



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



ŽAKLINA ŠMELCEROVIĆ

**INHIBICIJA KSANTIN-OKSIDAZE
DEPSIPEPTIDIMA I 2-AMINO-5-
ALKILIDEN-TIAZOL-4-ONIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC



ŽAKLINA ŠMELCEROVIĆ

**XANTHINE OXIDASE INHIBITORY
PROPERTIES OF DEPSIPEPTIDES AND 2-
AMINO-5-ALKYLIDENE-THIAZOL-4-ONES**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2016.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Живомир Петронијевић, редовни професор, Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу

Наслов: Инхибиција ксантин-оксидазе депсипептидима и 2-амино-5-алкилиден-тиазол-4-онима

У овој дисертацији испитан је утицај депсипептида и 2-амино-5-алкилиден-тиазол-4-она на активност комерцијалног ензима ксантин-оксидазе *in vitro* и ксантин-оксидазе у хомогенату јетре пацова. Три испитана 6-(пропан-2-ил)-морфолин-2,5-диона инхибирају комерцијалну ксантин-оксидазу и ксантин-оксидазу у хомогенату јетре пацова са IC_{50} вредностима нижим од $50 \mu\text{g/mL}$. Три испитана ациклична *N*-(α -бромацил)- α -амино естра нису показала значајнији утицај на активност ксантин-оксидазе. Деветнаест од тридесет испитиваних 2-амино-5-алкилиден-тиазол-4-она инхибирају комерцијалну ксантин-оксидазу са IC_{50} вредностима нижим од $50 \mu\text{g/mL}$. Осам од тридесет 2-амино-5-алкилиден-тиазол-4-она инхибирају ксантин-оксидазу у хомогенату јетре пацова са IC_{50} вредностима нижим од $50 \mu\text{g/mL}$. 4-((2-Бензиламино-4-оксотиазол-5(4*H*)-илиден)-метил)-бензонитрил се показао као најефикаснији инхибитор комерцијалне ксантин-оксидазе ($IC_{50} = 17,16 \mu\text{g/mL}$) и ксантин-оксидазе у хомогенату јетре пацова ($IC_{50} = 24,50 \mu\text{g/mL}$). Алопуринол је ефикаснији инхибитор и на комерцијалном и на ензиму у хомогенату јетре пацова, од свих испитиваних једињења.

Механизам инхибиције ксантин-оксидазе испитиваним депсипептидима и 2-амино-5-алкилиден-тиазол-4-онима, који су се показали као најефикаснији инхибитори овог ензима, разјашњен је методом молекулског *docking*-а. Начин везивања 6-(пропан-2-ил)-морфолин-2,5-диона за активни центар ксантин-оксидазе је сличан начину везивања салицилне киселине и фебуксостата за наведени ензим, јер испитивана једињења не образују ковалентне везе са атомом молибдена. Постоје два могућа начина интеракција испитиваних 2-амино-5-алкилиден-тиазол-4-она са ксантин-оксидазом, који зависе од природе амино групе.

Сумирајући *in silico* предвиђене физичко-хемијске, фармакокинетичке и токсиколошке параметре испитиваних једињења и осталих инхибитора ксантин-оксидазе може се закључити да већина једињења испуњава "Правило пет" Липинског и критеријуме добре растворљивости и пермеабилности. Ова једињења испуњавају и "правила Вебера", па се сматра да могу пенетрирати биолошке мембране и показати задовољавајући степен биорасположивости. Предвиђени фармакокинетички параметри указују на повољан степен хумане интестиналне апсорпције за скоро све инхибиторе, док је за већину једињења предвиђен изостанак испољавања токсичних

ефеката.
Генерални закључак ове докторске дисертације је да најефикаснији инхибитори ксантин-оксидазе из групе испитиваних депсипептида и 2-амино-5-алкилиден-тиазол-4-она представљају обећавајуће структуре за дизајн нових инхибитора ксантин-оксидазе, потенцијалних кандидата за лек у терапији хиперурикемије и гихта.

Научна област:	Технолошко инжењерство
Научна дисциплина:	Ензимско инжењерство
Кључне речи:	инхибиција ксантин-оксидазе; депсипептиди; 6-(пропан-2-ил)-морфолин-2,5-диони; <i>N</i> -(α -бромацил)- α -амино естри; 2-амино-5-алкилиден-тиазол-4-они; молекулски <i>docking</i> ; <i>in silico</i> студије
УДК:	66.097.8+577.152.1:543.645.6
CERIF класификација:	T 490
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Dr. Živomir Petronijević, Full Professor, Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš

Title: Xanthine oxidase inhibitory properties of depsipeptides and 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones

Abstract:

In this dissertation, depsipeptides and 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones were evaluated for inhibitory activity against commercial enzyme xanthine oxidase *in vitro* and xanthine oxidase in rat liver homogenate. Three studied 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones inhibit commercial xanthine oxidase and xanthine oxidase in rat liver homogenate with IC_{50} values below 50 $\mu\text{g/mL}$. Three studied *N*-(α -bromoacyl)- α -amino esters did not show the significant inhibitory effect against xanthine oxidase. Nineteen of thirty studied 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones inhibit commercial xanthine oxidase with IC_{50} values below 50 $\mu\text{g/mL}$. Eight of thirty 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones inhibit xanthine oxidase in rat liver homogenate with IC_{50} values lower than 50 $\mu\text{g/mL}$. 4-((2-Benzylamino-4-oxothiazol-5(4*H*)-ylidene)-methyl)-benzotrile showed the most potent inhibitory effect against commercial xanthine oxidase ($IC_{50} = 17.16 \mu\text{g/mL}$) as well as against rat liver xanthine oxidase ($IC_{50} = 24.50 \mu\text{g/mL}$). Allopurinol exhibited stronger inhibitory effect on commercial xanthine oxidase as well as rat liver xanthine oxidase than all assayed compounds.

Molecular docking studies were performed to gain an insight into the binding modes of the most potent studied depsipeptides and 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones with xanthine oxidase. The binding modes of 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones resemble those found on complexes of xanthine oxidase with salicylic acid and febuxostat which do not form a covalent bond with the molybdenum atom. There are two possible binding modes for the studied 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones that depend upon the nature of the "amine" part of the molecule.

Summarizing the *in silico* predicted physico-chemical, pharmacokinetic and toxicological properties of the studied compounds and the other xanthine oxidase inhibitors it might be concluded that the majority of compounds obey the Lipinski "Rule of five" and meet all criteria for good solubility and permeability. The assayed compounds obey the Veber rules and are likely to possess the ability to penetrate biological membranes and have satisfactory bioavailability. Predicted pharmacokinetic properties of selected xanthine oxidase inhibitors indicate to the favorable human intestinal absorption for almost all inhibitors, while the favorable toxicological properties are predicted for the majority of compounds.

General conclusion of this dissertation is that the most potent xanthine oxidase inhibitors of the studied depsipeptides and 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones represent the promising structures for design of novel xanthine oxidase inhibitors which are potential drug

	candidates for the treatment of hyperuricemia and gout.
Scientific Field:	Engineering technology
Scientific Discipline:	Enzyme engineering
Key Words:	xanthine oxidase inhibition; depsipeptides; 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones; <i>N</i> -(α -bromoacyl)- α -amino esters; 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones; molecular docking; <i>in silico</i> studies
UDC:	66.097.8+577.152.1:543.645.6
CERIF Classification:	T 490
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

Ova doktorska disertacija je rađena na Katedri za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Tehnološkog fakulteta u Leskovcu Univerziteta u Nišu.

Veliku i iskrenu zahvalnost za rukovođenje izradom ove disertacije dugujem svom mentoru dr Živomiru Petronijeviću, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Takođe, zahvaljujem se dr Nadi Nikolić, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu, dr Gordani Kocić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i dr Jeleni Lazarević, docentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, na izuzetno korisnim savetima i sugestijama.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj Porodici na ogromnoj podršci, razumevanju i strpljenju.

Skraćenice i simboli

DMSO - dimetil sulfoksid

FAD - flavin adenin dinukleotid

FDA - U.S. Food and Drug Administration

IC₅₀ - koncentracija inhibitora koja smanjuje brzinu enzimske reakcije na polovinu

LD₅₀ - smrtonosna doza kod 50% testiranih jedinki živih organizama

m_ilogP - particioni koeficijent oktanol/voda

MW - molekulska masa

N_{OHNH} - broj donora vodoničnih veza (OH i NH grupe)

N_{ON} - broj akceptora vodoničnih veza (O i N atomi)

N_{rotb.} - broj veza sa mogućnošću rotacije

NAD - nikotin adenin dinukleotid

RIP - relativni inhibitorni potencijal

RIP_a - IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

RIP_f - IC₅₀ feboksostat/IC₅₀ jedinjenje

SN₁ - SN₁ alifatična nukleofilna supstitucija

SN₂ - SN₂ alifatična nukleofilna supstitucija

SN_{Ar} - aromatična nukleofilna supstitucija

TD₅₀ - doza koja prouzrokuje toksične efekte kod 50% testiranih jedinki živih organizama

TPSA - polarnost, kapacitet formiranja vodoničnih veza

v₀ - brzina enzimske reakcije u odsustvu inhibitora

v_i - brzina enzimske reakcije u prisustvu inhibitora

ε_i - stepen inhibicije enzima

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	2
2.1. Ksantin-oksidaža: struktura, biohemija i regulacija aktivnosti.....	2
2.2. Inhibicija enzima.....	4
2.3. Značaj inhibicije ksantin-oksidaže.....	6
2.4. Pregled inhibitora ksantin-oksidaže.....	10
2.4.1. Inhibitori ksantin-oksidaže sa petočlanim prstenom.....	10
2.4.1.1. Derivati imidazola.....	10
2.4.1.2. Derivati pirazola.....	12
2.4.1.3. Derivati 1,3-selenazola.....	13
2.4.1.4. Derivati 1,3-tiazola.....	15
2.4.1.5. Derivati izoksazola.....	18
2.4.2. Inhibitori ksantin-oksidaže sa šestočlanim prstenom.....	19
2.4.2.1. Derivati benzena.....	19
2.4.2.2. Derivati pirimidina.....	21
2.4.3. Inhibitori ksantin-oksidaže biciklične strukture.....	26
2.4.3.1. Derivati naftalena.....	26
2.4.3.2. Derivati benzopirana.....	26
2.4.3.3. Derivati benzodioksana.....	30
2.4.3.4. Derivati hinolina.....	31
2.4.3.5. Derivati purina.....	31
2.4.3.6. Derivati pirazolo-pirimidina.....	32
2.4.3.7. Derivati tiadiazolo-pirimidina.....	34
2.4.4. Inhibitori ksantin-oksidaže triciklične strukture.....	35
2.4.4.1. Derivati karbazola.....	35
2.4.4.2. Derivati antracena.....	36
2.4.4.3. Derivati ksantona.....	37
2.4.4.4. Derivati naftopirana.....	38
2.4.4.5. Derivati pirazolo-hinazolina.....	40

2.4.4.6. Derivati pirazolo-triazolo-pirimidina	40
2.4.5. Inhibitori ksantin-oksidade – strukture sa četiri prstena	42
2.4.5.1. Derivati nafto-benzopirana	42
2.4.5.2. Derivati hromeno-hromena	42
2.5. Hemijska struktura i biološka aktivnost depsipectida	43
2.5.1. Hemijska struktura i biološka aktivnost ciklodidepsipectida	43
2.5.1.1. Hemijska struktura i biološka aktivnost 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona	45
2.5.2. Hemijska struktura i biološka aktivnost N-(α -bromacil)- α -amino estara	48
2.6. Hemijska struktura i biološka aktivnost 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona	49
2.7. <i>In silico</i> ispitivanja inhibitora medicinski značajnih enzima	51
2.7.1. Molekulski <i>docking</i> enzimskih inhibitora	51
2.7.2. Predviđanje fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina <i>in silico</i> metodama	51
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	53
4. MATERIJALI I METODE	54
4.1. Ispitivani depsipectidi i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-oni	54
4.1.1. Depsipectidi	54
4.1.1.1. 6-(Propan-2-il)-morfolin-2,5-dioni	54
4.1.1.2. Aciklični N-(α -bromacil)- α -amino estri	54
4.1.2. 2-Amino-5-alkiliden-tiazol-4-oni	54
4.2. <i>In vitro</i> ispitivanje inhibicije komercijalne ksantin-oksidade	55
4.3. <i>In vitro</i> ispitivanje inhibicije ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova	56
4.3.1. Dobijanje homogenata jetre pacova	56
4.3.2. Spektrofotometrijsko ispitivanje inhibicije ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova	57
4.4. <i>Docking</i> studije interakcija ispitivanih depsipectida i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona sa ksantin-oksidadom	58
4.5. Predviđanje fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina inhibitora ksantin-oksidade <i>in silico</i> metodama	58
5. REZULTATI I DISKUSIJA	62
5.1. Inhibicija ksantin-oksidade depsipectidima	62

5.1.1. Inhibicija ksantin-oksidade 6-(Propan-2-il)-morfolin-2,5-dionima	62
5.1.2. Inhibicija ksantin-oksidade acikličnim N-(α -bromacil)- α -amino estrima	69
5.2. Inhibicija ksantin-oksidade 2-amino-5-alikliden-tiazol-4-onma.....	70
5.3. Fizičko-hemijske, farmakokinetičke i toksikološke osobine inhibitora ksantin-oksidade predviđene <i>in silico</i> metodama	84
5.3.1. Fizičko-hemijske karakteristike inhibitora ksantin-oksidade.....	84
5.3.2. Farmakokinetički parametri inhibitora ksantin-oksidade.....	86
5.3.3. Toksikološki parametri inhibitora ksantin-oksidade.....	90
5.3.4. Mogućnost vezivanja inhibitora ksantin-oksidade za proteine i DNK	92
6. ZAKLJUČAK.....	103
7. LITERATURA	106
BIOGRAFIJA AUTORA.....	115
IZJAVE AUTORA	119

1. UVOD

Urikaza, koja katalizuje konverziju mokraćne kiseline u produkt veće rastvorljivosti, allantoin, nije aktivna u humanom organizmu. Hiperprodukcija ili hiposekrecija mokraćne kiseline može dovesti do pojave hiperurikemije i sledstveno gihta (Lü i saradnici, 2013). Giht, bolest povezana sa načinom života, nazivana je "kraljem bolesti", "bolešću kraljeva", ili po rečima Hipokrata "arthritisom bogatih", asocirana sa prekomernim unosom određenih namirnica i alkohola (Marcolongo, 2012).

