

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAMO GUZELJ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAMO GUZELJ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA ZAVIRALCEV KSANTINSKE
OKSIDAZE S PIRIDIL-1,2,4-OXSADIAZOLNIM OGRODJEM**
**DESIGN AND SYNTHESIS OF XANTHINE OXIDASE INHIBITORS
BASED ON A PYRIDYL-1,2,4-OXADIAZOLE SCAFFOLD**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvomizr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. *In vitro* testiranja aktivnosti so opravili na Centru za biomedicinsko znanost na Medicinski fakulteti Univerze v Nišu.

Zahvala

Iskreno zahvalo izrekamizr. prof. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm. za vložen trud, čas in deljenje strokovnega znanja med izdelavo magistrskega dela.

Zahvalil bi se še družini za razumevanje, podporo in vzpodbudo skozi življenje ter prijateljem za nepozabna študentska leta.

Hvala tudi tebi Neža, da si stala z menoj, mi pomagala in me z ljubeznijo podpirala skozi celoten študij.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvomizr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Samo Guzelj

Ljubljana, 2017

VSEBINA

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD.....	1
1.1 RAZGRADNJA PURINOV	1
1.2 KSANTINSKA OKSIDAZA	2
1.2.1 Struktura in mehanizem delovanja ksantinske oksidoreduktaze.....	3
1.3 S KSANTINSKO OKSIDOREDUKTAZO POVEZANA PATOFIZIOLOGIJA .	4
1.3.1 Putika oz. protin	4
1.3.2 Kardiovaskularne bolezni.....	6
1.4 TERAPIJA HIPERURIKEMIJE	8
1.5 ZAVIRALCI KSANTINSKE OKSIDAZE.....	9
1.5.1 Alopurinol	9
1.5.2 Febuksostat.....	11
1.5.3 Topiroksostat.....	12
1.6 ZAMENJAVA SKELETA OZ. »SCAFFOLD HOPPING«	13
2 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI	18
3.1 KROMATOGRAFSKE METODE	18
3.1.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)	18
3.1.2 Kolonska kromatografija.....	18
3.1.3 Tekočinska kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)	19
3.2 SPEKTROSKOPSKE METODE	19
3.2.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	19
3.2.2 Masna spektrometrija (MS).....	19
3.2.3 Infrardeča spektroskopija (IR)	19
3.3 DOLOČANJE TALIŠČ	19
3.4 PROGRAMSKA OPREMA	19
3.5 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE	20
4 EKSPERIMENTALNI DEL	21
4.1 Sinteza 4-piridilamidoksima (Spojina 1)	21
4.2 Sinteza 4-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)fenola (Spojina 2).....	22
4.3 Sinteza 4-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina (Spojina 3)	23

4.4	Sinteza 4,4'-(1,2,4-oksadiazol-3,5-diil)dipiridina (Spojina 4)	24
4.5	Sinteza 4-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoničila (Spojina 5).....	25
4.6	Sinteza 4-(5-(4-nitrofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina (Spojina 6).....	26
4.7	Sinteza 5-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzen-1,3-diola (Spojina 7)....	27
4.8	Sinteza (z)-n-hidroksi-2-metoksiisonikotinimidamida (Spojina 8)	28
4.9	Sinteza 4-(3-(2-metoksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)fenola (Spojina 9).....	29
4.10	Sinteza 2-metoksi-4-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina..... (Spojina 10).....	30
4.11	Sinteza 2-metoksi-4-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina (Spojina 11)	31
4.12	Sinteza 4-(3-(2-metoksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoničila	33
4.13	Sinteza 2-metoksi-4-(5-(4-nitrofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina (Spojina 13)	34
4.14	Sinteza 4-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-ola (Spojina 14) ..	35
4.15	Sinteza 5-(3-(2-metoksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzen-1,3-diola..... (Spojina 15).....	36
4.16	Sinteza 5-(3-(2-hidroksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzen-1,3-diola	37
4.17	Sinteza 4-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina-2-ola (Spojina 17).....	38
4.18	Sinteza 4-(3-(2-hidroksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoničila	39
4.19	Sinteza 4-(5-(4-nitrofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-ola (Spojina 19).....	40
4.20	Sinteza 3-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoničila (Spojina 20).....	41
4.21	Sinteza 2-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)-4-piridinkarbonitrila	42
4.22	Sinteza 4-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)-2-piridinkarbonitrila	43
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	45
5.1	TVORBA AMIDOKSIMA.....	45
5.2	DVOSTOPENJSKA TVORBA 1,2,4-OKSADIAZOLA.....	46
5.3	DEMETILIRANJE Z BOROVIK TRIBROMIDOM	48
5.4	DEMETILIRANJE Z BROMOVODIKOVO KISLINO.....	50
5.5	BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE	51
6	ZAKLJUČEK	56
7	LITERATURA	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Razgradnja AMP in GMP do sečne kisline.....	1
Slika 2: Reakciji, ki ju katalizirata obe obliki ksantinske oksidoreduktaze: ksantinska dehidrogenaza (XDH) in ksantinska oksidaza (XO)	3
Slika 3: A: Shema mehanizma oksidacije ksantina, B: Piranopterinski kofaktor	4
Slika 4: A: Sulfinpirazon, B: Probenecid, C: Benzbromaron, D: Lesinurad.....	9
Slika 5: A: Alopurinol, B: Oksipurinol, C: Mehanizem vezave oksipurinola v aktivno mesto encima	11
Slika 6: Febuksostat.....	11
Slika 7: Mehanizem zaviralnega delovanja topiroksostata.....	12
Slika 8: A: Morfin z označenimi cepitvami vezi, B: Tramadol.....	14
Slika 9: Strukturne spremembe topiroksostata do načrtovanih spojin	15
Slika 10: Potek sinteze iz 4-cianopiridina. Reagenti, a) $\text{NH}_2\text{OH}\times\text{HCl}$, K_2CO_3 , b) RCOOH , EDC, HOBt, Et_3N , DMAP ali RCOCl , Et_3N , DMAP, c) KF, d) BBr_3	16
Slika 11: Potek sinteze iz 2-metoksi-4-cianopiridina. Reagenti, a) $\text{NH}_2\text{OH}\times\text{HCl}$, K_2CO_3 , b) RCOOH , EDC, HOBt, Et_3N , DMAP ali RCOCl , Et_3N , DMAP, c) KF, d) BBr_3 , e) HBr, CH_3COOH	17
Slika 12: A: Mehanizem prek oksaziridinskega intermediata, B: Direktna tvorba amidoksima brez intermediata.....	45
Slika 13: Mehanizem nastanka amidnega stranskega produkta	46
Slika 14: A: Mehanizem aktivacije karboksilne kisline, B: Mehanizem nastanka neželenega produkta	47
Slika 15: Mehanizem katalize z DMAP, X: dobro izstopajoča skupina	48
Slika 16: Mehanizem ciklizacije O-acilamidoksima v 1,2,4-oksadiazol.....	48
Slika 17: Termodinamsko nefavoriziran mehanizem demetilacije	49
Slika 18: Triciklični mehanizem demetilacije z BBr_3	49
Slika 19: Mehanizem demetilacije s HBr	50
Slika 20: Bistvene interakcije topiroksostata v aktivnem mestu ksantinske oksidaze	53
Slika 21: A: Ksantin v enolni tautomerni obliki, B: Spojina 15, C: Krizin, D: Izoramnetin	55

KAZALO TABEL

Tabela I: Zaviralna aktivnost sintetiziranih spojin	51
---	----

POVZETEK

Z močno naraščajočo pojavnostjo putike se pojavlja vedno večja potreba po razvoju novih učinkovin v terapiji te bolezni. Ker je le-ta posledica povišanih serumskih koncentracij sečne kisline, je glavna terapevtska tarča ksantinska oksidaza – encim, ki hipoksantin in ksantin pretvarja v sečno kislino in tako predstavlja zadnjo stopnjo v metabolizmu purinov. Alopurinol, učinkovit zaviralec ksantinske oksidaze, ki je v terapiji putike zdravilo prvega izbora že zadnjih 50 let, zaradi neidealnega toksikološkega profila ni vedno primeren za vse paciente. Kljub obsežnemu iskanju novih zaviralcev sta bili od odkritja alopurinola registrirani le dve novi učinkovini, febuksostat in topiroksostat. Dodatno potrebo po odkrivanju novih učinkovin predstavljajo tudi odkritja vpletenosti sečne kisline v kardiovaskularne in ledvične bolezni, kar bi lahko obsegalo nove terapevtske indikacije zaviralcev ksantinske oksidaze.

V sklopu magistrske naloge smo na podlagi strukture topiroksostata načrtovali in nato sintetizirali serijo potencialnih zaviralcev ksantinske oksidaze. V strukturi topiroksostata smo po principu zamenjave skeleta triazolni obroč zamenjali z 1,2,4-oksadiazolnim obročem. Tako smo dobili piridil-1,2,4-oksadiazolno ogrodje, na katerega smo pripenjali različne substituentne. Sintezo smo pričeli iz dveh derivatov cianopiridina, ki smo ju s hidroksilaminom pretvorili v ustrezna amidoksima. Ta smo nato sklopili z različno substituiranimi aromatskimi karboksilnimi kisljinami in dobljene estre ciklizirali do 1,2,4-oksadiazolnega obroča. Z dodatnimi demetilacijami spojin, ki v svoji strukturi vsebujejo metoksi skupino, smo nato še razširili obseg sintetiziranih spojin.

Sintetizirali smo 20 končnih spojin, ki smo jih nato posredovali v biokemijsko analizo s pomočjo goveje ksantinske oksidaze. Izkazalo se je, da je 1,2,4-oksadiazolni obroč neprimerna zamenjava za triazolni obroč, saj zamenjava vodi v popolno izgubo zaviralne aktivnosti, kljub ohranitvi ostalih strukturnih elementov, ki pri topiroksostatu povzročajo zaviranje encima. Izmed testiranih spojin je šibko aktivna le spojina **15**, katere aktivnost pa verjetneje izvira iz podobnosti z nekaterimi flavonoidi namesto iz podobnosti s topiroksostatom.

Ključne besede: zaviralci ksantinske oksidaze, putika, 1,2,4-oksadiazol, zamenjava skeleta

ABSTRACT

Due to increasing prevalence of gout, there is a rising need to develop new active compounds to treat this disease. Since gout is a consequence of elevated serum uric acid concentrations, the main therapeutic target is xanthine oxidase – an enzyme that transforms hypoxanthine and xanthine into uric acid and thus represents the last stage of purine metabolism. Allopurinol, an effective xanthine oxidase inhibitor, has been a first-choice medicine in the treatment of gout for the last 50 years. However, due to an imperfect toxicological profile, it is not always suitable for all patients. Despite extensive research for new inhibitors, only two new active compounds have been registered since the discovery of allopurinol – febuxostat and topiroxostat. Discoveries that implicate uric acid in development of some cardiovascular and kidney diseases could represent new therapeutic indications for xanthine oxidase inhibitors and show additional need to develop new active inhibitors.

Within the scope of this Master's thesis, we planned and synthesized a series of new potential xanthine oxidase inhibitors, based on the structure of topiroxostat. We modified the structure of topiroxostat by employing scaffold hopping methodology, namely the triazole ring was replaced by a 1,2,4-oxadiazole ring. Thus, we obtained a central pyridyl-1,2,4-oxadiazole scaffold onto which we appended different substituents. We started our synthesis from two cyanopyridines, which were converted into respective amidoximes by using hydroxylamine. The amidoximes were then coupled with various substituted aromatic carboxylic acids and the resulting esters cyclized to 1,2,4-oxadiazole ring. Compounds incorporating methoxy groups were additionally demethylated to increase the number of final compounds.

We synthesized 20 final compounds, which were biochemically evaluated on bovine xanthine oxidase. The 1,2,4-oxadiazole ring did not prove to be a suitable scaffold replacement for the triazole ring, since this modification led to a complete loss of inhibitory activity, despite the fact that the other structural elements essential for the inhibitory activity of topiroxostat were retained. Among the tested compounds, only compound **15** showed weak inhibitory activity, which most likely originates from the structural similarity to certain flavonoids and not from similarity to topiroxostat.

Keywords: xanthine oxidase inhibitors, gout, 1,2,4-oxadiazole, scaffold hopping

SEZNAM OKRAJŠAV

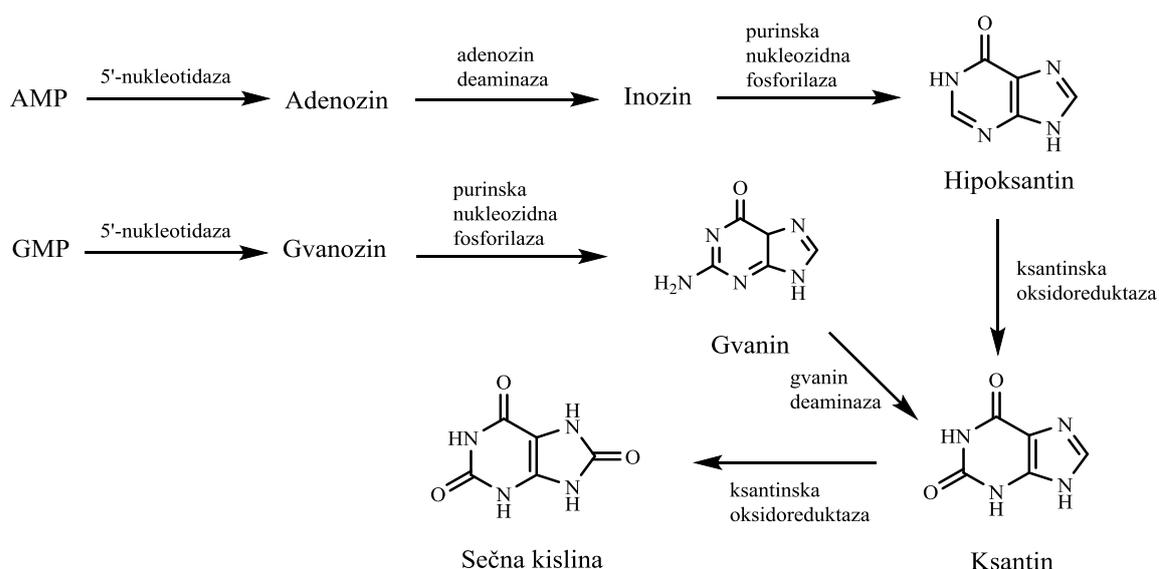
- AMP – adenzin monofosfat
- BBr₃ – borov tribromid
- br s – širok singlet (broad singlet)
- d – dublet
- dd – dublet dubleta
- D - Debye
- DKM - diklorometan
- DMAP – dimetilaminopiridin
- DMF – dimetilformamid
- DNK – deoksiribonukleinska kislina
- EDC×HCl – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid
- eq – ekvivalent
- GMP – gvanin monofosfat
- HOBt – hidroksibenzotriazol
- HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)
- IR – infrardeča spektroskopija (infrared spectroscopy)
- kDa – kilodalton
- MNU – mononatrijev urat
- MS – masna spektrometrija (mass spectrometry)
- NMR – jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)
- RNK – ribonukleinska kislina
- s – singlet
- THF – tetrahidrofur
- TLC – tankoplastna kromatografija (thin layer chromatography)
- t - triplet
- t_r – retencijski čas
- XDH – ksantinska dehidrogenaza (xanthine dehydrogenase)
- XO – ksantinska oksidaza (xanthine oxidase)

1 UVOD

1.1 RAZGRADNJA PURINOV

Purin je eden izmed najbolj razširjenih heterociklov v naravi. V nesubstituirani obliki se sicer ne pojavlja, je pa pomemben strukturni element mnogih bioloških molekul, ki jim s skupnim imenom rečemo »purini«. V obliki nukleotidov adenzin monofosfata (AMP) in gvanozin monofosfata (GMP) oz. dušikovih baz adenina in gvanina predstavlja dva osnovna gradnika DNK in RNK. Nukleotidi sodelujejo tudi pri energetskem metabolizmu, saj so strukturni deli nekaterih koencimov in sekundarnih prenašalcev ter delujejo kot nosilci aktiviranih intermediatov pri sintezi drugih spojin (1,2).

Zaradi njihove heterogene vloge je pomembno, da je koncentracija purinskih nukleotidov uravnotežena, kar celice dosegajo z njihovo sintezo (ali po »de novo« sintezni poti iz osnovnih gradnikov ali pa s ponovno uporabo že obstoječih purinov) in razgradnjo. Razgradnja s prehrano vnesenih nukleinskih kislin se začne v tankem črevesju, kjer nukleaze in fosfodiesteraze DNK in RNK razkosajo na mononukleotide, ki nato vstopajo v celice črevesne mukoze. Tam poteče zaporedje večih encimskih reakcij (Slika 1), s pomočjo katerih se AMP in GMP metabolizirata do končnega produkta – sečne kisline, ki telo zapusti skozi ledvice. Ne enak način se razgradijo tudi v telesu sintetizirani purinski nukleotidi, le da se razgradnja večinoma dogaja v jetrih (2–4).



Slika 1: Razgradnja AMP in GMP do sečne kisline

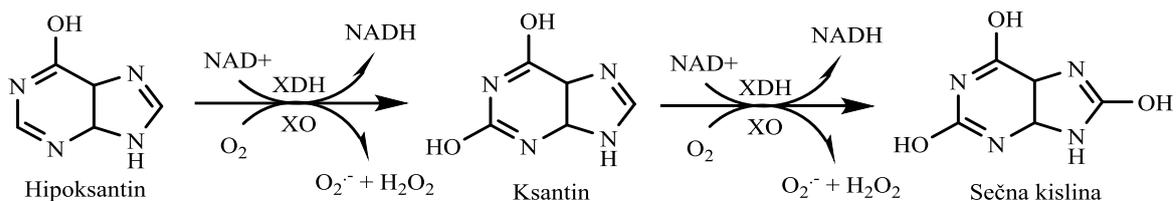
V prvi stopnji se z nukleotidov odstranijo fosfatne skupine, da dobimo nukleozida adenzin in gvanozin. Purinska nukleozidna fosforilaza nato odstrani ribozo, pri čemer iz inozina nastane hipoksantin in iz gvanozina gvanin. Sledi še deaminacija gvanina v ksantin. Zadnji korak razgradnje katalizira ksantinska oksidoreduktaza, ki hipoksantin in ksantin oksidira do končnega produkta – sečne kisline (3).

Pri večini sesalcev se sečna kislina metabolizira z encimom urikazo v alantoin, medtem ko pri ljudeh predstavlja končni produkt, ki se nato večinoma izloča skozi ledvica. Evolucijsko lahko izgubo gena za urikazo pri ljudeh razlagamo kot prednost, saj sečna kislina v našem telesu deluje kot močan antioksidant. Je pomemben lovilec radikalov v plazmi, vendar za svoje delovanje nujno potrebuje prisotnost askorbinske kisline, kar vodi v izgubo antioksidativne aktivnosti v lipidnem okolju, kjer je hidrofilna askorbinska kislina prisotna v manjši meri. Poleg svoje zaščitne vloge pa lahko sečna kislina paradoksalno deluje tudi kot pro-oksidant in škodni dejavnik. Kronično povišane koncentracije sečne kisline lahko povežemo z določenimi boleznimi, ki jih bomo obravnavali v kasnejših poglavjih tega uvoda (4,5).

1.2 KSANTINSKA OKSIDAZA

Ksantinska oksidaza je kompleksen molibdoflavoencim, ki v človeškem telesu predstavlja zadnji korak v razgradnji purinskih nukleotidov. Zaradi relativno enostavnega pridobivanja iz kravjega mleka jo lahko v čisti obliki preučujemo že zadnjih 60 let, kar nam omogoča dokaj podrobno poznavanje strukture in delovanja. Aktivnost ksantinske oksidaze so zaznali v vseh preučevanih vrstah, vključno z bakterijami. V človeškem telesu se nahaja predvsem v jetrih in tankem črevesju, medtem ko ostala tkiva izkazujejo majhno, vendar še vedno prisotno aktivnost (6).

Ksantinska oksidaza predstavlja eno izmed dveh oblik encimskega sistema ksantinske oksidoreduktaze, kjer drugo obliko predstavlja ksantinska dehidrogenaza. Obe obliki izhajata iz istega genetskega zapisa in katalizirata isto reakcijo – oksidativno hidroksilacijo obročnega ogljikovega atoma hipoksantina in ksantina (Slika 2). Razlika med njima je v akceptorju elektronov, saj pri ksantinski oksidazi pride do redukcije kisika, pri ksantinski dehidrogenazi pa se kot akceptor elektronov preferira koencim NAD⁺, vendar se lahko ob pomanjkanju NAD⁺ reducira tudi kisik. V primeru redukcije kisika nastajajo vodikov peroksid in superoksidni radikali, ki lahko vodijo v oksidativne poškodbe. Pri obeh oblikah se kot vir kisika, iz katere nastane hidroksilna skupina, porablja voda (6,7).



