pa prek Fe/S II na FAD (1). Na tem mestu elektrone prejme NAD⁺ ali molekularni kisik (2). Pri pretvorbi XDH v XO ostane okolica molibdopterinskega in [2Fe-2S] centrov nespremenjena, zato med oblikama ni razlike v vezavi in katalizi substratov. V okolici FAD pride do premestitve zanke Glu 423-Lys 433, ki prepreči dostop NAD⁺ do kofaktorja, ne moti pa interakcije kofaktorja z molekularnim kisikom (1).

1.2. BOLEZENSKA STANJA, V KATERIH JE UDELEŽENA KSANTIN-OKSIDAZA

1.2.1. Protin

Protin (imenovan tudi putika ali urični artritis) je presnovna motnja, za katero je značilna hiperurikemija in odlaganje kristalov natrijevega urata v sklepih in ostalih tkivih. Bolezen se kaže v ponavljajočih se napadih sklepnega vnetja (3). Prvi zapisi o protinu segajo v antiko, njegova prevalenca pa v zadnjih nekaj desetletjih narašča (7). Vzroki za to so spremembe v življenjskem slogu in daljša življenjska doba (8). 90-95 % pacientov je moških, pri katerih se bolezen navadno pojavi med 30. in 50. letom starosti (3). Pri ženskah je do menopavze redka, kar povezujejo z urikozuričnim delovanjem estrogena (7, 8). Tveganje za bolezen je tesno povezano s serumskimi koncentracijami sečne kisline. Raziskave kažejo, da je tveganje za razvoj protina pri posameznikih s serumsko koncentracijo sečne kisline nad 10 mg/dL 30,5 % (7). Glavni dejavniki tveganja so moški spol, visok vnos purinov, uživanje alkohola, ledvično popuščanje, uporaba diuretikov in metabolni sindrom (3). V 90 % primerov je hiperurikemija posledica zmanjšane izločanja sečne kisline preko ledvic, v 10 % pa povečane proizvodnje (8). Vzroki zmanjšane izločanja so lahko ledvično popuščanje, terapija z diuretiki, ciklosporinom, pirazinamidom, etambutolom ali nizkimi odmerki acetilsalicilne kisline (3). Tvorba sečne kisline je povečana v primeru prirojenih motenj presnove purinov, npr. zmanjšane aktivnosti hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaze ali povečane aktivnosti fosforibozil pirofosfat sintetaze (8). Prav tako do porasta koncentracij privedejo stanja, v katerih je

povečana sinteza in razpad nukleinskih kislin, npr. mieloproliferativne in limfoproliferativne bolezni, hemolitične anemije, luskavica in terapija z obsevanjem ali citostatiki (3, 7).

Sečna kislina je šibka kislina s pK_a vrednostjo 5,75. Pri fizioloških pH je večinoma ionizirana (okoli 98 %). Natrijev urat je slabo topen, saj njegova topnost znaša le okoli 380 $\mu\text{mol/L}$. Ko koncentracije presežejo te vrednosti, se tveganje za odlaganje kristalov v tkivih močno poveča. Topnost urata je odvisna tudi od temperature, pH in zunajceličnih matriksnih proteinov (8). Ker kristali natrijevega urata sprožijo močan vnetni odziv, opazimo aktivacijo komplementa (3), fagocitozo kristalov s strani nevtrofilcev in monocitov in sproščanje vnetnih mediatorjev, kot so IL-1, TNF- α in IL-8 (8). Poleg tega se iz razpadlih fagocitov sproščajo lizosomski encimi, kar privede do erozije sklepnega hrustanca (3).

Začetna stopnja razvoja protina je asimptomatska hiperurikemija, ki lahko traja tudi 20 let, preden se pojavijo klinični znaki (3). Prvi napad sklepnega vnetja načeloma prizadene en sklep, v večini primerov je to metatarzofalangealni sklep nožnega palca. V tem primeru stanje imenujemo tudi podagra. Sklep je otekel, pordel, topel na otip in močno boleč (7). Sledi intervalni protin, ko napadi zajemajo več sklepov, so hujši in dolgotrajnejši. Zadnja stopnja je kronični protin, za katerega je značilno kronično vnetje sklepov zaradi pojava večjih skupkov kristalov urata, ki se nalagajo v sklepih, kitnih ovojnica ter drugih tkivih (3).

Zdravilo izbora pri akutnem napadu protina so nesteroidni antirevmatiki, ki pa so zaradi neželenih učinkov in interakcij z drugimi zdravili pogosto kontraindicirani. Druga možnost je peroralna (9), intramuskularna ali intraartikularna aplikacija glukokortikoidov, npr. hidrokortizona (10). V uporabi je tudi kolhicin, ki pa ima ozko terapevtsko okno (7) in je manj primeren za paciente z ledvično ali jetrno insuficienco (8).

Cilj kronične terapije protina je znižanje koncentracij sečne kisline. V poštev pride za paciente s ponavljajočimi se napadi in kronično artropatijo (9). Najpogosteje je predpisan alopurinol, ki zniža tako serumsko koncentracijo sečne kisline kot tudi njeno izločanje in ustavi presnovo purinov na stopnji bolj topnih ksantina in hipoksantina (7). Znižanje koncentracije sečne kisline lahko dosežemo tudi z urikozuriki, med katere sodijo probenecid, sulfinpirazon in benzbromaron (9). Febuksostat je nov zaviralec XO, ki

učinkoviteje znižuje koncentracijo sečne kisline kot alopurinol (9). Novejša učinkovina je peglotikaza. Gre za rekombinantno uratno oksidazo, ki oksidira sečno kislino v bolj topen alantoin, ki se hitreje izloči iz telesa. Učinkovine, ki so zaenkrat še v fazi kliničnih testiranj, zajemajo anakinro (antagonist receptorja za IL-1) in canakinumab (humano monoklonsko protitelo proti IL-1 β) (11).

1.2.2. Ishemijsko-reperfuzijska poškodba

V stanju ishemije pride do porušanja transmembranskih ionskih gradientov. Naraste znotrajcelična koncentracija kalcija, kar privede do aktivacije proteaz, ki ireverzibilno pretvorijo XDH v XO. Sočasno se v celicah kopiči hipoksantin, ki je produkt katabolizma celičnega ATP. Ko pride do reperfuzije, med encimsko oksidacijo hipoksantina s kisikom kot končnim prejemnikom elektronov nastanejo večje količine reaktivnih kisikovih zvrsti, ki poškodujejo celične komponente in povzročijo okvare organov. Novejše raziskave kažejo, da je pretvorba XDH v XO prepočasna, da bi bila ključna za mehanizem nastanka poškodbe. Povečana aktivnost celotnega encima ne glede na obliko kot posledica ishemije ali povečana koncentracija substratov naj bi bila dovolj za povišano tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (2). Pri poškodbi organov, bogatih s XO, se ta lahko sprosti v krvni obtok in veže na glikozaminoglikane na površini žilnega endotelija, kjer proizvaja reaktivne kisikove zvrsti. Te povzročijo disfunkcijo endotelija in s tem prispevajo k poškodbi organov, ki so oddaljeni od mesta prvotne poškodbe in sami vsebujejo nizke koncentracije encima, npr. pljuč (2, 12). Večorganska odpoved je pogost vzrok smrti kritično bolnih pacientov, o njej pa so poročali po ishemiji črevesja, jeter, skeletnih mišic in srca (2).

Številne študije na živalskih modelih kažejo, da alopurinol in oksipurinol omilita okvare tkiv pri reperfuziji po ishemiji, npr. po miokardnem infarktu, možganski kapi in hemoragičnem šoku. Poleg tega se je izkazalo, da ima inaktivacija XO z zamenjavo molibdena v aktivnem mestu XO z volframom podoben protektivni učinek. To kaže, da je XO ena od potencialnih tarč v terapiji ishemičnih stanj in z njimi povezanih motenj (12).

1.2.3. Srčno-žilne in vnetne bolezni

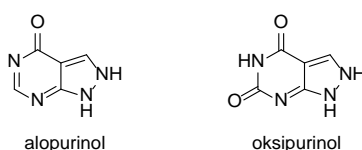
Alopurinol na živalskih modelih srčnega popuščanja, arterijske hipertenzije in ateroskleroze deluje kardioprotektivno in izboljšuje funkcijo srca in ožilja, kar je v nekaterih primerih podprto tudi s kliničnimi študijami. Povišane ravni XO naj bi prispevale

k oksidativnemu stresu pri patogenezi omenjenih bolezni. O pozitivnih učinkih terapije z alopurinolom poročajo tudi pri vnetnih boleznih, kot sta revmatoidni artritis in kolitis (12).

1.3. ZAVIRALCI KSANTIN-OKSIDAZE

1.3.1. Alopurinol in oksipurinol

Alopurinol (slika 5) je analog hipoksantina, ki ga je leta 1966 FDA odobrila za zdravljenje protina. Pri nizkih koncentracijah je kompetitivni inhibitor in substrat XO, pri višjih pa njen nekompetitivni inhibitor (12).

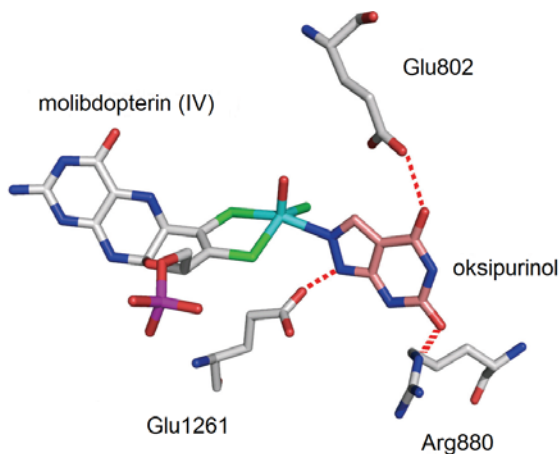


Slika 5 Strukturni formuli alopurinola in oksipurinola

Prek XO se metabolizira do aktivnega metabolita oksipurinola, ki je analog ksantina. Oksipurinol (slika 5) je nekompetitivni inhibitor XO in odgovoren za večino učinka alopurinola (12). Tvori kompleks z reducirano Mo(IV) obliko molibdopterinskega kofaktorja (slika 6). Dušikov atom N-1 oksipurinola zamenja ekvatorialni hidroksilni ligand molibdenovega atoma. Karbonilni skupini na mestih 4 in 6 tvorita vodikovi vezi z Glu 802 in Arg 880, dušikov atom N-3 pa z Glu 1261 (13). Encim se reaktivira z razpadom kompleksa po spontani ponovni oksidaciji kovinskega atoma ($t_{1/2} = 300$ min pri 25 °C) (14). Za doseg kliničnega učinka so zato potrebni vsaj trije visoki odmerki alopurinola dnevno (15).

Alopurinol ima nizko incidenco neželenih učinkov, kamor v glavnem sodijo gastrointestinalne motnje in blažje alergijske reakcije (10). Pri manj kot 2 % zdravljenih pa pride do hudih življenjsko ogrožujočih toksičnih učinkov (8). Preobčutljivostne reakcije vključujejo povišano telesno temperaturo, izpuščaje, hepatitis, odpoved ledvic (7), depresijo kostnega mozga, vaskulitis, eozinofilijo in Stevens-Johnsonov sindrom (oblika epidermalne nekrolize) (12). Pogostost neželenih učinkov je večja pri ledvični insuficienci, sočasni diuretični terapiji ali ponovni uvedbi zdravila po alergični reakciji nanj (8). Ker se alopurinol in oksipurinol izločata prek ledvic, obstajajo smernice za prilagoditev odmerka v primeru ledvičnega popuščanja, vendar znižanje odmerka pogosto zmanjša učinkovitost

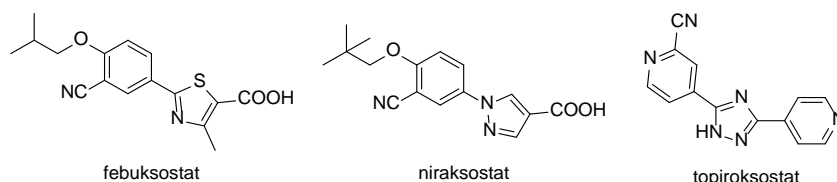
terapije (9). Pozorni moramo biti tudi glede interakcij z drugimi zdravili. Alopurinol namreč zvišuje plazemske koncentracije azatioprina, 6-merkapopurina in varfarina, ki se presnavljajo preko XO (7).



Slika 6 Oksipurinol v vezavnem mestu (PDB koda 3BDJ; povzeto po 13)

1.3.2. Nepurinski sintezni zaviralci - febeksostat, niraksostat in topioksostat

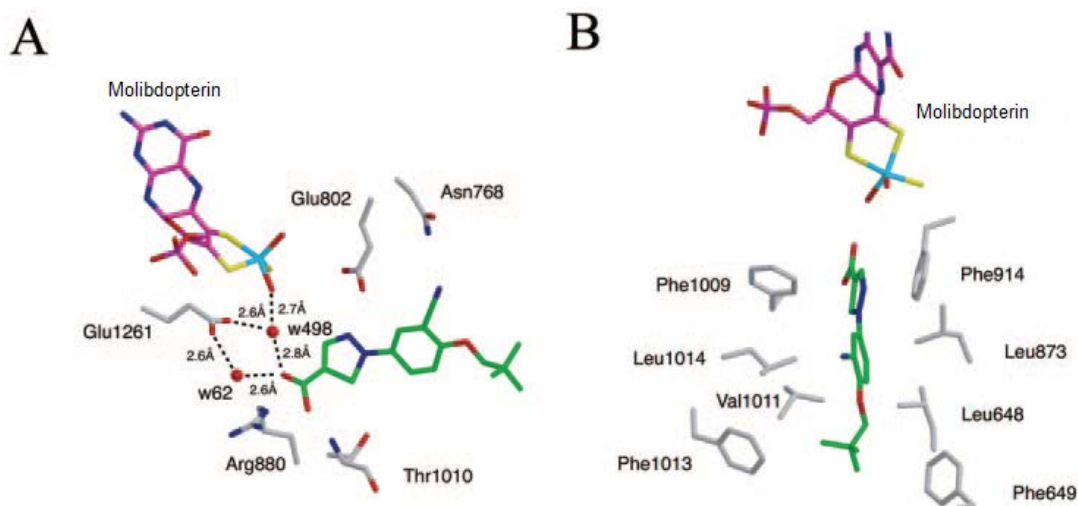
Leta 2008 je EMA odobrila febeksostat (slika 7) za zdravljenje protina, leto kasneje ji je sledila še FDA (14). V strukturi in mehanizmu delovanja se močno razlikuje od alopurinola (15). Zelo podoben mu je niraksostat (Y-700), ki še ni v klinični uporabi (16).



Slika 7 Nepurinski sintezni inhibitorji XO

Kristalna struktura goveje XO z niraksostatom (PDB koda 1VDV) kaže, da se ne veže na aktivno mesto encima, pač pa zapolni kanal, ki vodi do njega in s tem prepreči dostop substratom (slika 8). Pirazolni obroč se nahaja v bližini molibdenovega atoma. Vrinjen je med fenilna obroča aminokislinskih ostankov Phe 914 in Phe 1009 in tvori z njima π - π interakcije. Dušikov atom obroča tvori vodikove vezi s karboksilno skupino Glu 802. Karboksilat niraksostata tvori vodikove vezi s karboksilno skupino Glu 1261 preko dveh ohranjenih molekul vode. Prav tako tvori elektrostatske interakcije z gvanidinijevo skupino Arg 880. Opazimo lahko tudi interakcije z amidno skupino Thr 1010. Fenilni obroč zaviralca leži med stranskima skupinama Leu 873 in Leu 1014. Nanj vezana nitrilna skupina tvori vodikove vezi z amidom stranske verige Asn 768. 2,2-Dimetilpropoksi

skupina pa leži v hidrofobnem žepu, ki ga tvorijo aminokisline Leu 648, Phe 649, Val 1011 in Phe 1013 (16). Febuksostat izkorišča podobne interakcije v aktivnem mestu (PDB koda 1N5X) (15), vendar bolj zapolni vezavno mesto zaradi večjega žveplovega atoma in metilne skupine na tiazolnem obroču (16).



Slika 8 Niraksostat v vezavnem mestu (PDB koda 1VDV; povzeto po 16)

Ker febuksostat tvori zelo stabilen kompleks tako z oksidirano kot reducirano obliko encima, ima očitne prednosti pred alopurinolom, ki tvori kompleks le z reducirano obliko. Odmerni interval je daljši (enkrat dnevno), odmerek nižji, plazemske koncentracije pa bolj enakomerne (15). Ker se izloča tako prek ledvic kot prek jeter, ni potrebno prilagajati odmerkov pri blažji do zmerni ledvični insuficienci (8). Primeren je tudi za posameznike, ki so preobčutljivi na alopurinol (7). Redek, a resen neželen učinek so kardiovaskularni zapleti, kar preprečuje uporabo pri pacientih z ishemično boleznijo srca in srčnim popuščanjem. Pogosto je tudi povišanje aktivnosti jetrnih encimov (8).

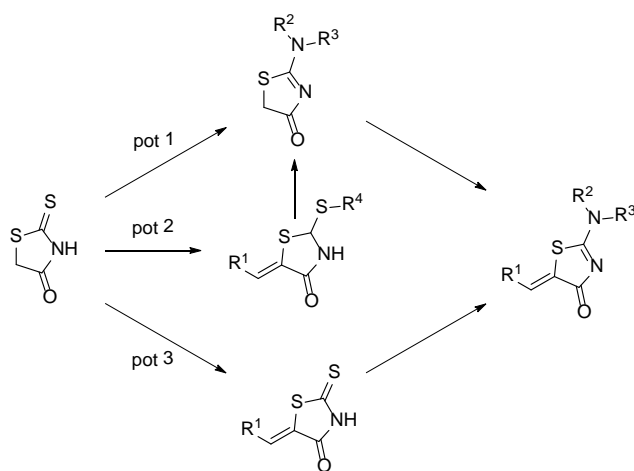
Leta 2011 je na Japonskem dovoljenje za promet dobila učinkovina topiroksostat (slika 7) (14). Gre za hibridni inhibitor, ki deluje po dveh mehanizmih. Podobno kot alopurinol se hidroksilira na mestu 2 pirimidinskega obroča. Kompleks topiroksostata in encima, ki nastane tekom reakcije, ima daljši razpolovni čas kot kompleks oksipurinola in encima ($t_{1/2}$ = 20,4 h za topiroksostat). Hkrati pa topiroksostat deluje kot nekovalentni inhibitor encima (17).

1.4. TIAZOLIDINONI

Spojine, ki v svoji strukturi vsebujejo rodaninski ali sorodne petčlenske heteroatomarne obročje (npr. tiazolidin-2,4-dionski in psevdotiohidantoiniski), se v zadnjem času pogosto pojavljajo v znanstveni literaturi kot potencialne učinkovine na različnih tarčah. Dejstvo je še posebej razvidno po uvedbi tiazolidin-2,4-dionov troglitazona, pioglitazona in rosiglitazona v klinični praksi za zdravljenje sladkorne bolezni tipa II. Na trgu je tudi epalrestat, zaviralec aldehyd reduktaze z rodaninskim skeletom, ki se uporablja za zdravljenje kroničnih zapletov sladkorne bolezni, kot so nevropatije, nefropatije in retinopatije (18). Številni članki poročajo o biološki aktivnosti 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onov na različnih tarčah (19).

1.4.1. Sinteza tiazolidinonov

V literaturi so opisane številne možnosti sinteze 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onov. Pri nekaterih pridemo do želenega skeleta s ciklokondenzacijo iz acikličnih prekurzorjev. Najbolj priročna je sinteza iz rodaninskega skeleta, kjer so možne tri poti (slika 9). Pri prvi tiokarbonilno žveplo rodanina substituira z aminom, kar lahko naredimo neposredno (pot 1) ali po predhodni aktivaciji s tvorbo tioetra (pot 2). Nastali 2-aminotiazol-4-on v drugi stopnji reagiramo z aldehydom po postopku Knoevenagelove kondenzacije. Tretja možnost je, da najprej izvedemo reakcijo med aldehydom in rodaninom, nato pa nastali 5-alkiliden-rodanin substituira z aminom (pot 3).



Slika 9 Sintezne poti 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onov iz rodanina (povzeto po 19)

Vsem trem načinom je skupna dvostopenjska sinteza, dolgi reakcijski časi in zahtevna izolacija. Enostavnejšo alternativo predstavlja enolončna sinteza s pomočjo mikrovalov.

Obe stopnji (Knoevenagelova kondenzacija in substitucija tiokarbonilnega žvepla z aminom) potečeta zaporedno brez izolacije vmesnih stopenj. Reakcijski časi so kratki, izolacija pa ob izbiri ustreznega topila preprosta (19). To nam omogoča sintezo velikega števila spojin v kratkem času. Mehanizem reakcije je podrobneje opisan v poglavju 5.1.