Giht je uzrokovan taloženjem i kristalizacijom mokraćne kiseline u zglobovima i okolnom tkivu, i predstavlja najčešći oblik inflamatornog artritisa (Borges i saradnici, 2002; Lü i saradnici, 2013). Hiperurikemija i giht su povezani sa metaboličkim sindromom, renalnim i kardiovaskularnim bolestima (Lü i saradnici, 2013).

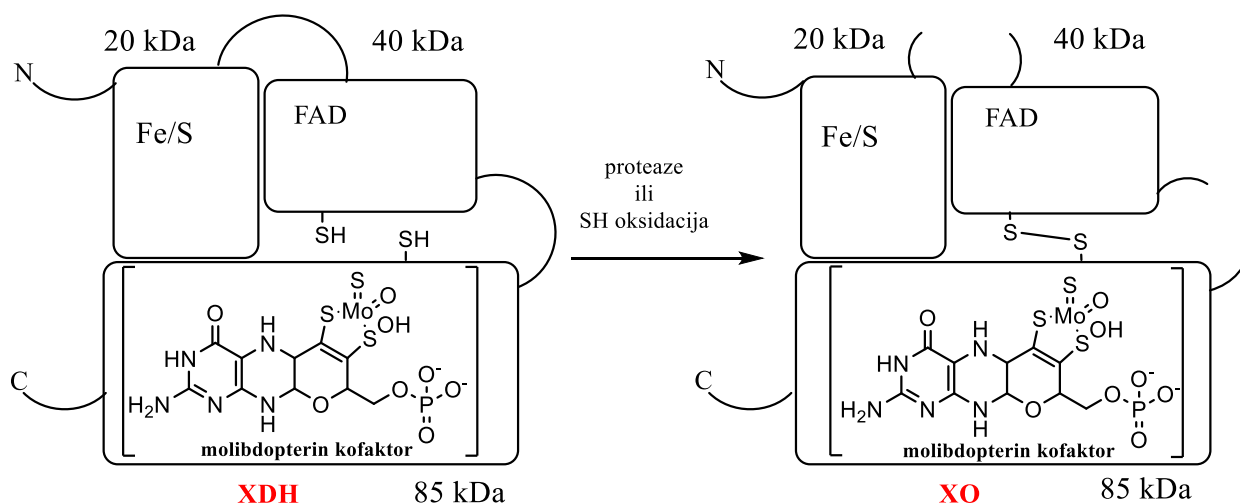
Ksantin-dehidrogenaza i ksantin-oksidaza su monogeniski produkti koji postoje u odvojenim, ali interkonvertibilnim oblicima, i predstavljaju ključne enzime u produkciji mokraćne kiseline kao krajnjeg metabolita adenin nukleotida (Borges i saradnici, 2002). Ksantin-dehidrogenaza je primarno aktivna u zdravom tkivu, dok pod patološkim uslovima biva konvertovana u ksantin-oksidazu. Prekomerna aktivnost ksantin-oksidaze vodi produkciji vodonik peroksida i superoksid anjon radikala, što povećava mogućnost pojave oksidativnog stresa. Ksantin-oksidaza predstavlja metu u terapiji gihta i stanja asociranih sa hiperurikemijom, sa svega nekoliko inhibitora dostupnih na tržištu. Inhibicija rezultuje smanjenjem produkcije i taloženja mokraćne kiseline u zglobovima (Lü i saradnici, 2013).

Poslednjih godina, učinjeni su napori i napredak u otkrivanju i razvoju novih inhibitora ksantin-oksidaze. Sintetisani su i izolovani brojni efikasni inhibitori, od kojih su neki dospeli i na tržište, kao što je topiroksostat odobren u Japanu juna 2013. godine (Hosoya i saradnici, 2014).

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Ksantin-oksidaža: struktura, biohemija i regulacija aktivnosti

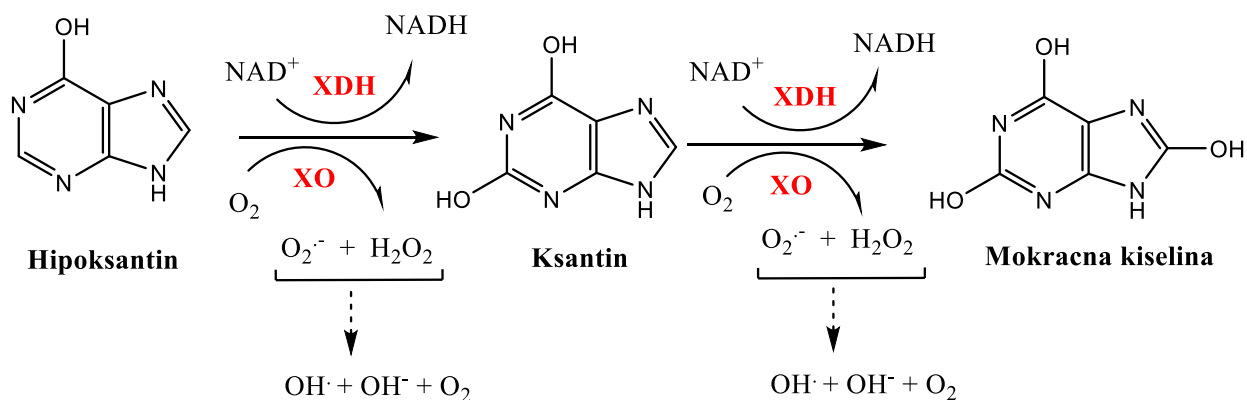
Ksantin-oksidaža (EC 1.1.3.22) i ksantin-dehidrogenaza (EC 1.1.1.204), predstavljaju interkonvertibilne oblike ksantin-oksido-reduktaze, aktivne u jetri, gastrointestinalnom traktu, bubregu, srcu, kapilarnim endotelnim ćelijama, mozgu, plućima i plazmi (Borges i saradnici, 2002; Harrison, 2002). Ovi enzimi su flavoproteini kompleksne strukture, sačinjeni od dve identične subjedinice od 145 kDa, sa izraženim, ne velikim, razlikama među vrstama. Svaka katalitički nezavisna subjedinica se sastoji od dva neidentična Fe/S centra u N-terminalnom domenu (20 kDa), flavin adenin dinukleotid (FAD) kofaktora u intermedijarnom domenu (40 kDa) i molibdo-pterinskog kofaktora u C-terminalnom domenu (85 kDa) (slika 1). Ovi enzimi se sastoje od oko 1330 aminokiselinskih ostataka, čija sekvenca pokazuje visok stepen homologije (~90%) kod humanog i enzima pacova i miša (Borges i saradnici, 2002; Nishino i saradnici, 2008). U prvoj reakciji katalizovanoj ksantin-oksido-reduktazom, odvija se transfer dva elektrona se ksantina na molibdo-pterinski kofaktor, a zatim na FAD posredstvom Fe/S centra, gde se odvija reakcija oksidacije praćena redukcijom nikotin adenin dinukleotida (NAD⁺) ili molekuskog kiseonika. Fe/S centar i FAD podležu spektralnim promenama tokom reakcije (Borges i saradnici, 2002). Humani enzim inicijalno biva sintetisan u obliku dehidrogenaze i može biti konvertovan u oksidazni oblik oksidacijom sulfhidrilnih ostataka ili proteolizom. Ograničena proteoliza humane ksantin-dehidrogenaze tripsinom, razgrađuje enzim u tri fragmenta, koji odgovaraju prethodno pomenutim domenima, uz istovremenu ireverzibilnu konverziju do ksantin-oksidaže (Enroth i saradnici, 2000). Reverzibilna transformacija ksantin-dehidrogenaze do ksantin-oksidaže može biti ostvarena oksidacijom cisteina (Borges i saradnici, 2002). Lee i saradnici (2000) su pokazali da peroksinitrit (ONOO⁻) inhibira aktivnost ksantin-oksidaže, što ukazuje da peroksinitrit nastao u biloškim sistemima može vršiti regulaciju aktivnosti ksantin-oksidaže.



Slika 1. Strukturni model subjedinice dimerne ksantin-dehidrogenaze i ksantin-oksidaze (adaptirano iz Borges i saradnici, 2002).

Ksantin-oksidaza je molibdoflavoprotein, široko distribuiran, sa visokom specifičnom aktivnošću u jetri i intestinumu humanog organizma. Ovaj enzim učestvuje u metabolizmu purina katalizujući oksidativnu hidrosilaciju hipoksantina do ksantina, i ksantina do mokraćne kiseline. Redukcijom kiseonika u flavinskom centru bivaju generisane reaktivne kiseonične vrste, superoksid anjon radikal i vodonik peroksid (slika 2) (Dhiman i saradnici, 2013). Nastali slobodni radikali mogu biti konvertovani u visoko reaktivne hidrosil radikale u prisustvu gvožđa (*Haber-Weiss* i *Fenton*-ova reakcija) (Nepali i saradnici, 2011a). Produkcija mokraćne kiseline i reaktivnih kiseoničnih vrsta, katalizovana ksantin-oksidadom, može dovesti do pojave gihta i oksidativnog oštećenja tkiva. Utvrđeno je učešće slobodnih radikala u indukciji apoptoze/nekroze, indukciji/supresiji ekspresije gena, aktivaciji ćelijskih signalnih kaskada, oksidativnom oštećenju DNK i lipida, inflamaciji, metaboličkim poremećajima, arterosklerozi, ishemija-reperfuzija oštećenjima, infarktu, renalnoj hipoksiji i karcinogenezi (Dhiman i saradnici, 2013; Lin i saradnici, 2015a; Nepali i saradnici, 2011a).

U patogenezi pojedinih oštećenja, ksantin-dehidrogenaza biva ireverzibilno konvertovana u ksantin-oksidadu usled aktivacije proteaza povišenim koncentracijama kalcijuma. U nedostatku energije dešava se ATP degradacija, akumulacija hipoksantina, generisanje mokraćne kiseline i superoksid anjon radikala katalisana ksantin-oksidadom (Harrison, 2002).



Slika 2. Šematski dijagram oksidativne hidroksilacije hipoksantina preko ksantina do mokraćne kiseline i generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta u metabolizmu purina (adaptirano iz Borges i saradnici, 2002 i Harrison, 2002).

Usled aktivnosti u cirkulaciji, ksantin-oksidaza može biti značajan generator slobodnih radikala u krvi. Aktivnost enzima može biti i do hiljadu puta povećana u cirkulaciji kada su oštećena tkiva bogata ksantin-oksidadom, posebno kod akutnog oštećenja jetre (Harrison, 2002; Pacher i saradnici, 2006).

Aktivnost enzima je regulisana na transkripcionom i post-transkripcionom nivou (Pacher i saradnici, 2006). Ekspresija ksantin-dehidrogenaza/ksantin-oksidaza gena je regulisana prisustvom specifičnih represor/aktivator vezujućih *TATA-like* regiona (Harrison, 2002).

Za određivanje aktivnosti ksantin-oksidaze se koriste spektrofotometrijske, HPLC i fluorimetrijske metode (Borges i saradnici, 2002; Shintani, 2013).

2.2. Inhibicija enzima

Inhibitori enzima su supstance koje mogu da uspore ili potpuno onemoguće odvijanje enzimskih reakcija. Po karakteru svog delovanja, inhibitori mogu biti povratni ili nepovratni (reverzibilni ili ireverzibilni). Reverzibilni inhibitori interaguju sa enzimom nekovalentnim vezama gradeći enzim-inhibitor kompleks, koji podleže disocijaciji do slobodnog enzima i inhibitora. Ravnoteža u reakciji enzima i inhibitora se uspostavlja brzo i ne menja se vremenom, izuzev u slučaju nestabilnih inhibitora. Step en inhibicije, tj. položaj ravnoteže u reakciji enzima i inhibitora, uvek zavisi od koncentracije inhibitora. Postoje više tipova reverzibilne inhibicije: konkurentna, nekonkurentna, beskonkurentna i mešovita.

Konkurentna inhibicija je otkrivena pri ispitivanju delovanja inhibitora koji su predstavljali analoge supstrata. Pošto u ovim slučajevima imamo vrlo slične strukture supstrata i inhibitora, pretpostavlja se da se inhibitor vezuje sa istim grupama na površini enzima za koje se vezuje i supstrat. Vezujući se za isto mesto enzima, za koje se vezuje i supstrat, inhibitor ometa vezivanje supstrata, i na taj način dovodi do smanjenja aktivnosti enzima. U ovom slučaju supstrat i inhibitor konkurišu za isto mesto u aktivnom centru enzima, i zbog toga je ova vrsta inhibicije dobila naziv konkurentna inhibicija. Nekonkurentna inhibicija zavisi samo od koncentracije inhibitora i ne može se umanjiti povećavanjem koncentracije supstrata. Nekonkurentni inhibitori ne utiču na vezivanje supstrata sa enzimom. Beskonkurentni inhibitori se ne vezuju sa slobodnim enzimom nego samo sa kompleksom enzim-supstrat (Petronijević, u pripremi). Reagujući sa kompleksom enzim-supstrat inhibitor sprečava njegovo razlaganje i obrazovanje proizvoda biohemijske reakcije. Porast koncentracije supstrata ne može da umanjí stepen inhibicije. Beskonkurentna inhibicija se retko sreće kod jednosupstratnih, a češće kod dvosupstratnih reakcija. Mešovita inhibicija se ispoljava istovremeno i kao konkurentni i nekonkurentni, a nekada i kao beskonkurentni tip inhibicije. Inhibitor modifikuje vezivanje supstrata za enzim, a sem toga smanjuje i maksimalnu brzinu inhibicije. Mešoviti inhibitori često ispoljavaju sposobnost da smanjuju interakcije enzima sa supstratom i da inhibiraju razlaganje kompleksa enzim-supstrat na enzim i proizvod reakcije (Koraćević i saradnici, 2006).

Ireverzibilni inhibitori se, po pravilu, vezuju za enzim kovalentnim vezama preko funkcionalne grupe enzima neophodne za katalitičku aktivnost, ili interaguju nekovalentnim vezama tako čvrsto, da se disocijacija nastalog kompleksa odvija veoma sporo. Reakcija enzima sa ireverzibilnim inhibitorima se odvija, obično, relativno sporo, ali se aktivnost enzima neprekidno smanjuje sa vremenom, do potpunog gubitka, čak i pri jako niskim koncentracijama inhibitora, pod uslovom da je inhibitor prisutan u višku u poređenju sa enzimom (Petronijević, u pripremi).

