

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJAŽ JEROMEL

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJAŽ JEROMEL

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA 3,5-DISUBSTITUIRANIH
DERIVATOV 1,2,4-OKSADIAZOLA KOT ZAVIRALCEV
KSANTINSKE OKSIDAZE**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF 3,5-DISUBSTITUTED 1,2,4-
OXADIAZOLE DERIVATES AS INHIBITORS OF XANTHINE
OXIDASE**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske meritve in ostale analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Inštitutu Jožef Stefan. Biološko vrednotenje končnih spojin je bilo opravljeno na Medicinski fakulteti Univerze v Nišu.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem izr. prof. dr. Žigi Jakopinu za odlično mentorstvo, vložen čas, strokovno pomoč in nasvete pri opravljanju eksperimentalnega dela ter pisanju magistrske naloge.

Posebno zahvalo namenjam tudi svoji družini in dekletu za vso podporo, ki so mi jo izkazali tekom študija.

Izjava

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

Aljaž Jeromel

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Zoran Lavrič, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I. POVZETEK | I |
| II. ABSTRACT | II |
| III. SEZNAM OKRAJŠAV | III |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1 SEČNA KISLINA IN HIPERURIKEMIJA | 1 |
| 1.2 KSANTINSKA OKSIDAZA | 2 |
| 1.3 BOLEZENSKA STANJA, POVEZANA S KSANTINSKO OKSIDAZO | 4 |
| 1.3.1 Sindrom tumorske lize povezan s kemoterapijo | 4 |
| 1.3.2 Ishemija s sledečo reperfuzijo | 5 |
| 1.3.3 Cirkulacijski šok | 5 |
| 1.3.4 Kronično popuščanje srca | 6 |
| 1.3.5 Hipertenzija, hiperholesterolemija, ateroskleroza in diabetes | 6 |
| 1.3.6 Vnetja | 7 |
| 1.4 ZAVIRALCI KSANTINSKE OKSIDAZE | 7 |
| 1.5 ZAMENJAVA SKELETA (SCAFFOLD HOPPING) | 10 |
| 1.5.1 Zamenjava heterocikla | 11 |
| 1.5.2 Odprtje ali zaprtje obročne strukture | 12 |
| 1.5.3 Načrtovanje peptidomimetikov | 12 |
| 1.6 OVREDNOTENJE NOVIH POTENCIALNIH ZAVIRALCEV KSANTINSKE OKSIDAZE | 13 |
| 1.7 OKSADIAZOLI | 15 |
| 2. NAMEN DELA | 17 |
| 3. MATERIALI IN METODE | 19 |
| 4. EKSPERIMENTALNO DELO | 22 |
| 4.1 Sinteza etil 3-cianobenzoata (spojina 1) | 22 |
| 4.2 Sinteza etil 3-(N'-hidroksikarbamimidoil)benzoata (spojina 2) | 23 |
| 4.3 Sinteza etil 3-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzoata (spojina 3) | 24 |
| 4.4 Sinteza etil 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzoata (spojina 4) | 25 |
| 4.5 Sinteza etil 3-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzoata (spojina 5) | 27 |
| 4.6 Sinteza etil 3-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzoata (spojina 6) | 28 |
| 4.7 Sinteza 3-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina 7) | 29 |
| 4.8 Sinteza 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina 8) | 31 |
| 4.9 Sinteza 3-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina 9) | 32 |
| 4.10 Sinteza 3-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina 10) | 33 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.11 Sinteza 3-(5-(3,5-dihidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina 11) | 34 |
| 4.12 Sinteza etil 5-cianopiridin-2-karboksilata (spojina 12) | 35 |
| 4.13 Sinteza etil 5-(N'-hidroksikarbamimidoil)piridin-2-karboksilata (spojina 13) | 36 |
| 4.14 Sinteza etil 5-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 14) | 37 |
| 4.15 Sinteza etil 5-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 15) | 39 |
| 4.16 Sinteza etil 5-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 16) | 40 |
| 4.17 Sinteza etil 5-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 17) | 42 |
| 4.18 Sinteza litijevega 5-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 18) | 43 |
| 4.19 Sinteza litijevega 5-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 19) | 44 |
| 4.20 Sinteza litijevega 5-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 20) | 45 |
| 4.21 Sinteza litijevega 5-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 21) | 46 |
| 4.22 Sinteza 4-(5-(3,5-dihidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilne kisline (spojina 22) | 47 |
| 4.23 Sinteza etil 4-cianopiridin-2-karboksilata (spojina 23) | 49 |
| 4.24 Sinteza etil 4-(N'-hidroksikarbamimidoil)piridin-2-karboksilata (spojina 24) | 50 |
| 4.25 Poskus sinteze etil 4-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 25) | 51 |
| 4.26 Sinteza etil 4-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 26) | 52 |
| 4.27 Sinteza etil 4-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 27) | 53 |
| 4.28 Sinteza litijevega 3-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 28) | 54 |
| 4.29 Sinteza 4-(5-(3,5-dihidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilne kisline (spojina 29) | 55 |
| 5. REZULTATI IN RAZPRAVA | 57 |
| 5.1 SINTEZNI POSTOPKI | 57 |
| 5.1.1 Esterifikacija | 57 |
| 5.1.2 Sinteza amidoksima | 59 |
| 5.1.3 Sinteza 1,2,4-oksadiazolnega obroča | 60 |

| | |
|------------------------------------------------------------|----|
| 5.1.4 Hidroliza estra..... | 63 |
| 5.1.5 Odstranitev metilnih skupin z BBr ₃ | 65 |
| 5.2 REZULTATI TESTIRANJA INHIBITORNE AKTIVNOSTI..... | 66 |
| 6. SKLEP..... | 69 |
| 7. VIRI IN LITERATURA..... | 71 |

KAZALO SLIK

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1 Strukturni model ene podenote XDH in XO..... | 3 |
| Slika 2 Shematski prikaz delovanja XDH in XO | 3 |
| Slika 3 Strukturni formuli alopurinola in oksipurinola | 8 |
| Slika 4 Strukturna formula febeksostata | 8 |
| Slika 5 Interakcije febeksostata v vezavnem mestu | 9 |
| Slika 6 Strukturni formuli topioksostata in Y-700..... | 10 |
| Slika 7 Rimonabant in strukturni derivati tiazola, pirola in pirazina..... | 11 |
| Slika 8 Zamenjava fenilnega obroča s spirociklopropilpiperidinom..... | 11 |
| Slika 9 Odprtje obročev na osnovni strukturi morfina in tramadol..... | 12 |
| Slika 10 Načrtovanje peptidomimetika | 12 |
| Slika 11 Derivati imidazola kot potencialni zaviralci XO..... | 13 |
| Slika 12 Derivati 1,3-tiazola kot potencialni zaviralci XO..... | 14 |
| Slika 13 Derivati pirimidona kot potencialni zaviralci XO..... | 14 |
| Slika 14 Izomerne oblike oksadiazolov..... | 15 |
| Slika 15 Zdravilne učinkovine z vsebujočim oksadiazolnim obročem | 16 |
| Slika 16 Načrt sinteze spojin na podlagi febeksostata in oksadiazolnega analoga resveratrola | 18 |
| Slika 17 Sinteza kislinskega klorida z uporabo SOCl ₂ | 57 |
| Slika 18 Nastanek estra iz kislinskega klorida | 58 |
| Slika 19 Shema nastanka amidoksima | 59 |
| Slika 20 Potencialni neželeni produkt pri stranski reakciji hidroksilamina z estrom..... | 60 |
| Slika 21 Sinteza 1,2,4-oksadiazola z uporabo TBAF kot katalizatorja | 62 |
| Slika 22 Potek sinteze 1,2,4-oksadiazolov z uporabo mikrovalov in KF-Al ₂ O ₃ | 62 |
| Slika 23 Potek sinteze 1,2,4-oksadiazolov z uporabo mikrovalov in očetne kisline..... | 63 |
| Slika 24 Alkalna hidroliza estra | 64 |
| Slika 25 Potek reakcije demetiliranja z uporabo BBr ₃ | 66 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|-----------------------------------------------------|----|
| Preglednica I Rezultati biološkega testiranja | 66 |
|-----------------------------------------------------|----|

I. POVZETEK

Ksantinska oksidaza je flavoproteinski encim, ki ima glavno vlogo v metabolizmu purinov. Nahaja se v različnih organih, in sicer predvsem v jetrih, prebavilih, pljučih, ledvicah, srcu in možganih ter tudi v plazmi. Encim katalizira oksidacijo hipoksantina v ksantin in nadalje ksantina v sečno kislino, ki je končni produkt metabolizma purinov. Preveliko nastajanje ali nasičenje poti izločanja vodi v povišano koncentracijo sečne kisline (hiperurikemija), ki je lahko vzrok za različna bolezenska stanja. Poleg tega pri reakcijah ksantinske oksidaze nastajajo tudi reaktivne kisikove zvrsti, ki imajo pomembno vlogo pri mnogih patoloških procesih. Zaradi majhnega števila registriranih zaviralcev ksantinske oksidaze, ki imajo hkrati še številne neželene stranske učinke, in zaradi vpliva encima na širok spekter patofiziologije, raziskovalci veliko pozornosti namenjajo iskanju novih, učinkovitejših in bolj varnih zdravilnih učinkovin.

V magistrskem delu smo načrtovali in sintetizirali različne 3,5-disubstituirane derivate 1,2,4-oksadiazola kot potencialne zaviralce ksantinske oksidaze in ovrednotili njihovo inhibitorno aktivnost. Kot spojino vodnico smo izbrali zaviralec febuksostat, ki smo mu zamenjali centralni obroč z bioizosterno zamenjavo tiazola z 1,2,4-oksadiazolom. Centralni obroč pa smo nato substituirali z različnimi arilnimi in heteroarilnimi skupinami.

Uspešno smo sintetizirali in karakterizirali enaindvajset različnih spojin, izmed katerih sta **10** in **22** pokazali šibko inhibitorno delovanje. Sklepamo lahko, da sta v naši seriji spojin za inhibitorno aktivnost poleg ustrezne prostorske razporeditve potrebni prosta karboksilna in dodatna elektron-akceptorska skupina. Aktivni spojini bi lahko nadalje optimizirali še z dodatkom lipofilne verige, ki bi tvorila dodatne hidrofobne interakcije v vezavnem mestu. Večina spojin ni bila aktivna, zato bi bilo v nadaljnjih raziskavah vredno razmisliti tako o drugačnem vzorcu substitucije (hetero)aromatskih obročev na mestih 3 in 5 centralnega 1,2,4-oksadiazolnega obroča kot mogoče tudi o bioizosterni zamenjavi tiazola z drugim centralnim obročem.

Ključne besede: ksantinska oksidaza, inhibicija, alopurinol, febuksostat, 1,2,4-oksadiazol

II. ABSTRACT

Xanthine oxidase is a flavoprotein enzyme that plays a major role in the purine metabolism. It is located in various organs, mainly in the liver, gut, lungs, kidneys, heart and brain and also in the plasma. The enzyme catalyzes the oxidation of hypoxanthine to produce xanthine and further catalyzes the oxidation of xanthine to produce uric acid, which is the final product of purine metabolism. Excessive uric acid formation or saturation of the elimination pathway leads to elevated uric acid level (hyperuricemia), which may be the underlying cause of various disease conditions. Furthermore, xanthine oxidase reactions generate reactive oxygen species, which play an important role in many pathological processes. Because of the small number of registered xanthine oxidase inhibitors, which simultaneously have many unwanted side effects, and due to the effect of the enzyme on the wide spectrum of pathophysiology, researchers are devoting a lot of attention to finding new, more effective and safer active substances.

In this Master's thesis, various 3,5-disubstituted derivatives of 1,2,4-oxadiazole were designed and synthesized as potential xanthine oxidase inhibitors. New compounds were later evaluated for their inhibitory activity. The design and synthesis were based on the structure of the lead compound – febuxostat. Within the scope of this thesis, the central thiazole ring was replaced with 1,2,4-oxadiazole. The central ring was then substituted with various aryl and heteroaryl groups.

We successfully synthesized and characterized twenty-one different compounds, of which **10** and **22** showed weak inhibitory activity. We can conclude that besides the appropriate spatial arrangement of the molecule, a free carboxyl group and an additional electron acceptor group are required for inhibitory activity in our series of compounds. Both active compounds could be further optimized by addition of a lipophilic chain that would form additional hydrophobic interactions in the binding site. Most of the compounds were inactive, therefore it would be worthwhile to consider both a different substitution pattern of (hetero) aromatic rings at positions 3 and 5 of the central 1,2,4-oxadiazole ring, as well as another central ring as a bioisosteric replacement of thiazole in further studies.

Key words: xanthine oxidase, inhibition, allopurinol, febuxostat, 1,2,4-oxadiazole

III. SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Arg | <i>angl. arginine</i> ; arginin |
| Asn | <i>angl. asparagine</i> ; asparagin |
| ATP | <i>angl. adenosine triphosphate</i> ; adenzin trifosfat |
| BOP | <i>angl. (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate</i> ; benzotriazol-1-il-oksi-tris (dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat |
| CB1 | <i>angl. cannabinoid receptor type 1</i> ; kanabinoidni receptor tipa 1 |
| CB2 | <i>angl. cannabinoid receptor type 2</i> ; kanabinoidni receptor tipa 2 |
| CDI | <i>angl. N,N'-carbonyldiimidazole</i> ; N,N'-karbonildiimidazol |
| d | dublet |
| DCC | <i>angl. N,N'-dicyclohexylcarbodiimide</i> ; N,N'-dicikloheksilkarbodiimid |
| dd | dublet dubleta |
| DIPEA | <i>angl. N,N-diisopropylethylamine</i> ; N,N-diizopropiletilamin |
| DKM | diklorometan |
| DMAP | <i>angl. 4-dimethylaminopyridine</i> ; 4-dimetilaminopiridin |
| DMF | <i>angl. dimethylformamide</i> ; dimetilformamid |
| DMSO-d ₆ | devteriran dimetilsulfoksid |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| EDC | <i>angl. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i> ; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid |
| EMA | <i>angl. European Medicines Agency</i> ; Evropska agencija za zdravila |
| eq | ekvivalent |
| FAD | flavin adenin dinukleotid |
| FDA | <i>angl. Food and Drug Administration</i> ; Uprava ZDA za hrano in zdravila |

| | |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Glu | <i>angl. glutamic acid</i> , glutaminska kislina |
| HIV | virus humane imunske pomanjkljivosti |
| HOBt | <i>angl. hydroxybenzotriazole</i> ; hidroksibenzotriazol |
| HPLC | <i>angl. high performance liquid chromatography</i> ; tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti |
| HR-MS | <i>angl. high resolution mass spectrometry</i> ; masna spektrometrija visoke ločljivosti |
| IC ₅₀ | <i>angl. half maximal inhibitory concentration</i> |
| IL-1 | interlevkin-1 |
| IR | <i>angl. infrared spectroscopy</i> ; infrardeča spektroskopija |
| kDA | kilodalton |
| KOPB | kronična obstruktivna pljučna bolezen |
| LC-MS | <i>angl. liquid chromatography – mass spectrometry</i> ; tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo |
| Leu | <i>angl. leucine</i> ; levcin |
| m | multiplet |
| MF | mobilna faza |
| Mr | relativna molekulska masa |
| MS | <i>angl. mass spectrometry</i> ; masna spektrometrija |
| MSU | <i>angl. monosodium urate</i> ; mononatrijev urat |
| NAD | nikotinamid adenin dinukleotid |
| NMR | <i>angl. nuclear magnetic resonance</i> ; jedrska magnetna resonanca |
| NSAID | <i>angl. nonsteroidal anti-inflammatory drug</i> ; nesteroidni antirevmatik |
| Phe | <i>angl. phenylalanine</i> ; fenilalanin |
| PMDA | <i>angl. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency</i> ; Japonska agencija za farmacevtske in medicinske izdelke |
| q | kvartet |

| | |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Rf | retencijski faktor |
| RIP | <i>angl. relative inhibitory potency</i> ; relativna inhibitorna jakost |
| ROS | <i>angl. reactive oxygen species</i> ; reaktivne kisikove zvrsti |
| s | singlet |
| t | triplet |
| TBAF | <i>angl. tetra-n-butylammonium fluoride</i> ; tetra-n-butilamonijev fluorid |
| THF | tetrahidrofuran |
| Thr | <i>angl. threonine</i> ; treonin |
| TLC | <i>angl. thin-layer chromatography</i> ; tankoplastna kromatografija |
| t _R | retencijski čas |
| URAT1 | <i>angl. urate transporter 1</i> ; uratni transporter 1 |
| Val | <i>angl. valine</i> ; valin |
| XDH | <i>angl. xanthine dehydrogenase</i> ; ksantinska dehidrogenaza |
| XO | <i>angl. xanthine oxidase</i> ; ksantinska oksidaza |
| XOR | <i>angl. xanthine oxidoreductase</i> ; ksantinska oksidoreduktaza |
| δ | kemijski premik |
| λ | valovna dolžina |

1. UVOD

1.1 SEČNA KISLINA IN HIPERURIKEMIJA

Sečna kislina je končni produkt metabolizma purinov v telesu. Purini se najprej metabolizirajo do inozina, nato do hipoksantina, čemur sledi še metabolna pretvorba do ksantina in v zadnji stopnji še do sečne kisline (1, 2). Sečna kislina ima heterociklično strukturo in je pri fiziološkem pH-ju v obliki soli, urata. Ta se iz telesa izloča preko urina in gastrointestinalnega trakta. Preveliko nastajanje in nasičenje poti eliminacije vodi v povišano koncentracijo sečne kisline v telesu, čemur pravimo hiperurikemija, ki je lahko vzrok za različna bolezenska stanja (2).

Stanje hiperurikemije v telesu se pojavi zaradi povečanega nastajanja sečne kisline ali pa njenega zmanjšanega izločanja iz telesa. Dejavniki tveganja za povečano nastajanje so različni, med najpomembnejše sodijo: hrana, bogata s purini (rdeče meso, školjke, s fruktozo sladkane pijače), prekomerno uživanje alkohola, debelost ter mieloproliferativne in limfoproliferativne motnje. Tudi vzroki za zmanjšano izločanje iz telesa so številni in zelo raznoliki, najpomembnejši med njimi so: metabolni sindrom, diabetes, kronična ledvična bolezen in zdravilne učinkovine, ki povečujejo raven urata v krvi (diuretiki, ciklosporin in nizki odmerki acetilsalicilne kisline) (2).

Hiperurikemija je definirana kot vrednost sečne kisline oz. urata v plazmi, ki presega 6,8 mg/dL. Pri tej koncentraciji se namreč poveča možnost reakcije deprotoniranega urata z natrijevimi ioni in s tem začetek obarjanja kristalov mononatrijevega urata (MSU), ki imajo ključno vlogo pri nastanku protina. Pri tej bolezni pride do nabiranja kristalov MSU v tkivih in sklepih, kar aktivira tkivne makrofage, ki začnejo izločati vnetne citokine, kot je na primer interleukin 1 (IL-1). Sledi aktivacija sistema komplementa, vdor nevtrofilcev in sproščanje derivatov arahidonske kisline, posledica vsega naštetega pa je vnetna reakcija v tkivu ali sklepu, kar privede do boleče otekline. Posledica hiperurikemije je lahko tudi tvorba kristalov v ledvicah, čemur sledi nastanek ledvičnih kamnov in v najhujšem primeru tudi akutna ledvična odpoved (2, 3).

Pri zdravljenju akutnega napada protina je potrebno najprej zmanjšati vnetje, kar lahko dosežemo z nesteroidnimi antirevmatiki (NSAID), ki so prva izbira zdravljenja, ali pa s kortikosteroidi oziroma celo z alkaloidom kolhicinom, ki zmanjšuje aktivacijo vnetnih in

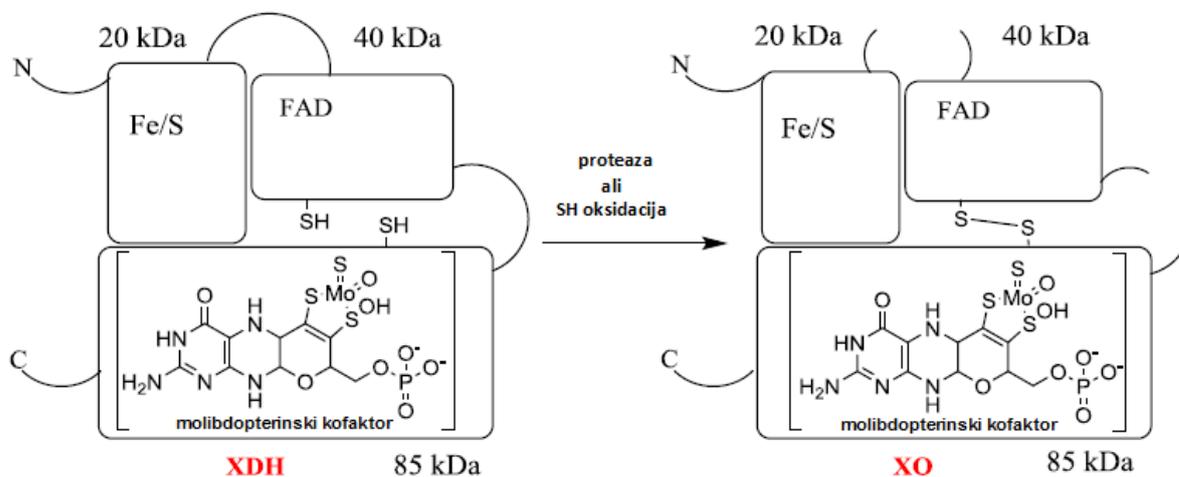
povečuje koncentracijo protivnetnih mediatorjev (4, 5). Za dolgoročno uravnavanje nivoja sečne kisline v plazmi se priporoča izguba telesne teže, zmanjšan vnos fruktoze, rdečega mesa, školjk in prenehanje uživanja alkohola. Priporočeno je uživanje zelenjave in manj mastnih mlečnih izdelkov. Če nefarmakološki ukrepi ne zadostujejo, lahko hiperurikemijo zdravimo z različnimi zdravilnimi učinkovinami. Daleč največ se uporabljata alopurinol in febuksostat, zaviralca ksantinske oksidaze, encima, ki katalizira nastanek sečne kisline kot končnega produkta metabolizma purinov. Poleg kolhicina se lahko uporabljata še probenecid in peglotikaza (4). Probenecid je zdravilna učinkovina, ki poveča urinarno izločanje sečne kisline prek inhibicije proksimalnega tubularnega prenašalca URAT1 v ledvicah (blokira ponovni privzem sečne kisline nazaj v kri). Učinkovina zato ni primerna za bolnike z ledvično insuficienco (6, 7). Peglotikaza spada v skupino urikaz in katalizira oksidacijo sečne kisline v allantoin, ki je bolj topen kot urat in se lažje izloča prek ledvic. Zdravilo se uporablja v obliki intravenske infuzije in je namenjeno bolnikom, pri katerih so možnosti zdravljenja z drugimi zdravili omejene (7, 8).

1.2 KSANTINSKA OKSIDAZA

Ksantinska oksidaza (XO) je flavoproteinski encim, ki ima glavno vlogo v metabolizmu purinov. Za svoje delovanje uporablja redoks kofaktor flavin adenin dinukleotid (FAD), ki služi kot prenašalec elektronov. Je ena izmed dveh oblik ksantinske oksidoreduktaze (XOR), pri čemer drugo predstavlja ksantinska dehidrogenaza (XDH). Gre za dve obliki istega encima, ki se razlikujeta v tem, da ksantinska oksidaza lahko reducira le kisik, ksantinska dehidrogenaza pa ima zaradi svoje oblike večjo afiniteto do kofaktorja NAD^+ (9). Razlika v njunem delovanju je posledica razlike v njunih strukturah. V sesalčjih celicah se encim sintetizira v obliki XDH, ki se nato v XO lahko pretvori s proteolizo ali pa z oksidacijo sulfhidrilnih ostankov do disulfidnih vezi. Na ta način se spremeni struktura proteina in prekrije skupino FAD, zato je sterično onemogočen prenos elektrona do večje molekule NAD^+ (10, 11).

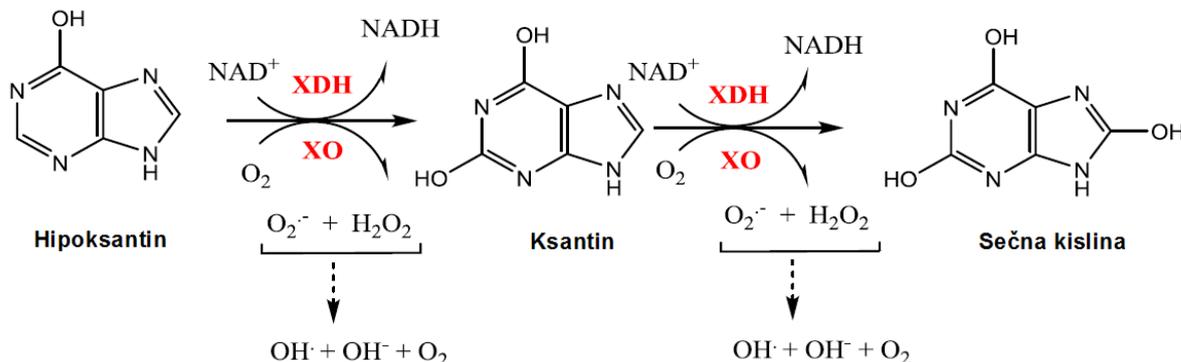
Ksantinska oksidoreduktaza je homodimer, sestavljena iz dveh 145 kDa velikih podenot. Vsaka podenota je sestavljena iz treh delov, in sicer iz (i) C-terminalnega dela, v velikosti 85 kDa, ki vsebuje molibdopterinski kofaktor, ki je tudi aktivno mesto encima; (ii) N-terminalnega 20 kDa velikega dela, v kateri se nahaja feredoksinski kompleks Fe_2S_2 ; in (iii) osrednjega dela v velikosti 40 kDa, ki vsebuje FAD (Slika 1). XOR se nahaja v

različnih organih, predvsem v jetrih, prebavilih, pljučih, ledvicah, srcu in možganih ter tudi v plazmi (12).



Slika 1 Strukturni model ene podenote XDH in XO. Prirejeno po Šmelcerović et al. (12)

Tako ksantinska dehidrogenaza kot ksantinska oksidaza katalizirata oksidacijo hipoksantina v ksantin in nadalje ksantina v sečno kislino. Ob tem v reakcijah ksantinske oksidaze nastajata tudi vodikov peroksid (H_2O_2) in superoksidni anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Slika 2) (12).