1.4.2. Delovanje tiazolidinonov na ksantin-oksidozo

Anderluh in sodelavci so sintetizirali knjižnico tridesetih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onov in v sodelovanju z raziskovalci z Univerze v Nišu testirali njihovo delovanje na komercialno XO iz govejega mleka in XO iz homogenata podganjih jeter. 19 spojin inhibira XO iz govejega mleka z IC_{50} pod $50 \mu\text{g/mL}$, medtem ko je takšnih spojin pri XO iz podganjih jeter 8. Kot posebej učinkovite so se na obeh sistemih pokazale spojine s 4-cianobenzilidenskim substituentom, na komercialni XO pa tudi tiste z (indol-3-il)metilenskim (20). Več informacij o knjižnici in testiranjih se nahaja v poglavju 2.

1.4.3. Delovanje tiazolidinonov na druge tarče

Omenjene spojine so testirali tudi glede na protimikrobno delovanje. Vse delujejo na *P. aeruginosa*, glede na minimalno inhibitorno koncentracijo pa je najučinkovitejša primerljiva z doksiciklinom. Večina zmerno do močno zavira rast *B. subtilis* in *S. aureus*, nobena pa nima učinka na *S. typhimurium* in *E. coli*. Inhibitorno delovanje se je pokazalo tudi pri *C. albicans*. Ne izkazujejo citotoksičnosti na celicah HEK-293 linije. Mehanizem protibakterijskega delovanja ni raziskan, vendar so za sorodne spojine ugotovili, da zavirajo UppS (21). Isto knjižnico so testirali kot zaviralce lipidne peroksidacije. Vse spojine delujejo zaviralno, najboljše so enako ali bolj učinkovite od antioksidantov, kot so troloks, kvercetin in L-askorbinska kislina. Sklepajo da je za delovanje ključen 5-metiliden-tiazol-4-onski del molekule (22).

1.5. PROBLEMATIKA PAINS SPOJIN

Reševanje visoke zmogljivosti (*ang.* High Throughput Screening oz. HTS) je temeljna metoda, s pomočjo katere farmacevtska podjetja in nekatere akademske ustanove odkrivajo ustrezne spojine vodnice z delovanjem na tarčne molekule (23). Med tako dobljenimi zadetki se pojavljajo tudi lažno pozitivni, pri katerih aktivnost ni posledica specifične reverzibilne interakcije s tarčo. Tovrstne spojine lahko kovalentno reagirajo s proteini

tarče, tvorijo agregate, kelirajo kovinske ione ali pa neposredno motijo detekcijo z absorpiranjem svetlobe ali fluoresciranjem (23, 24). Leta 2010 je Jonathan Baell s sodelavci objavil članek, v katerem je izpostavil več skupin spojin, ki se v literaturi pogosto pojavljajo kot zadetki v rešetanjih na različnih in nesorodnih tarčah. Poimenoval jih je s kratico PAINS (*ang. pan assay interference compounds*), njihovo aktivnost pa pripisuje prej omenjenim nespecifičnim načinom interakcije (23).

V tem pogledu so pogosto omenjene spojine s 5-alkiliden-rodaninskim skeletom, pa tudi njegovi 2-okso in 2-imino (oziroma njihova tautomerna 5-alkiliden-2-amino-tiazol-4-onska oblika) derivati. Zaradi eksociklične dvojne vezi, konjugirane s karbonilno skupino, naj bi bile reaktivni Michaelovi akceptorji (23). Kot take lahko že pri fizioloških pogojih kovalentno reagirajo z nukleofili, kot sta ditiotreitol in glutation (25), dokazali pa so tudi kovalentno vezavo na tiolne skupine cisteinskih stranskih verig tarčnih proteinov (26). V nekaterih primerih reakcijo inducira svetloba (27).

Eden možnih načinov nespecifične inhibicije je tudi tvorba agregatov v vodnih raztopinah (28). Shoichet in sodelavci so testirali serijo spojin, ki se pojavljajo kot pogosti HTS zadetki. Ugotovili so, da pri 10-1000 μM koncentracijah tvorijo delce velikosti 100-1000 nm, na površino katerih se adsorbira encim. Največkrat gre za policiklične aromatske, hidrofobne, planarne in rigidne molekule (29, 30). Nizke koncentracije neionskih površinsko aktivnih snovi (npr. Triton X-100) preprečijo adsorpcijo encima na površino agregatov, višje pa preprečijo nastanek agregatov (30).

Znano je, da rodanini interagirajo z ioni prehodnih kovin, pri čemer je možno, da k interakciji prispevajo hidroksilne in karboksilne skupine, če so prisotne v strukturi (23). Kot obarvane spojine lahko motijo tudi fotometrične meritve, če absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini detekcije (23, 28).

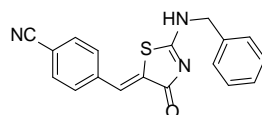
Baell torej rodanine ter sorodne spojine označuje kot PAINS in poziva k njihovi izključitvi iz knjižnic že pred rešetanjem v izogib omenjeni problematiki (23, 24). Poskusi določitve odnosa med strukturo in aktivnostjo teh molekul so namreč mnogokrat težavni, enako poskusi optimizacije spojin z namenom dosega večje selektivnosti in jakosti, zato naj bi bile popolnoma neprimerne za nadaljnji razvoj (28). Po drugi strani pa Mendgen s sodelavci na podlagi testiranja več kot sto spojin z rodaninskim, tiazolidin-2,4-dionskim, hidantoiniskim in tihidantoiniskim skeletom na različnih tarčah in analiziranja njihovih

lastnosti priporoča le previdnost pri obravnavi rezultatov bioloških testiranj (31). Rodanine kot začetne zadetke rešetanj je vsekakor potrebno obravnavati kritično, saj obstaja upravičen sum, da v veliko primerih niso uporabni v zgodnjih stopnjah odkrivanja novih zdravilnih učinkovin. Zaradi možnosti neselektivnega delovanja so tako še pomembnejše lastnosti testnega sistema. Ti naj bi bili robustni, specifični in naj bi omogočali vpogled v selektivnost delovanja preiskovane spojine. Hkrati je potrebno izključiti možnost, da spojina deluje po enem od naštetih nespecifičnih mehanizmov inhibicije (28).

2. NAČRT DELA

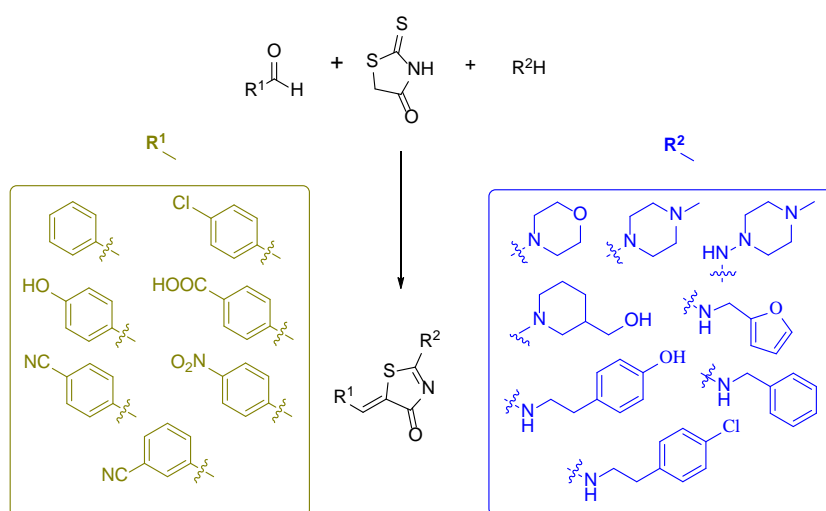
Cilj magistrske naloge je priprava knjižnice spojin z 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onskim skeletom, s pomočjo katere bi raziskali kemijski prostor substitucije na mestu 2 in 5 tiazolin-4-onskega obroča. Naloga zajema sintezo, izolacijo in čiščenje spojin, katerih ustreznost bomo potrdili z uporabo primernih analitskih tehnik. Spojine bomo poslali na biološka testiranja zaviranja komercialne XO iz govejega mleka in XO v homogenatu podganjih jeter, na podlagi katerih bomo ovrednotili delovanje na encim. S pomočjo rezultatov bomo poskusili ugotoviti, katere izkazujejo afiniteto in so primerni zadetki za nadaljnji razvoj.

Raziskovanje predstavlja nadaljevanje dela Anderluha in sodelavcev s Katedre za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, ki so sintetizirali serijo tridesetih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onov in v sodelovanju s kolegi z Univerze v Nišu testirali njihov zaviralni učinek na XO (20). Strukturno lahko spojine razdelimo na tri dele. Osrednji del predstavlja tiazolin-4-onski obroč. Na mestu 5 obroča je vezan alkilidenski del, na mestu 2 pa aaminski del. Ugotovili so, da na vezavo ugodno vplivata benzilamino skupina na mestu 2 in 4-cianobenzilidenska skupina na mestu 5 tiazol-4-onskega obroča. Kot najučinkovitejši se je tako izkazal (Z)-4-((2-(benzilamino)-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)benzoni-tril (slika 10). Spojina se glede na *in silico* rezultate sidranja v vezavno mesto XO veže tako, da je aaminski del globoko v notranjosti, benzamidinski del s polarno ciano skupino pa je v stiku s topilom. Takšna vezava pomeni manjše entropijske izgube (20).



Slika 10 (Z)-4-((2-benzilamino-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)-metil)benzonitril

Z izdelavo nove knjižnice želimo razširiti nabor potencialnih zaviralcev XO, saj bo šlo ravno tako za 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-one. Osrednji tiazolin-4-onski skelet bo ostal nespremenjen, uvedli pa bomo nove substituentne (slika 11). Pri arilmetilidenskem delu se bomo omejili na različne *para*- in *meta*-substituirane benzilidenske fragmente, ki jih bomo uvedli z ustreznimi benzaldehidi. Zlasti nas zanimajo spojine s karboksilno skupino. Ta je namreč ključen substituent v molekulah feboksostata in niraksostata, kjer sodeluje v interakcijah z aktivnim mestom. Zanima nas tudi njen vpliv na orientacijo zaviralcev v vezavnem mestu. Kar se tiče aminskega dela molekule, pa želimo sintetizirati po nekaj predstavnikov s sekundarno in terciarno amsko skupino, ki jih bomo dobili s pripenjanjem primarnih in sekundarnih aminov. Eden izmed pomembnejših ciljev je uvedba polarnih skupin (hidroksilne in karboksilne) v strukturo na obeh koncih molekule. Zanimajo nas zaradi možnosti tvorbe interakcij z vezavnim mestom, poleg tega pa si želimo povečati topnost zaviralcev z namenom povečanja biološke uporabnosti in zmanjšanja možnosti njihove agregacije v raztopinah. Spojine bomo sintetizirali po metodi, ki jo je razvil Anderluh s sodelavci (19). Ustreznost sintetiziranih spojin bomo preverili s snemanjem $^1\text{H-NMR}$ in $^{13}\text{C-NMR}$ spektrov ter masnih spektrov visoke ločljivosti. Dodatno bomo spojine opredelili še s snemanjem infrardečih spektrov in določanjem tališč.



Slika 11 Sintezni načrt

Z metodami molekulskega sidranja bomo skušali predvideti način vezave sintetiziranih zaviralcev na XO. S tem bomo dobili predstavo o naravi interakcij med molekulami zaviralcev in encimom. Knjižnico bomo poslali na biološka testiranja, kjer bodo ovrednotili inhibitorno delovanje učinkovin na tarčo. V kombinaciji z rezultati sidranja bomo lahko ugotovili, kateri strukturni elementi so najugodnejši in primerni za nadaljnji razvoj.

2.1. DOKAZOVANJE SPECIFIČNEGA MEHANIZMA DELOVANJA

Načrtovane spojine spadajo v razred predhodno omenjenih PAINS spojin. Zato se bomo v okviru raziskovalnega dela poskusili prepričati, da morebitna aktivnost testiranih spojin ni posledica neselektivnega delovanja ali vpliva na testni sistem. V ta namen bomo izbrali nekaj spojin iz sintetizirane knjižnice in na njihovem primeru skušali dokazati, da ne delujejo po nespecifičnih mehanizmih in so primerne za nadaljnji razvoj.

Najbolj nas zanima morebitna nespecifična reaktivnost 5-alkiliden-tiazol-4-onov, ki so glede na literaturo Baella možni Michaelovi akceptorji. Spojine bomo izpostavili dvema tipoma nukleofilov in sicer aminu in tiolu, s katerima bomo bomo v seriji poskusov mešali dve izmed sintetiziranih spojin. Sproti bomo opazovali, če prihaja do kakršnih koli sprememb v zmesi, ki bi kazale na potek kemijske reakcije.

Z metodo dinamičnega sipanja svetlobe bomo preučili težnjo spojin k tvorbi agregatov v raztopinah. S spektrofotometričnimi metodami bomo določili, v katerem območju valovnih dolžin raztopine izbranih spojin absorbirajo svetlobo. Ta podatek je uporaben pri ugotavljanju vpliva absorpcije svetlobe na rezultate testov, ki vključujejo spektrofotometrične in fluorimetrične meritve.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Reagenti in topila

Uporabili smo reagente in topila proizvajalcev *Acros*, *Carlo Erba*, *Fluka*, *Merck*, *Panreac* in *Sigma-Aldrich*.

3.2. Metode

3.2.1. Sinteza s pomočjo mikrovalov

Sinteze končnih spojin smo izvajali v mikrovalovnem reaktorju *DiscoverTM* (proizvajalec *CEM Corporation*). Reakcije so potekale v 10 mL steklenih vialah, zamašenih s septumom in opremljenih z magnetnim mešalom.

3.2.2. Odstranjevanje topil

Topila smo iz produktov odstranjevali tako, da smo temeljito uprašili trdno snov in jo trikrat izmenično suspendirali v dietiletru ter ga uparili na rotavaporju. Nazadnje smo preostanek 5 ur sušili s pomočjo vakuumske črpalke.

3.2.3. Kromatografske metode

a) Tankoplastna kromatografija

Potek reakcij smo spremljali z aluminijastimi ploščicami TLC Silica gel 60, označenih s fluorescenčnim indikatorjem F₂₅₄ (proizvajalec *Merck*). Lise smo opazovali pod UV lučjo pri valovni dolžini 254 nm. Ploščice smo po potrebi orosili z ninhidrinom ali fosfomolibdensko kislino.

b) Kolonska kromatografija

Za stacionarno fazo smo uporabljali Silica gel 60 z velikostjo delcev 0,040-0,063 nm (proizvajalec *Merck*).

Pri tankoplastni in kolonski kromatografiji smo uporabili različne mobilne faze, ki so navedene v poglavju Eksperimentalno delo pri vsakem reakcijskem postopku posebej.

3.2.4. Spektroskopske metode

a) Jedrska magnetna resonanca

^1H in ^{13}C spektre spojin smo posneli s spektrometrom Bruker AVANCE 400 DPX (400 MHz) na Fakulteti za Farmacijo. ^1H spektre smo snemali pri 400 MHz, ^{13}C pa pri 100 MHz. Vzorce smo raztopili v DMSO- d_6 , CDCl_3 ali MeOD- d_4 . Snemali smo pri temperaturi 298 K. Kot interni standard smo uporabili tetrametil silan (TMS).

b) Masna spektroskopija

Masne spektre so posneli s spektrometrom VG-Analytical Autospec Q (proizvajalec *Micromass*) v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan. Uporabili so ESI metodo ionizacije.

c) Infrardeča spektroskopija

Infrardeče spektre smo posneli s spektrometrom Thermo Nicolet FT-IR Nexus (proizvajalec *Nicolet Instrument Corporation*) z ATR tehniko.

d) UV-VIS spektrofotometrija

Spektrofotometrične meritve smo izvajali na Cary 50 Conc UV-VIS spektrofotometru (proizvajalec *Agilent Varian*). Gre za dvožarkovni sistem, vir svetlobe je ksenonska bliskavica.

3.2.5. Določanje tališča

Tališča smo določali s pomočjo Koflerjevega talilnega mikroskopa z ogrevalno mizico (proizvajalec *Leica*) in so nekorrigirana.

3.2.6. Določanje prisotnosti agregatov

Prisotnost agregatov v raztopinah in porazdelitev velikosti delcev smo določali z metodo dinamičnega sipanja svetlobe z aparaturo Zetasizer Nano ZS (proizvajalec *Malvern Instruments*).

3.2.7. Molekulsko sidranje

Za študije sidranja smo uporabljali programski paket OpenEye Scientific Software.

a) Priprava ligandov

Strukture spojin smo pripravili z uporabo programa ChemBioDraw Ultra 14.0 in celotno knjižnico shranili v sdf. formatu. S programom OMEGA 2.5.1.4 (32) smo izdelali

konformere za vsak ligand in jih shranili v formatu oeb.gz. Uporabili smo nastavitve flipper true, maksimalno število konformerov 200 in rms 0,5. Ostale nastavitve so bile privzete. Procesiranih je bilo 28 spojin. Program je porabil 0,19 sekund na molekulo. Povprečna količina rotorjev je bila 3,71, povprečna količina konformerov pa 55,6.

b) Priprava receptorja

Kot referenčno strukturo smo uporabili kristalno strukturo XO iz govejega mleka z vezanim ligandom febuksostatom (PDB koda 1N5X). S programom Make Receptor 3.0.1 smo ustvarili receptor dimenzij 15,00 Å x 16,00 Å x 22,67 Å. Pri ustvarjanju oblike vezavnega mesta smo nastavili možnost »balanced shape formation«. Zunanji volumen obrisa (outer contour volume) je znašal 1093 Å³. Restriktorjev nismo uporabili. Receptor smo shranili v formatu oeb.

c) Sidranje

Ustvarjene ligande smo sidrali v receptor s programom FRED (OEDocking 3.0.1) (33). Uporabili smo visoko resolucijo sidranja, ostale nastavitve so bile privzete. Protokol smo validirali z vezavo febuksostata.

3.2.8. Ostala programska oprema

Za risanje kemijskih struktur in reakcijskih shem, IUPAC poimenovanje spojin ter računanje molekulskih mas smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 14.0 (CambridgeSoft). Za računalniško obdelavo ¹H in ¹³C spektrov smo uporabili program MestRec 4.8.6. (Mestrelab Research), za obdelavo IR spektrov pa EZ Omnic E.S.P. 5.2 (Nicolet Instrument Corporation). Znanstvene članke smo iskali s pomočjo baz podatkov PubMed in SciFinder.

3.2.9. Biološka testiranja

a) Inhibicija komercialne XO

Za *in vitro* vrednotenje encimske inhibicije uporabimo komercialno XO iz govejega mleka (kupljeno od Sigma-Aldrich) in spektrofotometrično določamo nastanek sečne kisline pri 293 nm. Inhibicije izvajamo v epruветah z reakcijskimi zmesmi (skupni volumen 2150 µL), pripravljenimi po naslednjih postopkih: (i) *Testni vzorci* vsebujejo 0,01 enote XO, preučevano spojino, razredčeno v DMSO (končna koncentracija DMSO znaša 4,65 % v/v), 232,5 µM koncentracijo ksantina (Serva) in 46,5 mM pufer TRIS-HCl (pH 7,8); (ii)

kontrolne topila vsebujejo enako količino XO, ustrezno količino DMSO, ksantin in pufer TRIS-HCl; (iii) *kontrolni vzorci* vsebujejo enako količino XO, ksantin in pufer TRIS-HCl, katerega količina je prilagojena na isti volumen; (iv) *testni vzorci substrata* so vzorci, ki vsebujejo le XO, preučevano spojino, razredčeno v DMSO in pufer TRIS-HCl, z njihovo pomočjo pa ugotovimo, če so preučevane spojine substrati XO. Na isti način kot testne raztopine (i-iv) pripravimo tudi ustrezne slepe vzorce za vsako skupino. Epruvete inkubiramo 15 minut pri 37 °C. Reakcijo ustavimo z dodatkom 100 µL perklorove kisline. Odstotek inhibicije encima določimo z merjenjem razlike v absorbanci, ki korelira z nastankom sečne kisline; izračunamo jo kot odstotek spremembe glede na kontrolo topila. DMSO v končni koncentraciji 4,65 % v/v ne vpliva na encimski test. Preučevane spojine se v vseh vzorcih nahajajo v koncentraciji 150 µM. Tiste, pri katerih je odstotek inhibicije pri tej koncentraciji nad 50 %, testiramo v širšem območju koncentracij, da bi izračunali vrednosti IC₅₀. Pri vsaki krivulji uporabimo vsaj štiri koncentracije inhibitorja s tremi ponovitvami pri vsaki. Za pozitivno kontrolo uporabimo alopurinol in kvercetin.