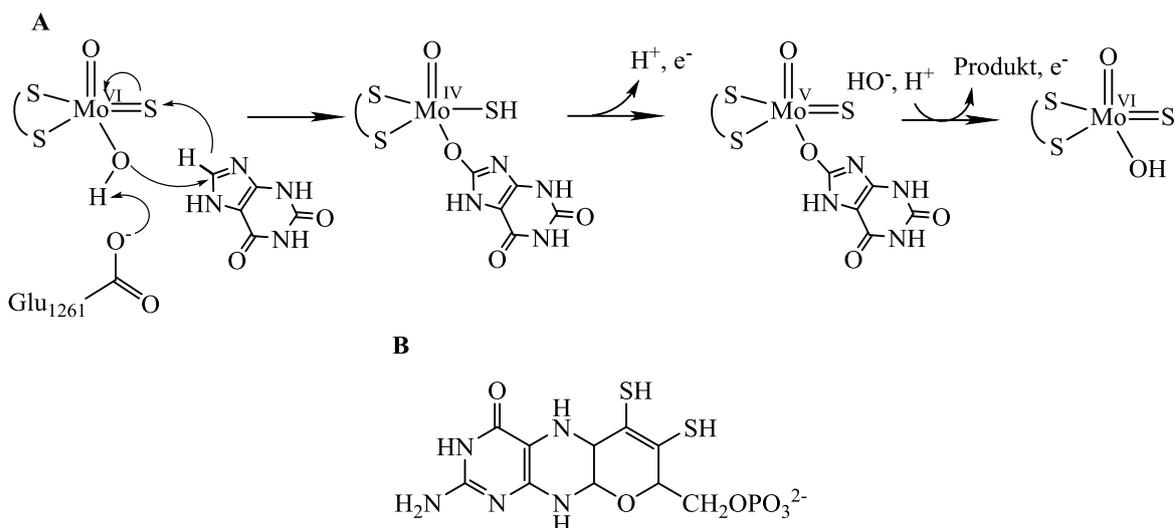
Slika 2: Reakciji, ki ju katalizirata obe obliki ksantinske oksidoreduktaze: ksantinska dehidrogenaza (XDH) in ksantinska oksidaza (XO) (8)

1.2.1 Struktura in mehanizem delovanja ksantinske oksidoreduktaze

Encim je sestavljen iz dveh identičnih, približno 145 kDa velikih podenot. Skupno je ksantinska oksidaza sestavljena iz 1330 aminokislin, njena sekvenca pa izkazuje močno homologijo med različnimi živalskimi vrstami. Vsaka izmed podenot je katalitično neodvisna in vsebuje 3 domene: C-terminalno domeno, ki vsebuje molibdopterinski kofaktor (85 kDa), N-terminalno domeno, ki vsebuje dva Fe/S centra (20 kDa) in vmesno domeno s flavin adenin dinukleotidom (FAD) (40 kDa). Protein se zvije tako, da vse 4 redoks centre poravnava v skoraj ravno črto, kar je pomembno za mehanizem delovanja encima (6,7,9).

Ksantinska oksidoreduktaza se sintetizira v obliki ksantinske dehidrogenaze, v obliko ksantinske oksidaze pa prehaja bodisi reverzibilno s tvorbo disulfidnih mostov z oksidacijo cisteinov v cistine bodisi ireverzibilno s proteolitično cepitvijo 3 domen na 3 fragmente. Kljub cepitvi ostanejo fragmenti tesno povezani, kar encimu ohranja aktivnost. Ob modifikaciji proteina pride do konformacijskih sprememb, predvsem okoli flavina, kar vodi v izgubo mesta za vezavo NAD in posledično spremembe akceptorja elektronov iz NAD v kisik (7,8).

V osnovnem stanju se molibden v aktivnem mestu nahaja v oksidacijskem stanju +6, obkrožen z okso ligandom (=O), hidrokso ligandom (-OH) in sulfido ligandom (=S), vezan na piranopterinski kofaktor. Na sliki 3 prikazano katalizo sproži glutamatna stranska veriga, ki s hidrokso liganda odcepi proton. Prosti elektronski par kisika nato nukleofilno napade elektrofilni ogljik v substratu, hkrati pa pride do prenosa hidridnega iona iz substrata na sulfidni ligand s hkratno redukcijo molibdena iz stanja +6 v +4. Sledi prenos elektronov z molibdenu preko obeh Fe/S centrov do flavina s hkratnim odcepom substrata, ki s seboj vzame hidroksilno skupino. Hidrokso ligand na molibdeni pa nadomesti hidroksid iz vode, kar aktivno mesto vrne v prvotno stanje. Elektroni, ki potujejo do flavina, le-tega reducirajo v FADH₂ obliko, ta pa elektrone odda bodisi na NAD⁺ v primeru ksantinske dehidrogenaze, bodisi na kisik v primeru ksantinske oksidaze (7,10).



Slika 3: **A:** Shema mehanizma oksidacije ksantina, **B:** Piranopterinski kofaktor (10)

1.3 S KSANTINSKO OKSIDOREDUKTAZO POVEZANA PATOFIZIOLOGIJA

V normalnem fiziološkem delovanju človeškega telesa ksantinska oksidoreduktaza predstavlja pomemben člen metabolne poti purinov. V redkih primerih pride zaradi genskih mutacij ali pomanjkanja molibdenskega kofaktorja do znižane aktivnosti ksantinske dehidrogenaze, kar lahko vodi v ledvične težave in nevrološke motnje (11). Pogosteje pa težave izvirajo iz prekomerne aktivnosti encima in posledičnega kopičenja sečne kisline in reaktivnih kisikovih zvrsti.

1.3.1 Putika oz. protin

Normalne koncentracije sečne kisline se gibajo med 3,5 - 7,2 mg/dL pri moških in postmenopavzalnih ženskah ter med 2,6 - 6,0 mg/dL v predmenopavzalnih ženskah. Sečna kislina je šibka kislina, ki se pri fiziološkem pH nahaja v obliki iona urata. Zaradi visoke koncentracije natrija v zunajceličnem prostoru je večina sečne kisline v obliki mononatrijevega urata, ki pa ima dokaj nizko vodotopnost 6,8 mg/dL. Če je ta topnost zaradi različnih dejavnikov presežena, lahko pride do kristalizacije in nalaganja kristalov mononatrijevega urata (MNU) v sklepkih, ledvicah in drugih tkivih. Povišano serumsko koncentracijo sečne kisline imenujemo hiperurikemija, njena posledica pa je bolezen putika oz. protin (12).

Nalaganje kristalov MNU v sklepu sproži aktivacijo imunskega sistema. Makrofagi v sklepnem prostoru fagocitirajo kristale, ki znotraj celice prek večih poti vodijo v encimsko

aktivacijo neaktivnega pro-interlevkina IL-1 β do biološko aktivnega IL-1 β , ki se nato sprošča iz celice, kjer deluje kot vnetni mediator. Posledično sproščanje drugih vnetnih dejavnikov in priliv nevtrofilcev vodi v dodatno fagocitozo kristalov in potenciranje vnetne reakcije, ki se kaže kot otečen, pordel, boleč in vroč sklep. Kronično ponavljanje tega procesa vodi v ireverzibilno poškodbo sklepa, kar pacient občuti kot kronično bolečino in nezmožnost uporabe sklepa zaradi hudih deformacij. Sčasoma lahko v subkutanem prostoru okoli sklepov pride tudi do nastanka tofov - skupkov kristalov MNU, obkroženih z vnetnimi celicami v matriksu lipidov, proteinov in mukopolisaharidov. V teh se lokalno aktivirajo osteoklasti, ki s svojimi encimi povzročajo erozijo kosti in hrustanca, ter s tem dodatne poškodbe sklepa. V večini primerov je prvi prizadet sklep palca na nogi, sledijo pa mu gležnji, kolena in prsti (13,14).

Putika je najbolj pogosta oblika vnetnega artritisa na svetu, ki še posebej prizadene moške nad 40 leti. Prevalenca v državah razvitega sveta v zadnjih desetletjih kaže močan trend navzgor, kar lahko pripisujemo predvsem spremembi povprečnega življenjskega sloga, spremembi prehrane in splošnemu staranju prebivalstva. Tveganje za razvoj putike močno raste s starostjo, pri ženskah pa se tveganje dodatno ostro poveča po menopavzi (15).

Do dviga koncentracij sečne kisline oz. hiperurikemije v večini primerov pride zaradi zmanjšanega izločanja sečne kisline. Približno ena tretjina se je izloči skozi gastrointestinalni trakt, preostanek pa telo zapusti z urinom. V ledvicah se urat prosto filtrira skozi glomerul, končno koncentracijo sečne kisline v urinu pa določajo za sečno kislino specifični tubularni prenašalci. Mutacije v genih za te prenašalce, ledvične bolezni in staranje pacienta lahko vodijo v zmanjšano sposobnost ledvic za izločanje sečne kisline in posledično povišanje serumskih koncentracij (4,15).

Poleg genetskih dejavnikov na razvoj putike močno vplivajo še drugi dejavniki. Prehrana, bogata s purini, poveča količino substratov, ki jih ksantinska oksidoreduktaza pretvori v sečno kislino. Fruktaza, predvsem v povezavi s hrano, sladkano s fruktoznim sirupom, zaradi svojega metabolizma vodi v izčrpavanje zalog ATP (adenozin trifosfat), nastali ADP (adenozin difosfat) pa se metabolizira do sečne kisline. Povečan vnos alkohola viša koncentracijo laktata v krvi, ta pa nato zavira izločanje urata skozi ledvica. Na koncentracijo sečne kisline vplivajo tudi določena zdravila, med katerimi največji vpliv na povišanje koncentracije izkazujejo diuretiki. Pogosto se kot dejavnik tveganja pojavlja tudi metabolni sindrom. Incidenca putike je pri osebah z visokim indeksom telesne mase nekajkrat večja

kot pri osebah z normalnih indeksom telesne mase, prav tako imajo pacienti s hipertenzijo dvakrat višje tveganje za razvoj putike (12,14–16).

Terapija putike pri akutnih napadih obsega protivnetno terapijo z nesteroidnimi antirevmatiki ali kortikosteroidi, v novejši terapiji pa bi se lahko uporabljale tudi učinkovine z zaviralnim delovanjem na interleukin-1. Smernice priporočajo tudi uporabo kolhicina, ki z vezavo na tubulin zavira polimerizacijo mikrotubulov in s tem pomaga pri zaviranju vnetnega odziva. V terapiji kroničnega povišanja serumske koncentracije sečne kisline pa je za paciente pomembna sprememba prehrane in znižanje vnosa alkohola s hkratnim zdravljenjem z zdravili, ki nižajo serumsko koncentracijo sečne kisline. Te bomo obravnavali v poglavjih 1.4 in 1.5. Znižanje koncentracije sečne kisline pod 6,0 mg/mL povzroči ponovno raztapljanje kristalov MNU in ublažitev simptomov (16–18).

1.3.2 Kardiovaskularne bolezni

Dolgo je veljalo prepričanje, da hiperurikemija ne predstavlja neodvisnega dejavnika tveganja za razvoj kardiovaskularnih bolezni. Povišane serumske koncentracije sečne kisline naj bi bile le posledica znižane glomerulne filtracije, uporabe diuretikov, ledvične vazokonstrikcije, oksidativnega stresa in drugih dejavnikov, ki so običajno prisotni pri bolnikih s kardiovaskularnimi boleznimi. Pogosto se te pojavljajo z drugimi stanji, predvsem v obliki metabolnega sindroma, hiperurikemija pa naj bi tu predstavljala posledico in ne vzroka težav (19).

Novejši podatki pa kažejo, da je sečna kislina močno vpletena v patogenezo kardiovaskularnih bolezni. Najbolje raziskana povezava obstaja med hiperurikemijo in hipertenzijo. Številne raziskave kažejo, da hiperurikemija povišuje relativno tveganje za razvoj hipertenzije, neodvisno od ostalih dejavnikov tveganja. Povišanje koncentracije sečne kisline za 1 mg/dL predstavlja 13% povečanje tveganja za razvoj hipertenzije. Ta povezava je najbolj izražena v mladih z zgodnje izraženo hipertenzijo. Znižanje serumske koncentracije sečne kisline z zaviralci ksantinske oksidaze pod 5,0 mg/dL pri teh bolnikih v večini primerov normalizira krvni tlak (19–22).

Mehanizmi interakcije med hiperurikemijo in hipertenzijo še niso povsem znani. Znano je, da do povišanja tveganja za razvoj hipertenzije pride tudi pri nivojih sečne kisline pod koncentracijo nasičenja, torej v patogenezi niso nujno vpleteni kristali MNU. Možni mehanizmi vključujejo s sečno kislino povezano aktivacijo sistema renin – angiotenzin in zaviranje NO sintaze. Posledična zmanjšana razpoložljivost vazodilatornega dušikovega

oksida lahko razloži hipertenzivno delovanje sečne kisline. Sečna kislina izkazuje tudi vpliv na gladke mišice v žilah, kjer stimulira njihovo proliferacijo, hkrati pa spodbuja izločanje vnetnih dejavnikov, ki lahko vodijo v razvoj endotelne disfunkcije (23,24).

Vloga sečne kisline se poleg hipertenzije pojavlja tudi pri ostalih komponentah metabolnega sindroma. Epidemiološke študije kažejo, da se prevalenca metabolnega sindroma močno zvišuje z naraščajočimi serumskimi koncentracijami sečne kisline. Tudi tu ima vlogo upočasnjeno nastajanje dušikovega oksida (zmanjšan pretok krvi mimo mišic vodi v zmanjšan privzem glukoze v mišice), hkrati pa sečna kislina povzroča vnetne in oksidativne spremembe v adipocitih, za katere je znano, da imajo močno vlogo v patogenezi inzulinske rezistence. Povišane koncentracije inzulina spodbujajo tubularno reabsorpcijo sečne kisline, kar vodi v začaran krog poslabševanja bolezenskega stanja (19,23,25).

Sečna kislina torej ne predstavlja le končnega elementa razgradnje purinov, ampak je njena vloga heterogena. Je pomemben antioksidativni element plazme, saj lahko reagira s superoksidnim anionom, vodikovim peroksidom, hidroksilnim radikalom in še posebej s peroksinitritom. Njena vloga pa se drastično spremeni znotraj celice, kjer prek različnih mehanizmov vodi v endotelno disfunkcijo in tako predstavlja pomemben faktor tveganja za razvoj metabolnega sindroma, kardiovaskularnih bolezni in ledvičnih bolezni. Kim in sodelavci so v meta-analizi 400.000 bolnikov za vsak porast serumske koncentracije sečne kisline za 1 mg/dL napovedali 12% relativno povečanje tveganja za smrt v povezavi s koronarno srčno boleznijo. Ioachimescu in sodelavci pa so za vsak dvig za 1 mg/dL pokazali kar 39% relativno povečanje tveganja za smrt, neodvisno od ostalih dejavnikov tveganja (26–28).

Ksantinska oksidoreduktaza pri teh stanjih nima le posredne vloge izvora sečne kisline, ampak je v patogenezo lahko vpletena neposredno. Znano je, da v primeru ishemije pride do povečane pretvorbe ksantinske dehidrogenaze v ksantinsko oksidazo. Prav tako do te pretvorbe pride v primeru vstopa ksantinske dehidrogenaze v cirkulacijo, kjer jo v oksidazno obliko pretvorijo serumske proteaze. Tam se lahko veže na površino žilnih endotelnih celic in z generacijo radikalov vodi do oksidativnih poškodb. S ksantinsko oksidazo generirani superoksidni radikali hitro reagirajo z dušikovim oksidom, pri čemer nastane močan oksidant peroksinitrit, ki nemudoma reagira z bližnjimi molekulami. Nastali superoksidni radikal se lahko ob prisotnosti železa prek Haber-Weissove reakcije pretvori tudi do zelo reaktivnega hidroksilnega radikala. Izguba za ožilje pozitivnih učinkov dušikovega oksida

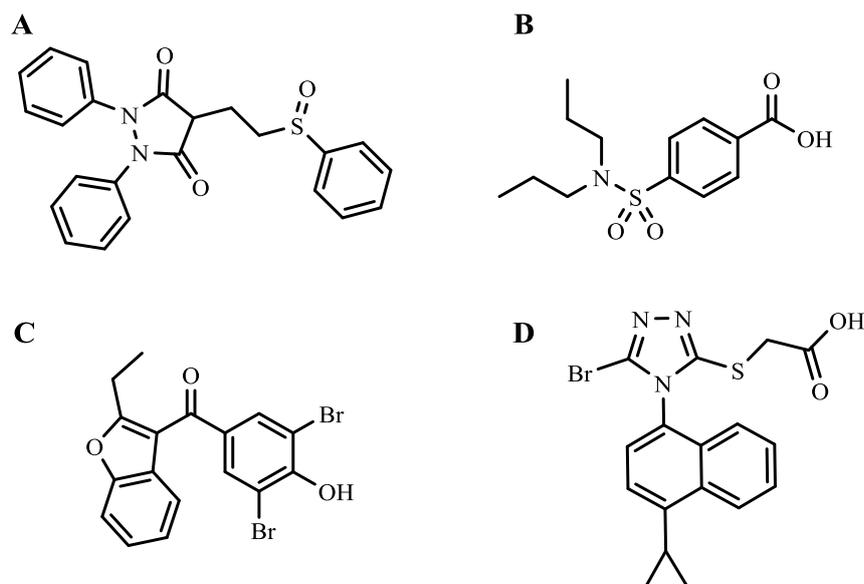
in oksidativne poškodbe DNA in lipidov so temeljni dejavniki razvoja ateroskleroze in posledično drugih kardiovaskularnih bolezni (6,29,30).

1.4 TERAPIJA HIPERURIKEMIJE

Evropske smernice priporočajo spust serumske koncentracije sečne kisline pod 6,0 mg/dL oz. pod 5,0 mg/dL v hujših primerih putike. Prvi korak so nefarmakološki ukrepi, ki v prvi vrsti obsegajo spremembo prehrane. Priporočen je zmanjšan vnos s purini bogate hrane (meso, morska hrana in določena zelenjava) in povečan vnos sadja in vrst zelenjave, ki vsebujejo malo purinov. Pomemben je tudi zadosten vnos vode, znižan vnos alkohola (predvsem piva, ki poleg etanola vsebuje tudi purine, ki izvirajo iz fermentacijskega postopka), predvsem pa znižan vnos sladkorja, še posebej fruktoze (17,31).

V primeru, da ti ukrepi ne dosegajo zadostnih rezultatov, se uporabi farmakološka terapija. V grobem zdravila proti hiperurikemiji delimo na dve skupini: zdravila, ki pospešujejo izločanje sečne kisline – urikozuriki in zdravila, ki preprečujejo nastajanje sečne kisline – urikostatiki. Slednja skupina zajema zaviralce ksantinske oksidaze, o katerih bo več povedano v poglavju 1.5 (17).

Urikozuriki predstavljajo zdravila drugega izbora v primeru slabega prenašanja zaviralca ksantinske oksidaze alopurinola ali pa če z njim samim ne dosegamo dovolj nizkih serumskih koncentracij sečne kisline. Uporabljajo se lahko samostojno ali pa v kombinaciji z zaviralci ksantinske oksidaze. V skupino urikozurikov uvrščamo sulfpirazon, benzbromaron, probenecid in nedavno registrirani lesinurad (Slika 4). Njihova dostopnost je odvisna od regulatornih organov posameznih držav. Sulfpirazon so s tržišča umaknili zaradi supresije kostnega mozga, podobne učinke izkazuje tudi benzbromaron, ki je v redkih primerih lahko tudi hepatotoksičen, vendar v določenih državah vseeno ostaja v omejeni uporabi. V Sloveniji je trenutno dostopen le probenecid, na tržišču pa bo kmalu tudi lesinurad, ki je dovoljenje za promet v Evropi dobil v letu 2016 (32,33).



Slika 4: A: Sulfipirazon, B: Probenecid, C: Benzbromaron, D: Lesinurad

Vse naštete učinkovine delujejo na podoben način, in sicer prek zaviranja prenašalca URAT-1, ki je v proksimalnih tubulih najpomembnejši regulator reabsorpcije sečne kisline iz primarnega urina nazaj v kri. URAT-1 deluje kot urat/anion prenašalec in omogoča reabsorpcijo urata v zameno za kloridne in nekatere druge organske anione. Njegovo zaviranje torej zmanjša delež reabsorbirane sečne kisline, kar privede do znižanja serumskih koncentracij sečne kisline (32,34).

Posebno skupino zdravil bioloških predstavljajo še rekombinante oblike urikaze, encima, ki smo ga ljudje izgubili tekom evolucije. Metabolizira pretvorbo sečne kisline v allantoin, ki se zelo dobro izloča skozi ledvice. V uporabi je pegilirana oblika urikaze – peglotikaza, ki pa se uporablja le v najhujših primerih putike, ko tarčnih serumskih koncentracij sečne kisline ne moremo doseči z uporabo najvišjih dovoljenih odmerkov drugih učinkovin (31,35).

1.5 ZAVIRALCI KSANTINSKE OKSIDAZE

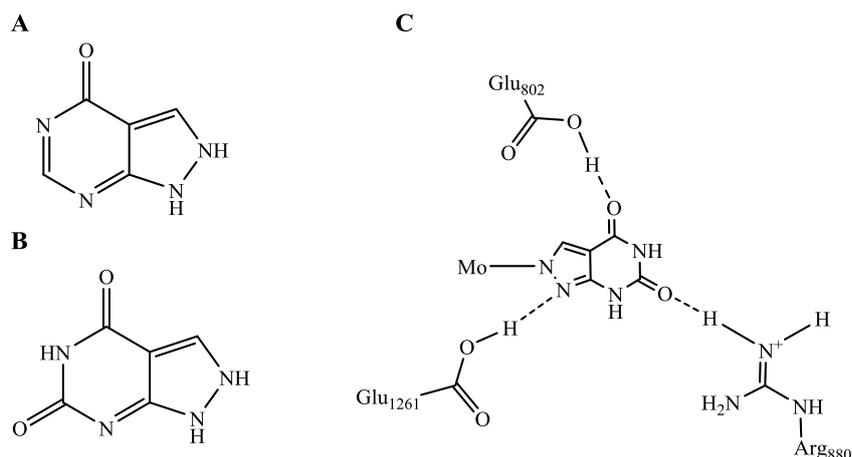
1.5.1 Alopurinol

Alopurinol so prvič sintetizirali v iskanju novih protirakavih učinkovin. Prvič je bil pod drobnogledom, ko so raziskovalci identificirali tiourno kislino kot enega izmed metabolitov 6-merkaptopurina, ki je prestavljal eno izmed pomembnejših protirakavih učinkovin. Predpostavka, da bo zaviranje ksantinske oksidaze vodilo v višjo učinkovitost 6-merkaptopurina, se je izkazala za pravilno, hkrati pa se je pokazal potencial za kontrolo

koncentracije serumske sečne kisline. To je vodilo v registracijo alopurinola kot zdravila za hiperurikemijo z odobritvijo FDA leta 1966 (36).