Slika 2 Shematski prikaz delovanja XDH in XO. Prirejeno po Šmelcerović et al. (12)

Obe obliki encima sodelujeta v vrsti biokemičnih procesov, kot npr. v hidroksilaciji purinov, pterinov, aromatskih heterociklov, alifatskih in aromatskih aldehydov, in tako pripomoreta tako k detoksifikaciji kot tudi aktivaciji različnih endogenih snovi (10). Encima sta pomembna tudi pri oksidaciji raznih zdravilnih učinkovin, predvsem tistih, ki po strukturi sodijo med derivate purina (13).

1.3 BOLEZENSKA STANJA, POVEZANA S KSANTINSKO OKSIDAZO

Pri poškodbi jeter in prebavnega trakta se poviša koncentracija XO v krvi, zato se uporablja kot biomarker pri ugotavljanju poškodb. Nivo encima v krvi lahko, poleg poškodb jeter in prebavil, kaže tudi na druge patofiziološke procese, kot so jetrna ishemija, hemoragični šok, anemija srpastih celic in ateroskleroza. V krvnem obtoku ima XO v teh procesih vlogo mediatorja, ki lahko povzroči poškodbe v drugih organih, saj se veže na glikozaminoglikane na površini endotelijskih celic, kjer začne sproščati oksidante, kar privede do endotelijske disfunkcije in poškodbe oddaljenih organov (10).

Poleg endotelijske disfunkcije je preveliko nastajanje sečne kisline skupaj z nastajajočimi reaktivnimi snovmi povezano tudi s kardiovaskularnimi obolenji, z akutnim artritidom in z ledvičnimi boleznimi. Urat sproža intrinzično koagulacijo in lahko stimulira nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v nevtrofilcih (9). Nastali superoksidni anion lahko hitro reagira z vnetnim mediatorjem dušikovim oksidom in tvori citotoksični oksidant peroksinitrit, ki lahko poškoduje beljakovine, lipide in DNA v neposredni bližini encima XO ter tako povzroča celične poškodbe in iniciira razna patofiziološka stanja. Superoksidni anion in ostale ROS imajo pomembno vlogo pri mnogih patoloških procesih, kot npr. pri vnetju, aterosklerozi, kancerogenezi in staranju (10, 14). Po drugi strani pa ima ksantinska oksidaza, poleg vloge pri nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti, tudi antioksidativno delovanje. Sečna kislina, ki nastaja v reakcijah XO, je namreč glavni plazemski antioksidant, ki se lahko oksidira do relativno stabilnih oksidacijskih produktov, in tako učinkovito ščiti biološke tarče pred oksidacijo, povzročeno s hidrosilnimi radikali, hipokloriti, peroksinitriti in singletnim kisikom (15, 16).

Alopurinol in njegov metabolit oksipurinol, sta v študijah pokazala pozitiven učinek pri zdravljenju kardiovaskularnih obolenj in različnih vnetij, zato v zadnjih desetletjih strokovnjaki vedno več pozornosti namenjajo raziskovanju ksantinske oksidaze in vlogi tega encima pri drugih bolezenskih stanjih (9, 10).

1.3.1 Sindrom tumorske lize povezan s kemoterapijo

Zaradi hitrega razpada tumorskih celic po kemoterapiji pride v telesu do metabolnih sprememb. Poviša se koncentracija purinov, zato nastaja vse več sečne kisline, kar se

odrazi v težki klinični sliki (slabost, bruhanje, oslabelelost, krči), ki jo omilimo z zaviralci ksantinske oksidaze (17). Potrebni so razmeroma veliki odmerki, ki pa imajo v primeru alopurinola veliko pogostost neželenih učinkov – vročina, izpuščaji, levkocitoza, eozinofilija, vaskulitis, aseptični meningitis, nefritis in ledvična odpoved, odpoved jeter ter smrt (10, 18).

1.3.2 Ishemija s sledečo reperfuzijo

Reaktivne kisikove zvrsti, ki nastajajo pri reakcijah kataliziranih s strani ksantinske oksidaze, pripomorejo k ishemičnim poškodbam organov. Pri ishemiji pride zaradi povišane koncentracije intracelularnega kalcija do aktivacije proteaz, ki XDH pretvorijo v XO, in hkrati do povišane vrednosti hipoksantina, ki nastaja iz porabljenega ATP-ja. Pri sledeči reperfuziji XO hipoksantin pretvarja v ksantin in nadalje v sečno kislino, pri tem pa zaradi porabljanja kisika nastajajo tudi ROS (10, 19). Po številnih študijah, v katerih so raziskovali prisotnost XO v ishemičnem srcu in vpliv alopurinola, je zdaj dokazano, da sta po ishemiji v srcu prisotna tako XO kot tudi povečana koncentracija substrata (20, 21). Navkljub velikemu številu študij, ki govorijo v prid zdravljenju z alopurinolom, so nekateri raziskovalci ugotovili, da le-ta nima učinka na potek bolezni oz. jo lahko celo poslabša (22, 23). Pozitiven vpliv alopurinola ni zanesljivo dokazan, zato bi bile za dokončno ugotovitev potrebne nove in bolj obsežne randomizirane študije. Je pa alopurinol v študijskih modelih uspešno zmanjšal ishemične poškodbe možganov in deloval zaščitno tudi pri ishemiji in sledeči reperfuziji prebavil (24, 25). Pri ishemični poškodbi jeter so raziskovalci dokazali tako povečano vrednost XO kot tudi povečano pretvorbo XDH v XO (26). V večini študij so dokazali zaščitno delovanje alopurinola, zmanjšanje izločanja jetrnih encimov in izboljšanje ledvične funkcije pri ishemičnih poškodbah ledvic (27, 28). Študije kažejo, da naj bi alopurinol imel zaščitno vlogo tudi pri ishemijsko – reperfuzijski poškodbi pljuč, ne pa pri poškodbah skeletnih mišic (29, 30).

1.3.3 Cirkulacijski šok

Raziskovalci so na različnih modelih hudega hemoragičnega šoka dokazali, da alopurinol ščiti pred poškodbami organov in zmanjšuje smrtnost (31). V študijah na različnih modelih je uspešno preprečil poškodbe jeter, zmanjšal raven DNA poškodb in bakterijsko

translokacijo ter ščitil pred vaskularnimi obolenji in napredujočo hemodinamično dekompenzacijo (31-35). Pri drugih oblikah šoka alopurinol ni izrazil teh pozitivnih učinkov. V kliničnih študijah zaenkrat še niso uspeli dokazati nobenega izmed zgoraj navedenih pozitivnih učinkov alopurinola (10).

1.3.4 Kronično popuščanje srca

Pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem so odkrili povišane vrednosti sečne kisline in tudi povečano aktivnost XO v miokardu (36). V *in vitro* študijah so dokazali, da obstaja povezava med povečanjem ravni XO v miokardu in napredovanim razvojem srčnega popuščanja. Posledica povečanja ravni XO je povečanje oksidativnega stresa v srcu (37). Alopurinol je v študijah zmanjšal porabo kisika v miokardu, povečal srčno kontraktilnost in mehansko učinkovitost ter zmanjšal kontraktilnost srčne mišice med srčnim napadom in nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (38, 39, 40). Ker je alopurinol hkrati zelo dober antioksidant, ni povsem jasno, v kolikšni meri je z inhibicijo ksantinske oksidaze pripomogel k zgornjim rezultatom. Vseeno pa so zaviralci XO zanimiva možnost pri zdravljenju srčnega popuščanja, saj je povišana raven sečne kisline v telesu dokazano povečala umrljivost pri srčnem popuščanju, hkrati pa njihov mehanizem delovanja ni enak kot pri ostalih zdravilih, ki se uporabljajo pri srčnem popuščanju, in bi tako učinek samo potencirali (10, 41).

1.3.5 Hipertenzija, hiperholesterolemija, ateroskleroza in diabetes

Serumska vrednost sečne kisline je pomemben dejavnik tveganja za kardiovaskularne in ledvične bolezni, še posebej pri ljudeh s srčnim popuščanjem, diabetesom in hipertenzijo (42). Bolniki s hiperurikemijo imajo večjo možnost za nastanek endotelijske disfunkcije, ki je začetna značilnost ateroskleroze, diabetesa, hipertenzije in srčnega popuščanja in lahko vodi lahko v kardiovaskularne zaplete ter nastanek mikrotrombov. K nastanku endotelijske disfunkcije pripomore tudi lokalni nastanek reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti v okolici žilnega endotelija (43). Dokazi kažejo na to, da bi z inhibicijo XO lahko zmanjšali nivo ROS in s tem ugodno vplivali na potek naštetih bolezni (20). Zaradi previsoke aktivnosti XO pride do nastanka ROS, kar vodi do strižnega stresa in poškodbe endotelija s posledično aterosklerozo (44). Tudi na modelu hiperholesterolemije na zajcih so z

inhibicijo XO z oksipurinolom dokazali zmanjšanje nastanka prostih radikalov (45). Podobno je raven aktivnosti XO povišana tudi pri diabetesu tipa 1 in tipa 2, zato je zdravljenje z alopurinolom zmanjšalo oksidativni stres in izboljšalo endotelijsko funkcijo (46, 47). Raziskovalci so v tkivih in srcu hipertenzivnih podgan našli povečano aktivnost XO, ki so jo po terapiji z oksipurinolom uspešno zmanjšali (48, 49). Študije izboljšanja žilne funkcije po zdravljenju z alopurinolom so dale nejasne rezultate, zato obstaja verjetnost, da XO pri patogenezi žilnih poškodb pri hipertenzivnih bolnikih nima pomembne vloge (10, 47, 50).

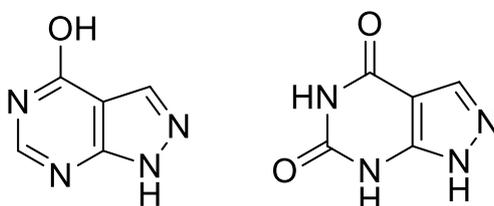
1.3.6 Vnetja

Pri pacientih z revmatoidnim artritisom so izmerili povišano plazemsko koncentracijo XO (51). Alopurinol neposredno zmanjšuje simptome artritisa z inhibicijo XO in posledično zmanjšanim nastankom kristalov ter tudi zaradi svojega antioksidativnega delovanja (52). Inhibicija XO se je izkazala kot dober način zdravljenja še pri nekaterih drugih vnetnih boleznih: pljučnica, akutni respiratorni sindrom, KOPB, nefritis, pankreatitis, peritonitis in peritonealne adhezije, uveitis in dermatitis (53-60).

1.4 ZAVIRALCI KSANTINSKE OKSIDAZE

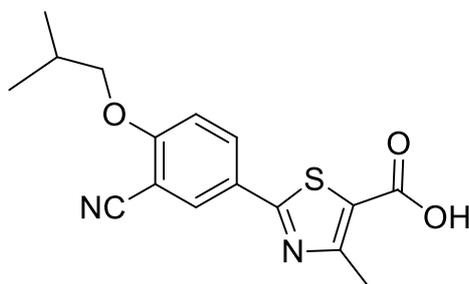
Alopurinol (1,5-dihidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-on) je najpogosteje predpisana zdravilna učinkovina iz skupine zaviralcev ksantinske oksidaze, ki se uporablja predvsem v terapiji zdravljenja protina. Odkrili so ga v okviru projekta iskanja novih protitumornih učinkovin, kjer je potencialna protitumorna učinkovina 6-merkaptopurin zaradi metabolizma, ki ga katalizira ksantinska oksidaza, izgubila učinkovitost. Inhibicija ksantinske oksidaze bi tako neposredno inhibirala metabolizem 6-merkaptopurina in ojačala protitumorno delovanje. Na podlagi poskusov so znanstveniki odkrili analog hipoksantina, alopurinol, ki je učinkovito zaviral delovanje ksantinske oksidaze. Leta 1966 je ameriška FDA alopurinolu odobrila dovoljenje za promet in je še danes najbolj uporabljano zdravilo za zdravljenje hiperurikemije (10, 61). V telesu se preko ksantinske oksidaze hitro oksidira do svojega aktivnega metabolita, oksipurinola (1,2-dihidropirazolo[4,3-*e*]pirimidin-4,6-dion), ki prav tako inhibira XO (Slika 3). Pri nizkih koncentracijah je alopurinol substrat in kompetitivni zaviralec encima, pri višjih

koncentracijah pa nekompetitivni zaviralec, tako kot oksipurinol. Mehanizem delovanja je preprost: alopurinol oz. oksipurinol nadomestita hidroksilni ligand na ionu molibdena in s tem preprečita oksidacijo hipoksantina do ksantina in le-tega do sečne kisline. Kljub svoji veliki učinkovitosti pri zdravljenju hiperurikemije je alopurinol razmeroma šibak zaviralec XO, zato ne čudi težnja raziskovalcev po odkrivanju novih, učinkovitejših spojin. Zaradi uspeha alopurinola so se začetne raziskave usmerjale k iskanju novih sinteznih derivatov purina in pirimidina, a so kmalu ugotovili, da so neželeni stranski učinki alopurinola, predvsem izpuščaji, neposredno povezani z njegovim purinskim skeletom. Encim fosforibozil transferaza namreč metabolizira purinske derivate do ustreznih nukleotidov, ki lahko v telesu povzročajo hude izpuščaje. Razvoj novih zaviralcev XO se je zato v kasnejših letih usmeril v spojine, ki se strukturno razlikujejo od purinov (9, 10).



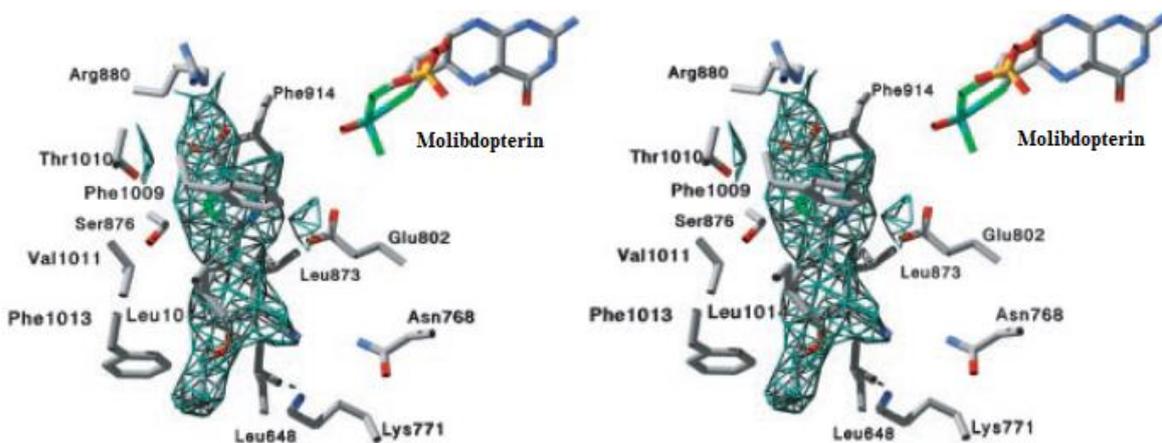
Slika 3 Strukturni formuli alopurinola (levo) in njegovega aktivnega metabolita oksipurinola (desno)

Leta 2009 je ameriška FDA japonskemu podjetju Takeda izdala dovoljenje za promet za zdravilo Uloric, z zdravilno učinkovino febuksostat (2-(3-ciano-4-[2-metilpropoksil]fenil)-4-metiltiazol-5-karboksilna kislina) (Slika 4). Gre za nepurinski zaviralec XO, derivat tiazola, ki se tesno prilega na aktivno mesto encima in tako preprečuje vezavo hipoksantina oz. ksantina. Pri tem ne pride do interakcije z molibdopterinskim kompleksom, zato je njegov mehanizem delovanja drugačen kot pri alopurinolu (9).



Slika 4 Strukturna formula febuksostata

Leta 2003 so raziskovalci preučili interakcije febeksostata z XO iz govejega mleka in ugotovili, da se v vezavnem mestu tvori močan kompleks (Slika 5). Najpomembnejše so interakcije med karboksilno skupino febeksostata in gvanidinsko skupino na Arg880, amidnim delom Thr1010 ter njegovo stransko hidroksilno skupino. Prav tako pride do tvorbe vodikovih vezi med amidno skupino Asn768 in nitrilno skupino febeksostata ter med stranskim karboksilnim delom ostanka Glu802 in tiazolnim dušikom febeksostata. K stabilizaciji kompleksa pripomorejo tudi π - π interakcije med tiazolom in aromatskim obročem Phe914 in Phe1009. Pomembne so še hidrofobne interakcije med benzonitrilom in Leu873 in Leu1014 ter med 4-izobutoksi delom febeksostata in ostanki aminokislin Leu648, Leu1013, Phe649 in Val1011 (12, 62). Leu648 in Phe649 sta prisotna zgolj pri goveji XO, v človeški pa sta na njunem položaju izolevcin in cistein. Kljub temu pa hidrofobne interakcije ostajajo enake, zato lahko mehanizem vezave prenesemo tudi na človeka (62).

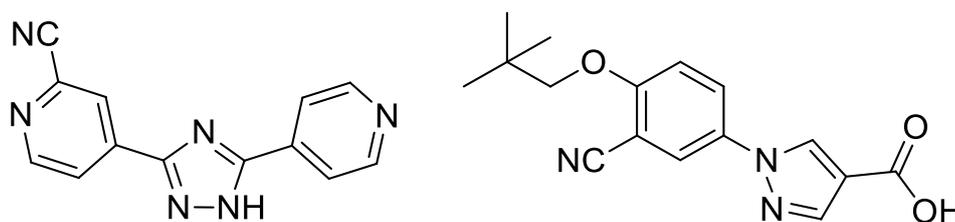


Slika 5 Interakcije febeksostata v vezavnem mestu. Prirejeno po Okamoto et al. (62)

Japonska agencija za zdravila PMDA je leta 2013 zdravilni učinkovini topiroksostat (3-(3-ciano-4-piridil)-5-(4-piridil)-1,2,4-triazol) odobrila dovoljenje za promet z zdravili na Japonskem. Podobno kot febeksostat tudi topiroksostat, ki je strukturno derivat triazola, sodi med nepurinske zaviralce XO (Slika 6). Gre za hibridni tip zaviralca, ki se najprej obnaša kot kompetitivni, nato pa kot ireverzibilni zaviralec, saj s ksantinsko oksidazo tvori močan kompleks. Pri svojem delovanju tvori interakcije z aminokislinskimi ostanki encima in se hkrati preko kisika kovalentno veže na molibdenski kompleks (63).

Učinkovina, za katero se pričakuje, da bo v naslednjih letih postala nova alternativa za zdravljenje hiperurikemije in je trenutno še v kliničnih študijah, je Y-700 ([1-[3-ciano-4-

(2,2-dimetilpropoksi)fenil]-1H-pirazol-4-karboksilna kislina]) (Slika 6). Gre za spojino, ki je v strukturnem smislu derivat pirazola in se, tako kot febuksostat, tesno prilega v aktivno mesto encima in preprečuje dostop substrata (64). Febuksostat, topiroksostat in tudi Y-700 so v študijah na podganah in ljudeh pokazali visoko biološko razpoložljivost, ugodnejši toksikološki profil ter močnejše in dalj časa trajajoče hiperurikemično delovanje kot alopurinol. Te učinkovine se v večji meri izločajo s fecesom, zato prilagajanje doze za ledvične bolnike ni potrebno (10, 65, 66). Pri tistih s hudo ledvično disfunkcijo je uporaba alopurinola namreč odsvetovana, saj se oksipurinol skoraj v celoti izloča preko ledvic (67).



Slika 6 Strukturni formuli topiroksostata (levo) in Y-700 (desno)

1.5 ZAMENJAVA SKELETA (SCAFFOLD HOPPING)

Zamenjava skeleta oz. t.i. skeletni preskok (ang. scaffold hopping) je ena izmed strategij za odkrivanje novih zdravilnih učinkovin. Metodo skeletnega preskoka je leta 1999 Schneider s sodelavci predstavil kot tehniko iskanja spojin, ki imajo podoben biološki učinek, a različno centralno ogrodje (skelet). Bistvo metode je zamenjava osrednjega skeleta znane aktivne molekule, pri čemer kot rezultat dobimo potencialno biološko aktivno spojino z drugačno kemijsko strukturo. Strategija se uporablja tako pri začetnem načrtovanju spojin, kot tudi pri njihovi kasnejši optimizaciji (68).

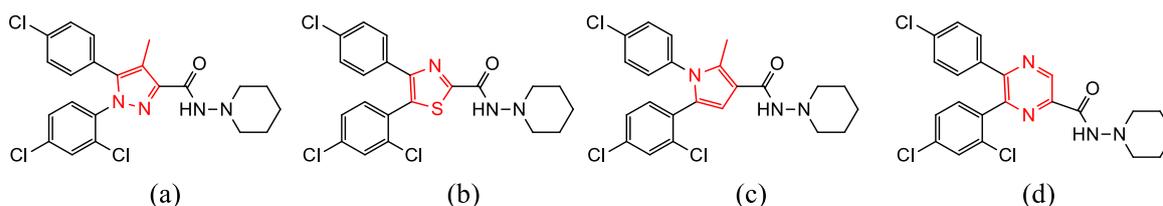
V splošnem obstajajo štiri različne kategorije skeletnega preskoka:

- zamenjava heterocikla
- odprtje oz. zaprtje obročne strukture
- načrtovanje peptidomimetikov
- preskok na osnovi topoloških značilnosti (redki primeri uspešnega preskoka)

1.5.1 Zamenjava heterocikla

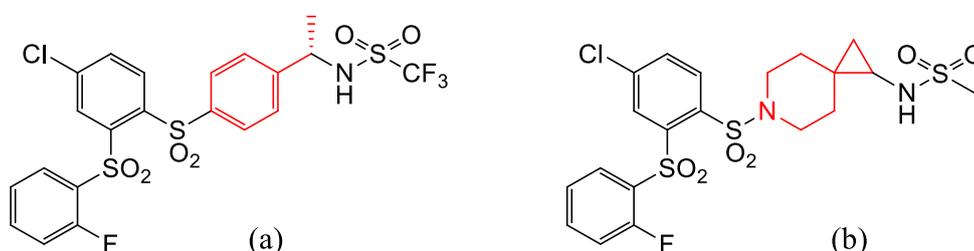
Heterocikel, ki ima vlogo osrednjega ogrodja spojine, s svojo prostorsko usmeritvijo omogoča interakcije med ligandom in tarčno molekulo. Zamenjava skeleta je uspešna, če uspemo ohraniti to usmeritev in hkrati obdržati biološko aktivnost. To lahko tudi izboljšamo, če novi skelet omogoča dodatne interakcije in še izboljša vezavo na tarčo.

Rimonabant je bil prvi odobreni selektivni antagonist kanabinoidnega receptorja CB1 za uporabo na ljudeh. Zaradi varnostnih zadržkov ta zdravilna učinkovina nikoli ni dobila dovoljenja za promet s strani ameriške FDA, zato so raziskovalci s pomočjo strategije skeletnega preskoka poskušali odkriti nove selektivne CB1 antagoniste z boljšimi farmakokinetičnimi lastnostmi (68). Metilpirazolno ogrodje so nadomestili z različnimi pet- in šestčlenskimi obroči (tiazoli, pirolu in pirazini) (69, 70, 71). S tem so uspeli zadržati biološko aktivnost, rezultati varnosti pri človeku pa še niso znani (Slika 7).



Slika 7 Rimonabant (a) in strukturni derivati tiazola (b), pirola (c) in pirazina (d). Prirejeno po Sun et al. (68)

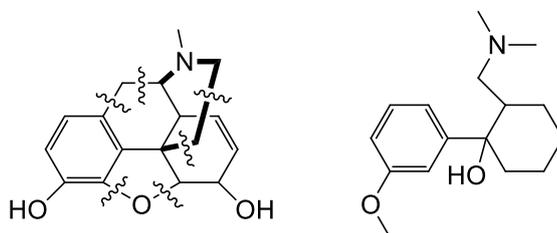
Na podoben način so raziskovalci iz Merck-a s pomočjo skeletnega preskoka razvili tudi boljše CB2 selektivne antagoniste (Slika 8). Triarilni bis-sulfonski antagonist CB2 je imel zaradi svojega skeleta še nekatere neželene učinke, ki so jih izničili z bolj hidrofobnim, biarilnim analogom (centralni fenilni obroč so zamenjali s spirociklopropilpiperidinom) (72).



Slika 8 Zamenjava fenilnega obroča (a) s spirociklopropilpiperidinom (b). Prirejeno po Sun et al. (68)

1.5.2 Odprtje ali zaprtje obročne strukture

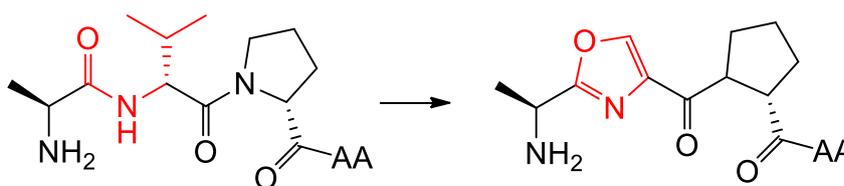
Zaprtje obroča lahko molekulo zaklene v njeno bioaktivno konformacijo in tako zmanjša entropijo pri interakciji s tarčno molekulo. Po drugi strani pa lahko odprtje obroča, če je le-teh v molekuli več, izboljša njene farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti (68). Raziskovalci so leta 1977 na podlagi strukture morfina sintetizirali tramadol. Ta se v primerjavi z morfinom sicer šibkeje veže na opioidne receptorje, a ima tudi manjši potencial za zasvojenost. Z odprtjem treh obročnih struktur so uspeli zadržati ključne farmakofore, ki so odgovorni za analgetično delovanje in hkrati zmanjšali neželene stranske učinke morfina ter povečali absorpcijo (Slika 9) (68, 73).



Slika 9 Odprtje obročev na osnovni strukturi morfina (levo) in tramadol (desno). Prirejeno po Sun et al. (68)

1.5.3 Načrtovanje peptidomimetikov

Biološko aktivni endogeni peptidi imajo pomembno vlogo v našem telesu, saj lahko njihovo neravnovesje privede do različnih patoloških stanj. Ker biogenih peptidov zaradi slabe metabolne stabilnosti in absorpcije ne moremo uporabljati kot zdravila, lahko z ustreznim načrtovanjem peptidomimetikov prikrijemo nekatere slabe lastnosti osnovne molekule. Gre za molekule, ki posnemajo bioaktivno konformacijo izbranega peptida. S skeletnim preskokom lahko zamenjamo nekatere dele peptidov, ki bi bili drugače podvrženi hitremu metabolizmu ali pa izboljšamo njihovo vezavo (Slika 10) (68, 74).