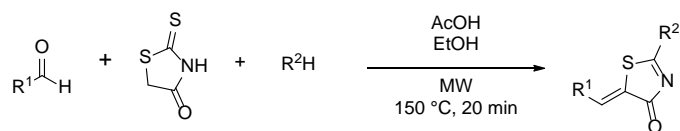
b) Inhibicija XO iz homogenata podganjih jeter

Inhibicijo aktivnosti XO v homogenatu podganjih jeter vrednotimo s spektrofotometrično metodo. Reakcijske zmesi (skupni volumen 2200 µL) pripravimo po naslednjih postopkih: (i) *Testni vzorci* vsebujejo 100 µL 10 % homogenata podganjih jeter, preučevano spojino, razredčeno v DMSO (končna koncentracija DMSO znaša 4,55 % v/v), 454,5 µM koncentracijo ksantina (*Serva*) in 46,5 mM pufer TRIS-HCl (pH 7,8); (ii) *kontrolne topila* vsebujejo enako količino homogenata podganjih jeter, ustrezno količino DMSO, ksantin in pufer TRIS-HCl; (iii) *kontrolni vzorci* vsebujejo enako količino homogenata podganjih jeter, ksantin in pufer TRIS-HCl, katerega količina je prilagojena na isti volumen. Na isti način kot testne raztopine (i-iii) pripravimo tudi ustrezne slepe vzorce za vsako skupino. Epruvete inkubiramo 15 minut pri 37 °C. Reakcijo ustavimo z dodatkom 100 µL perklorove kisline. Inhibicijo izračunamo kot odstotek spremembe glede na kontrolo topila. DMSO v končni koncentraciji 4,65 % v/v ne vpliva na encimski test. Preučevane spojine se v vseh vzorcih nahajajo v koncentraciji 150 µM. Tiste, pri katerih je odstotek inhibicije pri tej koncentraciji nad 50 %, testiramo v širšem območju koncentracij, da bi izračunali vrednosti IC₅₀. Pri vsaki krivulji uporabimo vsaj štiri koncentracije inhibitorja s tremi ponovitvami pri vsaki. Za pozitivno kontrolo uporabimo alopurinol in kvercetin.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPKI

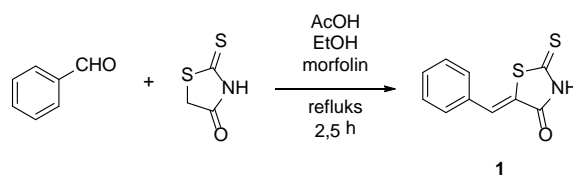
4.1.1. Splošni postopek sinteze in izolacije 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onov



Suspenziji rodanina (0,500 g, 3,75 mmol, 1,0 ekv.) v absolutnem etanolu (3 mL) dodamo aldehyd (7,50 mmol, 2,0 ekv.), amin (4,13 mmol, 1,1 ekv.) in ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol, 0,1 ekv.). Reakcijsko zmes mešamo in segrejemo v mikrovalovnem reaktorju do temperature 150 °C, pri čemer hitrost segrevanja ne preseže 2 °C/s (najvišja dovoljena moč segrevanja 20 W, najvišji dovoljeni tlak v reakcijski viali 20 bar). Reakcija poteka 20 minut pri 150 °C. Reakcijsko zmes nato ohladimo na ledu, izpadli produkt odfiltriramo z odsesavanjem, speremo z ledeno hladnim absolutnim etanolom in posušimo na zraku.

4.2. SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ

4.2.1. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-tioksotiazolidin-4-ona (**1**)



Suspenziji rodanina (5,00 g, 37,5 mmol, 1,0 ekv.) v absolutnem etanolu (50 mL) dodamo benzaldehid (7,63 mL, 75,1 mmol, 2,0 ekv.), morfolin (0,100 mL, 1,125 mmol, 0,03 ekv.) in ledocet (0,063 mL, 1,125 mmol, 0,03 ekv.). Reakcijsko zmes mešamo pri temperaturi refluxa 2,5 h. Nato jo ohladimo na ledu, izpadli produkt odfiltriramo z odsesavanjem, speremo z ledeno hladnim absolutnim etanolom in posušimo na zraku.

Molekulska formula: C₁₀H₇NOS₂

Relativna molekulska masa (izračunana): 221,29

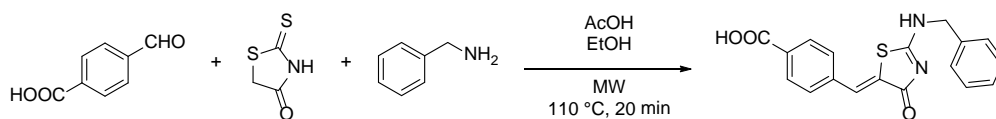
Opis: rumeni kristali

η: 93 % (7,70 g)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 7.52-7.58 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.61-7.63 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.67 (s, 1H, CH) ppm.

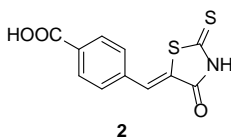
4.2.2. Sinteza (Z)-4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzojske kisline

(2)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-karboksibenzaldehid (1,126 g, 7,50 mmol), benzilamin (0,45 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL). **Modifikacija splošnega postopka:** Reakcijsko zmes segrevamo do 110 °C namesto 150 °C. Produkt izoliramo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM/MeOH = 1/1 z dodanim 1 % AcOH). Ustrezne frakcije uparimo.

¹H-NMR spekter izoliranega produkta je pokazal, da je reakcija potekla nepopolnoma in da v reakcijski zmesi prevladuje produkt Knoevenagelove kondenzacije:



Molekulska formula: C₁₁H₇NO₃S₂

Relativna molekulska masa (izračunana): 265,30

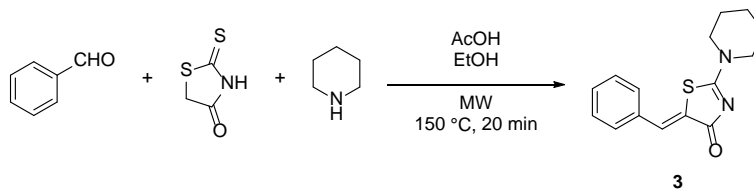
Opis: rumeni kristali

η: 9,3 % (0,118 g)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 7.67-7.73 (m, 3H, CH_{Ar} in CH), 8.06 (d, *J* = 8.37 Hz, 2H, CH_{Ar}), 13.22 (s, 1H, COOH) ppm.

V spektru je videti tudi signale želenega produkta (**15**), ki se je tvoril v manjši meri.

4.2.3. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-(piperidin-1-il)thiazol-4(5H)-ona (3)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), benzaldehid (0,76 mL, 7,50 mmol), piperidin (0,41 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL).

Molekulska formula: C₁₅H₁₆N₂OS

Relativna molekulska masa (izračunana): 272,37

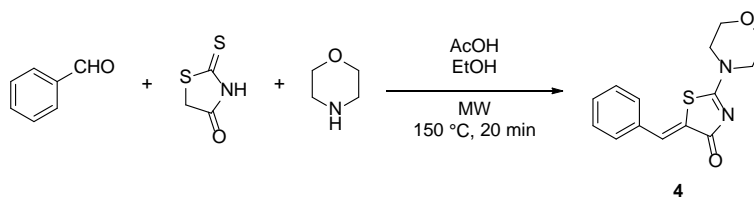
Opis: rumeni kristali

η: 71 % (0,731 g)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1.63-1.68 (m, 6H, NCH₂CH₂ in NCH₂CH₂CH₂), 3.63 (m, 2H, NCH₂), 3.90-3.92 (m, 2H, NCH₂), 7.42-7.47 (m, 1H, CH_{ar}), 7.52 (t, *J* = 7.50 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.63-7.65 (m, 3H, CH_{ar} in CH) ppm.

Ostalih analiz nismo potrebovali, saj je šlo za ponovno sintezo že znane spojine (19).

4.2.4. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-morfolinotiazol-4(5H)-ona (4)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), benzaldehid (0,76 mL, 7,50 mmol), morfolin (0,36 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL).

Molekulska formula: C₁₄H₁₄N₂O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 274,34

Opis: rumeni kristali

η: 82 % (0,845 g)

R_f: 0,48 (2 % MeOH v DKM)

Tališče: 201-204 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 1.06 (t, EtOH), 3.68 (t, *J* = 4.57 Hz, 2H, NCH₂), 3.72-3.77 (m, 4H, OCH₂), 3.93 (t, *J* = 5.20 Hz, 2H, NCH₂), 7.44-7.48 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.51-7.55 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.63-7.67 (m, 3H, CH_{Ar} in CH) ppm.

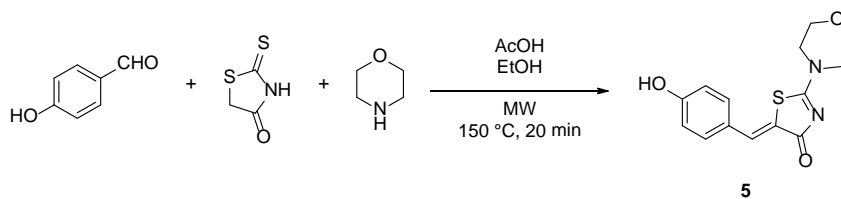
Na spektru je vidno topilo (etanol).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 48.42 (CH₂), 48.61 (CH₂), 65.51 (CH₂), 65.63 (CH₂), 128.30, 129.24 (2C, C_{Ar}), 129.56 (2C, C_{Ar}), 129.85, 130.03, 133.81, 174.41 (C_q), 179.17 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): *m/z* za C₁₄H₁₅N₂O₂S ([M+H]⁺): izr. 275.0854, izm. 275.0849

IR: ν [cm⁻¹] = 3010.73, 2965.07, 2862.89, 1674.13, 1604.18, 1555.41, 1492.38, 1464.68, 1440.36, 1384.27, 1346.35, 1305.48, 1277.53, 1239.20, 1203.96, 1163.35, 1108.58, 1068.15, 1029.50, 1001.05, 964.64, 928.30, 889.13, 848.91, 765.86, 737.79, 689.28, 647.31, 635.11.

4.2.5. Sinteza (Z)-5-(4-hidroksibenziliden)-2-morfolinotiazol-4(5H)-ona (5)



Splošni postopek: rodanin (0,400 g, 3,00 mmol), 4-hidroksibenzaldehid (0,733 g, 6,00 mmol), morfolin (0,29 mL, 3,30 mmol), ledocet (0,017 mL, 0,300 mmol), absolutni etanol (3,0 mL).

Molekulska formula: C₁₄H₁₄N₂O₃S

Relativna molekulska masa (izračunana): 290,34

Opis: oranžni kristali

η: 68 % (0,590 g)

R_f: 0,36 (8 % MeOH v DKM)

Tališče: 248-250 °C

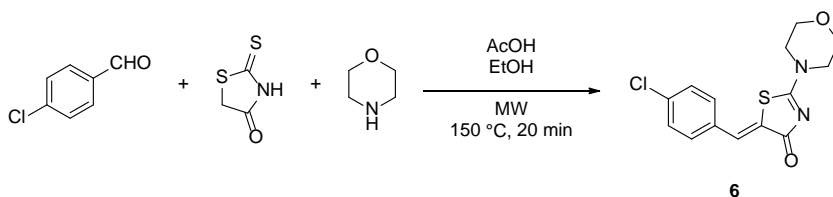
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 3.64-3.66 (m, 2H, NCH₂), 3.71- 3.77 (m, 4H, OCH₂), 3.90-3.92 (m, 2H, NCH₂), 6.91 (d, *J* = 8.66 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.49 (d, *J* = 8.67 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.58 (s, 1H, CH), 10.19 (s, 1H, OH) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 48.22 (CH₂), 48.47 (CH₂), 65.53 (CH₂), 65.63 (CH₂), 116.20 (2C, CH_{Ar}), 124.17, 124.63, 130.57, 131.73 (2C, CH_{Ar}), 159.34, 174.39 (C_q), 179.59 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₄H₁₅N₂O₃S ([M+H]⁺): izr. 291.0803, izm. 291.0801

IR: ν [cm⁻¹] = 2932.24, 1661.67, 1596.03, 1535.85, 1508.09, 1439.12, 1423.99, 1380.61, 1352.95, 1285.84, 1234.23, 1167.67, 1106.96, 1066.27, 1014.06, 933.59, 904.85, 885.40, 829.25, 808.48, 750.73, 717.66, 704.16, 651.30, 608.71.

4.2.6. Sinteza (Z)-5-(4-klorobenziliden)-2-morfolinotiazol-4(5H)-ona (6)



Splošni postopek: rodanin (0,400 g, 3,00 mmol), 4-klorobenzaldehid (0,843 g, 6,00 mmol), morfolin (0,29 mL, 3,30 mmol), ledocet (0,017 mL, 0,300 mmol), absolutni etanol (3,0 mL). Produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v etanolu in filtracijo.

Molekulska formula: C₁₄H₁₃ClN₂O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 308,78

Opis: oranžni kristali

η: 51 % (0,472 g)

R_f: 0,40 (5 % MeOH v DKM)

Tališče: 203-207 °C

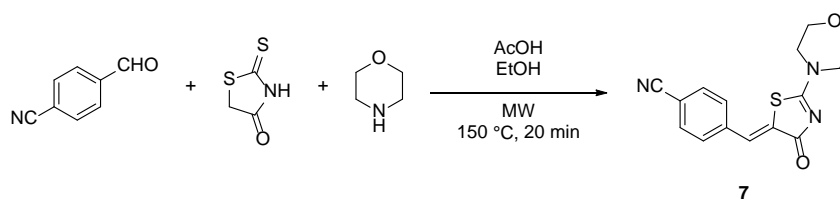
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 3.66-3.77 (m, 6H, OCH₂ in NCH₂), 3.92-3.95 (m, 2H, NCH₂), 7.57-7.66 (m, 5H, CH_{Ar} in CH) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 48.51 (CH₂), 48.67 (CH₂), 65.50 (CH₂), 65.61 (CH₂), 128.69, 129.03, 129.28 (2C, CH_{Ar}), 131.18 (2C, CH_{Ar}), 132.75, 134.35, 174.15 (C_q), 179.02 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₄H₁₄ClN₂O₂S ([M+H]⁺): izr. 309.0465, izm. 309.0468

IR: ν [cm⁻¹] = 2868.54, 1688.68, 1615.73, 1553.09, 1488.20, 1430.90, 1386.61, 1346.84, 1323.55, 1278.91, 1244.29, 1216.41, 1203.34, 1167.34, 1111.24, 1087.59, 1068.48, 1025.47, 999.79, 930.61, 902.71, 886.87, 833.51, 801.60, 747.84, 704.34, 677.05, 650.26, 620.31.

4.2.7. Sinteza (Z)-4-((2-morfolino-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)benzonitrila (7)



Splošni postopek: rodanin (0,400 g, 3,00 mmol), 4-cianobenzaldehid (0,787 g, 6,00 mmol), morfolin (0,29 mL, 3,30 mmol), ledocet (0,017 mL, 0,300 mmol), absolutni etanol (2,5 mL). Produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v etanolu in filtracijo.

Molekulska formula: C₁₅H₁₃N₃O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 299,35

Opis: oranžni kristali

η: 65 % (0,583 g)

R_f: 0,52 (8 % MeOH v DKM)

Tališče: 243-246 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 3.69-3.77 (m, 6H, OCH₂ in NCH₂), 3.93-3.96 (m, 2H, NCH₂), 7.72 (s, 1H, CH), 7.81 (d, *J* = 8.21 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.98 (d, *J* = 8.40 Hz, 2H, CH_{Ar}) ppm.

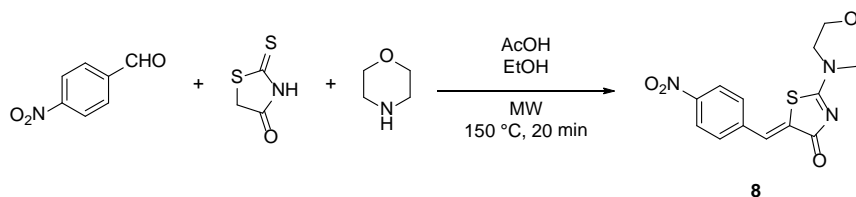
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 30.74 (acetone), 48.70 (CH₂), 48.80 (CH₂), 65.50 (CH₂), 65.63 (CH₂), 111.54, 118.54, 127.99, 130.03 (2C, CH_{Ar}), 131.83, 133.00 (2C, CH_{Ar}), 138.45, 174.06 (C_q), 178.78 (CO) ppm.

Na spektru je vidno topilo (acetone).

HR-MS (ESI): m/z za C₁₅H₁₄N₃O₂S ([M+H]⁺): izr. 300.0807, izm. 300.0803

IR: ν [cm⁻¹] = 3088.72, 2935.32, 2226.55, 1700.81, 1568.87, 1503.33, 1432.81, 1386.78, 1350.16, 1301.48, 1275.74, 1233.97, 1201.78, 1159.45, 1111.50, 1066.99, 1029.93, 1014.90, 995.73, 935.56, 897.98, 883.74, 850.95, 808.87, 758.41, 746.13, 714.38, 660.59, 622.83.

4.2.8. Sinteza (Z)-2-morfolino-5-(4-nitrobenziliden)tiazol-4(5H)-ona (8)



Splošni postopek: rodanin (0,400 g, 3,00 mmol), 4-nitrobenzaldehyd (0,907 g, 6,00 mmol), morfolin (0,29 mL, 3,30 mmol), ledocet (0,017 mL, 0,300 mmol), absolutni etanol (4,0 mL). **Modifikacija splošnega postopka:** Produkt izoliramo iz v reakciji nastalega viskoznega olja z raztapljanjem v etanolu in filtracijo oborine, ki se sčasoma tvori v raztopini. Produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v vrelem etanolu in filtracijo.

Molekulska formula: C₁₄H₁₃N₃O₄S

Relativna molekulska masa (izračunana): 319,34

Opis: oranžni kristali

η: 29 % (0,282 g)

R_f: 0,38 (3 % MeOH v DKM)

Tališče: 257-260 °C

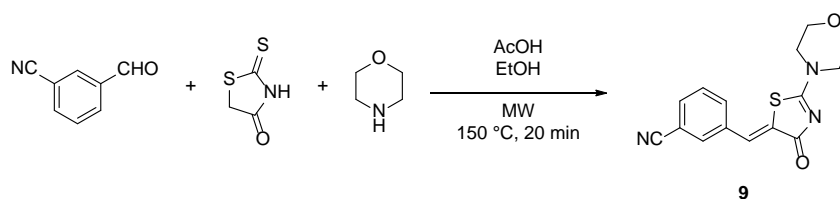
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 3.69-3.79 (m, 6H, OCH₂ in NCH₂), 3.95-3.97 (m, 2H, NCH₂), 7.78 (s, 1H, CH), 7.89 (d, *J* = 8.62 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.34 (d, *J* = 8.84 Hz, 2H, CH_{Ar}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 48.75 (CH₂), 48.84 (CH₂), 65.50 (CH₂), 65.61 (CH₂), 124.28 (2C, CH_{Ar}), 127.51, 130.48 (2C, CH_{Ar}), 132.63, 140.38, 147.21, 174.02 (C_q), 178.66 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₄H₁₄N₃O₄S ([M+H]⁺): izr. 320.0705, izm. 320.0709

IR: ν [cm⁻¹] = 3064.31, 2978.61, 2876.16, 1684.71, 1592.83, 1546.48, 1507.45, 1437.82, 1388.22, 1336.05, 1271.44, 1236.27, 1199.55, 1159.53, 1105.92, 1066.92, 1021.55, 996.71, 929.82, 888.00, 864.47, 838.91, 755.85, 738.55, 708.55, 680.34, 651.36, 622.02.

4.2.9. Sinteza (Z)-3-((2-morfolino-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)benzonitrila (9)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 3-cianobenzaldehid (0,983 g, 7,50 mmol), morfolin (0,36 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL).

Molekulska formula: C₁₅H₁₃N₃O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 299,35

Opis: rumeni kristali

η: 72 % (0,812 g)

R_f: 0,27 (2 % MeOH v DKM)

Tališče: 191-194 °C

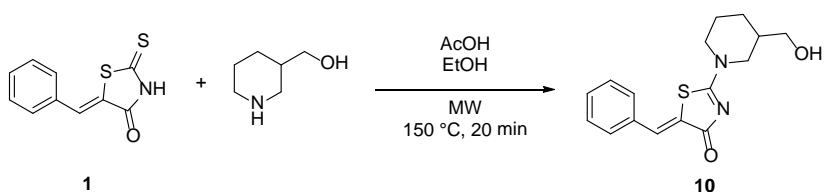
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 3.70-3.77 (m, 6H, NCH₂ in OCH₂), 3.93-3.96 (m, 2H, NCH₂), 7.70-7.75 (m, 2H, CH_{Ar} in CH), 7.90-7.96 (m, 2H, CH_{Ar}), 8.07 (t, J = 1.71 Hz, 1H, CH_{Ar}) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 48.63 (CH₂), 48.77 (CH₂), 65.50 (CH₂), 65.64 (CH₂), 112.41, 118.29, 127.67, 130.42, 130.85, 132.88, 132.93, 133.42, 135.19, 174.11 (C_q), 178.80 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₅H₁₄N₃O₂S ([M+H]⁺): izr. 300.0807, izm. 300.0803

IR: ν [cm⁻¹] = 2981.08, 2870.98, 2229.81, 1690.31, 1615.63, 1553.05, 1477.59, 1463.22, 1442.35, 1425.52, 1382.78, 1345.48, 1279.60, 1233.62, 1208.62, 1167.54, 1148.10, 1110.14, 1065.08, 1028.06, 1006.20, 940.33, 886.77, 863.49, 798.57, 769.28, 744.82, 720.68, 672.86, 649.35.