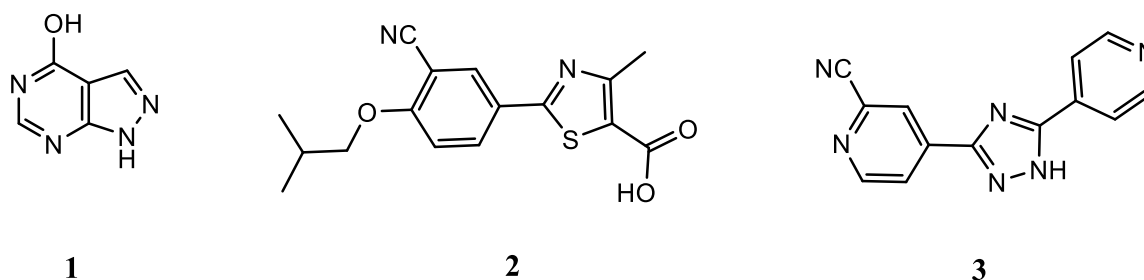
Ako se enzimski reakcija u odsustvu inhibitora odigrava brzinom v_0 , a u prisustvu inhibitora brzinom v_i , stepen inhibicije (ε_i) je definisan kao:

$$\varepsilon_i = \frac{v_0 - v_i}{v_0}$$

Kao merilo jačine inhibitora se koristi i koncentracija inhibitora koja smanjuje brzinu enzimski reakcije na polovinu, i označava se sa IC_{50} (Petronijević, u pripremi).

2.3. Značaj inhibicije ksantin-oksidade

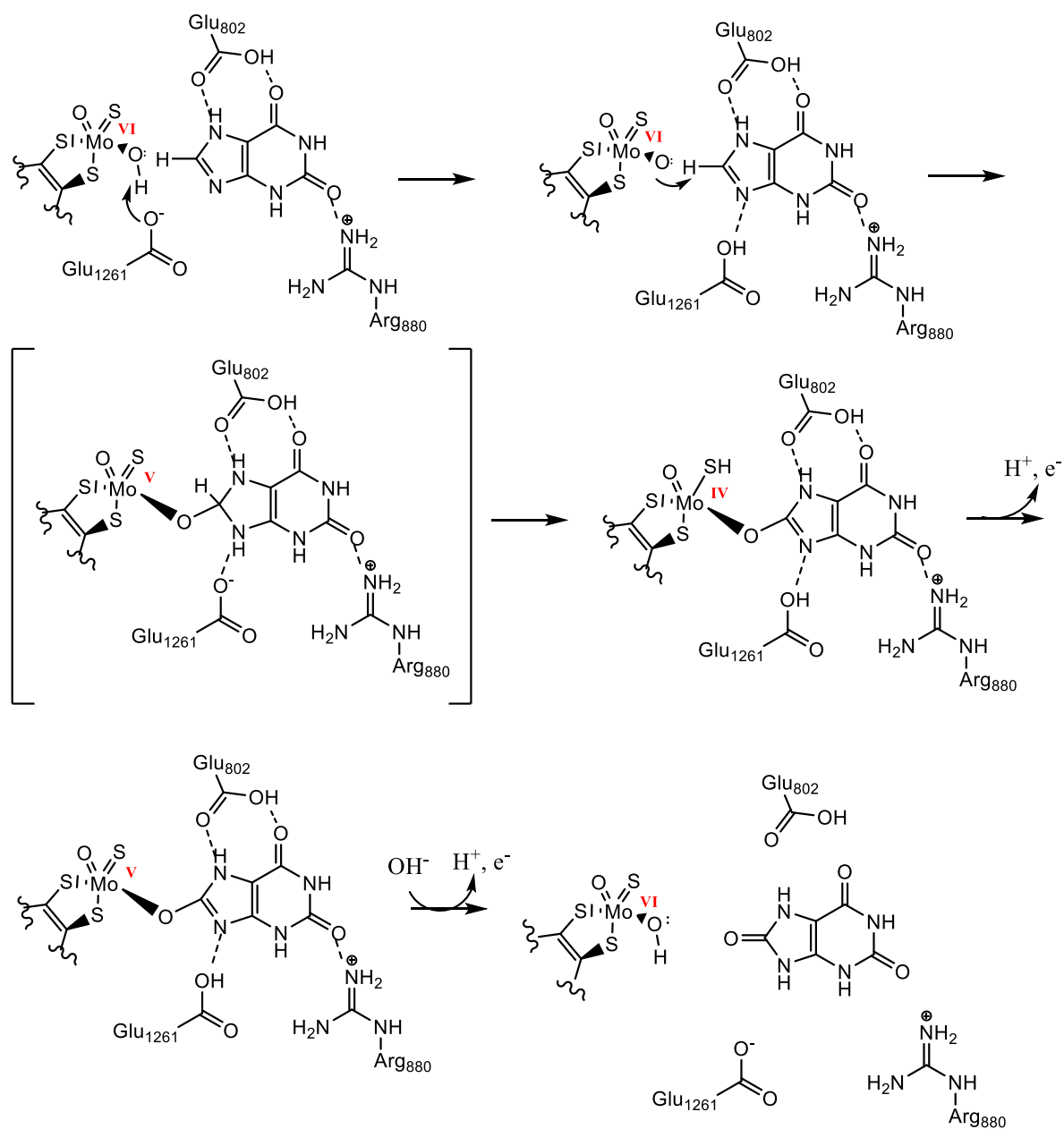
Istraživanjima i kliničkim studijama je dokazana uloga ksantin-oksidade u produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta i sledstvenih oksidativnih oštećenja (Pacher i saradnici, 2006). Inhibitori ksantin-oksidade nalaze primenu u hroničnoj terapiji i prevenciji hiperurikemije i gihta. Alopurinol (jedinjenje **1**, slika 3) je efikasan inhibitor ksantin-oksidade, decenijama primenjivan u terapiji gihta. Međutim, ozbiljni neželjeni efekti alopurinola i drugih analoga purina, kao što su hipersenzitivnost sa povišenom temperaturom, osipom i renalna toksičnost, ograničavaju njihovu primenu u terapiji (Borges i saradnici, 2002; Lü i saradnici, 2013). Postoji potreba za novim efikasnim inhibitorima ksantin-oksidade, povoljnijeg bezbedonosnog profila (Dhiman i saradnici, 2013). Febuksostat (jedinjenje **2**, slika 3), derivat tiazola, jedan od prvih nepurinskih inhibitora ksantin-oksidade odobren od strane FDA (U.S. Food and Drug Administration) (Guan i saradnici, 2014), takođe pokazuje neželjene efekte, što uslovljava odsustvo preporuke za primenu alopurinola i febuksostata u terapiji asimptomatske hiperurikemije. Postoji potreba za novim inhibitorima ksantin-oksidade za terapiju gihta kod pacijenata sa hipersenzitivnošću ili intolerancijom na alopurinol i febuksostat ili za kombinovanu terapiju radi postizanja veće efikasnosti i smanjenja verovatnoće ispoljavanja neželjenih efekata (Lü i saradnici, 2013). Jedan od odobrenih, strukturno inovativnih, inhibitora ksantin-oksidade je topiroksostat (jedinjenje **3**, slika 3) (Hosoya i saradnici, 2014).



Slika 3. Strukturne formule odobrenih inhibitora ksantin-oksidade, alopurinola (**1**), febuksostata (**2**) i topiroksostata (**3**).

Ima podataka o kristalnoj strukturi ksantin-oksidade i ksantin-oksidade vezane sa inhibitorima. Enroth i saradnici (2000) su objavili strukturu kompleksa salicilat-ksantin-oksidaza. Salicilat je kompetitivni inhibitor ksantin-oksidade. Vezuje se za molibdo-pterinski kofaktor, mesto vezivanja supstrata i njegove oksidacije, i onemogućava prilaz supstrata

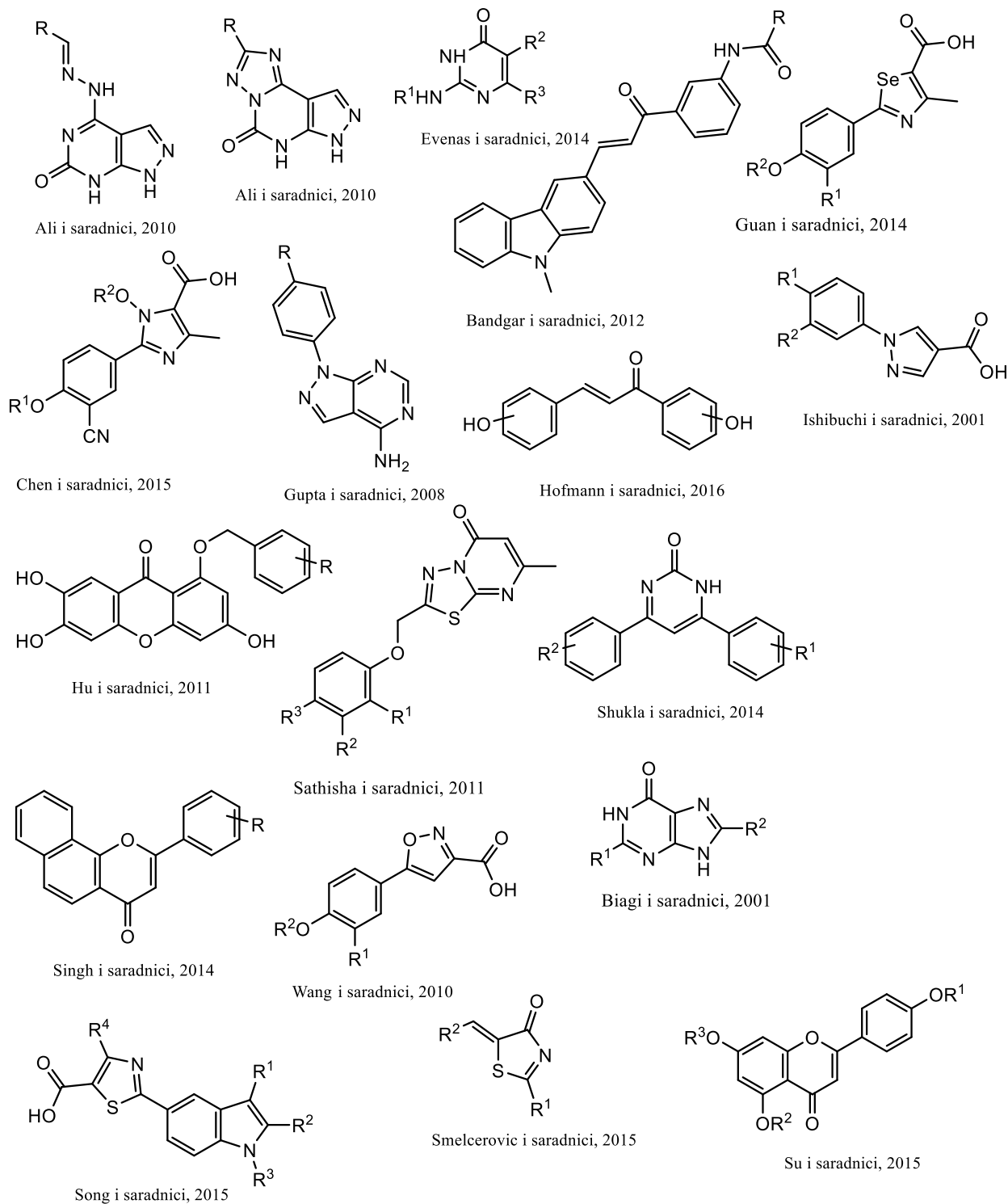
metalnom kompleksu. Aminokiselinski ostaci Arg880, Phe914, Phe1009, Thr1010 i Glu1261 učestvuju u vodoničnim i elektrostatskim interakcijama salicilata i vezivnog mesta enzima (Lin i saradnici, 2002). Ksantin podleže hidroksilaciji u molibdo-pterinskom centru okruženom ostacima Phe649, Asn768, Glu802, Leu873, Arg880, Phe914, Phe1009, Thr1010, Leu1014 i Glu1261. Od najvećeg značaja u hidroksilaciji supstrata su Glu802, Glu1261 i Arg880 (slika 4) (Lin i saradnici, 2015a). Kada je inhibitor vezan za enzim, prilaz supstratu je blokiran i oksidacija sprečena (Lin i saradnici, 2015b).



Slika 4. Mehanizam hidroksilacije ksantina do mokraćne kiseline katalisane ksantin-oksidadom (Nishino i saradnici, 2008; Choi i saradnici, 2004).

Alopurinol je pokazao sličan položaj i interakcije sa enzimom kao salicilat. Biciklični benzopiranon apigenina se preklapa sa prstenom salicilata, a stabilizacija ovog jedinjenja u vezivnom mestu enzima postoji usled interakcija fenil grupe i hidrofobnih ostataka Phe1076, Phe649, Leu648, Leu873 i Leu1014. Pokazano je uspostavljanje vodoničnih veza i elektrostatičnih interakcija između C7 hidroksilne grupe i Glu1261, C5 hidroksilne grupe i Arg880, i C4 karbonilne grupe i hidroksilne grupe Thr1010. Kvercetin se vezuje u molibdopterinskom centru, kao i apigenin, ali sa slabijim interakcijama (Lin i saradnici, 2002). Vezivno mesto enzima za kvercetin čine ostaci Arg880, Arg912, Phe914, Phe1009, Thr1010 i Glu1261 (Shen i saradnici, 2009). Febuksostat, preko karboksilne grupe interaguje sa Arg880 i Thr1010 i gradi vodoničnu vezu sa Glu802 (preko azotovog atoma heterociklusa) i Asn768 (preko cijano grupe) (Wang i saradnici, 2010).

Na slici 5. su prikazane opšte strukturne formule određenih novih inhibitora ksantin-oksidade, dok je u poglavlju 2.4. dat pregled najefikasnijih inhibitora ovog enzima.



Slika 5. Opšte strukturne formule novih inhibitora ksantin-oksidaze.

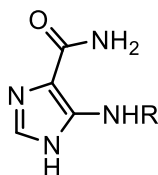
2.4. Pregled inhibitora ksantin-oksidade

2.4.1. Inhibitori ksantin-oksidade sa petočlanim prstenom

2.4.1.1. Derivati imidazola

Derivati imidazola predstavljaju jedan od prvih primera efikasnih monocikličnih inhibitora ksantin-oksidade (Biagi i saradnici, 1996). Jedinjenja **4** i **5** (tabela 1) se mogu smatrati analogima alopurinola, usled biozosterne zamene purinskog prstena 4-karbamoil-5-karboksamidoimidazolom.

