

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA POKOVEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA POKOVEC

**SINTEZA 5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OXSADIAZOLNIH  
DERIVATOV KLATRODINA**

**SYNTHESIS OF 5-(TRIFLUOROMETHYL)-1,2,4-OXADIAZOLE  
DERIVATIVES OF CLATHRODIN**

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za strokovno pomoč, koristne nasvete, spodbudne besede in potrpežljivost. Posebna zahvala gre ge. Damijani Zalar ter ostalim sodelavcem na Katedri za farmacevtsko kemijo.

Prav tako bi se še posebno rada zahvalila svojemu fantu, očetu in ostali družini ter prijateljem za vso ljubezen in podporo.

Magistrsko nalogo posvečam svoji preljubi mami Dragici in ji hkrati izrekam neizmerno zahvalo za vso ljubezen, spodbudo in besede »vedno vztrajaj do konca in verjemi vase«.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Petra Pokovec

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Janko Kos

Član magistrske komisije: asist. dr. Zoran Lavrič

**VSEBINA**

<b>I. POVZETEK</b> .....	V
<b>II. ABSTRACT</b> .....	VI
<b>III. SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	VII
<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Klatrodin in spužva oranžno slonje uho .....	1
1.2. Napetostno odvisni natrijevi ionski kanali (Na <sub>v</sub> -kanali).....	2
1.2.1. Molekularna struktura Na <sub>v</sub> -kanala .....	3
1.2.2. Fiziologija Na <sub>v</sub> -kanalov .....	6
1.2.3. Pregled vloge Na <sub>v</sub> -kanalov .....	7
1.2.4. Vpliv naravnih spojin na Na <sub>v</sub> -kanale .....	10
1.3. Vloga klatrodina in njegovih sinteznih analogov pri aktivaciji/inaktivaciji Na <sub>v</sub> - kanalov .....	13
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	15
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	17
<b>4. EKSPERIMENTALNO DELO</b> .....	20
4.1. Sinteza N-{4-[(4-cianobenzil)oksi]fenil}acetamida( <b>1</b> ) .....	21
4.2. Sinteza N-[4-({4-[amino(hidroksiimino)metil]benzil}oksi)fenil]acetamida( <b>5</b> ).....	21
4.3. Sinteza N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acet- amida( <b>8</b> ).....	22
4.4. Sinteza 4-{[4-(5-trifluorometil-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzil]oksi}fenilamina( <b>11</b> ) ..	23
4.5. Sinteza N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indol- karboksamida( <b>14</b> ) .....	24
4.6. Sinteza N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-4- cianofenilamida( <b>18</b> ).....	25
4.7. Sinteza N-(3-hidroksifenil)acetamida( <b>2</b> ) .....	27
4.8. Sinteza N-{3-[(4-cianobenzil)oksi]fenil}acetamida( <b>3</b> ) .....	27
4.9. Sinteza N-[3-({4-[amino(hidroksiimino)metil]benzil}oksi)fenil]acetamida( <b>6</b> ).....	28

4.10. Sinteza N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamida( <b>9</b> ).....	29
4.11. Sinteza 3-{[4-(5-trifluorometil-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzil]oksi}fenilamina( <b>12</b> )	29
4.12. Sinteza N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamida( <b>15</b> ) .....	30
4.13. Sinteza N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-3-(klorometil)fenilamida( <b>19</b> ) .....	31
4.14. Sinteza N-{3-[(3-cianobenzil)oksi]fenil}acetamida( <b>4</b> ) .....	34
4.15. Sinteza N-[3-({3-[amino(hidroksiimino)metil]benzil}oksi)fenil]acetamida( <b>7</b> ).....	34
4.16. Sinteza N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamida( <b>10</b> ).....	35
4.17. Sinteza 3-{[3-(5-trifluorometil-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzil]oksi}fenilamina( <b>13</b> )	36
4.18. Sinteza N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamida( <b>16</b> ) .....	37
4.19. Poskus sinteze N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-3-kloropropilamida( <b>20</b> ) .....	38
4.20. Sinteza N-(4-hidroksifenil)indolkarboksamida( <b>17</b> ).....	39
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	41
5.1. Priprava N-[[3-(cianobenzil)oksi]fenil]acetamidov <b>1, 3</b> in <b>4</b> .....	41
5.2. Priprava amidoksimov <b>5, 6</b> in <b>7</b> .....	42
5.3. Priprava 3,5-disubstituiranih-1,2,4-oksadiazolov <b>8, 9</b> in <b>10</b> .....	42
5.4. Priprava aminov <b>11, 12</b> in <b>13</b> .....	44
5.5. Priprava amidov <b>2, 14, 15, 16, 17, 18, 19</b> in <b>20</b> .....	46
5.5.1. Tvorba amida <b>2</b> z uporabo acetanhidrida.....	46
5.5.2. Tvorba amida <b>14</b> (1. način) z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU.....	47
5.5.3. Tvorba amidov <b>14</b> (2. način), <b>15, 16</b> in <b>17</b> (1. način) z uporabo TCT.....	49
5.5.4. Tvorba amida <b>17</b> (2. način) z uporabo oksalil klorida.....	52
5.5.5. Tvorba amidov <b>18, 19</b> in <b>20</b> z uporabo kislinskih kloridov.....	55

5.6. Rezultati elektrofiziološkega poskusa določanja aktivnosti spojin <b>8</b> , <b>9</b> in <b>10</b> na Na <sub>v</sub> 1.3-kanalih.....	57
<b>6. SKLEPI</b> .....	58
<b>7. LITERATURA</b> .....	60

## I. POVZETEK

Z evolucijo so rastline, živali in bakterije razvile pomembne obrambne in napadalne mehanizme. Eden izmed njih je biosinteza nepeptidnih in peptidnih spojin, ki delujejo na široko paleto bioloških tarč. Klatrodin je 2-aminoimidazolni alkaloid z nesubstituiranim pirol 2-karboksamidnim delom, ki so ga izolirali iz morske spužve *Agelas clathrodes*. Poskusi na celicah simpatičnih ganglijev, izoliranih iz piščančjih zarodkov, so pokazali, da ima klatrodin nevrotoksično delovanje in vpliva na ionsko prevodnost napetostno odvisnih natrijevih ionskih kanalov ( $\text{Na}_v$ ). Nedavne elektrofiziološke študije pa nakazujejo, da klatrodin nima vpliva na  $\text{Na}_v$ -kanale. Na podlagi strukture klatrodina je bilo sintetiziranih veliko analogov, pri katerih se je vseeno pokazala aktivnost za  $\text{Na}_v$ -kanale. Kljub temu da klatrodin ne velja več za potencialno spojino vodnico pri načrtovanju novih selektivnih zaviralcev  $\text{Na}_v$ -kanalov, njegovi strukturni analogi izkazujejo moduliranje delovanja  $\text{Na}_v$ -kanalov. Tako smo uspešno sintetizirali, izolirali in očistili 5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolne derivate klatrodina ter jih fizikalno-kemijsko okarakterizirali. Pripravili smo N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamid (**14**), N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamid (**15**), N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamid (**16**), N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-4-cianofenilamid (**18**), N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-3-(klorometil)fenilamid (**19**) in N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-2-propenamid (**21**). Z elektrofiziološkim poskusom na  $\text{Na}_v1.3$ -kanalih smo ugotovili, da imajo spojine N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamid (**8**), N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamid (**9**) in N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamid (**10**) zanemarljiv učinek na tovrstne kanale ( $\text{IC}_{50}$  vrednosti so  $\geq 30 \mu\text{M}$ ), zato bi v bodoče lahko preverili tudi aktivnost prej omenjenih spojin ter spojin **14**, **15**, **16**, **18**, **19** in **21** na ostale pod tipe  $\text{Na}_v$ -kanalov.

**Ključne besede:** napetostno odvisni natrijevi ionski kanali, klatrodin, *Agelas clathrodes*, 5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolni derivati klatrodina

## II. ABSTRACT

In the course of evolution, the plants, animals and bacteria have developed important defensive and offensive mechanisms. One of those mechanisms is the biosynthesis of nonpeptide and peptide products that function at a wide range of biological targets. Clathrodin is 2-aminoimidazole alkaloid with unsubstituted part of pyrrole 2-carboxamide and was isolated from marine sponge *Agelas clathrodes*. Experiments on sympathetic ganglion cells isolated from chicken embryo showed that clathrodin has neurotoxic activity and affects sodium voltage-gated ion channels ( $\text{Na}_v$ ). Recent electrophysiological studies suggest that clathrodin has no effect on  $\text{Na}_v$ -channels. Based on the structure of clathrodin, many analogues were synthesized and they have shown activity for  $\text{Na}_v$ -channels. Despite the fact that clathrodin is no longer seen as a potential compound for design of new selective inhibitors of  $\text{Na}_v$ -channels, its structural analogues exhibit modulation of action towards  $\text{Na}_v$ -channels. Therefore, we have successfully synthesized, isolated and purified 5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazole derivatives of clathrodin and we done physicochemical characterization. We have prepared N-[4-({4-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzyl}oxy)phenyl]indolcarboxamide (**14**), N-[3-({4-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzyl}oxy)phenyl]indolcarboxamide (**15**), N-[3-({3-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzyl}oxy)phenyl]indolcarboxamide (**16**), N-[4-({4-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzyl}oxy)phenyl]-4-cyanophenylamide (**18**), N-[3-({4-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzyl}oxy)phenyl]-3-(chloromethyl)phenylamide (**19**) and N-[3-({3-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzyl}oxy)phenyl]-2-propenamide (**21**). From electrophysiological experiments on  $\text{Na}_v1.3$ -channels, we found that the N-[4-({4-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzyl}oxy)phenyl]acetamide (**8**), N-[3-({4-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzyl}oxy)phenyl]acetamide (**9**) and N-[3-({3-[5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzyl}oxy)phenyl]acetamide (**10**) have a negligible effect on such channels ( $\text{IC}_{50}$  values are  $\geq 30 \mu\text{M}$ ). In the future we would like to check the activity of the compounds **8**, **9**, **10**, **14**, **15**, **16**, **18**, **19** and **21** for other subtypes of  $\text{Na}_v$ -channels.

**Key words:** sodium voltage-gated ion channels, clathrodin, *Agelas clathrodes*, 5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazole derivatives of clathrodin



**III. SEZNAM OKRAJŠAV**

<b>ACT</b>	aceton
<b>b.v.</b>	brezvodni
<b>BENZ</b>	benzen
<b>BTX</b>	batrahotoksin
<b>C<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	oksalil klorid
<b>CHCl<sub>3</sub> oz. CDCl<sub>3</sub></b>	kloroform
<b>cHEX</b>	cikloheksan
<b>CHN</b>	elementna analiza
<b>CTXs</b>	ciguatoksini
<b>δ</b>	kemijski premik
<b>d</b>	dublet
<b>D(I-IV)</b>	domena $\alpha$ -podenote Na <sub>v</sub> -kanala
<b>DEE</b>	dietileter
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DMSO</b>	dimetil sulfoksid
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	devteriran dimetilsulfoksid
<b>DOKS</b>	dioksan
<b>EtOAc</b>	etilacetat
<b>EtOH</b>	etanol
<b>ESI</b>	ionizacija z razprševanjem v električnem polju
<b>GABA</b>	$\gamma$ -aminomaslena kislina (4-aminobutanojska kislina)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	voda
<b>HCl</b>	klorovodikova kislina
<b>HEPT</b>	heptan
<b>HEX</b>	heksan
<b>HR-MS</b>	masna spektrometrija visoke ločljivosti
<b>IR</b>	infrardeča spektroskopija
<b>J</b>	sklopitvena konstanta
<b>m</b>	multiplet
<b>MeOH</b>	metanol

<b>MF</b>	mobilna faza
<b>M<sub>r</sub></b>	relativna molekulska masa
<b>MS</b>	masna spektrometrija
<b>Na</b>	natrij
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	natrijev sulfat
<b>NaCl</b>	natrijev klorid
<b>NaOEt</b>	natrijev etilat, natrijev etoksid
<b>NaOH</b>	natrijev hidroksid
<b>NaSpTxs</b>	toksini pajkov
<b>Na<sub>v</sub></b>	napetostno odvisni natrijev ionski kanal
<b>NH<sub>2</sub>OH x HCl</b>	hidroksilamin hidroklorid
<b>NMM</b>	N-metilmorfolin
<b>NMR</b>	jedrska magnetna resonanca
<b>OR</b>	orositveni reagent
<b>PbTxs</b>	brevetoksini
<b>PD</b>	porna domena (ang. pore domain)
<b>PEE</b>	petroleter
<b>ppm</b>	parts-per million
<b>ProTx-II</b>	protoksin II
<b>P-zanke</b>	zunajcelične povezovalne porne zanke
<b>R<sub>f</sub></b>	retencijski faktor
<b>s</b>	singlet
<b>S(1-6)</b>	spiralni transmembranski segmenti $\alpha$ -podenote Na <sub>v</sub> -kanala
<b>SCN(št.)A</b>	geni, ki kodirajo za $\alpha$ -podenote Na <sub>v</sub> -kanalov
<b>SCN(št.)B</b>	geni, ki kodirajo za $\beta$ -podenote Na <sub>v</sub> -kanalov
<b>ScTxs</b>	toksini škorpionov
<b>SF</b>	selektivnostni filter (ang. selectivity filter)
<b>STX</b>	saksitoksin
<b>T</b>	temperatura
<b>t</b>	triplet
<b>TBTU</b>	N,N,N',N'-tetrametil-o-(benzotriazol-1-il) uronijev tetrafluoroborat
<b>TCT</b>	2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin
<b>TEA</b>	triethylamin

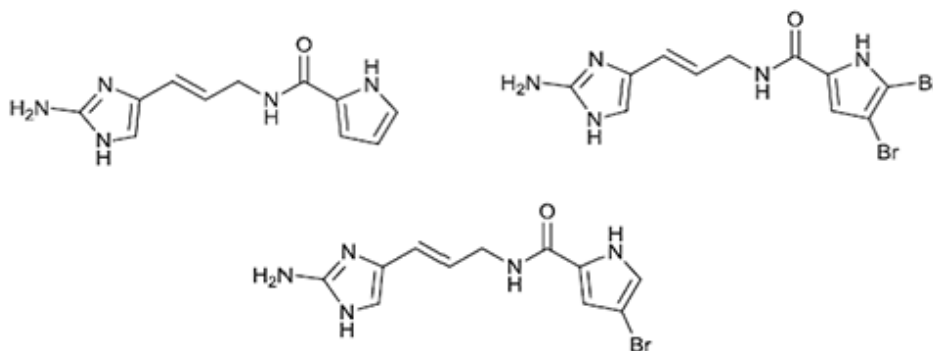
<b>TFAA</b>	anhidrid trifluorocetne kisline
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TLC</b>	tankoplastna kromatografija
<b>TMS</b>	tetrametilsilan
<b>TOL</b>	toluen
<b>TTX</b>	tetrodotoksin
<b>VDT</b>	veratridin
<b>VSD</b>	domena za zaznavanje napetosti (ang. voltage-sensing domain)

## 1. UVOD

Z evolucijo so rastline, živali in bakterije razvile pomembne obrambne in napadalne mehanizme. Eden izmed njih je biosinteza nepeptidnih in peptidnih spojin, ki delujejo na široko paleto bioloških tarč. V medicini se biosintezni produkti rastlinskih, živalskih in bakterijskih organizmov uporabljajo v terapevtske in diagnostične namene ali kot spojine vodnice za razvoj novih učinkovin.

### 1.1. KLATRODIN IN SPUŽVA ORANŽNO SLONJE UHO

Klatrodin je 2-aminoimidazolni alkaloid z nesubstituiranim pirol 2-karboksamidnim delom in je strukturno soroden svojemu 2,3-dibromopirolnemu analogu, oroidinu, in 2-bromopirolnemu analogu, himenidinu. Poskusi na celicah simpatičnih ganglijev, izoliranih iz piščančjih zarodkov, so pokazali, da ima klatrodin nevrotoksično delovanje in vpliva na ionsko prevodnost napetostno odvisnih natrijevih ionskih kanalov ( $\text{Na}_v$ ). Poskusi na žabjih mišicah so potrdili rezultate prej omenjenih poskusov. (1)



Slika 1: Molekulska struktura klatrodina (levo), oroidina (desno) in himenidina (v sredini spodaj) (1).

Klatrodin so izolirali iz morske spužve *Agelas clathrodes* (oranžno slonje uho) razreda *Demospongiae* (kremenaste spužve in spužve roženjače). Spužva oranžno slonje uho živi v vodah Karibskega morja, Bahamov in Floride. Ime je dobila po svojevrstnem pahljačastem, cevastem oz. grebenasto oblikovanem ogrodju in po barvi, ki je lahko različna in variira od rumene do oranžne, rdeče in rjave. Najdemo jo na globini več kot 10 metrov na grebenih, pobočjih grebenov in na navpičnih skalnatih površinah, kjer je tok

močan. Razmnožuje se spolno in nespolno. Prehranjuje se s pomočjo filtracije in vsebuje sekundarne metabolite, s pomočjo katerih se brani pred plenilci. (2)



Slika 2: Morska spužva *Agelas Clathrodes* (oranžno slonje uho) (3).

## 1.2. NAPETOSTNO ODVISNI NATRIJEVI IONSKI KANALI ( $\text{Na}_v$ -KANALI)

Napetostno odvisni natrijevi ionski kanali ( $\text{Na}_v$ ) sodijo med napetostno odvisne ionske kanale, transmembranske proteine, med katere uvrščamo tudi napetostno odvisne kalijeve, kalcijeve in kloridne ionske kanale. Njihovo aktivnost uravnava membranski potencial. Odprti kanali omogočajo ionom gibanje v smeri elektrokemijskega gradienta preko celične membrane. (4)

Hodgkin in Huxley sta l. 1952 pri proučevanju električne prevodnosti živčnih vlaken pri velikih lignjih odkrila napetostno odvisne natrijeve tokove. 26 let kasneje je znanstvenikom uspelo izolirati zelo kompleksno zgrajene natrijeve kanale. Do danes je znanih devet podtipov evkariontskih  $\text{Na}_v1$ -kanalov, pred kratkim pa so znanstveniki odkrili tudi novo družino evkariontskih natrijevih kanalov ( $\text{Na}_v2$ ). Prav tako je znanih osem farmakološko različnih vezavnih mest za ligande na  $\alpha$ -podenoti  $\text{Na}_v$ -kanala.  $\text{Na}_v$ -kanali generirajo več vrst natrijevih tokov, ki so podlaga za začetek in širjenje akcijskega potenciala v živčnih in mišičnih vlaknih. So tarče za široko paleto naravnih nepeptidnih

(tetrodotoksin (TTX), saksitoksin (STX), batrahotoksin (BTX)) in peptidnih nevrotoksinov, izoliranih iz strupa škorpionov, pajkov, stonog, dvoživk, rib, morskih vetrnic, spužev, stožčastih polžev, rastlin in bakterij. Na<sub>v</sub>-kanali se lahko nahajajo v treh različnih stanjih: odprto-prevodno stanje, zaprto-aktivirano (mirujoče) stanje in zaprto-inaktivirano (neprevodno oz. refraktarno) stanje. (4)

Na<sub>v</sub>-kanali se v večji meri izražajo v centralnem živčnem sistemu (Na<sub>v</sub>-podtip 1.1, 1.2, 1.3 in 1.6), dihalnih poteh (Na<sub>v</sub>-podtip 1.7, 1.8 in 1.9), srčni mišici (Na<sub>v</sub>-podtip 1.5 in 1.8), β-celicah trebušne slinavke (Na<sub>v</sub>-podtip 1.7), skeletnih mišicah (Na<sub>v</sub>-podtip 1.4), koži (Na<sub>v</sub>-podtip 1.7 in 1.8) in metastatskih rakavih celicah (Na<sub>v</sub>-podtip 1.1 – 1.9; β-podenote). Imajo pomembno farmakološko vlogo pri bolečini, epilepsiji, živčno-mišičnih motnjah, boleznih srčno-žilnega sistema, motnjah dihanja, raku, diabetični nevropatiji, kognitivni disfunkciji, avtizmu in multipli sklerozi. (4)

Zaradi svoje kompleksne molekularne strukture, hitrega prehajanja preko različnih stanj in visoke stopnje homologije sekvence aminokislin med različnimi podtipi Na<sub>v</sub>-kanalov predstavljajo izziv pri razvoju učinkovin, ki bi selektivno zavirale Na<sub>v</sub>-kanale (4).

### 1.2.1. MOLEKULARNA STRUKTURA Na<sub>v</sub>-KANALA

#### α-PODENOTA Na<sub>v</sub>-KANALA

Evkariontski Na<sub>v</sub>-kanali so zgrajeni iz α-podenote, ki je lahko sklopljena z eno ali dvema β-podenotama. Pri človeku poznamo devet različnih α-podenot (Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.4, Na<sub>v</sub>1.5, Na<sub>v</sub>1.6, Na<sub>v</sub>1.7, Na<sub>v</sub>1.8 in Na<sub>v</sub>1.9), ki jih kodirajo geni *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN4A*, *SCN5A*, *SCN8A*, *SCN9A*, *SCN10A* in *SCN11A*. Različne α-podenote določajo različne podtipe Na<sub>v</sub>-kanalov in vsebujejo vezavna mesta za učinkovine in toksine. α-podenote so veliki, enoverižni polipeptidi, ki so zgrajeni iz pribl. 2000 aminokislinskih ostankov in tvorijo štiri homologne domene (DI, DII, DIII, DIV), ki sestavljajo psevdotetrametrično strukturo. Vsaka domena je zgrajena iz šestih transmembranskih spiralnih segmentov (S1, S2, S3, S4, S5 in S6). Molekularna struktura α-podenote Na<sub>v</sub>-kanala je prikazana na sliki 3. (4)

- Domena za zaznavanje napetosti (ang. VSD = voltage-sensing domain) je zgrajena iz S1-4 segmentov iz vsake domene (slika 3) in je pomemben strukturni modul, ki uravnava odpiranje kanala po depolarizaciji membrane. Njeno fleksibilnost uravnava konformacijsko spreminjanje pozitivno nabitih argininskih in lizinskih ostankov znotraj

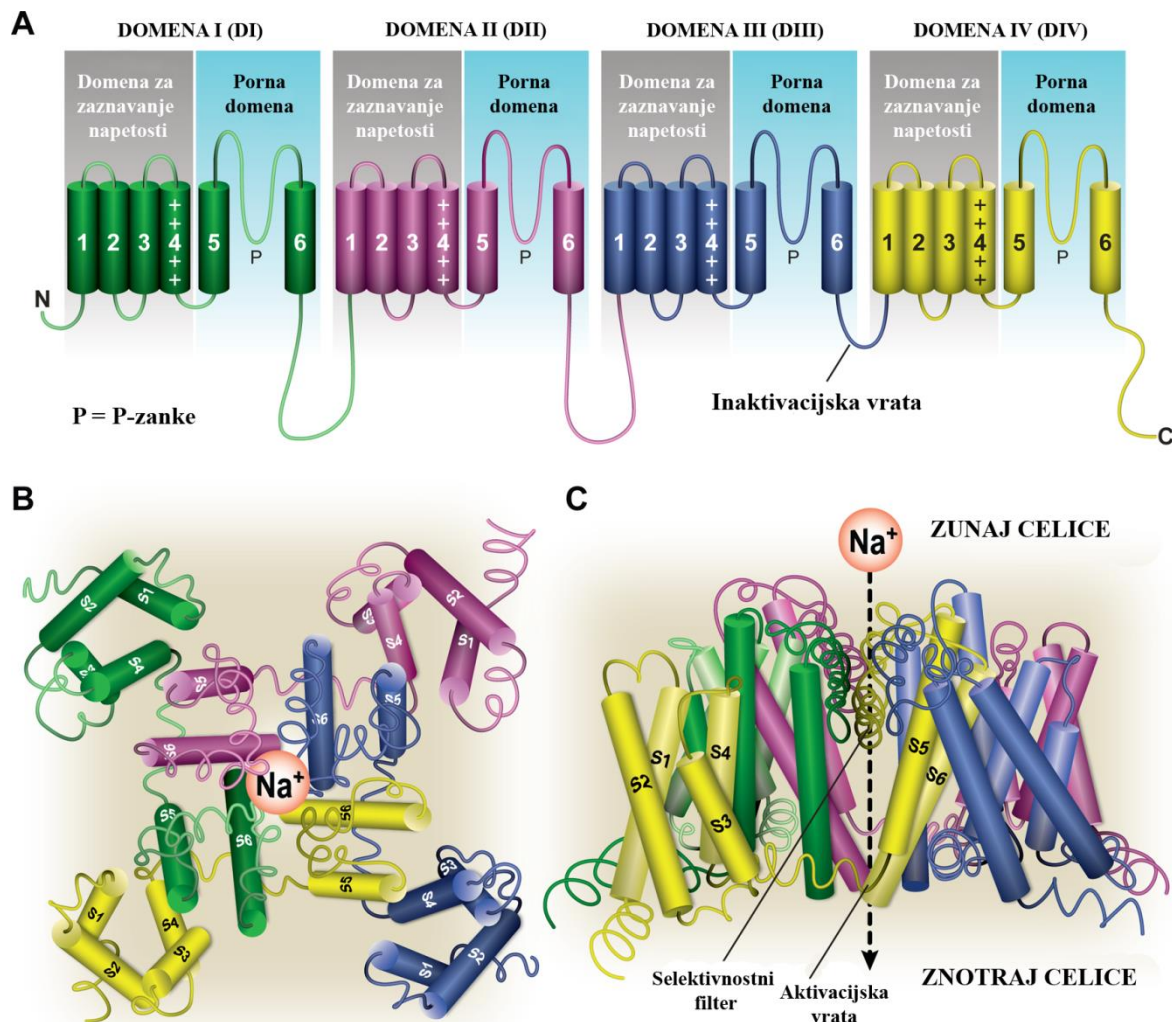
vsakega S4 heliksa. Štiri VSD so razvrščene okrog osrednjega vodnega kanala, ki ga sestavlja pora domena (ang. PD = pore domain). VSD je s PD povezana preko znotrajceličnega člena med transmembranskima segmentoma S4 in S5. Pozitivno nabiti S4 segmenti se po depolarizaciji pomaknejo proti zunajcelični površini. To gibanje se prenese na PD preko znotrajceličnih členov, ob tem pride do konformacijske spremembe in pora kanala se odpre. Med depolarizacijo inaktivacijska vrata zaprejo poro in s tem se kanal inaktivira. Po repolarizaciji membrane si neaktivni Na<sub>v</sub>-kanali »opomorejo«, S4 segmenti pa se vrnejo v prvotno stanje in so na razpolago za naslednjo depolarizacijo. (4)

- Porna domena (ang. PD = pore domain): segmenti S5, S6 in zunajcelične povezovalne porne zanke oz. P-zanke (ang. P-loops = pore loops) tvorijo poro kanala in selektivnostni filter (ang. SF = selectivity filter) (4).
- Selektivnostni filter (ang. SF = selectivity filter) vključuje pora domena. Predstavlja najožji del pore in razlikuje med ioni na podlagi podobnih nabojev in polmerov. SF je sestavljen iz aspartata v DI, glutamata v DII, lizina v DIII in alanina v DIV. Tvori geometrično najožji del v ionski pori (notranji obroč), ki selektivno prepušča hidratirane Na<sup>+</sup>-ione skozi ionsko poro. Bližje zunajcelični regiji se nahaja še en obroč (zunanji obroč), ki je sestavljen iz dveh glutamatnih in dveh aspartatnih ostankov in igra pomembno vlogo pri prehajanju Na<sup>+</sup>-ionov skozi poro. (4)
- Inaktivacijska vrata so ključni strukturni element  $\alpha$ -podenote in so sestavljena iz znotrajcelične zanke, ki povezuje homologni domeni DIII in DIV. Inaktivacijska vrata med hitro inaktivacijo delujejo kot pokrov na tečajih in se upognejo v znotrajcelično ustje pore. (4)
- Štirje hidrofobni aminokislinski ostanki, po eden iz vsakega znotrajceličnega konca S6 segmentov, tvorijo majhno znotrajcelično votlino ionskega kanala, ki jo imenujemo aktivacijska vrata (4).