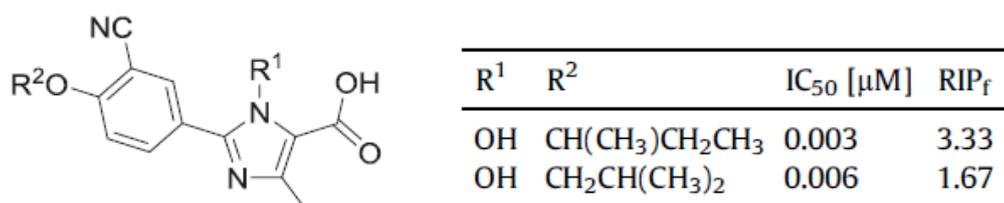


Slika 10 Načrtovanje peptidomimetika. Prirejeno po Sun et al. (68)

1.6 OVREDNOTENJE NOVIH POTENCIALNIH ZAVIRALCEV KSANTINSKE OKSIDAZE

Z namenom iskanja novih zaviralcev ksantinske oksidaze so znanstveniki v zadnjih letih sintetizirali in ovrednotili mnogo spojin, z različnimi kemijskimi strukturami. V članku, ki ga je aprila 2017 objavil Šmelcerović s sodelavci, so se raziskovalci osredotočili na pregled in vrednotenje 240 različnih analogov petčlenskih in šestčlenskih obročev ter na različne spojine z bicikličnimi, tricikličnimi in kondenziranimi obroči. Vsem spojinam so najprej izračunali relativno inhibitorno jakost ($RIP = IC_{50} \text{ standarda} / IC_{50} \text{ izbrane spojine}$; IC_{50} = koncentracija, pri kateri izbrana spojina zavre 50% aktivnosti encima), v drugem delu pa so z *in silico* metodami napovedali fizikalno-kemijske lastnosti, farmakokinetiko in toksičnost izbranih spojin. Med vsemi preučeni spojinami so se kot najbolj potencialni izkazali analogi imidazola, 1,3-tiazola in pirimidona (12).

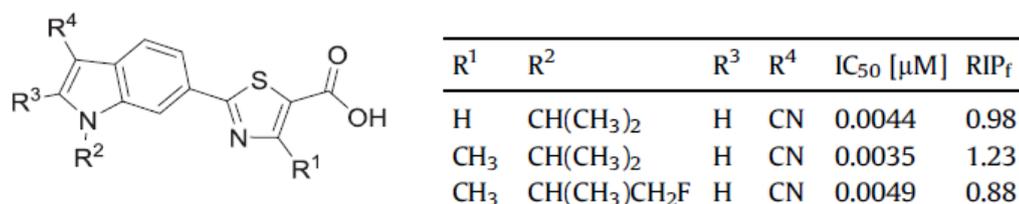
Chen s sodelavci je leta 2015 sintetiziral serije derivatov 1-hidroksi/metoksi-4-metil-2-fenil-1*H*-imidazol-5-karboksilne kisline (Slika 11) (75). Njihova struktura je podobna febeksostatu, razlikuje se le v drugačnem centralnem obroču in dodatni hidroksilni skupini na mestu 1, ki tvori dodatno vodikovo vez s Thr1010 v vezavnem mestu encima. Med vsemi sintetiziranimi spojinami imata največji potencial spojin, ki imata na mestu R₂ na fenilnem obroču hidrofobni skupini (1-metilpropil oz. 2-metilpropil), kot del etrne funkcionalne skupine. Poleg ugodnih fizikalno-kemijskih in farmakokinetičnih lastnosti imata tudi 1,67 oz. 3,33-krat večjo relativno inhibitorno jakost kot febeksostat (pozitivna kontrola - $IC_{50} = 0,01 \mu\text{M}$) (12).



Slika 11 Derivati imidazola kot potencialni zaviralci XO. Prirejeno po Šmelcerović et al. (12)

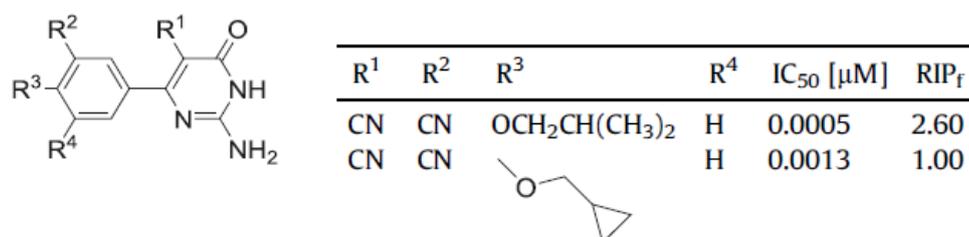
Song in sodelavci so leta 2015 sintetizirali serije tri-substituiranih 2-(indol-5-il)-tiazolnih derivatov, pri katerih so fenilno skupino febeksostata nadomestili s substituiranim indolom (Slika 12) (76). Podobno kot pri febeksostatu tudi pri teh spojinah karboksilat omogoča ionsko in vodikovo vez med zaviralcem in Arg880 in Thr1010 v vezavnem mestu encima. Največ obetajo spojine, ki imajo v svoji strukturi na indolnem mestu R₄ pripeto nitrilno

skupino, ki tvori vodikovo vez z aminokislinskim ostankom Asn768. Med vsemi temi so največjo biološko razpoložljivost v seriji pokazale spojine, ki na mestu R₃ nimajo substituentov, na mestu R₂ pa imajo hidrofobno skupino. Njihova relativna inhibitorna jakost je približno enaka oz. malo večja kot pri febeksostatu (pozitivna kontrola - IC₅₀ = 0.0043 ± 0.0012 μM) (12).



Slika 12 Derivati 1,3-tiazola kot potencialni zaviralci XO. Prirejeno po Šmelcerović et al. (12)

Leta 2014 so Evenas in sodelavci sintetizirali novo skupino možnih zaviralcev ksantinske oksidaze s 4-arilpirimidonskim osnovnim skeletom (Slika 13) (77). Najbolj sta se izkazali spojini, ki sta na mestu R₄ brez substituenta, na mestu R₁ in R₂ imata pripeto nitrilno skupino in na mestu R₃ še alkoksi skupino, ki tvori fenolni eter. Hidrofobni del alkoksi skupin, ki sta bili del najbolj potencialnih spojin, sta sestavljala izobutilni in etilciklopropanski fragment. Inhibitorna aktivnost je bila v primeru spojine z 2-izobutilnim fragmentom 2,6-krat večja kot vrednost IC₅₀ febeksostata (pozitivna kontrola - IC₅₀ = 0,0013 μM) (12).



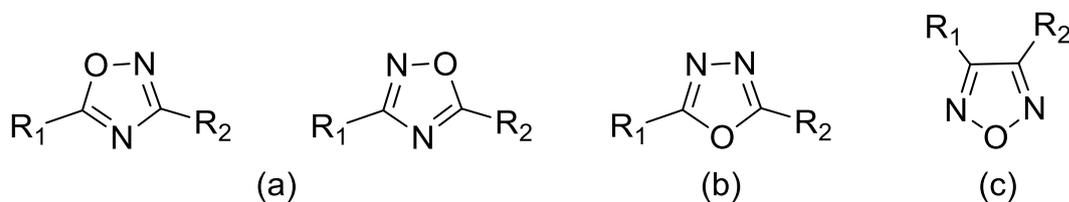
Slika 13 Derivati pirimidona kot potencialni zaviralci XO. Prirejeno po Šmelcerović et al. (12)

Večina spojin z bicikličnimi, tricikličnimi in ostalimi strukturami s prikondenziranimi obroči se ni izkazala kot zanimiva za potencialne nove zaviralce ksantinske oksidaze, kljub temu, da jih je kar precej imelo mnogo boljše inhibitorne aktivnosti (nižje vrednosti IC₅₀) kot standarda febeksostat in alopurinol. Razlog tiči v njihovih toksikoloških profilih, saj jih je kar nekaj med njimi bilo toksičnih ali pa so raziskovalci z *in silico* metodami napovedali njihov vpliv na P-glikoprotein, ki igra pomembno vlogo pri metabolizmu zdravil. Prav tako so se nekateri v *in silico* napovedi izkazali tudi kot endokrini motilci in bi tako motili

delovanje hormonskega sistema. Med tistimi z največ omejitvami so derivati benzopirana, karbazola, pirazolo-pirimidina in pirazolo-kinazolina (12).

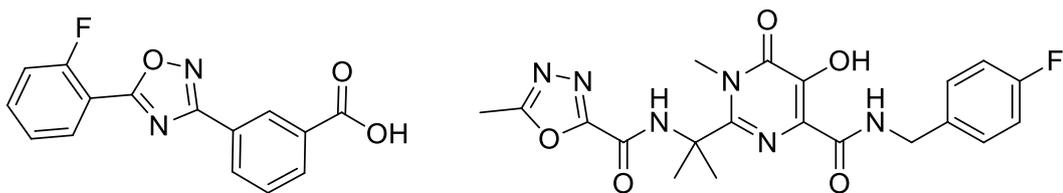
1.7 OKSADIAZOLI

Oksadiazoli so petčlenski heterociklični obroči z dvema ogljikovima, dvema dušikovima in enim kisikovim atomom. Obstajajo v različnih regioizomernih oblikah; dva 1,2,4-izomera, 1,3,4-izomer in 1,2,5-izomer (Slika 14). Najpogosteje uporabljena oblika oksadiazola v zdravilnih učinkovinah je 1,3,4-oksadiazol, najmanj pa 1,2,5-oksadiazol. Oba 1,2,4-izomera kot tudi 1,3,4-izomer zaradi skoraj identične geometrije usmerjajo možne substituentne v zelo podoben položaj, zato je pričakovati, da se vežejo na podoben način (78).



Slika 14 Izomerne oblike oksadiazolov - (a) 1,2,4-oksadiazol, (b) 1,3,4-oksadiazol, (c) 1,2,5-oksadiazol (78)

Njihov pomen v farmaciji in medicini vsako leto narašča, saj je na trgu ali v poznih fazah kliničnih študij vedno več učinkovin z oksadiazolnim obročem, ki izkazujejo različne učinke, kot npr: antiinfektivi, antidiabetiki, protitumorne, protivnetne, protimikrobne in nevroprotektivne učinkovine (78). Oksadiazolni obroči se pri odkrivanju in načrtovanju novih učinkovin uporabljajo na več načinov. Raziskovalci lahko z njimi modulirajo farmakokinetične lastnosti molekul, kot so to storili v primeru raltegravirja, kjer so z bioizosterno zamenjavo estra z oksadiazolnim obročem izboljšali biološko razpoložljivost. Raltegravir, protiretrovirusna učinkovina, ki deluje proti virusu HIV, je leta 2007 pridobila dovoljenje za promet tako s strani FDA kot Evropske agencije za zdravila (78, 79). EMA je pogojno dovoljenje za promet odobrila tudi atalurenu za zdravljenje Duchennove mišične distrofije (80). V tem primeru ima oksadiazol vlogo centralnega ogrodja molekule, ki služi kot planaren aromatski most, ki skrbi za primerno orientiranost substituentov (Slika 15) (78).



Slika 15 Zdravilne učinkovine z vsebujočim oksadiazolnim obročem. Ataluren (levo) in raltegravir (desno)

Navsezadnje pa lahko oksadiazolni obroči predstavljajo tudi glavni del farmakoforja, če prispevajo k boljši vezavi liganda na vezavno mesto (78). Na splošno so dobra bioizosterna zamenjava za estre, karbamate in amide, prav tako pa se uporabljajo tudi pri načrtovanju novih spojin z metodo skeletnega preskoka med šest- ali petčlenskimi obroči (81).

V splošnem obstaja pet glavnih sinteznih metod za pripravo 1,2,4-oksadiazolnega obroča:

- ciklizacija *O*-acilamidoksimov
- ciklizacija *N*-acilamidoksimov
- oksidacija 4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazolov
- 1,3-dipolarna cikloadicija nitril oksidov z nitrili in sorodnimi spojinami
- preureditev drugih heterocikličnih obročev

Najpogosteje uporabljena metoda je ciklizacija *O*-acilamidoksimov, ki se jih predhodno sintetizira v postopku aciliranja amidoksimov s karboksilno kislino ali njenimi aktiviranimi derivati (81). V prvi stopnji se sintetizira amidoksim z adicijo hidroksilamina na izbrani nitril ob prisotnosti baze, čemur sledi *O*-aciliranje amidoksima z aktiviranim derivatom karboksilne kisline. Najpogosteje se uporablja kislinski klorid ali karboksilna kislina v prisotnosti »coupling« reagenta (npr. CDI (N,N'-karbonildiimidazol)). Nastali *O*-aciliran amidoksim lahko nato izoliramo ali pa takoj nadaljujemo z reakcijo intramolekulske ciklodehidracije ob visoki temperaturi ali mikrovalovih. Tako prvo kot druga stopnjo sinteze lahko izvedemo pod različnimi reakcijskimi pogoji (81, 82).

2. NAMEN DELA

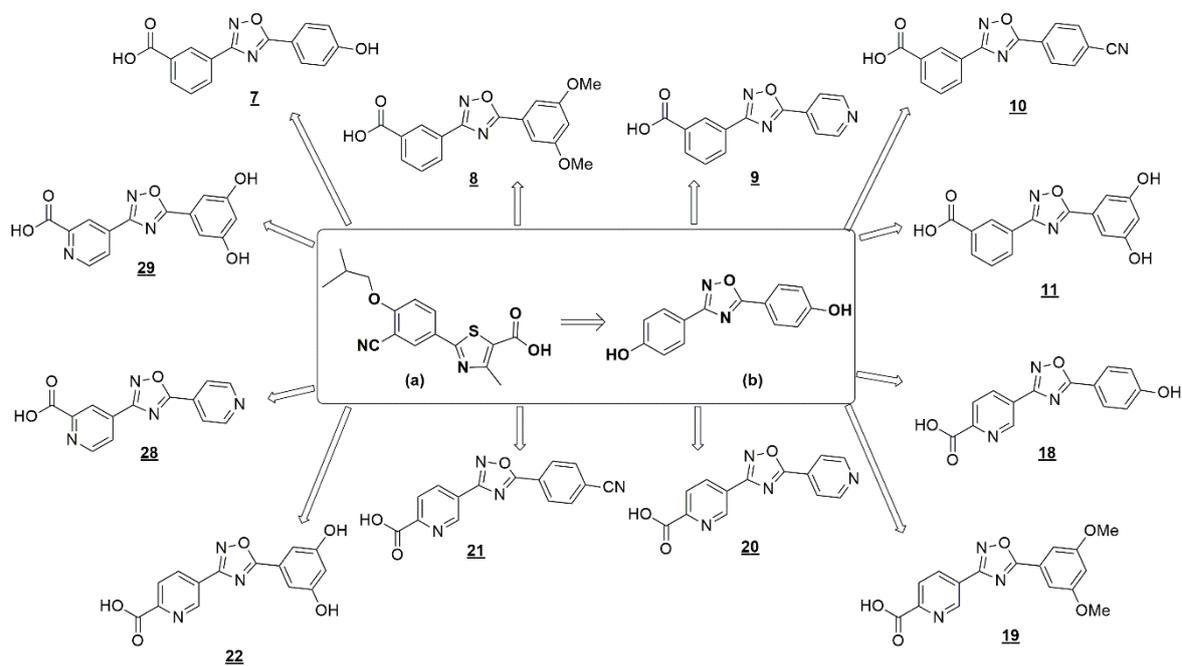
V okviru magistrske naloge bomo načrtovali in sintetizirali več spojin s potencialnim učinkom zaviranja encima ksantinske oksidaze. Načrtovanje bomo izvedli na osnovi že znanega liganda, kot spojino vodnico bomo namreč izbrali učinkovino febeksostat (2-(3-ciano-4-[2-metilpropoksil]fenil)-4-metiltiazol-5-karboksilna kislina). Kot dodatno usmeritev pri načrtovanju spojin nam bodo nudile ugotovitve raziskovalcev Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani, ki so ugotovili dobre antioksidativne in protivnetne lastnosti različnih 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola, zato nam bo oksadiazolni skelet teh spojin služil kot bioizosterna zamenjava tiazola v febeksostatu (83). Na podlagi že poznanih interakcij febeksostata v vezavnem mestu ksantinske oksidaze, ki smo jih predstavili v uvodu, bomo načrtovali spojine s substituiranim 1,2,4-oksadiazolnim obročem, ki mu bomo na mestih 3 in 5 pripeli dva (hetero)aromska obroča, na katera bomo pripeli različne funkcionalne skupine (Slika 16).

Vse sintetizirane spojine bomo fizikalno-kemijsko in spektroskopsko ovrednotili ter jih poslali na biološko vrednotenje tujim partnerjem, ki bodo določili njihove IC₅₀ vrednosti.

Na obroč, ki bo pripet na mesto 3, bomo dodali karboksilno skupino, ki se je zaradi interakcij z Arg880 in Thr1010 izkazala kot eden izmed ključnih delov farmakoforja febeksostata. Na mesto 5 oksadiazolnega obroča bomo v primeru vezave fenila nanj pripeli hidroksilno, nitrilno ali pa dve metoksi skupini. Sintetizirali bomo tudi serije spojin, ki bodo imele na mestu 5 1,2,4-oksadiazolnega obroča pripet piridin. Piridinski dušik, hidroksilna in nitrilna skupina lahko tvorijo dodatne vodikove vezi z vezavnim mestom encima, podobno kot febeksostat. Dve metoksi skupini bi lahko izboljšali tudi lipofilnost spojin in njihovo absorpcijo. Tako fenil kot tudi piridin bi lahko s π - π in hidrofobnimi interakcijami povečala stabilnost kompleksa med spojino in vezavnim mestom encima.

Izhajali bomo iz treh osnovnih spojin s karboksilno skupino (3-cianobenzojska kislina, 5-cianopiridin-2-karboksilna kislina, 4-cianopiridin-2-karboksilna kislina), ki jih bomo najprej z etanolom in tionil kloridom pretvorili v etilni ester. V naslednji stopnji bomo izbrano spojino z adicijo hidroksilamina na nitrilno skupino pretvorili v amidoksim, na katerega bomo vezali s pomočjo sklopitvenega reagenta aktivirano karboksilno kislino. Sintezo 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov bomo dokončali z reakcijo ciklodehidracije

O-acilamidoksimov v dioksanu ob prisotnosti kalijevega fluorida na temperaturi 110 °C. V zadnji stopnji bomo z LiOH izvedli še hidrolizo estra in z BBr₃ odstranili metilne etre.



Slika 16 Načrt sinteze spojin na podlagi feboksostata (a) in oksadiazolnega analoga resveratrola (b)

3. MATERIALI IN METODE

Reagenti in topila

Pri delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka, Carlo Erba, Panreac, Merck, Janssen). Brezvodni diklorometan (DKM) smo pripravili po standardnem postopku in ga hranili nad molekularnimi siti z velikostjo por 0.4 nm.

Laboratorijska oprema

- tehnica METTLER TOLEDO® PB403-S/FACT Precision Balance
- magnetno mešalo IKA® RCT basic IKAMAG Magnetic stirrer
- rotavapor BÜCHI® type R-114
- UV svetilka CAMAG UV-cabinet II ($\lambda = 254 \text{ nm}/366 \text{ nm}$)

Kromatografske metode

- **Tankoplastna kromatografija (TLC)**

Za izvedbo tankoplastne kromatografije smo uporabljali kromatografske plošče proizvajalca Merck Kieselgel 60 F254 z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem, kot mobilno fazo smo uporabljali različna topila in njihove kombinacije. Za detekcijo spojin na kromatografski plošči smo uporabljali UV svetilko valovnih dolžin $\lambda = 254 \text{ nm}$ in $\lambda = 366 \text{ nm}$.

- **Kolonska kromatografija**

Za čiščenje končnih spojin s kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm, proizvajalca Merck, kot mobilno fazo pa ustrezna topila oz. mešanice le teh. Kromatografijo smo izvajali v steklenih kolonah različnih velikosti, ki smo jih izbrali glede na količino zmesi produktov.

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

HPLC analize smo izvajali na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B, kolono Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm delci) ob uporabi predkolone in pri pretoku 1 mL/min. Kot eluent smo izbrali zmes 0,1% raztopine trifluoroocetne kisline v vodi in

acetonitrila, pri čemer smo gradient spreminjali s časom: od 0-30 min se je sestava spreminjala od 30% acetonitrila do 80%, od 30-35 minut pa še od 80% acetonitrila do 90%.

Določevanje tališč

Tališča spojin smo določili na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica. Temperature tališč niso korigirane.

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H in ^{13}C NMR spektri so bili posneti pri 400 MHz (^1H) in 100 MHz (^{13}C) na spektrometru Bruker Avance DPX₄₀₀ na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v DMSO- d_6 , CDCl_3 ali devteriranem metanolu in kot interni standard uporabili tetrametilsilan. Za procesiranje spektrov smo uporabili program MestReC.

Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti z ESI tehniko ionizacije na masnem spektrometru Q-TOF Premier, proizvajalca Micromass, v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektri so bili posneti na spektrometru Nexus FT-IR (ATR način) na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

Nomenklatura in risanje spojin

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

Biološko testiranje spojin

Novosintetizirane spojine smo dali biološko ovrednotiti tujim partnerjem na Center za biomedicinsko znanost na Medicinski fakulteti Univerze v Nišu. Za testiranje so uporabili ksantinsko oksidazo v govejem mleku, proizvajalca Sigma-Aldrich. Metoda je podrobneje opisana v članku (84).

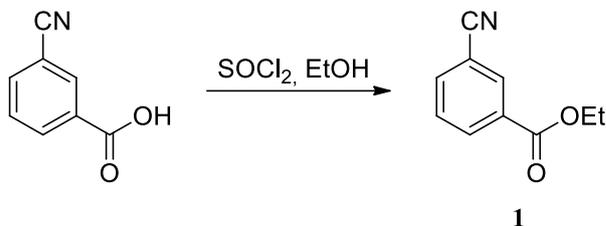
Reakcijska zmes (skupni volumen 2150 μL) v epruveti je vsebovala 0,01 enoto ksantinske oksidaze (ena enota pretvori 1,0 μmol ksantina v sečno kislino na minuto pri $\text{pH} = 7,5$ in

temperaturi 25 °C), 232,5 µM ksantina, 46,5 mM pufra TRIS-HCl (pH = 7,8) in našo izbrano spojino, raztopljeno v DMSO (končna koncentracija DMSO-ja v epruveti je znašala 4,65% v/v). Kontrolni vzorec topila je vseboval enako količino ksantinske oksidaze in ustrezne količine ksantina, pufra TRIS-HCl in DMSO-ja. Epruvete z našimi vzorci in ustrezno pripravljenimi slepimi vzorci so bile inkubirane 15 min pri temperaturi 37 °C, nato je sledila zaustavitev reakcije z dodatkom 100 µL perklorne kisline. Sledila je spektrofotometrična meritev nastanka sečne kisline. Absorbanca vzorcev je bila izmerjena pri 293 nm. Odstotek encimske inhibicije je bil izračunan iz razlike med meritvami absorbanc testnega in kontrolnega vzorca pri koncentraciji 150 µM. Ob več kot 50% inhibiciji je sledila ponovitev merjenja pri širšem razponu koncentracij, da so na podlagi umeritvene krivulje lahko izračunali IC₅₀ vrednost. Za pozitivno kontrolo so bili uporabljeni alopurinol, febuksostat in kvercetin.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteza etil 3-cianobenzoata (spojina 1)

Reakcija:



Postopek:

3001 mg (20,39 mmol) 3-cianobenzojske kisline smo natehtali v 100 mL bučko in dodali 40 mL brezvodnega etanola. Raztopino smo 10 min mešali na sobni temperaturi, jo nato ohladili na ledeni kopeli in dodali 1,7 mL (1,1 eq: 23,43 mmol) tionil klorida (SOCl₂). Reakcijsko zmes smo prenesli na oljno kopel in 20 ur segrevali pri temperaturi refluxa (T = 80 °C). Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo in dobili oljnat zaostanek, ki smo ga raztopili v dietil etru in nato uparili pod znižanim tlakom. Produkta se ni dalo upariti do suhega, zato smo dodali 50 mL etilacetata in s presesalno erlenmajerico odnučali oborino, ki smo jo pozneje zavrgli, matičnico pa spirali z 2 × 50 mL NaHCO₃, 20 mL NaCl in posušili z Na₂SO₄. Organsko fazo smo uparili pod znižanim tlakom in na sobni temperaturi je produkt prešel iz tekočega v trdno agregatno stanje, pri čemer smo dobili 2540 mg spojine 1.

Rezultati:

Izgled: bela amorfna snov

Izkoristek: 71,1 %

Mr: 175,18

Elementna sestava: C₁₀H₉NO₂

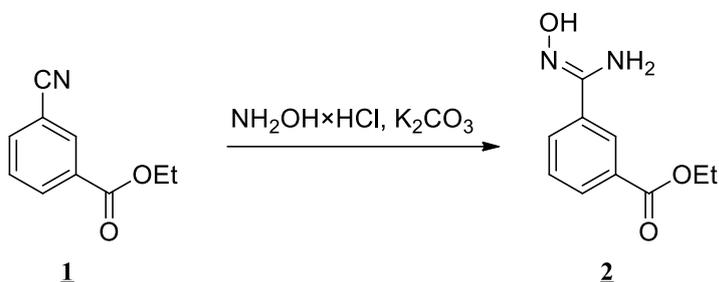
Rf: 0,69 (MF: etilacetat/heksan = 1/1)

T_{tališča}: 56 °C (85)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.33 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 4.31-4.36 (m, 2H, CH₂-CH₃), 7.73 (t, 1H, J = 8.0 Hz, H-Ar), 8.09-8.27 (m, 3H, 3 × H-Ar)

4.2 Sinteza etil 3-(N'-hidroksikarbamimidoil)benzoata (spojina 2)

Reakcija:



Postopek:

1923 mg (10,98 mmol) spojine 1 smo natehtali v 100 mL bučko in dodali 1527 mg (2 eq: 21,97 mmol) hidroksilaminijevega klorida ($\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$) in 3034 mg (2 eq: 21,95 mmol) kalijevega karbonata (K_2CO_3). Reakcijsko zmes smo v 10 mL etanola mešali na oljni kopeli in segrevali pri temperaturi refluxa ($T = 80\text{ }^\circ\text{C}$) preko noči. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili topilo, k preostanku dodali 100 mL etilacetata in spirali z 20 mL vode, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na_2SO_4 . Organski fazi smo uparili topilo in dobili 1623 mg spojine 2.