Tabela 1. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima imidazola **4** i **5** (Biagi i saradnici, 1996)



Opšta struktura jedinjenja 4 i 5

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
4	COCOO(CH ₂) ₄ CH ₃	1,92	2,19
5	COCOO(CH ₂) ₅ CH ₃	1,11	3,78

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

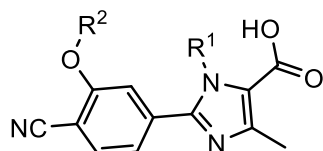
Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 4,20 μM)

^bRIP = relativni inhibicioni potencijal, $RIP_a = IC_{50} \text{ alopurinol} / IC_{50} \text{ jedinjenje}$

Chen i saradnici (2015) su sintetisali derivate 1-hidroksi/metoksi-4-metil-2-fenil-1*H*-imidazol-5-karboksilne kiseline (jedinjenja **6-18**, tabela 2), strukture zasnovane na modelu feboksostata i optimizovane radi postizanja većeg stepena inhibicije ksantin-oksidade. 1-Hidroksilna i metil grupa prstena učestvuju u interakcijama sa aktivnim centrom enzima. Jedinjenja **9-11** pokazuju isti mehanizam inhibicije kao feboksostat, sa većom efikasnošću u poređenju sa ostalim analogima i IC₅₀ vrednostima nižim od feboksostata. Pretpostavlja se da je 1-hidroksilna grupa od značaja za snažnu inhibiciju ksantin-oksidade jedinjenjima **9-11** zbog građenja vodoničnih veza sa Thr1010. Derivati 1-hidroksi/metoksi-4-metil-2-fenil-1*H*-imidazol-5-karboksilne kiseline sa 1-metoksi grupom, jedinjenja **17** i **18**, pokazuju manje efikasnu inhibiciju ksantin-oksidade (tabela 2). Utvrđeno je postojanje potencijalne

interakcije karboksilne grupe sa gvanidino grupom Arg880. Uvođenje hidroksilne grupe, između fenolne i karboksilne grupe, bi moglo dovesti do analoga febuksostata koji su efikasniji inhibitori ksantin-oksidade (Chen i saradnici, 2015).

Tabela 2. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima imidazola **6-18** (Chen i saradnici, 2015)



Opšta struktura jedinjenja 6-18

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _f ^b
6	OH	CH ₃	0,550	0,02
7	OH	(CH ₂) ₂ CH ₃	0,130	0,08
8	OH	CH(CH ₃) ₂	0,170	0,06
9	OH	(CH ₂) ₃ CH ₃	0,003	3,33
10	OH	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	0,003	3,33
11	OH	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,006	1,67
12	OH	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	0,030	0,33
13	OH	(CH ₂) ₅ CH ₃	0,030	0,33
14	OH	(CH ₂) ₆ CH ₃	0,110	0,09
15	OH	(CH ₂) ₇ CH ₃	1,200	0,01
16	OH	CH ₂ -(4-CH ₃)-C ₆ H ₄	0,110	0,09
17	OCH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	1,500	0,01
18	OCH ₃	CH ₂ -(4-CH ₃)-C ₆ H ₄	1,100	0,01

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

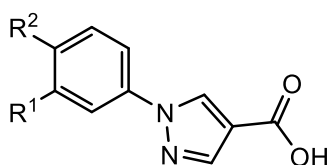
Pozitivna kontrola febuksostat (IC₅₀ = 0,01 μM)

^bRIP = relativni inhibicioni potencijal, RIP_f = IC₅₀ febuksostat / IC₅₀ jedinjenje

2.4.1.2. Derivati pirazola

Ishibuchi i saradnici (2001) su pokazali da je uvođenje velikih grupa, izobutoksi i neopentiloksi grupe, u položaj 4 1-fenilpirazol derivata značajno za efikasnu inhibiciju ksantin-oksidade *in vitro*. Povećanjem veličine 4-supstituenta do butoksi i oktiloksi grupa, smanjuje se efikasnost inhibicije. Od elektrofilnih supstituenata u položaju 3 fenolnog prstena, cijano grupa se pokazala kao najefikasnija. Slobodna karboksilna grupa u položaju 4 pirazola se pokazala esencijalnom za inhibiciju ksantin-oksidade. Svi ispitivani derivati pirazola (jedinjenja **19-24**, tabela 3) su bolji inhibitori ksantin-oksidade od alopurinola, a jedinjenja **19** i **20** su se pokazala kao najefikasnija (tabela 3) (Ishibuchi i saradnici, 2001).

Tabela 3. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima pirazola **19-24** (Ishibuchi i saradnici, 2001)



Opšta struktura jedinjenja 19-24

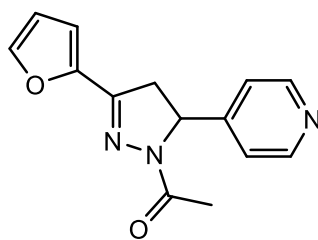
Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
19	CN	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,0071	36,62
20	CN	OCH ₂ C(CH ₃) ₃	0,0058	44,83
21	CN	O(CH ₂) ₃ CH ₃	0,0150	17,33
22	CN	O(CH ₂) ₇ CH ₃	0,0210	12,38
23	NO ₂	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,0330	7,88
24	Br	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,0430	6,05

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 0,26 μM)

^bRIP = relativni inhibicioni potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

Nepali i saradnici (2011b) su dizajnirali i sintetisali analoge 1-acetil-3,5-diaril-4,5-dihidro(1*H*)pirazola, od kojih se jedinjenje **25** (slika 6, IC₅₀ = 5,30 μM) pokazalo kao najefikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidade, efikasniji od alopurinola (IC₅₀ = 8,30 μM) (Nepali i saradnici, 2011b).



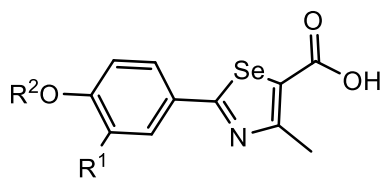
25

Slika 6. Strukturna formula jedinjenja **25**, pirazolskog inhibitora ksantin-oksidade (Nepali i saradnici, 2011b).

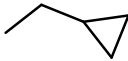
2.4.1.3. Derivati 1,3-selenazola

Selen predstavlja antioksidans multiplih funkcija. Guan i saradnici (2014) su pretpostavili da izosterna zamena sumpora febuksostata selenom ne utiče na efikasnost vezivanja struktura za ksantin-oksidadu. Sintetisani su derivati 2-fenil-4-metil-1,3-selenazol-5-karboksilne kiseline (jedinjenja **26-44**, tabela 4) i ispitan je njihov uticaj na aktivnost ksantin-oksidade *in vitro*. Jedinjenje **41** sa cijano grupom u položaju 3 i aliloksi grupom u položaju 4 fenolne strukture se pokazalo kao najefikasniji inhibitor ksantin-oksidade, efikasniji od febuksostata (tabela 4). Slobodna karboksilna grupa u položaju 5 selenazola se pokazala esencijalnom za inhibiciju ksantin-oksidade. Uočena je sličnost u mehanizmu vezivanja jedinjenja **41** i febuksostata za aktivni centar ksantin-oksidade. Jedinjenje **41** ostvaruje hidrofobne interakcije sa ksantin-oksidadom preko benzonitril grupe. Aliloksi grupa u položaju 4 fenolnog prstena povećava inhibitorni potencijal, pretpostavlja se posredstvom π interakcija alil ostatka sa Phe649. U slučaju zamene cijano grupe nitro grupom, dobijaju se jedinjenja koja su manje efikasni inhibitori ksantin-oksidade. Povećanjem veličine supstituenta u položaju 4, od metoksi do *n*-butoksi grupe, dobijaju se efikasniji inhibitori. Strukture supstituisanih alkoksi grupa su pokazale efikasniju inhibiciju ksantin-oksidade u odnosu na odgovarajuće linearne analoge. Uvođenje zasićenog prstena je rezultiralo nastankom izuzetno efikasnog inhibitora ksantin-oksidade (jedinjenje **43**) (Guan i saradnici, 2014).

Tabela 4. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima 1,3-selenazola **26-44** (Guan i saradnici, 2014)



Opšta struktura jedinjenja 26-44

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _f ^b
26	NO ₂	CH ₂ CH ₃	0,0825	0,23
27	NO ₂	(CH ₂) ₃ CH ₃	0,0492	0,38
28	NO ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,0337	0,55
29	NO ₂	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	0,0656	0,28
30	NO ₂	CH ₂ CH=CH ₂	0,0161	1,16
31	NO ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	0,0403	0,46
32	CN	CH ₃	0,0306	0,61
33	CN	CH ₂ CH ₃	0,0248	0,75
34	CN	(CH ₂) ₂ CH ₃	0,0162	1,15
35	CN	(CH ₂) ₃ CH ₃	0,0132	1,41
36	CN	(CH ₂) ₄ CH ₃	0,0456	0,41
37	CN	CH(CH ₃) ₂	0,0157	1,18
38	CN	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,0091	2,04
39	CN	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	0,0104	1,79
40	CN	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	0,0292	0,64
41	CN	CH ₂ CH=CH ₂	0,0055	3,38
42	CN	CH ₂ C≡CH	0,0538	0,35
43	CN		0,0133	1,40
44	CN	CH ₂ C ₆ H ₅	0,0354	0,53

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

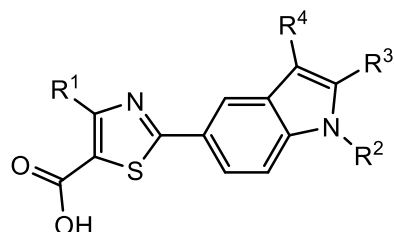
Pozitivna kontrola febuksostat (IC₅₀ = 0,0186 μM)

^bRIP = relativni inhibitorni potencijal, RIP_f = IC₅₀ febuksostat/IC₅₀ jedinjenje

2.4.1.4. Derivati 1,3-tiazola

Song i saradnici (2015) su sintetisali seriju trisupstituisanih derivata 2-(indol-5-il)-tiazola (jedinjenja **45-64**, tabela 5) i ispitali njihov uticaj na aktivnost ksantin-oksidade, uz poređenje sa febuksostatom kao standardnim inhibitorom. Hidrofobne i elektron akceptorne grupe u položaju 1 i 3 indola, respektivno, i hidrofobni supstituenti u položaju 4 tiazola su značajni za inhibiciju ksantin-oksidade. Interakcije derivata 2-(indol-5-il)-tiazola i ksantin-oksidade ostvaruju se vodoničnim vezama karboksilne grupe inhibitora sa Arg880 i Thr1010, i cijano grupe inhibitora sa Asn768. Tiazol ostvaruje interakciju sa Glu802 i π - π interakciju sa Phe914 i Phe1009. Strukture sa hidrofobnim supstituentom u položaju 1, bez supstituenta u položaju 2 indola, su pokazale visoku bioraspodivost i *in vivo* efikasnost. Jedinjenje **58** se pokazalo kao najefikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidade (tabela 5) (Song i saradnici, 2015).

Tabela 5. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima 1,3-tiazola **45-64** (Song i saradnici, 2015)



Opšta struktura jedinjenja 45-64

Jedinjenje	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _f ^b
45	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	H	0,1100	0,04
46	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	Cl	0,0057	0,75
47	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	H	Cl	0,0073	0,59
48	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	Cl	0,0160	0,27
49	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	H	NO ₂	0,0042	1,02
50	CH ₃	(CH ₂) ₂ OCH ₃	H	NO ₂	0,0120	0,36
51	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	CN	0,0055	0,78
52	H	CH(CH ₃) ₂	H	CN	0,0044	0,98
53	CF ₃	CH(CH ₃) ₂	H	CN	0,8950	0,01

54	OCH ₃	CH(CH ₃) ₂	H	CN	0,0900	0,05
55	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	H	CN	0,0035	1,23
56	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CN	0,0107	0,40
57	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ F	H	CN	0,0049	0,88
58	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ OH	H	CN	0,0030	1,43
59	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃	H	CN	0,0090	0,48
60	CH ₃	(CH ₂) ₂ SO ₂ CH ₃	H	CN	0,0123	0,35
61	CH ₃	(CH ₂) ₂ NHCOCH ₃	H	CN	0,0056	0,77
62	CH ₃	(CH ₂) ₂ NHSO ₂ CH ₃	H	CN	0,0060	0,72
63	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	H	CN	0,0039	1,10
64	CH ₃	CH ₂ -(2,4-di-F)-C ₆ H ₃	H	CN	0,0086	0,50

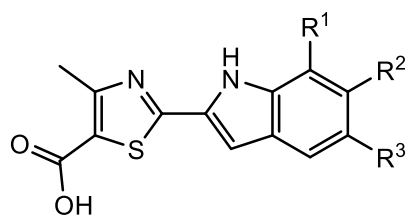
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola febeksostat (IC₅₀ = 0,0043 ± 0,0012 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, $RIP_f = IC_{50} \text{ febeksostat} / IC_{50} \text{ jedinjenje}$

Odnos struktura-aktivnost novih derivata 2-(indol-2-il)-tiazola (jedinjenja **65-82**, tabela 6) pokazuje da hidrofobne alkoksi grupe u položaju 5 i akceptori vodonične veze u položaju 7 indola predstavljaju esencijalne funkcionalne grupe za inhibiciju ksantin-oksidade. Značajne interakcije ostvaruje karboksilna grupa derivata 2-(indol-2-il)-tiazola sa ostacima Arg880 i Thr1010. Bromo, nitro i cijano grupe mogu formirati vodoničnu vezu sa Asn768, čime se objašnjavaju niske IC₅₀ vrednosti za jedinjenja **71-73** (tabela 6). Jedinjenja **75-78** ostvaruju interakcije sa ksantin-oksidadom, slične interakcijama febeksostata sa navedenim enzimom (Song i saradnici, 2016).