### **$\beta$ -PODENOTA Na<sub>v</sub>-KANALA**

Štirje geni (*SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* in *SCN4B*) v genomu sesalcev kodirajo za pet proteinskih  $\beta$ -podenot ( $\beta$ 1,  $\beta$ 1B,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 in  $\beta$ 4). Podenoti  $\beta$ 2 in  $\beta$ 4 se vežeta na  $\alpha$ -podenoto preko disulfidne vezi, medtem ko se podenoti  $\beta$ 1 in  $\beta$ 3 združita z  $\alpha$ -podenoto nekovalentno. Vse  $\beta$ -podenote so transmembranski proteini, razen podenote  $\beta$ 1B, ki je topna molekula.  $\alpha$ -podenota je sama po sebi zadostna za tvorbo polno delujočega Na<sub>v</sub>-

kanala, vseeno pa ima  $\beta$ -podenota pomembno vlogo pri finem uravnavanju kinetike kanala in pri ekspresiji kanala na celični površini.  $\beta$ -podenote  $\text{Na}_v$ -kanalov so člani superdružine imunoglobulinov (Ig) molekul celične adhezije in imajo zunajcelično Ig domeno, ki sodeluje pri številnih procesih celične adhezije. (4)

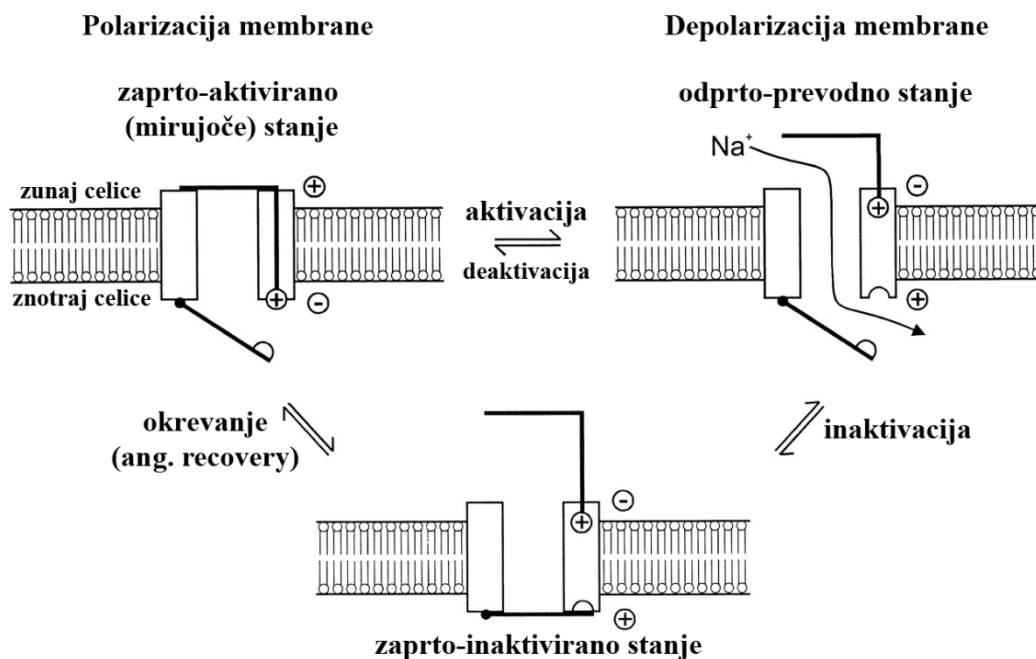


Slika 3: Molekularna struktura napetostno odvisnega natrijevega ionskega kanala ( $\text{Na}_v$ -kanala). (A) Struktura  $\alpha$ -podenote človeškega  $\text{Na}_v$ -kanala. (B) Zunajcelični pogled na kristalno strukturo  $\text{Na}_v$ -kanala v odprtem stanju bakterije *Magnetococcus* sp. (C) Stranski pogled na kristalno strukturo  $\text{Na}_v$ -kanala v odprtem stanju bakterije *Magnetococcus* sp. Prirejeno po (4).

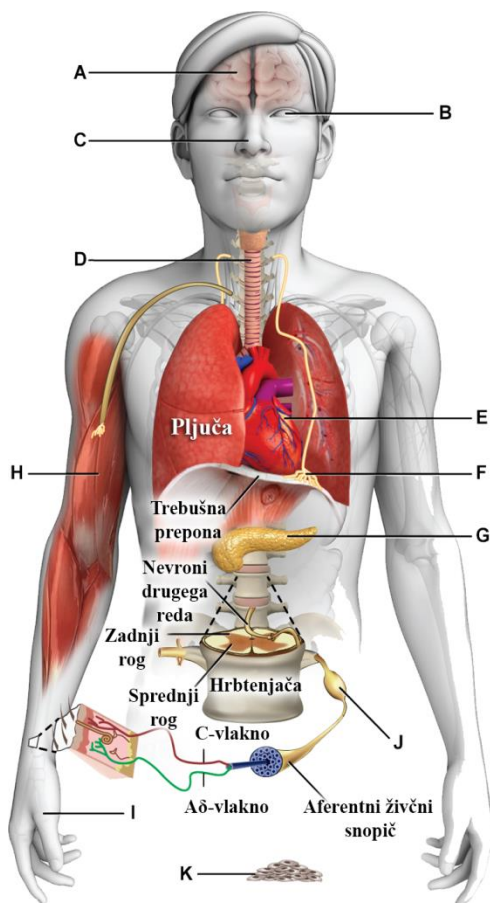


### 1.2.2. FIZIOLOGIJA $Na_v$ -KANALOV

$Na_v$ -kanali se nahajajo v celičnih membranah vzdražnih (živčne in mišične celice) in nevzdražnih (astrociti, mikroglia, makrofagi, rakave celice) celic. Od membranskega potenciala je odvisno, v kakšnem stanju se bodo nahajali. Depolarizacija membrane povzroči premike znotraj domen za zaznavanje napetosti, kar vodi do konformacijske spremembe  $\alpha$ -podenote in odprtja pore kanala.  $Na_v$ -kanali se zelo hitro odprejo in tako omogočijo tok  $Na^+$ -ionov v celico. Vse to je osnova za hitro proženje akcijskih potencialov v živčnih in mišičnih vlaknih.  $Na_v$ -kanali so kinetično hitro prevodni kanali, ki se inaktivirajo v nekaj milisekundah. Ker se nahajajo tudi v nevzdražnih celicah, naj bi bili udeleženi pri uravnavanju procesa fagocitoze, celičnega premikanja in metastaziranja. Mutacije genov, ki kodirajo za  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenote  $Na_v$ -kanalov, lahko vplivajo na ekspresijo kanalov ali pa spremenijo njihove lastnosti. To lahko posledično vodi do motenj ali celo prenehanja delovanja  $Na_v$ -kanalov, neobičajnega proženja akcijskih potencialov v živčnih in mišičnih vlaknih ter s tem tudi do bolezenskih stanj. (5)



Slika 4: Shema prikazuje  $Na_v$ -kanal v treh različnih stanjih (odprto-prevodno, zaprto-aktivirano (mirujoče) in zaprto-inaktivirano stanje). Depolarizacija membrane povzroči hitro odprtje kanala, čemur sledi hitra inaktivacija in prehod kanala v zaprto-inaktivirano stanje. Inaktivacija kanala izzove repolarizacijo membrane, čemur sledi faza okrevanja in prehod kanala v mirujoče stanje. Prirejeno po (6).



	Tkivo	Na-podtip	Učinek motnje delovanja Na - kanalov na fiziologijo
A	Centralni živčni sistem (CŽS)	1.1, 1.2, 1.3, 1.6	Epilepsija, migrena, avtizem, ataksija
B	Mrežnica	1.8, 1.9	Spremenjeno vizualno procesiranje
C	Olfaktorni (vohalni) senzorični nevroni	1.7	Anozmija (delna oziroma popolna izguba voha)
D	S senzoričnimi nevroni in vagalnimi senzoričnimi nevroni oživčene dihalne poti	1.7, 1.8, 1.9	Kašelj
E	Srčna mišica	1.5, 1.8	Sindrom Brugada, sindrom QT, atrijska fibrilacija
F	Živci in mišičje, ki sodelujejo pri dihanju	TTX-s Na <sub>v</sub> -s	Zastoj dihanja (zastropitev s tetrodotoksinom)
G	β-celice pankreasa	1.7	Sladkorna bolezen
H	Skeletna mišica	1.4	Hiperkalemična periodična paraliza, paramyotonia congenita, hipokalemična periodična paraliza
I	Koža	1.7, 1.8	Bolečinske motnje, paroksizmalna srbečica
J	Dorzalni ganglij	1.6, 1.7, 1.8, 1.9	
K	Metastatske rakave celice	1.1 - 1.9 in β-podenote	Rak jajčnikov, materničnega vratu, prostate, dojk, debelega črevesa, drobnocelični rak pljuč, melanom, limfom

Slika 5: Izražanje podtipov Na<sub>v</sub>-kanalov v različnih tkivih in učinki motenj delovanja Na<sub>v</sub>-kanalov na fiziologijo. Prirejeno po (4).

### 1.2.3. PREGLED VLOGE NA<sub>v</sub>-KANALOV

#### BOLEČINA

**Nocicepcija** je aktivnost v živčnih poteh, ki posredujejo signale o bolečinskih dražljajih.

**Bolečina** je subjektivna izkušnja, ki lahko spremlja nocicepcijo in vključuje posameznikov čustveni odziv nanjo. (7) S pomočjo primarnih senzoričnih nevronov zaznavamo nociceptivne dražljaje, ki jih občutimo kot bolečino. Pri nociceptivnem zaznavanju imajo pomembno vlogo naslednji podtipi Na<sub>v</sub>-kanalov: Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.7, Na<sub>v</sub>1.8 in Na<sub>v</sub>1.9. (4)

Na<sub>v</sub>1.7-kanali se hitro aktivirajo in inaktivirajo, po inaktivaciji pa počasi prehajajo nazaj v osnovno stanje. Tvorijo dve različni vrsti tokov, ramp tokove (ang. ramp currents) in resurgentne tokove (ang. resurgent currents). Genetske in biofizikalne študije so razkrile različne mutacije gena *SCN9A*, ki kodira za Na<sub>v</sub>1.7-kanal. Mutacije gena *SCN9A* lahko spreminjajo aktivacijske in inaktivacijske lastnosti Na<sub>v</sub>1.7-kanalov ter povzročajo degeneracijo aksona in paroksizmalno srbečico (»gain-of-function« mutacije), lahko pa

vodijo do ekspresije nefunkcionalnih proteinov pri družinah s prirojeno neobčutljivostjo na bolečino (»loss-of-function« mutacije). (4)

Na<sub>v</sub>1.8-kanali se v primerjavi z Na<sub>v</sub>1.7-kanali aktivirajo pri bolj depolariziranih membranskih potencialih. Mutacije gena *SCN10A*, ki kodira za Na<sub>v</sub>1.8-kanal, povzročajo povečano vzdražnost in nenavadno proženje akcijskih potencialov v dorzalnih bazalnih ganglijah (»gain-of-function« mutacije). Zato znanstveniki menijo, da naj bi imeli Na<sub>v</sub>1.8-kanali pomembno vlogo pri nocicepciji in bi bili udeleženi pri vnetni in nevropatski bolečini. (8) Na<sub>v</sub>1.9-kanali se aktivirajo pri zelo hiperpolariziranih membranskih potencialih blizu mirovnega membranskega potenciala. Mutacije gena *SCN11A*, ki kodira za Na<sub>v</sub>1.9-kanal, so znanstveniki povezali z blažjo mišično oslabelostjo ter s prirojeno nezmožnostjo občutenja bolečine pri ljudeh. Na<sub>v</sub>1.3-kanali pa naj bi prispevali k povečani vzdražnosti nevronov. (4)

## **EPILEPSIJA**

**Epilepsija** je kronična nevrološka motnja, za katero so značilni ponavljajoči se spontani **epileptični napadi**, ki se izrazijo v obliki motnje centralnega živčnega sistema (9). Pri uravnavanju vzdražnosti nevrnske mreže in sinhronizaciji nevrnske aktivnosti imajo pomembno vlogo GABA-nergični internevroni, kjer potekata sinteza in sproščanje GABA, ki je glavni inhibitorni nevrotransmitter v možganih. V GABA-nergičnih internevronih se izražata dva podtipa Na<sub>v</sub>-kanalov (Na<sub>v</sub>1.1 in Na<sub>v</sub>1.2), ki sta pomembna za generiranje akcijskih potencialov. Mutacije na genih, ki kodirajo za Na<sub>v</sub>1.1- in Na<sub>v</sub>1.2-kanale, poslabšajo vzdražnost GABA-nergičnih internevronov, kar vodi do povečane vzdražnosti in posledično do epilepsije (drugačnosmiselne in »loss-of-function« mutacije). (10)

## **ŽIVČNO-MIŠIČNE MOTNJE**

Na<sub>v</sub>1.4-kanali sodelujejo pri nastanku in širjenju akcijskih potencialov, ki povzročijo kontrakcijo mišice. Mutacije  $\alpha$ -podenote Na<sub>v</sub>1.4-kanalov so glavni vzrok za hiper- in hipokalemično periodično paralizo, prirojeno paramiotonijo in prirojen miastenični sindrom. (4)

## **BOLEZNI SRČNO-ŽILNEGA SISTEMA**

Študije so razkrile različne mutacije gena *SCN5A*, ki kodira za Na<sub>v</sub>1.5-kanal. Mutacije gena *SCN5A* lahko vplivajo na hitro inaktivacijo Na<sub>v</sub>-kanalov, pri čemer se kanali ne

zaprejo popolnoma, generirajo pa se dolgotrajni tokovi  $\text{Na}^+$ -ionov, kar vodi do podaljšanja ventrikularnega akcijskega potenciala («gain-of-function» mutacije) ali povzročitve sinteze nefunkcionalnega proteina oz. omejitve membranskega transporta skozi  $\text{Na}_v1.5$ -kanal («loss-of function» mutacije). (11)

## RAK

**Rak** je kompleksen patološki proces, ki ima svoj izvor v spremenjenem genomu. Gre za nekontrolirano razmnoževanje celic zaradi okvare nadzora celične delitve in odmiranja celic. Klinično se kaže v več kot sto boleznih z lokalnimi in sistemskimi znamenji. (13)  $\text{Na}_v$ -kanali imajo pomembno nadzorno funkcijo pri celičnih procesih, ki vključujejo metastaziranje in angiogenezo. Njihovo delovanje in ekspresijo uravnavajo hormoni, rastni faktorji, citokini in hipoksija,  $\text{Na}_v$ -kanali pa nadzirajo invazivnost rakavih celic z uravnavanjem celične gibljivosti in so povezani z izločanjem proteoliznih encimov. Povečano ekspresijo različnih podtipov  $\text{Na}_v$ -kanalov in  $\beta$ -podenot tako povezujejo s številnimi vrstami raka (metastatski karcinom prostate, rak dojke, drobnocelični rak pljuč, nevroblastom, melanom, rak materničnega vratu, rak jajčnikov in rak debelega črevesa). (4)

## DRUGO

**Kašelj** je eksploziven izdih in predstavlja normalen obrambni mehanizem čiščenja tujkov in izločkov iz traheobronhialnega drevesa (12). Refleks kašlja pri sesalcih uravnavajo vagalni senzorični nevroni, kjer se izražajo  $\text{Na}_v$ -kanali. Študije na morskih prašičkih so pokazale, da naj bi selektivno zaviranje perifernih  $\text{Na}_v1.7$ -kanalov imelo antitusični učinek. Pri **diabetični nevropatiji** se je pojavila nova hipoteza, ki pravi, da le-ta ni zaplet sladkorne bolezni, ampak je posledica mutacij genov, ki kodirajo za  $\text{Na}_v1.7$ -kanale. Mutacije genov, ki kodirajo za  $\text{Na}_v1.1$ -kanale, naj bi povzročale **kognitivne motnje** in bile povezane z **Alzheimerjevo boleznijo**, **shizofrenijo** in **migreno**, mutacije genov, ki kodirajo za  $\text{Na}_v1.2$ -kanale pa naj bi bile povezane z **avtizmom**.  $\text{Na}_v1.2$ -,  $\text{Na}_v1.6$ - in  $\text{Na}_v1.8$ -kanali naj bi imeli pomembno vlogo pri patofiziologiji **multiple skleroze**. Za  $\text{Na}_v1.2$ - in  $\text{Na}_v1.6$ -kanale so dokazali vpletenost v proces obnove živčne prevodnosti po demielinizaciji in degeneraciji aksonov. Povečana regulacija  $\text{Na}_v1.8$ -kanalov naj bi prispevala k cerebralni disfunkciji na eksperimentalnih mišjih modelih multiple skleroze. (4)

#### 1.2.4. VPLIV NARAVNIH SPOJIN NA $Na_v$ -KANALE

Rastline, kopenski organizmi (škorpijoni, pajki, stonoge), dvoživke, morski organizmi (stožčasti polži, morske vetrnice, spužve) in bakterije (cianobakterije) proizvajajo nepeptidne in peptidne spojine, s pomočjo katerih lahko napadejo svoj plen ali pa se branijo pred plenilci. Mnoge izmed teh spojin vplivajo na  $Na_v$ -kanale in imajo agonistične in antagonistične učinke ter tako vplivajo na kinetiko aktivacije in inaktivacije ionskega kanala ali pa svojo toksičnost izražajo preko fizičnega zaviranja toka  $Na^+$ -ionov skozi kanal. V magistrski nalogi se osredotočamo izključno na spojine naravnega izvora in njihove sintezne analoge, ki modulirajo delovanje evkariontskih  $Na_v$ -kanalov, saj je tudi klatrodin spojina naravnega izvora.

#### NEPEPTIDNE NARAVNE SPOJINE

**Tetrodotoksin** (TTX) je sekundarni gvanidinski metabolit z rigidno strukturo, ki ga najdemo pri ribi napihovalki in nekaterih drugih organizmih. Dokazano zavira  $Na_v1.1$ -,  $Na_v1.2$ -,  $Na_v1.3$ -,  $Na_v1.4$ -,  $Na_v1.6$ - in  $Na_v1.7$ -kanale. **Saksitoksin** (STX) je prav tako sekundarni gvanidinski metabolit, ki ga proizvaja enocelična dinoflagelatna alga in ima podobne učinke kot TTX. TTX in STX se vežeta na mesto 1 v  $Na_v$ -kanalu. Negativno nabite karboksilatne skupine aminokislinskih ostankov pa interagirajo s pozitivno nabitimi gvanidinskimi in hidroksilnimi skupinami TTX in STX. **Ciguatoksini** (CTXs) in **brevetoksini** (PbTxS) so nepeptidni polieterski toksini z molekulskim ogrodjem, ki spominja na lestev. Aktivirajo številne podtipne  $Na_v$ -kanalov. Proizvajajo jih morske dinoflagelatne mikroalge. CTXs in PbTxS se akumulirajo v tkivih rib, ki se prehranjujejo z mikroalgami. Tekom prehranjevalne verige se bioakumulirajo in oksidirajo do bolj toksičnih metabolitov. Interagirajo z mestom 5 na  $\alpha$ -podenoti  $Na_v$ -kanala. **Batrahotoksin** (BTX) je kompleksni steroidni alkaloid, izoliran iz kožnega sekreta žab rodu *Phylllobates*. **Veratridin** (VTD) je steroidni alkaloid, izoliran iz semen lilije *Sabadilla*. BTX in VTD se vežeta na mesto 2 in delujeta kot agonista na  $Na_v$ -kanalih. (4)

#### PEPTIDNE NARAVNE SPOJINE

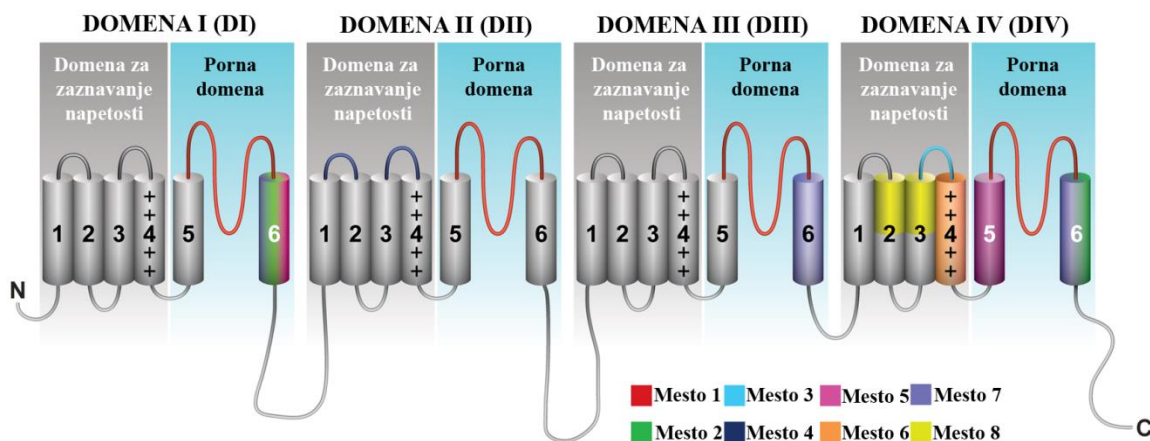
**Konotoksini** so toksini, izolirani iz strupa morskega stožčastega polža. Do danes je znanih pet družin konotoksinov ( $\mu$ -,  $\mu O$ -,  $\delta$ -,  $\iota$ - in  $\mu O\delta$ -), med katerimi  $\mu$ -,  $\mu O$ - in  $\mu O\delta$ -konotoksini zavirajo,  $\delta$ - in  $\iota$ -konotoksini pa aktivirajo  $Na_v$ -kanale. Iz vrst teh družin

izhajajo nekateri izmed najbolj selektivnih modulatorjev  $\text{Na}_v$ -kanalov. **KIIIA** je peptid, ki ga sestavlja 16 aminokislin. Izmed  $\mu$ -konotoksinov je najmočnejši blokator  $\text{Na}_v1.7$ -kanalov. Močno inhibira tudi  $\text{Na}_v1.1$ -,  $\text{Na}_v1.2$ -,  $\text{Na}_v1.4$ - in  $\text{Na}_v1.6$ -kanale. (14)

**Toksini škorpionov (ScTxS)** so toksini, izolirani iz strupa škorpionov.  $\alpha$ -ScTxS in  $\beta$ -ScTxS sta dve skupini ScTxS, ki specifično delujeta  $\text{Na}_v$ -kanale.  $\alpha$ -ScTxS interagirajo z  $\text{Na}_v$ -kanali na mestu 3 in upočasnijo hitro inaktivacijo kanala.  $\beta$ -ScTxS interagirajo z  $\text{Na}_v$ -kanali na mestu 4 in s tem povzročijo premik aktivacije, odvisne od napetosti, k bolj negativnim membranskim potencialom. Sintezni  $\alpha$ -toksin škorpionov **OD1** je močan modulator  $\text{Na}_v1.7$ -,  $\text{Na}_v1.4$ - in  $\text{Na}_v1.6$ -kanalov. (4)

**Toksini pajkov (NaSpTxS)** imajo večplasten mehanizem delovanja na  $\text{Na}_v$ -kanale in delujejo kot selektivni modulatorji aktivacije in inaktivacije. **Protoksin II (ProTx-II)** je najmočnejši zaviralec humanih  $\text{Na}_v1.7$ -kanalov. Gre za peptid, izoliran iz strupa tarantele *Thrixopelma pruriens*, ki se zasidra v DII S3 – S4 linker in ujame v past DII S4 napetostni senzor v zaprtem stanju. (15)


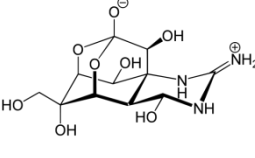
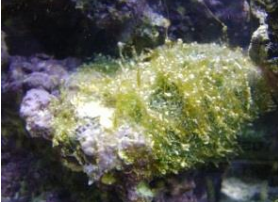
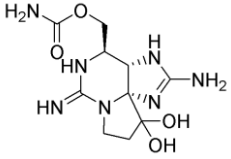
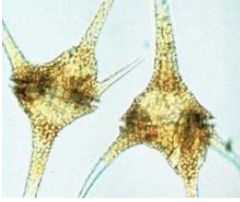
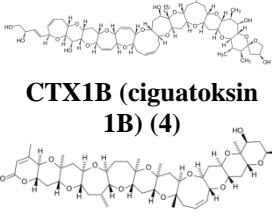
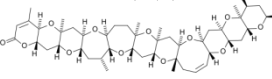

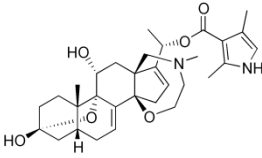

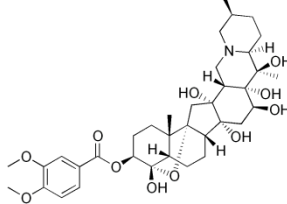

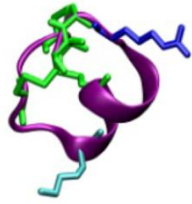

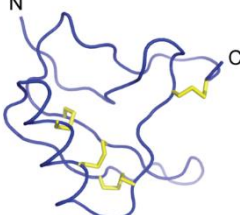

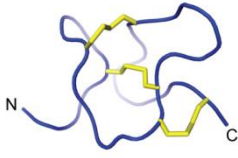

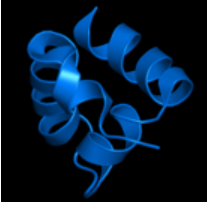

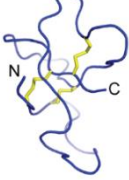
**$\mu$ -SLPTX-Ssm6a** je peptid, izoliran iz strupa kitajske rdečeglave stonoge *Scolopendra subspinipes mutilans*. Je selektiven zaviralec  $\text{Na}_v1.7$ -kanalov in izkazuje močan analgetični učinek na glodalskih modelih. **Antoplevrin B** je toksin morske vetrnice, ki se veže na mesto 3 in zavira hitro inaktivacijo  $\text{Na}_v$ -kanala. (4)



Slika 6: Slika prikazuje 8 do danes poznanih vezavnih mest učinkovin na  $\alpha$ -podenoti  $\text{Na}_v$ -kanala. V oklepajih so navedene konkretne spojine, ki se vežejo na to mesto. **Mesto 1** – 4 P-zanke (TTX, STX,  $\mu$ -konotoksini). **Mesto 2** – S6 v DI in DIV (BTX, VTD). **Mesto 3** – zunajcelična S3 – S4 zanka v DIV ( $\alpha$ -ScTxS). **Mesto 4** – zunajcelični zanki S1 – S2 in S3 – S4 v DII ( $\beta$ -ScTxS, ProTx-II). **Mesto 5** – S6 v DI in S5 v DIV (CTXS, PbTxS). **Mesto 6** – S4 v DIV ( $\mu\text{O}^-$ ,  $\delta$ -konotoksini). **Mesto 7** – S6 v DI, DIII, DIV (lokalni anestetiki). **Mesto 8** – S2 in S3 v DIV (majhne molekule). Prirejeno po (4).



Preglednica I: Nepeptidne in peptidne naravne spojine, ki modulirajo delovanje Na<sup>+</sup>-kanalov, in njihovi viri.

 <p><b>Riba napihovalka (16)</b></p>  <p><b>TTX (tetrodotoksin) (17)</b></p>	 <p><b>Dinoflagelatna alga (18)</b></p>  <p><b>STX (saksitoksin) (19)</b></p>	 <p><b>Dinoflagelatna mikroalga (20)</b></p>  <p><b>CTX1B (ciguatoksin 1B) (4)</b></p>  <p><b>PbTx B (brevetoksin B) (4)</b></p>	 <p><b>Zlata grozna listovka (<i>Phyllobates terribilis</i>) (21)</b></p>  <p><b>BTX (batrahotoxin) (4)</b></p>
 <p><b>Sabadilla (22)</b></p>  <p><b>VTD (veratridin) (4)</b></p>	 <p><b>Stožčasti polž (23)</b></p>  <p><b>μ-konotoksin KIIIA (24)</b></p>	 <p><b>Iranski rumeni škorpion (25)</b></p>  <p><b>OD1 (4)</b></p>	 <p><b>Tarantela (<i>Thrixopelma pruriens</i>) (26)</b></p>  <p><b>protoksin II (4)</b></p>
 <p><b>Stonoga <i>Scolopendra subspinipes</i> (27)</b></p>	 <p><b>μ-SLPTX-Ssm6a (28)</b></p>	 <p><b>Morska vetrnica (29)</b></p>	 <p><b>antopleurin B (4)</b></p>

### 1.3. VLOGA KLATRODINA IN NJEGOVIH SINTEZNIH ANALOGOV PRI AKTIVACIJI/INAKTIVACIJI $\text{Na}_v$ -KANALOV

Poskusi na celicah simpatičnih ganglijev, izoliranih iz piščančjih zarodkov, ter poskusi na žabjih mišicah so pokazali, da je morski alkaloid klatrodin zmanjšal tok  $\text{Na}^+$ -ionov v celico za 30 %, s tem pa naj bi izražal nevrotoksično aktivnost zoper  $\text{Na}_v$ -kanale (30). Nedavne elektrofiziološke študije pa nakazujejo na to, da klatrodin nima vpliva na  $\text{Na}_v$ -kanale in se ne smatra več za potencialno spojino vodnico pri razvoju novih učinkovin, ki bi ciljale na  $\text{Na}_v$ -kanale (1).