Rezultati:

Izgled: bela amorfna snov

Izkoristek: 71,1 %

Mr: 208,21

Elementna sestava: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$

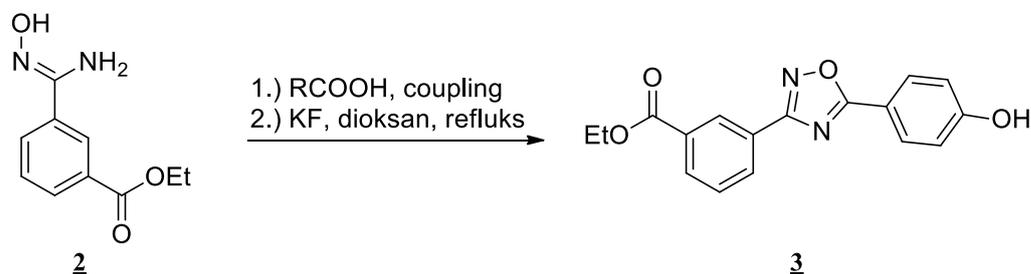
Rf: 0,30 (MF: etilacetat/heksan = 1/1)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.32-1.34 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.31-4.36 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.96 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 7.54 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 7.92-7.97 (m, 2H, $2 \times \text{H-Ar}$), 8.30 (t, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-Ar), 9.79 (s, 1H, $-\text{N-OH}$)

MS (ESI): 209 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (86)

4.3 Sinteza etil 3-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzoata (spojina **3**)

Reakcija:



Postopek:

314 mg (1,51 mmol) spojine **2** smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 208 mg (1 eq: 1,51 mmol) 4-hidroksibenzojske kisline, 318 mg (1,1 eq: 1,66 mmol) EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid), 224 mg (1,1 eq: 1,66 mmol) HOBt (hidroksibenzotriazol), 0,42 mL (2 eq: 3,02 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP (4-dimetilaminopiridin) in vse skupaj raztopili v 1,5 mL DMF (dimetilformamid) ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 263 mg (3 eq: 4,53 mmol) kalijevega fluorida (KF) in 6 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom upareli dioksan in nato produkt raztopili v 40 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 2 × 15 mL -1M HCl, nato z 2 × 15 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. Organski fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo in nastali produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan/etilacetat = 3/1). Dobili smo 58 mg surovega produkta, ki smo ga še prekrystalizirali iz etanola in dobili 16 mg čiste spojine **3** ($\eta = 3,4\%$)

Sintezo spojine **3** smo ponovili še enkrat s 150 mg spojine **2** in dobili še dodatnih 33 mg spojine **3**. Pri tem nismo izvedli kolonske kromatografije, ampak smo produkt takoj po izolaciji očistili s prekrystalizacijo. Izkoristek je bil v primerjavi s prvim postopkom višji ($\eta = 14,7\%$)

Rezultati:

Izgled: rjav prah

Izkoristek: 7,1 % (celokupni)

Mr: 310,30

Elementna sestava: C₁₇H₁₄N₂O₄

Rf: 0,69 (MF: etilacetat)

Tališča: 158-161 °C

IR (cm⁻¹): 1689, 1616, 1575, 1499, 1445, 1374, 1350, 1266, 1169, 1148, 1101, 1014, 842, 749, 737, 719.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.37 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 4.39 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 7.01 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz, 2× H-Ar), 7.74-7.78 (m, 1H, H-Ar), 8.06 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2x H-Ar), 8.17-8.19 (m, 1H, H-Ar), 8.32-8.35 (m, 1H, H-Ar), 8.61 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-Ar), 10.61 (s, 1H, Ar-OH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 14.14, 61.21, 113.91, 116.35, 126.93, 127.39, 129.99, 130.24, 130.80, 131.44, 131.93, 162.19, 165.00, 167.32, 175.85

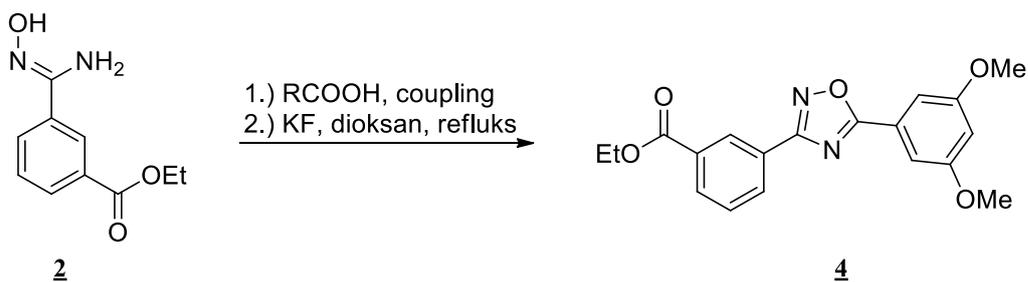
HPLC: Čistost spojine 98,3 % pri 254 nm (t_R = 15,43 min)

MS (ESI): 311,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₇H₁₅N₂O₄ [M+H]⁺: 311,1025 (izračunana: 311,1032)

4.4 Sinteza etil 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzoata (spojina 4)

Reakcija:



Postopek:

300 mg (1,44 mmol) spojine 2 smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 262 mg (1 eq: 1,44 mmol) 3,5-dimetoksi benzojske kisline, 304 mg (1,1 eq: 1,58 mmol) EDC, 214 mg (1,1 eq: 1,58 mmol) HOBT, 0,40 mL (2 eq: 2,88 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP in vse skupaj raztopili v 2 mL DMF ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s

tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 251 mg (3 eq: 4,32 mmol) KF in 6 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili dioksan in nato produkt raztopili v 40 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 2 × 15 mL 1M HCl, nato z 2 × 15 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. Organski fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo, nato smo surov produkt prekrizalizirali iz etanola, pri čemer smo dobili 123 mg spojine **4** ($\eta = 24,1 \%$).

Celoten postopek smo ponovili še enkrat s 140 mg spojine **2** in dobili še dodatnih 40 mg spojine **4** ($\eta = 16,8 \%$).

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 21,8 % (celokupni)

Mr: 354,36

Elementna sestava: C₁₉H₁₈N₂O₅

Rf: 0,70 (MF: etilacetat/heksan = 1/1)

T_{tališča}: 106-109 °C

IR (cm⁻¹): 1719, 1607, 1565, 1456, 1371, 1296, 1242, 1208, 1148, 1067, 1046, 1001, 925, 855, 824, 744, 706

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.37 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 3.88 (s, 6H, 2 × O-CH₃), 4.39 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 6.87 (t, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-Ar), 7.31 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, 2 × H-Ar), 7.78 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 8.18-8.21 (m, 1H, H-Ar), 8.35-8.38 (m, 1H, H-Ar), 8.62 (t, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-Ar)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 14.13, 55.74, 61.25, 105.59, 124.76, 125.01, 126.59, 127.42, 130.06, 130.85, 131.57, 132.11, 161.05, 164.98, 167.61, 186.27

HPLC: Čistost spojine 96,7 % pri 254 nm ($t_R = 21,43$ min)

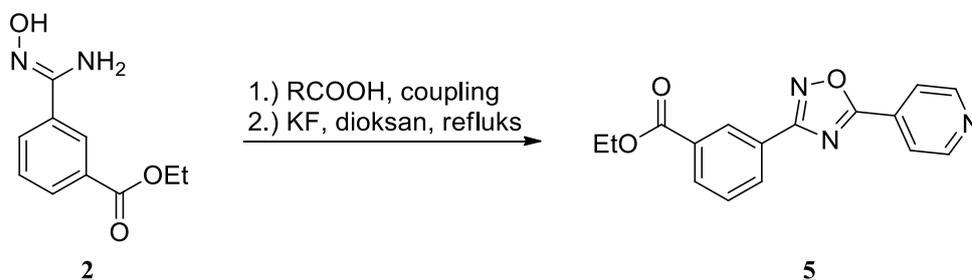
MS (ESI): 355,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₉H₁₉N₂O₅ [M+H]⁺: 355,1292 (izračunana: 355,1294)

4.5 Sinteza etil 3-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzoata (spojina 5)

5)

Reakcija:



Postopek:

208 mg (1,00 mmol) spojine 2 smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 123 mg (1 eq: 1,00 mmol) piridin-4-karboksilne kisline, 211 mg (1,1 eq: 1,10 mmol) EDC, 149 mg (1,1 eq: 1,10 mmol) HOBt, 0,28 mL (2 eq: 2,00 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP in vse skupaj raztopili v 2 mL DMF ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 174 mg (3 eq: 3,00 mmol) KF in 6 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili dioksan in nato produkt raztopili v 60 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 10 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. Organski fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo, nato smo surov produkt prekrizalizirali iz etanola, pri čemer smo dobili 42 mg spojine 5.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 14,2 %

Mr: 295,29

Elementna sestava: C₁₆H₁₃N₃O₃

Rf: 0,43

T_{tališča}: 101-104 °C

IR (cm⁻¹): 1714, 1573, 1545, 1519, 1416, 1350, 1270, 1144, 1108, 1025, 935, 889, 846, 824, 745, 729, 692

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.37 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 4.40 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 7.80 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-Ar), 8.15 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, 2 × H-Py), 8.20-8.23 (m, 2H, H-Ar), 8.37-8.40 (m, 1H, H-Ar), 8.93 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, 2 × H-Py)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 14.14, 61.27, 121.39, 126.33, 127.49, 130.17, 130.93, 131.55, 132.29, 151.20, 164.92, 166.91, 167.87

HPLC: Čistost spojine 99,5 % pri 254 nm (*t_R* = 12,43 min)

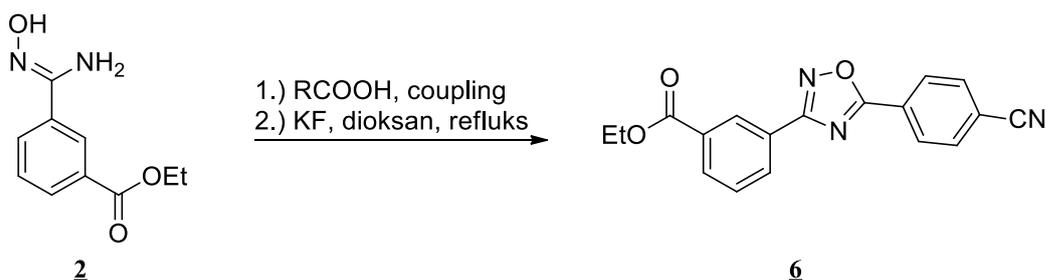
MS (ESI): 296,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₆H₁₄N₃O₃ [M+H]⁺: 296,1036 (izračunana: 296,1035)

4.6 Sinteza etil 3-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzoata (spojina **6**)

6

Reakcija:



Postopek:

300 mg (1,44 mmol) spojine **2** smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 212 mg (1 eq: 1,44 mmol) 4-ciano benzojske kisline, 304 mg (1,1 eq: 1,58 mmol) EDC, 214 mg (1,1 eq: 1,58 mmol) HOBt, 0,40 mL (2 eq: 2,88 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP in vse skupaj raztopili v 2 mL DMF ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 251 mg (3 eq: 4,32 mmol) KF in 6 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili dioksan in nato produkt raztopili v 40 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 2 × 10 mL 1M HCl, nato z 2 × 10 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. Organski fazi smo

pod znižanim tlakom uparili topilo, nato smo surov produkt prekrizalizirali iz etanola, pri čemer smo dobili 102 mg spojine **6**.

Rezultati:

Izgled: umazano beli kristali

Izkoristek: 22,2%

Mr: 319,31

Elementna sestava: C₁₈H₁₃N₃O₃

Rf: 0,71

T_{tališča}: 89-93 °C

IR (cm⁻¹): 2232, 1716, 1578, 1555, 1491, 1446, 1369, 1345, 1262, 1172, 1139, 1106, 1014, 928, 878, 846, 789, 748, 722

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.38 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 4.40 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 7.78-7.82 (m, 1H, H-Ar), 8.16 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 × H-Ar), 8.21-8.23 (m, 1H, H-Ar), 8.37-8.42 (m, 3H, 3 × H-Ar), 8.65-8.66 (m, 1H, H-Ar)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.13, 61.27, 115.45, 126.39, 127.08, 127.48, 128.80, 130.15, 130.92, 131.53, 132.11, 132.26, 133.49, 138.26, 164.48, 164.94

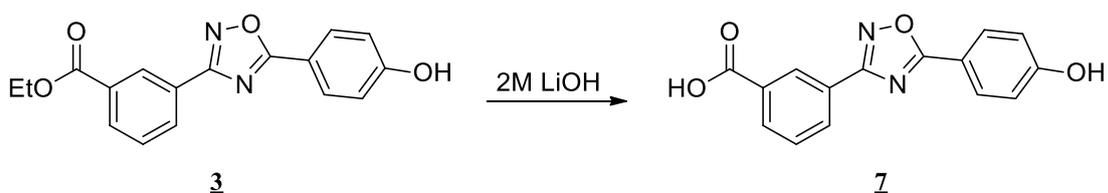
HPLC: Čistost spojine 100 % pri 254 nm (*t_R* = 18,80 min)

MS (ESI): 320,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₈H₁₄N₃O₃ [M+H]⁺: 320,1029 (izračunana: 320,1035)

4.7 Sinteza 3-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina **7**)

Reakcija:



Postopek:

V 10 mL bučko smo natehtali 37 mg (0,119 mmol) spojine **3**, jo raztopili v 1,5 mL THF in

dodali 477 μL (8 eq: 0,952 mmol) 2M LiOH. Po 24 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski zmesi ni več izhodne spojine in reakcijo prekinili. Iz reakcijske zmesi smo nato uparili THF (tetrahidrofuran), dodali 2 mL destilirane vode in na ledeni kopeli še 1 mL 1M HCl za nevtralizacijo LiOH. Nastala je rjava oborina, ki smo jo odnučali in posušili v sušilniku. Dobili smo 30 mg spojine **7**.

Rezultati:

Izgled: temno rjav prah

Izkoristek: 89,1%

Mr: 282,25

Elementna sestava: $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$

Rf: 0,26 (MF: heksan/etilacetat= 1/1)

T_{tališča}: 223-226 °C

IR (cm⁻¹): 3292, 1707, 1613, 1574, 1525, 1499, 1466, 1444, 1383, 1352, 1229, 1169, 1113, 1078, 966, 920, 838, 749, 719, 706

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7.02 (s, 2H, 2 \times H-Ar-OH), 7.74 (s, 1H, H-Ar), 8.07 (s, 2H, 2 \times H-Ar), 8.16 (s, 1H, H-Ar), 8.30 (s, 1H, H-Ar), 8.62 (d, 1H, $J = 0.8$ Hz, H-Ar), 10.64 (s, 1H, Ar-OH), 13.37 (s, 1H, COOH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 92.55, 95.40, 113.94, 116.34, 129.83, 130.22, 131.05, 132.08, 136.74, 147.57, 162.18, 167.42, 176.13

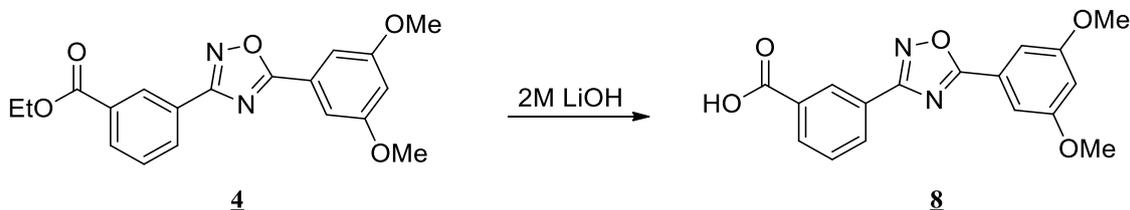
HPLC: Čistost spojine 100 % pri 254 nm ($t_R = 9,04$ min)

MS (ESI): 283,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₅H₁₁N₂O₄ [M+H]⁺: 283,0716 (izračunana: 283,0719)

4.8 Sinteza 3-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina **8**)

Reakcija:



Postopek:

V 10 mL bučko smo natehtali 60 mg (0,169 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 1,5 mL THF in dodali 678 μ L (8 eq: 1,352 mmol) 2M LiOH. Po 24 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski zmesi ni več izhodne spojine in reakcijo prekinili. Iz reakcijske zmesi smo nato uparili THF, dodali 2 mL destilirane vode in na ledeni kopeli še 1,5 mL 1M HCl za nevtralizacijo LiOH. Nastala je svetlo rjava oborina, ki smo jo odnučali in posušili v sušilniku. Dobili smo 27 mg spojine **8**.

Rezultati:

Izgled: svetlo rjav prah

Izkoristek: 48,9 %

Mr: 326,30

Elementna sestava: C₁₇H₁₄N₂O₅

Rf: 0,46 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)

T_{tališča}: 245-247 °C

IR (cm⁻¹): 1686, 1591, 1561, 1472, 1428, 1367, 1302, 1273, 1206, 1155, 1110, 1065, 1049, 926, 841, 746, 708

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3.88 (s, 6H, 2 \times O-CH₃), 6.87 (t, 1H, J = 2.0 Hz, H-Ar), 7.32 (d, 2H, J = 2.4 Hz, 2 \times H-Ar), 7.75 (t, 1H, J = 8.0 Hz, H-Ar), 8.16-8.19 (m, 1H, H-Ar), 8.32-8.35 (m, 1H, H-Ar), 8.63 (t, 1H, J = 1.6 Hz, H-Ar), 13.39 (s, 1H, COOH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 55.74, 105.55, 125.42, 126.43, 127.74, 129.87, 131.14, 136.46, 136.52, 157.15, 161.04, 166.55, 173.25

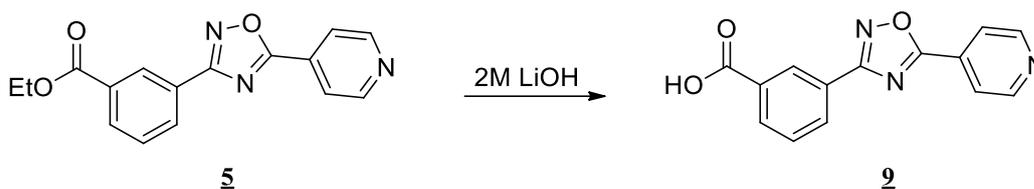
HPLC: Čistost spojine 95,0 % pri 254 nm ($t_R = 14,50$ min)

MS (ESI): 325,1 [M-H]⁻

HR-MS za C₁₇H₁₃N₂O₅ [M-H]⁻: 325,0828 (izračunana: 325,0824)

4.9 Sinteza 3-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina **9**)

Reakcija:



Postopek:

V 10 mL bučko smo natehtali 22 mg (0,075 mmol) spojine **5**, jo raztopili v 1,5 mL THF in dodali 298 μ L (8 eq: 0,600 mmol) 2M LiOH. Po 24 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski zmesi ni več izhodne spojine in reakcijo prekinili. Iz reakcijske zmesi smo nato uparili THF, dodali 2 mL destilirane vode in na ledeni kopeli še 0,6 mL 1M HCl za nevtralizacijo LiOH. Nastala je rjava oborina, ki smo jo odnučali in posušili v sušilniku. Dobili smo 19 mg spojine **9**.

Rezultati:

Izgled: rjav prah

Izkoristek: 95,4 %

Mr: 267,24

Elementna sestava: C₁₄H₉N₃O₃

Rf: 0,41 (MF: heksan/etilacetat= 1/1)

T_{tališča}: 262-265 °C

IR (cm⁻¹): 1702, 1612, 1591, 1556, 1414, 1365, 1285, 1260, 1062, 1010, 919, 840, 744, 719

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7.77 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 8.15 (s, 2H; 2 \times H-Py), 8.20 (s, 1H, H-Ar), 8.35 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-Ar), 8.66 (s, 1H, H-Ar), 8.94 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, 2 \times H-Py), 13.45 (s, 1H, COOH)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 107.08, 121.47, 126.13, 127.78, 130.03, 130.35, 131.20, 131.77, 132.46, 151.04, 166.53, 167.97, 174.16

HPLC: Čistost spojine 86,6 % pri 254 nm ($t_R = 5,18$ min)

MS (ESI): 266,1 [M-H] $^-$

HR-MS za $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_3$ [M-H] $^-$: 266,0565 (izračunana: 266,0566)

LC-MS (ESI): 268,2 [M+H] $^+$ (87)

4.10 Sinteza 3-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina 10)

Reakcija:



Postopek:

V 10 mL bučko smo natehtali 50 mg (0,157 mmol) spojine 6, jo raztopili v 1,5 mL THF in dodali 626 μL (8 eq: 1,256 mmol) 2M LiOH. Po 24 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski zmesi ni več izhodne spojine in reakcijo prekinili. Iz reakcijske zmesi smo nato uparili THF, dodali 2 mL destilirane vode in na ledeni kopeli še 1,3 mL 1M HCl za nevtralizacijo LiOH. Nastala je bela oborina, ki smo jo odnučali in posušili v sušilniku. Dobili smo 36 mg spojine 10.

Rezultati:

Izgled: bel prah

Izkoristek: 78,9 %

Mr: 291,26

Elementna sestava: $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$

Rf: 0,51 (MF: heksan/etilacetat= 1/1)

$T_{\text{tališča}}$: 286-290 $^{\circ}\text{C}$

IR (cm^{-1}): 3393, 1686, 1612, 1579, 1556, 1523, 1499, 1412, 1352, 1273, 1169, 1082, 921, 853, 821, 750, 715

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.76 (t, 1H, J = 8.0 Hz, $\underline{\text{H-Ar}}$), 8.12-8.20 (m, 3H, $3 \times \underline{\text{H-Ar}}$), 8.33-8.40 (m, 3H, $3 \times \underline{\text{H-Ar}}$), 8.65 (t, 1H, J = 1.6 Hz, $\underline{\text{H-Ar}}$), 13.42 (s, 1H, $\underline{\text{COOH}}$)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 115.43, 126.22, 127.11, 127.80, 128.77, 129.94, 131.11, 132.40, 133.47, 166.48, 167.92, 174.38

HPLC: Čistost spojine 97,0 % pri 254 nm (t_R = 12,02 min)

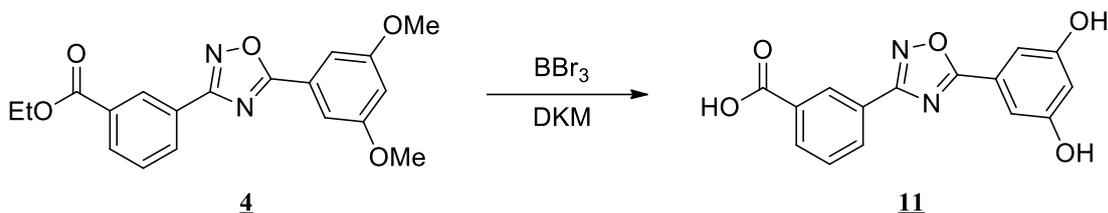
MS (ESI): 290,1 [M-H]⁻

HR-MS za $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_3$ [M-H]⁻: 290,0564 (izračunana: 290,0566)

LC-MS (ESI): 292,08 [M+H]⁺ (87)

4.11 Sinteza 3-(5-(3,5-dihidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojske kisline (spojina 11)

Reakcija:



Postopek:

60 mg (0,169 mmol) spojine 4 smo natehtali v 25-mL bučko, jo raztopili v 1 mL DKM in na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Dodali smo 2,03 mL (12 eq: 2,028 mmol) BBr_3 in mešali na ledeni kopeli še 10 min, nato smo kopel odstavili in pustili, da je reakcija potekala na sobni temperaturi. Čez 20 ur smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije. V reakcijsko zmes smo dodali 6 mL NaHCO_3 in 30 mL etilacetata ter fazi ločili. Večina produkta se je nahajala v vodni fazi, zato smo jo reekstrahirali s 3×10 mL etilacetata. Vse organske faze smo združili, uparili topilo in suh preostanek z 1 M HCl nakisali do pH = 3 ter odnučali nastalo oborino. Dobili smo 8 mg spojine 11.

Rezultati:

Izgled: temno siv prah

Izkoristek: 15,9 %

Mr: 298,25

Elementna sestava: C₁₅H₁₀N₂O₅

Rf: 0,15 (MF: etilacetat)

T_{talitšča}: > 300 °C

IR (cm⁻¹): 3284, 1702, 1611, 1567, 1522, 1456, 1368, 1240, 1162, 1005, 944, 861, 847, 747, 708

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 6.53 (s, 1H, H-Ar), 7.05 (s, 2H, 2 × H-Ar), 7.74 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-Ar), 8.16 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, H-Ar), 8.30 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-Ar), 8.61 (s, 1H, H-Ar), 9.94 (s, 2H, 2 × Ar-OH), 13.37 (s, 1H, COOH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 105.72, 107.36, 124.43, 126.58, 127.72, 129.88, 131.07, 131.75, 132.18, 159.26, 159.29, 166.52, 167.53, 175.83

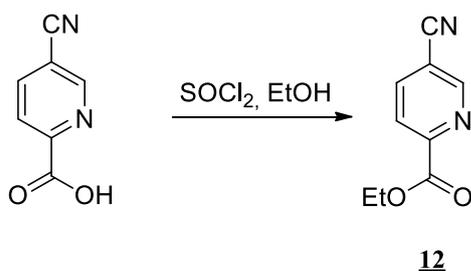
HPLC: Čistost spojine 98,6 % pri 254 nm (t_R = 6,41 min)

MS (ESI): 297,0 [M-H]⁻

HR-MS za C₁₅H₉N₂O₅ [M-H]: 297,0518 (izračunana: 297,0511)

4.12 Sinteza etil 5-cianopiridin-2-karboksilata (spojina 12)

Reakcija:



Postopek:

1129 mg (7,62 mmol) 5-cianopiridin-2-karboksilne kisline smo natehtali v 100 mL bučko in jo raztopili v 15 mL brezvodnega etanola. Raztopino smo 10 min mešali na sobni temperaturi, nato smo jo ohladili na ledeni kopeli in dodali 0,6 mL (1,1 eq: 8,39 mmol) tionil klorida. Reakcijsko zmes smo dve uri mešali na sobni temperaturi, nato smo jo prenesli še na oljno kopel in 20 ur segrevali pri temperaturi refluxa (T = 80 °C). Po končani reakciji smo pod nižanim tlakom uparili topilo in dobili oljnat zaostanek, ki smo

ga najprej raztopili v dietil etru in nato uparili pod znižanim tlakom. Produkta se ni dalo upariti do suhega, zato smo ga raztopili v 30 mL etilacetata, ki smo ga sprali z 10 mL vode. Vodno fazo smo reekstrahirali s 3×10 mL etilacetata ter vse organske faze združili, jih posušili z nasičeno raztopino NaCl ter Na_2SO_4 in pod znižanim tlakom uparili topilo. Na sobni temperaturi je produkt prešel iz tekočega v trdno agregatno stanje, pri čemer smo dobili 1123 mg spojine **12**.