4.2.10. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-(3-(hidroksimetil)piperidin-1-il)thiazol-4(5H)-ona (**10**)



Suspenziji **1** (0,400 g, 1,81 mmol, 1,0 ekv.) v absolutnem etanolu (1,5 mL) dodamo 3-piperidinmetanol (0,229 g, 1,99 mmol, 1,1 ekv.) in ledocet (0,010 mL, 0,18 mmol, 0,1 ekv.). Reakcijsko zmes mešamo in segrejemo v mikrovalovnem reaktorju do temperature 150 °C, pri čemer hitrost segrevanja ne preseže 2 °C/s (najvišja dovoljena moč segrevanja 20 W, najvišji dovoljeni tlak v reakcijski viali 20 bar). Reakcija poteka 20 minut pri 150 °C. Reakcijsko zmes nato ohladimo na ledu, izpadli produkt odfiltriramo z odsesavanjem in speremo z ledeno hladnim absolutnim etanolom.

Molekulska formula: C₁₆H₁₈N₂O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 302,39

Opis: bež kristali

η: 18 % (0,096 g)

R_f: 0,40 (DKM/MeOH = 9/1)

Tališče: 172-175 °C

¹H NMR (400 MHz): δ: 1.28-1.39 (m, 1H), 1.48-1.62 (m, 1H), 1.68-1.87 (m, 3H), 3.04 (dd, *J*₁ = 12.67 Hz, *J*₂ = 10.84 Hz)* in 3.22-3.45 (m, 4H), 3.77-3.88 (m, 1H)*, 4.47 (d, *J* = 12.76 Hz)* in 4.65 (dd, *J*₁ = 12.69 Hz, *J*₂ = 3.69 Hz, 1H)*, 4.72 (t, *J* = 5.29 Hz)* in 4.79 (t, *J* = 5.15 Hz, 1H)*, 7.45 (t, *J* = 6.96 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.50-7.55 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.63-7.64 (m, 3H, CH_{Ar} in CH) ppm.

Signali, označeni z zvezdico, so prisotni zaradi dveh konformacij.

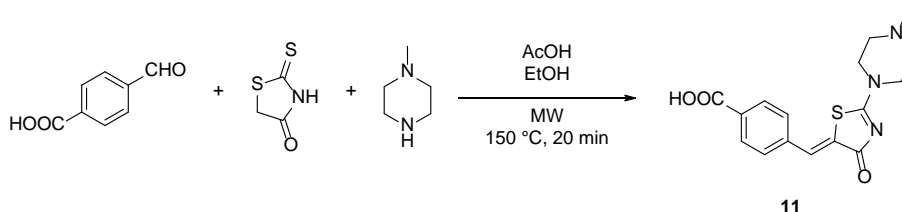
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 23.99, 24.78, 26.21, 26.29, 49.00, 49.74, 51.68, 52.17, 62.86, 63.21, 128.72, 128.82, 129.22, 129.25, 129.51, 129.55, 129.74, 133.90, 173.42, 173.53, 179.36, 179.39 ppm.

Nekateri signali so podvojeni zaradi prisotnosti dveh konformerov.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₆H₁₉N₂O₂S ([M+H]⁺): izr. 303.1167, izm. 303.1162

IR: ν [cm^{-1}] = 3500.56, 2944.69, 1671.45, 1608.68, 1551.94, 1489.46, 1443.81, 1380.63, 1336.84, 1289.59, 1261.11, 1198.92, 1176.66, 1132.49, 1089.00, 1051.93, 1000.70, 956.11, 924.88, 892.26, 848.83, 767.10, 741.40, 692.94, 631.77, 613.03.

4.2.11. Sinteza (Z)-4-((2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)-metil)benzojske kisline (**11**)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-karboksibenzaldehid (1,126 g, 7,50 mmol), 1-metilpiperazin (0,46 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (5 mL). Produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v vrelem metanolu in filtracijo.

Molekulska formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

Relativna molekulska masa (izračunana): 331,39

Opis: rumeni kristali

η : 33 % (0,414 g)

R_f : 0,24 (DKM/MeOH = 9/1 + 1 % AcOH)

Tališče: 288-291 °C

^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ : 2.40 (s, 3H, NCH_3), 2.61-2.68 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_3)\underline{\text{CH}_2}$), 3.75-3.78 (m, 2H, NCH_2), 4.05-4.07 (m, 2H, NCH_2), 7.70 (d, $J = 8.16$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.78 (s, 1H, CH), 8.11 (d, $J = 8.32$ Hz, 2H, CH_{Ar}) ppm.

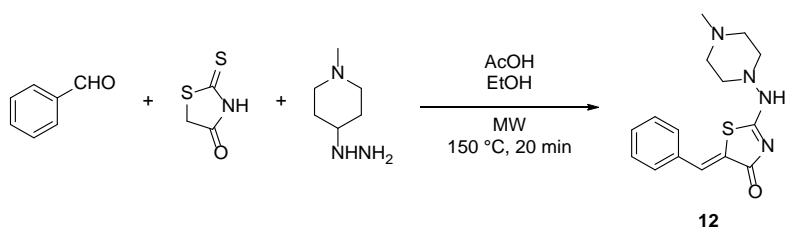
Signal COOH skupine ni viden, verjetno zaradi izmenjave protonov z MeOD.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ : 45.24 (CH_3), 48.02 (CH_2), 48.43 (CH_2), 53.58 (CH_2), 53.91 (CH_2), 128.63, 129.61 (2C, CH_{Ar}), 130.00 (2C, CH_{Ar}), 130.86, 131.28, 137.96, 166.72, 173.87, 179.07 ppm.

HR-MS (ESI): m/z za $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): izr. 332.1069, izm. 332.1071

IR: ν [cm^{-1}] = 2969.92, 1679.81, 1610.93, 1566.19, 1441.53, 1402.19, 1382.44, 1358.57, 1291.29, 1261.58, 1214.43, 1191.39, 1147.25, 1121.50, 1041.25, 988.75, 904.75, 880.11, 853.03, 778.79, 693.56, 654.15, 622.21.

4.2.12. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-((4-metilpiperazin-1-il)amino)tiazol-4(5H)-ona (12)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), benzaldehid (0,76 mL, 7,50 mmol), 1-amino-4-metilpiperazin (0,50 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL).

Molekulska formula: C₁₅H₁₈N₄OS

Relativna molekulska masa (izračunana): 302,40

Opis: oranžni kristali

η: 22 % (0,244 g)

R_f: 0,42 (10 % MeOH v DKM)

Tališče: 152-155 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 1.06 (t, EtOH), 2.09 (s, acetone), 2.85 (s, 3H, CH₃), 3.36 (s, 8H, NCH₂ in N(CH₃)CH₂), 7.32 (t, *J* = 7.27, 1H, CH_{Ar}), 7.39 (t, *J* = 7.32 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.60 (dd, *J*₁ = 8.30 Hz, *J*₂ = 1.24 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.78 (s, 1H, CH) ppm.

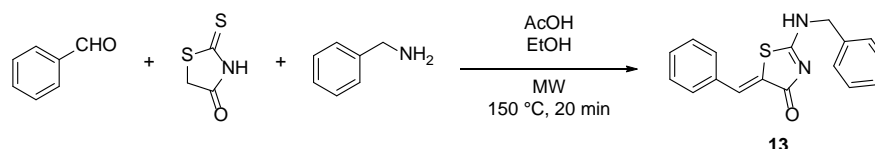
Na spektru je vidno topilo (etanol in acetone).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 45.24 (CH₃), 48.02 (CH₂), 48.43 (CH₂), 53.58 (CH₂), 53.91 (CH₂), 128.63, 129.61 (2C, CH_{Ar}), 130.00 (2C, CH_{Ar}), 130.86, 131.28, 137.96, 166.74, 173.87, 179.07 ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₅H₁₉N₄OS ([M+H]⁺): izr. 303.1280, izm. 303.1283

IR: ν [cm⁻¹] = 3006.93, 2849.56, 2603.37, 2415.44, 2049.31, 1600.41, 1477.96, 1443.92, 1378.05, 1361.10, 1310.96, 1275.89, 1222.21, 1180.18, 1150.37, 1102.41, 1062.20, 1029.91, 1011.13, 973.03, 937.74, 910.06, 877.99, 761.44, 698.50, 674.23.

4.2.13. Sinteza (Z)-2-(benzilamino)-5-benzilidentiazol-4(5H)-ona (13)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), benzaldehid (0,76 mL, 7,50 mmol), benzilamin (0,45 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL).

Molekulska formula: C₁₇H₁₄N₂OS

Relativna molekulska masa (izračunana): 294,37

Opis: bež kristali

η: 22 % (0,246 g)

R_f: 0,50 (5 % MeOH v DKM)

Tališče: 197-200 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 1.05 (t, EtOH), 4.75 (d, *J* = 5.72 Hz, 2H, NHCH₂), 7.30-7.46 (m, 6H, CH_{Ar}), 7.52 (t, *J* = 7.60 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.57-7.63 (m, 3H, CH_{Ar} in CH), 10.11 (t, *J* = 5.66 Hz, 1H, NH) ppm.

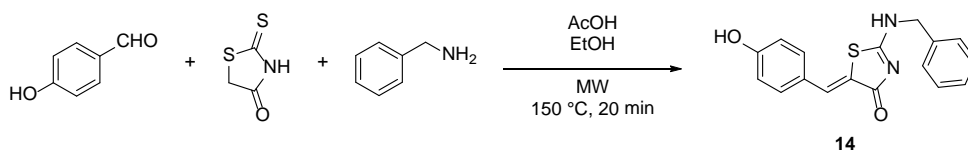
Na spektru je vidno topilo (etanol).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 47.82 (CH₂), 127.65, 127.81 (2C, CH_{Ar}), 128.67 (2C, CH_{Ar}), 128.70, 129.24 (2C, CH_{Ar}), 129.33, 129.47 (2C, CH_{Ar}), 129.62, 134.03, 137.17, 173.79 (C_q), 179.65 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₇H₁₅N₂OS ([M+H]⁺): izr. 295.0905, izm. 295.0898

IR: ν [cm⁻¹] = 3023.49, 2736.37, 1684.34, 1623.19, 1600.02, 1492.61, 1464.64, 1430.87, 1363.98, 1343.50, 1255.45, 1217.89, 1198.58, 1156.03, 1079.22, 1064.64, 1030.47, 996.35, 963.09, 943.14, 917.96, 872.57, 828.40, 761.52, 734.59, 697.44, 682.16, 648.10, 624.20.

4.3.14. Sinteza (Z)-2-(benzilamino)-5-(4-hidroksibenziliden)thiazol-4(5H)-ona (14)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-hidroksibenzaldehid (0,916 g, 7,50 mmol), benzilamin (0,45 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL). **Modifikacija splošnega postopka:** Produkt je po končani reakciji v raztopljeni obliki. Reakcijsko zmes shranimo čez noč v zamrzovalniku. Izpadli produkt odfiltriramo z odsesavanjem in speremo z ledeno hladnim absolutnim etanolom.

Molekulska formula: C₁₇H₁₄N₂O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 310,37

Opis: rumeni kristali

η: 43 % (0,501 g)

R_f: 0,35 (10 % MeOH v DKM)

Tališče: 227-230 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 1.06 (t, EtOH), 4.73 (d, *J* = 5.81 Hz, 2H, NHCH₂), 6.90 (d, *J* = 8.64 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.29-7.43 (m, 7H, CH_{Ar}), 7.53 (s, 1H, CH), 9.98 (t, *J* = 5.63 Hz, 1H, NH), 10.13 (s, 1H, OH) ppm.

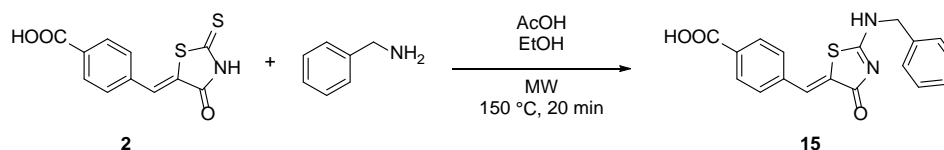
Na spektru je vidno topilo (etanol).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 47.69 (CH₂), 116.22 (2C, CH_{Ar}), 124.580, 124.86, 127.61, 127.78 (2C, CH_{Ar}), 128.66 (2C, CH_{Ar}), 129.87, 131.59 (2C, CH_{Ar}), 137.34, 159.12, 173.74 (C_q), 180.05 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₇H₁₅N₂O₂S ([M+H]⁺): izr. 311.0854, izm. 311.0861

IR: ν [cm⁻¹] = 3162.65, 2810.56, 1623.77, 1566.17, 1507.44, 1458.59, 1427.89, 1360.42, 1338.43, 1277.04, 1231.33, 1205.35, 1167.60, 1110.84, 1083.46, 1054.92, 1007.80, 947.08, 903.40, 822.98, 754.95, 694.20, 651.71, 620.65, 610.79.

4.2.15. Sinteza (Z)-4-((2-(benzilamino)-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)-benzojske kisline (**15**)



Suspenziji **2** (0,110 g, 0,415 mmol, 1,0 ekv.) v absolutnem etanolu (1,5 mL) dodamo benzilamin (0,050 mL, 0,456 mmol, 1,1 ekv.) in ledocet (0,005 mL, 0,087 mmol, 0,2 ekv.). Reakcijsko zmes mešamo in segrejemo v mikrovalovnem reaktorju do temperature 150 °C, pri čemer hitrost segrevanja ne preseže 2 °C/s (najvišja dovoljena moč segrevanja 20 W, najvišji dovoljeni tlak v reakcijski viali 20 bar). Reakcija poteka 20 minut pri 150 °C. Reakcijsko zmes nato ohladimo na ledu, izpadli produkt odfiltriramo z odsesavanjem in speremo z ledeno hladnim absolutnim etanolom.

Molekulska formula: C₁₈H₁₄N₂O₃S

Relativna molekulska masa (izračunana): 338,38

Opis: bež kristali

η: 34 % (0,048 g)

R_f: 0,52 (DKM/MeOH = 9/1 + 1 % AcOH)

Tališče: 315-318 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 2.09 (s, acetone), 4.76 (s, 2H, NHCH₂), 7.30-7.42 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.64-7.66 (m, 3H, CH_{Ar} in CH), 8.03 (d, 2H, J = 8.32 Hz, CH_{Ar}) ppm.

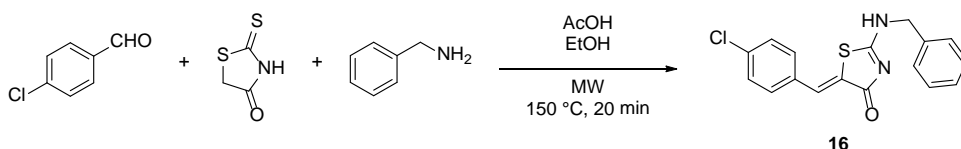
Na spektru je vidno topilo (acetone).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 47.89 (CH₂), 127.43, 127.65, 127.80 (2C, CH_{Ar}), 128.18, 128.68 (2C, CH_{Ar}), 129.34 (2C, CH_{Ar}), 129.98 (2C, CH_{Ar}), 130.75, 137.13, 137.57, 167.06 (C_q), 173.63 (CO), 179.43 (COOH) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₈H₁₅N₂O₃S ([M+H]⁺): izr. 339.0803, izm. 339.0811

IR: ν [cm⁻¹] = 3015.87, 2437.97, 1878.90, 1674.07, 1614.52, 1580.20, 1494.11, 1422.95, 1353.70, 1322.01, 1274.01, 1227.06, 1199.22, 1122.25, 1064.97, 1000.23, 858.45, 795.92, 773.91, 751.17, 721.06, 691.25, 648.17.

4.2.16. Sinteza (Z)-2-(benzilamino)-5-(4-klorobenziliden)thiazol-4(5H)-ona (**16**)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-klorobenzaldehid (1,054 g, 7,50 mmol), benzilamin (0,45 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL).

Molekulska formula: C₁₇H₁₃ClN₂OS

Relativna molekulska masa (izračunana): 328,81

Opis: rumeni kristali

η: 70 % (0,865 g)

R_f: 0,38 (3 % MeOH v DKM)

Tališče: 200-203 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 1.06 (t, EtOH), 4.75 (d, *J* = 4.75 Hz, 2H, NHCH₂), 7.30-7.42 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.60-7.62 (m, 5H, CH_{Ar} in CH), 10.15 (t, *J* = 5.66 Hz, 1H, NH) ppm.

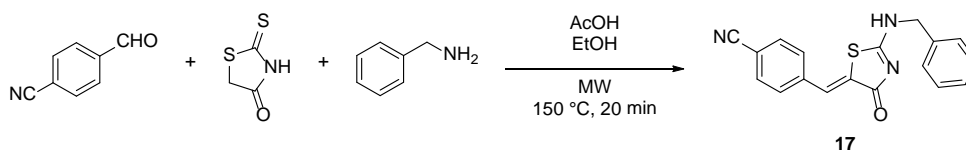
Na spektru je vidno topilo (etanol).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 47.87 (CH₂), 127.67 (2C, CH_{Ar}), 127.81, 127.99, 128.68 (2C, CH_{Ar}), 129.30 (2C, CH_{Ar}), 129.52, 131.08 (2C, CH_{Ar}), 132.99, 134.06, 137.10, 173.54 (C_q), 179.50 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₇H₁₄ClN₂OS ([M+H]⁺): izr. 329.0515, izm. 329.0510

IR: ν [cm⁻¹] = 2677.07, 1681.74, 1618.71, 1593.21, 1488.03, 1470.84, 1437.53, 1403.28, 1367.64, 1255.66, 1218.31, 1198.11, 1085.52, 1056.96, 1009.80, 995.59, 944.71, 916.68, 881.23, 847.37, 829.39, 808.96, 764.47, 740.73, 701.15, 678.23, 628.82.

4.2.17. Sinteza (Z)-4-((2-(benzilamino)-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)benzo-nitrila (**17**)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-cianobenzaldehid (0,983 g, 7,50 mmol), benzilamin (0,45 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL). Produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v vrelem acetonu in filtracijo.

Molekulska formula: C₁₈H₁₃N₃OS

Relativna molekulska masa (izračunana): 319,38

Opis: rumeni kristali

η: 13 % (0,157 g)

R_f: 0,27 (EtOAc/heksan = 1/1)

Tališče: 241-244 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 2.09 (s, aceton), 4.77 (d, *J* = 5.66 Hz, 2H, NHCH₂), 7.30-7.42 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.69 (s, 1H, CH), 7.75 (d, *J* = 8.20 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.98 (d, *J* = 8.37 Hz, 2H, CH_{Ar}), 10.25 (t, *J* = 5.59 Hz, 1H, NH) ppm.

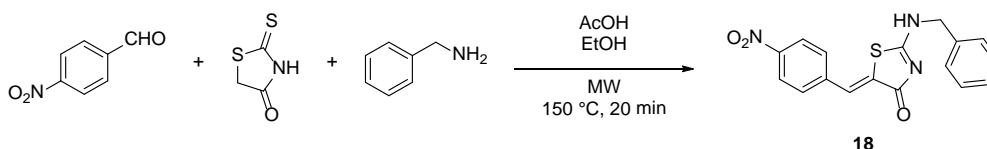
Na spektru je vidno topilo (aceton).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 47.99 (CH₂), 111.26, 118.59, 127.30, 127.72, 127.86 (2C, CH_{Ar}), 128.70 (2C, CH_{Ar}), 129.93 (2C, CH_{Ar}), 132.34, 133.00 (2C, CH_{Ar}), 136.98, 138.69, 173.40 (C_q), 179.23 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₈H₁₄N₃OS ([M+H]⁺): izr. 3210.0858, izm. 320.0851

IR: ν [cm⁻¹] = 3041.28, 2756.38, 2229.78, 1686.72, 1622.77, 1608.61, 1595.11, 1470.08, 1433.72, 1414.52, 1365.62, 1341.92, 1302.14, 1258.60, 1218.02, 1201.65, 1087.03, 1061.38, 994.89, 932.29, 892.39, 855.78, 838.03, 825.26, 773.74, 751.86, 701.63, 620.96.