Alopurinol še danes zaradi svoje dostopnosti, učinkovitosti in cene, predstavlja zdravilo prvega izbora v zdravljenju kronične hiperurikemije. Indikacije poleg putike obsegajo še sekundarne hiperurikemije, do katerih pride zaradi patološke razgradnje purinov med obsevanjem ali zdravljenjem s citostatiki. Kljub uspehu alopurinola ima ta tudi nekatere negativne strani. Zaradi strukturne sorodnosti z endogenimi purini lahko alopurinol vpliva tudi na sintezo drugih purinov, s čimer lahko razlagamo pojav neželenih učinkov. Pogosto se kot neželeni učinki pojavljajo gastrointestinalne težave in kožni izpuščaji, v redkejših primerih pa lahko pride do življenja ogrožajoče preobčutljivostne reakcije, ki zahteva takojšnje prenehanje zdravljenja. Do take reakcije lahko pride tudi po več mesecih ali celo letih zdravljenja in se običajno pojavlja pri pacientih z zmanjšano ledvično funkcijo. Zaradi prisotnosti teh neželenih učinkov se pri asimptomatskih hiperurikemijah odsvetuje uporabo alopurinola (8,36,37).

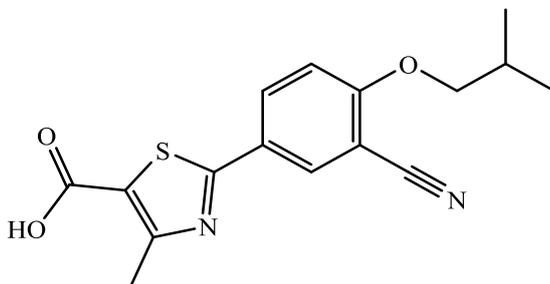
Alopurinol se v telesu, predvsem pa v jetrih, s ksantinsko oksidazo pretvori v aktivni metabolit oksipurinol. Alopurinol ima tako dokaj kratek razpolovni čas 2 do 3 ur, oksipurinol pa lahko zaradi svoje podobnosti sečni kislini izkorišča enake mehanizme ledvične reabsorpcije, kar njegov razpolovni čas podaljša na 16-30 ur. Oksipurinol v aktivnem mestu encima tvori stabilno kovalentno vez z reduciranim molibdenom v stanju +4, kjer zamenja običajno prisoten hidrokso ligand. Hkrati tvori vodikove vezi z glutamatom 802, argininom 880 in glutamatom 1261 (Slika 5). Delovanje oksipurinola kljub tvorbi kovalentne vezi ni ireverzibilno, saj se vez ob oksidaciji molibdena nazaj v osnovno stanje +6 sčasoma cepi (8,38).



Slika 5: A: Alopurinol, B: Oksipurinol, C: Mehanizem vezave oksipurinola v aktivno mesto encima (38)

1.5.2 Febuksostat

Po več kot 40 letih uporabe alopurinola kot edinega terapevtika v skupini zaviralcev ksantinske oksidaze je leta 2008 registrirani febeksostat (Slika 6) na trg prvič vnesel alternativno učinkovino alopurinolu. Za razliko od alopurinola izkazuje zaviralno aktivnost selektivno na oksidirani in reducirani obliki encima. V aktivnem mestu preprečuje dostop endogenim substratom encima, ne da bi prihajalo do vezave na molibdenski kofaktor (39).



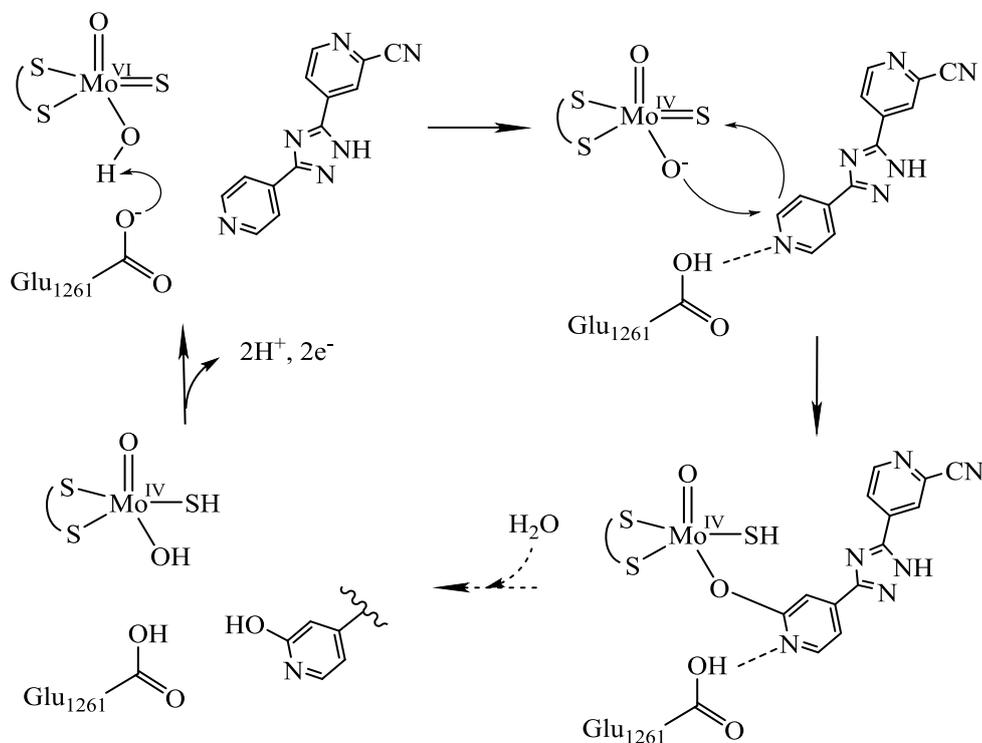
Slika 6: Febuksostat

V nasprotju z alopurinolom febeksostat ne izkazuje vpliva na druge encime v sintezi purinov, kar botruje ugodnejšemu varnostnemu profilu. V splošnem je febeksostat dobro toleriran, do neželenih učinkov, kot so slabost, glavoboli in driska, pride le pri 1-2 % pacientov. Dodatno prednost predstavlja dejstvo, da ledvična funkcija na plazemske koncentracije učinkovine nima vpliva, torej pri pacientih z okvarjeno ledvično funkcijo ni potrebe po prilagajanju odmerka. Kljub naštetim prednostim pa zaradi stroškovne učinkovitosti alopurinol še vedno ostaja zdravilo prvega izbora. Smernice uporabo febeksostata priporočajo le v primerih, ko pacient alopurinola ne tolerira, z njim samim ne

dosegamo dovolj nizkih serumskih koncentracij sečne kisline ali pa je pacientova ledvična funkcija huje okvarjena (31,35,39).

1.5.3 Topioksostat

Topioksostat je trenutno najnovejši predstavnik zaviralcev ksantinske oksidaze. Leta 2013 na Japonskem registrirana učinkovina, je hkrati strukturni in mehanistični zaviralec. V primerjavi z alopurinolom izkazuje pri predpisanih odmerkih podobno učinkovitost in pojavljanje neželenih učinkov. Za razliko od alopurinola je topioksostat varnejši pri pacientih z zmanjšano ledvično funkcijo. Iz alopurinola nastali oksipurinol se lahko nalaga v ledvice in tam povzroča neželene učinke. Enak učinek pri topioksostatu ni pričakovan, saj se nastali 2-hidroksotopioksostat ne akumulira in ne izloča skozi ledvice (40,41).



Slika 7: Mehanizem zaviralnega delovanja topioksostata (42)

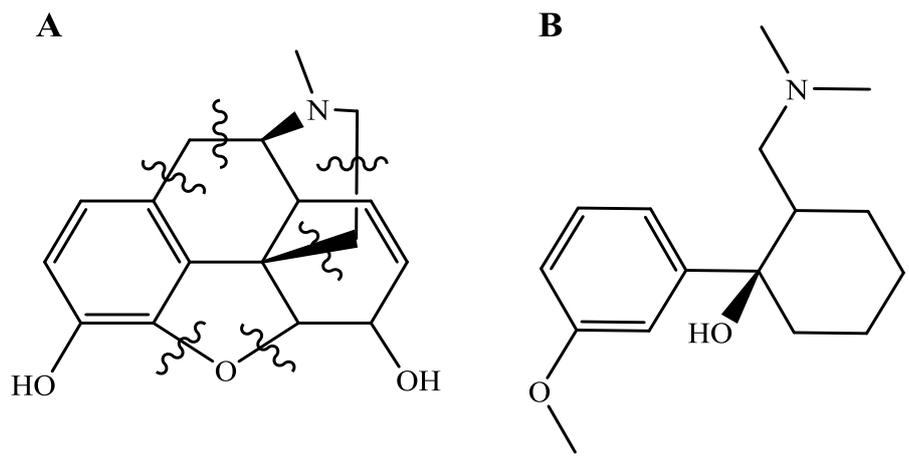
Na sliki 7 prikazan mehanizem delovanja izkazuje podobnost oksidaciji endogenih substratov. Za razliko od oksidacije ksantina in hipoksantina je prileganje topioksostata v aktivno mesto zelo tesno, kar onemogoča dostop vode, ki je običajno odgovorna za odcepitev substrata in posledično regeneracijo encima. Kompleks topioksostata in ksantinske oksidaze je zato zelo stabilen, z dolgim razpolovnim časom 20,4 ur (40,42).

1.6 ZAMENJAVA SKELETA OZ. »SCAFFOLD HOPPING«

Zamenjava skeleta (oz. angleško »scaffold hopping«) je farmacevtsko kemijski pristop odkrivanja novih farmacevtskih učinkovin. Gre za modifikacijo osrednje kemijske strukture že obstoječe učinkovine ali spojine vodnice z namenom pridobivanja novih strukturno različnih spojin z delovanjem na isto tarčo. Pristop deluje na predpostavki, da lahko z ohranitvijo bistvenih strukturnih elementov ohranimo biološko aktivnost kljub različni strukturi molekule. Razlogi za uporabo zamenjave skeleta so lahko različni. Lahko gre za iskanje učinkovin z močnejšim delovanjem na isto tarčo, bolj ugodnimi farmakokinetičnimi in toksikološkimi lastnostmi ali pa za »me too« princip, kjer farmacevtske družbe uporabljajo učinkovine konkurenčnih družb, da lahko tudi same prodrejo na trg za določeno bolezen (43).

Z razvojem novih metod odkrivanja spojin vodnic, predvsem rešetanja visoke zmogljivosti, lahko nove aktivne spojine odkrivamo relativno lahko. Spojine v teh knjižnicah so lahko pogosto farmakokinetičsko neugodne, zato predstavljajo idealno osnovo za strukturne modifikacije. Pristope zamenjav skeleta lahko v grobem delimo na štiri kategorije: zamenjava heterociklov, odpiranje in zapiranje obročev, načrtovanje psevdopeptidov ter peptidomimetikov in topološka oz. na obliki zasnovana zamenjava skeleta. Učinki strukturnih modifikacij so heterogeni in lahko med drugim obsegajo: i) zamenjavo lipofilnega skeleta za bolj hidrofilnega, kar izboljšuje topnost spojine, ii) odpravljanje metabolično labilnih mest v strukturi z namenom podaljševanja razpolovnega časa učinkovine in iii) zamenjava fleksibilnega skeleta za bolj rigidnega, kar lahko vodi v občutno močnejšo vezavo v aktivno mesto (43–45).

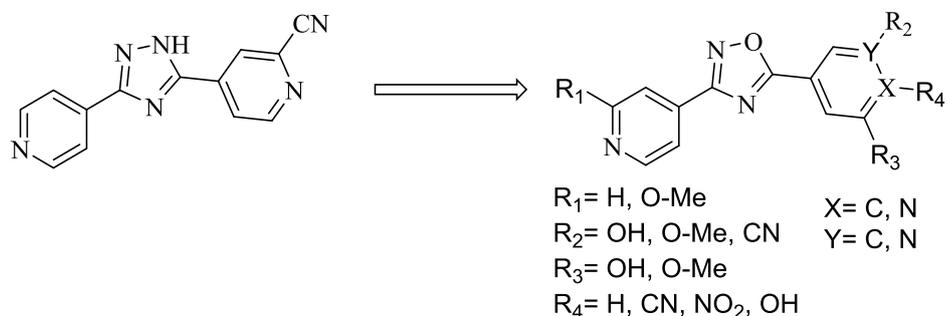
Na sliki 8 je viden eden izmed zgodnejših primerov zamenjave skeleta. Morfin, ena izmed najstarejših poznanih učinkovin, je zelo močan analgetik, ki pa ima zaradi zasvojljive narave omejeno uporabo v medicini. Povzroča tudi druge neželene učinke, kot so slabost, bruhanje in zaviranje dihanja. Struktura morfina je zelo rigidna, v obliki črke »T«. S cepitvijo šestih vezi in posledičnim odprtjem treh obročev, dobimo bolj fleksibilno strukturo, ki ima v telesu znižano aktivnost in povzroča manj neželenih učinkov. Čeprav se 2D strukturi spojin razlikujeta, se v 3D prostoru ob superpoziciji prekrivajo vsi bistveni strukturni elementi – terciarna aminska skupina, aromatski obroč in hidroksilna skupina (metilni ester se pri tramadolu cepi v jetrih). Tramadol tako deluje na iste receptorje kot morfin, hkrati pa ima boljši toksikološki profil (44).



Slika 8: A: Morfin z označenimi cepitvami vezi, B: Tramadol

2 NAMEN DELA

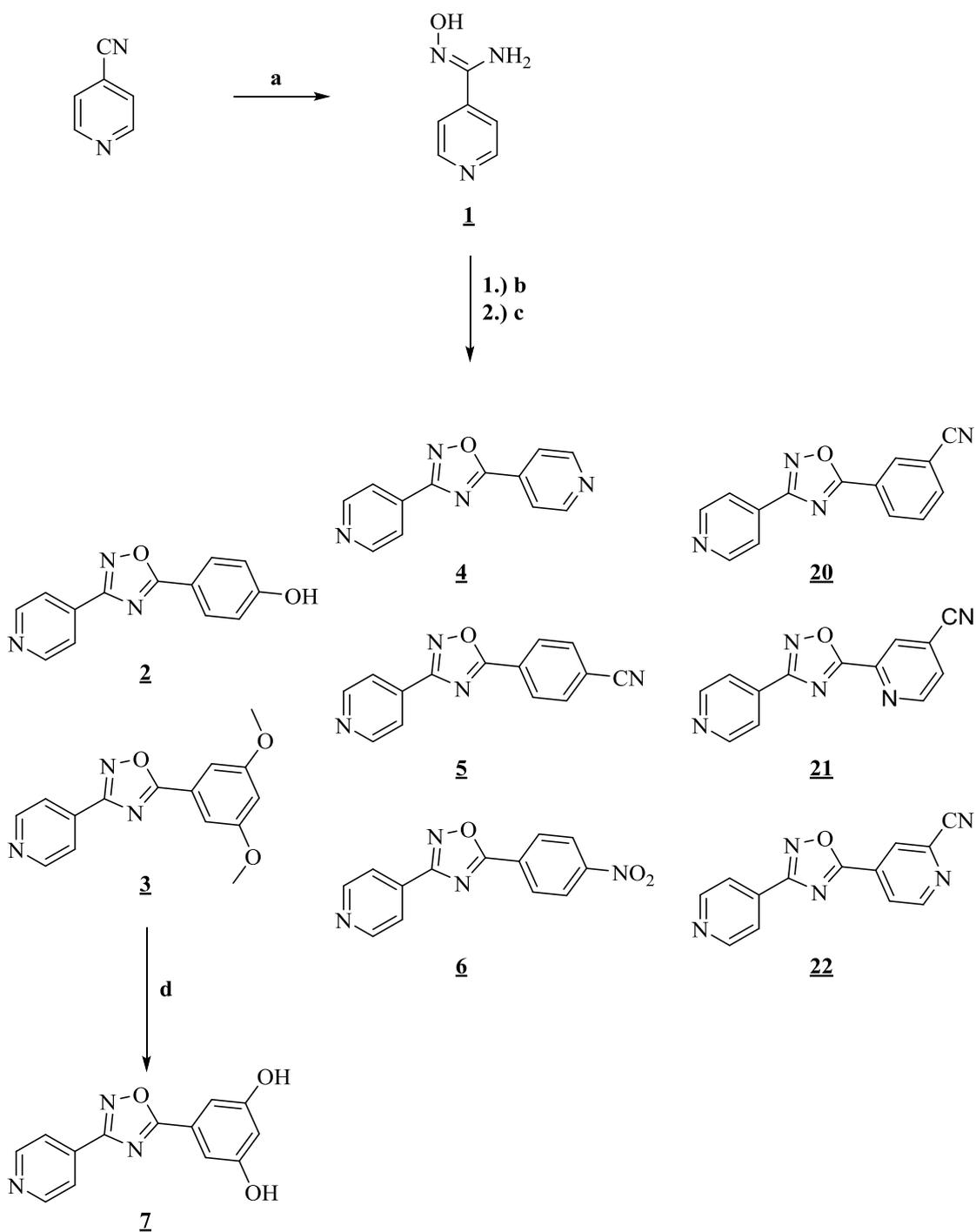
V sklopu magistrske naloge bomo načrtovali in sintetizirali nove spojine s potencialnim zaviralnim delovanjem na ksantinsko oksidazo. Izhajali bomo že iz obstoječe učinkovine topioksostata, ki je v skupini zaviralcev ksantinske oksidaze najnovejša registrirana učinkovina. Strukturo topioksostata bomo v želji, da ohranimo delovanje v istem vezavnem mestu, spreminjali le v manjši meri. Pri vseh končnih spojinah bomo osrednji triazolni heterociklični obroč zamenjali z 1,2,4-oksadiazolom. Obdržali bomo še piridilni obroč, vezan na mesto 3 oksadiazola. Na dobljeno piridil-1,2,4-oksadiazolno ogrodje bomo nato pripenjali različne substituentne in tako preverjali vpliv različnih skupin na jakost vezave v aktivno mesto encima (Slika 9).



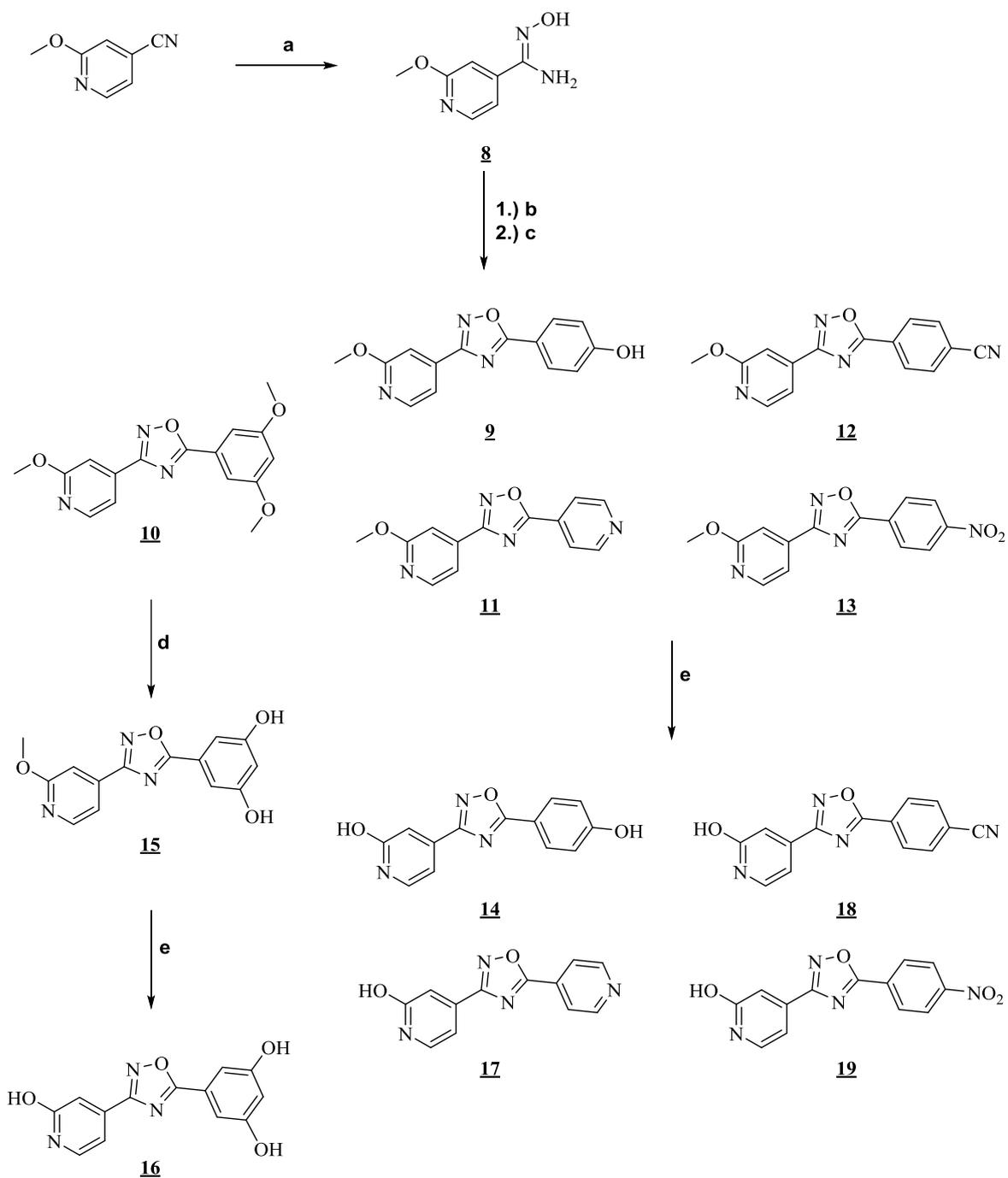
Slika 9: Strukturne spremembe topioksostata do načrtovanih spojin

Izhajali bomo iz dveh komercialno dostopnih izhodnih spojin – 4-cianopiridina in 2-metoksi-4-cianopiridina in iz njiju po principu divergentne sinteze sintetizirali dve seriji večih končnih spojin. V prvem koraku bomo iz obeh izhodnih spojin s hidroksilaminom tvorili amidoksim. Sledila bo dvostopenjska tvorba oksadiazolnega obroča. V prvi stopnji bomo na amidoksim s pomočjo sklopitvenih reagentov EDC in HOBt pripeli eno izmed substituiranih aromatskih karboksilnih kislin oz. bomo za esterifikacijo uporabili kislinski klorid. V drugi stopnji bomo brez vmesne izolacije z dodatkom kalijevega fluorida sprožili dehidracijo in posledično zaprtje obroča. S tem bomo že dobili nekatere končne spojine, na drugih pa bomo odstranili še metilne skupine, kar bomo dosegli bodisi z borovim tribromidom bodisi z uporabo raztopine bromovodikove kisline v očetni kislini (Slika 10 in Slika 11).