Rezultati:

Izgled: bela amorfna snov

Izkoristek: 83,6%

Mr: 176,17

Elementna sestava: $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$

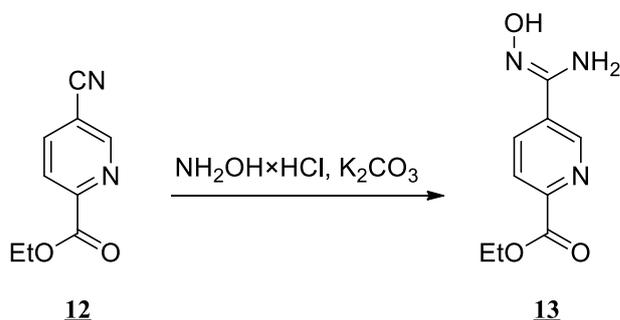
Rf: 0,63 (MF: etilacetat)

Tališča: 62-64 °C (88)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.34 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.38 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 8.20 (dd, 1H, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, H-Ar), 8.53 (dd, 1H, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, H-Ar), 9.16 (s, 1H, H-Ar)

4.13 Sinteza etil 5-(N'-hidroksikarbamimidol)piridin-2-karboksilata (spojina **13**)

Reakcija:



Postopek:

1110 mg (6,30 mmol) spojine **12** smo natehtali v 50 mL bučko in dodali 657 mg (1,5 eq: 9,45 mmol) hidroksilaminijevega klorida ($\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$) in 1306 mg (1,5 eq: 9,45 mmol) kalijevega karbonata (K_2CO_3). V bučko smo dodali še 20 mL etanola in reakcijsko zmes

mešali na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo zmes dve uri segrevali še pri temperaturi 40 °C, dodali še 0,5 eq obeh reagentov in povišali temperaturo na 50 °C. Po eni uri smo s TLC-jem zaznali konec reakcije. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili topilo, k preostanku dodali 40 mL etilacetata in spirali z 10 mL vode. Vodno fazo smo reekstrahirali s 3 × 10 mL etilacetata, vse organske faze združili, jih posušili z nasičeno raztopino NaCl in Na₂SO₄ ter uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 959 mg spojine **13**.

Rezultati:

Izgled: bela amorfna snov

Izkoristek: 72,8%

Mr: 209,20

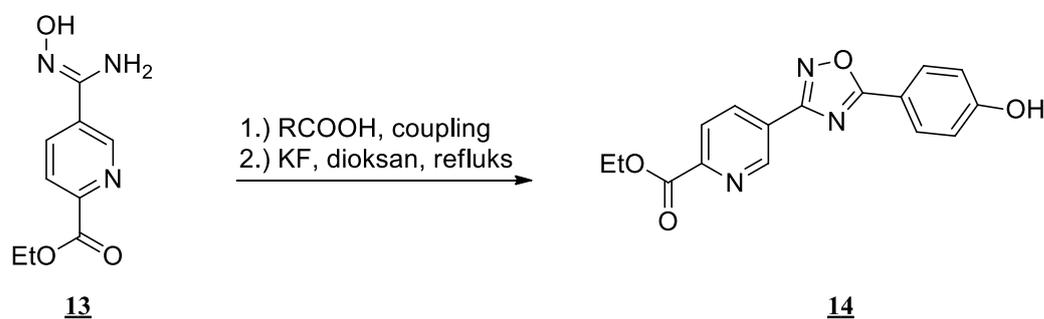
Elementna sestava: C₉H₁₁N₃O₃

Rf: 0,28 (MF: etilacetat)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.33 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 4.35 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 6.12 (s, 2H, -NH₂), 10.12 (s, 1H, -N-OH), 8.06 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, H-Ar), 8.20 (dd, 1H, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, H-Ar), 8.99 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, H-Ar)

4.14 Sinteza etil 5-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina **14**)

Reakcija:



Postopek:

210 mg (1,51 mmol) spojine **13** smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 166 mg (1,2 eq; 1,81 mmol) 4-hidroksi benzojske kisline, 231 mg (1,2 eq; 1,81 mmol) EDC, 185 mg (1,2

eq: 1,81 mmol) HOBt, 0,28 mL (2 eq: 3,02 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP in vse skupaj raztopili v 1,5 mL DMF in mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 175 mg (3 eq: 4,53 mmol) KF in 6 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom upareli dioksan in nato produkt raztopili v 30 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 10 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. Organski fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo. Surov produkt smo prelili z dietil etrom in metanolom ter odnučali nastalo oborino in dobili 33 mg čiste spojine **14**.

Rezultati:

Izgled: svetlo rjav prah

Izkoristek: 10,6%

Mr: 311,29

Elementna sestava: C₁₆H₁₃N₃O₄

Rf: 0,57 (MF: etilacetat)

T_{tališča}: 258-261 °C

IR (cm⁻¹): 1728, 1597, 1561, 1506, 1445, 1389, 1369, 1310, 1286, 1242, 1151, 1030, 974, 916, 848, 760, 699.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.37 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 4.41 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 7.02 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 × H-Ar), 8.08 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2 × H-Ar), 8.27 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-Ar), 8.63 (dd, 1H, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, H-Ar), 9.34 (t, 1H, *J* = 0,8 Hz, H-Ar), 10.67 (s, 1H, Ar-OH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 14.09, 61.57, 113.67, 116.40, 125.24, 125.45, 130.38, 136.06, 147.77, 149.58, 162.36, 164.08, 165.73, 176.14

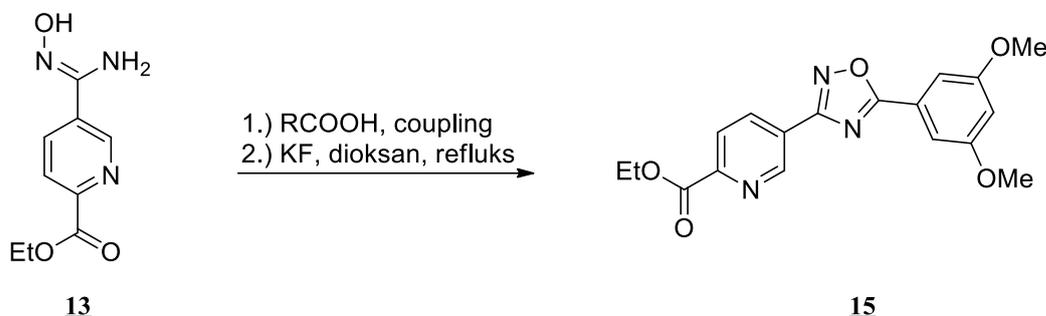
HPLC: Čistost spojine 97,3 % pri 254 nm (*t_R* = 10,20 min)

MS (ESI): 312,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₆H₁₄N₃O₄ [M+H]⁺: 312,0989 (izračunana: 312,0984)

4.15 Sinteza etil 5-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 15)

Reakcija:



Postopek:

250 mg (1,20 mmol) spojine 13 smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 261 mg (1,2 eq: 1,44 mmol) 3,5-dimetoksi benzojske kisline, 275 mg (1,2 eq: 1,44 mmol) EDC, 220 mg (1,2 eq: 1,44 mmol) HOBt, 0,33 mL (2 eq: 2,40 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP in vse skupaj raztopili v 1,5 mL DMF ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 208 mg (3 eq: 3,60 mmol) KF in 6 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili dioksan in nato produkt raztopili v 30 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 10 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. Organski fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo. Surov produkt smo prelili z dietil etrom, odnučali nastalo oborino ter dobili 135 mg čiste spojine 15.

Rezultati:

Izgled: bel prah

Izkoristek: 31,8%

Mr: 355,34

Elementna sestava: C₁₈H₁₇N₃O₅

Rf: 0,61 (MF: etilacetat)

T_{tališča}: 127-130 °C

IR (cm⁻¹): 1708, 1599, 1553, 1450, 1385, 1311, 1251, 1205, 1146, 1069, 1048, 970, 943, 854, 758, 698

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.37 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 3.88 (s, 6H, 2 × O-CH₃), 4.40 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 6.89 (t, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-Ar), 7.32 (d, 2H, $J = 2.0$ Hz, 2 × H-Ar), 8.27 (dd, 1H, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, H-Ar), 8.65 (dd, 1H, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, H-Ar), 9.37 (dd, 1H, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, H-Ar)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14.07, 55.75, 61.64, 105.68, 125.15, 125.26, 136.25, 147.83, 161.07, 164.07, 166.02, 175.84

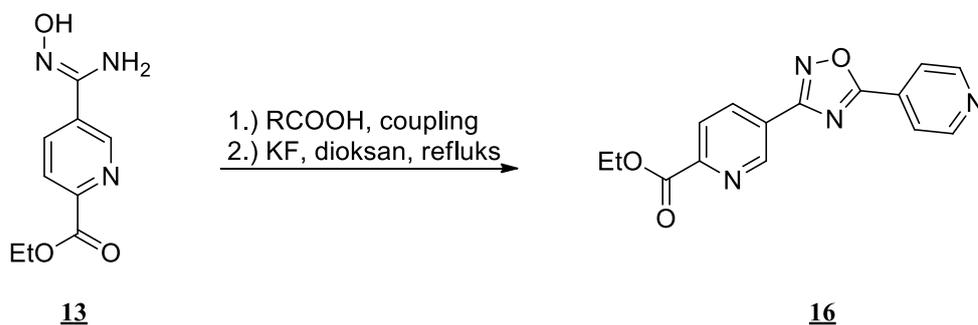
HPLC: Čistost spojine 100 % pri 254 nm ($t_R = 16,06$ min)

MS (ESI): 356,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₈H₁₈N₃O₅ [M+H]⁺: 356,1241 (izračunana: 356,1246)

4.16 Sinteza etil 5-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina **16**)

Reakcija:



Postopek:

120 mg (0,574 mmol) spojine **13** smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 85 mg (1,2 eq: 0,689 mmol) piridin-4-karboksilne kisline, 132 mg (1,2 eq: 0,689 mmol) EDC, 105 mg HOBt (1,2 eq: 0,689 mmol), 0,16 mL (2 eq: 1,148 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP in vse skupaj raztopili v 1,5 mL DMF ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 100 mg (3 eq: 1,722 mmol) KF in 6 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom upareli dioksan in nato produkt raztopili v 30 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 10 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. Organski fazi smo pod

znižanim tlakom uparili topilo. Surov produkt smo prelili z dietil etrom, odnučali nastalo oborino ter dobili 63 mg čiste spojine **16**.

Rezultati:

Izgled: bel prah

Izkoristek: 37,1%

Mr: 296,28

Elementna sestava: C₁₅H₁₂N₄O₃

Rf: 0,28 (MF: etilacetat)

T_{tališča}: 142-145 °C

IR (cm⁻¹): 1727, 1545, 1409, 1309, 1282, 1249, 1151, 1112, 1022, 965, 921, 858, 750, 692.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.37 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 4.41 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 8.15 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, 2 × H-Py), 8.29 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-Py), 8.67 (dd, 1H, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, H-Py), 8.94 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, 2 × H-Py), 9.39 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H-Py)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 14.08, 61.64, 121.41, 124.90, 125.31, 130.05, 136.27, 147.86, 149.88, 151.24, 158.27, 164.03, 166.29, 171.04, 174.55

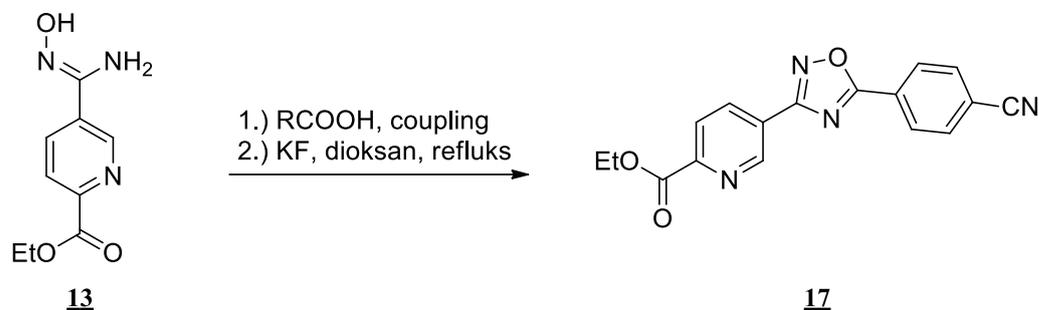
HPLC: Čistost spojine 100 % pri 254 nm (*t_R* = 5,91 min)

MS (ESI): 297,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₅H₁₃N₄O₃ [M+H]⁺: 297,0987 (izračunana: 297,0988)

4.17 Sinteza etil 5-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 17)

Reakcija:



Postopek:

150 mg (0,717 mmol) spojine **13** smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 127 mg (1,2 eq: 0,860 mmol) 4-cianobenzojske kisline, 165 mg (1,2 eq: 0,860 mmol) EDC, 132 mg (1,2 eq: 0,860 mmol) HOBt, 0,20 mL (2 eq: 1,434 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP in vse skupaj raztopili v 1,5 mL DMF ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 125 mg (3 eq: 2,151 mmol) KF in 6 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili dioksan in nato produkt raztopili v 30 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 10 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. Organski fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo. Produkt smo prelili z dietil etrom in odnučali nastalo oborino ter dobili 70 mg čiste spojine **17**.

Rezultati:

Izgled: rumen prah

Izkoristek: 30,5%

Mr: 320,30

Elementna sestava: C₁₇H₁₂N₄O₃

Rf: 0,70 (MF: etilacetat)

T_{tališča}: 169-172 °C

IR (cm⁻¹): 1740, 1712, 1590, 1555, 1494, 1407, 1367, 1332, 1280, 1245, 1172, 1134, 1110, 1024, 966, 860, 757, 726, 698

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.37 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 4.40 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 8.17 (dd, 2H, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 6.4 Hz, 2 × H-Ar), 8.28 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, H-Ar), 8.40 (dd, 2H, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 6.4 Hz, 2 × H-Ar), 8.66 (dd, 1H, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, H-Ar), 9.39 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, H-Ar)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 14.08, 61.64, 114.71, 115.59, 117.89, 124.96, 125.30, 126.89, 128.85, 133.53, 136.23, 147.86, 149.85, 164.03, 174.74

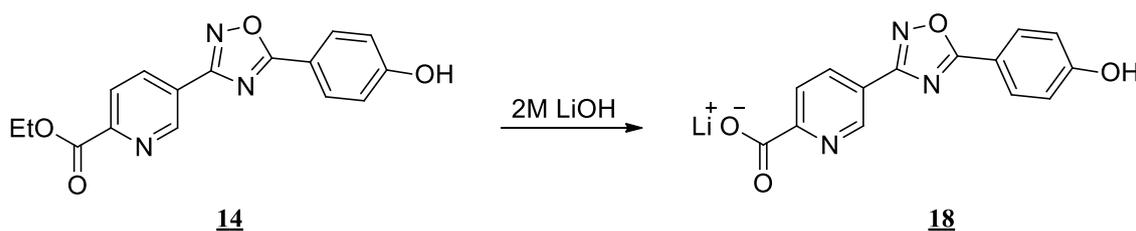
HPLC: Čistost spojine 99,0 % pri 254 nm (*t*_R = 12,96 min)

MS (ESI): 321,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₇H₁₃N₄O₃ [M+H]⁺: 321,0982 (izračunana: 321,0988)

4.18 Sinteza litijevega 5-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 18)

Reakcija:



Postopek:

V 10 mL bučko smo natehtali 20 mg (0,064 mmol) spojine 14, jo raztopili v 1,5 mL THF in dodali 257 μL (8 eq: 0,512 mmol) 2M LiOH. Reakcija je potekala pri sobni temperaturi. Po 20 urah smo nastalo oborino suspendirali v dietil etru in jo odnučali. Po sušenju v sušilniku smo dobili 17 mg spojine 18.

Rezultati:

Izgled: rjav prah

Izkoristek: 91,5%

Mr: 289,17

Elementna sestava: C₁₄H₈LiN₃O₄

Rf: /

T_{tališča}: > 300 °C

IR (cm⁻¹): 1582, 1405, 1344, 1289, 1172, 860, 764, 728

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 6.13 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2 × H-Ar), 7.58 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 × H-Ar), 8.08 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-Ar), 8.39 – 8.41 (m, 1H, H-Ar), 9.03 (s, 1H, H-Ar) * signal za OH skupino je skrit pod signalom za vodo pri 3.3 ppm

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 120.22, 120.25, 123.65, 123.92, 130.11, 130.30, 135.51, 145.83, 145.93, 166.71, 166.74, 167.27

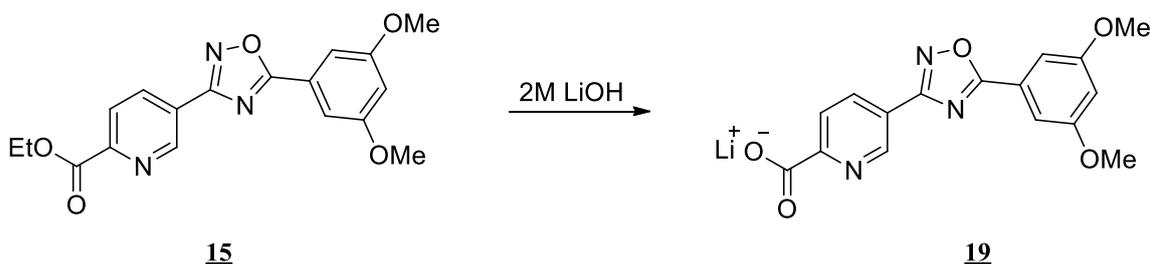
HPLC: Čistost spojine 99 % pri 254 nm (*t_R* = 4,82 min)

MS (ESI): 282,1 [M-Li]⁻

HR-MS za C₁₄H₈N₃O₄ [M-Li]⁻: 282,0518 (izračunana: 282,0515)

4.19 Sinteza litijevega 5-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 19)

Reakcija:



Postopek:

V 10 mL bučko smo natehtali 20 mg (0,056 mmol) spojine 15, jo raztopili v 1,5 mL THF in dodali 225 μL (8 eq: 0,448 mmol) 2 M LiOH. Reakcijo je potekala pri sobni temperaturi. Po 20 urah smo nastalo oborino suspendirali v dietil etru in jo odnučali. Po sušenju v sušilniku smo dobili 14 mg spojine 19.

Rezultati:

Izgled: bel prah

Izkoristek: 74,6%

Mr: 333,22

Elementna sestava: C₁₆H₁₂LiN₃O₅

Rf: /

T_{taliska}: > 300 °C

IR (cm⁻¹): 1603, 1577, 1404, 1358, 1336, 1211, 1165, 1136, 1069, 1049, 1029, 931, 860, 760

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3.88 (s, 6H, 2 × O-CH₃), 6.87 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, H-Ar), 7.32 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, 2 × H-Ar), 7.98 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-Ar), 8.38 (dd, 1H, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, H-Ar), 9.11 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, H-Ar)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 55.73, 105.60, 122.09, 123.60, 124.70, 135.50, 146.18, 159.85, 161.04, 166.51, 166.68, 175.53

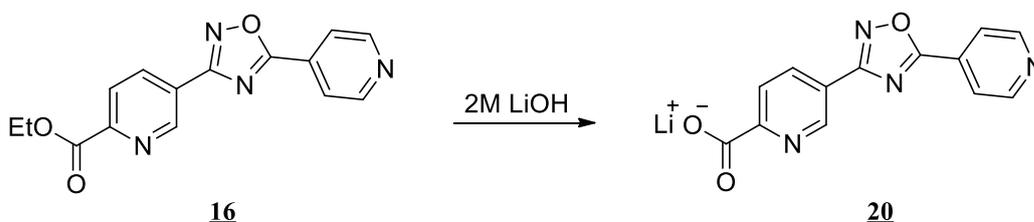
HPLC: Čistost spojine 100 % pri 254 nm (*t_R* = 10,50 min)

MS (ESI): 326,1 [M-Li]⁻

HR-MS za C₁₆H₁₂N₃O₅ [M-Li]: 326,0774 (izračunana: 326,0777)

4.20 Sinteza litijevega 5-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 20)

Reakcija:



Postopek:

V 10 mL bučko smo natehtali 35 mg (0,118 mmol) spojine 16, jo raztopili v 1,5 mL THF in dodali 473 μL (8 eq: 0,944 mmol) 2 M LiOH. Reakcijo je potekala pri sobni temperaturi. Po 20 urah smo nastalo oborino suspendirali v dietil etru in jo odnučali. Po sušenju v sušilniku smo dobili 30 mg spojine 20.

Rezultati:

Izgled: bel prah

Izkoristek: 92,6%

Mr: 274,16

Elementna sestava: C₁₃H₇LiN₄O₃

Rf: /

Tališča: > 300 °C

IR (cm⁻¹): 3566, 2920, 1563, 1547, 1401, 1323, 1138, 997, 858, 751, 735

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8.03 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-Py), 8.14 (dd, 1H, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 4.4 Hz, 2 × H-Py), 8.42 (dd, 1H, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, H-Py), 8.93 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, 2 × H-Py), 9.13 (dd, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, H-Py)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 121.38, 122.10, 123.25, 123.76, 130.15, 135.74, 146.22, 151.20, 159.50, 166.60, 166.74, 174.26

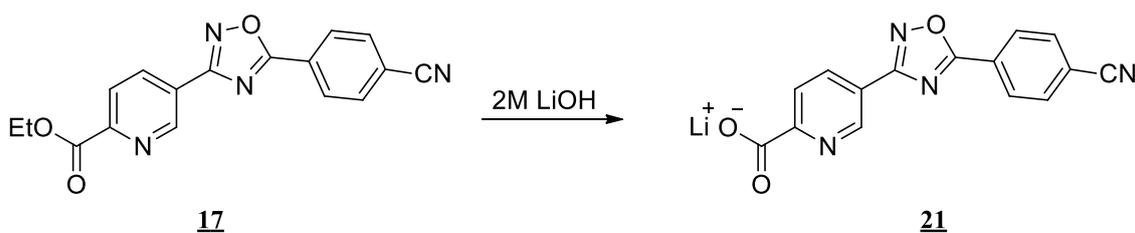
HPLC: Čistost spojine 100 % pri 254 nm (*t*_R = 2,32 min)

MS (ESI): 269,1 [M-Li+2H]²⁺

HR-MS za C₁₃H₉N₄O₃ [M-Li+2H]²⁺: 269,0680 (izračunana: 269,0675)

4.21 Sinteza litijevega 5-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 21)

Reakcija:



Postopek:

V 10 mL bučko smo natehtali 45 mg (0,140 mmol) spojine 17, jo raztopili v 1,5 mL THF in dodali 562 μL (8 eq: 1,120 mmol) 2 M LiOH. Reakcijo je potekala pri sobni temperaturi. Po 20 urah smo nastalo oborino suspendirali v dietil etru in jo odnučali. Po sušenju v sušilniku smo dobili 37 mg spojine 21.

Rezultati:

Izgled: bel prah

Izkoristek: 88,3%

Mr: 298,18

Elementna sestava: C₁₅H₇LiN₄O₃

Rf: /

T_{tališča}: > 300 °C

IR (cm⁻¹): 3374, 2235, 1618, 1585, 1384, 1332, 1279, 1255, 1166, 1135, 1026, 974, 860, 846, 758, 728, 704

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8.07 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-Py), 8.15 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2 × H-Ar), 8.39 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2 × H-Ar), 8.45 (dd, 1H, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 7.6 Hz, H-Py), 9.13 (s, 1H, H-Py)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 115.48, 117.91, 122.04, 123.67, 127.01, 128.79, 133.49, 135.61, 146.22, 166.70, 174.42

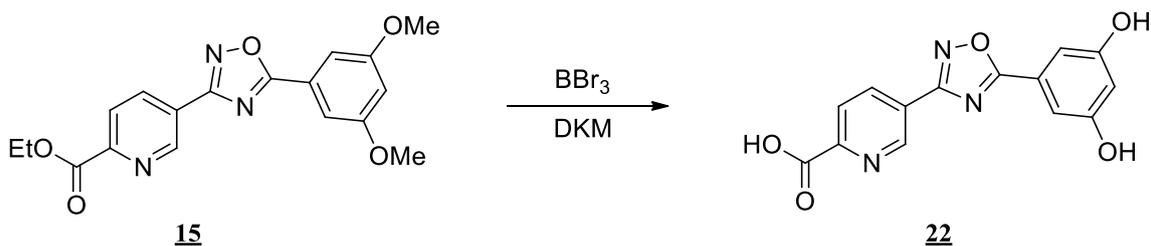
HPLC: Čistost spojine 96,4 % pri 254 nm (*t_R* = 7,43 min)

MS (ESI): 293,1 [M-Li+2H]⁺

HR-MS za C₁₅H₈N₄O₃ [M-Li+2H]⁺: 293,0683 (izračunana: 293,0675)

4.22 Sinteza 4-(5-(3,5-dihidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilne kisline (spojina 22)

Reakcija:



Postopek:

60 mg (0,169 mmol) spojine 15 smo natehtali v 25-mL bučko, jo raztopili v 1 mL DKM in na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Dodali smo 2,02 mL (12 eq: 2,028 mmol) BBr₃ in mešali na ledeni kopeli še 10 min, nato smo kopel odstavili in pustili, da je reakcija potekala na sobni temperaturi. Čez 20 ur smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije. V reakcijsko zmes smo dodali 6 mL NaHCO₃ in 30 mL etilacetata ter fazi ločili. Večina

produkta se je nahajala v vodni fazi, zato smo jo z 1M HCl nakisali do pH = 3 in jo reekstrahirali s 3×10 mL etilacetata. Vse organske faze smo združili, uparili topilo in dobili 10 mg spojine **22**.