Tabela 6. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima 1,3-tiazola **65-82** (Song i saradnici, 2016)



Opšta struktura jedinjenja 65-82

Jedinjenje	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _f ^b
65	H	H	OCH ₃	0,7920	0,01
66	H	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	0,4810	0,01
67	H	H	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,2090	0,02
68	H	H	OC ₆ H ₅	0,2330	0,02
69	H	H	OCH ₂ C ₆ H ₅	0,5220	0,01
70	Cl	H	OC ₆ H ₅	0,0143	0,30
71	Br	H	OC ₆ H ₅	0,0170	0,25
72	NO ₂	H	OC ₆ H ₅	0,0159	0,27
73	CN	H	OC ₆ H ₅	0,0089	0,48
74	NO ₂	H	OCH ₃	0,0159	0,27
75	NO ₂	H	CH ₂ NHSO ₂ CH ₃	0,0036	1,19
76	NO ₂	H	OCH(CH ₃) ₂	0,0051	0,84
77	CN	H	OCH(CH ₃) ₂	0,0061	0,71
78	CN	H		0,0057	0,75
79	CN	H	NH ₂	0,0318	0,14
80	CN	H		0,0094	0,46
81	CN	H	NHCH ₂ C ₆ H ₅	0,0093	0,46
82	CN	H		0,0069	0,62

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

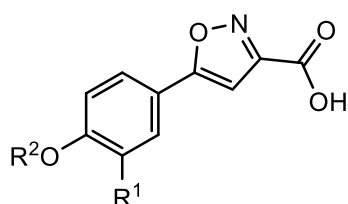
Pozitivna kontrola febeksostat (IC₅₀ = 0,0043 ± 0,0012 μM)

^bRIP = relativni inhibitorni potencijal, RIP_f = IC₅₀ febeksostat/IC₅₀ jedinjenje

2.4.1.5. Derivati izoksazola

Wang i saradnici (2010) su sintetisali brojne derivate 5-fenilizoksazol-3-karboksilne kiseline i ispitali njihov uticaj na aktivnost ksantin-oksidade, uz poređenje sa febuksostatom. Prisustvo cijano grupe u položaju 3 fenolnog prstena rezultiralo je efikasnijom inhibicijom komercijalnog enzima u poređenju sa strukturom sa 3-nitro grupom (tabela 7). Jedinjenje **86** sa izobutil supstuentom se pokazalo kao efikasan inhibitor ksantin-oksidade, što pokazuje da je kombinacija cijano i izobutil supstuentata značajna za inhibiciju ksantin-oksidade derivatima 5-fenilizoksazol-3-karboksilne kiseline. Mehanizam vezivanja jedinjenja **86** za enzim je sličan febuksostatu, ali je febuksostat efikasniji inhibitor. Pretpostavlja se da vodonične veze bivaju obrazovane između kiseonika izoksazola i karboksilne grupe Glu802. Izoksazol biva vezan između Phe914 i Phe1009, a benzonitril grupa između Leu873 i Leu1014. Hidrofobna 4-izobutoksi grupa biva pozicionirana na ulazu aktivnog centra enzima, sa hidrofobnim interakcijama sličnim kao kod febuksostata (Wang i saradnici, 2010).

Tabela 7. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima izoksazola **83-89** (Wang i saradnici, 2010)



Opšta struktura jedinjenja 83-89

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _f ^b
83	NO ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	1,00	0,003
84	NO ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	0,97	0,003
85	NO ₂	(4-Cl)-C ₆ H ₄	2,83	0,001
86	CN	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,36	0,008
87	CN	CH ₂ C ₆ H ₅	0,59	0,005
88	CN	(4-Cl)-C ₆ H ₄	0,63	0,005
89	CN	(4-C(CH ₃) ₃)-C ₆ H ₄	1,01	0,003

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola febuksostat (IC₅₀ = 0,003 μM)

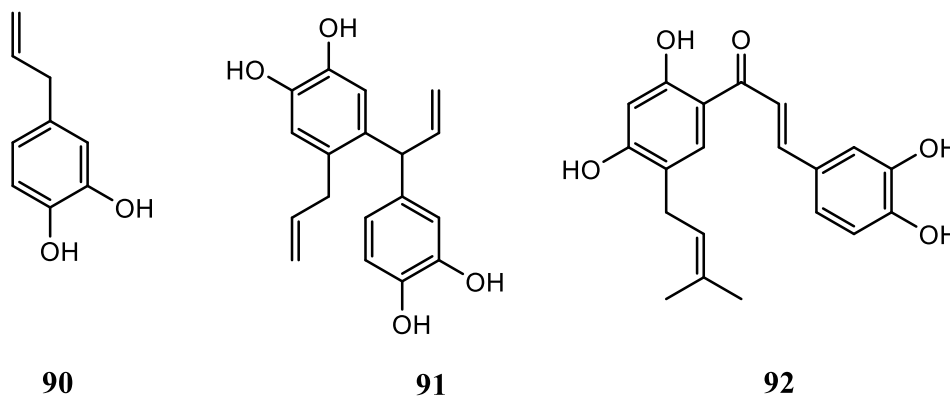
^bRIP = relativni inhibicioni potencijal, RIP_f = IC₅₀ febuksostat/IC₅₀ jedinjenje

2.4.2. Inhibitori ksantin-oksidade sa šestočlanim prstenom

2.4.2.1. Derivati benzena

Hidroksihavikol (jedinjenje **90**, slika 7, $IC_{50} = 16,70 \mu\text{M}$), izolovan iz ekstrakta lista *Piper betle*, je efikasniji inhibitor ksantin-oksidade od alopurinola ($IC_{50} = 30,70 \mu\text{M}$). Zaključeno je da je prisustvo dve hidroksilne grupe značajno za inhibiciju ksantin-oksidade (Murata i saradnici, 2009). Iz metanolnog ekstrakta *Piper nudibaccatum* su izolovani analozi hidroksihavikola i ispitan je njihov uticaj na aktivnost ksantin-oksidade. Jedinjenje **91** (slika 7, $IC_{50} = 0,28 \pm 0,09 \mu\text{M}$) je znatno efikasniji inhibitor ksantin-oksidade od alopurinola ($IC_{50} = 7,06 \pm 1,53 \mu\text{M}$) (Liu i saradnici, 2015).

Ispitan je i uticaj fenolnih jedinjenja izolovanih iz etanolnog ekstrakta korena *Broussonetia papyrifera* na aktivnost komercijalne ksantin-oksidade. Jedinjenje **92** (slika 7, $IC_{50} = 0,60 \pm 0,04 \mu\text{M}$) je efikasniji inhibitor ksantin-oksidade od alopurinola ($IC_{50} = 2,00 \pm 0,30 \mu\text{M}$). Derivati halkona su se generalno pokazali kao efikasniji inhibitori u odnosu na flavane (Ryu i saradnici, 2012).

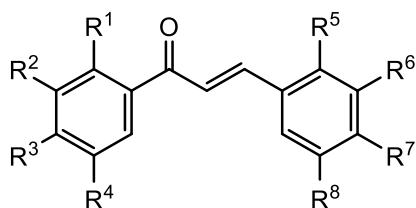


Slika 7. Strukturne formule jedinjenja **90-92**, benzenskih inhibitora ksantin-oksidade (Murata i saradnici, 2009; Liu i saradnici, 2015; Ryu i saradnici, 2012).

Halkoni **93**, **94**, **96-100** i **102** su efikasni inhibitori ksantin-oksidade, dok su **95** i **101** manje efikasni (tabela 8). Analizom hemijske strukture aktivnih halkona je utvrđeno da je potrebno prisustvo bar tri hidroksilne grupe za ostvarivanje efikasne inhibicije ksantin-oksidade. Dve hidroksilne grupe hidroksilovanih halkona formiraju vodonične veze sa karboksilnim grupama Glu802 i Glu1261, a karbonilni kiseonik halkona sa hidroksilnom

grupom Ser876. Jedinjenje **102**, derivat halkona sa šest hidroksilnih grupa, uspostavlja vodonične veze sa Thr1010 i Arg880 ostacima. Hidrofobne interakcije, takođe, učestvuju u vezivanju ispitivanih jedinjenja sa ksantin-oksidadom. Aminokiselinski ostaci enzima Phe941, Phe1009, Phe1013, Leu648, Leu873, Val1011, Ala910, Ala1078, Ala1079 i Pro1076 mogu učestvovati u pomenutim hidrofobnim interakcijama (Hofmann i saradnici, 2016).

Tabela 8. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima benzena **93-102** (Hofmann i saradnici, 2016)



Opšta struktura jedinjenja 93-102

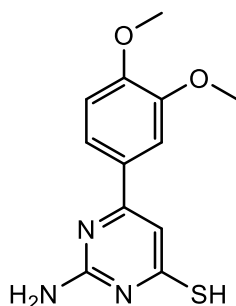
Jedinjenje	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	IC ₅₀ [μM] ^a
93	H	OH	H	H	H	OH	OH	H	5,3 ± 1,0
94	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	4,3 ± 1,0
95	OH	H	H	OH	H	OH	OH	H	17,0 ± 8,0
96	H	OH	OH	H	H	OH	OH	H	3,0 ± 0,6
97	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	6,5 ± 2,0
98	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	1,3 ± 0,4
99	H	OH	OH	H	OH	H	H	OH	8,6 ± 2,0
100	OH	OH	OH	H	H	OH	OH	H	1,2 ± 0,2
101	H	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	18,0 ± 3,0
102	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	5,5 ± 0,9

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

RIP = relativni inhibitorni potencijal, $RIP_a = IC_{50} \text{ alopurinol} / IC_{50} \text{ jedinjenje}$ nije računat zbog literaturnog podatka za IC₅₀ vrednost alopurinola u opsegu 0,20-50,00 μM

2.4.2.2. Derivati pirimidina

Derivati izocitozina uspostavljaju H- i π - interakcije sa ksantin-oksidadom. Jedinjenje **103** (slika 8, $IC_{50} = 1,40 \pm 0,70 \mu M$) je efikasniji inhibitor od alopurinola ($5,70 \pm 0,04 \mu M$). Međutim, zbog ustanovljene toksičnosti ovo jedinjenje nije predmet daljih ispitivanja (Chandrika i saradnici, 2012).

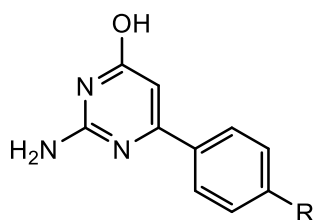


103

Slika 8. Strukturna formula jedinjenja **103**, pirimidinskog inhibitora ksantin-oksidade (Chandrika i saradnici, 2012).

Khanna i saradnici (2012) su ispitali uticaj derivata izocitozina (jedinjenja **104-109**, tabela 9) na aktivnost ksantin-oksidade. Jedinjenje **108** je efikasan inhibitor ksantin-oksidade, efikasniji od alopurinola, ali neznatno manje efikasan od feboksostata (tabela 9).

Tabela 9. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima pirimidina **104-109** (Khanna i saradnici, 2012)



Opšta struktura jedinjenja 104-109

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _f ^b RIP _a ^b
104	S(CH ₂) ₃ CH ₃	1,63 ± 0,08	0,02 2,57
105	SCH(CH ₃) ₂	2,44 ± 0,20	0,01 1,72
106	O(CH ₂) ₃ CH ₃	2,10 ± 0,19	0,01 2,00
107	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,60 ± 0,07	0,05 6,98
108	C ₆ H ₅	0,31 ± 0,08	0,10 13,52
109	OC ₆ H ₅	2,47 ± 1,43	0,01 1,70

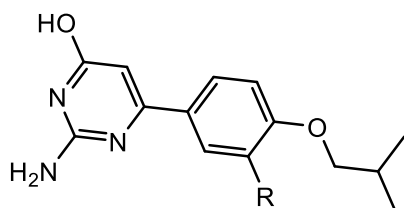
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola febeksostat (IC₅₀ = 0,03 μM) i alopurinol (IC₅₀ = 4,19 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_f = IC₅₀ febeksostat/IC₅₀ jedinjenje, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

Jedinjenje **113** je efikasniji inhibitor od febeksostata i alopurinola (tabela 10). Hidroksilna grupa pirimidina obrazuje vodoničnu vezu sa Arg880, Thr1010 i Glu802 (Khanna i saradnici, 2012).

Tabela 10. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima pirimidina **110-113** (Khanna i saradnici, 2012)



Opšta struktura jedinjenja 110-113

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _f ^b RIP _a ^b
110	CONH ₂	1,92 ± 0,70	0,02 3,01
111	OCH ₃	0,95 ± 0,65	0,03 6,07
112	NO ₂	0,14 ± 0,03	0,21 41,21
113	CN	0,02 ± 0,00	1,50 288,50

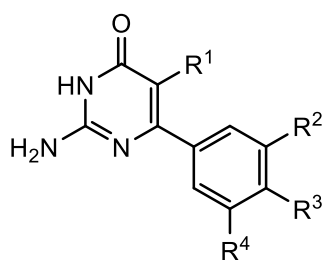
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola febeksostat (IC₅₀ = 0,03 μM) i alopurinol (IC₅₀ = 5,77 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_f = IC₅₀ febeksostat/IC₅₀ jedinjenje, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

Optimizacija strukture 4-arilpirimidona je rezultovala dobijanjem efikasnih inhibitora ksantin-oksidade. N3 atom i karbonilna grupa pirimidona (jedinjenja **114-128**, tabela 11), predstavljaju analog karboksilne grupe febeksostata za interakcije sa Arg880 i The1010 ostacima ksantin-oksidade. Jedinjenja **118**, **122** i **128** su efikasniji inhibitori ksantin-oksidade od febeksostata (tabela 11) (Evenäs i saradnici, 2014).

Tabela 11. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima pirimidina **114-128** (Evenās i saradnici, 2014)



Opšta struktura jedinjenja 114-128

Jedinjenje	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _f ^b
114	H	H	OCH ₂ C(CH ₃) ₃	H	0,1990	0,01
115	H	OCF ₃	H	H	0,1990	0,01
116	H	CN	H	CH ₃	0,1000	0,01
117	H	CN	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	0,0250	0,05
118	CN	CN	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	0,0005	2,60
119	CN	CN		H	0,0013	1,00
120	CN	CF ₃	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	0,0013	1,00
121	CN	OCF ₃	OCH ₂ C(CH ₃) ₃	H	0,0190	0,07
122	CN	OCF ₃		H	0,0006	2,17
123	Cl	CN	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	0,0016	0,81
124	Cl	CN	O(CH ₂) ₄ OH	H	0,0040	0,33
125	Cl	CN		H	0,0016	0,81
126	Cl	CN		CH ₃	0,0063	0,21
127	Cl	CF ₃		H	0,0063	0,21
128	Cl	OCF ₃		H	0,0010	1,30

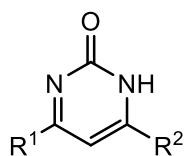
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola febuksostat ($IC_{50} = 0,0013 \mu M$)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, $RIP_f = IC_{50} \text{ febuksostat} / IC_{50} \text{ jedinjenje}$

Shukla i saradnici (2014) su sintetisali seriju derivata 4,6-diaril/heteroarilpirimidona i ispitali njihov uticaj na aktivnost komercijalne ksantin-oksidade. Pirimidoni sa heteroaril prstenom u položaju 4 i 6 su se pokazali kao najefikasniji inhibitori komercijalnog enzima (tabela 12). Tiofen učestvuje u građenju vodoničnih veza sa Glu802 i π - π interakcijama sa Phe914, što povećava stabilnost na mestu vezivanja. Vodonične veze se uspostavljaju između karbonilne grupe pirimidona i hidroksilne grupe Ser876, azota piridina i amino grupe Asn768 (Shukla i saradnici, 2014).