Sintetizirane spojine bomo na koncu deli tudi biokemijsko ovrednotiti, kar bodo izvedli na izolirani goveji ksantinski oksidazi na Centru za biomedicinsko znanost na Medicinski fakulteti Univerze v Nišu.



Slika 10: Potek sinteze iz 4-cianopiridina. Reagenti, a) $\text{NH}_2\text{OH}\times\text{HCl}$, K_2CO_3 , b) RCOOH , EDC, HOBt, Et_3N , DMAP ali RCOCl , Et_3N , DMAP, c) KF , d) BBr_3



Slika 11: Potek sinteze iz 2-metoksi-4-cianopiridina. Reagenti, a) $\text{NH}_2\text{OH}\times\text{HCl}$, K_2CO_3 , b) RCOOH , EDC, HOBt, Et_3N , DMAP ali RCOCl , Et_3N , DMAP, c) KF , d) BBr_3 , e) HBr , CH_3COOH

3 MATERIALI

Reagenti in topila

Pri sintezi in izolaciji spojin smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Apollo Scientific, Fluka, Merck, Sigma Aldrich in TCI. V vseh primerih je bila uporabljena prečiščena voda.

Laboratorijska oprema

- Tehtnica METTLER TOLEDO® PB403-S/FACT Precision Balance
- Magnetno mešalo z električnim grelnikom IKA® RCT basic IKAMAG
- UV svetilka CAMAG UV-CABINET II z valovnima dolžinama 254 nm in 366 nm
- Rotavapor BÜCHI® R-114
- Grelna pištola SKILL 1800 Watt

3.1 KROMATOGRAFSKE METODE

3.1.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)

TLC smo uporabljali za spremljanje poteka reakcij, preverjanje porazdelitve spojin med fazami pri ekstrakcijah, določanje čistosti frakcij pri kolonski kromatografiji in predhodno preverjanje čistosti končnih spojin po kristalizaciji. Kot stacionarno fazo smo uporabili plošče Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ z 0,2 mm nanosom silikagela na aluminijski podlagi z dodanim fluorescenčnim označevalcem. Za mobilne faze smo uporabljali čista organska topila ali njihove kombinacije v različnih razmerjih. Detekcijo spojin smo izvajali z UV svetilko pri valovni dolžini 254 nm.

3.1.2 Kolonska kromatografija

Za končno čiščenje spojin smo uporabili »flash« kolonsko kromatografijo. Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 mm proizvajalca Merck, ki smo ga nanegli v stekleno kolono s frito. Za mobilno fazo smo uporabili kombinacije organskih topil v različnih razmerjih. Za pospeševanje pretoka smo nad kolono ustvarjali povišan zračni tlak s pomočjo ročne črpalke. Čistost frakcij smo določevali s TLC kromatografijo. Ustrezne frakcije smo združili in mobilno fazo uparili pod znižanim tlakom.

3.1.3 Tekočinska kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)

Za preverjanje čistosti končnih sintetiziranih spojin smo uporabili metodo HPLC. Analize smo izvajali na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B, kolono Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 × 150 mm, 5 µm delci) ob uporabi predkolone Phenomenex pre-column C18 (5 µm delci) in pri pretoku 1 mL/min. Kot eluent smo izbrali zmes 0,1% raztopine trifluoroocetne kisline v vodi in acetonitrila, pri čemer smo sestavo mobilne faze spreminjali s časom: od 0-20 minut se je sestava spreminjala od 30% acetonitrila do 80%, od 20-25 minut pa še od 80% acetonitrila do 90%.

3.2 SPEKTROSKOPSKE METODE

3.2.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance III 400 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. ¹H spektre smo posneli pri 400 MHz, ¹³C spektre pa 100 MHz. V obeh primerih smo vzorce raztopili v devteriranem topilu DMSO-d₆ in kot interni standard uporabili tetrametilsilan (TMS).

3.2.2 Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier, proizvajalca Waters, z metodo ionizacije ESI, na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.2.3 Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na spektrometru Nicolet Nexus 470 FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Uporabili smo tehniko ATR (attenuated total reflection oz. oslabljeni popolni odboj).

3.3 DOLOČANJE TALIŠČ

Temperature tališč smo določali na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica. Temperature tališč so nekorrigirane.

3.4 PROGRAMSKA OPREMA

Za risanje struktur in reakcijskih shem smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 12.0, proizvajalca Perkin Elmer. NMR spektre smo obdelali z programsko opremo Mestrec (verzija 4.7.0.0).

3.5 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE

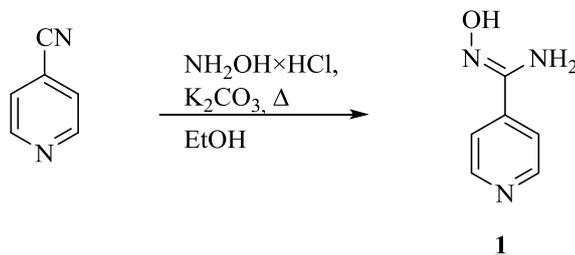
Sintetizirane spojine smo dali biokemijsko ovrednotiti tujim partnerjem na Center za biomedicinsko znanost na Medicinski fakulteti Univerze v Nišu. Za testiranje so uporabili ksantinsko oksidazo iz govejega mleka, proizvajalca Sigma-Aldrich.

Sintetizirani zaviralci so bili najprej raztopljeni v DMSO. Primernemu volumnu te raztopine (da je bila koncentracija zaviralca po redčenju 150 μM in koncentracija DMSO po redčenju 4,65 % v/v) je bilo dodanih 0,01 enot goveje ksantinske oksidaze (proizvajalca Sigma-Aldrich), 232,5 μM ksantina (proizvajalca Sigma-Aldrich) in redčeno s 46,5 mM TRIS-HCl pufrom (pH 7,8), da je bil skupen volumen raztopine 2150 μL . Na enak način, vendar brez dodatka zaviralca, so bili pripravljene kontrolni vzorci za preverjanje vpliva DMSO na reakcijo. Raztopine so bile inkubirane 15 minut pri 37 °C, nato so bile reakcije ustavljene z dodatkom 100 μL perklorne kisline.

Odstotek zaviranja so določili s spektrofotometričnim merjenjem razlike v absorbanci, ki sovpada z nastajanjem sečne kisline. Odstotek zaviranja je bil izračunan kot razmerje med spremembo absorbance pri vzorcu z zaviralcem in spremembo absorbance pri kontrolnem vzorcu, pri katerem je aktivnost encima 100 %. Spojinam, ki so kazale več kot 50 % zaviranje, so zaviralno aktivnost izmerili še pri štirih različnih koncentracijah zaviralca od 25 % do 75 % zaviranja encima. Za pozitivno kontrolo so uporabili alopurinol, febuksostat in kvercetin.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

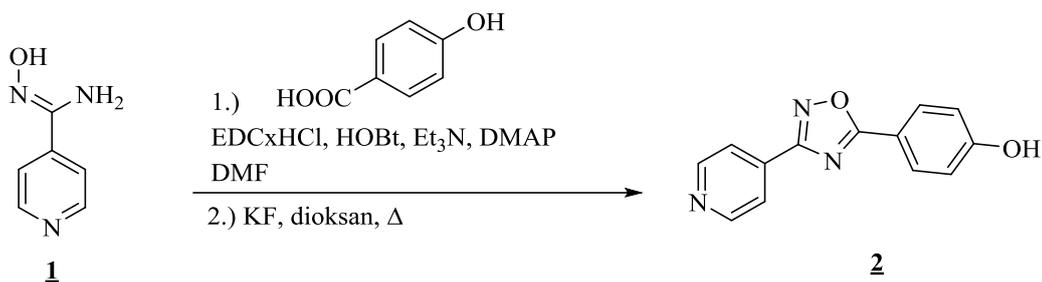
4.1 Sinteza 4-piridilamidoksima (Spojina **1**)



1,041 g (10 mmol) 4-cianopiridina smo raztopili v 60 mL etanola ter dodali 1,042 g (1,5 eq; 15 mmol) hidroksilaminijevega klorida in 2,073 g (1,5 eq; 15 mmol) kalijevega karbonata. Reakcijsko zmes smo 20 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo iz bučke pod znižanim tlakom odparili topilo. Suh preostanek smo raztopili v 100 mL etil acetata in spirali enkrat z 20 mL vode. Del produkta je šel v vodno fazo, zato smo jo ekstrahirali z etil acetatom (3x30 mL). Združene organske faze smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in uparili pod znižanim tlakom ter dobili 1,011 g spojine **1**.

Spojina 1 : 4-piridilamidoksim	
Elementna sestava: C ₆ H ₇ N ₃ O	Mr (izračunana): 137,06
Opis	Bel prah
Izkoristek	73,7%
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 6.01 (s, 2H, NH ₂), 7.64 (d, 2H, J = 6,4 Hz, Ar-H), 8.57 (d, 2H, J = 6,4 Hz, Ar-H), 10.02 (s, 1H, OH)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆), literaturni podatki (46)	δ [ppm] = 6.1 (s, NH ₂), 7.6 (d, J = 4,2 Hz, 2H, Ar-H), 8.6 (d, J = 4,2 Hz, 2H, Ar-H), 10.0 (s, 1H, OH)

4.2 Sinteza 4-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)fenola (Spojina **2**)

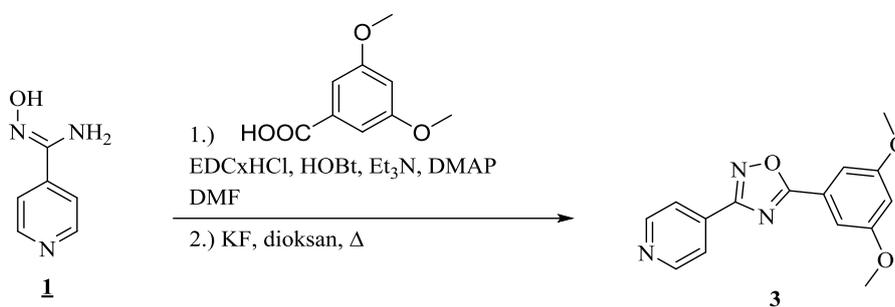


V 1 mL DMF smo raztopili 96 mg (0,7 mmol) spojine **1**, 97 mg (0,7 mmol) 4-hidroksibenzojske kisline, 148 mg (1,1 eq; 0,77 mmol) EDC·HCl in 104 mg (1,1 eq; 0,77 mmol) HOBT. Dodali smo še 195 μL (2 eq; 1,4 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopimo smo 2 uri mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 122 mg (3 eq; 2,1 mmol) KF in 4,5 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 30 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo suspendirali v 2 mL etanola in odfiltrirali nastalo oborino, ki smo jo čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 38 mg spojine **2**.

Spojina 2 : 4-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)fenol	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₂	Mr (izračunana): 239,23
Opis	Oranžen prah
Izkoristek	22,7%
Tališče	240-244 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 7.01 (d, 2H, J = 8,4 Hz, Ar-H), 8.00 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 8.05 (d, 2H, J = 8,4 Hz, Ar-H), 8.83 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 10.64 (s, 1H, OH)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 113.73, 116.39, 121.00, 130.28, 133.66, 150.86, 162.31, 166.72, 176.22
IR (ATR)	2583, 1584, 1527, 1499, 1463, 1420, 1368, 1298, 1261, 1170, 1144, 1064, 1008, 832, 756, 707, 634 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	97,5 %, t _r = 3,00 min
MS (ESI): m/z = 240,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 240,0776 (izračunana: 240,0773) za C ₁₃ H ₁₀ N ₃ O ₂

4.3 Sinteza 4-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina

(Spojina **3**)

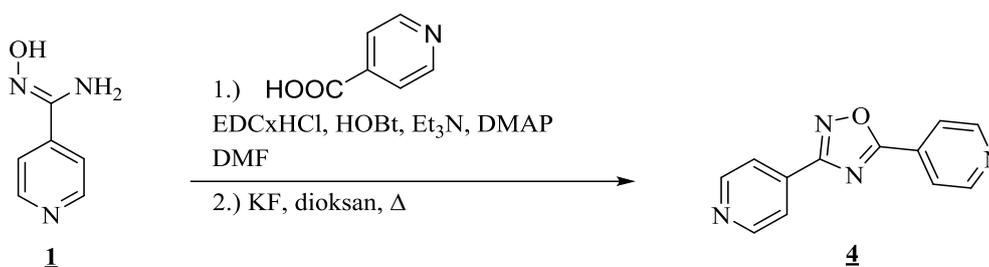


V 4 mL DMF smo raztopili 300 mg (2,19 mmol) spojine **1**, 399 mg (2,19 mmol) 3,5-dimetoksibenzojske kisline, 461 mg (1,1 eq; 2,41 mmol) EDC·HCl in 368 mg (1,1 eq; 2,41 mmol) HOBt. Dodali smo še 609 μ L (2 eq; 4,37 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2 uri mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 381 mg (3 eq; 6,56 mmol) KF in 9 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 18 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 60 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 18 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 226 mg spojine **3**.

Spojina 3 : 4-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin	
Elementna sestava: C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₃	Mr (izračunana): 283,28
Opis	Beli igličasti kristali
Izkoristek	36,5%
Tališče	130-133 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3.88 (s, 6H, 2× O-CH ₃), 6.88 (t, 1H, J = 2,4 Hz, Ar-H), 7.30 (d, 2H, J = 2,4 Hz, Ar-H), 8.03 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 8.84 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 55.74, 105.54, 105.63, 121.06, 124.60, 133.33, 150.91, 161.05, 166.99, 175.92
IR (ATR)	3056, 2966, 2838, 1717, 1605, 1575, 1556, 1521, 1456, 1431, 1416, 1372, 1313, 1240, 1211, 1194, 1168, 1076, 1064, 1043, 991, 973, 929, 886, 869, 835, 757, 737, 694, 679 cm ⁻¹

HPLC (254 nm)	98,2 %, $t_r = 8,18$ min
MS (ESI): $m/z = 284,1$ $[M+H]^+$	HR-MS: 284,1030 (izračunana: 284,1035) za $C_{15}H_{14}N_3O_3$

4.4 Sinteza 4,4'-(1,2,4-oksadiazol-3,5-diil)dipiridina (Spojina **4**)



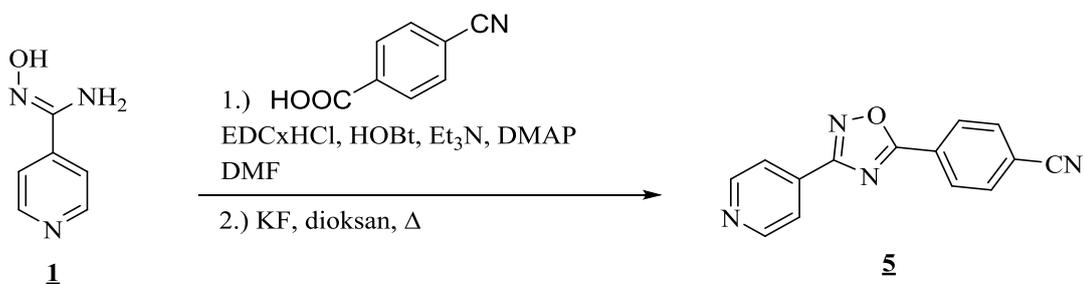
V 1,5 mL DMF smo raztopili 137 mg (1 mmol) spojine **1**, 123 mg (1 mmol) izonikotinske kisline, 211 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) EDCxHCl in 149 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) HOBT. Dodali smo še 278 μ L (2 eq; 2 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2,5 ure mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 174 mg (3 eq; 3 mmol) KF in 4,5 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 60 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 2 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 50 mg spojine **4**.

Spojina 4 : 4,4'-(1,2,4-oksadiazol-3,5-diil)dipiridin	
Elementna sestava: C ₁₂ H ₈ N ₄ O	Mr (izračunana): 224,22
Opis	Svetlo rjavi kristali
Izkoristek	22,3%
Tališče	148-150 °C, 165 - 167 °C (literaturna vrednost) (47)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 8.04 (d, 2H, J = 6,4 Hz, Ar-H), 8.13 (d, 2H, J = 6,4 Hz, Ar-H), 8.86 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 8.94 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃), literaturni podatki (48)	δ [ppm] = 7.99 (d, J = 4,10 Hz, 2H), 8.07 (d, J = 4,22 Hz, 2H); 8.83 (d, J = 4,22 Hz, 2H); 8.90 (d, J = 4,10 Hz, 2H)

¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 121.05, 121.37, 130.11, 133.07, 151.00, 151.22, 167.25, 174.63	
IR (ATR)	3047, 1604, 1580, 1544, 1521, 1488, 1466, 1414, 1366, 1338, 1314, 1289, 1210, 1143, 1093, 1063, 988, 904, 837, 752, 725, 713, 683 cm ⁻¹	
HPLC (254 nm)	100,0 %, t _r = 1,99 min	
MS (ESI): m/z = 225,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 225,0772 (izračunana: 225,0776) za C ₁₂ H ₉ N ₄ O	

4.5 Sinteza 4-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzonitrila

(Spojina **5**)

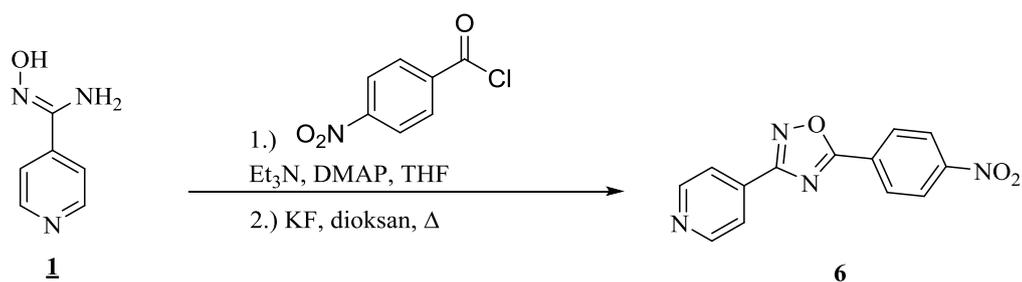


V 1,5 mL DMF smo raztopili 137 mg (1 mmol) spojine **1**, 147 mg (1 mmol) 4-cianobenzojske kisline, 211 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) EDC·HCl in 149 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) HOBT. Dodali smo še 278 μL (2 eq; 2 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2 uri mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 174 mg (3 eq; 3 mmol) KF in 4,5 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 60 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 6 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 73 mg spojine **5**.

Spojina 5 : 4-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzonitril	
Elementna sestava: C ₁₄ H ₈ N ₄ O	Mr (izračunana): 248,24
Opis	Beli kristali
Izkoristek	29,4%

Tališče	183-185 °C	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 8.04 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 8.16 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H), 8.37 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H), 8.86 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H)	
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 115.55, 117.90, 121.03, 126.96, 128.79, 133.14, 133.52, 151.00, 167.20, 174.82	
IR (ATR)	3267, 2233, 1614, 1586, 1553, 1523, 1497, 1466, 1415, 1365, 1311, 1272, 1140, 1059, 1018, 998, 977, 922, 854, 836, 757, 717, 703 cm ⁻¹	
HPLC (254 nm)	100,0 %, t _r = 5,09 min	
MS (ESI): m/z = 249,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 249,0777 (izračunana: 249,0776) za C ₁₄ H ₉ N ₄ O	

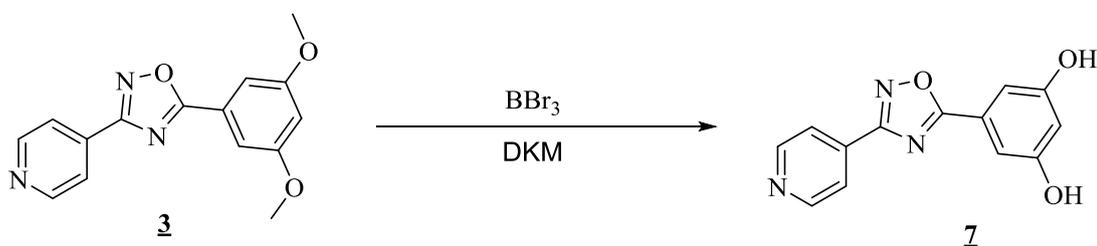
4.6 Sinteza 4-(5-(4-nitrofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina (Spojina **6**)



V 3 mL THF smo raztopili 137 mg (1 mmol) spojine **1** in 204 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) 4-nitrobenzoil klorida. Dodali smo še 278 µL (2 eq; 2 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2 uri mešali pri sobni temperaturi, nato smo pod znižanim tlakom uparili THF. Suh preostanek smo raztopili v 4,5 mL dioksana in dodali 174 mg (3 eq; 3 mmol) KF. Reakcijsko zmes smo 20 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 40 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 9 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 108 mg spojine **6**.