Rezultati:

Izgled: bel prah

Izkoristek: 19,8%

Mr: 299,24

Elementna sestava: C₁₄H₉N₃O₅

Rf: /

T_{tališča}: > 300 °C

IR (cm⁻¹): 2875, 1650, 1561, 1473, 1386, 1300, 1177, 1132, 1018, 1003, 932, 838, 805.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 6.55 (s, 1H, H-Ar), 7.06 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, 2 × H-Ar), 8.24 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, H-Ar), 8.59 (dd, 1H, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, H-Ar), 9.32 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, H-Ar), 9.97 (s, 2H, 2 × Ar-OH), 13.59 (s, 1H, COOH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 105.82, 107.69, 122.71, 124.05, 137.42, 147.43, 159.30, 166.12, 176.63

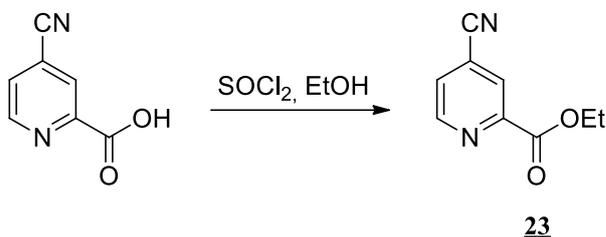
HPLC: Čistost spojine 97,3 % pri 254 nm (*t*_R = 2,99 min)

MS (ESI): 300,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₄H₁₀N₃O₅ [M+H]⁺: 300,0627 (izračunana: 300,0620)

4.23 Sinteza etil 4-cianopiridin-2-karboksilata (spojina 23)

Reakcija:



Postopek:

240 mg (1,62 mmol) 4-cianopiridin-2-karboksilne kisline smo natehtali v 25 mL bučko in jo raztopili v 7 mL brezvodnega etanola. Raztopino smo 10 min mešali na sobni temperaturi, nato smo jo ohladili na ledeni kopeli in dodali 129 μ l (1,1 eq: 1,78 mmol) tionil klorida. Reakcijsko zmes smo dve uri mešali na sobni temperaturi, nato smo jo prenesli še na oljno kopel in 20 ur segrevali pri temperaturi refluksa ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo in suh preostanek raztopili v 20 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 10 mL vode. Vodno fazo smo reekstrahirali s 3×10 mL etilacetata, vse organske faze združili, jih posušili z nasičeno raztopino NaCl in Na₂SO₄ ter uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 245 mg spojine 23.

Rezultati:

Izgled: bela amorfna snov

Izkoristek: 85,8%

Mr: 176,17

Elementna sestava: C₉H₈N₂O₂

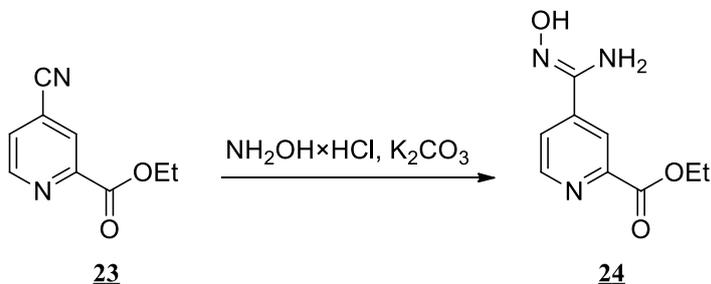
Rf: 0,52 (MF: etilacetat)

T_{tališča}: 89-93 $^{\circ}\text{C}$ (89)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.34 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 4.38 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₂-CH₃), 8.14 (dd, 1H, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-Py), 8.43 (dd, 1H, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, H-Py), 8.98 (dd, 1H, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-Py)

4.24 Sinteza etil 4-(N'-hidroksikarbamimidoil)piridin-2-karboksilata (spojina 24)

Reakcija:



Postopek:

230 mg (1,31 mmol) spojine **23** smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 136 mg (1,5 eq; 1,97 mmol) hidroksilaminijevega klorida ($\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$) in 271 mg (1,5 eq; 1,97 mmol) kalijevega karbonata (K_2CO_3). V bučko smo dodali še 5 mL etanola in reakcijsko zmes mešali na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo zmes dve uri segrevali še pri temperaturi 40 °C in nato s TLC-jem zaznali konec reakcije. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili topilo, k preostanku dodali 40 mL etilacetata in spirali z 10 mL vode. Vodno fazo smo reekstrahirali z 2×10 mL etilacetata, vse organske faze združili, jih posušili z nasičeno raztopino NaCl in Na_2SO_4 ter uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 195 mg spojine **24**.

Rezultati:

Izgled: bela amorfna snov

Izkoristek: 71,4%

Mr: 209,20

Elementna sestava: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$

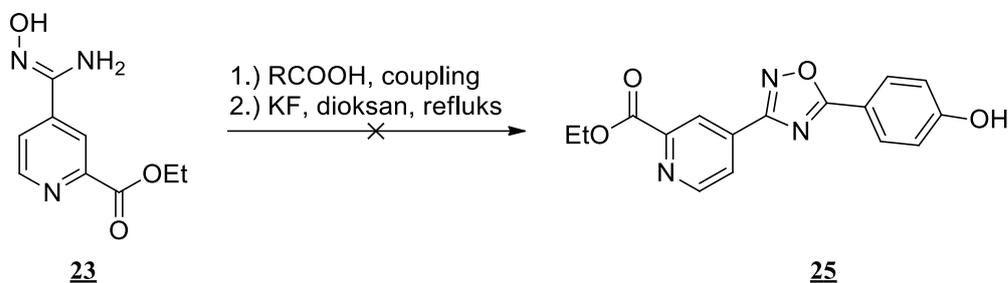
Rf: 0,23 (MF: etilacetat)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.34 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.35 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 6.15 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 7.87 (dd, 1H, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-Py), 8.34 (t, 1H, $J = 0.8$ Hz, H-Py), 8.72 (dd, 1H, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-Py), 10.21 (s, 1H, $-\text{N-OH}$)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14.10, 61.25, 120.51, 122.63, 141.78, 147.79, 148.28, 150.03, 164.59

4.25 Poskus sinteze etil 4-(5-(4-hidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 25)

Reakcija:



Postopek:

69 mg (0,330 mmol) spojine 23 smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 55 mg (1,2 eq: 0,396 mmol) 4-hidroksibenzojske kisline, 76 mg (1,2 eq: 0,396 mmol) EDC, 61 mg (1,2 eq: 0,396 mmol) HOBt, 67 μ L (2 eq: 0,660 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP in vse skupaj raztopili v 1,5 mL DMF ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 58 mg (3 eq: 0,990 mmol) KF in 5 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo na TLC ploščici zaznali večje število lis, a vseeno izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod nižanim tlakom uparili dioksan in nato produkt raztopili v 30 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 10 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. NMR spekter ni kazal čiste spojine, zato smo izvedli kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat). Izolirali smo več čistih frakcij z različnimi retencijskimi faktorji, a glede na posnete NMR spektre nobena ni predstavljala našega produkta.

Rezultati:

Izgled: siv prah

Izkoristek: /

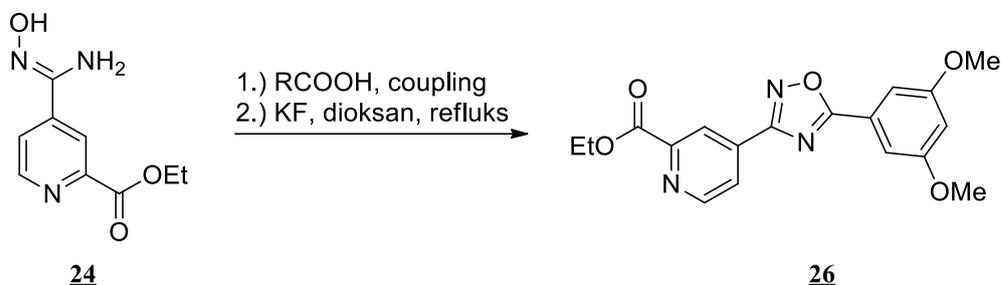
Mr: 311,29

Elementna sestava: C₁₆H₁₃N₃O₄

Rf: /

4.26 Sinteza etil 4-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 26)

Reakcija:



Postopek:

55 mg (0,263 mmol) spojine 24 smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 58 mg (1,2 eq: 0,316 mmol) 3,5-dimetoksi benzojske kisline, 61 mg (1,2 eq: 0,316 mmol) EDC, 48 mg (1,2 eq: 0,316 mmol) HOBt, 73 μ L (2 eq: 0,526 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP in vse skupaj raztopili v 1,5 mL DMF ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 46 mg (3 eq: 0,789 mmol) KF in 5 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 °C. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili dioksan in nato produkt raztopili v 30 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 10 mL nasičene NaHCO₃, 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na₂SO₄. Nastali surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat) in dobili 45 mg spojine 26.

Rezultati:

Izgled: temno rjav prah

Izkoristek: 48,2%

Mr: 355,34

Elementna sestava: C₁₈H₁₇N₃O₅

Rf: 0,55 (MF: etilacetat)

T_{tališča}: 120 - 123 °C

IR (cm⁻¹): 1741, 1572, 1453, 1367, 1302, 1239, 1207, 1149, 1060, 835, 756, 735, 687

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.38 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 3.88 (s, 6H, 2 \times O-CH₃), 4.42 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 6.89 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, H-Ar), 7.32

(d, 2H, $J = 2.0$ Hz, $2 \times \underline{H}$ -Ar), 8.28 (dd, 1H, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, \underline{H} -Py), 8.59 (dd, 1H, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, \underline{H} -Py), 8.98 (dd, 1H, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, \underline{H} -Py)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 14.09, 55.76, 61.68, 105.67, 110.61, 121.52, 121.70, 124.32, 124.49, 148.86, 151.14, 151.26, 161.07, 164.10

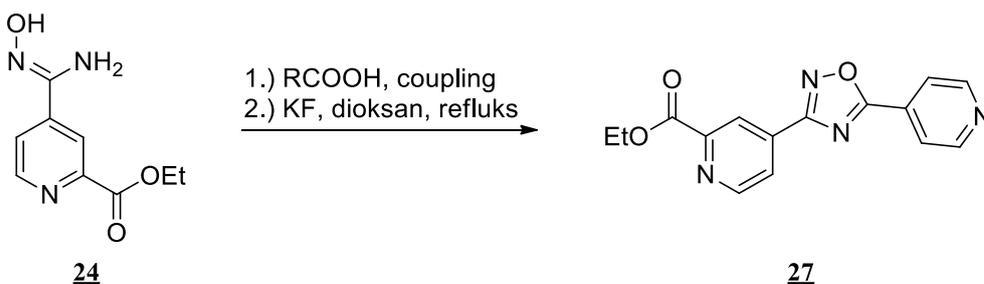
HPLC: Čistost spojine 99,3 % pri 254 nm ($t_R = 15,97$ min)

MS (ESI): 356,1 [M+H] $^+$

HR-MS za $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5$ [M+H] $^+$: 356,1239 (izračunana: 356,1246)

4.27 Sinteza etil 4-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 27)

Reakcija:



Postopek:

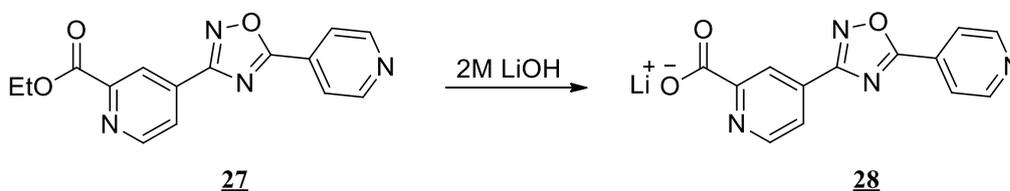
60 mg (0,287 mmol) spojine 24 smo natehtali v 25 mL bučko in dodali 35 mg (1 eq: 0,287 mmol) piridin-4-karboksilne kisline, 61 mg (1,1 eq: 0,316 mmol) EDC, 48 mg (1,1 eq: 0,316 mmol) HOBt, 80 μL (2 eq: 0,574 mmol) trietilamina, konico spatule DMAP-a in vse skupaj raztopili v 2 mL DMF ter mešali na sobni temperaturi. Po dveh urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanek vmesnega produkta, zato smo začeli z reakcijo ciklizacije. Dodali smo 50 mg (3 eq: 0,861 mmol) KF in 5 mL dioksana ter reakcijsko zmes refluktirali na oljni kopeli pri temperaturi 110 $^{\circ}\text{C}$. Po 18 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili dioksan in nato produkt raztopili v 30 mL etilacetata, ki smo ga spirali z 10 mL nasičene NaHCO_3 , 10 mL nasičene NaCl in posušili z Na_2SO_4 . NMR spekter ni kazal čiste spojine, zato smo izvedli kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat) in dobili 37 mg zmesi spojin 24 in 27. Zmes smo prelili z dietil etrom, odnučali nastalo oborino in dobili 15 mg čiste spojine 27.

Rezultati:**Izgled:** rjav prah**Izkoristek:** 17,7%**Mr:** 296,28**Elementna sestava:** C₁₅H₁₂N₄O₃**Rf:** 0,23 (MF: etilacetat)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.38 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 4.42 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 8.16 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, 2 × H-Py), 8.30 (dd, 1H, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, H-Py), 8.61 (dd, 1H, *J*₁ = 0.4 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, H-Py), 8.94 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, 2 × H-Py), 9.00 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, H-Py)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 14.07, 61.72, 121.44, 121.73, 124.31, 130.03, 134.50, 151.22, 151.35, 151.41, 164.05, 166.74

4.28 Sinteza litijevega 3-(5-(piridin-4-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilata (spojina 28)

Reakcija:**Postopek:**

V 10 mL bučko smo natehtali 14 mg (0,047 mmol) spojine 27, jo raztopili v 1,5 mL THF in dodali 189 μL (8 eq: 0,376 mmol) 2 M LiOH. Reakcijo je potekala pri sobni temperaturi. Po 20 urah smo nastalo oborino suspendirali v dietil etru in jo odnučali. Po sušenju v sušilniku smo dobili 10 mg spojine 28.

Rezultati:**Izgled:** bel prah**Izkoristek:** 79,2%**Mr:** 274,16**Elementna sestava:** C₁₃H₇LiN₄O₃

Rf: /

T_{tališča}: > 300 °C

IR (cm⁻¹): 1653, 1582, 1414, 1385, 1360, 1332, 1279, 1063, 990, 859, 837, 750, 709

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7.98 (dd, 1H, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, H-Py), 8.16 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, 2 × H-Py), 8.55 (s, 1H, H-Py), 8.72 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz, H-Py), 8.93 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, 2 × H-Py)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 121.40, 124.26, 130.18, 132.46, 132.97, 143.59, 149.19, 151.21, 166.54, 167.47, 174.58

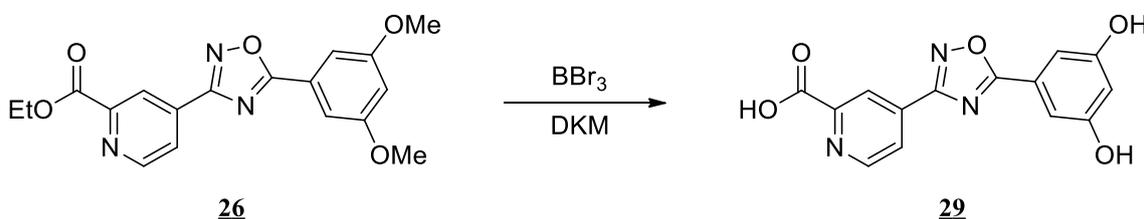
HPLC: Čistost spojine 97,6 % pri 254 nm (*t*_R = 2,20 min)

MS (ESI): 269,1 [M-Li+2H]⁺

HR-MS za C₁₃H₈N₄O₃ [M-Li+2H]⁺: 269,0677 (izračunana: 269,0675)

4.29 Sinteza 4-(5-(3,5-dihidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilne kisline (spojina 29)

Reakcija:



Postopek:

40 mg (0,113 mmol) spojine 26 smo natehtali v 25-mL bučko, jo raztopili v 1 mL DKM in na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Dodali smo 1,35 mL (12 eq: 1,356 mmol) BBr₃ in mešali na ledeni kopeli še 10 min, nato smo kopel odstavili in pustili, da je reakcija potekala na sobni temperaturi. Čez 20 ur smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije. V reakcijsko zmes smo dodali 6 mL NaHCO₃, jo z 1M HCl nakisali do pH = 3 in ekstrahirali z 3 × 20 mL etilacetata. Združenim organskim fazam smo uparili topilo in dobili 27 mg spojine 29.

Rezultati:

Izgled: temno rjav prah

Izkoristek: 33,7%

Mr: 299,24

Elementna sestava: C₁₄H₉N₃O₅

Rf: /

T_{tališča}: > 300 °C

IR (cm⁻¹): 3213, 1735, 1569, 1454, 1354, 1307, 1164, 1004, 929, 856, 759, 716, 675

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 6.54 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, H-Ar), 7.06 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, 2 × H-Ar), 8.22 (dd, 1H, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, H-Py), 8.58 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, H-Py), 8.96 (dd, 1H, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 5.2 Hz, H-Py), 9.98 (s, 2H, 2 × Ar-OH) * signal za COOH skupino je skrit pod signalom za vodo pri 3.3 ppm

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 103.79, 103.88, 105.80, 124.17, 126.65, 128.15, 134.80, 139.13, 141.41, 142.11, 159.30, 176.43

HPLC: Čistost spojine 95,3 % pri 254 nm (*t*_R = 2,75 min)

MS (ESI): 300,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₄H₁₀N₃O₅ [M+H]⁺: 300,0623 (izračunana: 300,0620)

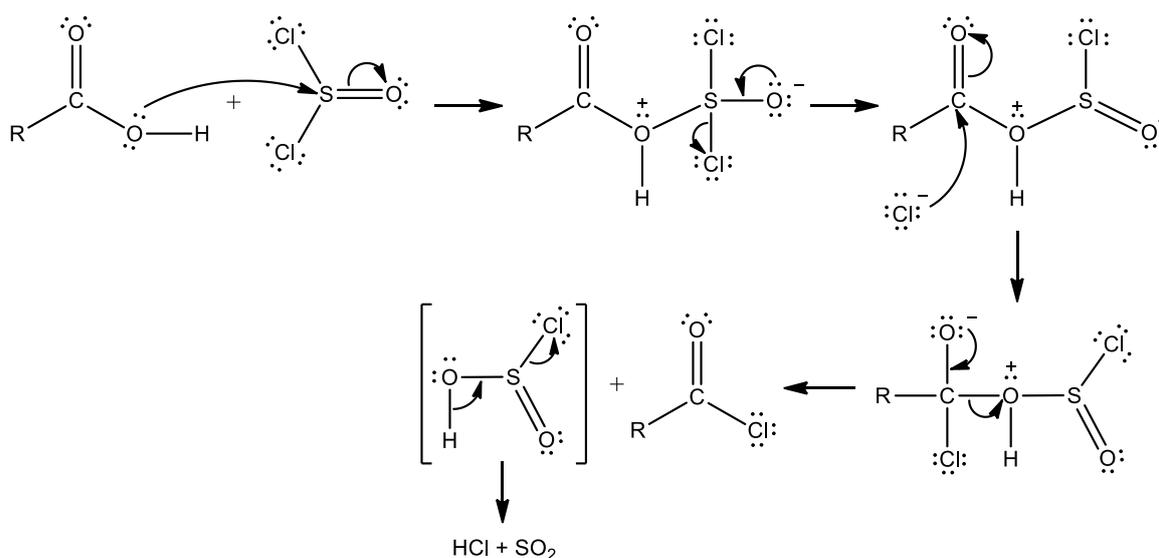
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 SINTEZNI POSTOPKI

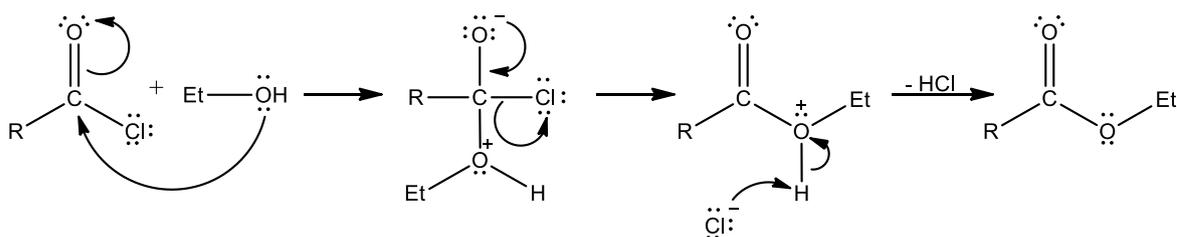
5.1.1 Esterifikacija

Izhodne spojine (3-cianobenzojska kislina, 5-cianopiridin-2-karboksilna kislina, 4-cianopiridin-2-karboksilna kislina) smo v prvi fazi sinteze pretvorili v etilne estre. S tem smo povečali selektivnost nadaljnjih reakcij, saj smo zaščitili karboksilno skupino, ki bi lahko v naslednji stopnji reakcije ob dodatku sklopitvenega reagenta zaradi svoje aktivacije tvorila neželene stranske produkte. Kot reagent smo uporabili tionil klorid (SOCl_2), ki karboksilne skupine pretvori v močno reaktivne kislinske kloride, ki nato reagirajo z alkoholi do ustreznih estrov. Pri naši sintezi smo kot topilo uporabili brezvodni etanol v prebitku, ki je s kislinskim kloridom nato reagiral do etilnega estra. Pri tej reakciji je potrebna uporaba brezvodnega etanola, saj lahko ob prisotnosti vode kislinski klorid hidrolizira do kisline (90, 91).

Pri sintezi kislinskega klorida s tionil kloridom poteka dvojna zaporedna nukleofilna adicija s sledečo eliminacijo. Kisik karboksilne kisline napade žveplov atom tionil klorida. Pri reakciji nastane kloridni ion, ki napade protoniran acil klorosulfit. Pri tem iz reakcije kot dobro izstopajoča skupina izstopa SO_2Cl , nastane pa kislinski klorid (Slika 17). V drugi stopnji sinteze estra prosti elektronski par na kisiku v molekuli EtOH napade karbonilno skupino kislinskega klorida, pri čemer izstopita Cl^- in H^+ in tako kot končni produkt dobimo etilni ester (Slika 18) (90).



Slika 17 Sinteza kislinskega klorida z uporabo SOCl_2



Slika 18 Nastanek estra iz kislinskega klorida

Pri izolaciji spojin **1** in **12** smo po uparivanju topila dobili oljnat zaostanek, kar je kazalo, da imamo v zaostanku prisotnega še precej tionil klorida. Dodali smo dietil eter in zmes uparili pod znižanim tlakom, a se produkta še vedno ni dalo upariti do suhega. Izolacijo smo nadaljevali z dodatkom etilacetata in spiranjem organske faze z vodo pri spojini **12** in z NaHCO₃ pri **1**. Organsko fazo smo posušili z nasičeno raztopino NaCl ter Na₂SO₄ ter uparili topilo. Na sobni temperaturi je produkt prešel iz tekočega v trdno agregatno stanje. Izkoristek pri sintezi spojine **12** je bil 83 %, pri **1** pa 71 %, kar je za to reakcijo razmeroma nizko. Eden izmed vzrokov za nižji izkoristek pri spojini **1** je verjetno tudi nastanek oborine pri dodatku etilacetata – oborino smo zavržli, ker ni predstavljala našega produkta. Pri izolaciji spojine **23** smo izpustili korak z dodajanjem dietil etra in takoj izvedli ekstrakcijo z etilacetatom in vodo. Izkoristek se je povečal za približno 2 %.

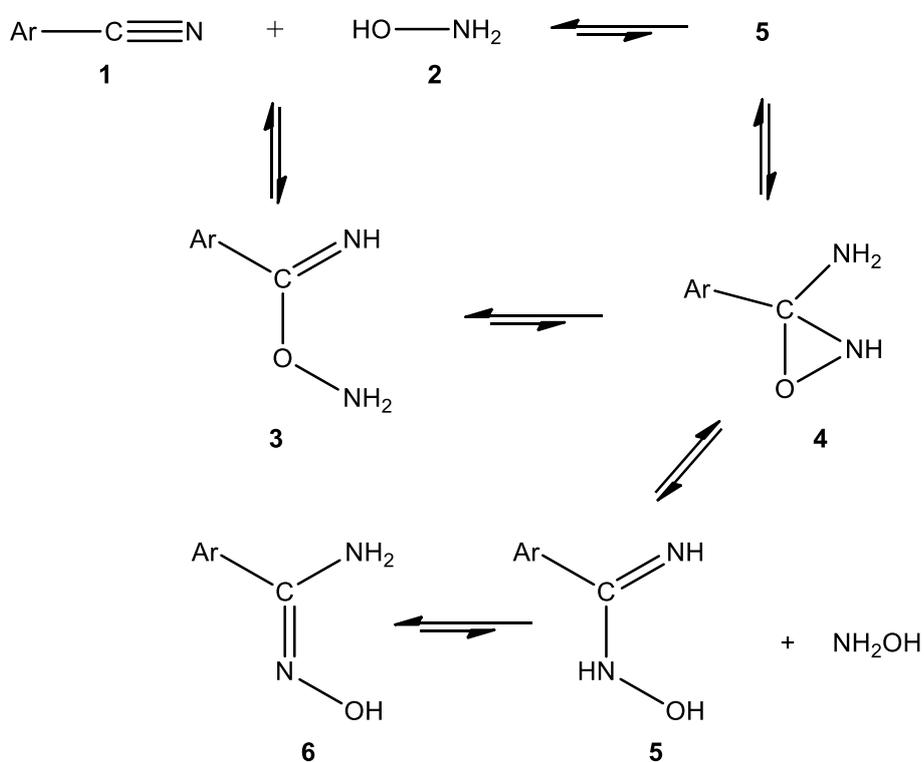
Poleg tionil klorida bi lahko za sintezo kislinskega klorida uporabili še oksalil klorid ((COCl)₂), fosforjev tri- ali pentaklorid (PCl₃, PCl₅) ali fosforil klorid (POCl₃). Ester bi lahko pripravili tudi z drugimi aktiviranimi derivati karboksilnih kislin, kot npr. z anhidridom kisline, drugim estrom ali z amidom, ki pa so vsi manj reaktivni kot kislinski klorid. Prav tako bi se lahko poslužili metode sinteze estrov s pomočjo sklopitvenega reagenta, ki ga dodamo direktno v zmes karboksilne kisline in alkohola. Prednost te metode je selektivna aktivacija karboksilne kisline v intermediate, ki v nadaljevanju reagirajo z alkoholom. Najpogosteje uporabljeni sklopitveni reagenti so DCC (N,N'-dicikloheksilkarbodiimid), CDI (N,N'-karbonildiimidazol), EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) in BOP (benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat) (92).

Kislinsko katalizirana (Fischerjeva) esterifikacija je zelo enostavna in dokaj pogosta metoda priprave estrov, pri kateri poteka reakcija karboksilne kisline z alkoholom v prisotnosti močne kisline, poleg estra pa je med produkti tudi voda. Gre za reverzibilno

reakcijo, ki jo lahko usmerimo v smer nastajanja estra, če uporabimo prebitek karboksilne kisline ali alkohola (lahko ga uporabimo kot topilo) ali pa če iz sistema sproti odstranjujemo vodo (90). To lahko dosežemo z dodatkom raznih sušilnih sredstev ali pa z uporabo Dean-Starkove pasti ob azeotropni destilaciji (92).