Kljub temu da klatrodin ne velja več za potencialno spojino vodnico pri načrtovanju novih selektivnih zaviralcev  $\text{Na}_v$ -kanalov, njegovi strukturni analogi izkazujejo aktivnost zoper  $\text{Na}_v$ -kanale. Četudi imajo večje peptidne molekule očitno prednost v smislu selektivnosti na določenih podtipih  $\text{Na}_v$ -kanalov, ne smemo spregledati potenciala majhnih sinteznih molekul.

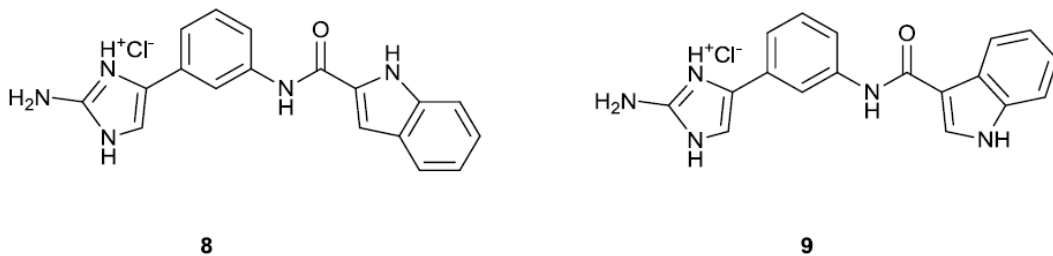
Na podlagi strukture klatrodina je bilo sintetiziranih veliko analogov (1, 31, 32, 33, 34, 35, 36). Pri strukturni družini analogov, kjer je bila fenilna skupina uporabljena z namenom, da omeji konformacijsko svobodo med 2-aminoimidazolom in indolskim jedrom, so opazili moduliranje odpiranja in zapiranja  $\text{Na}_v$ -kanalov (analog **8**, analog **9** (slika 7)). Rezultati elektrofiziološke študije so pokazali, da naj bi imela analoga **8** in **9** vpliv na  $\text{Na}_v$ -kanale, vendar naj bi z njimi interagirala na različne načine. (1)

Analog **8** je pri nizkih koncentracijah spremenil napetostno odvisnost inaktivacije (1). Podobno delujejo tudi določeni toksini škorpionov ( $\alpha$ -ScTx).  $\alpha$ -ScTx se vežejo na vezavno mesto 3 (slika 6), ki se nahaja na ekstracelularni zanki, ki povezuje segmenta S3 in S4 v domeni IV (DIV)  $\text{Na}_v$ -kanala.  $\alpha$ -ScTx interagirajo z  $\text{Na}_v$ -kanalom v zaprtem stanju, stabilizirajo S4 napetostni senzor DIV in poslabšajo konformacijske spremembe, ki so potrebne za hitro inaktivacijo. (4) Za razliko od  $\alpha$ -ScTx je analog **8** pri visokih koncentracijah zmanjšal maksimalno amplitudo toka  $\text{Na}^+$ -ionov, kar nakazuje na drugačen način modulacije  $\text{Na}_v$ -kanalov (1).

Analog **9** naj bi povzročil inhibicijo  $\text{Na}_v$ -kanala s fizično obstrukcijo poti ionskega kanala (1). Podobno delovanje izkazujejo tudi tetrodotoksin (TTX) in saksitoksin (STX), ki se vežeta na mesto 1 (slika 6) v  $\text{Na}_v$ -kanalu. TTX in STX se vežeta na ozek del znotraj pore kanala, s tem fizično zapreta pot  $\text{Na}^+$ -ionom in zmanjšata njihovo prevodnost skozi kanal. (4) Analog **9**, TTX in STX nimajo signifikantnega vpliva na kinetiko  $\text{Na}_v$ -kanalov. Poudariti



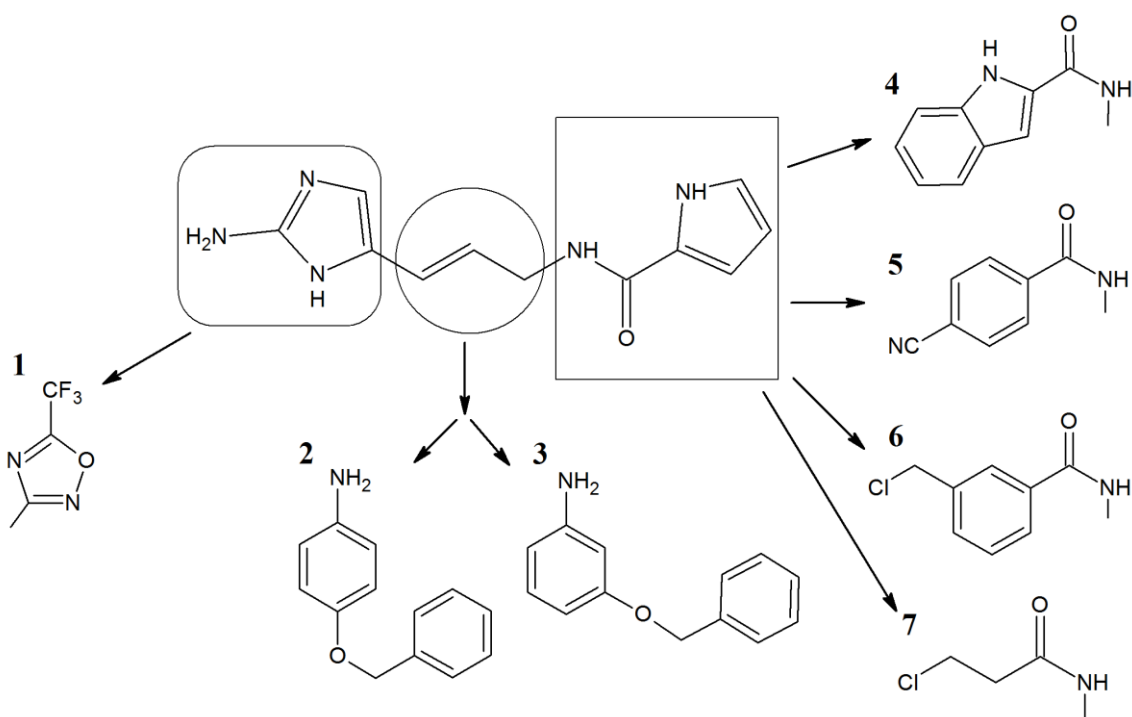
je potrebno še, da analog **9** z vezavo na Na<sub>v</sub>-kanale izkazuje podobno farmakološko aktivnost, vendar strukturno ni podoben gvanidinskima toksinoma TTX in STX. (1)



Slika 7: Slika prikazuje analoga **8** in **9** strukturne družine analogov klatrodina, kjer je bila fenilna skupina uporabljena z namenom, da omeji konformacijsko svobodo med 2-aminoimidazolom in indolskim jedrom (1).

## 2. NAMEN DELA

Sintetizirali, izolirali in očistili bomo 5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolne derivate klatrodina. Pri delu se bomo opirali na znane sintezne postopke priprave posameznih strukturnih elementov. 2-amino-1H-imidazolski obroč v klatroдинu bomo nadomestili s 5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolskim obročem (**1**). Kot distančnik bomo uporabili 4-(benziloksi)anilin (**2**) in 3-(benziloksi)anilin (**3**). Amido-1H-pirolno skupino v klatroдинu bomo nadomestili z amidoindolno (**4**), amido-4-cianofenilno (**5**), amido-3-klorometilfenilno (**6**) in amido-3-kloropropilno skupino (**7**), kar je prikazano na sliki 8.



Slika 8: Prikaz sprememb v molekuli klatrodina.

V prvi stopnji bomo sintetizirali etre N-{4-[(4-cianobenzil)oksi]fenil}acetamid (**1**), N-{3-[(4-cianobenzil)oksi]fenil}acetamid (**3**) in N-{3-[(3-cianobenzil)oksi]fenil}acetamid (**4**), pri čemer bomo uporabili N-(4-hidroksifenil)acetamid oz. N-(3-hidroksifenil)acetamid (**2**), 4-(bromometil)benzonitril oz. 3-(bromometil)benzonitril in NaOEt. Nadaljevali bomo s sintezo amidoksimov: N-[4-({4-[amino(hidroksiimino)metil]benzil}oksi)fenil]acetamid (**5**), N-[3-({4-[amino(hidroksiimino)metil]benzil}oksi)fenil]acetamid (**6**) in N-[3-({3-[amino(hidroksiimino)metil]benzil}oksi)fenil]acetamid (**7**). Pri sintezi amidoksimov bomo

uporabili  $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$  in TEA. V naslednji stopnji bomo pripravili 3,5-disubstituirane-1,2,4-oksadiazole: N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-acetamid (**8**), N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamid (**9**) in N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamid (**10**). Pri sintezi spojin **8**, **9** in **10** bomo uporabili TFAA in piridin b.v., reakcijo bomo segrevali ob vrenju. V četrti stopnji bomo izvedli kislo hidrolizo amidne skupine pri spojinah **8**, **9** in **10**. Dobljene amine: 4-{{4-(5-trifluorometil-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzil}oksi}fenilamin (**11**), 3-{{4-(5-trifluorometil-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzil}oksi}fenilamin (**12**) in 3-{{3-(5-trifluorometil-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzil}oksi}fenilamin (**13**) bomo v zadnji stopnji pretvorili v ustrezne amide z indol-2-karboksilno kislino in TBTU oz. TCT. Tako želimo pripraviti naslednje amide: N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamid (**14**), N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamid (**15**) in N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamid (**16**). Pri sintezi N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-4-cianofenilamida (**18**) bomo uporabili izhodni amin **11** in 4-cianobenzoil klorid. Sintezo N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-3-(klorometil)fenilamida (**19**) bomo izvedli z uporabo izhodnega amina **12** in 3-(klorometil)benzoil klorida. Pri sintezi N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-3-kloropropilamida (**20**) bomo uporabili izhodni amin **13** in 3-kloropropionil klorid. Sintezo 5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolnih derivatov klatrodina bomo poskušali izvesti tudi po drugi poti. Začeli bomo s sintezo N-(4-hidroksifenil)indolkarboksamida (**17**) ob uporabi TCT oz.  $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ . Vse spojine bomo očistili in jih fizikalno-kemijsko okarakterizirali. S pomočjo metode jedrske magnetne resonance (NMR), infrardeče spektroskopije (IR) in masne spektroskopije (MS) bomo sintetiziranim spojinam določili strukturo. Z elementno analizo (CHN) bomo potrdili vsebnost ogljika, vodika in dušika v molekulah. Rezultati elementne analize in določitev talilnega intervala nam bodo dali podatke o čistosti spojin. Spojinam bomo določili organoleptične lastnosti (izgled in vonj), topnost v različnih topilih in retencijski faktor v ustreznih mobilnih fazah ter izračunali izkoristke reakcij. Učinke izbranih spojin bomo določili s pomočjo elektrofiziološkega poskusa na napetostno odvisnih natrijevih ionskih kanalih.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### Laboratorijska oprema:

- Magnetno mešalo IKA<sup>®</sup> RCT basic IKAMAG Magnetic stirrer.
- Rotavapor BÜCHI<sup>®</sup> type R-114 in BÜCHI<sup>®</sup> Waterbath B-480.
- Tehnica METTLER TOLEDO<sup>®</sup> PB403-S/FACT Precision Balance in tehnica Sartorius ISO 9001.
- UV svetilka CAMAG UV-cabinet II ( $\lambda = 254 \text{ nm}/366 \text{ nm}$ ).
- Toplotna pištola SKIL<sup>®</sup> 1800 Watt, SKIL<sup>®</sup> 8003 Skil Europe BV Konijnenberg 60.
- Ultrazvočna kadička Iskra pio d.o.o., Sonis 4.
- Sušilnik Instrumentaria Zagreb, Sterimatic ST-11.
- Hladilnik Candy.
- Kalota Electrothermal EMV/1000/LC.
- Steklovina različnih proizvajalcev (bučke, čaše, erlenmajerice, merilne in polnilne pipete, vodni povratni hladilnik, termometer, prisesalne erlenmajerice, Büchnerjev lij, klor-kalcijeva cevka).
- Avtomatska pipeta Transferpette<sup>®</sup> ISO 9001\*14001.
- Filter papir (Sartorius, filter discs).
- Oljna kopel, ledena vodna kopel 0 °C (zmes vode in ledu), ledena vodna kopel –10 °C (zmes vode, ledu in kuhinjske soli).

#### Reagenti, topila in raztopine:

- Pri delu smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Merck KGaA, Carlo Erba Reagents, Sigma Aldrich, Emsure<sup>®</sup>, Riedel-de HAËN AG SEELZE – HANNOVER ustrezne čistosti ( $\geq 95 \%$ ).
- TEA in piridin smo pred vsako uporabo sveže predestilirali. Pri destilaciji smo zagotovili brezvodne pogoje. TEA in piridin smo predestilirali nad trdnim KOH-jem. Destilat TEA smo zbirali pri  $T_v = 89\text{--}90 \text{ }^\circ\text{C}$ , destilat piridina pa pri  $T_v = 115,2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po končani destilaciji smo glavno frakcijo destilata shranili in vsebino porabili v roku 48 h.

- NaOEt smo pripravili tako, da smo v bučko z okroglim dnom dodali EtOH b.v. (40 mL/1 g Na) in v čašo s toluenom natehtali Na. Koščke Na smo pred dodatkom k EtOH b.v. z brisačko popivnali, nato smo na bučko takoj nadelni vodni povratni hladilnik s klor-kalcijevo cevko in vklopili mešalo. Reakcija je bila končana, ko mehurčki niso več nastajali.

### Kromatografske metode:

- Tankoplastna kromatografija. TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany. Aluminijaste plošče dimenzije 20 x 20 cm z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. S TLC smo spremljali sintezne postopke, izolacijo in čiščenje spojin.
- Mobilne faze.  
**MF1:** EtOAc, **MF2:** EtOAc:MeOH = 2:3, **MF3:** EtOAc:MeOH = 2:1, **MF4:** DKM:MeOH = 7:1, **MF5:** DKM:MeOH = 9:1, **MF6:** DKM:MeOH = 49:1, **MF7:** EtOAc:HEX = 7:3, **MF8:** EtOAc:HEX = 49:1, **MF9:** EtOAc:HEX = 4:1, **MF10:** EtOAc:HEX = 3:2, **MF11:** CHCl<sub>3</sub>, **MF12:** EtOAc:HEX = 2:3, **MF13:** EtOAc:HEX = 3:7, **MF14:** EtOAc:HEX = 1:1, **MF15:** DKM.
- Orositveni reagenti. Ninhidrin (detekcija aminov in amidov), 9 % FeCl<sub>3</sub> v MeOH (detekcija alkoholov in fenolov), bromkrezol zeleno (detekcija karboksilnih kislin).
- Kolonska kromatografija. Stacionarna faza – silikagel Silica Gel 60 (Kieselgel 60, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (flash silikagel). Uporabljali smo različne mobilne faze in steklene kolone.

### Spektroskopske metode:

- NMR. Spektrometer Bruker UltraShield<sup>TM</sup> pri 400 MHz, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Topili CDCl<sub>3</sub> in DMSO-d<sub>6</sub>. Interni standard TMS. Obdelava spektrov s programom MestRec 4.8.6.0 (Mestrelab Research).
- MS. Spektrometer Q-TOF Premier, Waters-Micromass, Center za masno spektrometrijo, Institut Jožef Stefan v Ljubljani. Tehnika: ESI in HRMS.
- IR. Spektrometer PerkinElmer Spectrum BX System FT-IR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.

**Elementna analiza:**

- Analizator Perkin Elmer 2400 CHN, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani.

**Talilni interval in topnost:**

- Določevanje tališč oz. talilnih intervalov. Koflerjev talilni mikroskop z ogrevalno mizico Leica. Tališča niso korigirana.
- Topnost. V pripravljeno penicilinko smo dali kristalček spojine, kanili 3 kapljice hladnega topila in opazovali raztapljanje kristalčka.

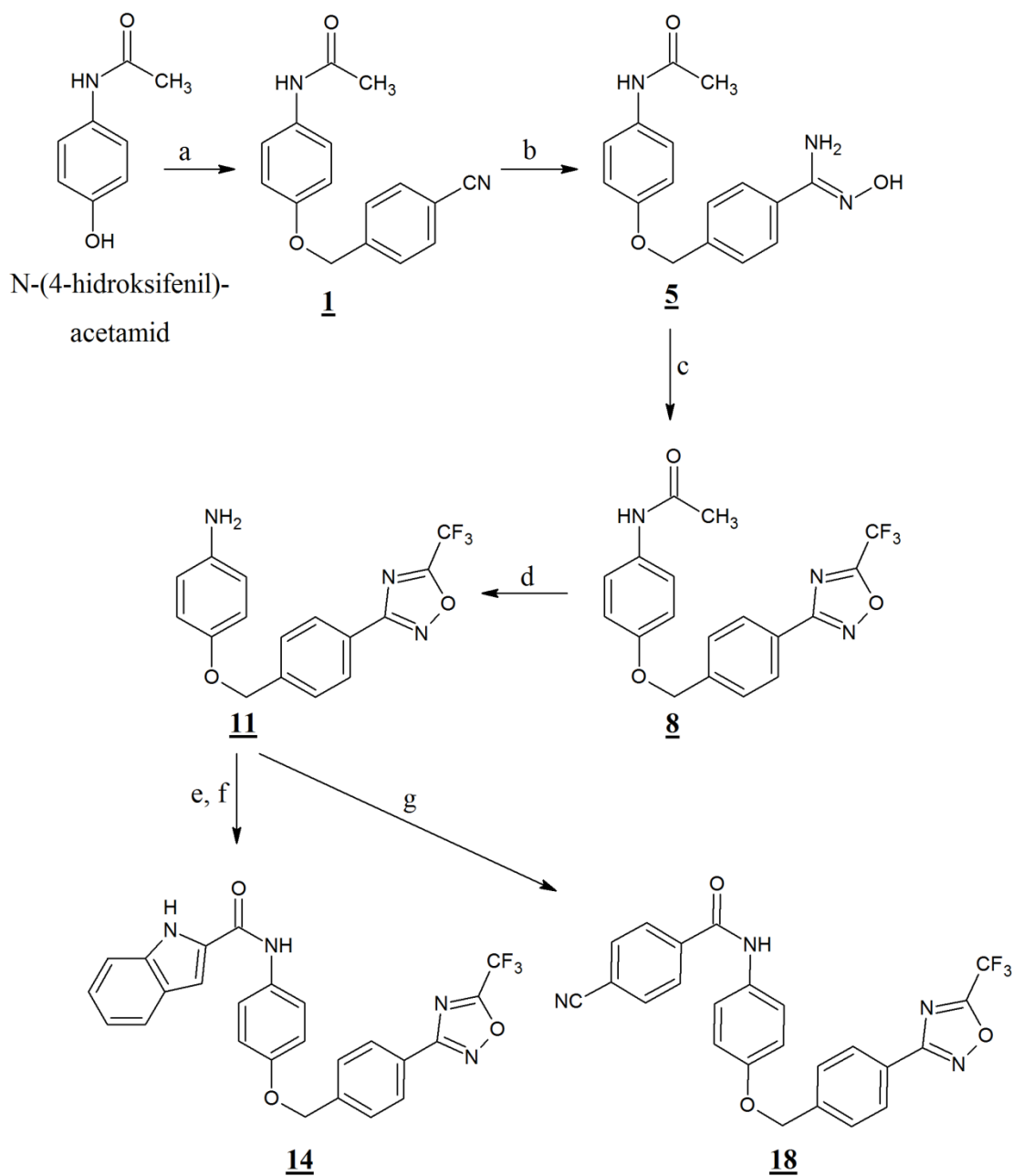
**Elektrofiziološke metode:**

- QPatch poskusi na  $Na_v1.3$  kanalih (Xention Ltd., Iconix Park, London Road, Pampisford, Cambridge CB22 3EG, UK).

**Računalniška programska oprema:**

- ACD/ChemSketch Freeware za risanje strukturnih formul, reakcijskih shem in poimenovanje struktur.
- Obdelava slikovnega materiala s programom Adobe Photoshop CC 2015.

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO



Slika 9: Reakcijska shema sinteze para-para analogov 5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolnih derivatov klatrodina. **a:** NaOEt, 4-(bromometil)benzonitril, segrevanje pri temperaturi vrelišča (t = 3,5 h); **b:** NH<sub>2</sub>OH x HCl, TEA, MeOH, segrevanje pri temperaturi vrelišča (t = 24 h); **c:** TFAA, piridin, T = 110 °C (t = 24–72 h); **d:** 5 M HCl, THF, segrevanje pri temperaturi vrelišča (t = 24–48 h); **e:** Indol-2-karboksilna kislina, TBTU, NMM, DKM, T = 40 °C (t = 10 h); **f:** Indol-2-karboksilna kislina, TCT, NMM, DKM, T = 20 °C (t = 1 teden); **g:** 4-cianobenzoil klorid, TEA, DKM, T = 20 °C, (t = 5,5 h).

#### 4.1. SINTEZA N-{4-[(4-CIANOENZIL)OKSI]FENIL}ACETAMIDA (**1**) (37)

Najprej smo pripravili NaOEt. V 100 mL bučko z okroglim dnom smo nalili EtOH b.v. (60 mL) in dodali Na (24,4 mmol, 560 mg). Tvorba NaOEt v EtOH je potekala na sobni temperaturi 1 h. Nato smo dodali N-(4-hidroksifenil)acetamid (19,9 mmol, 3 g) in na oljni kopeli pri  $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  segrevali 1 h. Po 1 h smo reakcijski zmesi dodali 4-(bromometil)benzonitril (20,4 mmol, 4 g) in na oljni kopeli pri temperaturi vrelišča segrevali 3,5 h. Po končani reakciji smo bučko ohladili na sobno temperaturo. Vsebino smo prelili v 600 mL čašo in dodali ohlajeno destilirano  $\text{H}_2\text{O}$  (500 mL). Izpadli produkt **1** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke ter ga spirali z ohlajeno destilirano  $\text{H}_2\text{O}$ . Produkt **1** smo kvantitativno prenesli v 250 mL bučko z okroglim dnom in dodali DEE (50 mL). DEE smo odpareli na rotavaporju. Produkt **1** smo nato sušili v sušilniku 3 h ( $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Na koncu smo izvedli prekrystalizacijo iz 96 % EtOH. Kristale produkta **1** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke, jih spirali s hladnim 96 % EtOH in jih sušili v sušilniku 2 h ( $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

**Izgled:** blede rožnati kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v  $\text{CHCl}_3$ , EtOH, ACT in MeOH ter slabo topna v HEX, DEE, destilirani  $\text{H}_2\text{O}$  in TOL. **Izkoristek reakcije:** 58,2 %. **Rf:** 0,43 v MF1. **Talilni interval:** 197–200  $^{\circ}\text{C}$ . **Molekulska formula:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ . **Mr (izračunana):** 266,32. **MS (ESI):** 267,1 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. **IR (KBr  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3291, 2230, 1658, 1612, 1513, 1408, 1372, 1241, 1010, 827, 726, 559. **Elementna analiza:** izračunano: C: 72,15 %; H: 5,31 %; N: 10,52 %; izmerjeno: C: 71,94 % ( $\Delta$  0,21); H: 5,33 % ( $\Delta$  0,02); N: 10,37 % ( $\Delta$  0,15).  **$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.0 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 5.18 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{O}-$ ); 6.95 (d, 2H,  $J = 9.1\text{ Hz}$ , 2H Ar); 7.48 (d, 2H,  $J = 9.2\text{ Hz}$ , 2H Ar); 7.65 (d, 2H,  $J = 8.5\text{ Hz}$ , 2H Ar); 7.67 (d, 2H,  $J = 8.5\text{ Hz}$ , 2H Ar); 9.81 (s, 1H,  $-\text{NH}-$ ).

#### 4.2. SINTEZA N-[4-({4-[AMINO(HIDROKSIIMINO)METIL]BENZIL}-OKSI)FENIL]ACETAMIDA (**5**) (37)

V 100 mL bučko z okroglim dnom smo nalili MeOH (60 mL) ter dodali  $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$  (9,4 mmol, 650 mg) in TEA (7,2 mmol, 1 mL). Reakcijsko zmes smo mešali 30 min na sobni temperaturi. Nato smo reakcijski zmesi dodali spojino **1** (7,5 mmol, 2 g) in na oljni kopeli pri temperaturi vrelišča segrevali 24 h. Po končani reakciji smo bučko ohladili na sobno temperaturo. Kasneje smo jo hladili še na ledeni vodni kopeli. Vsebino smo nato



prelili v 600 mL čašo in dodali ohlajeno destilirano H<sub>2</sub>O (500 mL). Čašo smo za 24 h postavili v hladilnik. Nastale bele oz. blede rožnate kristale produkta **5** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in jih nato v sušilniku sušili 3 h (T = 50 °C). **Izgled:** beli oz. blede rožnati kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v EtOH, MeOH in ACT ter slabo topna v CHCl<sub>3</sub>, HEX, DEE, TOL in destilirani H<sub>2</sub>O. **Izkoristek reakcije:** 92,3 %. **Rf:** 0,2 v MF1, 0,77 v MF2, 0,70 v MF3, 0,65 v MF4. **Talilni interval:** 205–208 °C. **Molekulska formula:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>. **Mr (izračunana):** 299,36. **MS (ESI):** 300 (M+H)<sup>+</sup>. **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3456, 3363, 3289, 1662, 1516, 1411, 1311, 1234, 1111, 1042, 925, 826, 720, 521. **Elementna analiza:** izračunano: C: 64,19 %; H: 5,74 %; N: 14,04 %; izmerjeno: C: 63,76 % (Δ 0,43); H: 5,60 % (Δ 0,14); N: 13,61 % (Δ 0,43). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 2.0 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 5.07 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 5.82 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 6.94 (d, 2H, J = 9.1 Hz, 2H Ar); 7.42 – 7.46 (m, 4H, 4H Ar); 7.68 (d, 2H, J = 8.5 Hz, 2H Ar); 9.64 (s, 1H, -OH); 9.79 (s, 1H, -NH-).

### 4.3. SINTEZA N-[4-({4-[5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}OKSI)FENIL]ACETAMIDA (**8**)<sup>(37)</sup>

V 50 mL bučko z okroglim dnom smo dodali spojino **5** (2,7 mmol, 800 mg) in piridin (pribl. 10–20 mL). Nato smo vklopili magnetno mešalo in počakali, da se je spojina **5** v piridinu raztopila. Reakcijsko zmes smo prepihovali z argonom 30 min in jo na ledeni vodni kopeli ohladili na –10 °C. V ohlajeno reakcijsko zmes smo nato počasi dokapavali TFAA (3,2 mmol, 453 μL). Bučko smo dvignili nad ledeno vodno kopel in pri sobni temperaturi mešali 1 h. Nato smo jo segrevali na oljni kopeli pri T = 110 °C in konec reakcije ocenili s pomočjo TLC. Reakcija je potekala 48 h. Bučko smo po končani reakciji ohladili na sobno temperaturo, vsebino prelili v 250 mL čašo, dodali destilirano H<sub>2</sub>O (150 mL) in s 4 M HCl nakisali do pH = 2. V čaši smo dobili rjavo kosmičasto oborino, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke. Nato smo izvedli kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF = EtOAc ali EtOAc:HEX = 7:3; topilo za suhi nanos = ACT, MeOH) in dobili očiščeno spojino **8**. **Izgled:** blede oranžni kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v MeOH, DMSO in EtOAc ter slabo topna v destilirani H<sub>2</sub>O, EtOH, TOL, ACT, CHCl<sub>3</sub>, DEE in HEX. **Izkoristek reakcije:** 22,5 %. **Rf:** 0,55 v MF1, 0,93 v MF4, 0,9 v MF5, 0,35 v MF6, 0,32 v MF7, 0,48 v MF8, 0,48 v MF9 in 0,25 v MF10. **Talilni interval:** 201–204 °C. **Molekulska formula:** C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>. **Mr (izračunana):** 377,35. **MS (ESI):** 378 (M+H)<sup>+</sup>. **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3313,

2908, 2363, 1662, 1544, 1374, 1328, 1216, 1165, 995, 820, 766, 523. **Elementna analiza:** izračunano (**8** x ¼ C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N): C: 58,22 %; H: 3,88 %; N: 11,47 %; izmerjeno: C: 57,97 % (Δ 0,25); H: 3,46 % (Δ 0,42); N: 11,10 % (Δ 0,37). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 2.01 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 5.19 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 6.98 (d, 2H, J = 9.1 Hz, 2H Ar); 7.49 (d, 2H, J = 9.1 Hz, 2H Ar); 7.69 (d, 2H, J = 8.6 Hz, 2H Ar); 8.10 (d, 2H, J = 8.5 Hz, 2H Ar); 9.81 (s, 1H, -NH-).