Spojina 6 : 4-(5-(4-nitrofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₈ N ₄ O ₃	Mr (izračunana): 268,23
Opis	Svetlo rjavi kristali
Izkoristek	40,3%
Tališče	164-168 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 8.06 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 8.46-8.52 (m, 4H, Ar-H), 8.87 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 121.07, 124.68, 128.44, 129.62, 133.14, 150.13, 150.98, 167.27, 174.58
IR (ATR)	3047, 1609, 1527, 1415, 1367, 1351, 1312, 1273, 1140, 923, 869, 856, 832, 770, 743, 725, 690 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	100,0 %, t _r = 6,56 min
MS (ESI): m/z = 269,0 [M+H] ⁺	HR-MS: 269,0677 (izračunana: 269,0675) za C ₁₃ H ₉ N ₄ O ₃

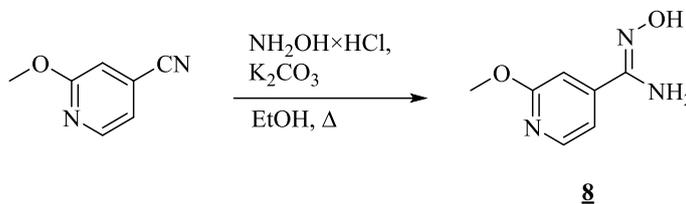
4.7 Sinteza 5-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzen-1,3-diola (Spojina **7**)



V 1 mL diklorometana smo raztopili 80 mg (0,282 mmol) spojine **3**. Med mešanjem smo na ledeni kopeli počasi dodali 2,82 mL (10 eq; 2,82 mmol) 1M raztopine BBr₃ v diklorometanu. Nato smo odstranili ledeno kopel in pri sobni temperaturi mešali še nadaljnjih 21 ur. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 8 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Produkt smo ekstrahirali v 40 mL etil acetata, organsko fazo spirali z 10 mL nasičene raztopine NaCl, posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili pod znižanim tlakom. Dobljen oljnat preostanek smo raztopili v 10 mL metanola in znova uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobljen trd preostanek smo suspendirali v 3 ml dietil etra, oborino odfiltrirali in posušili na zraku. Dobili smo 70 mg spojine **7**.

Spojina 7 : 5-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzen-1,3-diol	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₃	Mr (izračunana): 255,23
Opis	Svetlo rjav prah
Izkoristek	97,1%
Tališče	228-231 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 6.55 (t, 1H, J = 2,4 Hz, Ar-H), 7.05 (d, 2H, J = 2,4 Hz, Ar-H), 8.11 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 8.90 (d, 2H, J = 6,4 Hz, Ar-H), 9.97 (br s, 2H, -OH)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	/
IR (ATR)	3214, 3095, 1643, 1595, 1567, 1472, 1384, 1303, 1247, 1171, 1139, 1100, 1013, 1001, 991, 971, 933, 862, 830, 758, 675cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	99,1 %, t _r = 2,20 min
MS (ESI): m/z = 256,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 256,0729 (izračunana: 256,0722) za C ₁₃ H ₁₀ N ₃ O ₃

4.8 Sinteza (z)-*n*-hidroksi-2-metoksiisonikotinimidamida (Spojina **8**)

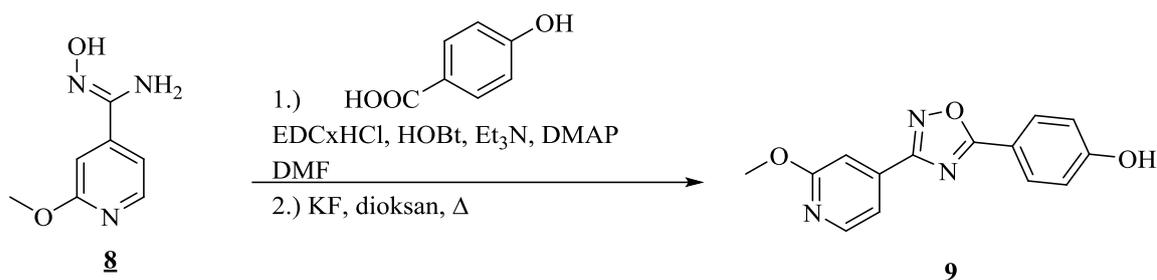


500 mg (3,727 mmol) 2-metoksi-4-cianopiridina smo raztopili v 40 mL etanola ter dodali 518 mg (2 eq; 7,454 mmol) hidroksilaminijevega klorida in 1,030 g (2 eq; 7,454 mmol) kalijevega karbonata. Reakcijsko zmes smo 24 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo iz bučke pod znižanim tlakom odparili topilo. Suh preostanek smo raztopili v 80 ml etil acetata in spirali enkrat z 20 ml vode. Del produkta je šel v vodno fazo, zato smo jo ekstrahirali enkrat s 30 ml etil acetata. Združene organske faze smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in uparili ter dobili 479 mg spojine **8**.

Spojina 8 : (Z)-N-hidroksi-2-metoksiisonikotinimid	
Elementna sestava: C ₇ H ₉ N ₃ O ₂	Mr (izračunana): 167,17
Opis	Bel prah
Izkoristek	76,9%
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3.85 (s, 3H, OCH ₃), 5.97 (s, 2H, -NH ₂), 7.07 (dd, 1H, J ₁ = 1,6 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 7.25 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, Ar-H), 8.13 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 10.02 (s, 1H, -OH)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 53.21, 106.33, 113.29, 143.60, 146.63, 148.74, 163.95

4.9 Sinteza 4-(3-(2-metoksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)fenola

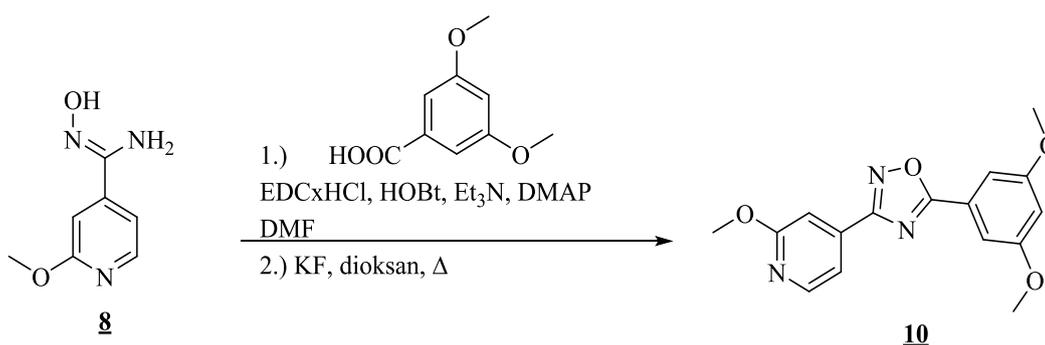
(Spojina **9**)



V 1 mL DMF smo raztopili 97 mg (0,58 mmol) spojine **8**, 80 mg (0,58 mmol) 4-hidroksibenzojske kisline, 122 mg (1,1 eq; 0,64 mmol) EDCxHCl in 86 mg (1,1 eq; 0,64 mmol) HOBT. Dodali smo še 162 μL (2 eq; 1,16 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2,5 ure mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 101 mg (3 eq; 1,74 mmol) KF in 4,5 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 20 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 30 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EA:Hex=1:1) in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 45 mg spojine **9**.

Spojina 9 : 4-(3-(2-metoksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)fenol	
Elementna sestava: C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O ₃	Mr (izračunana): 269,26
Opis	Oranžen prah
Izkoristek	28,8%
Tališče	185-189 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3.94 (s, 3H, OCH ₃), 7.01 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H), 7.37 (dd, 1H, J ₁ = 1,2 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 7.58 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, Ar-H), 8.04 (d, 2H, J = 9,2 Hz, Ar-H), 8.41 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 10.64 (s, 1H, -OH)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 53.63, 88.97, 97.31, 108.08, 113.72, 116.37, 130.28, 136.65, 148.46, 162.29, 164.25, 176.14
IR (ATR)	3006, 2603, 1614, 1579, 1501, 1447, 1410, 1376, 1341, 1289, 1269, 1225, 1171, 1045, 841, 760, 702 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	100,0 %, t _r = 11,69 min
MS (ESI): m/z = 270,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 270,0872 (izračunana: 270,0879) za C ₁₄ H ₁₂ N ₃ O ₃

4.10 Sinteza 2-metoksi-4-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina (Spojina **10**)



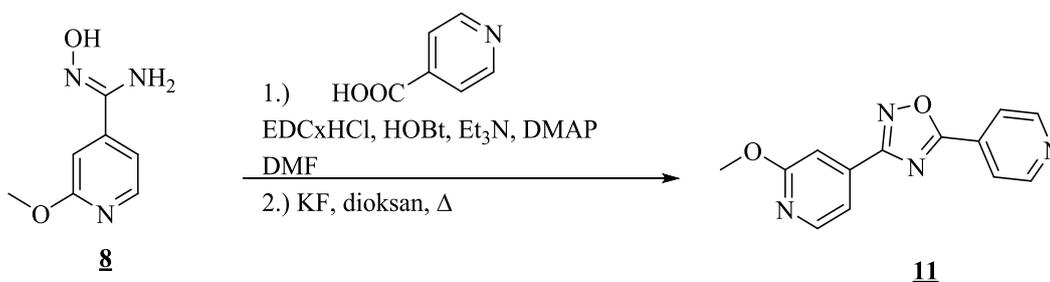
V 1 mL DMF smo raztopili 117 mg (0,7 mmol) spojine **8**, 127 mg (0,7 mmol) 3,5-dimetoksibenzojske kisline, 148 mg (1,1 eq; 0,77 mmol) EDC·HCl in 104 mg (1,1 eq; 0,77 mmol) HOBT. Dodali smo še 195 μL (2 eq; 1,4 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2,5 ure mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 122 mg (3 eq; 2,1 mmol) KF in 4,5 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri

temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 30 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 9 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 101 mg spojine **10**.

Spojina 10 : 2-metoksi-4-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin	
Elementna sestava: C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₄	Mr (izračunana): 313,31
Opis	Beli kristali
Izkoristek	46,1%
Tališče	133-136 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3.87 (s, 6H, 2×OCH ₃), 3.94 (s, 3H, OCH ₃), 6.88 (t, 1H, J = 2,4 Hz, Ar-H), 7.30 (d, 2H, J = 2,4 Hz, Ar-H), 7.41 (s, 1H, Ar-H), 7.61 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 1,2 Hz, Ar-H), 8.42 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 53.67, 55.73, 105.51, 105.65, 108.21, 114.32, 124.59, 136.30, 148.54, 161.05, 164.28, 166.80, 175.84
IR (ATR)	2947, 2844, 1603, 1576, 1555, 1514, 1470, 1387, 1369, 1310, 1206, 1159, 1120, 1068, 1045, 998, 852, 832, 760, 674 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	99,3 %, t _r = 18,56 min
MS (ESI): m/z = 314,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 314,1144 (izračunana: 314,1141) za C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₄

4.11 Sinteza 2-metoksi-4-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina

(Spojina **11**)

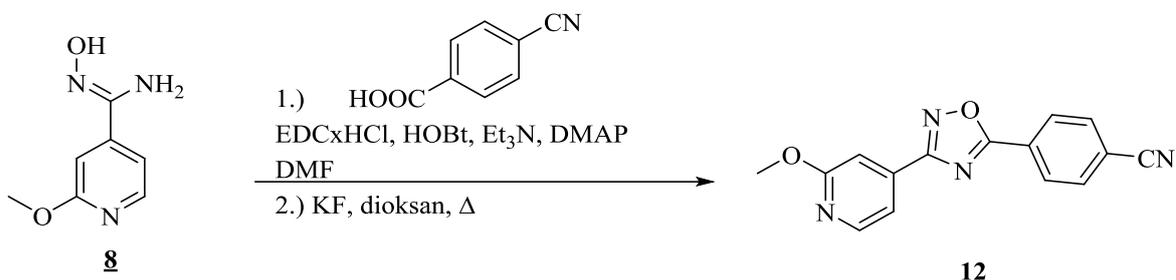


V 1 mL DMF smo raztopili 86 mg (0,51 mmol) spojine **8**, 63 mg (0,51 mmol) piridin-4-karbonske kisline, 109 mg (1,1 eq; 0,57 mmol) EDC×HCl in 77 mg (1,1 eq; 0,57 mmol) HOBt. Dodali smo še 143 µL (2 eq; 1,03 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2,5 ure mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 90 mg (3 eq; 1,54 mmol) KF in 3 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 30 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 3 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 49 mg spojine **11**.

Spojina 11 : 2-metoksi-4-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O ₂	Mr (izračunana): 254,24
Opis	Beli kristali
Izkoristek	37,5%
Tališče	137-141 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3.95 (s, 3H, OCH ₃), 7.42 (dd, 1H, J ₁ = 1,2 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 7.63 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, Ar-H), 8.12 (d, 2H, J = 6 Hz, Ar-H), 8.44 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 8.93 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 53.69, 108.22, 114.29, 121.37, 127.79, 130.09, 136.04, 148.66, 151.21, 164.30, 174.56
IR (ATR)	3046, 2357, 1618, 1581, 1549, 1516, 1476, 1417, 1392, 1361, 1337, 1288, 1223, 1044, 983, 888, 834, 756, 713 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	100,0 %, t _r = 7,48 min
MS (ESI): m/z = 255,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 255,0880 (izračunana: 255,0882) za C ₁₃ H ₁₁ N ₄ O ₂

4.12 Sinteza 4-(3-(2-metoksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzonitrila

(Spojina **12**)



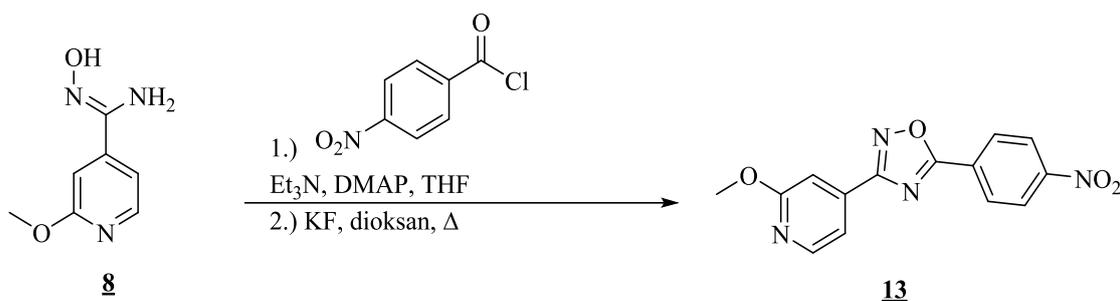
V 1 mL DMF smo raztopili 117 mg (0,7 mmol) spojine **8**, 103 mg (0,7 mmol) 4-cianobenzojske kisline, 148 mg (1,1 eq; 0,77 mmol) EDC·HCl in 104 mg (1,1 eq; 0,77 mmol) HOBt. Dodali smo še 195 μ L (2 eq; 1,4 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2 uri mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 122 mg (3 eq; 2,1 mmol) KF in 4,5 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 30 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 12 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 88 mg spojine **12**.

Spojina 12 : 4-(3-(2-metoksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzonitril	
Elementna sestava: C ₁₅ H ₁₀ N ₄ O ₂	Mr (izračunana): 278,27
Opis	Beli kristali
Izkoristek	45,2%
Tališče	162-166 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3.94 (s, 3H, OCH ₃), 7.41 (d, 1H, J = 0,8 Hz, Ar-H), 7.61 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, Ar-H), 8.16 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H), 8.37 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H), 8.43 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 53.69, 108.19, 114.28, 115.51, 117.91, 126.91, 128.79, 133.48, 136.09, 148.63, 164.28, 166.99, 174.73
IR (ATR)	2956, 2231, 1617, 1516, 1460, 1447, 1398, 1342, 1270, 1127, 1031, 990, 977, 873, 849, 840, 759, 702 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	98,9 %, t _r = 15,27 min

MS (ESI): m/z = 279,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 279,0886 (izračunana: 279,0882) za C ₁₅ H ₁₁ N ₄ O ₂
--	--

4.13 Sinteza 2-metoksi-4-(5-(4-nitrofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina

(Spojina **13**)



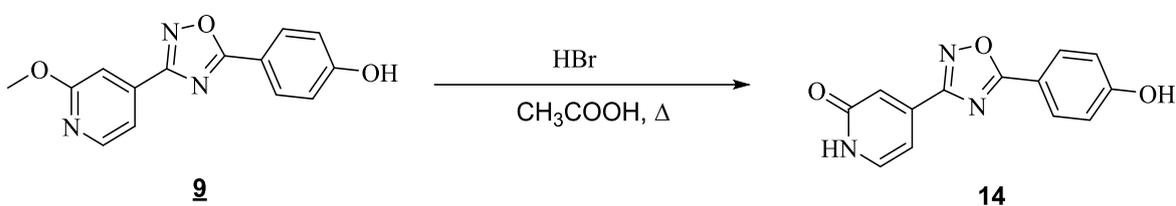
V 6 mL THF smo raztopili 117 mg (0,7 mmol) spojine **8** in 143 mg (1,1 eq; 0,77 mmol) 4-nitrobenzoil klorida. Dodali smo še 195 μ L (2 eq; 1,4 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2 uri mešali pri sobni temperaturi, nato smo pod znižanim tlakom uparili THF. Suh preostanek smo raztopili v 4,5 mL dioksana in dodali 122 mg (3 eq; 2,1 mmol) KF. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 30 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Na fazni meji se je pojavila oborina, ki smo jo odnučali. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo združili s prej odnučano oborino, ga suspendirali v 30 mL etanola in odfiltrirali nastalo oborino, ki smo jo čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 125 mg spojine **13**.

Spojina 13 : 2-metoksi-4-(5-(4-nitrofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin	
Elementna sestava: C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₄	Mr (izračunana): 298,25
Opis	Bel prah
Izkoristek	59,9%
Tališče	171-173 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3.95 (s, 3H, OCH ₃), 7.43 (dd, 1H, J ₁ = 1,6 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 7.63 (dd, 1H, J ₁ = 5,6 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, Ar-H), 8.44-8.50 (m, 5H, Ar-H)

¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 53.70, 108.20, 114.30, 124.67, 128.43, 129.63, 136.08, 148.66, 150.13, 164.30, 167.07, 174.50	
IR (ATR)	3077, 2964, 1616, 1574, 1557, 1528, 1514, 1472, 1388, 1367, 1342, 1306, 1282, 1223, 1028, 976, 865, 851, 743, 696 cm ⁻¹	
HPLC (254 nm)	100,0 %, t _r = 16,66 min	
MS (ESI): m/z = 299,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 299,0783 (izračunana: 299,0780) za C ₁₄ H ₁₁ N ₄ O ₄	

4.14 Sinteza 4-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-ola

(Spojina **14**)

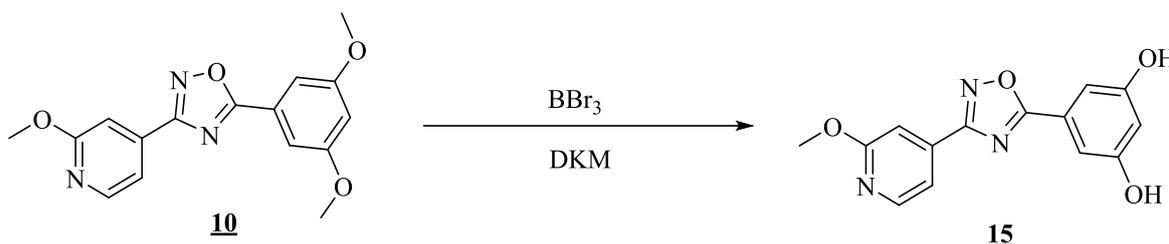


V 1 mL očetne kisline smo raztopili 30 mg (0,111 mmol) spojine **9** in dodali 2 mL 33% (m/m) raztopine HBr v očetni kislini. Reakcijsko zmes smo 2 uri segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom skoncentrirali topilo na minimalen volumen. Na ledeni kopeli smo dodali 20 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Izpadlo oborino smo filtrirali in sprali z dietil etrom, ter posušili na zraku. Dobili smo 17 mg spojine **14**.