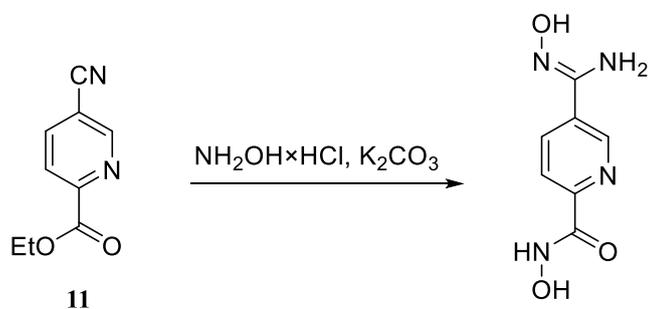
5.1.2 Sinteza amidoksima

Hidroksilaminijev klorid je kristalinična snov, ki ob dodatku baze (v našem primeru K_2CO_3) tvori hidroksilamin, ustrezno sol (KCl), vodo in CO_2 . V našem primeru ima vlogo nukleofila, ki s kisikom napade ogljikov atom nitrila, pri čemer nastane intermediat 3. Zaradi elektrostatske interakcije med amskim dušikom in iminskim ogljikom pride do tvorbe nestabilnega oksaziridinskega obroča 4. S cepitvijo vezi C-O nastane intermediat 5, v zadnji fazi pa s tautomerizacijo še končni produkt, amidoksim 6 (Slika 19) (93). Hidroksilamin je ambidenten nukleofil, zato bi lahko tako z dušikom kot s kisikom napadel nitrilni ogljikov atom. Vendarle pa so študije pokazale, da v ravnotežju nastane zwitterion $^+NH_3O^-$, zato mehanizem nukleofilne adicije poteka preko kisika (94).



Slika 19 Shema nastanka amidoksima. Prirejeno po Rajendra et al. [93]

Spojine **2**, **13** in **24** smo sintetizirali z adicijo hidroksilamina na nitrilno funkcionalno skupino, prisotno v predhodnih spojinah. Kot topilo smo izbrali etanol, medtem ko smo poleg hidroksilaminijevega klorida ($\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$) kot reagent uporabili še kalijev karbonat (K_2CO_3), s katerim smo zagotovili alkalne pogoje in s tem prost hidroksilamin. Pri sintezi spojine **2** smo uporabili dva ekvivalenta $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ in K_2CO_3 , reakcija pa je potekala pri temperaturi refluxa preko noči ($T = 80\text{ }^\circ\text{C}$). Pri poskusu sinteze spojine **13** pod enakimi pogoji smo dobili zmes različnih produktov. Ko smo reakcijski zmesi uparili topilo, k preostanku pa dodali etilacetat, ki smo ga nato spirali z vodo, NaCl in posušili z Na_2SO_4 , je bilo namreč izredno malo spojine v organski fazi, velik del pa v vodni, kar kaže na to, da je hidroksilamin verjetno napadel tudi ester in tako tvoril veliko bolj polarno spojino (Slika 20). Zaradi tega smo pri nadaljnjih sintezah spojin **13** in **24** uporabili 1,5 ekvivalenta obeh reagentov in milejše pogoje – reakcija je potekala preko noči pri sobni temperaturi in potem še dve uri na $40\text{ }^\circ\text{C}$. Pri spojini **13** smo po dveh urah dodali še 0,5 ekvivalenta obeh reagentov in povišali temperaturo na $50\text{ }^\circ\text{C}$. Ko smo s TLC-jem zaznali konec reakcije, smo začeli z izolacijo. Najprej smo uparili etanol, nato dodali etilacetat in spirali z vodo. Vodno fazo smo reekstrahirali z etilacetatom, združili vse organske faze, jih posušili z nasičeno raztopino NaCl in Na_2SO_4 ter uparili topilo. Izkoristki reakcij so bili med seboj primerljivi ($\sim 70\%$).



Slika 20 Potencialni neželeni produkt pri stranski reakciji hidroksilamina z estrom

5.1.3 Sinteza 1,2,4-oksadiazolnega obroča

Sintezo različno substituiranih 1,2,4-oksadiazolov smo izvedli s ciklizacijo *O*-acilamidoksimov.

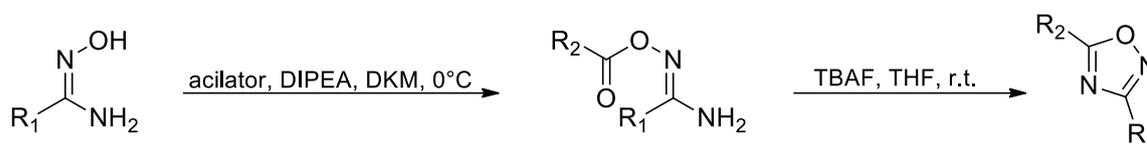
- V prvi stopnji smo uporabili t.i. »coupling« metodo (metodo sklopitve), pri kateri smo najprej v topilu DMF izbrano karboksilno kislino aktivirali s sklopitvenim

reagentom in tako omogočili *O*-aciliranje izbranega amidoksima. Kot sklopitveni reagent smo uporabili EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid), ki smo mu kot pomožna nukleofila oziroma katalizatorja reakcije, ki pospešita sklopitev, dodali še hidroksibenzotriazol (HOBt) in 4-dimetilaminopiridin (DMAP). Ker smo uporabili EDC v obliki EDC × HCl, smo v reakcijsko zmes dodali še bazo (trietilamin).

- V drugi stopnji smo izvedli intramolekulsko ciklodehidracijo brez predhodne izolacije produkta. Kot reakcijsko topilo smo uporabili dioksan, kot dehidracijsko sredstvo pa smo dodali še KF in vse skupaj 20 ur refluktirali pri temperaturi 110 °C. Izolacijo vseh spojin smo izvedli na podoben način: najprej smo reakcijski zmesi uparili dioksan in dodali etilacetat, ki smo ga spirali z vodnimi raztopinami kislin ali baz in ustrezno posušili. S tem smo se znebili prebitnih reagentov in nekaterih možnih nečistot ter zagotovili, da je naš produkt v celoti prešel v organsko fazo. Etilacetat smo nato uparili in dobili oborino, ki smo jo po potrebi še dodatno očistili z različnimi metodami (izobarjanje, kolonska kromatografija).

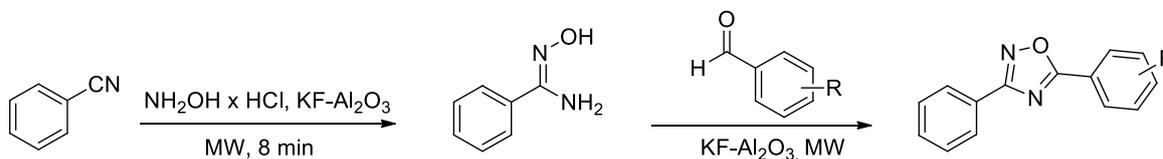
Ker so NMR spektri v surovih produktih **14**, **15**, **16**, **17** in **27** pokazali na prisotnost nečistot, smo oborine prelili z dietil etrom, v katerem so nekatere nečistote, za razliko od naših spojin, zelo dobro topne. S tem smo na enostaven način očistili zelene spojine, kar je potrdila tudi analiza z NMR spektroskopijo. Končni izkoristki so bili precej nizki (10.6 %, 31.8 %, 37.1 %, 30,5 %, 17,7 %). Izgube z izobarjanjem so bile v vseh primerih več kot 50 %, kar kaže na to, da reakcija ni potekala selektivno in da je bil delež nečistot razmeroma visok. Hkrati lahko iz rezultatov sklepamo, da so tudi naše spojine delno topne v dietil etru. Surove produkte **3**, **4**, **5** in **6** smo očistili z metodo prekrystalizacije iz etanola tako, da smo jih raztopili v najmanjšem možnem volumnu vročega etanola. Pri sledečem ohlajanju so se začeli tvoriti kristali iskanih spojin. S tem smo, sodeč po NMR in ostalih analizah, dobro očistili naš produkt. Pri tem postopku so bile izgube malo večje kot pri končnem čiščenju z izobarjanjem in zato končni izkoristki nekoliko nižji (7.1 %, 21.8 %, 14.2 %, 22.2 %). Podobno lahko tudi pri teh spojinah zaključimo, da je bil delež nečistot v surovem produktu pred končnim čiščenjem dokaj visok. Spojine **3**, **26** in **27** smo predhodno očistili tudi s kolonsko kromatografijo, a ker se je izolacija s prekrystalizacijo oz. spiranje z dietil etrom izkazalo za hitrejše in učinkovitejše, čiščenja s kolonsko kromatografijo pri preostalih spojinah nismo več izvajali.

S sinteznim postopkom, ki smo ga uporabili pri ostalih spojinah, smo poskusili sintetizirati tudi spojino **25**, a žal neuspešno. Analiza NMR spektrov je pokazala, da imamo v končni oborini nečist produkt, zato smo ga poskusili očistiti s kolonsko kromatografijo in zbrali skupne frakcije vsake posamezne lise. V nobeni frakciji z NMR analizo nismo uspeli dokazati nedvoumnega nastanka spojine **25**. Ker smo tudi pri sintezah spojin **3** ($\eta = 7.1\%$) in **14** ($\eta = 10.6\%$) dosegli najnižje izkoristke med vsemi in ker je vsem trem spojinam skupna hidroksilna skupina, ki v reakcijah predstavlja kompetitivni nukleofil, lahko sklepamo, da so se zaradi ostrih reakcijskih pogojev in reaktivnega intermedata tvorili neželeni stranski produkti. V tem primeru bi lahko reakcijo poskusili izvesti pod blažjimi reakcijskimi pogoji. Kot katalizator bi lahko v topilu THF uporabili TBAF (tetra-*n*-butilamonijev fluorid), ki olajša in pospeši ciklodehidracijo (Slika 21), pri čemer reakcija poteka že na sobni temperaturi (95).



Slika 21 Sinteza 1,2,4-oksadiazola z uporabo TBAF kot katalizatorja

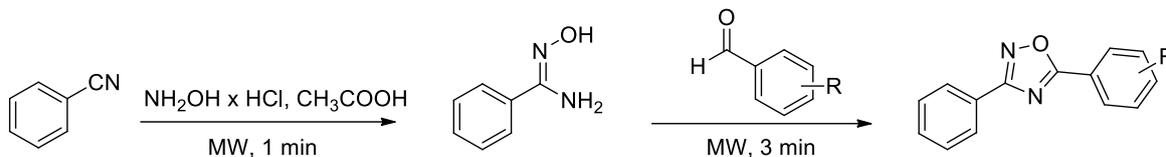
Kot učinkovit alternativni postopek za sintezo 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov se je izkazala metoda z uporabo mikrovalov, ki skrajša reakcijski čas in izboljša izkoristek reakcije. V prvi stopnji izbranemu benzonitrilu dodamo hidroksilamin in katalizator KF-Al₂O₃ ter reakcijsko zmes za 8 minut izpostavimo mikrovalovom. V drugi stopnji »in situ« nastalemu amidoksimu dodamo še ustrezen substituiran benzaldehid in zopet izpostavimo mikrovalovom, dokler s TLC-jem ne zaznamo nastanek končnega produkta 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola (Slika 22) (96).



Slika 22 Potek sinteze 1,2,4-oksadiazolov z uporabo mikrovalov in KF-Al₂O₃

Možnih je več sinteznih poti za nastanek oksadiazolnega obroča z uporabo mikrovalov. Adib in sodelavci so leta 2006 poročali o izjemno hitrem nastanku končnega produkta z odličnim izkoristkom (Slika 23). Podobno kot z uporabo KF-Al₂O₃ so v prvi stopnji

benzonitrilu in hidroksilaminu kot katalizator dodali ocatno kislino in v drugi stopnji še ustrezno substituiran benzaldehid (97).



Slika 23 Potek sinteze 1,2,4-oksadiazolov z uporabo mikrovalov in ocatne kisline

5.1.4 Hidroliza estra

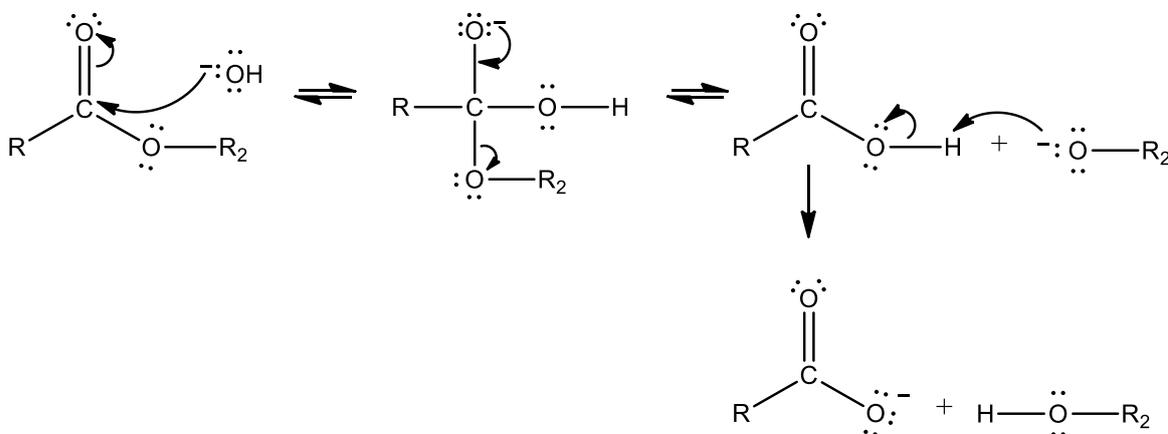
Estre lahko hidroliziramo na različne načine. V našem magistrskem delu smo se odločili za alkalno hidrolizo z osmimi ekvivalenti 2M litijevega hidroksida (LiOH), pri čemer smo kot sotopilo izbrali THF. Najprej smo pri sintezi spojine **8** poskusili z uporabo štirih ekvivalentov baze, ki smo jim po dveh urah mešanja na sobni temperaturi dodali še dva, a reakcija ni potekla do konca. Naslednji dan smo dodali še dva ekvivalenta in s TLC-jem zaznali konec reakcije. V vseh sledečih hidrolizah smo zaradi tega uporabili osem ekvivalentov LiOH in mešanje na sobni temperaturi. Vse reakcije so potekale z dobrim izkoristkom ($> 75\%$), le pri sintezi spojine **8** je bil le-ta nižji (49%). Razlog tiči verjetno v dejstvu, da je to bila naša modelna spojina, pri kateri smo postopek hidrolize šele razvijali in smo eksperimentirali s količino reagenta.

Po končani reakciji smo reakcijskim zmesem, ki so vsebovale spojine **7**, **8**, **9**, in **10** uparili THF, dodali destilirano vodo in zadostno količino HCl za nevtralizacijo LiOH. Naš produkt se je zaradi slabe topnosti v vodni raztopini izoboril, tako da smo ga izolirali z nučanjem. Pri izolaciji spojin **7**, **8** in **10** nismo imeli težav, saj je v strukturi spojin prisoten samo en kisli center, ki pri dovolj nizkem pH-ju ne disociira. Zaradi tega te spojine niso bile topne v vodnih raztopinah in so se takoj po odstranitvi organskega topila oborile. Pri spojini **9** sta prisotna tako kisel kot bazični center, zato smo morali biti pri izolaciji še posebej pozorni na pH, ki je moral biti med 3 in 4, da spojina ne ni nabita.

Pri sintezi spojin **18**, **19**, **20**, **21** in **28** se je oborina tvorila že ob mešanju na sobni temperaturi v THF v obliki litijevih soli zelenih spojin. Vsem tem spojinam je skupno, da imajo za razliko od spojin **7**, **8**, **9** in **10** namesto fenilnega obroča v strukturi substituiran piridin. Zaradi tega so te spojine bolj polarne in so v izbranem organskem topilu (THF) netopne. Izolacija teh spojin je bila zato preprostejša, saj smo jih odfiltrirali, oborine sprali

z dietil etrom in jih posušili v sušilniku. Pri spojinah **19**, **20**, **21** in **28** so bile oborine zelo lepljiva in se je ni dalo ustrezno posušiti, zato smo dodali 2 mL acetona, metanola in destilirane vode ter jo raztopili. Topila smo nato popolnoma odstranili in suh preostanek prelili z dietil etrom, v katerem so bile topne nepolarne nečistote. Nastale oborine smo odnučali in v sušilniku posušili do suhega.

Alkalna hidroliza estra, ki jo lahko včasih imenujemo tudi saponifikacija, poteka po principu nukleofilne adicije s sledečo eliminacijo na karbonilnem ogljikovem atomu (Slika 24). Mehanizem reakcije je sledeč: hidroksidni ion napade karbonilno skupino estra in posledično iz nastalega tetraedričnega intermedata izstopi alkoksidni ion, ki nato s protonom tvori alkohol. Nastali karboksilatni ion zaradi svojega negativnega naboja ne vstopa v nadaljnje nukleofilne substitucije, zato je alkalna hidroliza estra praktično ireverzibilna. Praviloma poteka v raztopini vode ter organskega sotopila, ki se z vodo dobro meša, in ob prisotnosti baze (KOH, NaOH, LiOH). Topilo in razmerje med topilom in vodo morata zagotavljati topnost tako estru, kot tudi bazi. Možna, a redkejša, pa je tudi hidroliza v brezvodnih pogojih, pri čemer po končani reakciji nastaneta alkohol in sol karboksilne kisline (uporaba nukleofila v aprotičnem topilu, npr. LiI v DMF) (90).



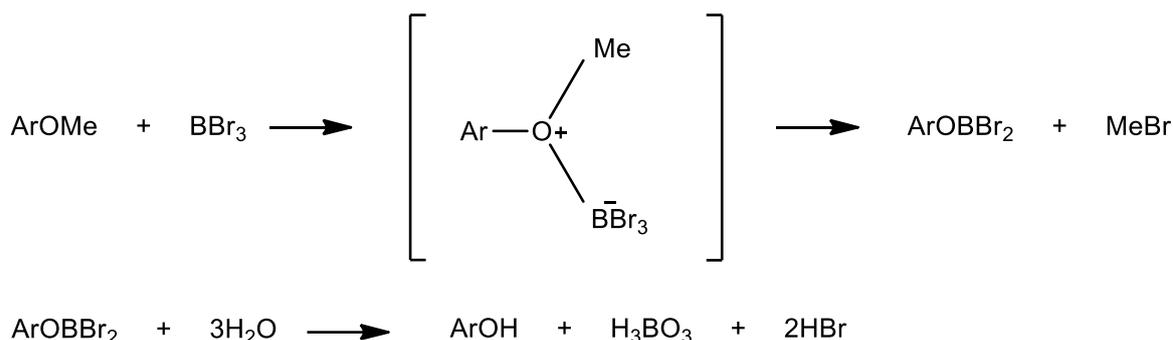
Slika 24 Alkalna hidroliza estra

Poznamo tudi kislinsko katalizirano hidrolizo estra, ki pa je reverzibilna. Pri reakciji nastajata karboksilna kislina in alkohol, kot reagent pa uporabimo vodno raztopino kisline. Ravnotežje lahko premaknem v smer nastajanja produktov, če pri hidrolizi uporabimo velik prebitek vode – v praksi to najlažje storimo z refluktiranjem estra z razredčeno vodno raztopino HCl ali H₂SO₄ (90, 91).

5.1.5 Odstranitev metilnih skupin z BBr₃

Spojnam **4**, **15** in **26** smo v zadnji stopnji sinteze odstranili metilni eter. Ker so slednji izjemno obstojni, smo uporabili raztopino močne Lewisove kisline, borovega tribromida (BBr₃), v diklorometanu. Reakcija je najbolje potekala pri spojini **29** ($\eta = 34\%$), kjer smo reakcijsko zmes najprej ohladili na ledeni kopeli na 0 °C, nato pa dodali v prebitku 12 ekvivalentov BBr₃ v DKM. Reakcija je potekala 10 min na ledeni kopeli, nato pa še 20 ur na sobni temperaturi. Z dodatkom NaHCO₃ smo reakcijo zaustavili, reakcijsko zmes nakisali do pH = 3 in ekstrahirali z etilacetatom, ki smo ga nato uparili pod znižanim tlakom in dobili želeno spojino. NMR spekter je pokazal, da se je poleg dveh metilnih etrov zaradi agresivnih pogojev pri reakciji odstranila še estrska skupina. Pri spojinah **11** in **22** smo dosegli nižje izkoristke, saj smo pred nakisanjem z 1M HCl dodali etilacetat, da bi naš produkt prešel v organsko fazo, a se je izkazalo, da je zaradi dveh prostih hidroksilnih in ene proste karboksilne skupine bolj topen v vodni fazi.

Reakcija demetiliranja verjetno poteče preko nastalega kompleksa med borovim tribromidom in kisikovim atomom v etru, čemur sledi eliminacija metilbromida (Slika 25). Po sledeči hidrolizi nastane končni produkt s prosto hidroksilno skupino (98, 99). V literaturi najdemo podatke, da je priporočljivo uporabiti 1 mol BBr₃ za vsako etrsko skupino v spojini in še dodaten mol za vsako skupino, ki vsebuje potencialno bazičen dušikov atom ali kisikov atom (npr. CN, COOH, CHO, v našem primeru COOEt) (98). Analogno kot reakcijo demetiliranja bi lahko pojasnili tudi odstranitev estrske skupine. Zaradi dodane velike količine (12 eq) borov tribromid kot močna Lewisova kislina z lahkoto reagira z estrom, ki donira elektronski par. Sklepamo lahko, da se tudi v tem primeru tvori kompleks med BBr₃ in kisikovim atomom alkoholnega dela estra, čemur sledi eliminacija etilbromida. V literaturi lahko zasledimo, da so z BBr₃ v DKM že uspešno pretvorili metilne, etilne, terc-butilne, benzilne in p-nitrobenzilne estre do pripadajočih karboksilnih kislin (100).



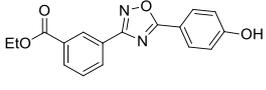
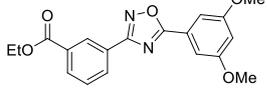
Slika 25 Potek reakcije demetiliranja z uporabo BBr₃. Prirejeno po McOmie et al. [98]

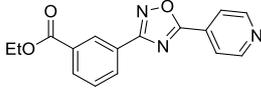
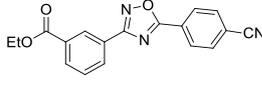
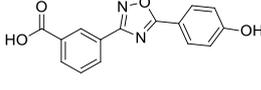
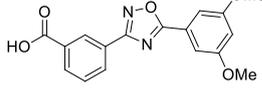
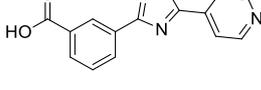
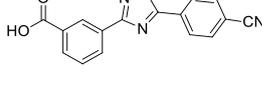
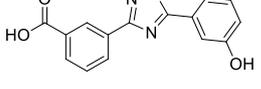
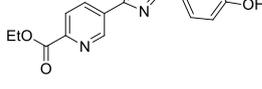
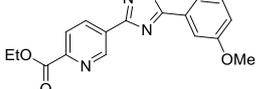
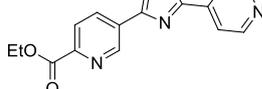
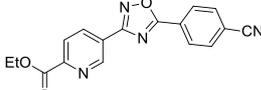
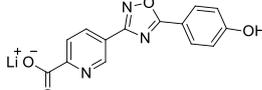
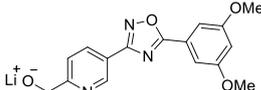
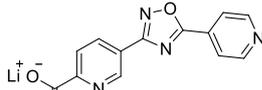
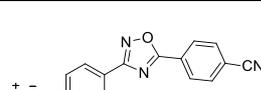
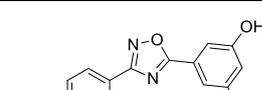
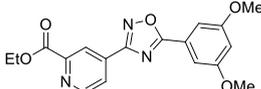
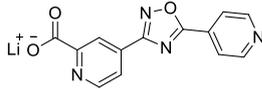
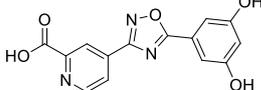
Alternativni postopek za odstranitev metilnega etra bi lahko predstavljala reakcija z vodno raztopino bromovodikove kisline (HBr) oz. z bromovodikovo kislino v etanolu. Prav tako lahko v literaturi zasledimo, da so z močnimi nukleofili, npr. tiolati v topilu DMF, uspešno odstranili metilne etre. V obeh primerih gre za agresivna postopka, ki morata potekati pri visoki temperaturi in imata po navadi zaradi tega nižjo selektivnost glede na funkcionalne skupine in posledično nižji izkoristek kot reakcija z BBr₃ (101).

5.2 REZULTATI TESTIRANJA INHIBITORNE AKTIVNOSTI

Uspeli smo sintetizirati enaindvajset spojin, ki smo jih načrtovali kot potencialne zaviralce ksantinske oksidaze. Na Medicinski fakulteti Univerze v Nišu so spojinam določili inhibitorno aktivnost na delovanje goveje ksantinske oksidaze. Postopek testiranja je opisan v poglavju Materiali in metode. Poleg spojin s prosto karboksilno skupino so ovrednotili tudi estrske oblike načrtovanih spojin. Rezultati so podani v spodnji preglednici I kot IC₅₀ vrednost - koncentracija, pri kateri izbrana spojina zavre 50% aktivnosti encima. Kot pozitivna kontrola so bile uporabljene tri spojine: alopurinol (IC₅₀ = 1.33 ± 0.14 μM), febuksostat (IC₅₀ = 0.008 ± 0.001 μM) in kvercetin (IC₅₀ = 15.23 ± 3.16 μM).