4.2.18. Sinteza (Z)-2-(benzilamino)-5-(4-nitrobenziliden)tiazol-4(5H)-ona (18)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-nitrobenzaldehyd (1,133 g, 7,50 mmol), benzilamin (0,45 mL, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL). **Modifikacija splošnega postopka:** Produkt izoliramo iz v reakciji nastalega viskozne olja z raztapljanjem nečistot v vrelem acetonu in filtracijo. Dodatno produkt izoliramo iz filtrata s kolonsko kromatografijo (mobilna faza EtOAc/heksan = 1/1), s čimer se znebimo večine nečistot. Ustrezne frakcije uparimo in produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v vrelem acetonu in filtracijo.

Molekulska formula: C₁₇H₁₃N₃O₃S

Relativna molekulska masa (izračunana): 339,37

Opis: oranžni kristali

η: 9 % (0,111 g)

R_f: 0,26 (EtOAc/heksan = 1/1)

Tališče: 210-213 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 2.09 (s, acetone), 4.78 (d, *J* = 5.34 Hz, 2H, NHCH₂), 7.31-7.42 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.74 (s, 1H, CH), 7.84 (d, *J* = 8.59 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.36 (d, *J* = 8.88 Hz, 2H, CH_{Ar}), 10.29 (t, *J* = 5.49 Hz, 1H, NH) ppm.

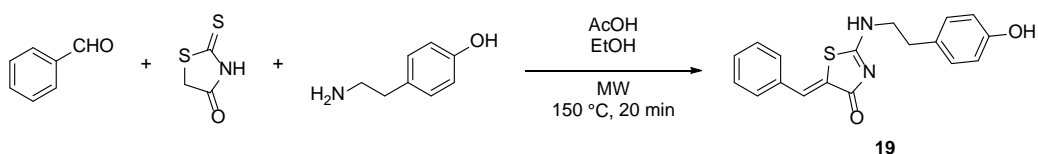
Na spektru je vidno topilo (acetone).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 48.05 (CH₂), 124.33 (2C, CH_{Ar}), 126.79, 127.73, 127.87 (2C, CH_{Ar}), 128.71 (2C, CH_{Ar}), 130.37 (2C, CH_{Ar}), 133.20, 136.97, 140.63, 147.02, 173.39, 179.16 ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₇H₁₄N₃O₃S ([M+H]⁺): izr. 340.0756, izm. 340.0760

IR: ν [cm⁻¹] = 2773.15, 1692.77, 1628.51, 1605.81, 1511.39, 1491.72, 1463.74, 1433.23, 1367.09, 1338.11, 1261.92, 1217.88, 1202.62, 1157.47, 1108.16, 1084.48, 1055.70, 993.87, 921.05, 888.04, 864.28, 839.94, 757.13, 733.64, 699.26, 683.58.

4.2.19. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-((4-hidroksifenetil)amino)thiazol-4(5H)-ona (19)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), benzaldehid (0,76 mL, 7,50 mmol), tiramin (0,567 g, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (5 mL). Produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v vrelem etanolu in filtracijo.

Molekulska formula: C₁₈H₁₆N₂O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 324,40

Opis: rumeni kristali

η: 24 % (0,292 g)

R_f: 0,27 (10% MeOH v DKM)

Tališče: 240-243 °C

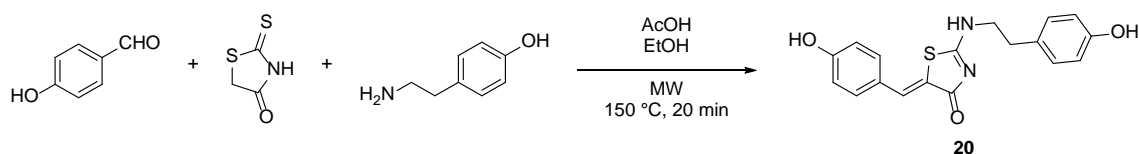
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 2.81 (t, *J* = 7.21 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.70 (dd, *J*₁ = 12.94 Hz, *J*₂ = 7.02 Hz, 2H, NHCH₂), 6.71 (d, *J* = 8.48 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.06 (d, *J* = 8.46 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.43 (t, *J* = 7.43 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.50-7.63 (m, 5H, CH_{Ar} in CH), 9.26 (s, 1H, OH), 9.71 (t, *J* = 5.44 Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 33.58 (CH₂), 46.13 (CH₂), 115.26 (2C, CH_{Ar}), 128.52, 128.73, 129.00, 129.23 (2C, CH_{Ar}), 129.45 (2C, CH_{Ar}), 129.55, 129.65 (2C, CH_{Ar}), 134.09, 155.92, 173.30 (C_q), 179.67 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): *m/z* za C₁₈H₁₇N₂O₂S ([M+H]⁺): izr. 325.1011, izm. 325.1014

IR: ν [cm⁻¹] = 3184.06, 3022.44, 2817.75, 1666.18, 1620.15, 1581.27, 1512.68, 1489.71, 1466.54, 1432.68, 1344.86, 1294.09, 1263.02, 1229.59, 1181.22, 1106.58, 1068.46, 1029.97, 1003.57, 925.41, 879.16, 852.96, 825.92, 763.98, 735.20, 685.60, 644.41, 617.78.

4.2.20. Sinteza (Z)-5-(4-hidroksibenziliden)-2-((4-hidroksifenetil)amino)tiazol-4(5H)-ona (20)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-hidroksibenzaldehid (0,916 g, 7,50 mmol), tiramin (0,567 g, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL).

Molekulska formula: C₁₈H₁₆N₂O₃S

Relativna molekulska masa (izračunana): 340,40

Opis: rumeni kristali

η: 39 % (0,495 g)

R_f: 0,29 (10 % MeOH v DKM)

Tališče: 253-256 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 1.05 (t, EtOH), 2.79 (t, *J* = 7.23 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.66 (dd, *J*₁ = 12.90 Hz, *J*₂ = 7.14 Hz, 2H, NHCH₂), 6.69 (d, *J* = 8.52 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.89 (d, *J* = 8.67 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.04 (d, *J* = 8.48 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.40 (d, *J* = 8.75 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.50 (s, 1H, CH), 9.23 (s, 1H, OH), 9.56 (t, *J* = 5.52 Hz, 1H, NH), 10.11 (s, 1H, OH) ppm.

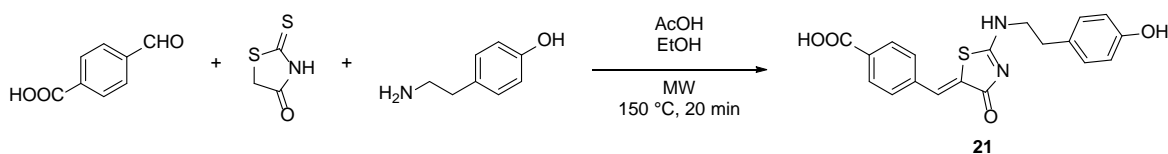
Na spektru je vidno topilo (etanol).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 33.62 (CH₂), 46.02 (CH₂), 115.25 (2C, CH_{Ar}), 116.19 (2C, CH_{Ar}), 124.62, 124.91, 128.60, 129.53, 129.66 (2C, CH_{Ar}), 131.54 (2C, CH_{Ar}), 155.91, 159.03, 173.25 (C_q), 180.06 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): *m/z* za C₁₈H₁₇N₂O₃S ([M+H]⁺): izr. 341.0960, izm. 341.0969

IR: ν [cm⁻¹] = 3274.11, 3026.06, 1675.55, 1563.22, 1506.91, 1465.45, 1430.46, 1391.62, 1361.51, 1306.45, 1232.54, 1171.35, 1114.58, 1031.43, 1005.47, 952.11, 907.84, 866.05, 824.73, 756.48, 705.86, 628.41, 605.55.

4.2.21. Sinteza (Z)-4-((2-((4-hidroksifenetil)amino)-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)benzojske kisline (**21**)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-karboksibenzaldehid (1,126 g, 7,50 mmol), tiramin (0,567 g, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL). Produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v vrelem etanolu in filtracijo.

Molekulska formula: C₁₉H₁₆N₂O₄S

Relativna molekulska masa (izračunana): 368,41

Opis: rumeni kristali

η: 6 % (0,086 g)

R_f: 0,32 (1 % MeOH v EtOAc)

Tališče: nad 350 °C

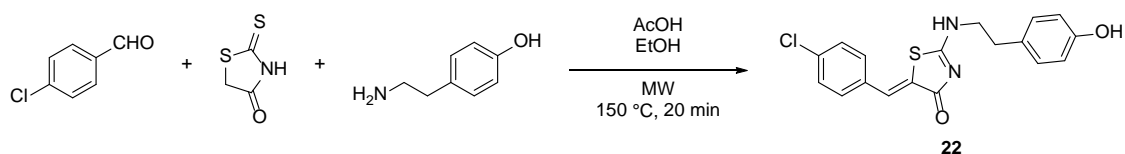
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 2.80 (t, *J* = 7.16 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.70 (dd, *J*₁ = 12.79 Hz, *J*₂ = 6.90 Hz, 2H, NHCH₂), 6.70 (d, *J* = 8.49 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.05 (d, *J* = 8.46 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.64 (s, 1H, CH), 7.67 (d, *J* = 8.41 Hz, 2H, CH_{Ar}), 8.04 (d, *J* = 8.37 Hz, 2H, CH_{Ar}), 9.24 (s, 1H, OH), 9.79 (t, *J* = 5.60 Hz, 1H, NH), 13.15 (s, 1H, COOH) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 33.55 (CH₂), 46.23 (CH₂), 115.25 (2C, CH_{Ar}), 127.69, 128.47, 129.45 (2C, CH_{Ar}), 129.66 (2C, CH_{Ar}), 130.03 (2C, CH_{Ar}), 130.98, 131.17, 138.26, 155.92, 166.76 (C_q), 173.12 (CO), 179.40 (COOH) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₉H₁₅N₂O₄S ([M-H]⁻): izr. 367.0753, izm. 367.0743

IR: ν [cm⁻¹] = 2971.98, 1671.50, 1613.58, 1582.80, 1510.87, 1461.00, 1432.71, 1372.91, 1319.33, 1277.83, 1244.58, 1201.67, 1171.94, 1129.61, 1107.38, 1076.84, 1056.70, 1012.11, 894.69, 844.15, 825.54, 771.62, 741.20, 709.63, 686.97, 666.70, 642.99.

4.2.22. Sinteza (Z)-5-(4-klorobenziliden)-2-((4-hidroksifenetil)amino)thiazol-4(5H)-ona (**22**)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-klorobenzaldehid (1,054 g, 7,50 mmol), tiramin (0,567 g, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL).

Molekulska formula: C₁₈H₁₅ClN₂O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 358,84

Opis: bež kristali

η: 29 % (0,387 g)

R_f: 0,32 (10 % MeOH v DKM)

Tališče: 232-235 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 1.06 (t, EtOH), 2.80 (t, *J* = 7.25 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.69 (dd, *J*₁ = 12.89 Hz, *J*₂ = 7.07 Hz, 2H, NHCH₂), 6.70 (d, *J* = 8.57 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.05 (d, *J* = 8.52 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.59-7.60 (m, 5H, CH_{Ar} in CH), 9.25 (s, 1H, OH), 9.75 (t, *J* = 5.50 Hz, 1H, NH) ppm.

Na spektru je vidno topilo (etanol).

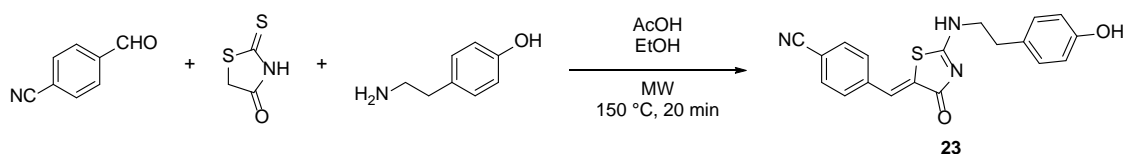
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 30.75 (acetone), 33.56 (CH₂), 46.19 (CH₂), 115.26 (2C, CH_{Ar}), 127.67, 128.49, 129.28 (2C, CH_{Ar}), 129.56, 129.65 (2C, CH_{Ar}), 131.06 (2C, CH_{Ar}), 133.06, 133.99, 155.93, 173.06 (C_q), 179.52 (CO) ppm.

Na spektru je vidno topilo (acetone).

HR-MS (ESI): *m/z* za C₁₈H₁₄ClN₂O₂S ([M-H]⁻): izr. 357.0465, izm. 357.0472

IR: ν [cm⁻¹] = 3016.48, 1675.92, 1614.52, 1584.28, 1486.34, 1435.18, 1403.90, 1341.61, 1268.63, 1230.18, 1203.76, 1093.62, 1039.01, 1008.72, 891.04, 820.10, 787.37, 715.51, 680.74, 650.54, 637.28.

4.2.23. Sinteza (Z)-4-((2-((4-hidroksifenetil)amino)-4-oksotiazol-5(4H)-iliden)metil)benzonitrila (**23**)



Splošni postopek: rodanin (0,500 g, 3,75 mmol), 4-cianobenzaldehid (0,983 g, 7,50 mmol), tiramin (0,567 g, 4,13 mmol), ledocet (0,021 mL, 0,375 mmol), absolutni etanol (3 mL). Produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v vrelem izopropanolu in filtracijo. Izopropanol odstranimo s koevaporacijo z dietil etrom in sušenjem na vakuumski črpalki.

Molekulska formula: C₁₉H₁₅N₃O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 349,41

Opis: rumeni kristali

η: 12 % (0,161 g)

R_f: 0,54 (EtOAc)

Tališče: 240-243 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 1.04 (d, i-PrOH), 2.80 (t, *J* = 7.19 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.70 (dd, *J*₁ = 7.09 Hz, *J*₂ = 12.60 Hz, 2H, NHCH₂), 6.69 (d, *J* = 8.40 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.04 (d, *J* = 8.55 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.65 (s, 1H, CH), 7.74 (d, *J* = 8.47 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.97 (d, *J* = 8.39 Hz, 2H, CH_{Ar}), 9.24 (s, 1H, OH), 9.84 (t, *J* = 5.37 Hz, 1H, NH) ppm.

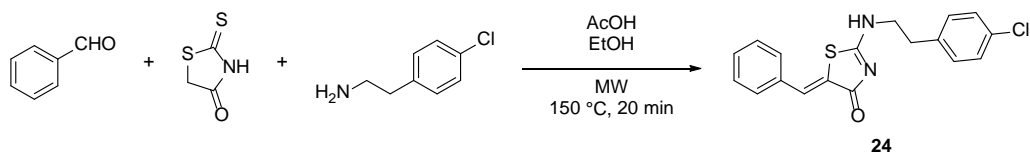
Na spektru je vidno topilo (izopropanol).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 33.53 (CH₂), 46.29 (CH₂), 111.19, 115.25 (2C, CH_{Ar}), 118.60, 126.98, 128.43, 129.65 (2C, CH_{Ar}), 129.91 (2C, CH_{Ar}), 132.38, 132.98 (2C, CH_{Ar}), 138.75, 155.93, 172.91 (C_q), 179.24 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): m/z za C₁₉H₁₄N₃O₂S ([M-H]⁻): izr. 348.0807, izm. 348.0813

IR: ν [cm⁻¹] = 3280.67, 3027.78, 2227.28, 1680.14, 1613.10, 1592.83, 1568.38, 1515.71, 1470.17, 1431.85, 1409.94, 1360.17, 1265.32, 1228.93, 1187.20, 1110.63, 1057.44, 1001.32, 887.89, 826.24, 784.56, 752.71, 723.54, 677.39, 630.19.

4.2.24. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-((4-klorofenil)amino)tiazol-4(5H)-ona (24)



Splošni postopek: rodanin (0,400 g, 3,00 mmol), benzaldehid (0,61 mL, 6,00 mmol), 2-(4-klorofenil)etilamin (0,46 mL, 3,30 mmol), ledocet (0,017 mL, 0,03 mmol), absolutni etanol (5 mL).

Molekulska formula: C₁₈H₁₅ClN₂OS

Relativna molekulska masa (izračunana): 342,84

Opis: rumeni kristali

η: 44 % (0,451 g)

R_f: 0,38 (3 % MeOH v DKM)

Tališče: 237-240 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 2.92 (t, *J* = 7.04 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.75 (dd, *J*₁ = 12.68 Hz, *J*₂ = 7.03 Hz, 2H, NHCH₂), 7.28-7.60 (m, 10H, CH_{Ar} in CH), 9.70 (t, *J* = 5.46 Hz, 1H, NH) ppm.

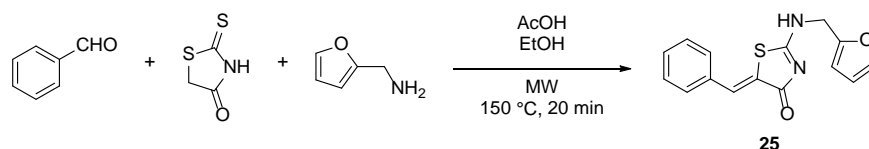
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 30.72 (acetone), 33.58 (CH₂), 45.48 (CH₂), 128.39 (2C, CH_{Ar}), 128.64, 129.12, 129.22 (2C, CH₂), 129.45 (2C, CH_{Ar}), 129.57, 130.68 (2C, CH_{Ar}), 131.10, 134.05, 137.61, 173.44 (C_q), 179.61 (CO) ppm.

Na spektru je vidno topilo (acetone).

HR-MS (ESI): *m/z* za C₁₈H₁₆ClN₂OS ([M+H]⁺): izr. 343.0672, izm. 343.0664

IR: ν [cm⁻¹] = 2814.89, 1685.86, 1624.88, 1604.80, 1489.82, 1470.06, 1442.09, 1408.12, 1368.76, 1347.37, 1281.76, 1245.67, 1195.01, 1180.57, 1087.34, 1041.98, 1012.86, 997.81, 911.77, 839.45, 810.53, 762.48, 745.10, 678.68, 644.62, 621.65.

4.2.25. Sinteza (Z)-5-benziliden-2-((furan-2-ilmetil)amino)tiazol-4(5H)-ona (25)



Splošni postopek: rodanin (0,750 g, 5,63 mmol), benzaldehid (1,15 mL, 11,25 mmol), furfurylamin (0,55 mL, 6,19 mmol), ledocet (0,032 mL, 0,563 mmol), absolutni etanol (4,5 mL). Produkt očistimo z raztapljanjem nečistot v vrelem acetonu in filtracijo.

Molekulska formula: C₁₅H₁₂N₂O₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 284,33

Opis: svetlo rjavi kristali

η: 10 % (0,163 g)

R_f: 0,42 (EtOAc/heksan = 2/1)

Tališče: 223-226 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ: 2.09 (aceton), 4.76 (d, *J* = 5.29 Hz, 2H, NHCH₂), 6.45-6.46 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.42-7.68 (m, 7H, CH_{Ar} in CH), 10.09 (t, *J* = 5.09 Hz, 1H, NH) ppm.

Na spektru je vidno topilo (aceton).

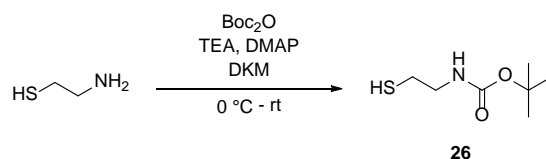
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ: 40.79 (CH₂), 108.69, 110.74, 128.55, 129.26 (2C, CH_{Ar}), 129.49, 129.66 (2C, CH_{Ar}), 133.99, 143.11, 149.85, 173.71 (C_q), 179.53 (CO) ppm.

Zaradi prekrivanja en signal ni viden.

HR-MS (ESI): *m/z* za C₁₅H₁₁N₂O₂S ([M-H]⁻): izr. 283.0541, izm. 283.0536

IR: ν [cm⁻¹] = 3137.87, 3120.05, 3050.06, 2628.68, 1677.04, 1620.86, 1590.40, 1493.97, 1465.15, 1444.74, 1423.85, 1389.11, 1361.24, 1332.31, 1273.04, 1251.52, 1188.15, 1145.05, 1075.79, 1061.66, 1013.48, 997.91, 953.46, 925.99, 904.48, 881.37, 849.89, 820.31, 760.87, 735.11, 712.33, 684.50, 647.33, 636.79, 619.20, 602.67, 543.37, 521.95, 508.44.