Spojina 14 : 4-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-ol	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₃	Mr (izračunana): 255,23
Opis	Svetlo rjav prah
Izkoristek	59,8%
Tališče	>300 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 6.65-6.70 (m, 3H, Ar-H), 6.95 (d, 1H, J = 1,2 Hz, Ar-H), 7.55 (d, 1H, J = 6,8 Hz, Ar-H), 7.81-7.83 (m, 2H, Ar-H) *signala za OH skupini sta skrita pod signalom za vodo pri 3.3 ppm
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 102.20, 107.84, 117.90, 118.14, 130.15, 137.11, 138.47, 162.33, 166.13, 169.60, 176.74

IR (ATR)	2812, 1660, 1593, 1545, 1499, 1437, 1378, 1320, 1279, 1234, 1170, 1123, 1065, 1007, 980, 878, 838, 761, 701 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	97,8 %, t _r = 3,70 min
MS (ESI): m/z = 256,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 256,0726 (izračunana: 256,0722) za C ₁₃ H ₁₀ N ₃ O ₃

4.15 Sinteza 5-(3-(2-metoksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzen-1,3-diola (Spojina **15**)

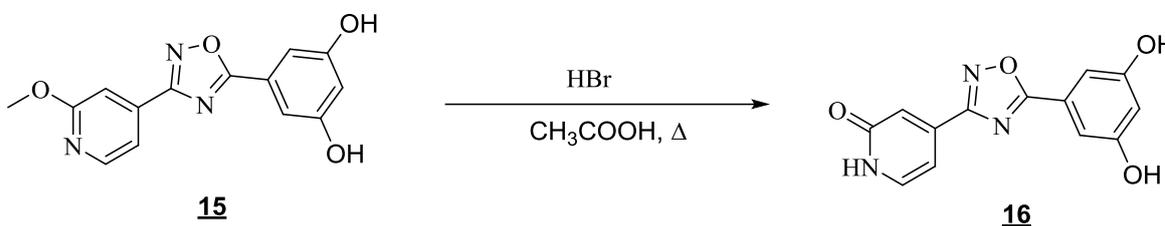


V 1 mL diklorometana smo raztopili 40 mg (0,128 mmol) spojine **10**. Med mešanjem smo na ledeni kopeli počasi dodali 1,53 mL (12 eq; 1,53 mmol) 1M raztopine BBr₃ v diklorometanu. Nato smo odstranili ledeno kopel in pri sobni temperaturi mešali še nadaljnjih 23 ur. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 8 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Produkt smo ekstrahirali v 30 mL etil acetata, organsko fazo spirali z 10 mL nasičene raztopine NaCl, posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili pod znižanim tlakom ter na koncu dobili 33 mg spojine **15**.

Spojina 15 : 5-(3-(2-metoksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzen-1,3-diol	
Elementna sestava: C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O ₄	Mr (izračunana): 285,25
Opis	Bel prah
Izkoristek	90,6%
Tališče	222-225 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3.94 (s, 3H, OCH ₃), 6.53 (t, 1H, J = 2,4 Hz, Ar-H), 7.03-7.04 (m, 2H, Ar-H), 7.37 (dd, 1H, J ₁ = 1,2 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 7.58 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 1,2 Hz, Ar-H), 8.41 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 9.96 (s, 2H, -OH)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 53.64, 105.76, 107.50, 108.08, 114.30, 124.24, 136.46, 148.52, 159.26, 164.25, 166.66, 176.19

IR (ATR)	3270, 1613, 1578, 1560, 1514, 1481, 1453, 1373, 1317, 1224, 1170, 1123, 1086, 1043, 1004, 943, 876, 864, 845, 761, 667 cm ⁻¹	
HPLC (254 nm)	99,2 %, t _r = 8,38 min	
MS (ESI): m/z = 286,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 286,0822 (izračunana: 286,0828) za C ₁₄ H ₁₂ N ₃ O ₄	

4.16 Sinteza 5-(3-(2-hidroksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzen-1,3-diola (Spojina **16**)



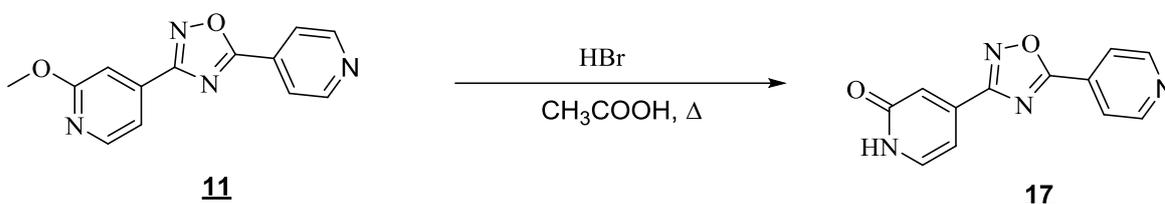
V 1 mL oetne kisline smo raztopili 25 mg (0,0876 mmol) spojine **15** in dodali 2 mL 33% (m/m) raztopine HBr v oetni kislini. Reakcijsko zmes smo 2 uri segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom skoncentrirali topilo na minimalen volumen. Na ledeni kopeli smo dodali 20 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Izpadlo oborino smo odfiltrirali, sprali z dietil etrom in posušili na zraku. Dobili smo 14 mg spojine **16**.

Spojina 16 : 5-(3-(2-hidroksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzen-1,3-diol	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₄	Mr (izračunana): 271,23
Opis	Temno rjav prah
Izkoristek	58,9%
Tališče	>300 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 6.46 (t, 1H, J = 2 Hz, Ar-H), 6.69 (dd, 1H, J ₁ = 6,4 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, Ar-H), 6.91-6.93 (m, 3H, Ar-H), 7.61 (d, 1H, J = 6,8 Hz, Ar-H) *signali na OH skupine so skriti pod signalom za vodo pri 3.3 ppm
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 102.26, 105.12, 108.32, 117.25, 123.82, 137.41, 139.05, 161.02, 163.74, 166.73, 176.61

IR (ATR)	2943, 1659, 1593, 1545, 1498, 1437, 1378, 1320, 1279, 1234, 1169, 1115, 1065, 1006, 980, 877, 839, 760, 700 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	99,5 %, t _r = 2,51 min
MS (ESI): m/z = 270,1 [M-H] ⁻	HR-MS: 270,0511 (izračunana: 270,0515) za C ₁₃ H ₈ N ₃ O ₄

4.17 Sinteza 4-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina-2-ola

(Spojina **17**)

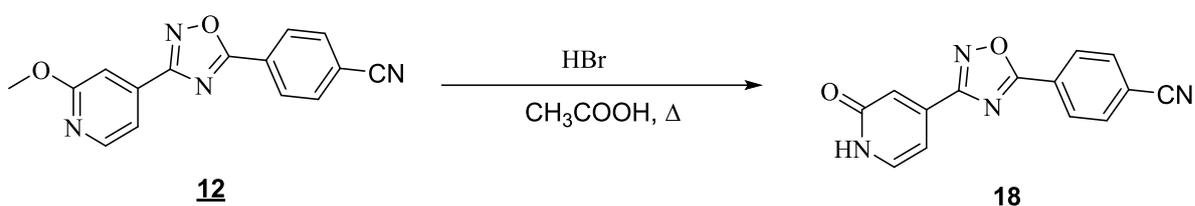


V 1 mL očetne kisline smo raztopili 30 mg (0,118 mmol) spojine **11** in dodali 2 mL 33% (m/m) raztopine HBr v očetni kislini. Reakcijsko zmes smo 2 uri segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom skoncentrirali topilo na minimalen volumen. Na ledeni kopeli smo dodali 20 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Izpadlo oborino smo filtrirali in sprali z dietil etrom, ter posušili na zraku. Dobili smo 21 mg spojine **17**.

Spojina 17 : 4-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridina-2-ol	
Elementna sestava: C ₁₂ H ₈ N ₄ O ₂	Mr (izračunana): 240,22
Opis	Rjav prah
Izkoristek	74,1%
Tališče	>300 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 6.69 (dd, 1H, J ₁ = 6,4 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, Ar-H), 6.94 (d, 1H, J = 0,8 Hz, Ar-H), 7.66 (d, 1H, J = 6,4 Hz, Ar-H), 8.10 (d, 2H, J = 6,4 Hz, Ar-H), 8.92 (d, 2H, J = 6,4 Hz, Ar-H) *signal za OH skupino je skrit pod signalom za vodo pri 3.3 ppm
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 79.11, 102.01, 121.38, 127.55, 128.81, 130.09, 137.50, 151.18, 166.93, 174.44

IR (ATR)	2957, 2832, 1664, 1622, 1581, 1549, 1451, 1412, 1375, 1296, 1242, 1125, 1069, 1007, 983, 912 873, 835, 794, 753, 728 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	96,4 %, t _r = 1,98 min
MS (ESI): m/z = 241,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 241,0728 (izračunana: 241,0726) za C ₁₂ H ₉ N ₄ O ₂

4.18 Sinteza 4-(3-(2-hidroksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzonitrila (Spojina **18**)



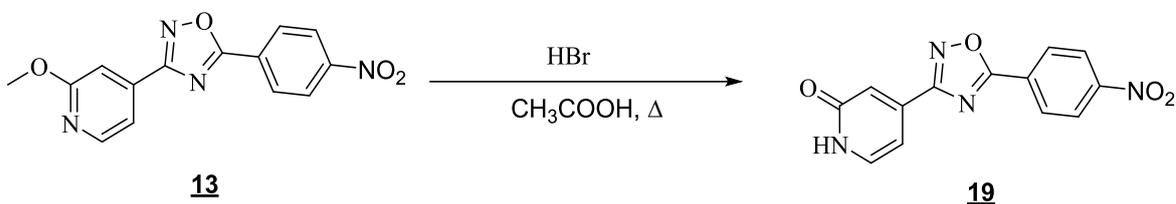
V 1,5 mL očetne kisline smo raztopili 40 mg (0,144 mmol) spojine **12** in dodali 2 mL 33% (m/m) raztopine HBr v očetni kislini. Reakcijsko zmes smo 2 uri segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom skoncentrirali topilo na minimalen volumen. Na ledeni kopeli smo dodali 20 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Izpadlo oborino smo filtrirali in sprali z dietil etrom, ter posušili na zraku. Dobili smo 27 mg spojine **18**.

Spojina 18 : 4-(3-(2-hidroksipiridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzonitril	
Elementna sestava: C ₁₄ H ₈ N ₄ O ₂	Mr (izračunana): 264,24
Opis	Bel prah
Izkoristek	71,1%
Tališče	>300 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 6.68-6.69 (m, 1H, Ar-H), 6.94 (s, 1H, Ar-H), 7.65 (d, 1H, J = 6,8 Hz, Ar-H), 8.14 (d, 2H, J = 8,4 Hz, Ar-H), 8.35 (d, 2H, J = 8,4 Hz, Ar-H) *signal za OH skupino je skrit pod signalom za vodo pri 3.3 ppm
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 101.74, 115.47, 117.61, 117.92, 127.01, 128.77, 133.48, 136.81, 139.31, 145.91, 167.22, 174.47

IR (ATR)	2962, 2231, 1660, 1625, 1586, 1545, 1498, 1449, 1373, 1278, 1231, 1116, 1071, 1007, 981, 921, 875, 856, 834, 799, 760, 697 cm ⁻¹	
HPLC (254 nm)	100,0 %, t _r = 6,01 min	
MS (ESI): m/z = 265,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 265,0730 (izračunana: 265,0726) za C ₁₄ H ₉ N ₄ O ₂	

4.19 Sinteza 4-(5-(4-nitrofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-ola

(Spojina **19**)



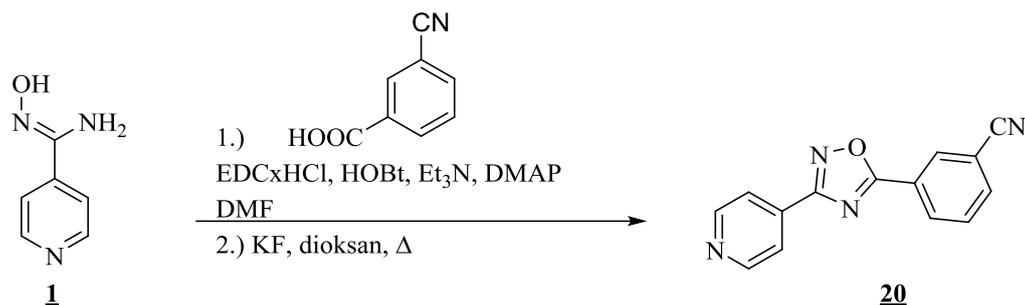
V 1 mL očetne kisline smo raztopili 40 mg (0,134 mmol) spojine **13** in dodali 2 mL 33% (m/m) raztopine HBr v očetni kislini. Reakcijsko zmes smo 2 uri segrevali pri temperaturi refluksa, nato smo pod znižanim tlakom skoncentrirali topilo na minimalen volumen. Na ledeni kopeli smo dodali 20 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Izpadlo oborino smo filtrirali in sprali z dietil etrom, ter posušili na zraku. Dobili smo 27 mg spojine **19**.

Spojina 19 : 4-(5-(4-nitrofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-ol	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₈ N ₄ O ₄	Mr (izračunana): 284,23
Opis	Svetlo rjav prah
Izkoristek	70,8%
Tališče	277-281 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 6.74-6.76 (m, 1H, Ar-H), 7.04 (s, 1H, Ar-H), 7.62 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar-H), 8.44-8.49 (m, 4H, Ar-H), 12.04 (s, 1H, NH)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 101.71, 124.64, 128.50, 129.60, 136.87, 138.03, 139.24, 140.13, 150.08, 163.65, 174.23
IR (ATR)	2956, 2823, 1662, 1623, 1569, 1542, 1530, 1379, 1342, 1289, 1241, 1107, 1006, 978, 854, 771, 744, 709 cm ⁻¹

HPLC (254 nm)	98,7 %, $t_r = 7,36$ min
MS (ESI): $m/z = 285,1$ $[M+H]^+$	HR-MS: 285,0626 (izračunana: 285,0624) za $C_{13}H_9N_4O_4$

4.20 Sinteza 3-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzonitrila

(Spojina **20**)

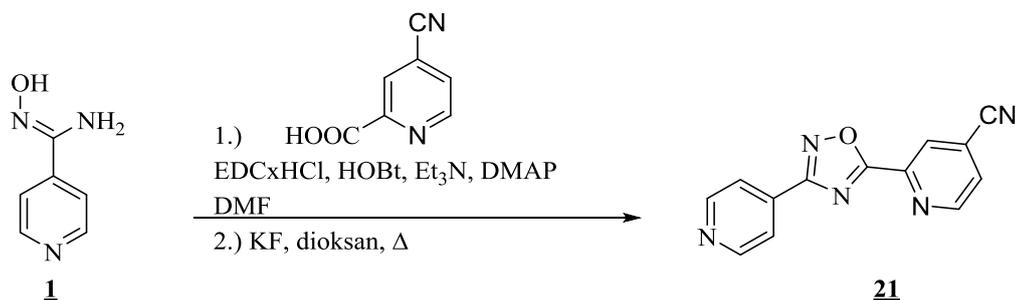


V 1,5 mL DMF smo raztopili 137 mg (1 mmol) spojine **1**, 147 mg (1 mmol) 3-cianobenzojske kisline, 211 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) EDC·HCl in 149 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) HOBT. Dodali smo še 278 μ L (2 eq; 2 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2 uri mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 174 mg (3 eq; 3 mmol) KF in 4,5 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 60 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine $NaHCO_3$, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine $NaCl$. Organsko fazo smo posušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 6 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 113 mg spojine **20**.

Spojina 20 : 3-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzonitril	
Elementna sestava: $C_{14}H_8N_4O$	Mr (izračunana): 248,24
Opis	Oker prah
Izkoristek	45,6%
Tališče	106-110 °C

¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 7.89 (dt, 2H, J ₁ = 0,8 Hz, J ₂ = 8,0 Hz, Ar-H), 8.03 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 8.21-8.24 (m, 1H, Ar-H), 8.49-8.52 (m, 1H, Ar-H), 8.63 (dt, 2H, J ₁ = 0,8 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, Ar-H), 8.85 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H)	
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 112.83, 117.61, 121.02, 124.31, 129.70, 130.93, 131.57, 132.47, 133.14, 136.84, 150.97, 167.09, 174.58	
IR (ATR)	3243, 2234, 1613, 1578, 1523, 1486, 1416, 1372, 1191, 1083, 999, 910, 836, 756, 702, 677 cm ⁻¹	
HPLC (254 nm)	96,6 %, t _r = 4,32 min	
MS (ESI): m/z = 249,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 249,0782 (izračunana: 249,0776) za C ₁₄ H ₉ N ₄ O	

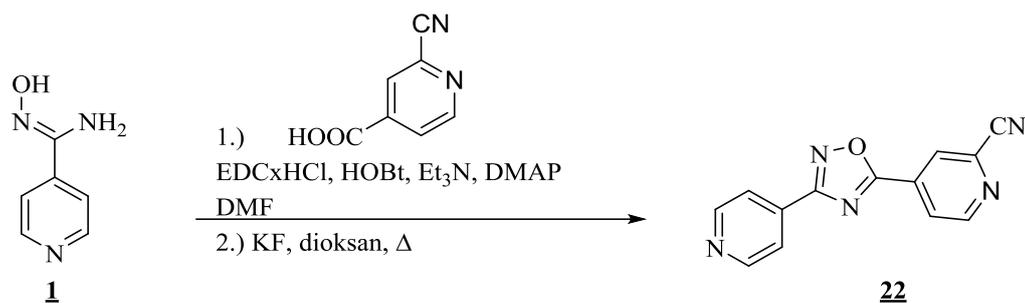
4.21 Sinteza 2-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)-4-piridinkarbonitrila (Spojina **21**)



V 1,5 mL DMF smo raztopili 137 mg (1 mmol) spojine **1**, 148 mg (1 mmol) 4-cianopikolinske kisline, 211 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) EDCxHCl in 149 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) HOBT. Dodali smo še 278 μL (2 eq; 2 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2 uri mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 174 mg (3 eq; 3 mmol) KF in 4,5 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 60 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 6 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 58 mg spojine **21**.

Spojina 21 : 2-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)-4-piridinkarbonitril	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₇ N ₅ O	Mr (izračunana): 249,23
Opis	Oker prah
Izkoristek	23,3%
Tališče	123-127°C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 8.06 (d, 2H, J = 6,4 Hz, Ar-H), 8.26 (dd, 2H, J ₁ = 1,6 Hz, J ₂ = 5,2 Hz, Ar-H), 8.79-8.80 (m, 1H, Ar-H), 8.88 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 9.13 (dd, 2H, J ₁ = 0,8 Hz, J ₂ = 4,8 Hz, Ar-H)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 115.90, 121.04, 121.40, 126.29, 129.42, 133.08, 143.52, 151.01, 151.75, 167.25, 173.85
IR (ATR)	1706, 1625, 1580, 1545, 1465, 1413, 1364, 1198, 833, 753, 708, 688 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	96,4 %, t _r = 2,54 min
MS (ESI): m/z = 250,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 250,0725 (izračunana: 250,0729) za C ₁₃ H ₈ N ₅ O

4.22 Sinteza 4-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)-2-piridinkarbonitrila (Spojina **22**)



V 1,5 mL DMF smo raztopili 137 mg (1 mmol) spojine **1**, 148 mg (1 mmol) 2-cianoizonikotinske kisline, 211 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) EDC×HCl in 149 mg (1,1 eq; 1,1 mmol) HOBT. Dodali smo še 278 μL (2 eq; 2 mmol) trietilamina in konico spatule DMAP. Raztopino smo 2 uri mešali pri sobni temperaturi, nato smo vanjo dodali 174 mg (3 eq; 3 mmol) KF in 4,5 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo 21 ur segrevali pri temperaturi refluxa, nato smo pod znižanim tlakom uparili dioksan. Preostanek smo raztopili v 60 mL etil acetata in spirali najprej z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃, nato pa še z 10 mL nasičene raztopine

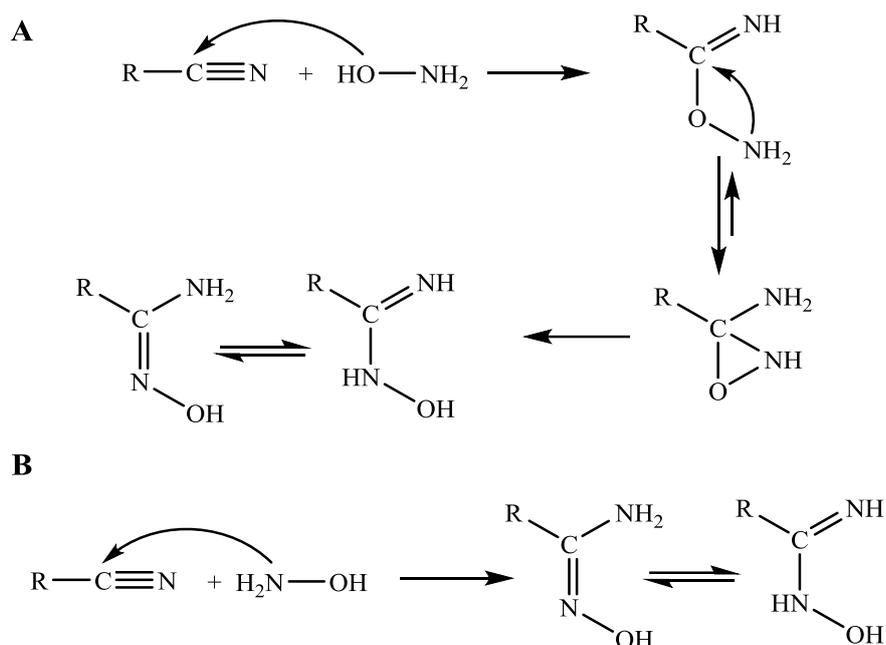
NaCl. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prekristalizirali iz 6 mL etanola in ga čez noč posušili v sušilniku na 60 °C. Dobili smo 97 mg spojine **22**.