Preglednica I Rezultati biološkega testiranja

| Struktura | Spojina | IC ₅₀ [μM] | Struktura | Spojina | IC ₅₀ [μM] |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------|
|  | <u>3</u> | > 150 |  | <u>4</u> | > 150 |

| Struktura | Spojina | IC ₅₀ [μM] | Struktura | Spojina | IC ₅₀ [μM] |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------|
|  | <u>5</u> | > 150 |  | <u>6</u> | > 150 |
|  | <u>7</u> | > 150 |  | <u>8</u> | > 150 |
|  | <u>9</u> | > 150 |  | <u>10</u> | 38.00 ± 4.16 |
|  | <u>11</u> | > 150 |  | <u>14</u> | > 150 |
|  | <u>15</u> | > 150 |  | <u>16</u> | > 150 |
|  | <u>17</u> | > 150 |  | <u>18</u> | > 150 |
|  | <u>19</u> | > 150 |  | <u>20</u> | > 150 |
|  | <u>21</u> | > 150 |  | <u>22</u> | 57.53 ± 21.17 |
|  | <u>26</u> | > 150 |  | <u>28</u> | > 150 |
|  | <u>29</u> | > 150 | / | / | / |

Po testiranju se je izkazalo, da spojini **10** (3-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzojska kislina) in **22** (4-(5-(3,5-dihidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)piridin-2-karboksilna kislina) izkazujeta šibko inhibitorno delovanje z IC_{50} nižjim od 150 μ M. Obe spojini imata prosto karboksilno skupino, ki je pri febuksostatu predstavljala najpomembnejši del interakcije z aminokislinskima ostankoma Arg880 in Thr1010 v vezavnem mestu. Nitrilna skupina v spojini **10** in dve hidroksilni skupini v **22** so kot akceptor vodikove vezi pripomogle k tvorbi vezi s tarčno molekulo, najverjetneje z Asn768. Spojine, ki imajo na fenilnem obroču, ki je pripet na mestu 5 1,2,4-oksadiazolnega obroča, vezano samo eno hidroksilno skupino oz. dve metoksi skupini se niso izkazale kot aktivne. Razlog je verjetno ta, da v tem delu molekule nimajo dovolj učinkovitega akceptorja vodikove vezi. Neaktivne so bile tudi spojine, ki imajo na mestu 5 1,2,4-oksadiazolnega obroča vezan piridin. Navkljub možni tvorbi močne vodikove vezi, verjetno prostorska razporeditev molekule ne ustreza dobri vezavi v vezavno mesto. Tudi spojine, ki imajo na mestu 3 1,2,4-oksadiazola vezan piridin-4-ilni fragment, so se izkazali kot neaktivne. Možno je, da pride pri teh spojinah do tvorbe intramolekulskih vodikovih vezi med piridinskim dušikom in vodikom karboksilne skupine. Obe naši aktivni spojini imata poleg funkcionalnih skupin, ki omogočajo interakcije, očitno tudi ustrezno orientiranost substituentov v prostoru za vezavo v vezavno mesto. To bi pojasnilo zakaj spojini **11** in **21** navkljub enakim dodanim fragmentom ne izkazujeta inhibitornega delovanja. Za inhibitorno aktivnost febuksostata je nenazadnje pomemben tudi tiazolni obroč, ki tvori π - π interakcije z Phe914 in Phe1009 in hkrati omogoča vodikovo vez med tiazolnim dušikom in stransko karboksilno skupino Glu802. Ker samo dve od naših enaindvajsetih spojin izkazujeta inhibitorno delovanje, ki je hkrati še zelo šibko ($\sim 5.000 \times$ (spojina **10**) oz $\sim 7.000 \times$ (spojina **22**) večja IC_{50} vrednost kot febuksostat) bi bilo vredno razmisliti o nadaljnji optimizaciji naše serije spojin. V prihodnje bi sicer lahko poskusili z načrtovanjem spojin s 3,5-disubstituiranim 1,2,4-oksadiazolnim obročem, kjer bi na mesto 3 vezali heterocikel s prosto karboksilno skupino in na mesto 5 heterocikel, ki bi vseboval močan akceptor vodikove vezi in hkrati še lipofilno verigo, ki bi poskrbela za dodatne hidrofobne interakcije z ostanki aminokislin Leu648, Leu1013, Phe649 in Val1011, podobno kot 4-izobutoksi del febuksostata. Po drugi strani pa bi bilo smiselno zgoraj našete fragmente pripeti še na drug centralni obroč, kot npr. imidazol ali triazol, ki bi prav tako kot tiazol omogočal interakcije v vezavnem mestu in bi mogoče bolje kot 1,2,4-oksadiazol usmerjal substituent v prostor.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali 3,5-disubstituirane derivate 1,2,4-oksadiazola kot potencialne zaviralce ksantinske oksidaze. Kot spojino vodnico smo izbrali znan zaviralec ksantinske oksidaze febeksostat. Pri načrtovanju naših spojin smo upoštevali še ugotovitve raziskovalcev Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani, ki so dokazali ugodne antioksidativne in protivnetne lastnosti različnih 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola, zato nam je ta 1,2,4-oksadiazolni skelet služil kot bioizosterna zamenjava tiazola v strukturi febeksostata.

Sintezo načrtovanih spojin smo izvedli v več stopnjah. Najprej smo izbrani spojini z estrom zaščitili karboksilno skupino in v naslednji stopnji na nitril vezali hidroksilamin, pri čemer je nastal amidoksim. Sledilo je *O*-aciliranje amidoksima z izbrano karboksilno kislino in sklopitvenim reagentom EDC. S sledečo metodo ciklodehidracije *O*-acilamidoksima s kalijevim fluoridom smo dobili 3,5-disubstituiran 1,2,4-oksadiazol. V zadnji stopnji sinteze smo z litijevim hidroksidom izvedli hidrolizo estra in z BBr_3 odstranili metilne etre, kjer je bilo to potrebno. S sintezami smo dosegli zadovoljive izkoristke in z njimi nismo imeli večjih težav, razen pri spojini **25**, kjer bi lahko uporabili milejše pogoje reakcije ali pa alternativno metodo sinteze 1,2,4-oksadiazolnega z mikrovalovi.

Sintetizirali smo enaindvajset spojin, ki so jim ovrednotili njihovo inhibitorno aktivnost in jo podali kot IC_{50} vrednost. Šibko inhibitorno aktivnost sta pokazali dve spojini, **10** (3-(5-(4-cianofenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzojska kislina) in **22** (4-(5-(3,5-dihidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) piridin-2-karboksilna kislina), za kateri sta, poleg ustrezne prostorske razporeditve značilna tudi prosta karboksilna skupina na prvem heterociklu in ustrežna elektron – akceptorska skupina na drugem heterociklu. V nadaljnjih raziskavah bi ju lahko še potencialno optimizirali z dodatkom lipofilne verige, ki je prisotna tudi v febeksostatu in tvori hidrofobne interakcije z ostanki aminokislin v vezavnem mestu. Ker je za delovanje febeksostata, s svojimi interakcijami in usmerjanjem ostalih funkcionalnih skupin v prostor, pomemben tudi centralni obroč tiazol, in ker naše spojine v večini niso pokazale inhibitorne aktivnosti, bi lahko v prihodnosti, poleg zgoraj omenjene optimizacije spojin **10** in **22**, mogoče načrtovali tudi spojine z drugačnim centralnim obročem, ki bi omogočal tako dodatne interakcije v vezavnem mestu kot boljšo prostorsko razporeditev

substituentov. Zanimivi možnosti bi bila imidazol in triazol, na katera bi nato pripeli strukturne fragmente, ki so značilni za aktivni spojini **10** in **22**.

7. VIRI IN LITERATURA

- [1] Kleber ME, Delgado G, Grammer TB, Silbernagel G, Huang J, Krämer BK, Ritz E, März W: Uric acid and Cardiovascular Events: A Mendelian Randomization Study. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26(11): 2831-2838
- [2] <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/rheumatology/gout-and-pseudogout/> (dostopano: junij 2017)
- [3] Martillo MA, Nazzari L, Crittenden DB: The Crystallization of Monosodium Urate. *Curr Rheumatol Rep.* 2014; 16(2): 400
- [4] Hainer BL, Matheson E, Wilkes RT: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Gout. *American Family Physician.* 2014; 90(12): 831-836
- [5] Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR: Mechanism of Action of Colchicine in the Treatment of Gout. *Clinical Therapeutics.* 2014; 36 (10): 1465-1479
- [6] Silverman W, Locovei S, Dahl G: Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295: 761-767
- [7] McGill NW: The epidemiology and treatment of gout. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews.* 2011; 3: 73-82
- [8] Burns CM, Wortmann RL: Latest evidence on gout management: what the clinician needs to know. *Therapeutic Advances in Chronic Disease.* 2012; 3(6): 271-286
- [9] Xu C, Liu S, Song F, Liu Z: Xanthine Oxidase Inhibitors and the Analytical Methods to Screen Them: A Review. *Current Traditional Medicine.* 2015; 1: 41-50
- [10] Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C: Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 87-114
- [11] <https://pdb101.rcsb.org/motm/117> (dostopano: junij 2017)
- [12] Šmelcerović A, Tomović K, Šmelcerović Ž, Petronijević Ž, Kocić G, Tomašić T, Jakopin Ž, Anderluh M: Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on in silico calculated physico-

chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 135. 2017; 491-516

[13] Obreza A: Molibden kot pomemben element v sledovih. *Farm Vestn.* 2008; 59: 16-20

[14] Ribarič S (urednik): *Temelji patološke fiziologije*, 2. izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 45-52

[15] Parks DA, Skinner KA, Skinner HB, Tan S: Multiple organ dysfunction syndrome: Role of xanthine oxidase and nitric oxide. *Pathophysiology.* 1998; 5; 49-66

[16] Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K: Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules.* 2015; 5: 545-589

[17] Smalley RV, Guaspari A, Haase-Statz S, Anderson SA, Cederberg D, Hohneker JA: Allopurinol: intravenous use for prevention and treatment of hyperuricemia. *J Clin Oncol.* 2000; 18(8): 1758–1763

[18] Khoo BP, Leow YH: A review of inpatients with adverse drug reactions to allopurinol. *Singapore Med J.* 2000; 41(4): 156–160

[19] Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* 1981; 81(1):22–29 TU CO DEJ 10-ko!!

[20] Berry CE, Hare JM: Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 2004; 555 (3): 589–606

[21] Xia Y, Zweier JL: Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *J Biol Chem.* 1995; 270(32): 18797–18803

[22] Johnson WD, Kayser KL, Brenowitz JB, Saedi SF: A randomized controlled trial of allopurinol in coronary bypass surgery. *Am Heart J.* 1991; 121(1): 20–24

[23] Parmley LF, Mufti AG, Downey JM: Allopurinol therapy of ischemic heart disease with infarct extension. *Can J Cardiol.* 1992; 8(3): 280–286

[24] Itoh T, Kawakami M, Yamauchi Y, Shimizu S, Nakamura M: Effect of allopurinol on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury in spontaneously hypertensive rats. *Stroke.* 1986; 17(6): 1284–1287

- [25] Kulah B, Besler HT, Akdag M, Oruc T, Altinok G, Kulacoglu H, Ozmen MM, Coskun F: The effects of verapamil vs. allopurinol on intestinal ischemia/ reperfusion injury in rats: "An experimental study." *Hepatogastroenterology*. 2004; 51(56): 401–407
- [26] McKelvey TG, Hollwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U, Jones HP: Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am J Physiol*. 1988; 254(5): G753–G760
- [27] Yildirim S, Tok H, Koksall H, Erdem L, Baykan A: Allopurinol plus pentoxifilline in hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Asian J Surg*. 2002; 25(2):149–153
- [28] Rhoden E, Teloken C, Lucas M, Rhoden C, Mauri M, Zettler C, Bello-Klein A, Barros E: Protective effect of allopurinol in the renal ischemia-reperfusion in uninephrectomized rats. *Gen Pharmacol*. 2000; 35(4): 189–193.
- [29] Aiba M, Yokoyama Y, Snow TR, Novitzky D, McKeown PP: Effects of allopurinol pretreatment with pulmonary flush on lung preservation. *J Heart Lung Transplant*. 1992; 11(6): 1025–1030
- [30] Dorion D, Zhong A, Chiu C, Forrest CR, Boyd B, Pang CY: Role of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic skeletal muscles in the pig and human. *J Appl Physiol*. 1993; 75(1): 246–255
- [31] Lazarus HM, Owens ML, Hopfenbeck A: Allopurinol protection of hepatic nuclear function during hemorrhagic shock. *Surg Forum*. 1974; 25: 10–12
- [32] Cunningham SK, Keaveny TV: Effect of a xanthine oxidase inhibitor on adenine nucleotide degradation in hemorrhagic shock. *Eur Surg Res*. 1978; 10(5): 305–313
- [33] Deitch EA, Bridges W, Baker J, Ma JW, Ma L, Grisham MB, Granger DN, Specian RD, Berg R: Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation is reduced by xanthine oxidase inhibition or inactivation. *Surgery*. 1988; 104(2): 191–198
- [34] Parks DA, Granger DN: Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol*. 1983; 245(2): G285–G289
- [35] Bond RF, Haines GA, Johnson G 3rd: The effect of allopurinol and catalase on cardiovascular hemodynamics during hemorrhagic shock. *Circ Shock*. 1988; 25(3): 139–151

- [36] Leyva F, Anker SD, Godsland IF, Teixeira M, Hellewell PG, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ: Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation. *Eur Heart J*. 1998; 19(12): 1814–1822
- [37] Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R: Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res*. 2000; 87(3): 241–247
- [38] Ekelund UE, Harrison RW, Shokek O, Thakkar RN, Tunin RS, Senzaki H, Kass DA, Marban E, Hare JM: Intravenous allopurinol decreases myocardial oxygen consumption and increases mechanical efficiency in dogs with pacing induced heart failure. *Circ Res*. 1999; 85(5): 437–445
- [39] Amado LC, Saliaris AP, Raju SV, Lehrke S, St John M, Xie J, Stewart G, Fitton T, Minhas KM, Brawn J, Hare JM: Xanthine oxidase inhibition ameliorates cardiovascular dysfunction in dogs with pacing-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39(3): 531–536
- [40] Engberding N, Spiekermann S, Schaefer A, Heineke A, Wiencke A, Muller M, Fuchs M, Hilfiker-Kleiner D, Hornig B, Drexler H, Landmesser U: Allopurinol attenuates left ventricular remodeling and dysfunction after experimental myocardial infarction: a new action for an old drug? *Circulation*. 2004; 110(15): 2175–2179
- [41] Cicoira M, Zanolla L, Rossi A, Golia G, Franceschini L, Brighetti G, Zeni P, Zardini P: Elevated serum uric acid levels are associated with diastolic dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*. 2002; 143(6): 1107–1111
- [42] Alderman MH: Uric acid and cardiovascular risk. *Curr Opin Pharmacol*. 2002; 2(2): 126–130
- [43] Li JM, Shah AM: Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol*. 2004; 287(5): R1014–R1030
- [44] McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H, Harrison DG: Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol*. 2003; 285(6): H2290–H2297

- [45] White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, Parks DA, Tarpey MM, Freeman BA: Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(16): 8745–8749
- [46] Desco MC, Asensi M, Marquez R, Martinez-Valls J, Vento M, Pallardo FV, Sastre J, Vina J: Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes*. 2002; 51(4): 1118–1124
- [47] Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD: Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension*. 2000; 35(3): 746–751
- [48] Janssen M, de Jong JW, Pasini E, Ferrari R: Myocardial xanthine oxidoreductase activity in hypertensive and hypercholesterolemic rats. *Cardioscience*. 1993; 4(1): 25–29
- [49] Wallwork CJ, Parks DA, Schmid-Schonbein GW: Xanthine oxidase activity in the dexamethasone-induced hypertensive rat. *Microvasc Res*. 66(1): 30–37
- [50] Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Quyyumi AA, Panza JA: Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension*. 1997; 30(1): 57–63
- [51] Miesel R, Zuber M: Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation*. 1993; 17(5): 551–561
- [52] Miesel R, Zuber M, Sanocka D, Graetz R, Kroeger H: Effects of allopurinol on in vivo suppression of arthritis in mice and ex vivo modulation of phagocytic production of oxygen radicals in whole human blood. *Inflammation*. 1994; 18(6): 597–612
- [53] Miyakawa H, Sato K, Shinbori T, Okamoto T, Gushima Y, Fujiki M, Suga M: Effects of inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase inhibitors on SEB-induced interstitial pneumonia in mice. *Eur Respir J*. 2002; 19(3): 447–457
- [54] Mabley JG, Nivorozhkin A, Southan GJ, Szabo C, Salzman AL: Pathogenetic role of xanthine oxidase in a murine model of acute lung injury. *FASEB J*. 2003; 17: A247
- [55] Komaki Y, Sugiura H, Koarai A, Tomaki M, Ogawa H, Akita T, Hattori T, Ichinose M: Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's airways. *Pulm Pharmacol Ther*. 2005; 18(4): 297–302

- [56] Gwinner W, Plasger J, Brandes RP, Kubat B, Schulze M, Regele H, Kerjaschki D, Olbricht CJ, Koch KM: Role of xanthine oxidase in passive Heymann nephritis in rats. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10(3): 538–544
- [57] Zeki S, Miura S, Suzuki H, Watanabe N, Adachi M, Yokoyama H, Horie Y, Saito H, Kato S, Ishii H: Xanthine oxidase-derived oxygen radicals play significant roles in the development of chronic pancreatitis in WBN/Kob rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 17(5): 606–616
- [58] Rijhwani A, Sen S, Gunasekaran S, Ponnaiya J, Balasubramanian KA, Mammen KE: Allopurinol reduces the severity of peritoneal adhesions in mice. *J Pediatr Surg.* 1995; 30(4): 533–537
- [59] Augustin AJ, Loeffler KU, Sekundo W, Grus FH, Lutz J: Effects of systemically applied allopurinol and prednisolone on experimental autoimmune uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1999; 237(6): 508–512
- [60] Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC: Alterations of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation: potential role for peroxynitrite in skin inflammation. *Biochem Pharmacol.* 1996; 51(12): 1727–1738
- [61] Becker MA, Fitz-Patrick D, Choi HK, Dalbeth N, Storgard C, Cravets M, Baumgartner S: An open label, 6-month study of allopurinol safety in gout: The LASSO study. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 2015; 45: 174-183
- [62] Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Kondo S, Pai EF, Nishino T: An Extremely Potent Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 1848-1855
- [63] Hosoya T, Ohno I, Nomura S, Hisatome I, Uchida S, Fujimori S, Yamamoto T, Hara S: Effects of toprozostat on the serum urate levels and urinary albumin excretion in hyperuricemic stage 3 chronic kidney disease patients with or without goat. *Clin Exp Nephrol.* 2014; 18: 876-884
- [64] Fukunari A, Okamoto K, Nishino T, Eger BT, Pai EF, Kamezawa M, Yamada I, Kato N: Y-700 [1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid]: A Potent Xanthine Oxidoreductase Inhibitor with Hepatic Excretion. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2004; 311(2): 519-528

- [65] Matsumoto K, Okamoto K, Ashizawa N, Nishino T: FYX-051: A Novel and Potent Hybrid-Type Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011; 336(1): 95-103
- [66] Tsuruta Y, Mochizuki T, Moriyama T, Itabashi M, Takei T, Tsuchiya K, Nitta K: Switching from allopurinol to febuxostat for the treatment of hyperuricemia and renal function in patients with chronic kidney disease. *Clin Rheumatol*. 2014; 33: 1643-1648
- [67] Turnheim K, Krivanek P, Oberbauer R: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of allopurinol in elderly and young subjects. *J Clin Pharmacol*. 1999; 48: 501-509
- [68] Sun H, Tawa G, Wallqvist A: Classification of Scaffold Hopping Approaches. *Drug Discov Today*. 2012; 17(7-8): 310-324
- [69] Berrgren AIK, Böstrom SJ, Elebring ST, Fallefors L, Wilstermann JM, Greasley P: 4,5-diarylthiazole derivatives as CB-1 ligands. WO Patent, Patent number 2004058255 A1, date of patent Jul. 15, 2004
- [70] Berrgren AIK, Böstrom SJ, Cheng L, Elebring ST, Greasley P, Nagard M, Wilstermann JM, Terricabras E: 1,5-diaryl-pyrrole-3-carboxamide derivatives and their use as cannabinoid receptor modulators. WO Patent, Patent number 2004058249 A1, date of patent Jul. 15, 2004
- [71] Böstrom J, Berggren K, Elebring T, Greasley PJ, Wilstermann M: Scaffold hopping, synthesis and structure-activity relationships of 5,6-diaryl-pyrazine-2-amide derivatives: a novel series of CB1 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem*. 2007; 15(12): 4077-4084
- [72] Lavey BJ, Kozlowski JA, Shankar BB, Spitler JM, Zhou G, Yang DY, Shu Y, Wong MK, Wong SC, Shih NY, Wu J, McCombie SW, Rizvi R, Wolin RL, Lunn CA: Optimization of triaryl bis-sulfones as cannabinoid-2 receptor ligands. *Bioorg Chem Med Lett*. 2007; 17(13): 3760-3764
- [73] Shen Q, Qian Y, Xu X, Li W, Liu J, Fu W: Design, synthesis and biological evaluation of N-phenylalkyl-substituted tramadol derivatives as novel μ opioid receptor ligands. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2015; 36: 887-894
- [74] Marc G, Pečar S: Bioizosterija in načrtovanje peptidomimetikov, *Farm Vestn*. 1993; 44: 3-22

- [75] Chen S, Zhang T, Wang J, Wang F, Niu H, Wu C, Wang S: Synthesis and evaluation of 1-hydroxy/methoxy-4-methyl-2-phenyl-1H-imidazole-5-carboxylic acid derivatives as non-purine xanthine oxidase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2015; 103: 343-353
- [76] Song JU, Choi SP, Kim TH, Jung CK, Lee JY, Jung SH, Kim GT: Design and synthesis of novel 2-(indol-5-yl)thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015; 25(6): 1254-1258
- [77] Evenäs J, Edfeldt F, Lepistö M, Svitacheva N, Synnergren A, Lundquist B, Gränse M, Rönnholm A, Varga M, Wright J, Wei M, Yue S, Wang J, Li C, Li X, Chen G, Liao Y, Lv G, Tjörnebo A, Narjes F: HTS followed by NMR based counterscreening. Discovery and optimization of pyrimidones as reversible and competitive inhibitors of xanthine oxidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014; 24 (5): 1315-1321
- [78] Boström J, Hogner A, Llinas A, Wellner E, Plowright AT: Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 2012; 55: 1817-1830
- [79] Liedtke MD, Tomlin CR, Lockhart SM, Miller MM, Rathbun RC: Long-term efficacy and safety of raltegravir in the management of HIV infection. *Infection and Drug resistance.* 2014; 7: 73-84
- [80]
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002720/human_med_001742.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 (dostopano: junij 2017)
- [81] Jakopin Ž, Sollner Dolenc M: Recent advances in the synthesis of 1,2,4- and 1,3,4-oxadiazoles. *Curr. Org. Chem.* 2008; 12: 850–898.
- [82] Maftai CV, Fodor E, Jones PG, Franz MH, Kelter G, Fiebig H, Neda I: Synthesis and characterization of novel bioactive 1,2,4-oxadiazole natural product analogs bearing the N-phenylmaleimide and N-phenylsuccinimide moieties. *Beilstein J. Org. Chem.* 2013; 9: 2202-2215.
- [83] Gobec M, Tomašič T, Markovič T, Mlinarič-Raščan I, Sollner Dolenc M, Jakopin Ž: Antioxidant and anti-inflammatory properties of 1,2,4-oxadiazole analogs of resveratrol. *Chemico-Biological Interactions.* 2015; 240: 200-207

- [84] Šmelcerovič Ž, Veljkovič A, Kocić G, Yancheva D, Petronijević Ž, Anderluh M, Šmelcerovič A: Xanthine oxidase inhibitory properties and anti-inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Chemico-Biological Interactions*. 2015; 229: 73-81
- [85] Rupe H, Bernstein F: The effect of the position of substituted groups in the benzene nucleus upon the catalytic hydrogenation of the cyano group. *Helvetica Chimica Acta*. 1930; 13: 457-473
- [86] Fish PV, Allan GA, Bailey S, Blagg J, Butt R, Collis MG, Greiling D, James K, Kendall J, McElroy A, McCleverty D, Reed C, Webster R, Whitlock GA: Potent and selective nonpeptidic inhibitors of procollagen C-proteinase. *J Med Chem*. 2007; 50(15): 3442-3456.
- [87] Karp GM, Hwang S, Chen G, Almstead NG: 1,2,4-oxadiazole benzoic acid compounds and their use for nonsense suppression and the treatment of disease. United States Patent, Patent number US20040204461 A1, date of patent: Oct. 14, 2004
- [88] Suvorov BV, Lebedeva OB: Synthesis of 5-cyanopicolinic acid and its ethyl ester and amide. *Izvestiya Akademii Nauk Kazakhskoi SSR, Seriya Khimicheskaya*. 1977; 27(5): 89-90
- [89] Heinisch G, Loetsch G, Vieboeck F: Decisive increase of regioselectivity in radical substitutions: Minisci reaction in the two-phase system. *Angewandte Chemie*. 1985; 97(8): 694-695
- [90] Solomons TWG, Fryhle CB: *Organic Chemistry*, 9th Edition, John Wiley & Sons, Inc., ZDA, 2008; 794-801
- [91] Tišler M: *Organska kemija*, 2. izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2013; 239-244
- [92] Katedra za farmacevtsko kemijo: *Metode N- in O-aciliranja, Vaje in seminarji iz farmacevtske kemije* 3, 2010
- [93] Rajendra M. Srivastava RM, Pereira MC, Faustino WWM, Coutinho K, dos Anjos JV, de Melo SJ: Synthesis, mechanism of formation, and molecular orbital calculations of arylamidoximes. *Monatsh Chem*. 2009; 140; 1319-1324
- [94] Medeiros M, Souza BS, Orth ES, Brandão TAS, Rocha W, Kirby AJ, Nomea F: The reaction of hydroxylamine with aspirin. *ARKIVOC*. 2011; vii; 461-476

- [95] 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 Letters*. 2001; 42: 1441-1443
- [96] Dar BA, Zaheer Z, Fatema S, Jadav S, Farooqui M: KF-Al₂O₃ Catalyzed Domino One-Pot, Three-Component Synthesis of 3,5-Disubstituted-1,2,4-Oxadiazoles Under Microwave-Assisted Solvent Free Conditions and Their Biological Activity. *IJPRAS*. 2015; 4(3): 93-99
- [97] Adib M, Jahromi AH: Microwave-assisted efficient, one-pot, three-component synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett*. 2006; 47: 2965-2969
- [98] McOmie JFW, Watts ML, West DE: Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide. *Tetrahedron* 1968; 24; 2289-2292
- [99] Kosak TM, Conrad HA, Korich AL, Lord RL: Ether cleavage re-investigated: elucidating the mechanism of BBr₃-facilitated demethylation of aryl methyl ethers. *Eur. J. Org. Chem*. 2015; 7460-7467
- [100] Felix AM: Cleavage of Protecting Groups with Boron Tribromide. *J. Org. Chem*. 1974; 39 (10): 1427-1429
- [101] http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/O_Demethylation/O-Demethylation_Index.htm (dostopano: junij 2017)