Tabela 12. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima pirimidina **129-133** (Shukla i saradnici, 2014)



Opšta struktura jedinjenja **129-133**

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μ M] ^a	RIP _a ^b
129	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	10,21	1,20
130	(4-Cl)-C ₆ H ₄	(4-Cl)-C ₆ H ₄	12,00	1,02
131			11,23	1,09
132			7,23	1,69
133			6,45	1,90

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

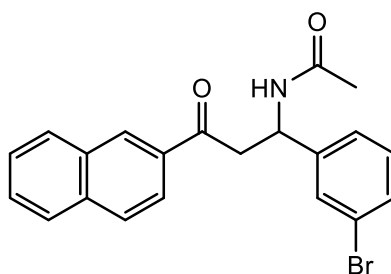
Pozitivna kontrola alopurinol ($IC_{50} = 12,24 \mu M$)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, $RIP_a = IC_{50} \text{ alopurinol} / IC_{50} \text{ jedinjenje}$

2.4.3. Inhibitori ksantin-oksidade biciklične strukture

2.4.3.1. Derivati naftalena

N-(1,3-Diaril-3-oksopropil)amidi predstavljaju intermedijere u sintezi biološki značajnih jedinjenja. Od ovih amida, jedinjenje **134** (slika 9) se pokazalo kao najefikasniji inhibitor ksantin-oksidade ($IC_{50} = 2,45 \mu M$), efikasniji od alopurinola ($IC_{50} = 8,30 \mu M$). Ovo jedinjenje, pored efikasne *in vitro* inhibicije, pokazuje i *in vivo* hipourikemični efekat pored sa alopurinolom. Mehanizam vezivanja jedinjenja **134** za enzim je sličan mehanizmu vezivanja febuksostata i salicilne kiseline (Nepali i saradnici, 2011a).



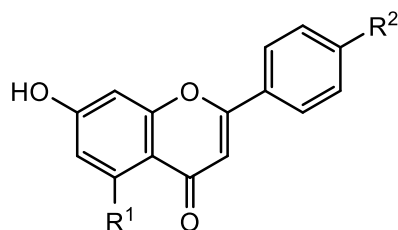
134

Slika 9. Strukturna formula jedinjenja **134**, naftalenskog inhibitora ksantin-oksidade (Nepali i saradnici, 2011a).

2.4.3.2. Derivati benzopirana

Flavanoni, dihidroflavonoli i flavanoli nisu inhibitori ksantin-oksidade usled odsustva dvostruke veze između C2 i C3 atoma. Flavoni i flavonoli inhibiraju ksantin-oxidazu. Neki od srakturnih zahteva za inhibiciju ksantin-oksidade su: prisustvo C5 i C7 hidroksilne grupe, dvostruka veza između C2 i C3 atoma, planarna struktura. Prisustvo C6 hidroksilne grupe smanjuje inhibitorski potencijal. Flavonoli pokazuju veću efikasnost inhibicije ksantin-oksidade od flavona (Borges i saradnici, 2002). Flavoni **135-138** su efikasniji inhibitori ksantin-oksidade od kvercetina (tabela 13) (Costantino i saradnici, 1996).

Tabela 13. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima benzopirana **135-138** (Costantino i saradnici, 1996)



Opšta struktura jedinjenja 135-138

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _k ^b
135	H	C ₆ H ₅	0,3470	1,10
136	OH	C ₆ H ₅	0,0136	28,16
137	OH	C(CH ₃) ₃	0,0908	4,22
138	OH	OCH ₃	0,2200	1,74

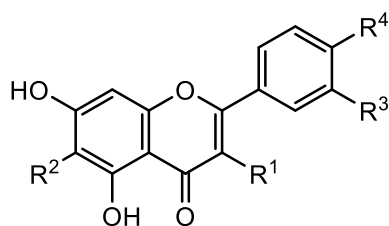
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola kvercetin (IC₅₀ = 0,383 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_k = IC₅₀ kvercetin/IC₅₀ jedinjenje

Aglikoni flavonoida, luteolin (**139**), kvercetin (**140**) i baikalein (**141**), su efikasniji inhibitori ksantin-oksidade od alopurinola (tabela 14) (Li i saradnici, 2014).

Tabela 14. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima benzopirana **139-141** (Li i saradnici, 2014)



Opšta struktura jedinjenja 139-141

Jedinjenje	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
139	H	H	OH	OH	10,20	25,32
140	OH	H	OH	OH	31,90	8,10
141	H	OH	H	H	71,50	3,61

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

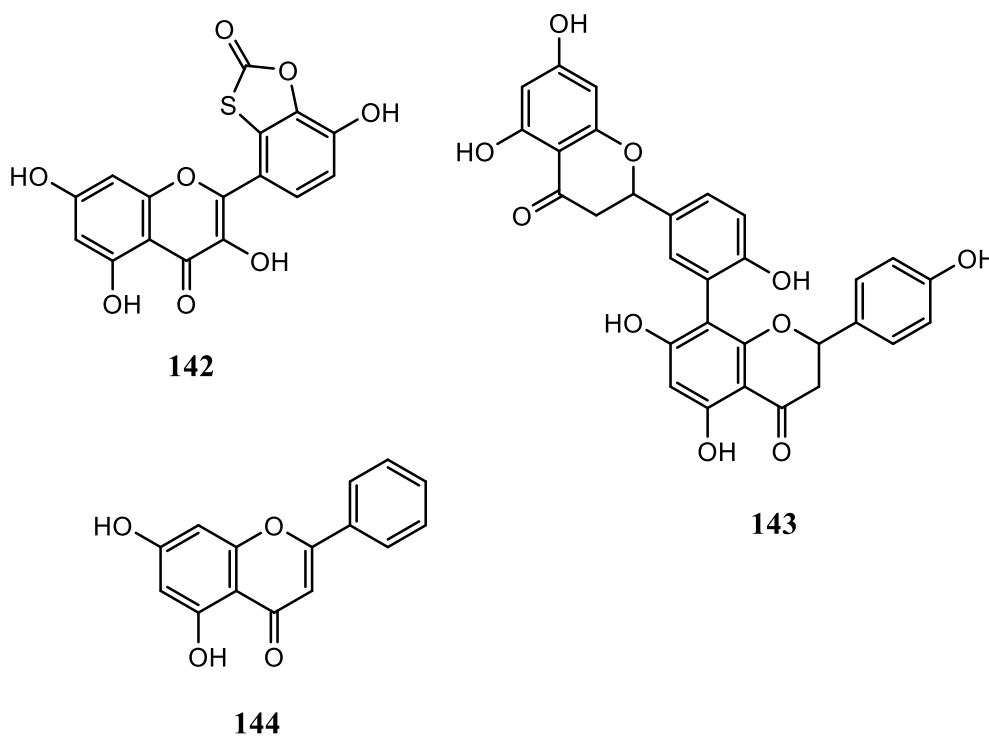
Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 258,30 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

Strukturna sličnost benzoksatiolanona ksantinu, alopurinolu i oksipurinolu navela je na pretpostavku da oksatiolanonski derivati kvercetina mogu inhibirati ksantin-oksidadu efikasnije od kvercetina. Hidrofobniji kvercetin-oksatiolanon (jedinjenje **142**, slika 10) se bolje apsorbuje od kvercetina preko bioloških membrana *in vivo*. Jedinjenje **142** ($IC_{50} = 0,05 \mu M$) je efikasniji inhibitor ksantin-oksidade od kvercetina ($IC_{50} = 0,40 \mu M$). Unos hrane bogate prekursorima kvercetin-oksatiolanona, kao što je rutin, može biti od značaja u tretmanu hiperurikemije (Takahama i saradnici, 2011).

Seme biljne vrste *Semecarpus anacardium* L. se koristi u tradicionalnoj medicini Indije u tretmanu inflamatornih bolesti i gihta. U etil-acetatnom ekstraktu je identifikovan biflavonoid tetrahydroamentoflavon (jedinjenje **143**, slika 10) odgovoran za efikasnu inhibiciju ksantin-oksidade. Jedinjenje **143** i alopurinol su inhibirali enzim sa IC_{50} vrednostima 0,092 i 0,100 μM , respektivno. Jedinjenje **143** poseduje šest hidroksilnih grupa i nekompetitivan je inhibitor ksantin-oksidade. Velika molekulska masa, veći broj hidroksilnih grupa i odsustvo planarnosti predstavljaju razlike ovog jedinjenja od drugih flavonoida, što može biti uzrok nekompetitivnog tipa inhibicije (Arimboor i saradnici, 2011).

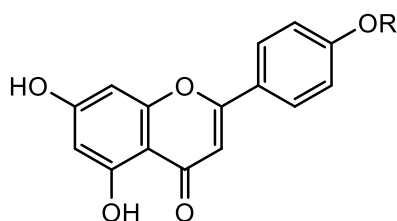
Flavonoid hrizin (**144**, slika 10, $IC_{50} = 1,26 \pm 0,04 \mu M$) je efikasniji inhibitor ksantin-oksidade od alopurinola ($IC_{50} = 2,93 \pm 0,02 \mu M$) (Lin i saradnici, 2015b).



Slika 10. Strukturne formule jedinjenja **142-144**, benzopiranskih inhibitora ksantin-oksidade (Takahama i saradnici, 2011; Arimboor i saradnici, 2011; Lin i saradnici, 2015b).

Su i saradnici (2015) su sintetisali derivate apigenina, uvođenjem karboksil-alkil supstituenata. Jedinjenja **145-150** (tabela 15) su znatno efikasniji inhibitori komercijalne ksantin-oksidade od alopurinola. Jedinjenje **149**, koje se pokazalo kao najefikasniji inhibitor *in vitro* (tabela 15), pokazalo je i hipourikemičan efekat *in vivo* (Su i saradnici, 2015).

Tabela 15. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima benzopirana **145-150** (Su i saradnici, 2015)



Opšta struktura jedinjenja 145-150

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
145	CH ₂ COOH	0,820	3,54
146	(CH ₂) ₃ COOH	0,600	4,83
147	(CH ₂) ₄ COOH	0,220	13,18
148	(CH ₂) ₅ COOH	0,320	9,06
149	(CH ₂) ₆ COOH	0,098	29,59
150	(CH ₂) ₇ COOH	0,250	11,60

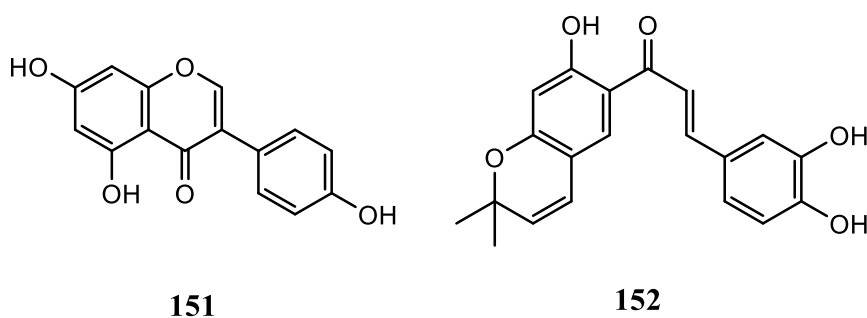
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 2,90 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

Izoflavonoid semena soje, genistein (4',5,7-trihidroksiizoflavon, jedinjenje **151**, slika 11) pokazuje brojne biološke aktivnosti. Ovo jedinjenje je pokazalo efikasniju inhibiciju ksantin-oksidade (IC₅₀ = 1,73 ± 0,04 μM) od alopurinola (IC₅₀ = 3,53 ± 0,08 μM). Genistein stupa u interakcije sa Leu648, Phe649, Glu802, Ser876, Glu879, Arg880, Phe914, Phe1009, Thr1010 i Phe1013 u aktivnom centru enzima i vezuje se na vezivnom mestu supstrata. Uočene su dve hidrofobne veze, sa Ser876 i Asn768. Prsten benzena genisteina formira π-π interakcije sa Phe1009 i Phe1013 (Lin i saradnici, 2015a).

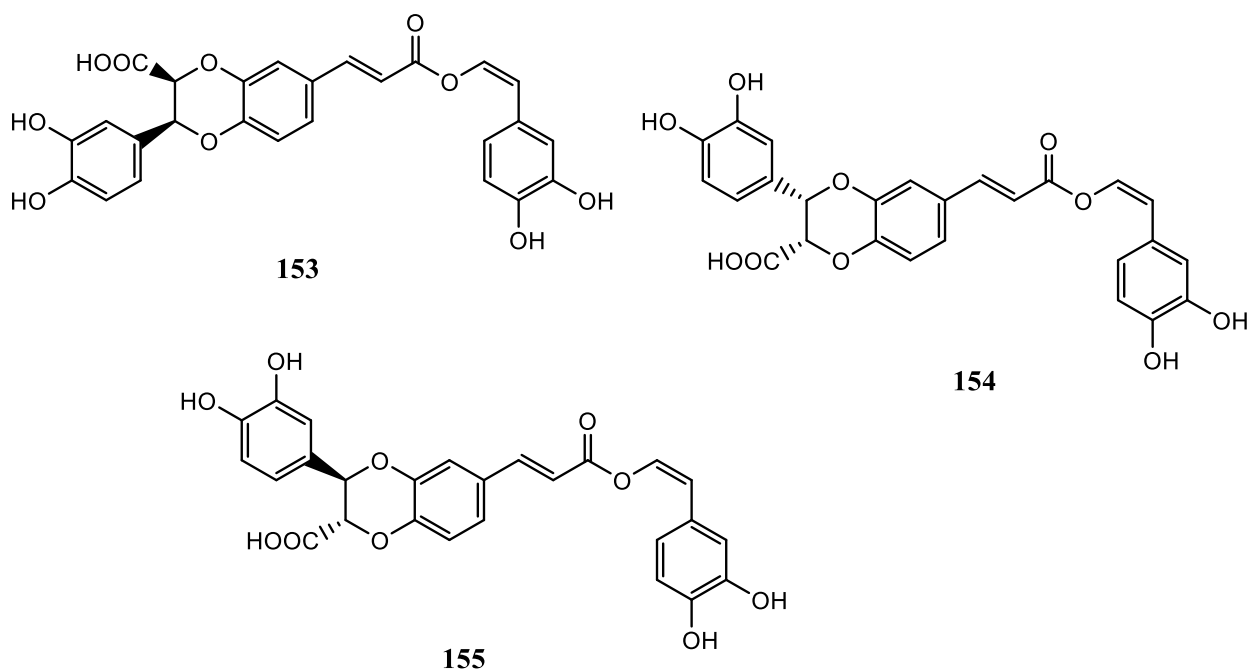
Benzopiranski derivat (jedinjenje **152**, slika 11) izolovan iz etanolnog ekstrakta korena *Broussonetia papyrifera*, je efikasniji inhibitor ksantin-oksidade (IC₅₀ = 1,80 ± 0,10 μM) od alopurinola (IC₅₀ = 2,00 ± 0,30 μM) (Ryu i saradnici, 2012).



Slika 11. Strukturne formule jedinjenja **151** i **152**, benzopiranskih inhibitora ksantin-oksidade (Lin i saradnici, 2015a; Ryu i saradnici, 2012).