#### 4.4. SINTEZA 4-{[4-(5-TRIFLUOROMETIL-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL)BENZIL]OKSI}FENILAMINA (**11**)<sup>(37)</sup>

V 25 mL bučko z okroglim dnom smo dodali spojino **8** (1,2 mmol, 453 mg), 5 M HCl (6,0 mmol, 1,2 mL) in THF (10,4 mL). Vklpili smo magnetno mešalo in zmes segrevali na oljni kopeli pri temperaturi vrelišča 48 h. Po končani reakciji smo THF odparili na rotavaporju. Vsebino v bučki smo naalkalili z 10 M NaOH do pH = 10. Bazično vodno fazo smo prelili v 250 mL lij ločnik in ekstrahirali z EtOAc (200 mL). Organsko fazo smo spirali z destilirano H<sub>2</sub>O (2 x 40 mL) in nasičeno raztopino NaCl (40 mL) ter jo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 h. Nato smo sušilno sredstvo odfiltrirali in organsko topilo (EtOAc) uparili na rotavaporju. Dobili smo 367 mg oranžne zmesi. Zmes smo očistili s kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF = CHCl<sub>3</sub>; topilo za suhi nanos = ACT, MeOH) in dobili očiščeno spojino **11**. **Izgled:** blede oranžni kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v EtOAc, DKM, DMSO, MeOH, EtOH in ACT ter slabo topna v CHCl<sub>3</sub>, HEX, TOL, destilirani H<sub>2</sub>O in DEE. **Izkoristek reakcije:** 49,6 %. **Rf:** 0,58 v MF6. **Talilni interval:** 84–86 °C. **Molekulska formula:** C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>. **Mr (izračunana):** 335,31. **MS (HRMS):** 336,1 (M+H)<sup>+</sup>; 336,0955; izračunano: 336,0960 (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3377, 2879, 2361, 1615, 1510, 1420, 1325, 1157, 1020, 829, 754, 699, 659. **Elementna analiza:** izračunano (**11** x 1/8 CHCl<sub>3</sub>): C: 55,30 %; H: 3,50 %; N: 12,00 %; izmerjeno: C: 55,61 % (Δ 0,31); H: 3,97 (Δ 0,47); N: 11,63 (Δ 0,37). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 4.66 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 5.08 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 5.515 (d, 2H, J = 9.0 Hz, 2H Ar); 6.75 (d, 2H, J = 8.9 Hz, 2H Ar); 7.66 (d, 2H, J = 8.5 Hz, 2H Ar); 8.08 (d, 2H, J = 8.5 Hz, 2H Ar).

#### 4.5. SINTEZA N-[4-({4-[5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}OKSI)FENIL]INDOLKARBOKSAMIDA (**14**)

##### 1. način:

V 25 mL bučko z okroglim dnom smo dodali indol-2-karboksilno kislino (1,5 mmol, 239 mg), TBTU (1,5 mmol, 475 mg) in DKM (11 mL). Vkllopili smo magnetno mešalo in vsebino na sobni temperaturi mešali 5 min. K reakcijski zmesi smo dodali NMM (3,3 mmol, 362  $\mu$ L) in na sobni temperaturi mešali 1 h. Nato smo dodali spojino **11** (0,96 mmol, 323 mg) in NMM (1,7 mmol, 181  $\mu$ L). Po dodatku NMM smo na oljni kopeli pri temperaturi vrelišča mešali 10 h. Po končani reakciji smo DKM uparili na rotavaporju. Nato smo v bučko nalili DKM (30 mL) in vsebino kvantitativno prenesli v 50 mL lij ločnik. Organsko fazo smo spirali z destilirano H<sub>2</sub>O (3 x 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (10 mL). Organsko topilo (DKM) smo uparili na rotavaporju. Dobljeno zmes smo poskušali očistiti s kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF = CHCl<sub>3</sub>; topilo za suhi nanos = CHCl<sub>3</sub> in ACT), s preobarjanjem v kombinaciji topil MeOH – DEE in preobarjanjem v kombinaciji topil EtOAc – HEX. Spojine **14** nismo uspeli očistiti.

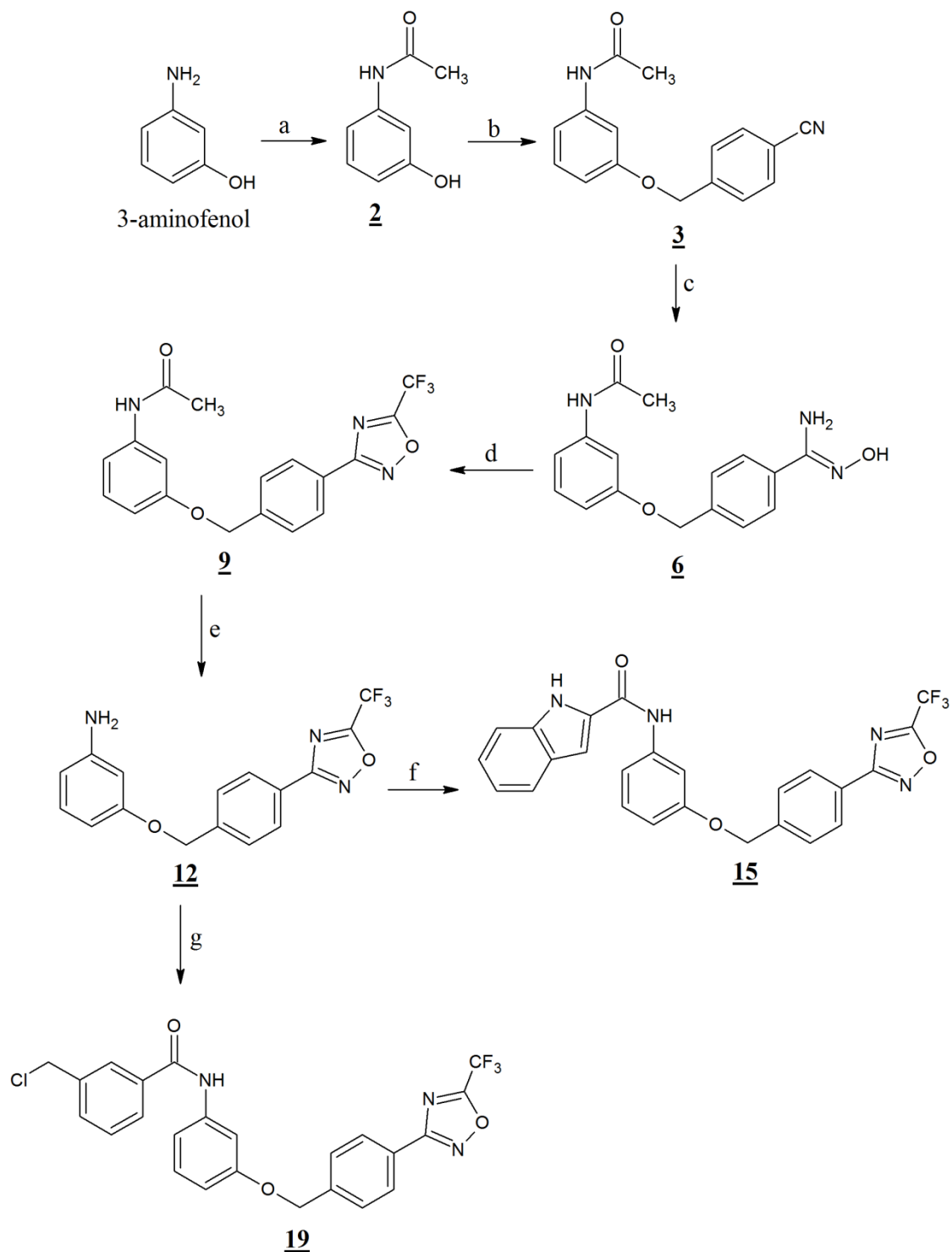
##### 2. način:

V 100 mL bučko z okroglim dnom smo nalili DKM (40 mL), dodali TCT (0,7 mmol, 128 mg) in zmes na ledeni vodni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo v bučko dodali NMM (2,1 mmol, 230  $\mu$ L) in indol-2-karboksilno kislino (2,1 mmol, 337 mg). Reakcijsko zmes smo na ledeni vodni kopeli pustili mešati 3 h. Nato smo bučko dvignili nad ledeno vodno kopel in v reakcijsko zmes dodali spojino **11** (1 mmol, 350 mg) ter NMM (2,1 mmol, 230  $\mu$ L). Bučko smo zatesnili s steklenim zamaškom in vsebino pustili mešati na sobni temperaturi 1 teden. Po končani reakciji smo topilo (DKM) uparili na rotavaporju in vsebino prelili s hladno destilirano H<sub>2</sub>O (40 mL). Nastalo svetlo rjavo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in sušili v sušilniku 3 h (T = 50 °C). Produkt smo nato kvantitativno prenesli v 50 mL bučko z okroglim dnom, dodali DEE (30 mL) in dali na ultrazvočno kadičko. Nastalo fino oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in sušili v sušilniku 3 h (T = 50 °C). Dobili smo očiščeno spojino **14**. **Izgled:** blede rjav prašek brez vonja. **Topnost:** spojina je slabo topna v destilirani H<sub>2</sub>O, EtOH, DEE, DKM, PEE, HEX, cHEX, HEPT, CHCl<sub>3</sub> in DMSO. V hladnem ACT, EtOAc, BENZ in TOL je slabo topna, v vročih topilih

se raztopi. Spojina je dobro topna v DOKS. **Izkoristek reakcije:** 82,6 %. **Rf:** 0,76 v MF6. **Talilni interval:** 250–254 °C. **Molekulska formula:** C<sub>25</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>. **Mr (izračunana):** 478,46. **MS (HRMS):** 477,1 (M-H)<sup>-</sup>; 477,1179; izračunano: 477,1175 (C<sub>25</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3362, 3101, 1774, 1694, 1640, 1598, 1534, 1477, 1414, 1364, 1318, 1272, 1201, 1155, 1055, 994, 905, 822, 801, 748, 700, 636, 565, 509. **Elementna analiza:** izračunano: C: 62,75 %; H: 3,59 %; N: 11,71 %; izmerjeno: C: 63,17 % (Δ 0,42); H: 3,63 % (Δ 0,04); N: 12,17 % (Δ 0,46). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 5.25 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 7.05 – 7.09 (m, 3H, 3H Ar); 7.22 (t, 1H, J = 6.0 Hz, 1H Ar); 7.38 (s, 1H, 1H Ar); 7.46 (d, 2H, J = 9.0 Hz, 2H Ar); 7.71 – 7.74 (m, 4H, 4H Ar); 8.12 (d, 2H, J = 8.6 Hz, 2H Ar); 10.14 (s, 1H, -NH-); 11.70 (s, 1H, -NH-).

#### 4.6. SINTEZA N-[4-({4-[5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}OKSI)FENIL]-4-CIANOFENILAMIDA (**18**)

V 25 mL bučko z okroglim dnom smo dodali spojino **11** (0,29 mmol, 97 mg), DKM (10 mL) in TEA (0,35 mmol, 48 μL) ter zmes na ledeni vodni kopeli ohladili na -10 °C. Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali 4-cianobenzoil klorid (0,35 mmol, 58 mg). Nato smo bučko dvignili nad ledeno vodno kopel in pri sobni temperaturi mešali 5,5 h. Po končani reakciji smo DKM uparili na rotavaporju in vsebino v bučki prelili s hladno destilirano H<sub>2</sub>O (20 mL). Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in sušili v sušilniku 1 h (T = 50 °C). Dobili smo čisto spojino **18**. **Izgled:** rjavi kristali s kovinskim leskom brez vonja. **Topnost:** spojina je topna v MeOH, ACT, EtOAc, DMSO in CHCl<sub>3</sub> ter slabo topna destilirani H<sub>2</sub>O in HEX. **Izkoristek reakcije:** 86,3 %. **Rf:** 0,75 v MF1, 0,50 v MF14. **Talilni interval:** 219–223 °C. **Molekulska formula:** C<sub>24</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>. **Mr (izračunana):** 464,43. **MS (HRMS):** 463,1 (M-H)<sup>-</sup>; 463,1011; izračunano: 463,1018 (C<sub>24</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 2232, 1648, 1598, 1513, 1499, 1414, 1316, 1289, 1229, 1196, 1156, 1102, 1027, 993, 902, 858, 819, 757, 730, 663, 633, 567, 516. **Elementna analiza:** izračunano: C: 62,06 %; H: 3,26 %; N: 12,07 %; izmerjeno: C: 61,61 % (Δ 0,45); H: 3,39 % (Δ 0,13); N: 11,77 % (Δ 0,30). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 5.24 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 7.075 (d, 2H, J = 9.2 Hz, 2H Ar); 7.68 – 7.72 (m, 4H, 4H Ar); 8.03 (d, 2H, J = 8.7 Hz, 2H Ar); 8.04 – 8.12 (m, 4H, 4H Ar); 10.40 (s, 1H, -NH-).



Slika 10: Reakcijska shema sinteze meta-para analogov 5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolnih derivatov klatrodina. **a**: Acetanhidrid, H<sub>2</sub>O, T = 20 °C (t = 40 min); **b**: NaOEt, 4-(bromometil)benzoni-tril, segrevanje pri temperaturi vrelišča (t = 3 h 25 min); **c**: NH<sub>2</sub>OH x HCl, TEA, MeOH, segrevanje pri temperaturi vrelišča (t = 24 h); **d**: TFAA, piridin, T = 110 °C (t = 24–72 h); **e**: 5 M HCl, THF, segrevanje pri temperaturi vrelišča (t = 24 h); **f**: Indol-2-karboksilna kislina, TCT, NMM, DKM, T = 20 °C (t = 1 teden); **g**: 3-(klorometil)benzoil klorid, TEA, DKM, T = 20 °C, (t = 24 h).

**4.7. SINTEZA N-(3-HIDROKSIFENIL)ACETAMIDA (2)** <sup>(38)</sup>

V 250 mL bučko z okroglim dnom smo dodali 3-aminofenol (82,5 mmol, 9 g) in destilirano H<sub>2</sub>O (21 mL) ter nastalo suspenzijo na ledeni vodni kopeli ohladili na 0 °C. Ohlajeni suspenziji smo med mešanjem počasi dokapavali acetanhidrid (88,4 mmol, 8,3 mL). Nato smo izklopili magnetno mešalo, bučko z reakcijsko zmesjo dvignili nad ledeno vodno kopel in jo pustili na sobni temperaturi 1 h. Nastali produkt **2** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in ga sušili v sušilniku 3 h (T = 50 °C). Nato smo izvedli prekristalizacijo iz vode. Kristale produkta **2** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in jih sušili v sušilniku 1 h (T = 50 °C). **Izgled:** svetlo rjavi kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v EtOH, ACT in MeOH ter slabo topna v DEE, destilirani H<sub>2</sub>O, HEX, CHCl<sub>3</sub> in TOL. **Izkoristek reakcije:** 72,0 %. **Rf:** 0,46 v MF1. **Talilni interval:** 145–148 °C. **Talilni interval iz literature:** 146–149 °C (39). **Molekulska formula:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>. **Mr (izračunana):** 151,18. **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3472, 3116, 1608, 1559, 1458, 1277, 1163, 1030, 960, 882, 769, 544. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 2.01 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 6.42 (d, 1H, J = 11.2 Hz, ArH); 6.92 (d, 1H, J = 10.6 Hz, ArH); 7.05 (t, 1H, J = 8.5 Hz, ArH); 7.19 (s, 1H, ArH); 9.34 (s, 1H, -OH); 9.79 (s, 1H, -NH-).

**4.8. SINTEZA N-{3-[(4-CIANOENZIL)OKSI]FENIL}ACETAMIDA (3)** <sup>(37)</sup>

Najprej smo pripravili NaOEt. V 100 mL bučko z okroglim dnom smo nalili EtOH b.v. (60 mL) in dodali Na (24,35 mmol, 560 mg). Tvorba NaOEt v etanolu je potekala na sobni temperaturi 1,5 h. Nato smo dodali spojino **2** (19,8 mmol, 3 g) in na oljni kopeli pri T = 50 °C segrevali 1,5 h. Po 1,5 h smo reakcijski zmesi dodali 4-(bromometil)benzoni-tril (20,4 mmol, 4 g) in na oljni kopeli pri temperaturi vrelišča segrevali 3,5 h. Po končani reakciji smo bučko ohladili na sobno temperaturo. Vsebinsko smo prelili v 600 mL čašo in dodali ohlajeno destilirano H<sub>2</sub>O (500 mL). Izpadli produkt **3** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in ga spirali z ohlajeno destilirano H<sub>2</sub>O. Produkt **3** smo kvantitativno prenesli v 250 mL bučko z okroglim dnom in dodali DEE (60 mL). DEE smo odpareli na rotavaporju. Produkt **3** smo nato sušili v sušilniku 3 h (T = 50 °C). Na koncu smo izvedli prekristalizacijo iz 96 % EtOH. Kristale produkta **3** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke, jih spirali s hladnim 96 %

EtOH in jih sušili v sušilniku 45 min ( $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). **Izgled:** blede rožnati kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v  $\text{CHCl}_3$ , EtOH, ACT in MeOH ter slabo topna v HEX, DEE in destilirani  $\text{H}_2\text{O}$ . **Izkoristek reakcije:** 53,6 %. **Rf:** 0,57 v MF1. **Talilni interval:** 151–153  $^{\circ}\text{C}$ . **Molekulska formula:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ . **Mr (izračunana):** 266,32. **MS (ESI):** 267,1 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. **IR (KBr  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3292, 2226, 1665, 1616, 1487, 1414, 1379, 1283, 1158, 1053, 821, 753, 689, 554. **Elementna analiza:** izračunano: C: 72,15 %; H: 5,31 %; N: 10,52 %; izmerjeno: C: 71,97 % ( $\Delta$  0,18); H: 5,39 % ( $\Delta$  0,08); N: 10,56 % ( $\Delta$  0,04).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.03 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 5.19 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 6.69 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, 1H Ar); 7.10 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, 1H Ar); 7.20 (t, 1H,  $J = 8.1$  Hz, 1H Ar); 7.40 (s, 1H, 1H Ar); 7.64 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz, 2H Ar); 7.77 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, 2H Ar); 9.94 (s, 1H,  $-\text{NH}-$ ).

#### 4.9. SINTEZA N-[3-({4-[AMINO(HIDROKSIIMINO)METIL]BENZIL}-OKSI)FENIL]ACETAMIDA (**6**)<sup>(37)</sup>

V 100 mL bučko z okroglim dnom smo nalili MeOH (60 mL) ter dodali  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  (9,4 mmol, 650 mg) in TEA (9,1 mmol, 1,3 mL). Reakcijsko zmes smo na sobni temperaturi pustili mešati 30 min. Nato smo ji dodali spojino **3** (7,5 mmol, 2 g) in na oljni kopeli pri temperaturi vrelišča segrevali 24 h. Po končani reakciji smo bučko ohladili na sobno temperaturo in jo kasneje hladili še na ledeni vodni kopeli. Vsebino smo nato prelili v 600 mL čašo in dodali ohlajeno destilirano  $\text{H}_2\text{O}$  (500 mL). Čašo smo za 24 h postavili v hladilnik. Nastalo belo oborino, produkt **6**, smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in sušili v sušilniku 1 h ( $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). **Izgled:** bel prašek brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v MeOH, DMSO in ACT ter slabo topna v EtOH,  $\text{CHCl}_3$ , HEX, DEE, TOL in destilirani  $\text{H}_2\text{O}$ . **Izkoristek reakcije:** 91,6 %. **Rf:** 0,51 v MF4. **Talilni interval:** 193–198  $^{\circ}\text{C}$ . **Molekulska formula:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ . **Mr (izračunana):** 299,36. **MS (ESI):** 300 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. **IR (KBr  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3494, 3384, 2930, 1657, 1558, 1451, 1373, 1274, 1155, 1032, 924, 865, 763, 688, 534. **Elementna analiza:** izračunano: C: 64,19 %; H: 5,74 %; N: 14,04 %; izmerjeno: C: 64,43 % ( $\Delta$  0,24); H: 5,70 % ( $\Delta$  0,04); N: 13,93 % ( $\Delta$  0,11).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.03 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 5.08 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 5.83 (s, 2H,  $-\text{NH}_2$ ); 6.69 (d, 1H,  $J = 11.5$  Hz, 1H Ar); 7.10 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, 1H Ar); 7.19 (t, 1H,  $J = 8.1$  Hz, 1H Ar); 7.37 (s, 1H, 1H Ar); 7.44 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, 2H Ar); 7.69 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, 2H Ar); 9.66 (s, 1H,  $-\text{OH}$ ); 9.86 (s, 1H,  $-\text{NH}-$ ).

**4.10. SINTEZA N-[3-({4-[5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}OKSI)FENIL]ACETAMIDA (9)** <sup>(37)</sup>

V 50 mL bučko z okroglim dnom smo dodali spojino **6** (4,0 mmol, 1,2 g) in piridin (pribl. 20 mL). Nato smo vklopili magnetno mešalo in počakali, da se je spojina **6** v piridinu raztopila. Reakcijsko zmes smo prepihovali z argonom 30 min in jo na ledeni vodni kopeli ohladili na  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V ohlajeno reakcijsko zmes smo nato počasi dokapavali TFAA (4,5 mmol, 634  $\mu\text{L}$ ). Bučko smo dvignili nad ledeno vodno kopel in pri sobni temperaturi mešali 1 h. Nato smo vsebino segrevali na oljni kopeli pri  $T = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$  in konec reakcije ocenili s pomočjo TLC. Reakcija je potekala 24 h. Bučko smo po končani reakciji ohladili na sobno temperaturo, vsebino prelili v 250 mL čašo, dodali destilirano  $\text{H}_2\text{O}$  (200 mL) in s 4 M HCl nakisali do  $\text{pH} = 2$ . V čaši smo dobili blede oranžno kosmičasto oborino, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke. Nato smo izvedli kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF = EtOAc; topilo za suhi nanos = ACT, MeOH, EtOAc) in dobili očiščeno spojino **9**. **Izgled:** rumeni kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v ACT, MeOH, DMSO,  $\text{CHCl}_3$  in EtOAc ter slabo topna v destilirani  $\text{H}_2\text{O}$ , EtOH, TOL, DEE in HEX. **Izkoristek reakcije:** 60,3 %. **Rf:** 0,51 v MF1. **Talilni interval:**  $179\text{--}181\text{ }^{\circ}\text{C}$ . **Molekulska formula:**  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}_3$ . **Mr (izračunana):** 377,35. **MS (ESI):** 378 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. **IR (KBr  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3297, 2365, 1667, 1618, 1490, 1421, 1323, 1211, 1161, 1060, 994, 870, 766, 535. **Elementna analiza:** izračunano: C: 57,29 %; H: 3,75 %; N: 11,14 %; izmerjeno: C: 57,64 % ( $\Delta$  0,35); H: 3,45 % ( $\Delta$  0,3); N: 11,10 % ( $\Delta$  0,04).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.03 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 5.20 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 6.72 (d, 1H,  $J = 9.2\text{ Hz}$ , 1H Ar); 7.10 (d, 1H,  $J = 8.2\text{ Hz}$ , 1H Ar); 7.21 (t, 1H,  $J = 8.1\text{ Hz}$ , 1H Ar); 7.42 (s, 1H, 1H Ar); 7.69 (d, 2H,  $J = 8.6\text{ Hz}$ , 2H Ar); 8.10 (d, 2H,  $J = 8.5\text{ Hz}$ , 2H Ar); 9.94 (s, 1H,  $-\text{NH}-$ ).

**4.11. SINTEZA 3-{{4-(5-TRIFLUOROMETIL-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL)BENZIL}OKSI}FENILAMINA (12)** <sup>(37)</sup>

V 25 mL bučko z okroglim dnom smo dodali spojino **9** (1,9 mmol, 719 mg), 5 M HCl (9,5 mmol, 1,9 mL) in THF (8,0 mL). Vklopili smo magnetno mešalo in zmes segrevali na oljni kopeli pri temperaturi vrelišča 24 h. Po končani reakciji smo THF odparili na rotavaporju. Vsebinsko v bučki smo naalkalili z 10 M NaOH do  $\text{pH} = 10$ . Bazično vodno fazo smo prelili v 50 mL lij ločnik in ekstrahirali z EtOAc (3 x 40 mL). Združene organske faze smo prelili



v 250 mL lij ločnik ter spirali z destilirano H<sub>2</sub>O (2 x 40 mL) in nasičeno raztopino NaCl (40 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 h. Nato smo sušilno sredstvo odfiltrirali in organsko topilo (EtOAc) uparili na rotavaporju. Dobili smo 550 mg temno rumene oljaste zmesi. Zmes smo očistili s kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF = EtOAc:HEX = 2:3 oz. CHCl<sub>3</sub>; topilo za suhi nanos = MeOH) in dobili očiščeno spojino **12**. **Izgled:** blede rumeni kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v EtOAc, DKM, DMSO, MeOH, EtOH in ACT ter slabo topna v CHCl<sub>3</sub>, HEX, TOL, destilirani H<sub>2</sub>O in DEE. **Izkoristek reakcije:** 42,3 %. **Rf:** 0,29 v MF11, 0,67 v MF1, 0,45 v MF12. **Talilni interval:** 98–102 °C. **Molekulska formula:** C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>. **Mr (izračunana):** 335,31. **MS (HRMS):** 336,1 (M+H)<sup>+</sup>; 336,0967; izračunano: 336,0960 (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3462, 3358, 1600, 1481, 1421, 1323, 1149, 991, 833, 756, 689. **Elementna analiza:** izračunano: C: 57,31 %; H: 3,61 %; N: 12,53 %; izmerjeno: C: 57,17 % (Δ 0,14); H: 3,68 % (Δ 0,07); N: 12,45 % (Δ 0,08). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 5.09 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 5.13 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>); 6.17 (d, 2H, J = 8.1 Hz, 2H Ar); 6.23 (s, 1H, 1H Ar); 6.91 (t, 1H, J = 8.0 Hz, 1H Ar); 7.67 (d, 2H, J = 8.6 Hz, 2H Ar); 8.10 (d, 2H, J = 8.6 Hz, 2H Ar).

#### 4.12. SINTEZA N-[3-({4-[5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}OKSI)FENIL]INDOLKARBOKSAMIDA (**15**)

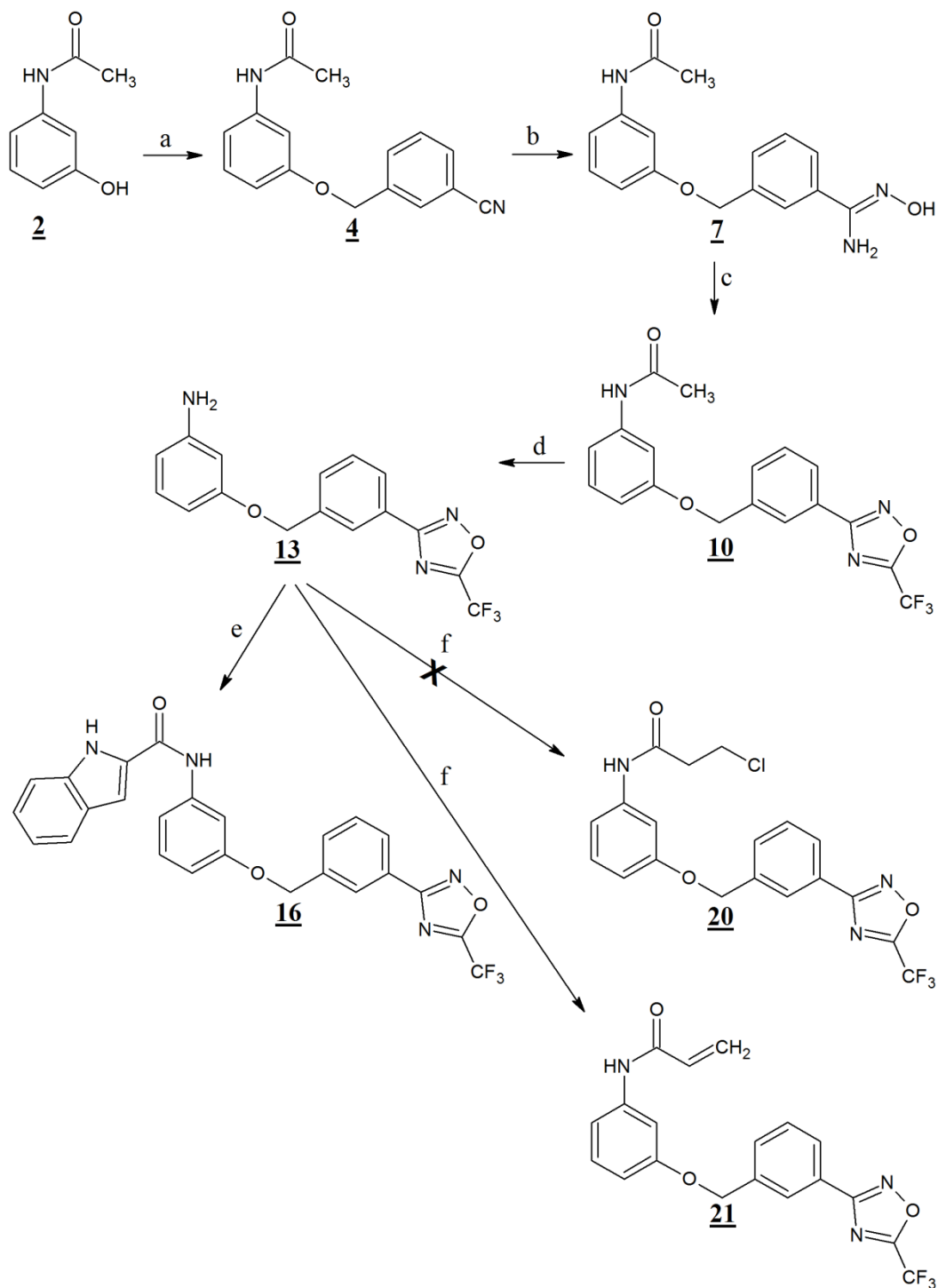
V 100 mL bučko z okroglim dnom smo nalili DKM (40 mL), dodali TCT (0,36 mmol, 66 mg) in zmes na ledeni vodni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo v bučko dodali NMM (1,1 mmol, 118 μL) in indol-2-karboksilno kislino (1,1 mmol, 173 mg). Reakcijsko zmes smo na ledeni vodni kopeli pustili mešati 3 h. Nato smo bučko dvignili nad ledeno vodno kopel ter reakcijski zmesi dodali spojino **12** (0,5 mmol, 180 mg) in NMM (1,1 mmol, 118 μL). Bučko smo zatesnili s steklenim zamaškom in vsebino pustili mešati na sobni temperaturi 4 dni, nato pa pri temperaturi vrelišča segrevali še 4 dni. Po končani reakciji smo topilo (DKM) uparili na rotavaporju in vsebino prelili s hladno destilirano H<sub>2</sub>O (40 mL). Temno rumeno oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in sušili v sušilniku 3 h (T = 50 °C). Oborino smo kvantitativno prenesli v 100 mL bučko z okroglim dnom, dodali DEE (30 mL) in dali na ultrazvočno kadičko za 5 min. Fino temno rumeno oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke. Topilo (DEE) matičnice smo uparili na rotavaporju in dobili temno rumen produkt. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF = EtOAc:HEX = 3:7; topilo za suhi nanos = MeOH) in dobili očiščeno spojino **15**.