4.2.26. Sinteza *tert*-butil (2-merkaptetil)karbamata (26)



Raztopini cisteamina (0,500 g, 6,48 mmol, 1,0 ekv.) v 5 mL suhega DKM dodamo TEA (1,35 mL, 9,72 mmol, 1,5 ekv.) in DMAP (katalitska količina). Med mešanjem na ledeni kopeli počasi dokapamo raztopino di-*tert*-butil dikarbonata (1,556 g, 7,13 mmol, 1,1 ekv.) v 3 mL suhega DKM. Odstavimo ledeno kopel in mešamo reakcijsko zmes na sobni temperaturi 24 h. Topilo uparimo in produkt izoliramo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza petroleter/EtOAc = 1/1). Ustrezne frakcije uparimo.

Molekulska formula: C₇H₁₅NO₂S

Relativna molekulska masa (izračunana): 177,26

Opis: brezbarvna oljnata tekočina

η: 16 % (0,185 g)

R_f: 0,45 (petroleter/EtOAc = 1/1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ: 1.36 (t, *J* = 8.49 Hz, 1H, SH), 1.45 (s, 9H, CH₃), 2.65 (dd, *J*₁ = 14.87 Hz, *J*₂ = 6.57 Hz, 2H, CH₂SH), 3.31 (s, 2H, CH₂NH), 4.98 (s, 1H, NH) ppm.

4.3. DOLOČANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI SPOJIN

4.3.1. Testiranje reaktivnosti spojin

Izvedli smo serijo osmih eksperimentov reaktivnosti dveh sintetiziranih spojin v dveh topilih in z dvema nukleofiloma. Pripravili smo 0,1 M raztopino spojine **3** in **21** v DMSO- d_6 in $CDCl_3$. Spojini **3** smo dodali 1 ekvivalent nukleofila, tj. metilamina (8,03 M raztopina v absolutnem etanolu) oziroma **26**, spojini **21** pa 2 ekvivalenta. Bučke oz. cevke smo zatesnili s parafilmom. Zmes smo mešali 2 dni pri 37 °C. Vzorčili smo takoj po dodatku vseh reagentov (referenčni vzorec), po 1 h, 24 h in 48 h ter posneli 1H -NMR spekter zmesi. Primerjali smo spektre glede na spekter referenčnega vzorca.

4.3.2. Testiranje agregacije spojin

Pripravili smo 1 mM in 10 mM raztopino spojine **21** v DMSO in zmesi DMSO in vode v razmerju 1:9. Z zetasizerjem smo v vsaki raztopini ugotavljali prisotnost agregatov spojine in določali porazdelitev velikosti delcev.

4.3.3. Merjenje absorpcijskega UV-VIS spektra spojin

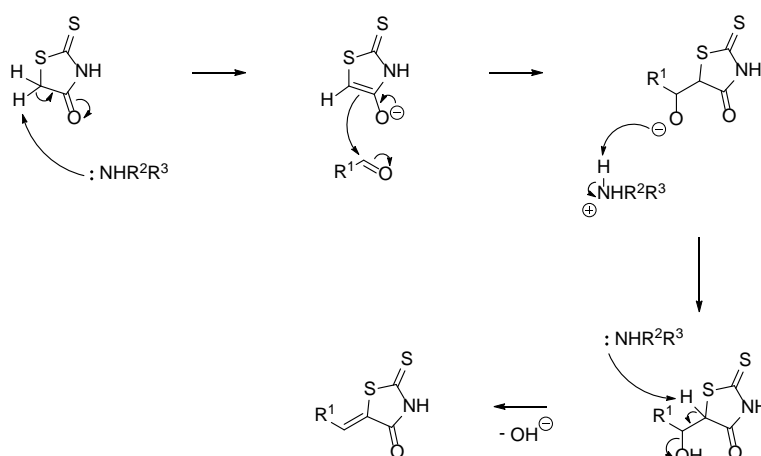
Pripravili smo 0,1 mM raztopino spojine **21** v DMSO in posneli njen absorpcijski spekter v območju valovnih dolžin 200-800 nm.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. SINTEZA KONČNIH SPOJIN

Do končnih spojin smo razen v dveh primerih (spojini **10** in **15**) prišli po postopku enolončne sinteze. Metoda nam je omogočila hitro ter enostavno sintezo in izolacijo večjega števila spojin z različnimi substituenti.

Reakcija poteče v dveh stopnjah. Prva stopnja je Knoevenagelova kondenzacija aromatskega aldehida in rodanina (slika 12).

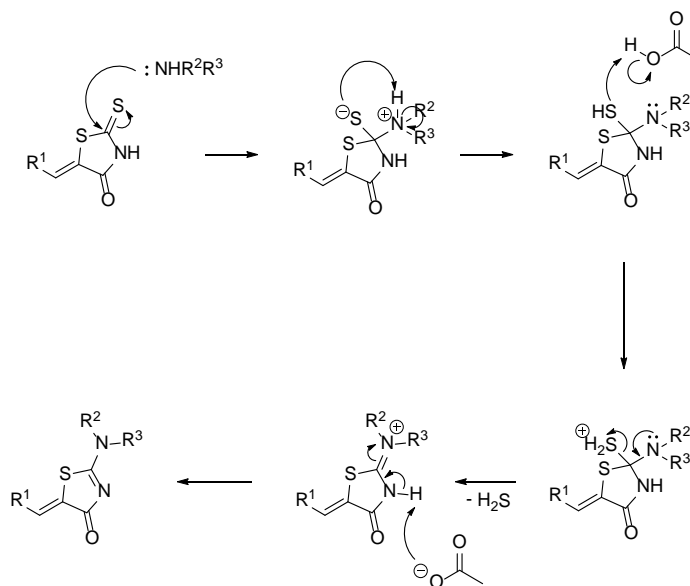


Slika 12 Mehanizem Knoevenagelove kondenzacije

Najprej bazični katalizator odcepi šibko kisel proton z ogljikovega atoma na mestu α glede na karbonilno skupino rodaninskega obroča. Ker izvajamo enolončno sintezo, bazo v našem primeru predstavlja amin. Ta ima tako dve funkciji – je katalizator v prvi in reagent v drugi stopnji hkrati. Tvori se enolatni ion, ki napade karbonilni ogljik aromatskega aldehida. Nastali alkoksidni ion se protonira, dobimo aldol. Sledi dehidracija, ko baza odcepi še drugi proton z α -ogljikovega atoma, čemur sledi tvorba eksociklične dvojne vezi in eliminacija hidroksidnega aniona. Pri nastanku dvojne vezi bi teoretično lahko nastala dva geometrijska izomera, vendar so pri razvoju metode ugotovili, da reakcija poteče regioselektivno do termodinamsko stabilnejšega Z-izomera (19).

Aromatski aldehyd smo dodali v dvakratnem prebitku zaradi ugodnega vpliva na izkoristek reakcije. Obstaja namreč možnost stranskih reakcij, ki porabljajo aldehyd. Cannizzarova reakcija je na primer značilna za aromatske aldehyde v bazičnem mediju, prav tako lahko pride do oksidacije aldehyda do karboksilne kisline (19).

Knoevenagelovi kondenzaciji sledi adicija amina na tiokarbonilno skupino s sledečo eliminacijo (slika 13).



Slika 13 Mehanizem nukleofilne adicije amina na C=S skupino s sledečo eliminacijo

Amin nukleofilno napade tiokarbonilni ogljik, zatem se proton premesti z eksocikličnega dušikovega atoma na eksociklični žveplov atom. Novonastala tiolna skupina se protonira. Nevezni elektronski par eksocikličnega dušika se premesti in tvori se dvojna vez z ogljikom na mestu 2 rodaninskega obroča, hkrati pa pride do eliminacije H_2S . Nastali iminijev kation se pretvori v enamini z odcepitvijo protona s cikličnega dušika in premestitvijo dvojne vezi v obroč. Vir protona, potrebnega za eliminacijo H_2S , je očetna kislina, ki smo je v reakcijsko zmes dodali 0,1 ekvivalenta. Količina kislinskega katalizatorja je pomembna. Prevelika količina bi tvorila z aminom kvaterno amonijevo sol, ki je bistveno slabši nukleofil in bi težje reagirala s tiokarbonilno skupino.

Pri nekaj poskusih sintez končnih spojin (protokoli niso opisani) smo pri $150\text{ }^\circ\text{C}$ glede na razvite TLC reakcijskih zmesi dobili množico produktov, kar nam je otežilo izolacijo do te mere, da smo poskusili z optimizacijo reakcijskih pogojev. Nekatere reakcije smo namesto do $150\text{ }^\circ\text{C}$ segrevali le do $110\text{ }^\circ\text{C}$ z namenom omejitve poteka stranskih reakcij. V teh primerih smo iz $^1\text{H-NMR}$ spektrov ugotovili, da je reakcija potekla le do produkta prve stopnje, torej je prišlo do Knoevenagelove kondenzacije med aromatskim aldehidom in rodaninom, ne pa tudi do nukleofilne adicije amina s sledečo eliminacijo. Takšen primer je sinteza spojine **15**. Po izvedbi reakcije pri $110\text{ }^\circ\text{C}$ smo dobili spojino **2**, ki smo jo uporabili

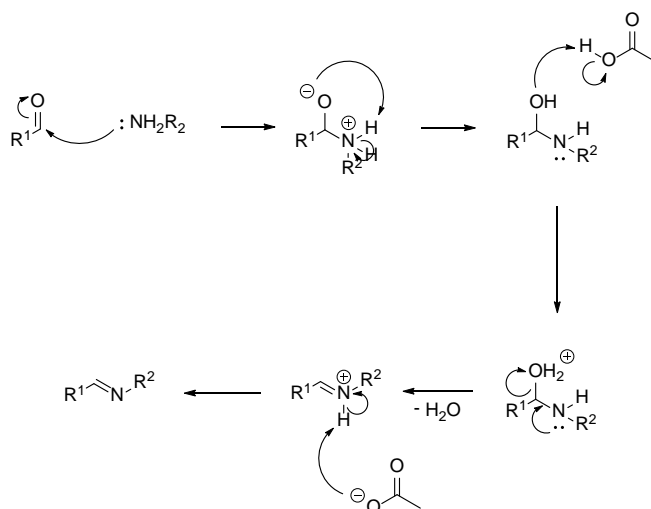
v ločeni sintezni stopnji in z dodatkom amina pri višji temperaturi sintetizirali ustrezen produkt. Sklepamo, da je 110 °C v določenih primerih premalo za preseg potrebne energijske bariere in da je za popoln potek reakcije potrebna višja temperatura, kar je najbrž odvisno od narave amina.

Reakcije smo izvajali v mikrovalovnem reaktorju, kar nam je omogočilo krajše reakcijske čase in boljše izkoristke. Reaktor učinkovito dovaja energijo v sistem z visokim izkoristkom, saj mikrovalove absorbira reakcijska zmes in ne reakcijska viala. Energijo dovajamo neposredno reagentom in topilu. Reakcije lahko v zaprtih vialah izvajamo tudi nad temperaturo vrelišča topila pri povišanem tlaku, kar nam poleg ugodnega vpliva visoke temperature na kinetiko reakcije dovoljuje tudi uporabo topil z nižjim vreliščem, ki jih v procesu izolacije lažje odstranimo. Učinkovitost sinteze lahko pripišemo tudi specifičnim učinkom mikrovalov (34). Druga stopnja reakcije poteka preko bipolarnega intermedata. Ta lahko absorbira mikrovalove v procesu dielektričnega segrevanja, ko oscilirajoče električno polje reaktorja sili bipolarno molekulo v poravnanje v smeri električnega polja (19, 34). Oprema nam omogoča natančen nadzor nad močjo segrevanja, temperaturo in tlakom reakcijske zmesi. Posledično obstaja možnost tesne optimizacije pogojev (34). Ker v drugi stopnji nastaja H₂S, smo ves čas nadzorovali tlak v reakcijski viali. Kot zanimivost naj omenimo, da Knoevenagelova kondenzacija sicer poteče kvantitativno v nekaj minutah že pri sobni temperaturi, kar so dokazali pri razvoju sintezne metode. Tudi pri našem delu je bilo kmalu po dodatku vseh reagentov opaziti močno segrevanje reakcijske zmesi kot posledico poteka reakcije.

V izvornem protokolu je kot edina potrebna metoda čiščenja spojin navedena filtracija reakcijske zmesi in spiranje z ledeno hladnih etanolom. Pri desetih končnih spojinah to ni zadostovalo, kar smo razbrali iz razvitih TLC spranih produktov, na katerih je bilo videti več lis. V teh primerih smo protokol priredili. Največkrat se je izkazalo, da so končne spojine slabše topne od nečistot v vsaj enem od organskih topil, ki so bila na voljo. Prave prekrizalizacije ni bilo mogoče izvesti, zato smo poskusili s homogenim suspendiranjem grobega produkta v topilu in segrevanjem do vrelišča z namenom, da bo prišlo le do raztapljanja nečistot, neraztopljeni zeleni produkt pa bomo lahko filtrirali. Z našo metodo smo dosegali dovolj visoke stopnje čistosti. Čiščenje s kolonsko kromatografijo ni prišlo v poštev, saj so bile naše spojine brez izjeme slabo topne v ustreznih mobilnih fazah in bi se obarjale v koloni. To bi privedlo do slabe ločbe in prenizkih izkoristkov. Tovrsten

postopek smo uporabili le pri spojinah **2** in **18**, vendar se je iz navedenih razlogov le deloma obnesel. Izkoristki so bili izredno majhni, poleg tega je bilo pri spojini **18** potrebno dodatno čiščenje ustreznih frakcij. Omenjeni protokoli čiščenja z raztapljanjem nečistot kljub precejšnjim izgubam vseeno omogočajo bistveno višje izkoristke kot kromatografske kolone.

Na razvitih TLC ploščicah je bilo videti, da so v reakcijah nastajali tudi številni stranski produkti. Poleg višje omenjenih je možna stranska reakcija kislinsko katalizirana nukleofilna adicija amina na aromatski aldehid s sledečo eliminacijo vode (slika 14).



Slika 14 Mehanizem nukleofilne adicije amina na aldehid s sledečo eliminacijo

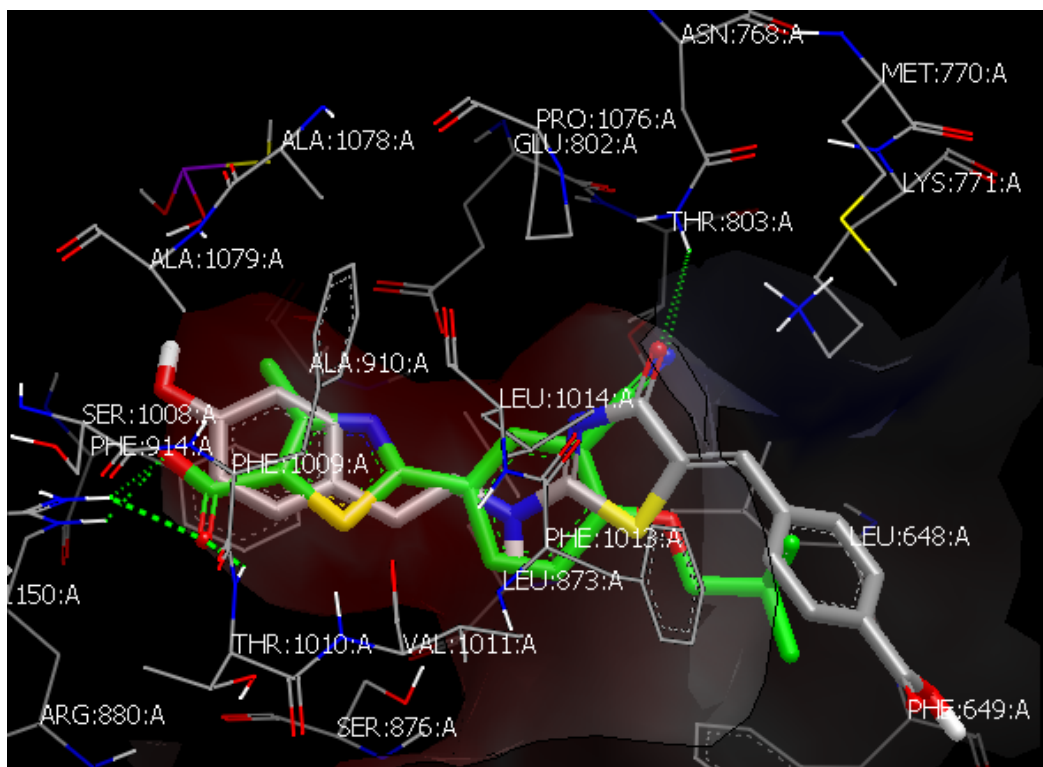
Reakcija v tej obliki poteka le s primarnimi amini. Amin nukleofilno napade karbonilni ogljik. Proton se premesti z dušikovega atoma na kisikov atom karbonilne skupine, dobimo hemiaminalni intermediat. Kislinski katalizator protonira hidroksilno skupino hemiaminala. Nevezni elektronski par se premesti z dušika in tvori se dvojna vez s sočasno dehidracijo. Nastali iminijev kation odda proton in tvori se končni imin.

5.2. MOLEKULSKO SIDRANJE

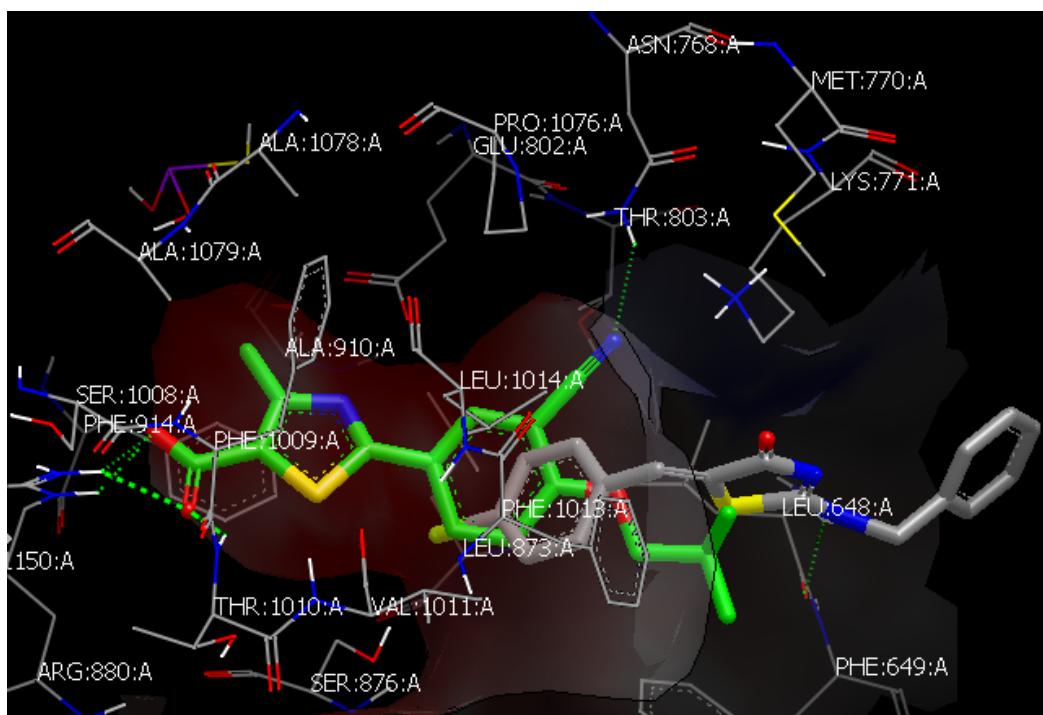
Protokol sidranja smo validirali z vezavo računalniško generiranih konformacij febuksostata v vezavno mesto XO s kokristaliziranim febuksostatom (priloga 1, slika 18). Molekuli se praktično prekrivata, kar kaže na ustreznost protokola. Kljub temu vrednosti, generirane v poročilu (priloga 2, tabela IV) niso povsem v skladu z rezultati bioloških testiranj. Molekulska sidranje je namreč orodje, ki se uporablja predvsem za preučevanje načina vezave molekul na aktivno mesto, ni pa orodje izbora za napoved afinitete vezave. Z njim smo pokazali, da sintetizirani zaviralci lahko zasedejo ugoden položaj v aktivnem mestu in izkoristijo nove interakcije v primerjavi s prvo serijo spojin. Vsekakor pa je zanimivo, da je program kot najboljšo (za febuksostatom) ovrednotil ravno vezavo spojine **21**, ki se je na bioloških testiranjih izkazala kot najmočnejši zaviralec. To kaže, da smo izbrali substituyente, ki ugodno vplivajo na vezavo molekule.

Sidranje struktur je pokazalo dva možna načina vezave. Večina spojin se veže z amskim delom v notranjosti in benzilidenskim delom obrnjenim proti topilu. Spojina **21** tvori z vezavnim mestom številne interakcije (slika 15). Fenilni obroč amskega dela je vrinjen med Phe 914 in Phe 1009 in z njima lahko tvori π - π interakcije. Obroč Phe 1009 je postavljen pravokotno nanj. Hidroksilna skupina lahko tvori vodikovo vez z Arg 880. Tiazolinonski obroč je med Leu 873 in Leu 1014, njegova karbonilna skupina pa tvori vodikovo vez z amidno skupino Asn 768. Benzilidenski del je obdan s hidrofobnimi ostanki Leu 648, Phe 649, Val 1011 in Phe 1013. Karboksilna skupina štrli v topilo.