Spojina 22 : 4-(3-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-5-il)-2-piridinkarbonitril	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₇ N ₅ O	Mr (izračunana): 249,23
Opis	Roza prah
Izkoristek	39,0%
Tališče	160-163 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 8.03 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 8.43 (dd, 2H, J ₁ = 1,6 Hz, J ₂ = 4,8 Hz, Ar-H), 8.77-8.78 (m, 1H, Ar-H), 8.65 (d, 2H, J = 6,0 Hz, Ar-H), 9.08 (dd, 2H, J ₁ = 0,8 Hz, J ₂ = 4,8 Hz, Ar-H)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 117.21, 121.53, 125.88, 127.07, 132.41, 133.37, 134.54, 151.52, 153.30, 167.87, 173.76
IR (ATR)	1705, 1579, 1546, 1516, 1466, 1414, 1384, 1366, 908, 833, 754, 709, 700, 687 cm ⁻¹
HPLC (254 nm)	95,2 %, t _r = 2,99 min
MS (ESI): m/z = 250,1 [M+H] ⁺	HR-MS: 250,0724 (izračunana: 250,0729) za C ₁₃ H ₈ N ₅ O

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 TVORBA AMIDOKSIMA

Za kasnejšo sintezo oksadiazolnega obroča je bilo potrebno v prvem koraku sintetizirati amidoksima, kar smo dosegli z uporabo hidroksilamina. Pri tej reakciji smo izhajali iz dveh izhodnih spojin: 4-cianopiridina in 2-metoksi-4-cianopiridina. Reakcijo smo izvajali v etanolu, ki dobro raztaplja tako izhodno spojino kot produkt. Ker je hidroksilamin lahko nestabilen, se pogosto uporablja v obliki soli s HCl, zaradi česar smo v reakcijsko zmes dodali še kalijev karbonat, da smo *in situ* tvorili neprotonirani hidroksilamin. Reakcija poteka po principu nukleofilnega napada hidroksilamina na nitrilno skupino. Ker ima hidroksilamin lastnosti dvojnega nukleofila, lahko napade tako z dušikovim kot s kisikovim atomom (Slika 12). V obeh primerih dobimo končni želeni produkt, odvisno od reakcijskih pogojev pa tudi nekaj amidnega stranskega produkta (49,50).

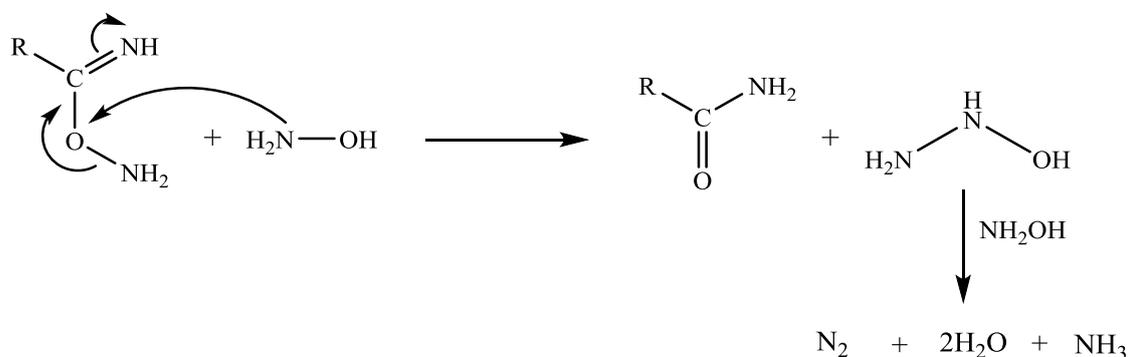


Slika 12: A: Mehanizem prek oksaziridinskega intermediata, B: Direktna tvorba amidoksima brez intermediata

Mehanizmu A v prid govori dejstvo, da je v hidroksilaminu kisik močnejši nukleofil od dušika. Po vezavi kisika na nitrilno skupino postane nitrilni ogljik zaradi elektron privlačnih lastnosti kisika še bolj elektrofilen, kar vodi v dodaten nukleofilni napad dušika in ciklizacijo do nestabilnega oksaziridinskega intermediata. Slednji se lahko odpre s cepitvijo N₂-C₃ vezi ali O₁-C₃ vezi, s tem da je slednja cepitev termodinamsko preferirana, kar vodi v nastanek

amidoksimskega produkta. Do tega vodi tudi mehanizem B, ki pa je enostavnejši in vključuje le direktni nukleofilni napad dušika na nitrilni ogljik. Najverjetnejša razlaga je, da reakcija poteka po obeh mehanizmih. V obeh primerih produkt obstaja v dveh tautomernih oblikah (49,50).

Pri reakciji v manjši meri nastaja tudi amidni stranski produkt (Slika 13). V primeru, da nitrilno skupino napade kisik iz hidroksilamina, lahko z nastalo spojino reagira dodatna molekula hidroksilamina, kar vodi v nastanek aromatskega amida. Obseg poteka reakcije do tega stranskega produkta je odvisen od izbire topila in baze. V našem primeru sta se etanol in kalijev karbonat izkazala za dobro izbiro, saj smo z njima dosegli visok izkoristek reakcije (74% pri 4-ciano derivatu in 77% pri 2-metoksi-4-ciano derivatu) in čist produkt (49,50).



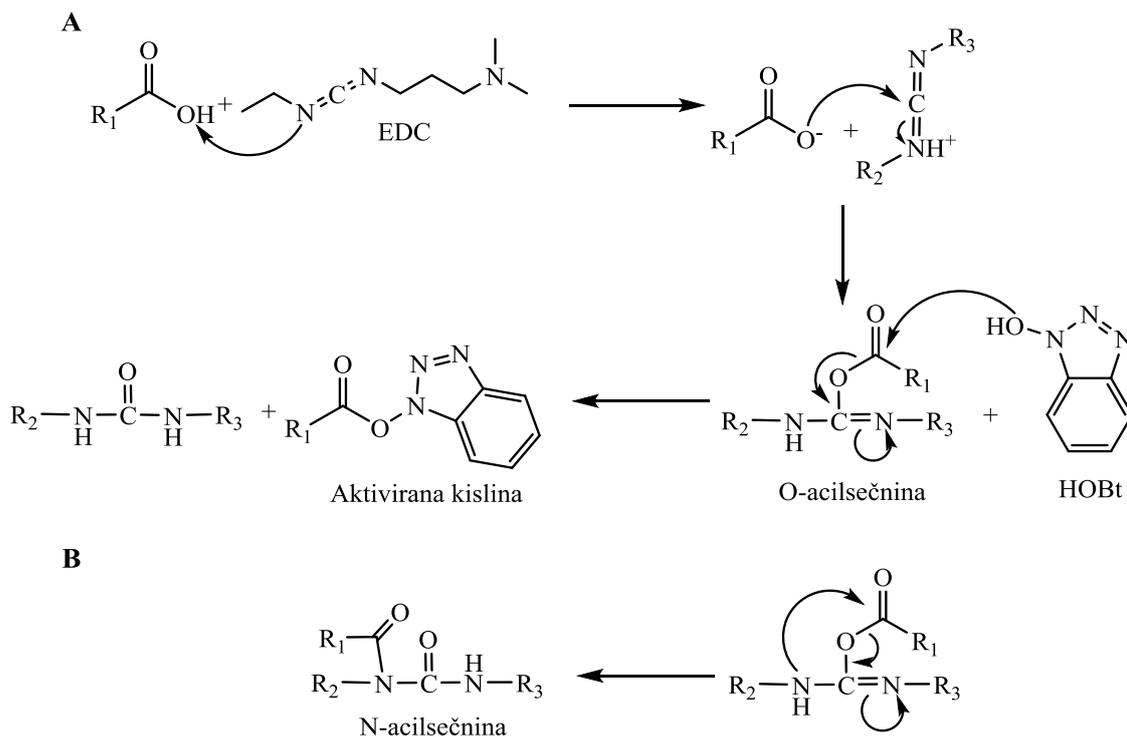
Slika 13: Mehanizem nastanka amidnega stranskega produkta

5.2 DVOSTOPENJSKA TVORBA 1,2,4-OKSADIAZOLA

Oksadiazolni obroč predstavlja pomemben fragment v farmacevtski kemiji, zato je bila njegova sinteza podrobno raziskana. Ena izmed bolj enostavnih in učinkovitih metod je O-aciliranje amidoksimov s sledečim zapiranjem obroča, zato smo se za to metodo odločili tudi v našem magistrskem delu.

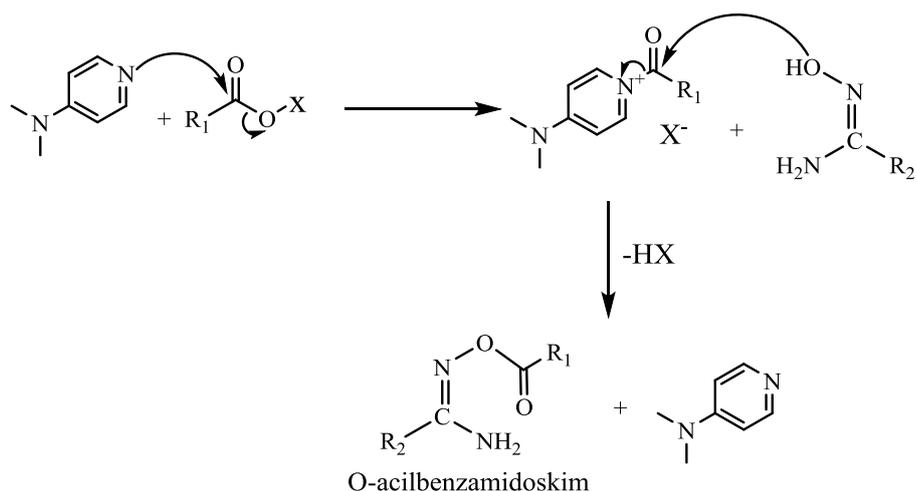
Tvorba estrske vezi pri blagih pogojih ne poteče, saj hidroksilni del karboksilne skupine ni dobra izstopajoča skupina. Za povečanje reaktivnosti bi morali uporabiti ostrejšje reakcijske pogoje, kar bi lahko vodilo v nastanek neželenih produktov. Boljša možnost je aktivacija karboksilne kisline. O-aciliranje amidoksima smo zato izvedli z uporabo sklopitvenega reagenta (Slika 14). Najpogosteje uporabljeni sklopitveni reagenti za tvorbo estrov sodijo v skupino karbodiimidov. Za naš namen smo uporabili EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid, ki najprej reagira z aromatsko karboksilno kislino. Pri tem dobimo O-acilsečnino, ki je zaradi dobre izstopajoče skupine bolj reaktivna od izhodne

karboksilne kisline. V tem koraku lahko pride do premestitve acilne skupine zaradi intramolekularnega napada dušika na karbonylno skupino aktivirane kisline. Dobljena N-acilsečnina ni ža izkoristek in predstavlja težavo pri izolaciji produkta. V izogib tej stranski reakciji smo v reakcijsko zmes dodali še pomožni nukleofil HOBt – hidroksibenzotriazol, ki s hidroksilno skupino napade aktiviran karbonylni ogljik. Dobimo aktivirano kislino in sečninski stranski produkt, ki pa ga je zaradi hidrofilnosti pri izolaciji enostavno odstraniti z ekstrakcijo v vodno fazo (51,52).



Slika 14: A: Mehanizem aktivacije karboksilne kisline, B: Mehanizem nastanka neželenega produkta

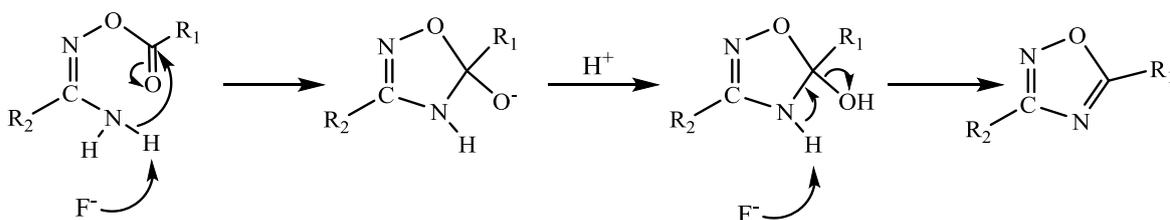
Tako aktivirana kislina je že pripravljena za reakcijo z amidoksimom. Ker pa smo želeli reakcijo še pospešiti, smo v reakcijsko zmes dodali še konico spatule DMAP – dimetilaminopiridina. Ta kot močan nukleofil reagira z aktivirano kislino (Slika 15), kar še olajša in pospeši napad hidroksilne skupine amidoksima in s tem tvorbe želenega produkta (51).



Slika 15: Mehanizem katalize z DMAP, X: dobro izstopajoča skupina

Enak postopek smo uporabili pri skoraj vseh spojinah, le pri *para*-nitro substituiranih derivatih smo uporabili kislinski klorid. V tem primeru dobro izstopajočo skupino predstavlja kloridni ion (X na Slika 15), zato nam v reakcijsko zmes ni bilo potrebno dodajati EDC in HOBt. Potek O-acilacije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in konec reakcije določili, ko na plošči ni bilo več vidnega izhodnega amidoksima. V vseh primerih smo z naslednjim korakom nadaljevali brez vmesne izolacije produktov.

Ciklizacijo vmesnih O-acilamidoksimov smo sprožili z dodatkom kalijevega fluorida (Slika 16). Fluoridni ioni v aprotičnih topilih, kot je tudi v našem primeru uporabljeni dioksan, delujejo kot močna baza, kar omogoča deprotonacijo in sledeči napad amidinskega aniona na karbonilni ogljik acilne skupine. Odcep vode v naslednji stopnji privede do tvorbe končnega 1,2,4-oksadiazolnega obroča (53).

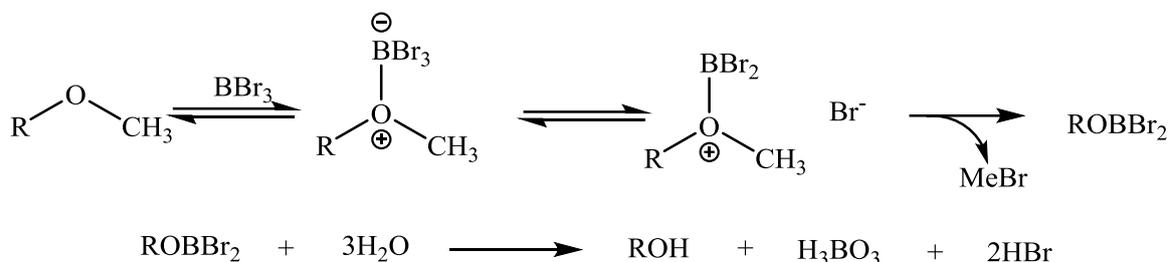


Slika 16: Mehanizem ciklizacije O-acilamidoksima v 1,2,4-oksadiazol

5.3 DEMETILIRANJE Z BOROVIKIM TRIBROMIDOM

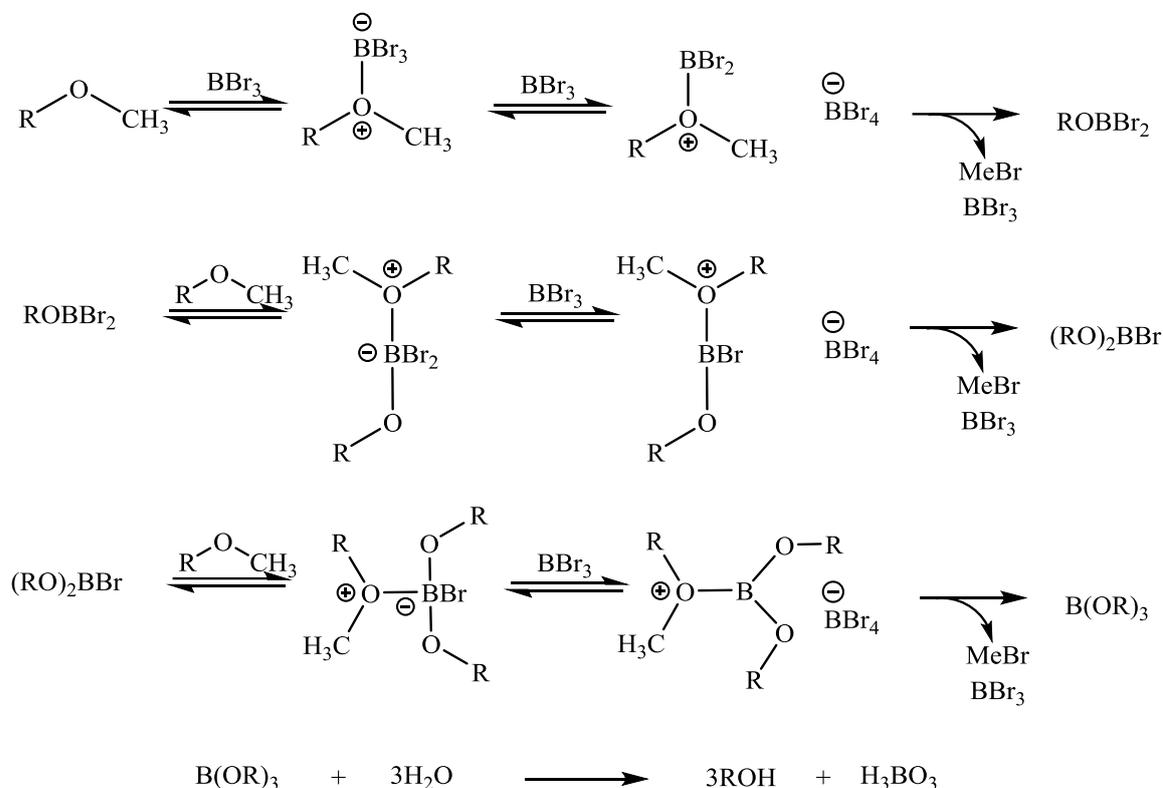
Z namenom širitve kemijskega prostora sintetiziranih spojin in s tem boljše določitve odnosa med strukturo in delovanjem novih spojin, smo v O-metiliranih spojinah cepili etrne vezi. To smo dosegli z uporabo borovega tribromida v diklorometanu, klasičnega reagenta za

demetiliranje aromatskih etrov. BBr_3 je po naravi močna Lewisova kislina, kar mu omogoča tvorbo adukta s kisikovim atomom v etrni vezi (Slika 17). Dolgo je veljalo prepričanje, da v aduktu pride do izgube bromida, ta pa nato nukleofilno napade metilno skupino kationskega intermediata, kar vodi do nastanka metil bromida in PhOBBr_2 . Slednji naj bi se nato med obdelavo z vodo hidroliziral do končnega alkoholnega produkta (54,55).



Slika 17: Termodinamsko nefavoriziran mehanizem demetilacije

Novejše računske in eksperimentalne raziskave nakazujejo, da je na sliki 17 prikazan odcep bromida termodinamsko nefavoriziran pri nizkih temperaturah, pri katerih običajno izvajamo reakcijo. Dejanski mehanizem je kompleksnejši in vključuje tri cikle, kjer se v vsakem ciklu odstrani metilna skupina z nove molekule arilnega etra (Slika 18). Dobljeni triaril boran se nato hidrolizira do končnega alkohola med obdelavo z vodo (54,56).



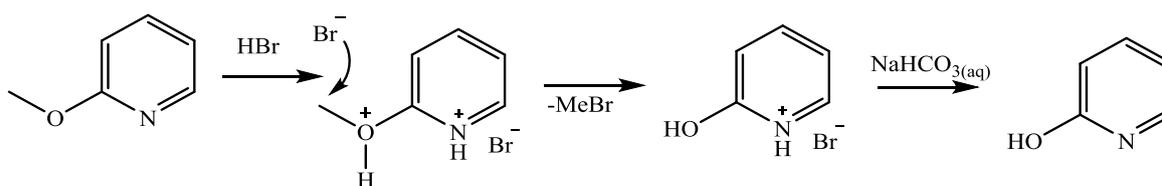
Slika 18: Triciklični mehanizem demetilacije z BBr_3

V našem primeru smo za reakcijo uporabili velik prebitok BBr_3 (10 oz. 12 ekvivalentov), čeprav lahko po predlaganem mehanizmu vsaka molekula BBr_3 cepi tri molekule etra. Razlog za to je ležal v uporabljeni atmosferi, ki je nismo vzdrževali strogo brezvodne, BBr_3 pa ob stiku z vodo zelo hitro hidrolizira do bromovodikove kisline. Z visokim prebitkom smo tako vseeno dosegali visoke izkoristke (97% pri spojini **7** in 91% pri spojini **15**). Reaktivnost BBr_3 z vodo smo lahko izkoristili tudi pri izolaciji, saj smo s spiranjem z vodo dobro odstranili ves odvečni reagent.

Prvotno smo pričakovali, da bomo pri reakciji z BBr_3 cepili tudi metoksi skupino, ki leži na *orto* mestu glede na piridinski dušikov atom. NMR analiza je pokazala, da temu ni tako, saj so bili na spektrih še vedno vidni protoni metilne skupine. Razlog za to verjetno leži v elektronprivlačnih lastnostih piridinskega dušika. Elektronska gostota okoli dušika je mnogo večja od elektronske gostote okoli ogljikovih atomov in na njih pritrjenih substituentov. Elektronsko okrnjeni kisikov atom etrne skupine zato ni dovolj nukleofilen, da bi tvoril adukt z BBr_3 . Reakcija na tej skupini zato ne poteče kljub velikemu prebitku reagenta. S tem smo odkrili reakcijske pogoje s katerimi lahko dosegamo selektivno cepitev metoksi skupin na aromatskih obročih brez cepitve metoksi skupin na piridinskem obroču. Verjetno pa do cepitve ne bi prišlo tudi na drugih, piridinu podobnih heteroaromatskih obročih.

5.4 DEMETILIRANJE Z BROMOVODIKOVO KISLINO

Za cepitev metoksi skupine na *orto* mestu glede na piridinski dušikov atom smo se morali poslužiti bolj agresivne demetilacijske metode. Uporabili smo 33% raztopino HBr v očetni kislini. Kot reakcijsko topilo smo uporabili očetno kislino, saj le-ta dobro raztaplja tako izhodne spojine kot HBr . Reakcijo smo izvajali 2 uri pri povišani temperaturi. Visoka reaktivnost HBr v mnogih primerih vodi do poteka neželenih stranskih reakcij, kar je tudi razlog, da smo v prvem koraku uporabili blažjo metodo z BBr_3 . Kljub temu se je izkazalo, da je reakcija potekla le do želenega produkta z dobrim izkoristkom (59-74%). HBr v stiku s piridinom tvori piridinijevo sol, zato smo po koncu reakcije produkt oborili z NaHCO_3 , ki nevtralizira nastalo kislino (Slika 19) (51).