**Izgled:** blede rumen prašek z neprijetnim vonjem. **Topnost:** spojina je topna v MeOH, ACT, EtOAc, DEE in DMSO ter slabo topna v CHCl<sub>3</sub> in HEX. **Izkoristek reakcije:** 24,6 %. **Rf:** 0,36 v MF13. **Talilni interval:** 182–184 °C. **Molekulska formula:** C<sub>25</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>. **Mr (izračunana):** 478,46. **MS (HRMS):** 477,1 (M-H)<sup>-</sup>; 477,1174; izračunano: 477,1175 (C<sub>25</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3307, 1656, 1603, 1594, 1537, 1477, 1449, 1420, 1378, 1323, 1290, 1210, 1176, 1152, 1039, 992, 901, 860, 832, 767, 742, 704, 680, 611, 540. **Elementna analiza:** izračunano: C: 62,75 %; H: 3,59 %; N: 11,71 %; izmerjeno: C: 62,56 % (Δ 0,19); H: 3,74 % (Δ 0,15); N: 11,57 % (Δ 0,14). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 5.27 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 6.81 (d, 1H, J = 10.6 Hz, 1H Ar); 7.08 (t, 1H, J = 7.0 Hz, 1H Ar); 7.23 (t, 1H, J = 7.1 Hz, 1H Ar); 7.30 (t, 1H, J = 8.1 Hz, 1H Ar); 7.42 (d, 1H, J = 7.4 Hz, 1H Ar); 7.43 (s, 1H, 1H Ar); 7.47 (d, 1H, J = 8.2 Hz, 1H Ar); 7.63 (s, 1H, 1H Ar); 7.69 (d, 1H, J = 7.8 Hz, 1H Ar); 7.73 (d, 2H, J = 8.4 Hz, 2H Ar); 8.12 (d, 2H, J = 8.4 Hz, 2H Ar); 10.20 (s, 1H, -NH-); 11.76 (s, 1H, -NH-).

#### 4.13. SINTEZA N-[3-({4-[5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}OKSI)FENIL]-3-(KLOROMETIL)FENILAMIDA (**19**)

V 25 mL bučko z okroglim dnom smo dodali spojino **12** (0,79 mmol, 264 mg), DKM (10 mL) in TEA (0,94 mmol, 131 μL) ter zmes na ledeni vodni kopeli ohladili na -10 °C. V ohlajeno reakcijsko zmes smo počasi dokapavali 3-(klorometil)benzoil klorid (0,94 mmol, 134 μL). Na ledeni vodni kopeli smo zmes mešali 1,5 h. Nato smo bučko dvignili nad ledeno vodno kopel in pri sobni temperaturi mešali 24 h. Po končani reakciji smo DKM uparili na rotavaporju, vsebino v bučki pa prelili s hladno destilirano H<sub>2</sub>O (20 mL) in jo kvantitativno prenesli v 50 mL čašo. Nato smo dodali nasičeno raztopino NaCl (10 mL) in čašo postavili v hladilnik za 24 h. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in sušili v sušilniku 1 h (T = 50 °C). Zmes smo očistili s kolonsko kromatografijo z direktnim nanosom (MF = CHCl<sub>3</sub>) in dobili čisto spojino **19**. **Izgled:** beli do blede rumeni kristali s svežim prijetnim vonjem. **Topnost:** spojina je topna v CHCl<sub>3</sub> in DMSO ter slabo topna v destilirani H<sub>2</sub>O, EtOAc, HEX, DKM in DEE. **Izkoristek reakcije:** 56,0 %. **Rf:** 0,68 v MF14, 0,45 v MF11. **Talilni interval:** 156–157 °C. **Molekulska formula:** C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>Cl. **Mr (izračunana):** 487,89 g/mol. **MS (HRMS):** 486,0 (M-H)<sup>-</sup>; 486,0830; izračunano: 486,0832 (C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>Cl). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3273, 1646, 1611, 1596, 1535, 1490, 1481, 1442, 1328, 1321, 1290, 1261, 1207, 1176, 1154, 1063, 994, 904, 828, 757, 694, 671, 596, 559, 505. **Elementna analiza:**

izračunano: C: 59,08 %; H: 3,52 %; N: 8,61 %; izmerjeno: C: 59,33 % ( $\Delta$  0,25); H: 3,73 % ( $\Delta$  0,21); N: 8,49 % ( $\Delta$  0,12).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 4.87 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Cl}$ ); 5.25 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-O-}$ ); 6.81 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, 1H Ar); 7.29 (t, 1H,  $J = 8.1$  Hz, 1H Ar); 7.38 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz, 1H Ar); 7.56 (t, 1H,  $J = 7.7$  Hz, 1H Ar); 7.61 (s, 1H, 1H Ar); 7.67 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, 1H Ar); 7.72 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, 2H Ar); 7.92 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, 1H Ar); 8.0 (s, 1H, 1H Ar); 8.12 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, 2H Ar); 10.32 (s, 1H,  $-\text{NH-}$ ).



Slika 11: Reakcijska shema sinteze meta-meta analogov 5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolnih derivatov klatrodina. **a**: NaOEt, 3-(bromometil)benzonitril, segrevanje pri temperaturi vrelišča (t = 3,5 h); **b**: NH<sub>2</sub>OH x HCl, TEA, MeOH, segrevanje pri temperaturi vrelišča (t = 24 h); **c**: TFAA, piridin, T = 110 °C (t = 24–72 h); **d**: 5 M HCl, THF, segrevanje pri temperaturi vrelišča (t = 48 h); **e**: Indol-2-karboksilna kislina, TCT, NMM, DKM, T = 20 °C (t = 1 teden); **f**: 3-kloropropionil klorid, TEA, DKM, T = 20 °C, (t = 24 h).

**4.14. SINTEZA N-{3-[(3-CIANOENZIL)OKSI]FENIL}ACETAMIDA****(4)** <sup>(37)</sup>

Najprej smo pripravili NaOEt. V 100 mL bučko z okroglim dnom smo nalili EtOH b.v. (60 mL) in dodali Na (24,35 mmol, 560 mg). Tvorba NaOEt v etanolu je potekala na sobni temperaturi 70 min. Nato smo dodali spojino **2** (19,9 mmol, 3 g) in na oljni kopeli pri T = 50 °C segrevali 70 min. Po 70 min smo reakcijski zmesi dodali 3-(bromometil)benzonitril (20,4 mmol, 4 g) in na oljni kopeli pri temperaturi vrelišča segrevali 3,5 h. Po končani reakciji smo bučko ohladili na sobno temperaturo. Vsebino smo prelili v 600 mL čašo in dodali ohlajeno destilirano H<sub>2</sub>O (500 mL). Čašo smo čez noč postavili v hladilnik. Izpadli produkt **4** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in ga spirali z ohlajeno destilirano H<sub>2</sub>O. Produkt **4** smo kvantitativno prenesli v 100 mL bučko z okroglim dnom in dodali DEE (40 mL). DEE smo odpareli na rotavaporju. Produkt **4** smo nato sušili v sušilniku 1 h (T = 50 °C). Na koncu smo izvedli prekristalizacijo iz 96 % EtOH. Kristale produkta **4** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke, jih spirali s hladnim 96 % EtOH in jih sušili v sušilniku 1 h (T = 50 °C). **Izgled:** blede rožnati kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v CHCl<sub>3</sub>, EtOH, ACT in MeOH ter slabo topna v HEX, DEE, TOL in destilirani H<sub>2</sub>O. **Izkoristek reakcije:** 45,4 %. **Rf:** 0,53 v MF1. **Talilni interval:** 116–119 °C. **Molekulska formula:** C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Mr (izračunana):** 266,32. **MS (ESI):** 267,1 (M+H)<sup>+</sup>. **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3295, 2228, 1668, 1616, 1559, 1487, 1419, 1383, 1277, 1160, 1048, 870, 754, 688, 591. **Elementna analiza:** izračunano: C: 72,15 %; H: 5,31 %; N: 10,52 %; izmerjeno: C: 71,80 % (Δ 0,35); H: 4,96 % (Δ 0,35); N: 10,41 % (Δ 0,11). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 2.03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 5.13 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 6.70 (d, 1H, J = 9.8 Hz, 1H Ar); 7.10 (d, 1H, J = 7.2 Hz, 1H Ar); 7.20 (t, 1H, J = 8.1 Hz, 1H Ar); 7.39 (s, 1H, 1H Ar); 7.62 (t, 1H, J = 7.8 Hz, 1H Ar); 7.81 (t, 2H, J = 7.8 Hz, 2H Ar); 7.91 (s, 1H, 1H Ar); 9.94 (s, 1H, -NH-).

**4.15. SINTEZA N-[3-({3-[AMINO(HIDROKSIIMINO)METIL]BENZIL}-OKSI)FENIL]ACETAMIDA (7)** <sup>(37)</sup>

V 100 mL bučko z okroglim dnom smo nalili MeOH (60 mL) ter dodali NH<sub>2</sub>OH x HCl (7,2 mmol, 500 mg) in TEA (7,2 mmol, 1 mL). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 15 min na sobni temperaturi. Nato smo ji dodali spojino **4** (5,6 mmol, 1,5 g) in zmes na oljni

kopeli pri temperaturi vrelišča segrevali 24 h. Po končani reakciji smo bučko ohladili na sobno temperaturo in jo kasneje hladili še na ledeni vodni kopeli. Vsebino smo nato prelili v 600 mL čašo in dodali ohlajeno destilirano H<sub>2</sub>O (500 mL). Čašo smo za 24 h postavili v hladilnik. Nastale bele kristale produkta **7** smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in jih nato sušili v sušilniku 1 h (T = 50 °C). **Izgled:** blede rožnati kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je dobro topna v EtOH, MeOH, DMSO, CHCl<sub>3</sub>, DEE in ACT ter slabo topna v HEX, TOL in destilirani H<sub>2</sub>O. **Izkoristek reakcije:** 95,3 %. **Rf:** 0,25 v MF1, 0,63 v MF4. **Talilni interval:** 79–82 °C. **Molekulska formula:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>. **Mr (izračunana):** 299,36 g/mol. **MS (ESI):** 300 (M+H)<sup>+</sup>. **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3456, 3360, 2368, 1659, 1596, 1550, 1448, 1387, 1293, 1160, 1057, 959, 881, 772, 691, 541. **Elementna analiza:** izračunano (**7** x H<sub>2</sub>O): C: 60,55 %; H: 6,05 %; N: 13,24 %; izmerjeno: C: 60,91 % (Δ 0,36); H: 5,56 % (Δ 0,49); N: 13,12 % (Δ 0,12). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 2.03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 5.08 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 5.83 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 6.70 (d, 1H, J = 9.0 Hz, 1H Ar); 7.09 (d, 1H, J = 6.3 Hz, 1H Ar); 7.19 (t, 1H, J = 8.1 Hz, 1H, Ar); 7.36 – 7.46 (m, 3H, 3H Ar); 7.63 (d, 1H, J = 7.6 Hz, 1H Ar); 7.77 (s, 1H, 1H Ar); 9.66 (s, 1H, -OH); 9.93 (s, 1H, -NH-).

#### 4.16. SINTEZA N-[3-({3-[5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}OKSI)FENIL]ACETAMIDA (**10**)<sup>(37)</sup>

V 50 mL bučko z okroglim dnom smo dodali spojino **7** (5,1 mmol, 1,5 g) in piridin (pribl. 30 mL). Nato smo vklopili magnetno mešalo in počakali, da se je spojina **7** v piridinu raztopila. Reakcijsko zmes smo prepihovali z argonom 30 min in jo na ledeni vodni kopeli ohladili na -10 °C. V ohlajeno reakcijsko zmes smo nato počasi dokapavali TFAA (12,3 mmol, 1,7 mL). Bučko smo dvignili nad ledeno vodno kopel in pri sobni temperaturi mešali 1 h. Nato smo zmes segrevali na oljni kopeli pri T = 110 °C in konec reakcije ocenili s pomočjo TLC. Reakcija je potekala 7 dni. Bučko smo po končani reakciji ohladili na sobno temperaturo, vsebino prelili v 250 mL čašo, dodali destilirano H<sub>2</sub>O (150 mL) in s 4 M HCl nakisali do pH = 2. Na dnu čaše smo opazili temno rjavo olje. Vsebino smo iz čaše prelili v 500 mL lij ločnik in kislo vodno fazo ekstrahirali z DKM (200 mL). Organsko fazo smo spirali s 5 % citronsko kislino (100 mL), z destilirano H<sub>2</sub>O (150 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (150 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 h. Nato smo sušilno sredstvo odfiltrirali in organsko topilo (DKM) uparili na rotavaporju. Dobili smo 1,7 g temno rjave oljaste zmesi. Zmes smo očistili s kolonsko kromatografijo z direktnim

nanosom (MF = EtOAc) in dobili očiščeno spojino **10**. **Izgled**: rumeni kristali brez vonja. **Topnost**: spojina je dobro topna v EtOAc, DKM, DMSO, MeOH, EtOH in ACT ter slabo topna v CHCl<sub>3</sub>, HEX, TOL, destilirani H<sub>2</sub>O in DEE. **Izkoristek reakcije**: 15,6 %. **Rf**: 0,58 v MF1, 0,51 v MF6. **Talilni interval**: 89–93 °C. **Molekulska formula**: C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>. **Mr (izračunana)**: 377,35. **MS (HRMS)**: 378 (M+H)<sup>+</sup>; 378,1061; izračunano: 378,1066 (C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>)**: 3260, 3096, 2865, 1609, 1554, 1496, 1416, 1324, 1269, 1207, 1152, 1032, 991, 836, 757, 682. **Elementna analiza**: izračunano (**10** x ¼ C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N): C: 58,22 %; H: 3,88 %; N: 11,47 %; izmerjeno: C: 58,09 % (Δ 0,13); H: 3,79 % (Δ 0,09); N: 11,19 % (Δ 0,28). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)**: δ (ppm) = 2.00 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 5.22 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 6.72 (d, 1H, J = 9.1 Hz, 1H Ar); 7.11 (d, 1H, J = 10.9 Hz, 1H Ar); 7.21 (t, 1H, J = 8.1 Hz, 1H Ar); 7.40 (s, 1H, 1H Ar); 7.66 (t, 1H, J = 7.5 Hz, 1H Ar); 7.75 (d, 1H, J = 7.8 Hz, 1H Ar); 8.04 (d, 1H, J = 8.1 Hz, 1H Ar); 8.15 (s, 1H, 1H Ar); 9.94 (s, 1H, -NH-).

#### 4.17. SINTEZA 3-{[3-(5-TRIFLUOROMETIL-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL)BENZIL]OKSI}FENILAMINA (**13**)<sup>(37)</sup>

V 50 mL bučko z okroglim dnom smo dodali spojino **10** (1,2 mmol, 446 mg), 5 M HCl (10,9 mmol, 2,2 mL) in THF (10,0 mL). Vklpili smo magnetno mešalo in zmes na oljni kopeli segrevali pri temperaturi vrelišča 24 h. Po končani reakciji smo THF odparili na rotavaporju. Vsebino v bučki smo naalkalili z 10 M NaOH do pH = 10. Bazično vodno fazo smo prelili v 100 mL lij ločnik in ekstrahirali z EtOAc (3 x 40 mL). Združene organske faze smo prelili v 250 mL lij ločnik ter spirali z destilirano H<sub>2</sub>O (2 x 40 mL) in nasičeno raztopino NaCl (40 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 h. Nato smo sušilno sredstvo odfiltrirali in organsko topilo (EtOAc) uparili na rotavaporju. Dobili smo 761 mg zmesi. Očistili smo jo s kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF = CHCl<sub>3</sub>; topilo za suhi nanos = MeOH) in dobili očiščeno spojino **13**. **Izgled**: temno oranžni kristali brez vonja. **Topnost**: spojina je dobro topna v EtOAc, DKM, DMSO, MeOH, EtOH in ACT ter slabo topna v CHCl<sub>3</sub>, HEX, TOL, destilirani H<sub>2</sub>O in DEE. **Izkoristek reakcije**: 45,5 %. **Rf**: 0,42 v MF11, 0,76 v MF6. **Talilni interval**: 79–81 °C. **Molekulska formula**: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>. **Mr (izračunana)**: 335,31. **MS (HRMS)**: 336,1 (M+H)<sup>+</sup>; 336,0966; izračunano: 336,0960 (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>)**: 3472, 3383, 1600, 1516, 1423, 1324, 1215, 1148, 1045, 961, 904, 825, 758, 685, 626. **Elementna analiza**: izračunano: C: 57,31 %; H: 3,61 %; N: 12,53 %; izmerjeno: C: 57,17 % (Δ 0,14); H: 3,65 % (Δ 0,04); N: 12,37 % (Δ 0,16). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)**: δ (ppm) = 5.08 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 5.14 (s, 2H, -

$\text{NH}_2$ ); 6.14 – 6.21 (m, 1H, 1H Ar); 6.23 (s, 2H, 2H Ar); 6.91 (t, 1H, J = 8.0 Hz, 1H Ar); 7.65 (t, 1H, J = 7.8 Hz, 1H Ar); 7.72 (d, 1H, J = 8.0 Hz, 1H Ar); 8.02 (d, 1H, J = 7.7 Hz, 1H Ar); 8.13 (s, 1H, 1H Ar).

#### 4.18. SINTEZA N-[3-({3-[5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}OKSI)FENIL]INDOLKARBOKSAMIDA (**16**)

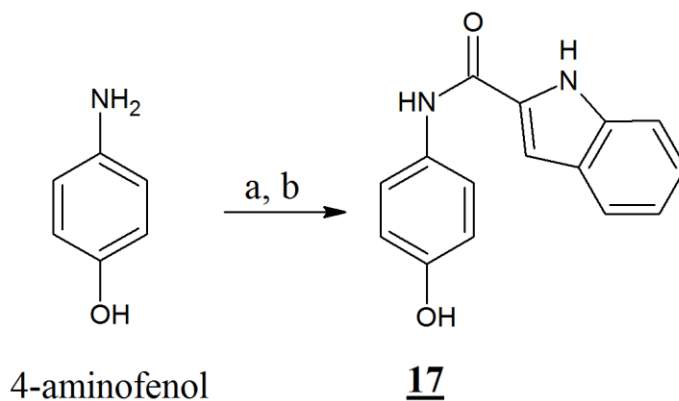
V 100 mL bučko z okroglim dnom smo nalili DKM (40 mL), dodali TCT (0,46 mmol, 84 mg) in zmes na ledeni vodni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo v bučko dodali NMM (1,4 mmol, 151  $\mu\text{L}$ ) in indol-2-karboksilno kislino (1,4 mmol, 221 mg). Reakcijsko zmes smo na ledeni vodni kopeli pustili mešati 3 h. Nato smo bučko dvignili nad ledeno vodno kopel in v reakcijsko zmes dodali spojino **13** (0,7 mmol, 230 mg) in NMM (1,4 mmol, 151  $\mu\text{L}$ ). Bučko smo zatesnili s steklenim zamaškom in pustili mešati na sobni temperaturi 4 dni, nato smo jo pri temperaturi vrelišča segrevali še 4 dni. Po končani reakciji smo topilo (DKM) uparili na rotavaporju in vsebino prelili s hladno destilirano  $\text{H}_2\text{O}$  (40 mL). Rumeno oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in sušili v sušilniku 3 h ( $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$ ). Oborino smo kvantitativno prenesli v 100 mL bučko z okroglim dnom, dodali DEE (30 mL) in dali na ultrazvočno kadičko za 5 min. Fino rumeno oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke. Topilo (DEE) matičnice smo uparili na rotavaporju in dobili rumen produkt. Očistili smo ga s kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF = EtOAc:HEX = 3:7; topilo za suhi nanos = MeOH in ACT) in dobili očiščeno spojino **16**. **Izgled:** blede rjavi kristali z neprijetnim vonjem. **Topnost:** spojina je topna v MeOH, ACT, EtOAc, DEE in DMSO ter slabo topna v  $\text{CHCl}_3$  in HEX. **Izkoristek reakcije:** 29,3 %. **Rf:** 0,42 v MF13. **Talilni interval:** 186–189 °C. **Molekulska formula:**  $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3\text{F}_3$ . **Mr (izračunana):** 478,46. **MS (HRMS):** 477,1 (M-H)<sup>-</sup>; 477,1183; izračunano: 477,1175 ( $\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3\text{F}_3$ ). **IR (KBr  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3421, 3284, 1667, 1595, 1533, 1447, 1427, 1380, 1310, 1258, 1206, 1154, 1040, 994, 859, 808, 748, 682, 551.  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 5.28 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 6.81 (d, 1H, J = 9.1 Hz, 1H Ar); 7.08 (t, 1H, J = 8.0 Hz, 1H Ar); 7.23 (t, 1H, J = 7.6 Hz, 1H Ar); 7.30 (t, 1H, J = 8.2 Hz, 1H Ar); 7.40 – 7.45 (m, 2H, 2H Ar); 7.47 (d, 1H, J = 8.2 Hz, 1H Ar); 7.62 (s, 1H, 1H Ar); 7.66 – 7.71 (m, 2H, 2H Ar); 7.79 (d, 1H, J = 6.6 Hz, 1H Ar); 5.05 (d, 1H, J = 7.5 Hz, 1H Ar); 8.19 (s, 1H, 1H Ar); 10.20 (s, 1H,  $-\text{NH-CO-}$ ); 11.75 (s, 1H,  $-\text{NH-}$ ).



**4.19. POSKUS SINTEZE N-[3-({3-[5-(TRIFLUOROMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL]BENZIL}OKSI)FENIL]-3-KLOROPROPILAMIDA  
(20)**

V 25 mL bučko z okroglim dnom smo dodali spojino **13** (0,52 mmol, 173 mg), DKM (10 mL) in TEA (0,62 mmol, 86  $\mu$ L) ter zmes na ledeni vodni kopeli ohladili na  $-10$  °C. V ohlajeno reakcijsko zmes smo počasi dokapavali 3-kloropropionil klorid (0,62 mmol, 59  $\mu$ L). Na ledeni vodni kopeli smo jo mešali 1,5 h. Nato smo bučko dvignili nad ledeno vodno kopel in pri sobni temperaturi mešali 24 h. Po končani reakciji smo DKM uparili na rotavaporju in dobili rumeno olje. V bučko smo dodali hladno destilirano H<sub>2</sub>O (20 mL) in vsebino kvantitativno prenesli v 250 mL lij ločnik ter ekstrahirali z DKM (100 mL). Organsko fazo smo spirali z destilirano H<sub>2</sub>O (50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (100 mL). Sušili smo jo nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in topilo (DKM) uparili na rotavaporju. Zmes smo očistili s kolonsko kromatografijo s suhim nanosom (MF = DKM; topilo za suhi nanos = ACT, MeOH) in dobili čisto spojino. **Izgled:** blede rumeni kristali z neprijetnim vonjem. **Topnost:** spojina je topna v MeOH, ACT in DMSO ter slabo topna v destilirani H<sub>2</sub>O, EtOAc, HEX, CHCl<sub>3</sub> in DKM. **Izkoristek reakcije:** 35,9 %. **Rf:** 0,54 v MF14, 0,25 v MF15. **Talilni interval:** 116–119 °C. **Molekulska formula:** C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>. **Mr (izračunana):** 389,36. **MS (ESI):** 390,1 (M+H)<sup>+</sup>. **MS (HRMS):** 390,1 (M+H)<sup>+</sup>; 390,1070; izračunano: 390,1066 (C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>):** 3275, 1666, 1606, 1555, 1497, 1466, 1418, 1304, 1225, 1176, 1149, 1046, 993, 922, 846, 762, 739, 686, 601, 533. **Elementna analiza:** izračunano: C: 58,61 %; H: 3,63 %; N: 10,79 %; izmerjeno: C: 58,60 % ( $\Delta$  0,01); H: 3,85 % ( $\Delta$  0,22); N: 10,47 % ( $\Delta$  0,32). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 5.24 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 5.76 (dd, 1H, J<sub>AC</sub> = 10.0 Hz, J<sub>AB</sub> = 1.1 Hz, -CH=CH<sub>2</sub> (trans)); 6.23 (dd, 1H, J<sub>BC</sub> = 16.7 Hz, J<sub>AB</sub> = 2.1 Hz, -CH=CH<sub>2</sub> (cis)); 6.42 (dd, 1H, J<sub>BC</sub> = 16.9 Hz, J<sub>AC</sub> = 5.1 Hz, -CH=CH<sub>2</sub>); 6.78 (d, 1H, J = 9.2 Hz, 1H Ar); 7.18 – 7.28 (m, 2H, 2H Ar); 7.51 (s, 1H, 1H Ar); 7.67 (t, 1H, J = 6.7 Hz, 1H Ar); 7.76 (d, 1H, J = 8.2 Hz, 1H Ar); 8.04 (d, 1H, J = 7.8 Hz, 1H Ar); 8.16 (s, 1H, 1H Ar); 10.14 (s, 1H, -NH-).

Opomba: Rezultati so pokazali, da je pri sintezi nastala spojina **21** (N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-2-propenamid), spojina **20** pa ni nastala.



Slika 12: Sinteza spojine **17**. **a**: Indol-2-karboksilna kislina, TCT, NMM, DKM, T = 20 °C, (t = 24 h); **b**: Indol-2-karboksilna kislina, DKM b.v., C<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, piridin, T = 20 °C, (t = 5 h).