Drugi način vezave, ki so ga pokazali rezultati, je z amskim delom obrnjenim proti topilu (slika 16). Čeprav je program pokazal drugače, bi v resnici lahko spojina **21** zavzela tudi takšen položaj. Tudi v obrnjenem položaju pričakujemo vzpostavitev ugodnih interakcij z aktivnim mestom. Večina ostalih spojin nima te lastnosti, zato je tip spojin s 4-karboksibenzilidenskim delom zanimiv za razširjeno sintezo in dodatne *in silico* eksperimente.



Slika 15 Spojina **21** (obarvana sivo), sidrana v vezavno mesto XO s kokristaliziranim febuksostatom (obarvan zeleno)



Slika 16 Spojina **16** (obarvana sivo), sidrana v vezavno mesto XO s kokristaliziranim febuksostatom (obarvan zeleno)

5.3. BIOLOŠKA TESTIRANJA

9 spojin od 22 inhibira komercialno XO z IC_{50} vrednostjo pod $150 \mu M$ (tabela I). Pri XO iz homogenata podganjih jeter so takšne spojine štiri (tabela II). Najbolj aktivna v obeh sistemih je spojina **21**, sledita ji **15** in **11**. Vse tri vsebujejo 4-karboksibenzilidensko strukturo. Po jakosti delovanja na komercialni XO jim sledita **16** in **22** s 4-klorobenzilidensko strukturo. Vse našete spojine so močnejši inhibitorji od **17**, ki se je pokazala kot najbolj aktivna v prvi knjižnici (20). Videti je tudi, da so v vrsti spojin z istim alkilidenskim delom tiste z benzilaminskim ali 2-(4-hidroksifenil)etilaminskim substituentom močnejše od tistih z morfolinskim. Vse spojine so šibkejši inhibitorji od alopurinola, vendar sta spojini **21** in **15** v istem velikostnem razredu IC_{50} kot alopurinol.

Tabela I IC_{50} vrednosti [μM] spojin 4-25 na komercialni XO

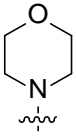
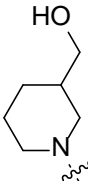
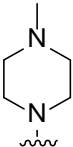
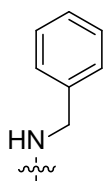
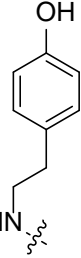
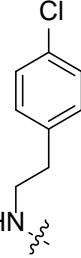
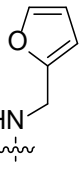
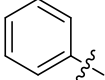
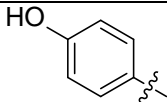
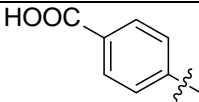
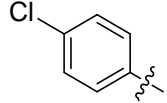
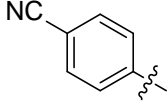
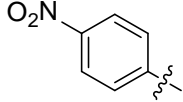
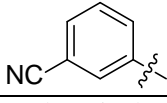
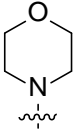
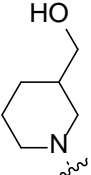
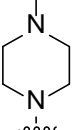
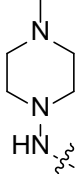
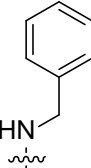
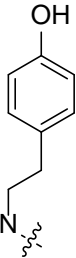
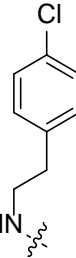
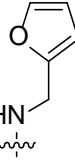

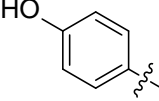
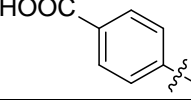
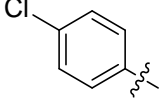
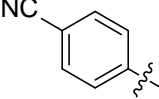
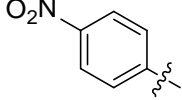
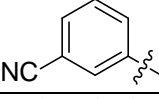
R^2	R^1							
	4 >150	10 >150		12 >150	13 >150	19 >150	24 >150	25 >150
	5 >150				14 77,26	20 96,76		
			11 13,18		15 3,67	21 2,32		
	6 >150				16 25,91	22 53,76		
	7 >150				17 95,03	23 121,07		
	8 >150				18 >150			
	9 >150							
alopurinol	2,03							
kvercetin	21,05							

Tabela II IC₅₀ vrednosti [μM] spojin 4-25 na XO v homogenatu podganjih jeter

R ²								
	R ¹							
								
	<u>4</u> >150	<u>10</u> >150		<u>12</u> >150	<u>13</u> >150	<u>19</u> >150	<u>24</u> >150	<u>25</u> >150
	<u>5</u> >150				<u>14</u> >150	<u>20</u> >150		
			<u>11</u> 42,73		<u>15</u> 11,59	<u>21</u> 7,21		
	<u>6</u> >150				<u>16</u> 77,62	<u>22</u> >150		
	<u>7</u> >150				<u>17</u> >150	<u>23</u> >150		
	<u>8</u> >150				<u>18</u> >150			
	<u>9</u> >150							
	alopurinol	5,33						
	kvercetin	59,37						

Rezultati so v skladu z našo prvotno domnevo, da bi karboksilna skupina utegnila ugodno vplivati na aktivnost zaviralcev.

5.4. ŠTUDIJ FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI SPOJIN

Možnost nespecifične inhibicije XO in lažno pozitivnih rezultatov smo večinoma preučevali na primeru ene spojine. Izbrali smo spojino 21, ki se je med biološkimi testiranjmi pokazala kot najbolj aktivna.

5.4.1. Testiranje reaktivnosti spojin

Izvedli smo serijo poskusov reaktivnosti spojin **3** in **21** z dvema nukleofiloma v dveh topilih ter poskuse spremljali z $^1\text{H-NMR}$ spektroskopijo. Na začetku eksperimenta smo ugotovili, da je spojina **21** netopna v CDCl_3 , saj je na spektrih ni bilo videti, zato smo ta poskus izključili iz razprave.

Glede na mehanizem Michaelovih adicij bi pričakovali zamenjavo protona na metilidenskem ogljiku z nukleofilom in posledično znižanje jakosti signala tega protona. Po pregledu $^1\text{H-NMR}$ spektrov reakcijskih zmesi po 1, 24 in 48 urah smo ugotovili, da se ne razlikujejo bistveno glede na spektre, posnete takoj po dodatku vseh reagentov. Iz tega sledi, da spojini **3** in **21** ne reagirata z uporabljenima nukleofiloma pri naših pogojih. Sklepamo, da so naše spojine nereaktivne, ker je mesto, kjer bi prišlo do reakcije, del konjugiranega sistema aromatskega obroča, dvojne vezi in karbonilne skupine. Adicija bi prekinila konjugacijo, kar je s energijskega stališča neugodno.

Uporabili smo dva različna reagenta, saj smo želeli preizkusiti reaktivnost spojine s trdim (amin) in mehkim (tiol) nukleofilom. V primeru Michaelovih akceptorjev ti dve vrsti namreč različno reagirata. Mehki nukleofili navadno reagirajo po mehanizmu 1,4-adicije, katere produkt je termodinamsko stabilnejši, trdi pa po mehanizmu 1,2-adicije, kjer je reakcija usmerjana kinetično (35). Glede na mehanizem Michaelovih adicij bi pričakovali, da elektron privlačni substituenti na benzilidenskem delu molekule povečajo reaktivnost elektrofilnega centra. Če bi naše spojine nespecifično reagirale z nukleofilnimi aminokislinskimi ostanki XO, bi največjo aktivnost pokazale spojine z nitro, karboksi in ciano substituenti. Negativni mezomerni efekt nitro skupine je med temi največji. Vendar opazimo, da nobena od spojin z nitro substituentom ni aktivna na XO v definiranem območju, medtem ko sta dve od treh spojin s ciano substituenti šibko aktivni. Ta posreden dokaz v kombinaciji z našim testom spremljanja reaktivnosti z $^1\text{H-NMR}$ kaže na to, da 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-oni niso nespecifični kovalentni inhibitorji encimov.

5.4.2. Testiranje agregacije spojin

Pregled korelacijskih krivulj (priloga 3, sliki 19 in 21) kaže, da zetasizer ne more potrditi prisotnosti trdnih delcev pri koncentraciji 1 mM niti v DMSO niti v zmesi DMSO in vode v razmerju 1 : 9. Pri koncentraciji 10 mM pa smo zaznali delce v obeh sistemih.

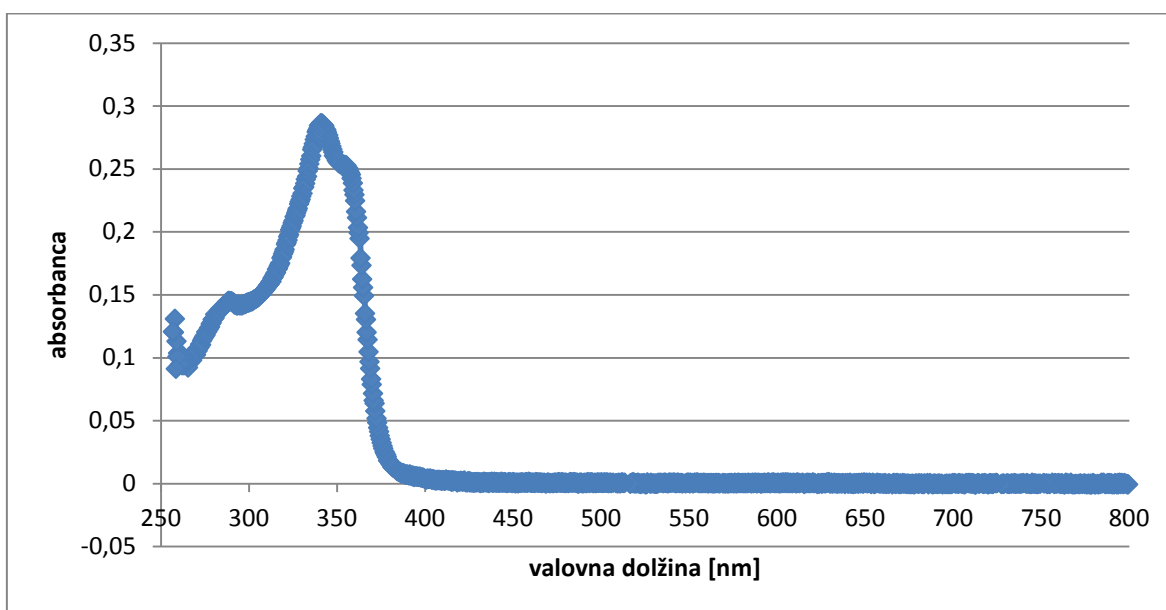
Tabela III Rezultati analize prisotnosti delcev v raztopinah spojine **21**, pridobljeni z zetasizerjem

	velikost agregatov [nm]	povprečna velikost [nm]
1 mM DMSO	/	/
1 mM DMSO : H ₂ O = 9 : 1	/	/
10 mM DMSO	100-800	326,5
10 mM DMSO : H ₂ O = 9 : 1	1000-3000	1837

Iz rezultatov (tabela III ter priloga 3, sliki 20 in 22) je razvidno, da se agregati spojine **21** začnejo tvoriti pri koncentraciji med 1 mM in 10 mM. Delci so večji v sistemu DMSO in vode zaradi slabše topnosti spojine v vodi. Pri 1 mM koncentraciji v raztopinah ni agregatov niti v sistemu DMSO in vode, ki simulira pogoje bioloških testiranj. Na podlagi tega lahko zaključimo, da spojina **21** ne tvori agregatov pri relevantnih pogojih bioloških testiranj in potemtakem ne deluje po mehanizmu adsorpcije encima na površino.

5.2.3. Merjenje absorpcijskega UV-VIS spektra spojin

Obdelane podatke smo predstavili v obliki grafa absorbance v odvisnosti od valovne dolžine svetlobe (slika 17).



Slika 17 Graf absorbance spojine 21 v odvisnosti od valovne dolžine

Spojina **21** absorbira v območju 250-380 nm, maksimum absorpcije je pri 341 nm. Ne absorbira po širokem območju valovnih dolžin ultravijolične in vidne svetlobe. Hiter pregled nekaterih fluorescentnih barvil nam pokaže, da jih veliko absorbira svetlobo pri višjih valovnih dolžinah, npr. tartrazin (425 nm), fluorescein (496 nm), metil oranžno (507 nm), triptan modro (607 nm) in malahit zeleno (615 nm) (23). Emitirana svetloba ima višje

valovne dolžine kot absorbirana. Absorpcijski in emisijski spektri velikega dela fluorescentnih barvil se ne prekrivajo z absorpcijskim spektrom spojine **21**. Test daje informacijo, ki je lahko v pomoč pri oblikovanju ustreznega testnega sistema za morebitna nadaljnja testiranja. Barvila, ki absorbirajo in emitirajo svetlobo pri valovnih dolžinah nad 400 nm bi bila primerna za uporabo v bioloških testih, ki bi vključevali naše spojine. Testna sistema, na katerih so testirali naše spojine, sicer vključujeta detekcijo produkta encimske reakcije pri 293 nm, vendar s slepimi meritvami zagotavljamo, da se absorbance učinkovin odštejejo od izmerjenih vrednosti.

5.2.4. Analiza rezultatov testov nespecifičnih mehanizmov

Pokazali smo, da najmočnejša spojina iz knjižnice, spojina **21**, ne deluje po nespecifičnih mehanizmih, ki jih opisuje Baell. Domnevamo, da je njena aktivnost posledica specifičnih interakcij s XO. Možno je, da se podobno kot febuksostat veže v kanal, ki vodi do aktivnega mesta encima in s tem prepreči dostop substratom. Neizpodbiten dokaz za to pa bi dobili s kristalno strukturo encima z vezanim zaviralcem. Sklepamo, da reaktivnost spojine **21** velja tudi za ostale predstavnike sintetizirane serije, saj gre za podobne strukture z enakim profilom substitucije na osrednjem tiazolinonskem obroču. Vendar moramo biti pozorni in vsako spojino obravnavati individualno.

Rodanini, ki jih navajajo v literaturi, imajo v nasprotju z našimi spojinami na mestu 2 osrednjega obroča tiokarbonilno skupino. Obstaja možnost, da je ta skupina odgovorna za večino nespecifičnih interakcij in ne Michaelov akceptor. S substitucijo z aminom na mestu 2 smo rodanine pretvorili v 2-aminotiazolin-4-one in s tem spremenili reaktivnost obroča.

Rodaninski obroč omogoča sintezo zelo raznolikih derivatov, zato je težko označiti celoten razred spojin kot PAINS na podlagi delovanja le ene skupine spojin znotraj tega razreda. Tu se kaže možnost, da PAINS strukture z ustreznimi kemijskimi modifikacijami pretvorimo v takšne, ki nimajo težnje po nespecifičnih interakcijah in so lahko popolnoma legitimni zadetki rešetanj. Lastnosti molekul namreč ne določa le osrednji obroč, pač pa so ključnega pomena substituenti, s katerimi vstopajo v interakcije z biološkimi makromolekulami, topilom in ena z drugo.

6. SKLEP

Tekom praktičnega dela magistrske naloge smo sintetizirali usmerjeno knjižnico 22 spojin z namenom testiranja njihovega zaviralnega delovanja na XO. 9 spojin je aktivnih na komercialni XO iz govejega mleka, od teh štiri zavirajo tudi XO iz homogenata podganjih jeter z IC_{50} manjšim od 150 μ M. Kot najboljši zaviralec se je izkazala spojina **21**, sledi ji spojina **15**. Aktivnost obeh spojin je primerljiva z alopurinolom, ki se uporablja v klinični praksi. Vse tri najboljše spojine vsebujejo 4-karboksibenzilidenski fragment. Spojine s 4-klorobenzilidenskim delom so šibkejši inhibitorji, šibko aktivne so še spojine s 4-hidroksibenzilidenskim in 4-cianobenzilidenskim delom. Vsem je skupno, da vsebujejo na amskem delu aromatsko strukturo (benzilaminsko ali 2-(4-hidroksifenil)etilaminsko).

Uspeli smo sintetizirati veliko število spojin v relativno kratkem času, kar lahko pripišemo enostavni in učinkoviti metodi enolončne sinteze. Največ težav nam je povzročala izolacija produktov. So slabo topni v običajnih organskih topilih, kar nam je onemogočalo čiščenje s kolono. Posledično smo morali za vsako spojino posebej dodobra raziskati pogoje izolacije in čiščenja. Tekom eksperimentalnega dela smo razvili učinkovite in preproste načine izolacije in čiščenja s pomočjo raztapljanja nečistot v organskih topilih. Razvili smo uspešne protokole, ki omogočajo hitro sintezo večjih količin produktov ustrezne čistosti.

Sintetizirane spojine smo *in silico* sidrali v vezavno mesto XO, pri čemer je program kot najboljšo ovrednotil ravno spojino **21**. Napovedali smo potencialno ustrezen način vezave, zlasti za spojine s karboksilno skupino, ki so se na bioloških testih izkazale kot najmočnejši zaviralci.

Zaradi opozoril v literaturi, da tovrstne spojine sodijo med PAINS, smo preučili tudi možnost njihovega neselektivnega delovanja. Dokazali smo, da spojina **21** ni Michaelov akceptor in ne reagira z nukleofili pri fiziološko relevantnih pogojih, prav tako ne tvori agregatov pri IC_{50} . S tem smo pokazali, da spojine s tiazolinonskim skeletom niso nujno PAINS. Eno ključnih dognanj našega eksperimentalnega dela je, da lahko z ustreznimi strukturnimi modifikacijami spremenimo PAINS v spojine, ki se vežejo na tarčo selektivno in reverzibilno.

S praktičnim delom magistrske naloge smo uspeli preseči uspeh prve serije 2-amino-5-alkiliden-tiazolin-4-onkih zaviralcev XO in hkrati postavili podlago za nadaljnje delo na

tem skeletu. Z dokazi, da ne gre za PAINS, smo upravičili nadaljnji razvoj teh spojin z namenom povečanja jakosti delovanja na XO. Ker se je kot ključna za delovanje izkazala karboksilna skupina na benzilidenskem delu molekule, bo delo usmerjeno predvsem v sintezo 5-(4-karboksibenziliden)-tiazolin-4-onskih struktur z derivatizacijo na amskem delu.

7. LITERATURA

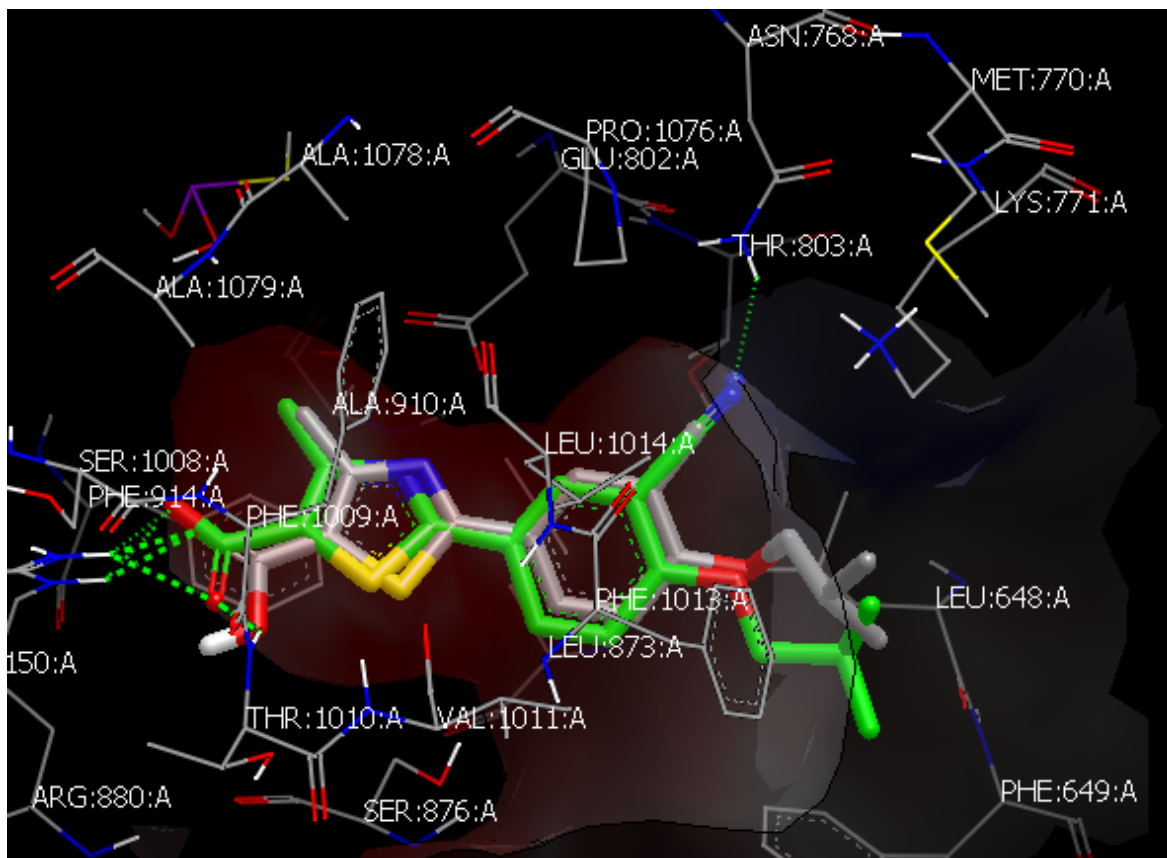
1. Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Pai EF: Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(20): 10723-8.
2. Harrison R: Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002; 33(6): 774-97.
3. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: *Interna medicina*, 4. izdaja, Littera Picta, Ljubljana, 2011: 1456-61.
4. Hille R: Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch Biochem Biophys* 2005; 433(1): 107-16.
5. Hille R, Hall J, Basu P: The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev* 2014; 114(7): 3963-4038.
6. Okamoto K, Matsumoto K, Hille R, Eger BT, Pai EF, Nishino T: The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(21): 7931-6.
7. Falasca GF: Metabolic diseases: gout. *Clin Dermatol* 2006; 24(6): 498-508.
8. Richette P, Bardin T: Gout. *Lancet* 2010; 375(9711): 318-28.
9. Baker JF, Schumacher HR: Update on gout and hyperuricemia. *Int J Clin Pract* 2010; 64(3): 371-7.
10. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G: *Rang & Dale's pharmacology*, 7. izdaja, Elsevier Limited, 2012: 331-2
11. Burns CM, Wortmann RL: Gout therapeutics: new drugs for an old disease. *Lancet* 2011; 377(9760): 165-77.
12. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C: Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58(1): 87-114.
13. Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Pai EF, Nishino T: Mechanism of inhibition of xanthine oxidoreductase by allopurinol: crystal structure of reduced bovine milk xanthine oxidoreductase bound with oxipurinol. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; 27(6): 888-93.