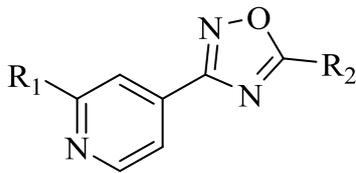
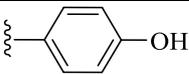
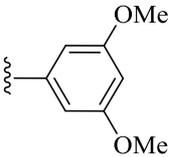
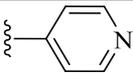
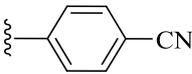
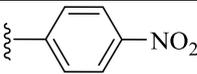
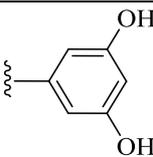
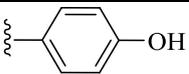


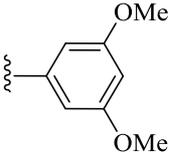
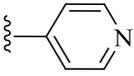
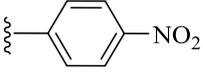
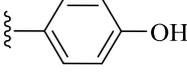
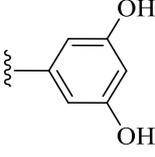
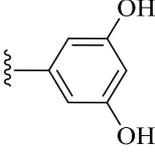
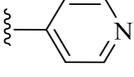
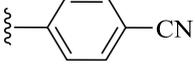
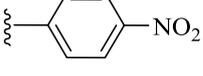
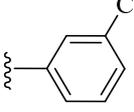
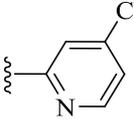
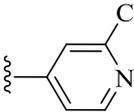
Slika 19: Mehanizem demetilacije s HBr

5.5 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE

Vsem končnim sintetiziranim spojinam so določili njihovo zaviralno aktivnost na izolirani goveji ksantinski oksidazi. V prvi seriji testov so bile vse spojine ovrednotene pri koncentraciji 150 μM . V primeru, da je bilo zaviranje encima opazno, so bili testi z namenom natančnejše določitve IC_{50} ponovljeni še pri več različnih koncentracijah zaviralca. Rezultati testiranja so zbrani v Tabela I.

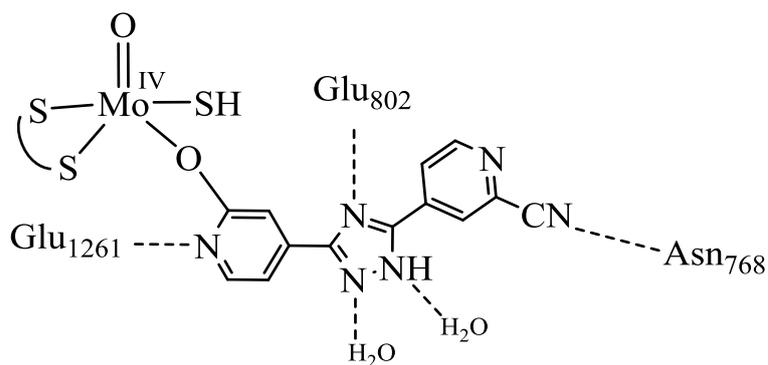
Tabela I: Zaviralna aktivnost sintetiziranih spojin

			
OZNAKA SPOJINE	STRUKTURA SPOJINE		IC_{50} [μM]
	R_1	R_2	
<u>2</u>	H		>150
<u>3</u>	H		>150
<u>4</u>	H		>150
<u>5</u>	H		>150
<u>6</u>	H		>150
<u>7</u>	H		>150
<u>9</u>	-OMe		>150

<u>10</u>	-OMe		>150
<u>11</u>	-OMe		>150
<u>12</u>	-OMe		>150
<u>13</u>	-OMe		>150
<u>14</u>	-OH		>150
<u>15</u>	-OMe		40,61 ± 4.06
<u>16</u>	-OH		>150
<u>17</u>	-OH		>150
<u>18</u>	-OH		>150
<u>19</u>	-OH		>150
<u>20</u>	H		>150
<u>21</u>	H		>150
<u>22</u>	H		>150

Izmed 20 testiranih spojin se je kot aktivna izkazala le spojina **15**. Rezultati so presenetljivi, saj smo kot modelno spojino vzeli topiroksostat, zelo močan zaviralec z vrednostjo IC₅₀ 5,3 nM (57). Ker smo strukturo topiroksostata spreminjali le v manjšem obsegu, smo pričakovali ohranjeno aktivnost, ki bi se spreminjala v odvisnosti od substituentov na obeh aromatskih obročih.

Da bi lažje primerjali sintetizirane spojine s topiroksostatom, je potrebno opredeliti bistvene strukturne elemente, ki botrujejo močnemu delovanju topiroksostata (Slika 20). Najpomembnejši del je 4-piridilni obroč, preko katerega pride do kovalentne povezave z molibdenskimi kofaktorjem encima, zato mora biti nesubstituirano vsaj eno mesto na *orto* položaju ob piridinskem dušikovem atomu. Slednji hkrati tvori vodikovo vez z Glu-1261. Vodikovi vezi tvorita še Glu-802 in N4 atom triazolnega obroča ter nitrilna skupina in Asn-768. Osrednji triazolni obroč je stisnjen med Phe-914 in Phe-1009, zato je pomembno ohranjanje planarne strukture srednjega obroča. V kristalni strukturi kompleksa topiroksostata in ksantinske oksidaze sta vidni še dve molekuli vode, ki sta od N1 in N2 triazolnih atomov na razdalji, ki ustreza vodikovi vezi (42,57).

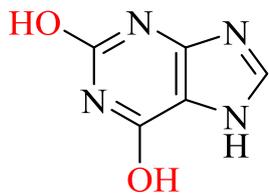
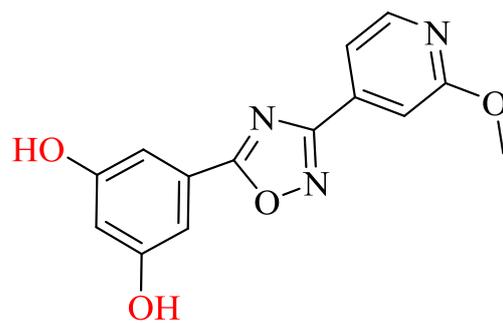
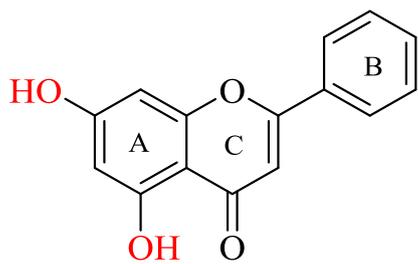
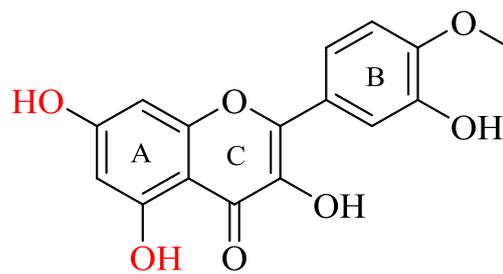


Slika 20: Bistvene interakcije topiroksostata v aktivnem mestu ksantinske oksidaze

Vse sintetizirane spojine v večji meri ustrezajo večini strukturnih elementov, ki so pomembni pri delovanju topiroksostata. Da bi izničili vpliv substituentov na jakost delovanja in s tem preverili le vpliv zamenjave triazolnega z 1,2,4-oksadiazolnim obročem, smo sintetizirali tudi spojino **22**. Ta je razen zamenjave enega dušikovega s kisikovim atomom v centralnem obroču strukturno povsem identična spojina topiroksostatu. Ugotovimo, da zamenjava obročev vodi v popolno izgubo aktivnosti. Tako triazol kot oksadiazol sta planarna aromatska obročja, ki sta sposobna tvorbe π - π interakcij z obema aromatskima aminokislinskima ostankoma v encimu. Iz teh podatkov lahko sklepamo, da je izguba aktivnosti posledica spremenjene tvorbe vodikovih vezi.

Goldberg in sodelavci so v preučevanju različnih izomerov oksadiazola odkrili, da je N4 dušikov atom zelo slab akceptor vodikove vezi (58). Ti resonančni vplivi lahko v primeru sintetiziranih spojin vodijo v izgubo sposobnosti tvorbe vodikove vezi z Glu-802. Hkrati je oksadiazolni kisikov atom akceptor vodikove vezi in ne donor kot je to N1 triazolni dušikov atom. Pri zamenjavi obroča pride tudi do večje spremembe dipolnega momenta in s tem razporeditve elektronske gostote po molekuli. 1,2,4-triazol na obroču izkazuje dipolni moment 3,17 D, 1,2,4-oksadiazol pa le 1,8 D (59,60). Vse opisane spremembe lahko razlagajo slabo afiniteto sintetiziranih spojin do aktivnega mesta ksantinske oksidaze.

Glede na neaktivnost vseh ostalih spojin, še posebej spojine **22**, je presenetljivo, da spojina **15** vseeno izkazuje šibko zaviralno aktivnost. Njeno aktivnost težko razložimo s primerjavo s topiroksostatom, lahko pa njeno strukturo primerjamo z nekaterimi flavonoidi. Le-ti so zaradi svoje edinstvene antioksidativne narave že dolgo predmet raziskovanja. Nekatere izmed spojin v skupini flavonoidov izkazujejo tudi močno zaviralno aktivnost na ksantinsko oksidazo, ki izvira iz njihove delne podobnosti s ksantinom. Kvercetin, ki spada v to skupino, je bil uporabljen tudi kot pozitivna kontrola pri biokemijskem vrednotenju sintetiziranih spojin. Slika 21 prikazuje strukturno podobnost ksantina, spojine **15** in krizina, enega izmed flavonov – podskupine flavonoidov – ki ksantinsko oksidazo zavira z $IC_{50} = 5,02 \mu M$. Če z obroča A na krizinu odstranimo obe hidroksilni skupini, dobimo flavon, ki je v smislu zaviranja ksantinske oksidaze povsem neaktivna spojina. To dokazuje, da sta ti hidroksilni skupini bistveni za delovanje. Substitucija na obroču B je glede aktivnosti težje predvidljiva. Z dodatkom dveh hidroksi in ene metoksi skupine dobimo izoramnetin, ki ima še izboljšano aktivnost ($IC_{50} = 0,40 \mu M$), medtem ko v drugih primerih dodajanje hidroksi skupin vodi v znižanje aktivnosti. Podobni učinki se kažejo tudi v našem primeru, saj je spojina **15** aktivna, spojini **7** in **16** pa ne. Da bi teorijo glede podobnosti s flavonoidi potrdili, bi potrebovali kristalno strukturo kompleksa spojine **15** in ksantinske oksidaze, kar bi lahko bil predmet nadaljnjih raziskav (61,62).

A**B****C****D**

Slika 21: A: Ksantin v enolni tautomerni obliki, B: Spojina **15**, C: Kriazin, D: Izoramnetin

6 ZAKLJUČEK

V sklopu magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali 20 novih potencialnih zaviralcev ksantinske oksidaze. Zasnovali smo jih na podlagi strukture znanega in močnega zaviralca topiroksostata. Z zamenjavo skeleta smo dobili piridil-1,2,4-oksadiazolni osnovni skelet, na katerega smo pripenjali različne substituentne. Uporabili smo že dobro uveljavljene sintezne postopke, zato so sinteze v vseh korakih potekle po pričakovanjih do produktov visoke čistosti.

Vse sintetizirane spojine smo posredovali na *in vitro* testiranje aktivnosti z govejo ksantinsko oksidazo. Razen spojine **15** so se vse spojine izkazale kot neaktivne. Tako smo ugotovili, da zamenjava triazolnega obroča z 1,2,4-oksadiazolnim obročem v topiroksostatu vodi v izgubo zaviralne aktivnosti. Razlogi za ta pojav se najverjetneje skrivajo v izgubi sposobnosti tvorbe vodikovih vezi in spremenjeni elektronski gostoti na centralnem obroču.

Razloge za šibko delovanje spojine **15** smo našli drugje, in sicer v podobnosti strukture z določenimi flavonoidi, ki so v preteklosti že bili predmet raziskovanja na področju zaviranja ksantinske oksidaze. Da bi lahko to teorijo potrdili, bi potrebovali kristalno strukturo kompleksa spojine **15** in encima. Glede na enostavnost sinteze spojin z oksadiazolnim obročem bi lahko iz kristalne strukture pridobljene podatke uporabili za optimizacijo strukture in razvoj močnejših zaviralcev.

7 LITERATURA

1. Rosemeyer H: The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chem Biodivers* 2004; 1: 361–401.
2. Richard H, Denise F: Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 5. izdaja. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011
3. Nelson L D, Cox M M, Lehninger L A: Lehninger's principles of biochemistry, 6. izdaja. New York: W.H. Freeman, 2013
4. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V: Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol* 2016; 213: 8–14.
5. Sautin YY, Johnson RJ: Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 2008; 27: 608–619.
6. Harrison R: Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 774–797.
7. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T: Mammalian xanthine oxidoreductase - Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J* 2008; 275: 3278–3289.
8. Borges F, Fernandes E, Roleira F: Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem* 2002; 9: 195–217.
9. Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF: Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 10723–10728.
10. Choi E-Y, Stockert AL, Leimkühler S et al.: Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *J Inorg Biochem* 2004; 98: 841–848.
11. Ichida K, Amaya Y, Kamatani N, Nishino T, Hosoya T, Sakai O: Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria. *J Clin Invest* 1997; 99: 2391–2397.
12. Desideri G, Castaldo G, Lombardi A et al.: Is it time to revise the normal range of serum uric acid levels? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18: 1295–1306.
13. Gonzalez EB: An update on the pathology and clinical management of gouty arthritis.

- Clin Rheumatol 2012; 31: 13–21.
14. Hainer BL, Matheson E, Travis Wilkes R: Diagnosis, treatment, and prevention of gout. *Am Fam Physician* 2014; 90: 831–836.
 15. Kuo C-F, Grainge MJ, Zhang W, Doherty M: Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11: 649–662.
 16. Richette P, Bardin T: Gout. *Lancet* 2010; 375: 318–328.
 17. Gliozzi M, Malara N, Muscoli S, Mollace V: The treatment of hyperuricemia. *Int J Cardiol* 2016; 213: 23–27.
 18. Baker JF, Ralph Schumacher H: Update on gout and hyperuricemia. *Int J Clin Pract* 2010; 64: 371–377.
 19. Feig DI, Kang DH, Johnson RJ: Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2008; 359: 1811–1821.
 20. Feig DI, Johnson RJ: Hyperuricemia in childhood primary hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 247–252.
 21. Feig DI, Soletsky B, Johnson RJ: Effect of allopurinol on blood pressure of adolescents with newly diagnosed essential hypertension: a randomized trial. *Jama* 2008; 300: 924–932.
 22. Grayson PC, Young Kim S, Lavalley M, Choi HK: Hyperuricemia and incident hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res* 2011; 63: 102–110.
 23. Menè P, Punzo G: Uric acid: bystander or culprit in hypertension and progressive renal disease? *J Hypertens* 2008; 26: 2085–2092.
 24. Johnson RJ, Kang DH, Feig D et al.: Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 2003; 41: 1183–1190.
 25. Choi HK, Ford ES: Prevalence of the Metabolic Syndrome in Individuals with Hyperuricemia. *Am J Med* 2007; 120: 442–447.
 26. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Vizioli L, Muscari A: The relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular diseases: Molecular

- mechanisms and clinical implications. *J Cardiol* 2012; 59: 235–242.
27. Kim SY, Guevara JP, Kim KM, Choi HK, Heitjan DF, Albert DA: Hyperuricemia and coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010; 62: NA-NA.
 28. Ioachimescu AG, Brennan DM, Hoar BM, Hazen SL, Hoogwerf BJ: Serum uric acid is an independent predictor of all-cause mortality in patients at high risk of cardiovascular disease: A Preventive Cardiology Information System (PreCIS) database cohort study. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 623–630.
 29. Berry CE, Hare JM: Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004; 555: 589–606.
 30. Dawson J, Walters M: Uric acid and xanthine oxidase: Future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease? *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62: 633–644.
 31. Richette P, Doherty M, Pascual E et al.: 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. *Ann Rheum Dis* 2016.
 32. Bach MH, Simkin PA: Uricosuric drugs: the once and future therapy for hyperuricemia? *Curr Opin Rheumatol* 2014; 26: 169–175.
 33. Sivera F, Andrés M, Quilis N: Gout: Diagnosis and treatment. *Med Clin (Barc)* 2017; 148: 271–276.
 34. Sattui SE, Gaffo AL: Treatment of hyperuricemia in gout: current therapeutic options, latest developments and clinical implications. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2016; 8: 1–15.
 35. Suresh E, Das P: Recent advances in management of gout. *QJM* 2012; 105: 407–417.
 36. Pacher P: Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 87–114.
 37. Chen C, Lü J-M, Yao Q: Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Med Sci Monit* 2016; 22: 2501–2512.
 38. Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Pai EF: 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: 37–41.
39. Ernst ME, Fravel MA: Febuxostat: A Selective Xanthine-Oxidase / Xanthine-Dehydrogenase Inhibitor for the Management of Hyperuricemia in Adults With Gout. *Clin Ther* 2009; 31: 2503–2518.
 40. 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: 95–103.
 41. Hosoya T, Ogawa Y, Hashimoto H, Ohashi T, Sakamoto R: Comparison of topiroxostat and allopurinol in Japanese hyperuricemic patients with or without gout: A phase 3, multicentre, randomized, double-blind, double-dummy, active-controlled, parallel-group study. *J Clin Pharm Ther* 2016; 41: 290–297.
 42. 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 U S A* 2004; 101: 7931–7936.
 43. Böhm HJ, Flohr A, Stahl M: Scaffold hopping. *Drug Discov Today Technol* 2004; 1: 217–224.
 44. Sun H, Tawa G, Wallqvist A: Classification of scaffold-hopping approaches. *Drug Discov Today* 2012; 17: 310–324.
 45. Sekhon BS, Bimal N: Scaffold hopping in drug discovery. *RGUHS J Pharm Sci* 2012; 2: 10–16.
 46. Koryakova AG, Ivanenkov YA, Ryzhova EA et al.: Novel aryl and heteroaryl substituted N-[3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl]-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamides as selective GSK-3 inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett* 2008; 18: 3661–3666.
 47. Pibiri I, Pace A, Buscemi S, Causin V, Rastrelli F, Saielli G: Oxadiazolyl-pyridines and perfluoroalkyl-carboxylic acids as building blocks for protic ionic liquids: crossing the thin line between ionic and hydrogen bonded materials. *Phys Chem Chem Phys* 2012; 14: 14306.
 48. Outirite M, Lebrini M, Lagrenée M, Bentiss F: New One Step Synthesis of 3 , 5-Disubstituted 1 , 2 , 4-Oxadiazoles. *J Heterocycl Chem* 2007; 44: 1529–1531.

49. Srivastava RM, Pereira MC, Faustino WWM et al.: Synthesis, mechanism of formation, and molecular orbital calculations of arylamidoximes. *Monatshefte für Chemie - Chem Mon* 2009; 140: 1319–1324.
50. Vörös A, Mucsi Z, Baán Z et al.: An experimental and theoretical study of reaction mechanisms between nitriles and hydroxylamine. *Org Biomol Chem* 2014; 12: 8036–8047.
51. Clayden, Jonathan; Greeves, Nick; Warren S: *Organic Chemistry*, 2. Izdaja. New York: Oxford University Press, 2012
52. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A: Recent development in peptide coupling reagents. *J Saudi Chem Soc* 2012; 16: 97–116.
53. Gangloff AR, Litvak J, Shelton EJ, Sperandio D, Wang VR, Rice KD: Synthesis of 3,5-Disubstituted-1,2,4-oxadiazoles Using Tetrabutylammonium Fluoride As a Mild and Efficient Catalyst. *Tetrahedron* 2001; 42: 1441–1443.
54. Kosak TM, Conrad HA, Korich AL, Lord RL: Ether Cleavage Re-Investigated: Elucidating the Mechanism of BBr₃-Facilitated Demethylation of Aryl Methyl Ethers. *European J Org Chem* 2015; 2015: 7460–7467.
55. McOmie JFW, Watts ML, West DE: Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide. *Tetrahedron* 1968; 24: 2289–2292.
56. Sousa C, Silva PJ: BBr₃-assisted cleavage of most ethers does not follow the commonly assumed mechanism. *European J Org Chem* 2013;: 5195–5199.
57. Sato T, Ashizawa N, Matsumoto K et al.: Discovery of 3-(3-cyano-4-pyridyl)-5-(4-pyridyl)-1,2,4-triazole, FYX-051-a xanthine oxidoreductase inhibitor for the treatment of hyperuricemia. *Bioorganic Med Chem Lett* 2009;: 6225–6229.
58. Goldberg K, Groombridge S, Hudson J et al.: Oxadiazole isomers: all bioisosteres are not created equal. *Medchemcomm* 2012; 3: 600.
59. Potts KT: The Chemistry of 1,2,4-Triazoles. *Chem Rev* 1961; 61: 87–127.
60. Boström J, Hogner A, Llinàs A, Wellner E, Plowright AT: Oxadiazoles in medicinal chemistry. *J Med Chem* 2012; 55: 1817–1830.
61. Lin S, Zhang G, Liao Y, Pan J, Gong D: Dietary Flavonoids as Xanthine Oxidase

- Inhibitors: Structure-Affinity and Structure-Activity Relationships. *J Agric Food Chem* 2015; 63: 7784–7794.
62. Nagao A, Seki M, Kobayashi H: Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999; 63: 1787–1790.