#### 4.20. SINTEZA N-(4-HIDROKSIFENIL)INDOLKARBOKSAMIDA (**17**)

1. način:

V 50 mL bučko z okroglim dnom smo nalili DKM (20 mL), dodali TCT (1,5 mmol, 282 mg) in zmes na ledeni vodni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo v bučko dodali NMM (4,6 mmol, 504 µL) in indol-2-karboksilno kislino (4,6 mmol, 738 mg). Reakcijsko zmes smo na ledeni vodni kopeli pustili mešati 3 h. Bučko smo dvignili nad ledeno vodno kopel ter v reakcijsko zmes dodali p-aminofenol (4,6 mmol, 500 mg) in NMM (4,6 mmol, 504 µL). Bučko smo nato zatesnili s steklenim zamaškom in pustili mešati na sobni temperaturi 1 teden. Po končani reakciji smo topilo (DKM) uparili na rotavaporju in vsebino prelili s hladno destilirano H<sub>2</sub>O (50 mL). Nastalo svetlo rjavo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in sušili v sušilniku 3 h (T = 50 °C). Dobili smo čisto spojino **17**. **Izgled**: rjavi kristali brez vonja. **Topnost**: spojina je topna v MeOH, ACT, EtOAc, DEE in DMSO ter slabo topna v CHCl<sub>3</sub> in HEX. **Izkoristek reakcije**: 1. način: 33,7 %. **Rf**: 1. način: 0,52 v MF6. **Talilni interval**: 1. način: 267–271 °C. **Molekulska formula**: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Mr (izračunana)**: 252,29. **MS (HRMS)**: 253,1 (M+H)<sup>+</sup>; 253,0971; izračunano: 253,0977 (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **IR (KBr cm<sup>-1</sup>)**: 3398, 3330, 3050, 2360, 1647, 1610, 1511, 1443, 1375, 1316, 1223, 1189, 1103, 1014, 978, 934, 883, 826, 739, 650. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)**: δ (ppm) = 6.77 (d, 2H, J = 8.9 Hz, 2H Ar); 7.06 (t, 1H, J = 7.5 Hz, 1H Ar); 7.21 (t, 1H, J = 7.1 Hz, 1H Ar); 7.36 (s, 1H, 1H Ar); 7.46 (d, 1H, J = 8.2 Hz, 1H Ar); 7.56 (d, 2H, J = 8.9 Hz, 2H Ar); 7.66 (d, 1H, J = 8.0 Hz, 1H Ar); 9.28 (s, 1H, -OH); 10.01 (s, 1H, -NH-CO-); 11.68 (s, 1H, -NH-).

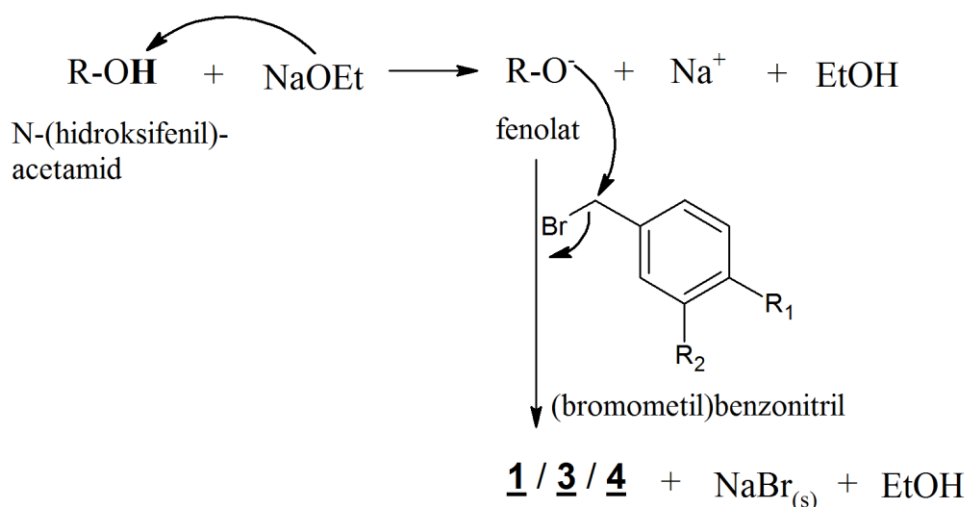
## 2. način:

V 25 mL bučko z okroglim dnom smo dodali indol-2-karboksilno kislino (4,6 mmol, 738 mg), DKM b.v. (10 mL) in  $C_2Cl_2O_2$  (18,3 mmol, 9,2 mL). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na sobni temperaturi 24 h. DKM b.v. smo upareli na rotavaporju in dobili svetlo rjavo praškasto zmes. Nato smo v bučko dodali DKM b.v. (6 mL), piridin (5 mL) in p-aminofenol (4,6 mmol, 500 mg). Na bučko smo nadeli septum in balonček z argonom ter pri sobni temperaturi mešali 24 h. DKM b.v. in piridin smo upareli na vakuumski črpalki. Dodali smo ohlajeno destilirano  $H_2O$  (15 mL) in oborino rjave barve odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke. Oborino smo prenesli v 50 mL bučko, dodali DEE (30 mL), dali na ultrazvočno kadičko ter sipko vijolično obarvano oborino odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke. Matičnico (DEE) smo uparili na rotavaporju in dodali ohlajeno destilirano  $H_2O$  (30 mL). Nastali produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom s pomočjo vodne črpalke in ga sušili v sušilniku 3 h ( $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$ ). Dobili smo čisto spojino **17**. **Izgled:** rjavi kristali brez vonja. **Topnost:** spojina je topna v MeOH, ACT, EtOAc, DEE in DMSO ter slabo topna v  $CHCl_3$  in HEX. **Izkoristek reakcije:** 2. način: 16,3 %. **Rf:** 2. način: 0,52 v MF6. **Talilni interval:** 2. način: 265–269  $^\circ\text{C}$ . **Molekulska formula:**  $C_{15}H_{12}N_2O_2$ . Rezultati za spojini **17** 1. način in **17** 2. način se v izgledu, topnosti, retencijskem faktorju in talilnem intervalu ujemajo in tako potrjujejo, da sta spojini identični, zato smo naredili MS, IR, elementno analizo in  $^1\text{H-NMR}$  le za 1. način.

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. PRIPRAVA N-[[ (CIANOBEZIL) OKSI] FENIL] ACETAMIDOV 1, 3 IN 4

Pri sintezi spojin 1, 3 in 4 je potekla reakcija nukleofilne substitucije, pri kateri so nastali N-[[ (cianobenzil)oksi]fenil]acetamid, NaBr (bela kosmičasta oborina) in molekula EtOH. Reakcija je potekla po mehanizmu, ki je prikazan na sliki 13.

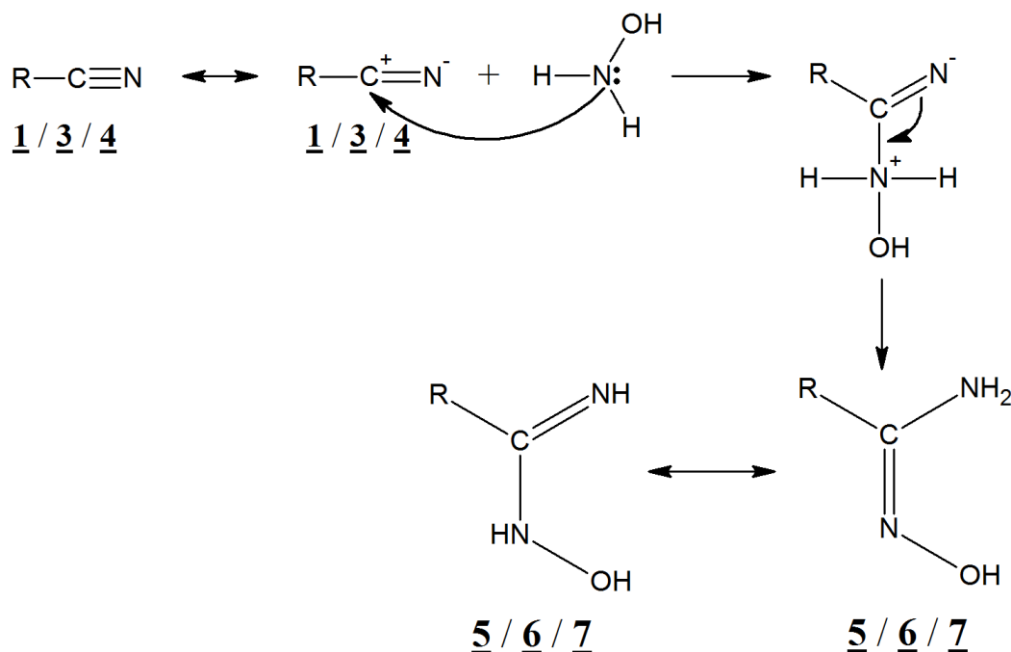


Slika 13: Shematski prikaz tvorbe spojin 1, 3 in 4 v reakciji nukleofilne substitucije. V prvi stopnji je nastal fenolat, ki je v drugi stopnji reagiral z (bromometil)benzonitrilom. Nastali so N-[[ (cianobenzil)-oksi]fenil]acetamid (1, 3 oz. 4), NaBr (bela kosmičasta oborina) in molekula EtOH. (R = CH<sub>3</sub>CONH-Ph-, 4-(bromometil)benzonitril [R<sub>1</sub> = CN, R<sub>2</sub> = H], 3-(bromometil)benzonitril [R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CN]) (40, 41).

Pri sintezi spojin 1, 3 in 4 smo dobili 58,2 %, 53,6 % in 45,4 % izkoristek reakcije. Spojine 1, 3 in 4 so položajni izomeri (para-para (1), meta-para (3) in meta-meta (4)). N-(4-hidroksifenil)acetamid in 4-(bromometil)benzonitril v reakciji nukleofilne substitucije najlažje reagirata zaradi optimalnega položaja proste –NHCOCH<sub>3</sub> in –CN skupine. Obe skupini sta na para mestu v molekulah, ki reagirata. Položaj prostih funkcionalnih skupin vpliva na potek in izkoristek reakcije. Pri reakciji sinteze spojine 4 je položaj –NHCOCH<sub>3</sub> in –CN skupine na meta mestu. To je pripomoglo k večji sterični oviranosti, zmanjšani reaktivnosti in posledično slabšemu izkoristku reakcije v primerjavi s sintezo para-para in meta-para izomera.

**5.2. PRIPRAVA AMIDOKSIMOV 5, 6 IN 7**

Pri sintezi spojin 5, 6 in 7 je potekla reakcija polarne adicije na polarno, heterogeno multiplo vez, nastal je amidoksim. Reakcija je potekla po mehanizmu, ki je prikazan na sliki 14.

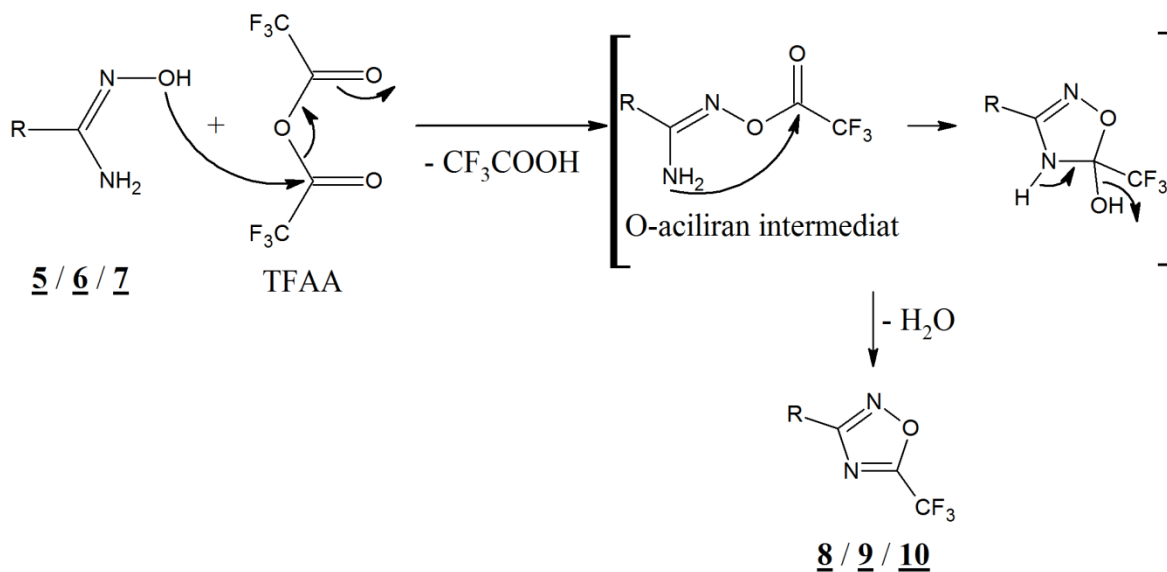


Slika 14: Shematski prikaz mehanizma sinteze amidoksimov 5, 6 in 7. Z bazo (TEA) smo pretvorili  $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$  v neionizirano obliko  $\text{NH}_2\text{OH}$ , ki je reagirala z ogljikovim atomom  $-\text{CN}$  skupine v molekulah spojin 1, 3 in 4, pri tem smo dobili amidoksime 5, 6 in 7. ( $\text{R} = -\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Ph}-\text{NHCOCH}_3$ ). Prirejeno po (43).

Pri sintezi vseh treh položajnih izomerov (para-para (5), meta-para (6) in meta-meta (7)) smo dobili zelo dobre izkoristke (nad 90 %). S spektroskopskimi metodami smo potrdili njihovo strukturo, čistost pa z elementno analizo.

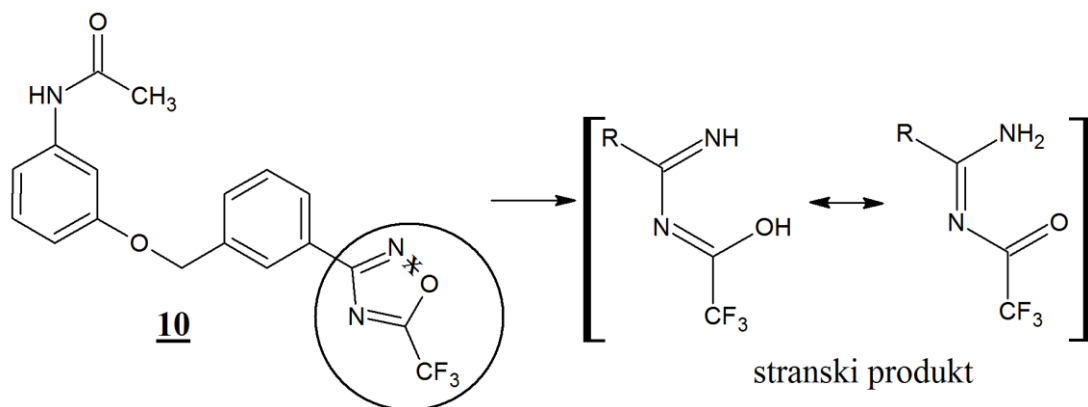
**5.3. PRIPRAVA 3,5-DISUBSTITUIRANIH-1,2,4-OKSADIAZOLOV 8, 9 IN 10**

Pri sintezi spojin 8, 9 in 10 je potekla reakcija nastanka 3,5-disubstituiranih-1,2,4-oksadiazolov. Najbolj učinkovita metoda za sintezo 3,5-disubstituiranih-1,2,4-oksadiazolov je ciklizacija O-acilamidoksimov, ki nastanejo z acilacijo amidoksimov s kislinskim anhidridom ali drugih derivatov karboksilnih kislin (44, 45). Sinteza spojin 8, 9 in 10 je najverjetneje potekla po mehanizmu, ki je prikazan na sliki 15.



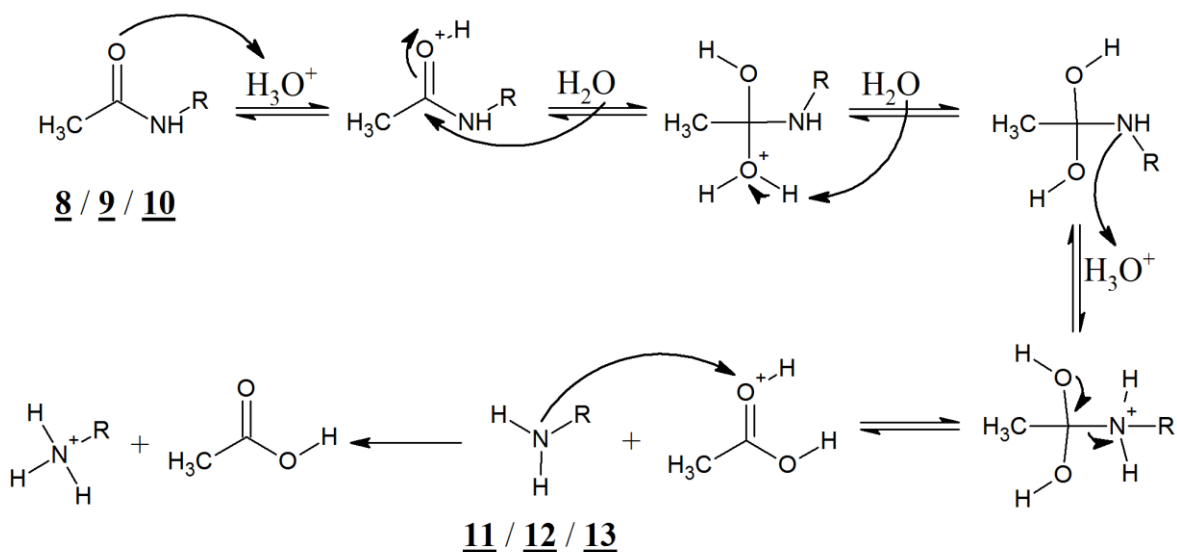
Slika 15: Shematski prikaz mehanizma sinteze 3,5-disubstituiranih-1,2,4-oksadiazolov (**8**, **9** in **10**). V prvi stopnji je nastal ključni O-aciliran intermediat, ki je v drugi stopnji reagiral po mehanizmu nukleofilne adicije z amsko skupino (ciklizacija), pri tem je izstopila molekula H<sub>2</sub>O in nastal je 3,5-disubstituiran-1,2,4-oksadiazol. (R = -Ph-CH<sub>2</sub>-O-Ph-NHCOCH<sub>3</sub>). Prirejeno po (44, 45).

Pri sintezi 3,5-disubstituiranih-1,2,4-oksadiazolov smo brezvodne pogoje zagotovili tako, da smo raztopino amidoksima prepihali z Ar. Večjo selektivnost reakcije smo zagotovili s tem, ko smo TFAA počasi dokapavali v ohlajeno raztopino (-10 °C) amidoksima v piridinu, to pomeni, da smo reakcijo vodili v smeri nastanka O-aciliranega produkta, pri čemer ni nastajal diaciliran stranski produkt. Pri sintezi spojin **8** (para-para analog), **9** (meta-para analog) in **10** (meta-meta analog) smo dobili 22,5 %, 60,3 % in 15,6 % izkoristek reakcije. Vse izkoristke smo izračunali po izvedbi kolonske kromatografije. Na sintezo oksadiazolov najverjetneje vpliva položajna izomerija. Za naš tip reakcij se je izkazalo, da je meta-para izomerija najugodnejša. Pri kolonski kromatografiji spojine **10** smo analizirali tudi dve drugi frakciji in po <sup>1</sup>H-NMR in masni analizi ugotovili, da se je pri reakciji oksadiazolski obroč najverjetneje odprl ali pa reakcija ciklizacije ni potekla do konca (slika 16). Zato bi morda morali podaljšati čas reakcije ali znižati temperaturo. Na potek in izkoristek reakcije bi torej lahko vplivali nastanek stranskih produktov, čas poteka reakcije, temperatura in položajna izomerija.

Slika 16: Prikaz razpada N-O vezi v molekuli spojine **10** v 1,2,4-oksadiazolskem obroču.

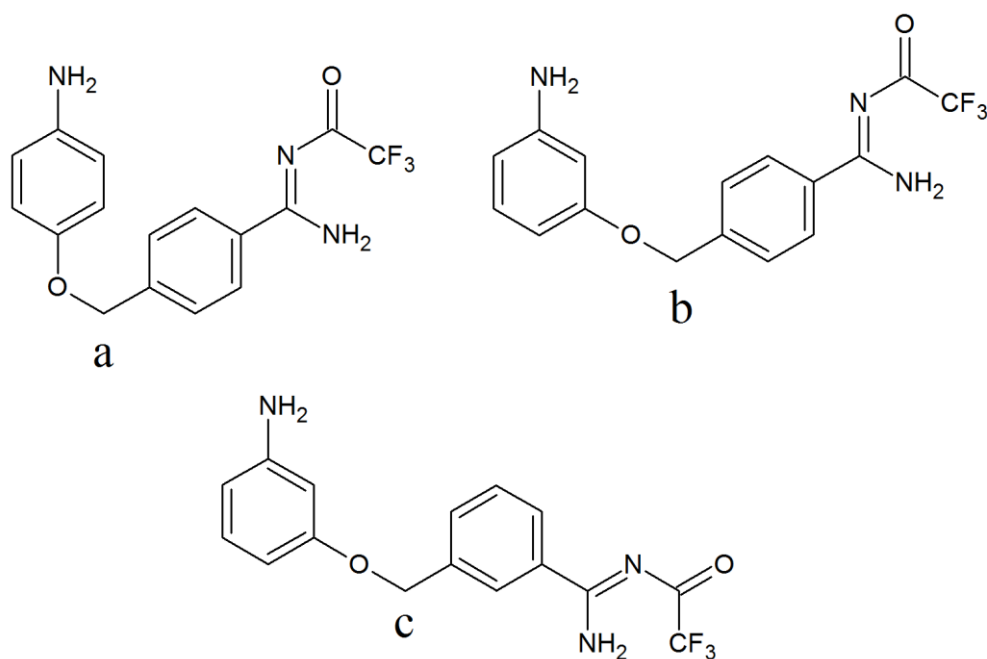
#### 5.4. PRIPRAVA AMINOV **11**, **12** IN **13**

Pri sintezi spojin **11**, **12** in **13** je potekla reakcija nukleofilne substitucije na acilni skupini oz. kislinsko katalizirana hidroliza amidov **8**, **9** in **10** ob uporabi močne kisline (5 M HCl) in segrevanja ob vrenju. Dobili smo amine **11**, **12** in **13**. Predlagan mehanizem sinteze spojin **11**, **12** in **13** je prikazan na sliki 17.



Slika 17: Shematski prikaz mehanizma kislinsko katalizirane hidrolize amidov **8**, **9** in **10** ob uporabi močne kisline (5 M HCl) in segrevanja ob vrenju. V prvi stopnji je potekla aktivacija amidov **8**, **9** in **10**. V drugi stopnji je nastal tetraedrični intermediat s pozitivnim nabojem, ki se je v tretji stopnji deprotoniral. Nato se je skupina  $-NH-R$  protonirala ( $-NH_2^+-R$ ) in postala dobro izstopajoča skupina. V peti stopnji je nastal amin (**11**, **12** oz. **13**) in protonirana oblika karboksilne kisline. V zadnji stopnji se je amin protoniral, pri tem je nastala karboksilna kislina in protonirana oblika amina. ( $R = -Ph-O-CH_2-Ph-(5\text{-trifluorometil})-1,2,4\text{-oksadiazol}$ ). Prirejeno po (46, 47).

Pri sintezi spojin **11** (para-para analog), **12** (meta-para analog) in **13** (meta-meta analog) smo dobili 49,6 %, 42,3 % in 45,5 % izkoristek reakcije. Izkoristke smo izračunali po izvedeni kolonski kromatografiji. Ugotovili smo, da položajna izomerija ne igra bistvene vloge pri reakciji hidrolize amidov **8**, **9** in **10**. Hidroliza amidov je potekala pod ostrimi pogoji, zato smo pričakovali, da bodo pri reakciji nastali stranski produkti. V osnovi je (5-trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolski obroč stabilen, vendar se lahko pod močno kislimi oz. alkalnimi ostrimi pogoji odpre. Na TLC ploščici smo pri vseh treh reakcijah (**11**, **12** in **13**) po končani sintezi opazili dve lisi, ki sta se z ninhidrinom obarvali intenzivno vijolično. Razlika v retencijskem faktorju je bila več kot 0,6. Lisa z višjim retencijskim faktorjem je pripadala produktu **11**, **12** oz. **13**, lisa z nižjim retencijskim faktorjem pa stranskemu produktu (a, b oz. c) (slika 18). Za nas so bili pomembni produkti **11**, **12** in **13**, stranskih produktov zato nismo izolirali.

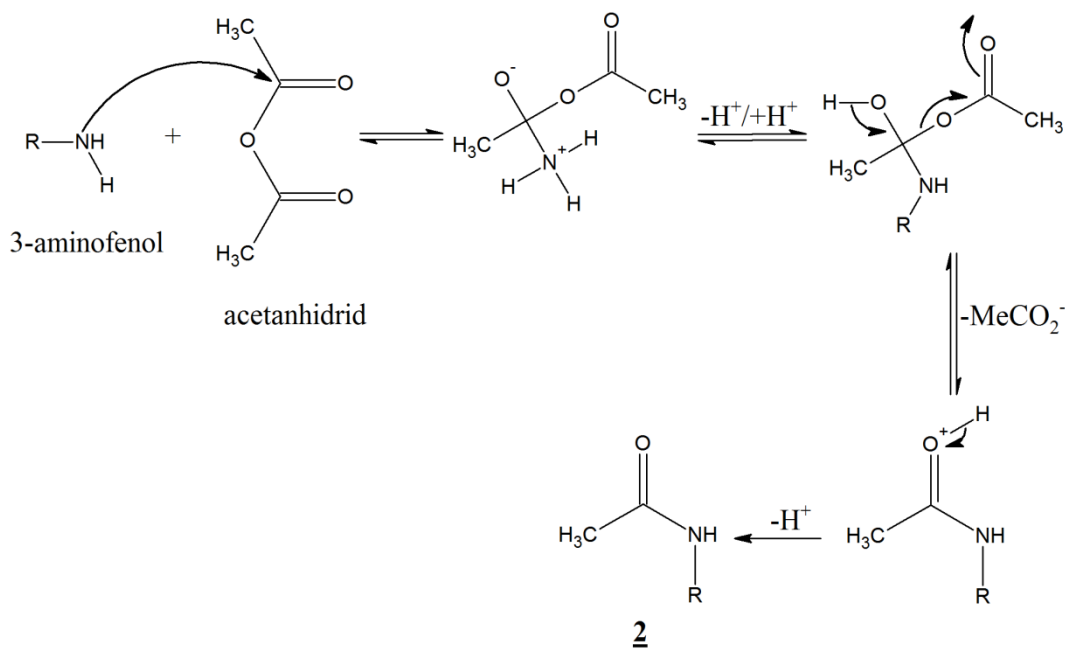


Slika 18: Prikaz strukture stranskih produktov (a = stranski produkt spojine **11**, b = stranski produkt spojine **12** in c = stranski produkt spojine **13**).



**5.5. PRIPRAVA AMIDOV 2, 14, 15, 16, 17, 18, 19 IN 20****5.5.1. TVORBA AMIDA 2 Z UPORABO ACETANHIDRIDA**

Pri sintezi spojine 2 je potekla nukleofilna adicija na heterogene multiple vezi s sledečo eliminacijo (substitucija), pri čemer je nastal amid. Podroben mehanizem je predstavljen na sliki 19.

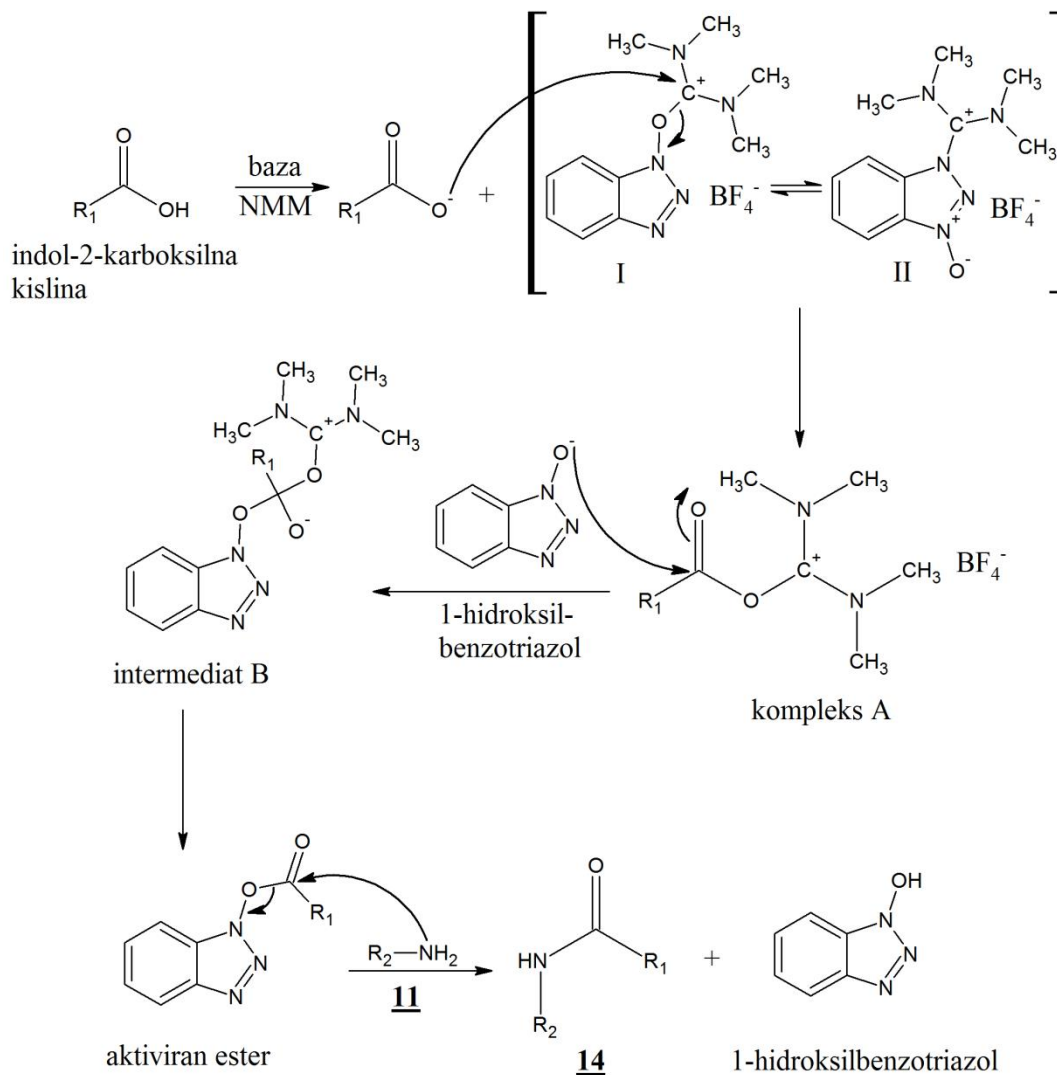


Slika 19: Shematski prikaz tvorbe amida preko aktivacije karboksilne skupine v obliki simetričnega anhidrida. Aminska skupina 3-aminofenola se je kot nukleofil adirala na karbonilno skupino acetanhidrida. Nastal je tetraedrični intermediat. Nato je prišlo do eliminacije acetatnega iona ter nastanka protonirane oblike amida. Ta se je deprotoniral, pri tem pa je prišlo do tvorbe spojine 2 in očetne kisline. (R = -Ph-OH). Prirejeno po (42).