14. Nishino T, Okamoto K: Mechanistic insights into xanthine oxidoreductase from development studies of candidate drugs to treat hyperuricemia and gout. *J Biol Inorg Chem* 2015; 20(2): 195-207.
15. Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Kondo S, Pai EF, Nishino T: An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 2003; 278(3): 1848-55.
16. Fukunari A, Okamoto K, Nishino T, Eger BT, Pai EF, Kamezawa M, Yamada I, Kato N: Y-700 [1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxylic acid]: a potent xanthine oxidoreductase inhibitor with hepatic excretion. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311(2): 519-28.
17. Matsumoto K, Okamoto K, Ashizawa N, Nishino T: FYX-051: a novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336(1): 95-103.
18. Tomašić T, Mašič LP: Rhodanine as a privileged scaffold in drug discovery. *Curr Med Chem* 2009; 16(13): 1596-629.
19. Anderluh M, Jukič M, Petrič R: Three-component one-pot synthetic route to 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Tetrahedron* 2009; 65: 344-50
20. Smelcerovic Z, Veljkovic A, Kocic G, Yancheva D, Petronijevic Z, Anderluh M, Smelcerovic A: Xanthine oxidase inhibitory properties and anti-inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Chem Biol Interact* 2015; 229: 73-81.
21. Sinko W, Wang Y, Zhu W, Zhang Y, Feixas F, Cox CL, Mitchell DA, Oldfield E, McCammon JA: Undecaprenyl diphosphate synthase inhibitors: antibacterial drug leads. *J Med Chem* 2014; 57(13): 5693-701.
22. Zvezdanovic J, Daskalova L, Yancheva D, Cvetkovic D, Markovic D, Anderluh M, Smelcerovic A: 2-Amino-5-alkylidenethiazol-4-ones as promising lipid peroxidation inhibitors. *Monatsh Chem* 2014; 145: 945-952.
23. Baell JB, Holloway GA: New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem* 2010; 53(7): 2719-40.
24. Baell J, Walters MA: Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* 2014; 513(7519): 481-3.
25. Carlson EE, May JF, Kiessling LL: Chemical probes of UDP-galactopyranose mutase. *Chem Biol* 2006; 13(8): 825-37.

26. Lee G, Piper DE, Wang Z, Anzola J, Powers J, Walker N, Li Y: Novel inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerases. *J Mol Biol* 2006; 357(4): 1051-7.
27. Carter PH, Scherle PA, Muckelbauer JK, Voss ME, Liu RQ et. al.: Photochemically enhanced binding of small molecules to the tumor necrosis factor receptor-1 inhibits the binding of TNF-alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(21): 11879-84.
28. Tomašić T, Peterlin Mašič L: Rhodanine as a scaffold in drug discovery: a critical review of its biological activities and mechanisms of target modulation. *Expert Opin Drug Discov* 2012; 7(7): 549-60.
29. McGovern SL, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet BK: A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J Med Chem* 2002; 45(8): 1712-22.
30. McGovern SL, Helfand BT, Feng B, Shoichet BK: A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J Med Chem* 2003; 46(20): 4265-72.
31. Mendgen T, Steuer C, Klein CD: Privileged scaffolds or promiscuous binders: a comparative study on rhodanines and related heterocycles in medicinal chemistry. *J Med Chem* 2012; 55(2): 743-53.
32. Kirchmair J, Wolber G, Laggner C, Langer T: Comparative performance assessment of the conformational model generators Omega and Catalyst: a large-scale survey on the retrieval of protein-bound ligand conformations. *J Chem Inf Model* 2006; 46(4): 1848-61.
33. McGann M: FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. *J Comput-Aided Mol Des* 201; 26(8): 897-906.
34. Loupy A: *Microwaves in organic synthesis*, 2. izdaja, Wiley-VCH, Weinheim, 2006: 66, 116-7.
35. Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P: *Organic Chemistry*, 1. izdaja, Oxford University Press, New York, 2001: 234-5.

8. PRILOGE

Priloga 1: Validacija protokola sidranja



Slika 18 Računalniško generirana molekula febuksostata (obarvana sivo), sidrana v vezavno mesto XO s kokristaliziranim febuksostatom (obarvan zeleno)

Priloga 2: Poročilo sidranja spojin v vezavno mesto XO

Tabela IV Poročilo sidranja spojin v vezavno mesto XO

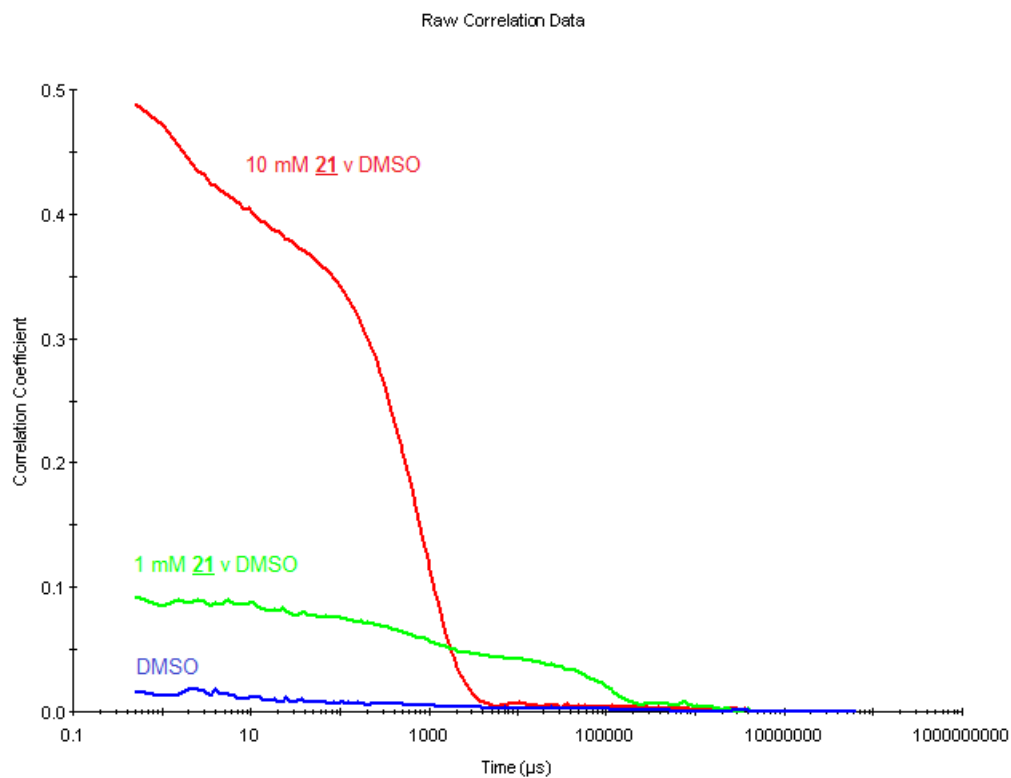
spojina	M_r	xLog P	PSA	težki atomi	št. akc.	št. don.	št. kel.	oblika	H-vez	desol. prot.	desol. lig.	total score
febukso stat	316,375	2,8	83,2	22	5	1	2	-15,28 (98%)	-2,82 (80%)	4,11 (27%)	3,36 (5%)	- 10,63 (98%)
<u>21</u>	368,407	2,5	99,0	26	5	2	2	-14,62 (95%)	-2,34 (63%)	5,38 (5%)	2,51 (16%)	-9,07 (91%)
<u>19</u>	324,398	3,5	61,7	23	3	1	1	-13,86 (84%)	-2,49 (73%)	5,04 (13%)	2,47 (23%)	-8,83 (88%)
<u>20</u>	340,397	2,6	81,9	24	4	2	2	-14,35 (91%)	-2,25 (52%)	5,08 (9%)	2,73 (9%)	-8,79 (84%)
<u>23</u>	349,408	3,3	85,5	25	4	1	1	-13,54 (80%)	-2,46 (66%)	5,01 (16%)	2,47 (27%)	-8,52 (80%)
<u>10</u> (R)*	302,392	2,9	52,9	21	3	1	1	-9,80 (48%)	-3,63 (84%)	2,68 (41%)	2,33 (45%)	-8,43 (77%)
<u>10</u> (S)*	302,392	2,9	52,9	21	3	1	1	-8,96 (20%)	-3,85 (88%)	2,19 (52%)	2,39 (38%)	-8,23 (73%)
<u>24</u>	342,841	5,0	41,5	23	2	0	0	-13,93 (89%)	-1,81 (38%)	5,55 (2%)	1,99 (66%)	-8,19 (70%)
<u>14</u>	310,371	3,4	61,7	22	3	1	1	-9,58 (41%)	-1,21 (30%)	1,68 (73%)	1,25 (88%)	-7,86 (63%)
<u>15</u>	338,381	3,3	78,8	24	4	1	1	-9,77 (45%)	-2,22 (48%)	1,88 (55%)	2,56 (13%)	-7,56 (59%)
<u>12</u>	302,396	2,6	47,9	21	3	0	0	-7,32 (5%)	-3,94 (91%)	1,62 (80%)	2,15 (55%)	-7,50 (55%)
<u>9</u>	299,348	2,1	65,7	21	4	0	0	-9,07 (23%)	-2,78 (77%)	2,27 (45%)	2,23 (52%)	-7,35 (48%)
<u>25</u>	284,333	3,2	54,6	20	3	0	0	-11,87 (73%)	-0,74 (20%)	2,93 (38%)	2,35 (41%)	-7,33 (45%)
<u>13</u>	294,372	4,3	41,5	21	2	0	0	-9,29 (30%)	-0,45 (9%)	1,64 (77%)	0,80 (98%)	-7,30 (41%)
<u>16</u>	328,814	4,9	41,5	22	2	0	0	-9,49 (38%)	-0,62 (16%)	1,84 (63%)	1,04 (91%)	-7,23 (38%)
<u>17</u>	319,382	4,1	65,3	23	3	0	0	-10,05 (55%)	-0,37 (5%)	1,83 (66%)	1,39 (84%)	-7,19 (34%)
<u>18</u>	339,369	2,6	84,6	24	4	0	0	-9,87 (52%)	-0,98 (27%)	1,78 (70%)	1,93 (77%)	-7,14 (30%)
<u>5</u>	290,337	1,4	62,1	20	4	1	1	-7,73 (9%)	-2,29 (59%)	1,13 (98%)	1,79 (80%)	-7,11 (27%)
<u>6</u>	308,780	2,9	41,9	20	3	0	0	-10,36 (59%)	-0,87 (23%)	2,21 (48%)	2,05 (63%)	-6,96 (23%)
<u>4</u>	274,338	2,3	41,9	19	3	0	0	-8,50 (13%)	-2,22 (45%)	1,84 (59%)	1,99 (70%)	-6,88 (20%)
<u>7</u>	299,348	2,1	65,7	21	4	0	0	-9,19 (27%)	-0,01 (2%)	1,42 (91%)	0,91 (95%)	-6,88 (16%)
<u>11</u>	331,390	1,6	73,2	23	5	1	1	-11,72 (70%)	-2,47 (70%)	4,94 (20%)	2,43 (30%)	-6,82 (13%)
<u>8</u>	319,335	0,6	85,0	22	5	0	0	-9,38 (34%)	-0,52 (13%)	1,47 (88%)	1,97 (73%)	-6,46 (9%)

*oznaki (R) in (S) označujeta konformacijo na kiralnem centru spojine

št. akc.: število akceptorjev vodikovih vezi; **št. don.:** število donorjev vodikovih vezi; **št. kel.:** število centrov, ki lahko delujejo kot kelatorji; **oblika:** prispevek oblike molekule k vezavi; **H-vez:** prispevek vodikove vezi; **desol. prot.:** prispevek desolvatacije tarčnega proteina; **desol. lig.:** prispevek desolvatacije liganda

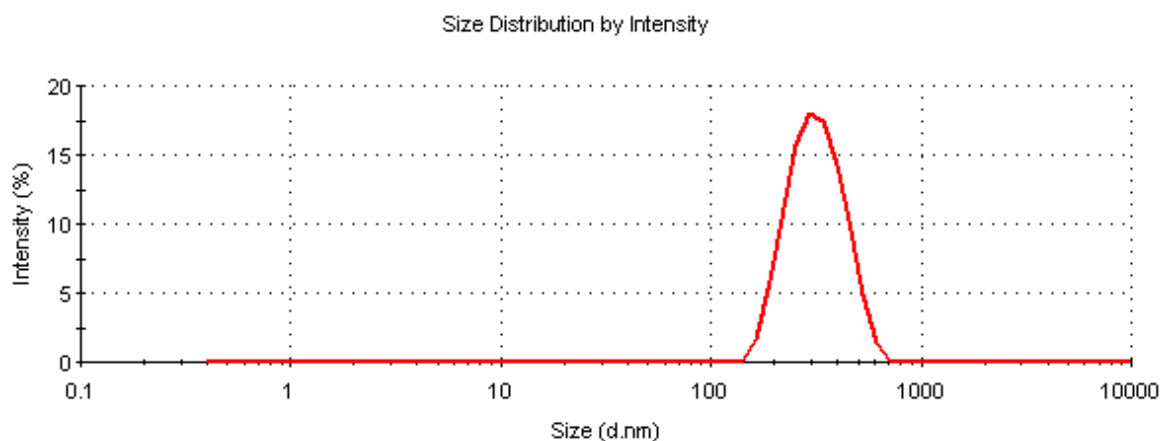
Priloga 3: Grafi analize agregacije spojine 21

a) Korelacijska krivulja za raztopino 21 v DMSO



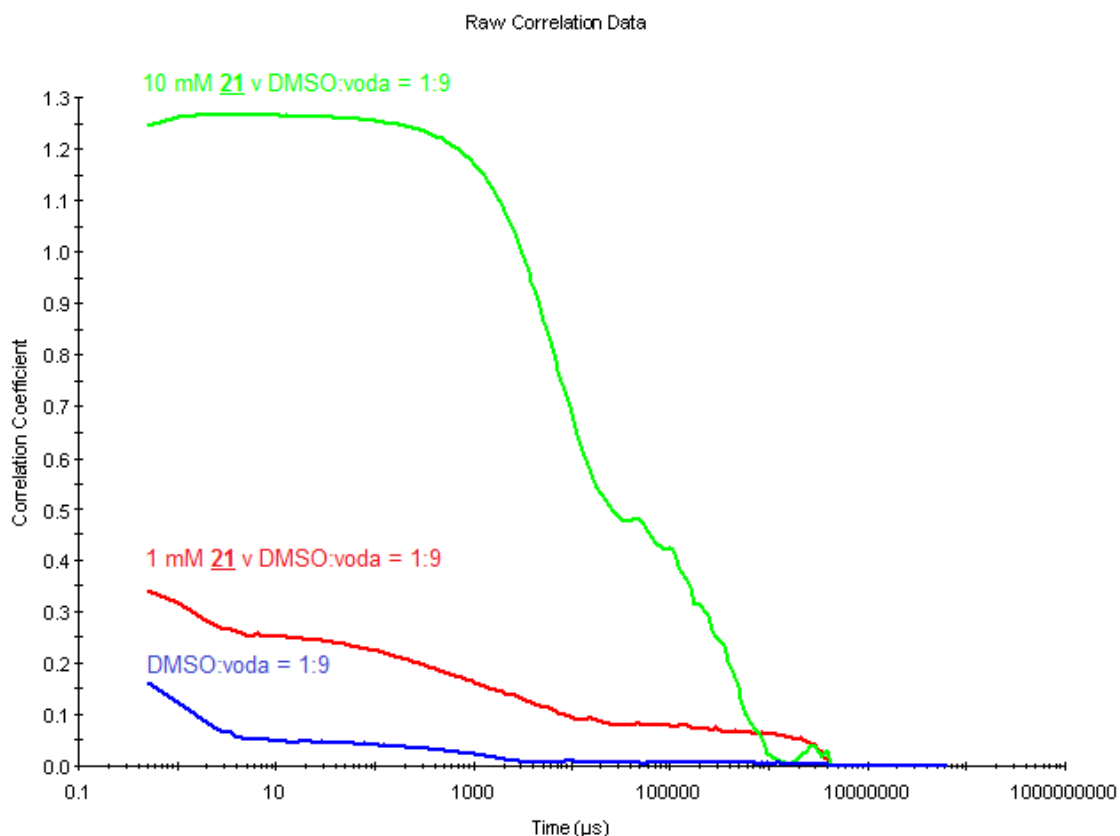
Slika 19 Korelacijska krivulja za raztopino 21 v DMSO

b) Porazdelitev velikosti delcev v 10 mM raztopini 21 v DMSO



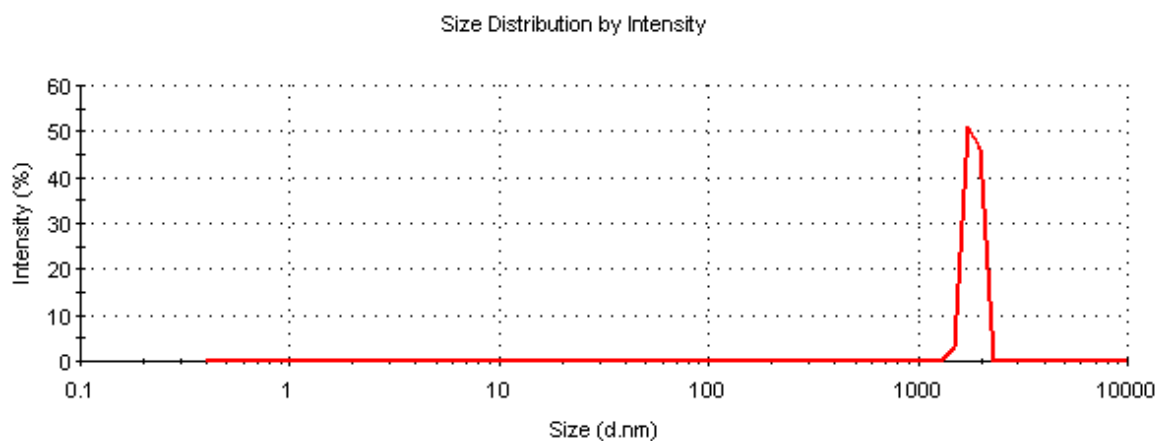
Slika 20 Porazdelitev velikosti delcev v 10 mM raztopini 21 v DMSO

c) Korelacijska krivulja za raztopino 21 v sistemu DMSO:H₂O = 9:1



Slika 21 Korelacijska krivulja za raztopino 21 v sistemu DMSO:H₂O = 9:1

b) Porazdelitev velikosti delcev v 10 mM raztopini 21 v DMSO:H₂O = 1:9



Slika 22 Porazdelitev velikosti delcev v 10 mM raztopini 21 v DMSO:H₂O = 1:9