2.4.3.3. Derivati benzodioksana

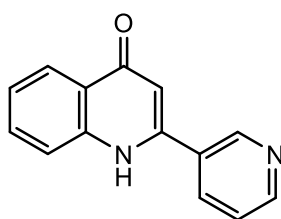
Rezultat studije Tsai i saradnika (2014) je opravdao primenu biljne vrste *Hyptis rhomboids* u tretmanu gihta. Benzodioksanski derivat (**153**, slika 12, $IC_{50} = 0,60 \pm 0,30 \mu M$) se pokazao kao najefikasniji inhibitor ksantin-oksidade, potentniji od alopurinola ($IC_{50} = 5,30 \pm 0,60 \mu M$). Jedinjenja **154** (slika 12, $IC_{50} = 5,20 \pm 0,50 \mu M$) i **155** (slika 12, $IC_{50} = 2,00 \pm 0,10 \mu M$) su manje efikasni inhibitori ksantin-oksidade od jedinjenja **153** (Tsai i saradnici, 2014).



Slika 12. Strukturne formule jedinjenja **153-155**, benzodioksanskih inhibitora ksantin-oksidade (Tsai i saradnici, 2014).

2.4.3.4. Derivati hinolina

U pokušaju razvoja novih nepurinskih inhibitora ksantin-oksidge Dhiman i saradnici (2013) su kao osnovu koristili strukturu flavona. Dizajnirali su i sintetisali seriju 2-aril/heteroaril-4-hinolona (aza analozi flavona) i ispitali njihov uticaj na aktivnost ksantin-oksidge *in vitro*. Uočen je uticaj 2-aril supstituenta na efikasnost inhibicije ksantin-oksidge. Jedinjenje **156** (slika 13) koje sadrži piridinski prsten u položaju 2 hinolona, je efikasniji inhibitor ksantin-oksidge ($IC_{50} = 6,24 \mu M$) od alopurinola ($IC_{50} = 8,31 \mu M$) (Dhiman i saradnici, 2013).



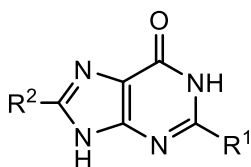
156

Slika 13. Strukturna formula jedinjenja **156**, hinolinskog inhibitora ksantin-oksidge (Dhiman i saradnici, 2013).

2.4.3.5. Derivati purina

Monosupstituisani derivati 2-(tioalkil)-purina (jedinjenja **157-164**) su efikasniji inhibitori komercijalne ksantin-oksidge od alopurinola (tabela 16) (Biagi i saradnici, 1996, 2001). Jedinjenje **162** se pokazalo kao najefikasniji purinski inhibitor ksantin-oksidge.

Tabela 16. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima purina **157-164** (Biagi i saradnici, 1996, 2001)



Opšta struktura jedinjenja 157-164

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
157	S(CH ₂) ₃ CH ₃	H	3,880	1,08
158	S(CH ₂) ₄ CH ₃	H	2,850	1,47
159	S(CH ₂) ₅ CH ₃	H	0,115	36,52
160	S(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ CH ₃	H	0,670	6,27
161	S(CH ₂) ₃ OCH ₂ CH ₃	H	0,058	72,41
162	S(CH ₂) ₄ OCH ₃	H	0,028	150,00
163	H	S(CH ₂) ₅ CH ₃	0,560	7,50
164	OH	S(CH ₂) ₅ CH ₃	0,660	6,36

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

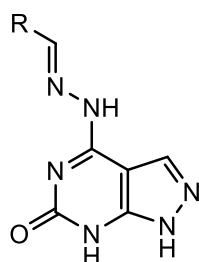
Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 4,20 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

2.4.3.6. Derivati pirazolo-pirimidina

Ali i saradnici (2010) su ispitivali odnos struktura-aktivnost derivata 4-arilmetilidenhidrazino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina (jedinjenja **165-177**) i ustanovili njihovu veću efikasnost u inhibiciji komercijalne ksantin-oksidade od alopurinola (tabela 17) (Ali i saradnici, 2010).

Tabela 17. Inhibicija ksantin-oksidaze derivatima pirazolo-pirimidina **165-177** (Ali i saradnici, 2010)



Opšta struktura jedinjenja 165-177

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
165	CH ₃	4,670	5,20
166	(CH ₂) ₈ CH=CH ₂	7,894	3,08
167	C ₆ H ₅	0,305	79,67
168	(4-F)-C ₆ H ₄	0,373	65,15
169	(2-Cl)-C ₆ H ₄	0,077	315,58
170	(3-Cl)-C ₆ H ₄	0,223	108,97
171	(4-Cl)-C ₆ H ₄	0,224	108,48
172	(4-CH ₃)-C ₆ H ₄	0,247	98,38
173	(4-OCH ₃)-C ₆ H ₄	0,172	141,28
174	3,4-OCH ₂ O-C ₆ H ₃	0,385	63,12
175	(4-COOH)-C ₆ H ₄	0,399	60,90
176	(4-OH)-C ₆ H ₄	0,359	67,69
177	(4-NO ₂)-C ₆ H ₄	1,925	12,62

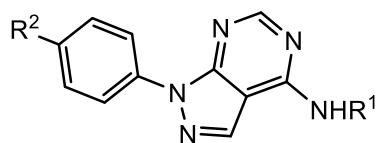
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 24,30 μM)

^bRIP = relativni inhibitorni potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

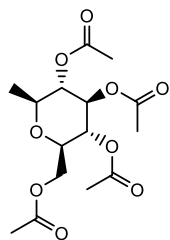
Od derivata pirazolo[3,4-d]pirimidina (jedinjenja **178-184**, tabela 18), najefikasnijim su se pokazala jedinjenja sa cijano, nitro, trifluorometil i glicil-metil estarskom grupom. Derivati *N*-aril-5-amino-4-cijanopirazola i odgovarajućih pirazolo[3,4-d]pirimidina se vezuju za enzim interakcijama sa Phe649, Phe914, Phe1009 i Phe1013. U aktivnom centru enzima ostaci Arg880, Thr1010, Glu1261, Asn768, Lys771 i Glu802 formiraju vodonične veze sa ispitivanim inhibitorima (Gupta i saradnici, 2008).

Tabela 18. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima pirazolo-pirimidina **178-184** (Gupta i saradnici, 2008)



Opšta struktura jedinjenja 178-184

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
178	H	CH ₃	17,35 ± 1,19	1,41
179	H	OCH ₃	19,58 ± 0,20	1,25
180	H	CN	0,40 ± 0,01	61,00
181	H	NO ₂	2,20 ± 0,05	11,09
182	H	CF ₃	0,18 ± 0,02	135,56
183	H	CONHCH ₂ COOCH ₃	0,08 ± 0,01	305,00
184		COOH	18,44 ± 2,59	1,32



^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

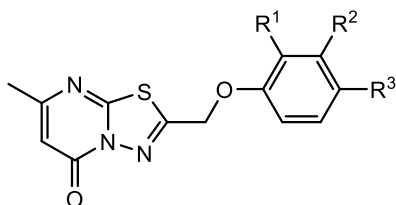
Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 24,40 ± 0,50 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

2.4.3.7. Derivati tiadiazolo-pirimidina

Sathisha i saradnici (2011) su sintetisali derivate 7-metil-2-(fenoksimetil)-5H-[1,3,4]tiadiazolo[3,2-a]pirimidin-5-ona (jedinjenja **185-191**, tabela 19) i ispitali njihov uticaj na aktivnost ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova i na komercijalnom enzimu. Ova jedinjenja su se pokazala efikasnijim inhibitorima od alopurinola (tabela 19) (Sathisha i saradnici, 2011).

Tabela 19. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima tiadiazolo-pirimidina **185-191** (Sathisha i saradnici, 2011)



Opšta struktura jedinjenja 185-191

Jedinjenje	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b	IC ₅₀ [μM] ^c	RIP _a ^d
185	H	H	H	0,555 ± 0,0231	1,36	nd	-
186	H	H	OCH ₃	0,289 ± 0,0057	2,61	0,269 ± 0,0211	2,71
187	H	H	Cl	0,449 ± 0,0103	1,68	0,461 ± 0,0401	1,58
188	H	CH ₃	Cl	0,623 ± 0,0231	1,21	0,634 ± 0,0377	1,15
189	CH ₃	H	H	0,362 ± 0,0111	2,08	0,326 ± 0,0234	2,24
190	Br	H	H	0,413 ± 0,0101	1,82	0,603 ± 0,0455	1,21
191	F	H	H	0,590 ± 0,0213	1,28	nd	-

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na enzimu homogenata jetre pacova

Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 0,753 ± 0,0331 μM na enzimu homogenata jetre pacova)

^bRIP = relativni inhibicioni potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje, na enzimu homogenata jetre pacova

^cIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 0,730 ± 0,0374 μM na komercijalnom enzimu)

^dRIP = relativni inhibicioni potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje, na komercijalnom enzimu

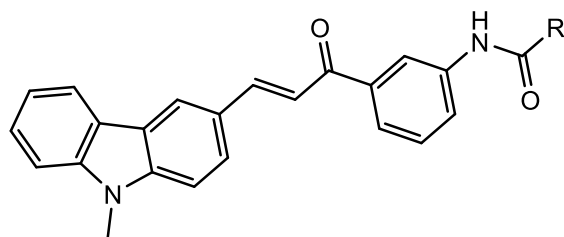
nd – nije detektovano/ispitivano

2.4.4. Inhibitori ksantin-oksidade triciklične strukture


2.4.4.1. Derivati karbazola

Bandgar i saradnici (2012) su sintetisali derivate karbazola (jedinjenja **192-198**, tabela 20) i ispitali njihov uticaj na aktivnost komercijalne ksantin-oksidade. Jedinjenja sa supstituentima u *meta* položaju su pokazala veću efikasnost od jedinjenja sa supstituentima u *para/orto* položaju. Jedinjenja **192-198** su efikasniji inhibitori ksantin-oksidade od alopurinola (Bandgar i saradnici, 2012).

Tabela 20. Inhibicija ksantin-oksidaze derivatima karbazola **192-198** (Bandgar i saradnici, 2012)



Opšta struktura jedinjenja **192-198**

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
192	(3-Cl)-C ₆ H ₄	4,40 ± 0,89	1,93
193	(4-Cl)-C ₆ H ₄	5,60 ± 1,03	1,52
194	(3-F)-C ₆ H ₄	4,50 ± 0,89	1,89
195	(4-CH ₃)-C ₆ H ₄	5,30 ± 2,13	1,60
196	(3-CF ₃)-C ₆ H ₄	5,10 ± 2,00	1,67
197	CH=CH-C ₆ H ₅	5,10 ± 1,30	1,67
198		4,30 ± 0,89	1,98

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

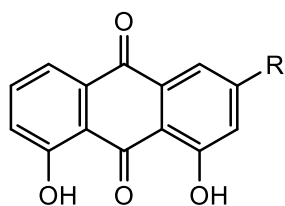
Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 8,50 ± 2,13 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

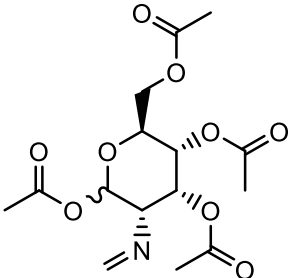
2.4.4.2. Derivati antracena

Derivati antracena (**199-201**) su efikasniji inhibitori komercijalne ksantin-oksidaze od alopurinola (tabela 21) (Shi i saradnici, 2014). Bočni nizovi ovih jedinjenja pokazuju uticaj na aktivnost. Najefikasniji inhibitor, jedinjenje **199**, interaguje vodoničnim vezama sa Glu802 (4-hidroksilna i 10-karbonilna grupa), Ser876 (9-karbonilna grupa), Arg880 i Thr1010 (formil grupa bočnog niza i 9-karbonilna grupa). Fenolna grupa inhibitora interaguje vodoničnim i elektrostatičnim vezama sa Arg880, Glu1261 i Thr1010 ostacima enzima (Shi i saradnici, 2014).

Tabela 21. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima antracena **199-201** (Shi i saradnici, 2014)



Opšta struktura jedinjenja 199-201

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
199	CHO	2,79 ± 0,64	4,03
200	=N-C ₆ H ₅	3,87 ± 0,35	2,90
201		8,43 ± 1,81	1,33

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

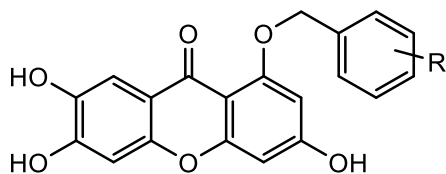
Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 11,23 ± 0,11 μM)

^bRIP = relativni inhibitorni potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

2.4.4.3. Derivati ksantona

Hu i saradnici (2011) su sintetisali novu klasu derivata ksantona i ispitali njihov uticaj na aktivnost komercijalne ksantin-oksidade. Derivati ksantona **207** i **209** su značajno efikasniji inhibitori od alopurinola (tabela 22). Ova dva jedinjenja interaguju vodoničnim vezama sa Gln1040, Ser1082, Glu1261, Gly797, Gln767 i Cys150 ostacima. Karboksilna grupa Lys1045 interaguje vodoničnim vezama sa azotom jedinjenja **209** (Hu i saradnici, 2011).

Tabela 22. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima ksantona **202-209** (Hu i saradnici, 2011)



Opšta struktura jedinjenja 202-209

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
202	-	21,73 ± 1,52	1,12
203	2-CH ₃	7,08 ± 0,65	3,45
204	3-CH ₃	13,56 ± 0,28	1,80
205	4-CH ₃	5,73 ± 0,10	4,26
206	2-Cl	6,41 ± 0,15	3,81
207	4-Cl	4,70 ± 0,12	5,19
208	4-Br	20,06 ± 1,37	1,22
209	4-CN	4,67 ± 0,35	5,23

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

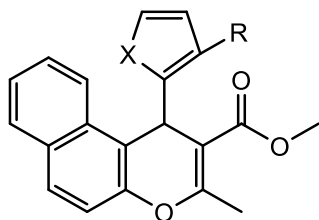
Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 24,40 ± 0,50 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

2.4.4.4. Derivati naftopirana

Od sintetisanih derivata naftopirana, jedinjenja **210-213** su se pokazala kao najefikasniji inhibitori komercijalne ksantin-oksidade (tabela 23). *Docking* studijama je pokazano prisustvo vodoničnih veza između kiseonika naftopirana jedinjenja **210** i Gln1194 ostatka enzima (Sharma i saradnici, 2014).