Pri sintezi spojine 2 smo dobili 72,0 % izkoristek reakcije. Aminska skupina je v molekuli 3-aminofenola bolj reaktivna (nukleofilnejša) kot hidroksi skupina, zato smo suspenzijo 3-aminofenola ohladili na ledeni vodni kopeli in po kapljicah dodajali acetanhidrid. Reakcijo smo tako selektivno vodili do nastanka spojine 2. Ob ostrejših pogojih, ustreznem reakcijskem mediju in prebitku acetanhidrida bi dobili N- in O- acetiliran produkt (42). Tega diacetiliranega stranskega produkta reakcije nismo zaznali s TLC pred izolacijo spojine, prav tako so tudi vsi spektroskopski podatki potrdili prisotnost le N-acetiliranega produkta.

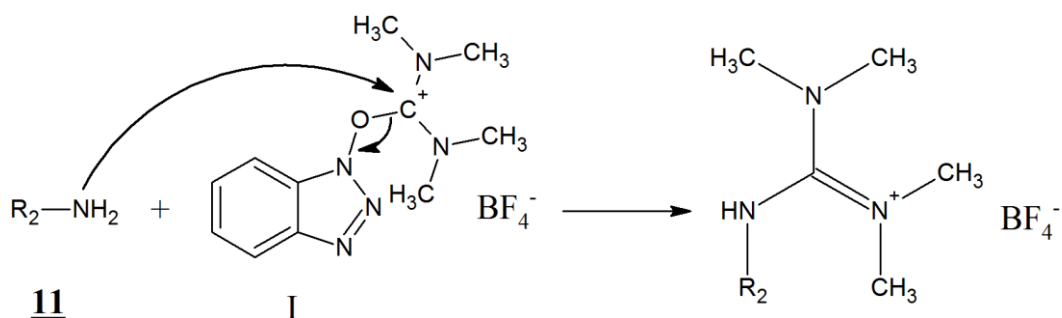
### 5.5.2. TVORBA AMIDA **14** (1. NAČIN) Z UPORABO SKLOPITVENEGA REAGENTA TBTU

Spojino **14** smo sintetizirali na dva različna načina. Pri prvem postopku smo indol-2-karboksilno kislino pretvorili v bolj elektrofilno spojino za nukleofilno substitucijo z aminom **11**, kjer smo si pomagali z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU v prisotnosti NMM kot baze. Predlagan mehanizem sinteze spojine **14** (1. način) je prikazan na sliki 20.



Slika 20: Shematski prikaz mehanizma nastanka amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU. V prvi stopnji je nastal karboksilatni anion indol-2-karboksilne kisline, ki je v drugi stopnji reagiral s tautomerno obliko I molekule TBTU. V tretji stopnji se je tvoril intermediat B, v četrti stopnji pa aktiviran ester. V zadnji stopnji je molekula amina **11** reagirala z molekulo aktiviranega estra, pri tem je nastala molekula amida **14**. ( $R_1 = \text{indol}$ ,  $R_2 = \text{-Ph-O-CH}_2\text{-Ph-(5-trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol}$ ). Prirejeno po (48, 49).

Poleg glavne reakcije je potekla tudi stranska reakcija, pri kateri je molekula amina **11** kot nukleofil reagirala s tautomerno obliko I molekule TBTU, kar je prikazano na sliki 21.



Slika 21: Shematski prikaz mehanizma poteka stranske reakcije pri sintezi spojine **14**. ( $R_2 = -\text{Ph-O-CH}_2\text{-Ph-(5-trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol}$ ). Prirejeno po (48, 49).

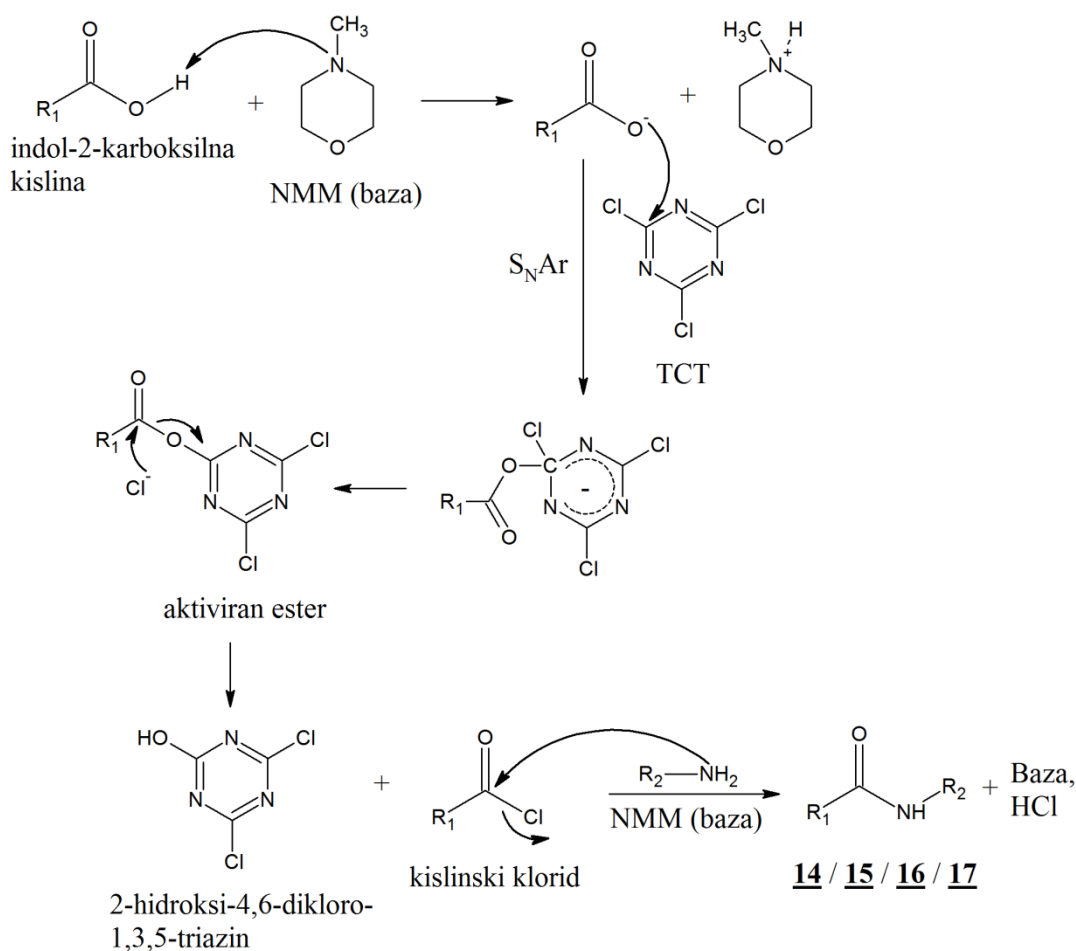
Izkoristek sinteze, izolacije in čiščenja spojine **14** (1. način) je bil 5,6 %. Postopek izolacije spojine **14** (1. način) smo začeli z ekstrakcijo. Organsko fazo (DKM) smo spirali z destilirano  $\text{H}_2\text{O}$  in nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$ . DKM smo uparili na rotavaporju. Dobili smo blede rjavo oborino z ostrim, neprijetnim vonjem in ugotovili, da je zmes zelo slabo topna v  $\text{CHCl}_3$ , DKM, MeOH, EtOH in DEE ter dobro topna v kombinaciji topil  $\text{CHCl}_3 - \text{ACT}$ . Nato smo izvedli kolonsko kromatografijo s suhim nanosom, vendar zmesi nismo uspeli očistiti. Spojino smo skušali izolirati še z metodo preobarjanja s kombinacijo topil MeOH – DEE in EtOAc – HEX, vendar pri tem nismo bili uspešni.

Menimo, da je hkrati z glavno reakcijo potekla tudi stranska reakcija. Najbolj verjetno je, da indol-2-karboksilna kislina ni v celoti zreagirala s tautomerno obliko I molekule TBTU do ustreznega aktiviranega estra. Ob dodatku amina **11** je bila zato v reakcijski zmesi prisotna tautomerna oblika I molekule TBTU. Amin **11** je zreagiral po mehanizmu glavne reakcije z aktiviranim estrom do amida **14** (1. način) in s tautomerno obliko I molekule TBTU po mehanizmu stranske reakcije do ustreznega produkta. Dobili smo zmes glavnega in stranskega produkta. Menimo, da je nastanek slabo topnega stranskega produkta vplival na zmanjšano topnost zmesi, v kateri je bila kot želen produkt spojina **14** (1. način), kar je močno otežilo izolacijo spojine oz. čiščenje zmesi glavnega (spojina **14** (1. način)) in stranskega produkta. Vse od naštetega je pripomoglo k zelo slabemu izkoristku reakcije. Položajna izomerija analoga para-para ni vplivala na reakcijo.

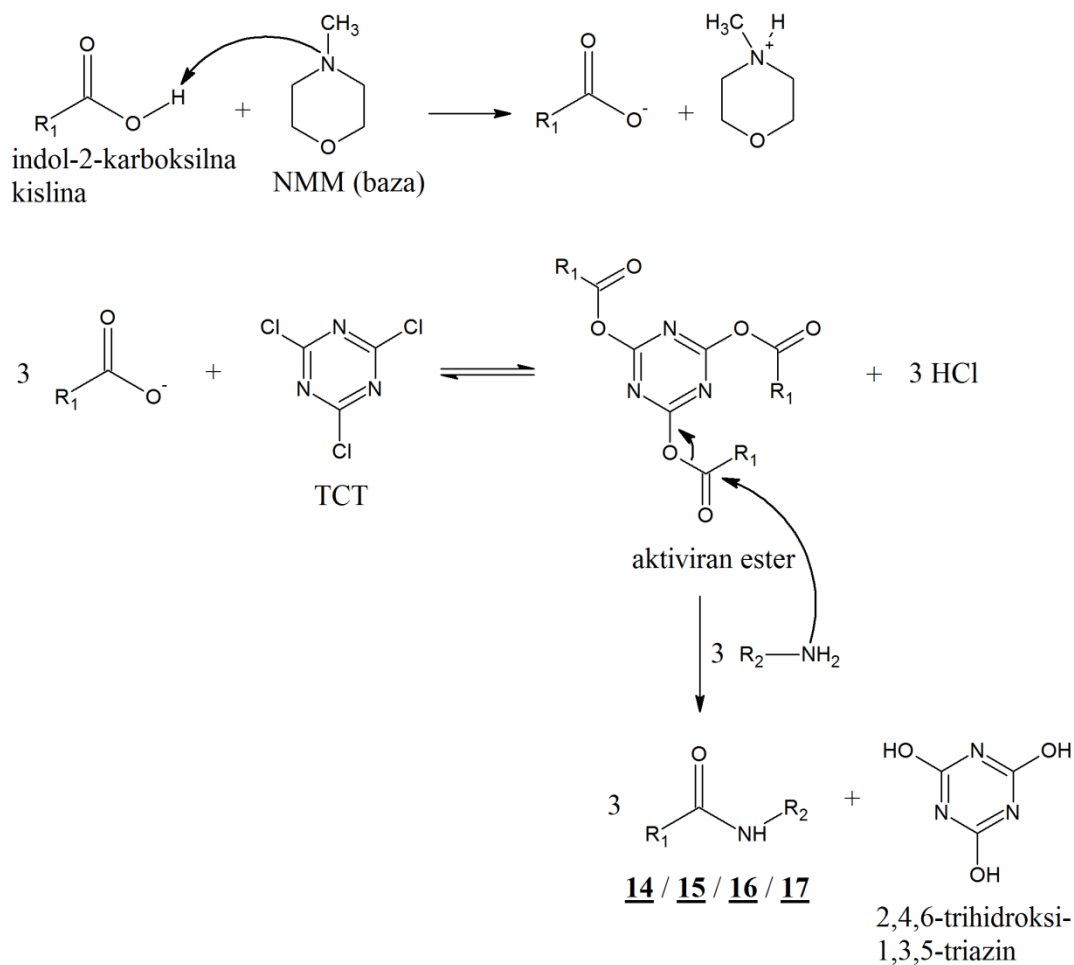
Sinteza amidne vezi z uporabo TBTU kot sklopitvenega reagenta se ni izkazala za primerno za naš tip spojin, zato smo poiskali drug sintezni in izolacijski postopek.

### 5.5.3. TVORBA AMIDOV **14** (2. NAČIN), **15**, **16** IN **17** (1. NAČIN) Z UPORABO TCT

Pri sintezi spojin **14** (2. način), **15**, **16** oz. **17** (1. način) je potekla reakcija nastanka amidne vezi med indol-2-karboksilno kislino in aminom **11**, **12**, **13** oz. **p-aminofenolom** z uporabo TCT in NMM kot baze. Sinteza spojin **14** (2. način), **15**, **16** in **17** (1. način) po postopku aktivacije karboksilne kisline s TCT lahko poteče po dveh poteh. Pri prvem mehanizmu (slika 22) najprej nastane ustrezen kislinski klorid, ki vstopi v reakcijo z aminom **11**, **12**, **13** oz. **p-aminofenolom**, pri čemer se tvori želen amid. Pri drugem mehanizmu (slika 23) amin neposredno reagira z aktiviranim estrom, pri čemer nastane želen amid.



Slika 22: Prvi mehanizem sinteze spojin **14** (2. način), **15**, **16** oz. **17** (1. način). V prvi stopnji je nastal karboksilatni anion indol-2-karboksilne kisline. V drugi stopnji je potekla nukleofilna aromatska substitucija, pri čemer se je tvoril aktiviran ester. V tretji stopnji je prišlo do tvorbe kislinskega klorida, ki je v zadnji stopnji reagiral z aminom (**11**, **12**, **13** oz. **p-aminofenol**), pri čemer je nastal ustrezen amid. ( $R_1$  = indol,  $R_2$  = -Ph-O-CH<sub>2</sub>-Ph-(5-trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol oz.  $R_2$  = -Ph-OH). Prirejeno po (50, 51).



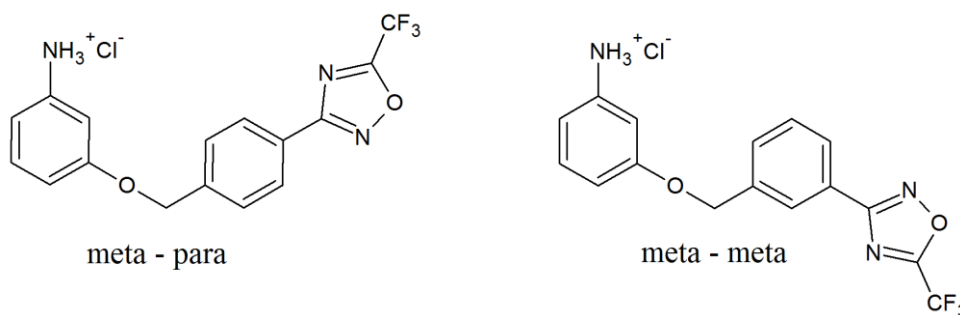
Slika 23: Drugi mehanizem sinteze spojin **14** (2. način), **15**, **16** oz. **17** (1. način). V prvi stopnji je nastal karboksilatni anion indol-2-karboksilne kisline. V drugi stopnji je potekla nukleofilna aromatska substitucija, pri čemer se je tvoril aktiviran ester. Aktiviran ester je v zadnji stopnji reagiral z aminom (**11**, **12**, **13** oz. **p-aminofenolom**), pri tem so nastale tri molekule ustreznega amida in molekula 2,4,6-trihidroksi-1,3,5-triazina. (R<sub>1</sub> = indol, R<sub>2</sub> = -Ph-O-CH<sub>2</sub>-Ph-(5-trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol oz. R<sub>2</sub> = -Ph-OH). Prirejeno po (50, 51).

Uspešno smo izvedli postopke sinteze, izolacije in čiščenja spojin **14** (2. način), **15**, **16** in **17** (1. način).

Pri sintezi spojin **14** (2. način), **15** in **16** smo dobili 82,6 %, 24,6 % in 29,3 % izkoristek reakcije. Ugotovili smo, da je za sintezo para-para analoga (**14**) primernejša uporaba TCT kot uporaba sklopitvenega reagenta TBTU. Pri sintezi spojine **14** (2. način) smo uporabili TCT in dobili neprimerno boljši izkoristek reakcije kot pri sintezi spojine **14** (1. način) z uporabo TBTU, kjer je bil izkoristek le 5,6 %. Za neaktivirane sisteme, kot sta indol-2-karboksilna kislina in amin **11**, je primernejša uporaba reagentov, ki kislino pretvorijo do

bolj reaktivnega kislinskega derivata. Pri uporabi TBTU smo dobili aktiviran ester, pri uporabi TCT pa kislinski klorid. Kislinski klorid je bolj reaktivna oblika kislinskega derivata kot ester. Pri uporabi TCT smo s spremljanjem reakcije s TLC videli, da je reakcija potekla v smeri nastanka spojine **14**, pri čemer smo nastale stranske produkte odstranili na enostaven in hiter način.

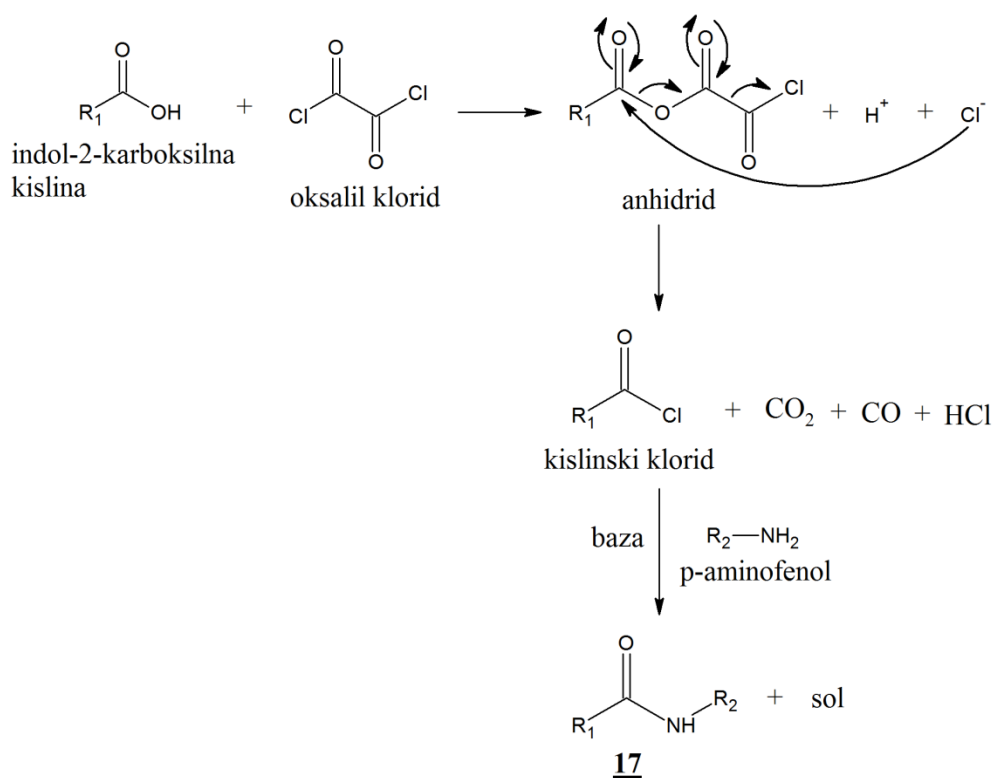
Menimo, da položajna izomerija vpliva na sintezo amidne vezi s TCT. Najboljši izkoristek smo dobili pri para-para analogu (**14** (2. način)), nato pri meta-meta analogu (**16**), najslabšega pa pri meta-para analogu (**15**). Slab izkoristek pri sintezi spojin **15** in **16** bi lahko upravičili tudi z nastankom nereaktivne soli amina **12** oz. **13** s HCl ob morebitnem primanjkljaju baze NMM. Ob reakciji amina z molekulo kislinskega klorida (prvi mehanizem) oz. ob nastanku aktiviranega estra (drugi mehanizem) nastane molekula HCl. Če ob dodatku amina v reakciji ni zadostne količine baze, ki bi nastalo kislino nevtralizirala, poteče acidobazična reakcija med molekulo HCl in prostim aminom do ustrezne soli. Tako del amina zreagira po mehanizmu glavne reakcije bodisi s kislinskim kloridom bodisi z aktiviranim estrom do ustreznega amida, del pa s HCl do nastanka nereaktivne soli. Izolacijska postopka in postopka čiščenja spojin **15** in **16** sta bila daljša in zahtevnejša v primerjavi z izolacijskim postopkom spojine **14** (2. način), kar je pripomoglo k bistveno slabšemu izkoristku spojin **15** in **16** v primerjavi s spojino **14** (2. način).



Slika 24: Prikaz strukturnih formul stranskih produktov (nereaktivnih soli) pri sintezi spojin **15** in **16**.

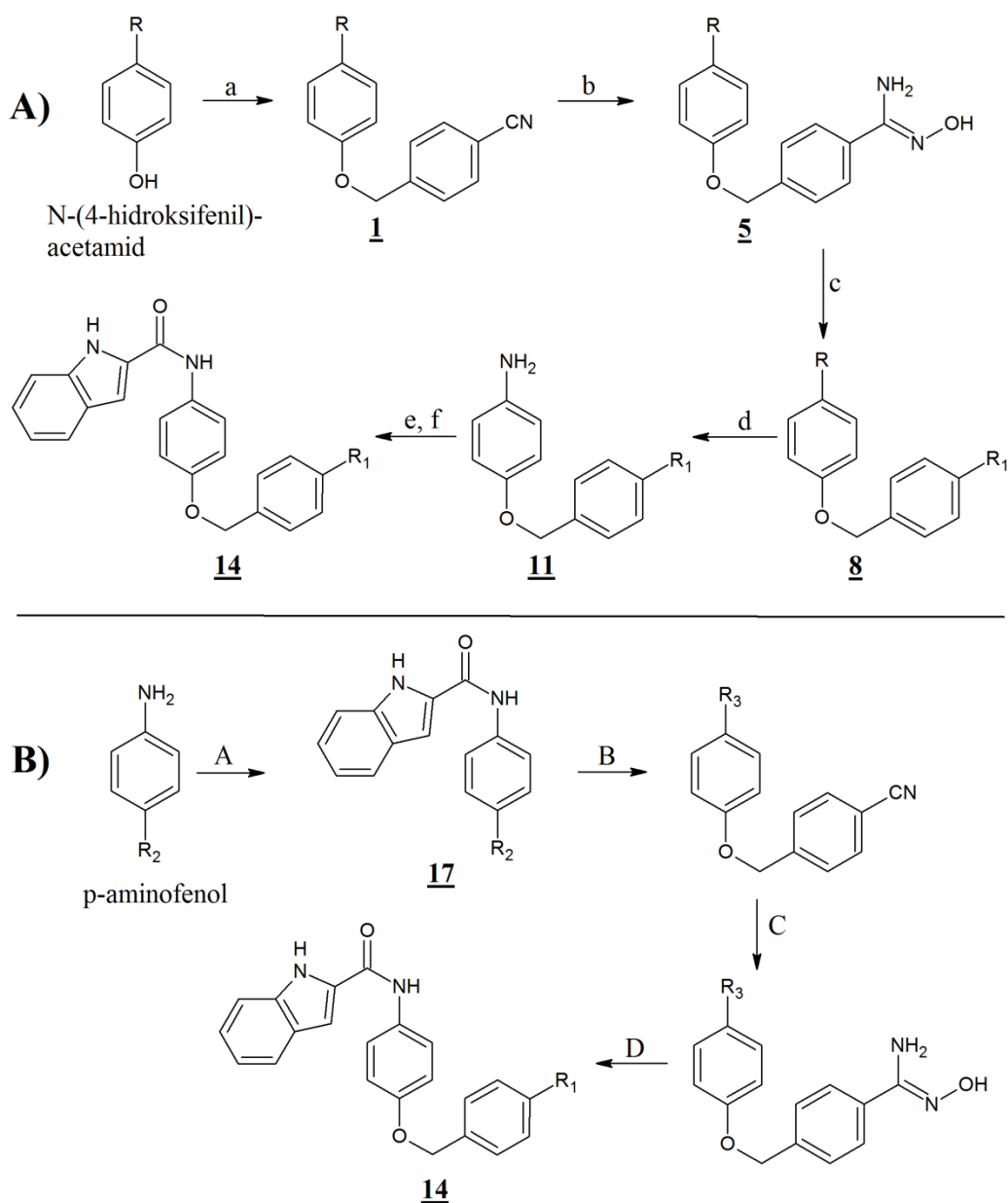
**5.5.4. TVORBA AMIDA 17 (2. NAČIN) Z UPORABO OKSALIL KLORIDA**

Pri sintezi spojine 17 (2. način) je potekla reakcija nastanka amidne vezi z uporabo oksalil klorida ( $C_2Cl_2O_2$ ). Tvorba kislinskega halida (klorida, bromida) je ena izmed enostavnejših metod aktivacije kisline. Običajno gre za dvostopenjski proces, pri čemer najprej poteče reakcija aktivacije kisline do nastanka kislinskega halida, nato sledi ustrezna sklopitvena reakcija, npr. reakcija kislinskega halida z aminom do nastanka amida. Pri uporabi  $C_2Cl_2O_2$  reakcijo spremlja stehiometričen nastanek dveh molekul plina ( $CO_2$  in  $CO$ ) in tvorba  $HCl$ , zaradi česar je potrebna prisotnost baze. Pribitek baze je potreben za nevtralizacijo nastale  $HCl$  in preprečitev pretvorbe amina do nereaktivne  $HCl$  soli. (51) Sinteza spojine 17 (2. način) je potekla po mehanizmu, ki je prikazan na sliki 25.



Slika 25: Shematski prikaz mehanizma sinteze spojine 17 (2. način). Tvorba amidne vezi z uporabo oksalil klorida. V prvi stopnji je nastala molekula anhidrida,  $H^+$  in  $Cl^-$ . V drugi stopnji je  $Cl^-$  reagiral z molekulo anhidrida, pri čemer je prišlo do tvorbe kislinskega klorida,  $CO_2$ ,  $CO$  in  $HCl$ . V zadnji stopnji je p-aminofenol reagiral z molekulo kislinskega klorida ob prebitku baze, pri čemer sta se tvorila amid 17 in ustrezna sol. ( $R_1 = \text{indol}$ ,  $R_2 = -\text{Ph-OH}$ ). Prirejeno po (51).

Želeli smo poiskati optimalno sintezno pot za spojino **14** (**15** oz. **16**), ki bi nam omogočila najvarčnejšo porabo reagentov (npr. indol-2-karboksilna kislina). Prav tako smo želeli optimizirati čas reakcije in dobiti čim boljši izkoristek reakcije. Odločili smo se preizkusiti sintezno pot, kjer bi v prvi stopnji v molekulo aminofenola uvedli indolkarboksamidni fragment, v nadaljevanju pa bi reakcijo izvajali po že preizkušenih postopkih substitucije – OH skupine v molekuli aminofenola.



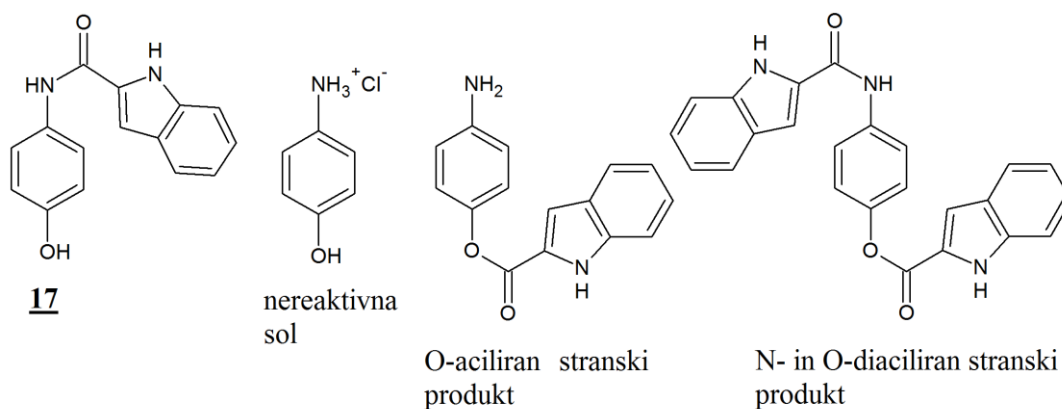
Slika 26: Načrt sinteznih poti spojine **14**. **a, B**: NaOEt, 4-(bromometil)benzoničil,  $T_v$ ; **b, C**:  $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ , TEA, MeOH,  $T_v$ ; **c, D**: TFAA, piridin,  $T = 110\text{ }^\circ\text{C}$ ; **d**: 5 M HCl, THF,  $T_v$ ; **e, f, A**: Indol-2-karboksilna kislina, NMM, DKM, TBTU (e), TCT (f, A),  $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$  (e),  $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$  (f, A). ( $R = -\text{NHCOCH}_3$ ,  $R_1 = 5\text{-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolski obroč}$ ,  $R_2 = -\text{OH}$ ,  $R_3 = \text{indolkarboksamidni fragment}$ ,  $T_v = \text{segrevanje pri temperaturi vrelišča}$ ).



Na sliki 26 je prikazana primerjava sinteznih poti A) in B) spojine **14**. Pri sinteznem postopku A) smo začeli s substitucijo –OH skupine v molekuli N-(4-hidroksifenil)acetamida, nadaljevali s pripravo 3,5-disubstituiranega-1,2,4-oksadiazola, v predzadnji stopnji izvedli odščito acetilne skupine, sintezno pot pa zaključili z uvedbo indolkarboksamidnega fragmenta v molekulo amina **11** (slika 9, slika 26). Pri sinteznem postopku B) smo začeli z uvedbo indolkarboksamidnega fragmenta v molekulo p-aminofenola, nato pa bi sintezno pot nadaljevali s substitucijo –OH skupine in jo zaključili s pripravo 3,5-disubstituiranega-1,2,4-oksadiazola (slika 26).

Izvedli smo sintezo spojine **17** (z indol-2-karboksilno skupino N-aciliran p-aminofenol) in spojino uspešno pripravili na dva različna načina. Pri prvem načinu (TCT) smo dobili 33,7 %, pri drugem ( $C_2Cl_2O_2$ ) pa 16,3 % izkoristek reakcije. Pri obeh načinih lahko slab izkoristek upravičimo z nastankom nereaktivne soli p-aminofenola s HCl ob morebitnem primanjkljaju baze NMM. Pri drugem načinu hkrati ob nastanku kislinskega klorida indol-2-karboksilne kisline nastane HCl in če ob dodatku p-aminofenola v reakciji ni zadostne količine baze, ki bi nastalo kislino (HCl) nevtralizirala, poteče acidobazična reakcija do ustrezne soli. Pri obeh načinih sinteze spojine **17** je možno, da je prišlo do N- in O-aciliranja p-aminofenola. Menimo, da bi pri ostrejših pogojih (višja temperatura, ustrezni dodatni ekvivalenti sklopitvenega reagenta in baze) lahko poteklo tudi O-aciliranje, pri čemer bi del p-aminofenola zreagiriral do ustreznega N-aciliranega produkta, del pa do O-aciliranega produkta oz. do N- in O-diaciliranega produkta (slika 27).

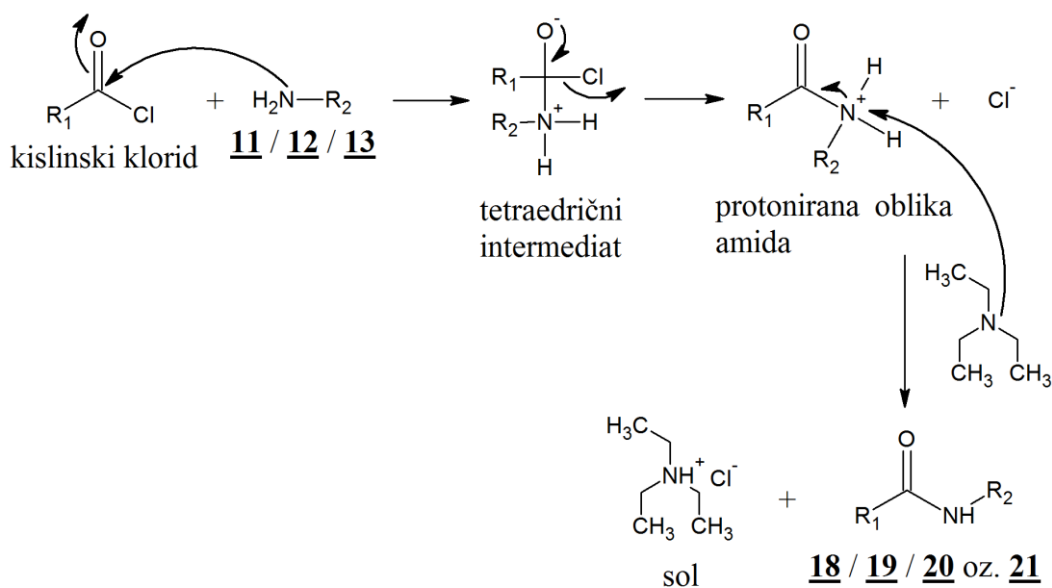
Ugotovili smo, da je sinteza spojin **14**, **15** in **16** po drugi poti mogoča, vendar je problem v slabem izkoristku reakcije in nastanku številnih stranskih produktov ne glede na način izvajanja reakcije.



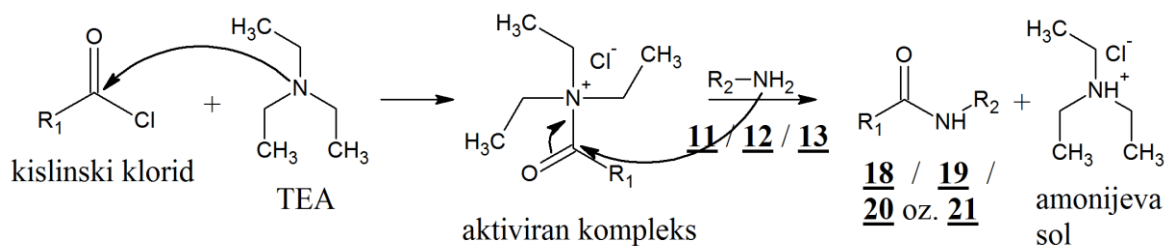
Slika 27: Prikaz strukturne formule spojine **17** in stranskih produktov.

5.5.5. TVORBA AMIDOV **18**, **19** IN **20** Z UPORABO KISLINSKIH KLORIDOV

Pri sintezi spojin **18**, **19** oz. **20** je potekla reakcija nukleofilne substitucije, nastala je amidna vez med aminom **11**, **12** oz. **13** in ustreznim kislinskim kloridom v nevodnem mediju ob uporabi TEA kot baze. Menimo, da sta možna dva mehanizma reakcije **18**, **19** in **20**. Prvi mehanizem temelji na nastanku tetraedričnega intermediata (slika 28), drugi pa prikazuje delovanje baze kot katalizatorja pri nastanku ustreznega amida (slika 29).



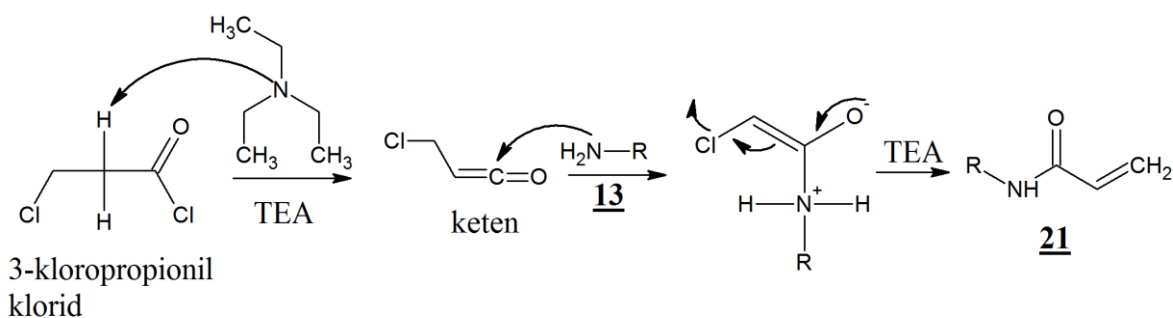
Slika 28: Shematski prikaz prvega mehanizma nastanka amidov **18**, **19** in **20** preko tvorbe tetraedričnega intermediata. V prvi stopnji je nastal tetraedrični intermedat. V drugi stopnji se je tvorila protonirana oblika amida, ki se je v zadnji stopnji deprotoniral, pri čemer smo dobili molekulo amida in ustrežna sol. (R<sub>1</sub> = -Ph-CN (**18**), -Ph-CH<sub>2</sub>-Cl (**19**), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl (**20**)). Prirejeno po (50, 51).



Slika 29: Shematski prikaz drugega mehanizma nastanka amidov **18**, **19** in **20**, pri katerem baza (TEA) deluje kot katalizator pri tvorbi amidne vezi. V prvi stopnji je nastal aktiviran kompleks, ki je nato reagiral z aminom, pri čemer smo dobili ustrezen amid in amonijevo sol. (R<sub>2</sub> = -Ph-O-CH<sub>2</sub>-Ph-(5-trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol). Prirejeno po (50, 51).

Uspešno smo izvedli postopke sinteze, izolacije in čiščenja spojin **18**, **19** in **20**. Pri sintezi spojine **18** smo dobili 86,3 %, pri **19** 56,0 %, pri **20** pa 35,9 % izkoristek. Menimo, da na reakcijo vpliva položajna izomerija. Pri izomeru amina para-para je bila sterična oviranost najmanjša, zato je bil izkoristek najboljši. Pri izomeru amina meta-meta je bila sterična oviranost največja, reakcija je težje potekala in zato smo dobili najslabši izkoristek. Izolacijska postopka in postopka čiščenja spojin **19** in **20** sta bila daljša in zahtevnejša v primerjavi z izolacijskim postopkom spojine **18**.

Z analiznimi metodami za določitev strukture spojine, molekulske mase in elementne sestave spojine **20** ter izhodnega reagenta 3-kloropropionil klorida smo ugotovili, da pri sintezi ni nastala spojina **20**, temveč spojina **21** N-[3-((3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-2-propenamid. Za kislinske kloride je znano, da imajo pod bazičnimi pogoji težnjo po pretvorbi do ketenov (50, 51, 52, 53).



Slika 30: Shematski prikaz nastanka spojine **21**. Molekula TEA (baza) je odtegnila kisel  $\alpha$ -proton (H) molekuli 3-kloropropionil klorida, sledil je izstop  $\text{Cl}^-$  in nastanek molekule ketena. Keten je nato vstopil v reakcijo z aminom **13**, po premestitvi elektronov je sledil izstop drugega  $\text{Cl}^-$  na mestu 3 in nastanek amida **21** (50, 51, 52, 53).

## 5.6. REZULTATI ELEKTROFIZIOLOŠKEGA POSKUSA DOLOČANJA AKTIVNOSTI SPOJIN 8, 9 IN 10 NA $Na_v1.3$ -KANALIH

Preglednica II: Prikaz aktivnosti spojin 8, 9 in 10 na  $Na_v1.3$ -kanalih.

	P1		P3	
	IC <sub>50</sub> (μM)	SD	IC <sub>50</sub> (μM)	SD
<b>Tetrodotoksin (TTX)</b>	0,00651	0,0008	0,00341	0,00011
<b><u>8</u></b>	30	0	30	0
<b><u>9</u></b>	30	0	30	0
<b><u>10</u></b>	30	0	30	0

Poskusi so bili izvedeni v Xentionu po standardnem postopku in so opisani v članku S. Peigneur in sodelavcev (1). Iz tabele je razvidno, da spojine 8, 9 in 10 nimajo vpliva na  $Na_v1.3$ -kanale v primerjavi s tetrodotoksinom (TTX), ki je močan zaviralec  $Na_v1.3$ -kanalov. Za spojine 8, 9 in 10 so IC<sub>50</sub> vrednosti za P1 in P3 višje od 30 μM, zato se smatra, da imajo spojine zanemarljiv učinek na tovrstne kanale. P1 je oznaka za mirujočo obliko  $Na_v1.3$ -kanala, P3 je oznaka za inaktivirano obliko  $Na_v1.3$ -kanala in SD je oznaka za standardni odklon.

## 6. SKLEPI

Uspešno smo sintetizirali, izolirali in očistili 5 različnih 5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazolnih derivatov klatrodina ter jih fizikalno-kemijsko in spektroskopsko okarakterizirali. Tako smo pripravili N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamid (**14**), N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamid (**15**), N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]indolkarboksamid (**16**), N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-4-cianofenilamid (**18**) in N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-3-(klorometil)fenilamid (**19**).

Sinteza N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-3-kloropropilamida (**20**) ni uspela. Z analiznimi metodami za določitev strukture spojine, molekulske mase in elementne sestave smo ugotovili, da je nastala spojina N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]-2-propenamid (**21**).

Želeli smo poiskati optimalno sintezno pot za spojino **14** (**15** oz. **16**), ki bi omogočila najvarčnejšo porabo reagentov, optimiziranje časa reakcije in čim boljši izkoristek reakcije. Pri prvem sinteznem postopku smo začeli s substitucijo –OH skupine v molekuli N-(4-hidroksifenil)acetamida, nadaljevali s pripravo 3,5-disubstituiranega-1,2,4-oksadiazola, v predzadnji stopnji izvedli odščito acetilne skupine in sintezno pot zaključili z uvedbo indolkarboksamidnega fragmenta v molekulo amina **11**. Pri drugem sinteznem postopku smo začeli z uvedbo indolkarboksamidnega fragmenta v molekulo p-aminofenola, nato pa bi sintezno pot nadaljevali s substitucijo –OH skupine in jo zaključili s pripravo 3,5-disubstituiranega-1,2,4-oksadiazola.

Tako smo izvedli sintezo spojine **17** in spojino uspešno pripravili na dva različna načina, in sicer z uporabo TCT reagenta in oksalil klorida. Ugotovili smo, da je za tovrstno sintezo amidne vezi primernejši TCT reagent.

Ugotovili smo, da na sintezo 3,5-disubstituiranih-1,2,4-oksadiazolov **8**, **9** in **10** vpliva položajna izomerija. Izkazalo se je, da je za ta tip reakcije najugodnejša meta-para izomerija. Ugotovili smo, da pri sintezi igrajo pomembno vlogo še nekateri drugi parametri: odsotnost vode, čas poteka reakcije, temperatura in že omenjena položajna izomerija.

Pri sintezi para-para analoga **14** smo ugotovili, da je uporaba TCT reagenta primernejša kot uporaba sklopitvenega reagenta TBTU za sintezo amidne vezi. Menimo, da položajna izomerija vpliva na sintezo amidne vezi s TCT reagentom. Najboljši izkoristek smo dobili pri para-para analogu (**14**), in sicer 82,6 %, pri meta-meta analogu (**16**) 29,3 %, najslabšega pa pri meta-para analogu (**15**), in sicer 24,6 %.

Uspešno smo izvedli sintezo amidne vezi med amini **11**, **12** ter **13** in izbranimi kislinskimi kloridi. Pri sintezi spojine **18** smo dobili 86,3 %, pri spojini **19** 56,0 %, pri sintezi spojine **20** oz. **21** pa 35,9 % izkoristek. Na reakcijo vpliva položajna izomerija. Izolacijska postopka in postopka čiščenja spojin **19** in **20** oz. **21** sta bila daljša in zahtevnejša v primerjavi z izolacijskim postopkom spojine **18**.

Z elektrofiziološkim poskusom na Na<sub>v</sub>1.3-kanalih smo ugotovili, da imajo spojine N-[4-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamid (**8**), N-[3-({4-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamid (**9**) in N-[3-({3-[5-(trifluorometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il]benzil}oksi)fenil]acetamid (**10**) zanemarljiv učinek na tovrstne kanale (IC<sub>50</sub> vrednosti so  $\geq 30 \mu\text{M}$ ), zato bi v bodoče lahko preverili tudi aktivnost prej omenjenih spojin in spojin **14**, **15**, **16**, **18**, **19** in **21** na različne podtipe Na<sub>v</sub>-kanalov, ne le na en podtip.

## 7. LITERATURA

1. Peigneur, S., Žula, A., Zidar, N., Chan-Porter, F., Kirby, R., Madge, D., Ilaš, J., Kikelj, D. and Tytgat, J., 2014. Action of Clathrocin and Analogues on Voltage-Gated Sodium Channels. *Marine Drugs*. 2014, 12, 2132 – 2143.
2. Wikipedia, The Free Encyclopedia, 2008. Agelas clathrodes. [online] (datum posodobitve 11.10.2014) Dostopno na: [https://en.wikipedia.org/wiki/Agelas\\_clathrodes](https://en.wikipedia.org/wiki/Agelas_clathrodes) [01.09.2015].
3. Coral reef photos, Barry B. Brown, 2009. Caribbean sponges, orange sponges, elephant ear sponge. [online] Dostopno na: <http://www.coralreefphotos.com/caribbean-sponges-orange-sponges-elephant-ear-sponge/> [01.09.2015].
4. De Lera Ruiz, M. and L. Kraus, R., 2015. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 58 (18), 7093 – 7118.
5. Catterall, W. A., 2014. Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels at Atomic Resolution. *Experimental Physiology*. 2014, 99 (1), 35 – 51.
6. Lehmann-Horn, F. and Jurkat-Rott, K., 1999. Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *Physiological Reviews*. 1999, vol. 79, št. 4, 1317 – 1372.
7. Bresjanac, M., 2011. Bolečina. Ribarič, S. ur. *Temelji patološke fiziologije*. 2. izdaja. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2011. *Littera picta d.o.o.* str. 249-255.
8. Faber, C. G., Lauria, G., Merkies, I. S., Cheng, X., Han, C., Ahn, H. S., Persson, A. K., Hoeijmakers, J. G., Gerrits, M. M., Pierro, T., Lombardi, R., Kapetis, D., Dib-Hajj, S. D. and Waxman, S. G., 2012. Gain-of-function Na<sub>v</sub>1.8 mutations in painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012, 109 (47), 19444 – 19449.
9. Ribarič, S., 2011. Motnje zavesti. Ribarič, S. ur. *Temelji patološke fiziologije*. 2. izdaja. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2011. *Littera picta d.o.o.* str. 284.
10. Catterall, W. A., 2014. Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2014, 54, 317 – 338.

11. Antzelevitch, C., Nesterenko, V., Shryock, J. C., Rajamani, S., Song, Y. and Belardinelli, L., 2014. The role of late I Na in development of cardiac arrhythmias. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2014, 221, 137 – 168.
12. Bresjanac, M., 2008. Kašelj in dispneja. Avtorji Bajrović et al., Ribarič, S. ur. Seminarji iz patološke fiziologije. 1. izdaja. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2011. *Littera picta d.o.o.* str. 82.
13. Črne-Finderle, N. in Zorec, R., 2011. Lastnosti neoplastičnih celic, invazivnost in metastaziranje. Ribarič, S. ur. *Temelji patološke fiziologije*. 2. izdaja. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2011. *Littera picta d.o.o.* str. 126.
14. Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I. and Christie, M. J., 2012. Conus venom peptide pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 2012, 64 (2), 259 – 298.
15. Park, J. H., Carlin, K. P., Wu, G., Ilyin, V. I., Musza, L. L., Blake, P. R. and Kyle, D. J., 2014. Studies examining the relationship between the chemical structure of protoxin II and its activity on voltage gated sodium channels. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, 57 (15), 6623 – 6631.
16. Ottawa Sun, 2015. Quebec women in Thailand poisoned by Fugu? [online] Dostopno na: <http://blogs.canoe.com> [12.11.2015].
17. About education, 2015. Tetrodotoxin chemical structure. [online] Dostopno na: <http://chemistry.about.com> [12.11.2015].
18. Reefkeeping Magazine, 2015. Problem Dinoflagellates and pH. [online] Dostopno na: <http://reefkeeping.com> [12.11.2015].
19. Chemistry World, 2015. Burke, M., 2012. Analytical test for shellfish poisoning saves 14,000 mice. [online] Dostopno na: <http://www.rsc.org/chemistryworld> [12.11.2015].
20. Algae Industry Magazine, 2015. Dinoflagellate microalgae show biofuel potential in Spanish study. [online] Dostopno na: <http://www.algaeindustrymagazine.com> [12.11.2015].
21. Wikipedia, The Free Encyclopedia, 2015. Panamanian golden frog. [online] Dostopno na: [https://en.wikipedia.org/wiki/Panamanian\\_golden\\_frog](https://en.wikipedia.org/wiki/Panamanian_golden_frog) [12.11.2015].
22. NutraWiki, 2015. Sabadilla. [online] Dostopno na: <http://nutrawiki.org/sabadilla> [12.11.2015].
23. Australian Museum, 2015. Cone shells, Conus. [online] Dostopno na: <http://australianmuseum.net.au/cone-shells-conus> [12.11.2015].



24. Knapp, O., McArthur, J. R. and Adams, D. J., 2012. Conotoxins targeting neuronal Voltage-Gated Sodium Channel Subtypes: Potential Analgesics? *Toxins*. 2012, 4 (11), 1236 – 1260.
25. UniProt Consortium, 2015. Taxonomy - *Odontobuthus doriae* (Yellow Iranian scorpion). [online] Dostopno na: <http://www.uniprot.org/taxonomy/342590> [12.11.2015].
26. Birdspiders.com, Rick C. West – arachnologist, 1997. *Thrixopelma pruriens* Schmidt 1998, female, Chile. [online] Dostopno na: <http://www.birdspiders.com> [12.11.2015].
27. Reptarium association, 2008. Species *Scolopendra subspinipes*. [online] Dostopno na: <http://www.reptarium.cz/en/taxonomy/Scolopendra-subspinipes/photogallery/4218> [12.11.2015].
28. Protein Data Bank in Europe, 2012. 2mun › Mu-scoloptoxin-Ssm6a. [online] Dostopno na: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2mun/protein/1> [12.11.2015].
29. Valdosta State University, 2015. Sea Anemones. [online] Dostopno na: [www.valdosta.edu](http://www.valdosta.edu) [12.11.2015].
30. Rentas, A.L., Rosa, R., Rodríguez, A.D. and De Motta, G.E., 1995. Effect of alkaloid toxins from tropical marine sponges on membrane sodium currents. *Toxicon*. 1995, 33 (4), 491 – 497.
31. Žula, A., Kikelj, D. and Ilaš, J., 2013. 2-Aminoimidazoles in medicinal chemistry. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013, 13 (13), 1921 – 1943.
32. Zidar, N., Montalvão, S., Hodnik, Ž., Nawrot, D.A., Žula, A., Ilaš, J., Kikelj, D., Tammela, P. and Mašič, L.P., 2014. Antimicrobial activity of the marine alkaloids, clathrocin and oroidin, and their synthetic analogues. *Marine Drugs*. 2014, 12 (2), 940 – 963.
33. Trdan, L., 2013. Sinteza 4-(benziloksi)anilinskih derivatov klatrodina; Synthesis of 4-(benzyloxy) aniline derivatives of the clathrocin: magistrska naloga. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
34. Okoren, P., 2011. Sinteza 2-aminoimidazolskih derivatov nevrotoksina klatrodina; Synthesis of 2-aminoimidazole derivatives of the neurotoxin clathrocin: diplomska naloga. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
35. Majcen, S., 2015. Sinteza aminopirimidintiazolov s potencialnim delovanjem na napetostno odvisne ionske kanalčke; Synthesis of aminopyrimidinethiazoles with

- potential activity on voltage-gated ion channels: magistrska naloga. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
36. Sajovic, L., 2013. Sinteza potencialnih tetrahidrokinazolinskih zaviralcev DNA giraze B; Synthesis of potencial tetrahydroquinazoline inhibitors of DNA gyrase B: magistrska naloga. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
37. Nadrah, K., 2008. Načrtovanje, sinteza in biološko vrednotenje delovanja modulatorjev integrinskih receptorjev; Design, synthesis and biological evaluation of integrin receptor modulators: doktorska disertacija. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani. (str. 85, 86, 89, 131, 132, 133).
38. Požgan, F. in Štefane, B., 2009. Uvod v laboratorijsko organsko kemijo. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani. 129-130.
39. Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, 2015. Acetamidophenol, 99%. [online] Dostopno na internetu na naslovu: <http://www.alfa.com/en/catalog/A12764> [18.01.2016].
40. Tišler, M., 1991. Nukleofilne substitucije in eliminacije na  $sp^3$  hibridiziranih ogljikovih atomih. Tišler, M. ur. Organska kemija: Tretja, popravljena in dopolnjena izdaja. Tretja izdaja. Ljubljana: Državna založba Slovenije.
41. Anderluh, M., Mravljak, J., Perdih, A., Sova M. in Pečar, S., 2010. Farmacevtska kemija III: Vaje in seminarji. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
42. Požgan, F. in Štefane, B., 2009. Uvod v laboratorijsko organsko kemijo. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani. 129-130.
43. Tišler, M., 1991. Polarne adicije na polarne, heterogene multiple vezi. Tišler, M. ur. Organska kemija: Tretja, popravljena in dopolnjena izdaja. Tretja izdaja. Ljubljana: Državna založba Slovenije. 195, 245.
44. O Bora, R., Dar, B., Pradhan, V. and Farooqui, M., 2014. [1, 2, 4]-Oxadiazoles: Synthesis and Biological Applications. Mini-Reviews in medicinal Chemistry. 2014, Apr; 14 (4): 355-369.
45. Jian, G., Ruimao, H., Yan, S. and Jianhua, C., 2014. Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles and their behavior of liquid crystallines. Tetrahedron Letters 55. 2014, 1557-1560.
46. University of Calgary, Department of chemistry, 2014. Chapter 20: Carboxylic Acid Derivatives. Nucleophilic Acyl Substitution. [online] (19.8.2014). Dostopno na:

- <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch20/ch20-3-4-1.html> [datum dostopa: 19.8.2015].
47. KhanAcademy, 2015. Acid and base – catalyzed hydrolysis of amides. [online film] (21.9.2015). Dostopno na: <https://www.khanacademy.org/science/organic-chemistry/carboxylic-acids-derivatives/acid-derivatives-jay/v/acid-and-base-catalyzed-hydrolysis-of-amides> [datum dostopa: 19.8.2015].
48. Valeur, E. and Bradley, M., 2009. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*. 2009, 38, 606 – 631.
49. Bachem, pioneering partner for peptides, 2014. Coupling reagents, Bachem, pioneering partner for peptides. Global Marketing, Bachem Group. (junij 2014). Dostopno na: [http://www.bachem.com/fileadmin/user\\_upload/pdf/Monographs/Coupling\\_Reagents.pdf](http://www.bachem.com/fileadmin/user_upload/pdf/Monographs/Coupling_Reagents.pdf) [datum dostopa: 21.8.2015]. 2-4.
50. Ambersing, P., R. and Rambhau, P., G., 2011. N-Acylation in non-aqueous and aqueous medium- method of amide synthesis in non-peptide compounds. *Scholars Research Library, Der Pharma Chemica*. 2011, 3(3), 409 – 421.
51. Montalbetti, C., A. G. N. and Falque, V., 2005. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 61. 2005, 10827 – 10852.
52. Cocivera, M. and Effio, A., 1980. Static and Flow Nuclear Magnetic Resonance of Dehydrohalogenation of 2-Chloropropanoyl Chloride. *The Journal of Organic Chemistry*. 1980, 45 (3), 415–420.
53. Paull, D., H., Weatherwax, A. and Lectka, T., 2009. Catalytic, asymmetric reactions of ketenes and ketene enolates. *Tetrahedron*. 2009, 65, 6771–6803.