Tabela 23. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima naftopirana **210-213** (Sharma i saradnici, 2014)



Opšta struktura jedinjenja 210-213

Jedinjenje	X	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
210	S	H	4,00	2,78
211	S	CH ₃	7,31	1,52
212	O	H	10,00	1,11
213	NH	H	6,23	1,78

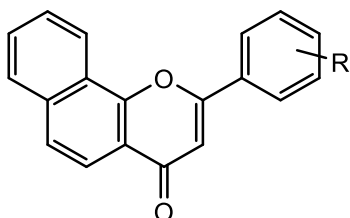
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 11,10 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

Naftoflavon **215** je značajno efikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidade od alopurinola (tabela 24). Ovo jedinjenje biva stabilizovano elektrostatičnim i hidrofobnim interakcijama na mestu vezivanja. Naftil ostatak se vezuje između Phe914 i Phe1009. Vodonične veze se obrazuju između karbonilne grupe jedinjenja **215** i hidroksilne grupe Ser876, kao i fluora jedinjenja **215** i vodonika na azotu Asn768. Uočene su i hidrofobne interakcije inhibitora sa bočnim nizom Leu648 (Singh i saradnici, 2014).

Tabela 24. Inhibicija ksantin-oksidade derivatima naftopirana **214-216** (Singh i saradnici, 2014)



Opšta struktura jedinjenja 214-216

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
214	2-F	4,94	1,76

215	4-F	0,62	14,02
216	4-NO ₂	1,95	4,46

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

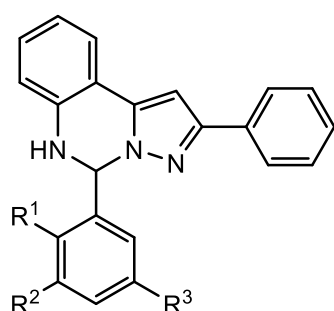
Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 8,69 μM)

^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, $RIP_a = IC_{50} \text{ alopurinol} / IC_{50} \text{ jedinjenje}$

2.4.4.5. Derivati pirazolo-hinazolina

Kumar i saradnici (2014) su dizajnirali i sintetisali derivate 5,6-dihidro-pirazolo[1,5-c]hinazolina (jedinjenja **217** i **218**) koji su efikasni inhibitori komercijalne ksantin-oksidadze (tabela 25).

Tabela 25. Inhibicija ksantin-oksidadze derivatima pirazolo-hinazolina **217** i **218** (Kumar i saradnici, 2014)



Opšta struktura jedinjenja 217 i 218

Jedinjenje	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
217	OH	Cl	Cl	10,96	2,89
218	H	NO ₂	H	20,89	1,51

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 31,62 μM)

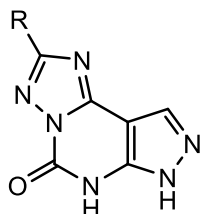
^bRIP = relativni inhibitorski potencijal, $RIP_a = IC_{50} \text{ alopurinol} / IC_{50} \text{ jedinjenje}$

2.4.4.6. Derivati pirazolo-triazolo-pirimidina

Ali i saradnici (2010) su ispitali i odnos struktura-aktivnost derivata 7H-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidin-5(6H)-ona (jedinjenja **219-236**) i ustanovili da su znatno efikasniji inhibitori komercijalne ksantin-oksidadze i u odnosu na analoge 4-

arilmetilidenhidrazino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, i u odnosu na alopurinol (tabela 26) (Ali i saradnici, 2010).

Tabela 26. Inhibicija ksantin-oksidge derivatima pirazolo-triazolo-pirimidina **219-236** (Ali i saradnici, 2010)



Opšta struktura jedinjenja 219-236

Jedinjenje	R	IC ₅₀ [μM] ^a	RIP _a ^b
219	H	0,184	132,07
220	CH ₃	0,250	97,20
221	CH ₂ CH ₃	0,782	31,07
222	(CH ₂) ₃ CH ₃	0,529	45,94
223	(CH ₂) ₆ CH ₃	0,069	352,17
224	(CH ₂) ₈ CH=CH ₂	0,117	207,69
225	C ₆ H ₅	0,103	235,92
226	(4-F)-C ₆ H ₄	0,062	391,94
227	(2-Cl)-C ₆ H ₄	0,070	347,14
228	(3-Cl)-C ₆ H ₄	0,038	639,47
229	(4-Cl)-C ₆ H ₄	0,032	759,38
230	(4-Br)-C ₆ H ₄	0,034	714,71
231	(4-CH ₃)-C ₆ H ₄	0,041	592,68
232	(4-OCH ₃)-C ₆ H ₄	0,053	458,49
233	3,4-OCH ₂ O-C ₆ H ₃	0,041	592,68
234	(4-OH)-C ₆ H ₄	0,055	441,82
235	(4-NO ₂)-C ₆ H ₄	0,060	405,00
236	(3-NO ₂)-(4-OH)-C ₆ H ₃	0,037	656,76

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja na komercijalnom enzimu

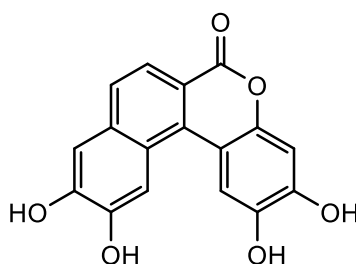
Pozitivna kontrola alopurinol (IC₅₀ = 24,30 μM)

^bRIP = relativni inhibitorni potencijal, RIP_a = IC₅₀ alopurinol/IC₅₀ jedinjenje

2.4.5. Inhibitori ksantin-oksidade - strukture sa četiri prstena

2.4.5.1. Derivati nafto-benzopirana

Produkt oksidacije kafene kiseline (jedinjenje **237**, slika 14, $IC_{50} = 0,06 \mu M$) je efikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidade od alopurinola ($IC_{50} = 1,00 \mu M$) (Masuda i saradnici, 2014).

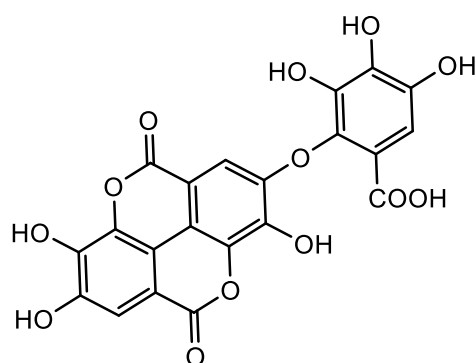


237

Slika 14. Strukturna formula jedinjenja **237**, nafto-benzopiranskog inhibitora ksantin-oksidade (Masuda i saradnici, 2014).

2.4.5.2. Derivati hromeno-hromena

Vodeni ekstrakt lista *Lagerstroemia speciosa* inhibira aktivnost ksantin-oksidade. Iz ekstrakta je izolovan dilakton valoneinske kiseline (jedinjenje **238**, slika 15) koji je efikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidade ($IC_{50} = 2,50 \mu M$) od alopurinola ($IC_{50} = 10,40 \mu M$). Ovaj podatak ide u prilog primeni ekstrakata *Lagerstroemia speciosa* u prevenciji i tretmanu hiperurikemije. Postoje ispitivanja koja ukazuju na prisustvo jedinjenja **238** i u drugim biljnim vrstama (Unno i saradnici, 2004).



238

Slika 15. Strukturna formula jedinjenja **238**, hromeno-hromenskog inhibitora ksantin-oksidade (Unno i saradnici, 2004).

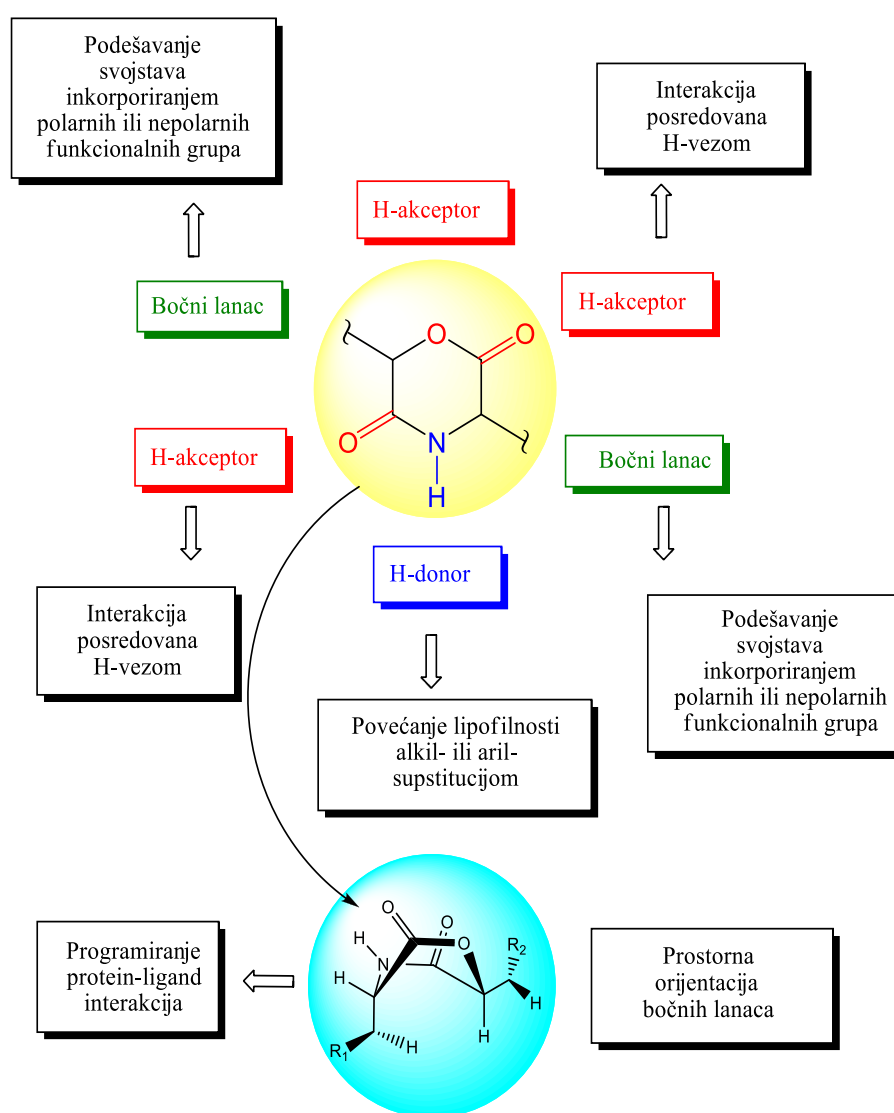
2.5. Hemijska struktura i biološka aktivnost depsipeptida

Depsipeptidi predstavljaju veliku grupu peptidnih laktona prirodnog i sintetskog porekla, koji u svojoj strukturi sadrže najmanje jednu estarsku vezu. Mogu biti ciklični i aciklični. Ciklodepsipeptidi privlače pažnju istraživača usled širokog spektra bioloških aktivnosti, kao što su: imunosupresivna, antibakterijska, antifungalna, antiinflamatorna i antitumorna aktivnost (Lemmens-Gruber i saradnici, 2009; Sarabia i saradnici, 2004; Bagavananther Andavan i Lemmens-Gruber, 2010). Strukturna raznolikost unutar ove klase jedinjenja potiče od vrste i broja aminokiselina, veličine makrociklusa i njihovih bočnih lanaca (Sarabia i saradnici, 2004).

2.5.1. Hemijska struktura i biološka aktivnost ciklodidepsipeptida

Ciklodidepsipeptidi su strukturno najjednostavniji ciklodepsipeptidi, koji imaju jednu amidnu i jednu estarsku grupu u istom šestočlanom prstenu. Morfolin-2,5-dionski prsten ciklodidepsipeptida je jednostavan heterociklični skelet koji pruža mogućnost raznovrsnih strukturnih modifikacija (slika 16). Morfolin-2,5-dion sadrži tri atoma kiseonika, akceptora vodoničnih veza, i NH grupu, koja može biti i akceptor i donor vodonične veze. Pored toga, morfolin-2,5-dionski prsten omogućava modifikacije u tri pozicije: na C3, i N4 i C6 atomu. Supstitucija bočnim lancima, definisane prostorne orijentacije, omogućava podešavanje željenih farmakoloških svojstava, kroz inkorporaciju polarnih, odnosno nepolarnih, funkcionalnih grupa. Lipofilnost derivata ciklodidepsipeptida se može podešavati i kontrolisati odgovarajućom alkil- ili aril- supstitucijom na N4 poziciji. Ciklodidepsipeptidi

poseduju konformaciono fleksibilan heterociklus sa dva asimetrična C atoma, C3 i C6, što rezultuje mnoštvom enantiomera i diastereoizomera. Prisustvo estarske i amidne grupe otvara mogućnost postojanja laktam (keto) i laktim (enol) tautomernih formi (Smelcerovic i saradnici, 2014). Dokazano je da je keto oblik stabilniji (Yancheva i saradnici, 2012). Adekvatnim dizajnom je moguće sintetisati jedinjenje za određenu protein-ligand interakciju.

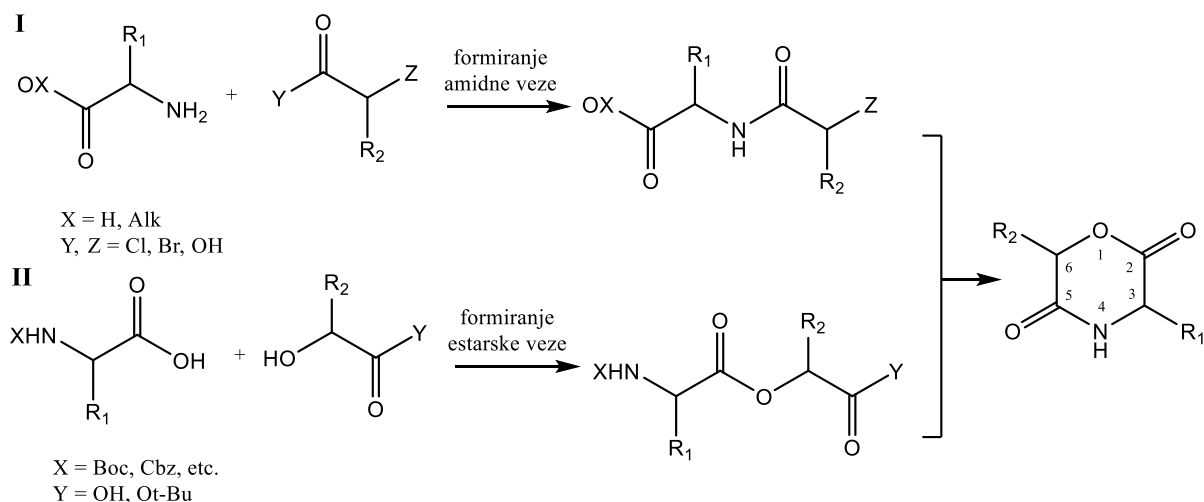


Slika 16. Strukturna raznolikost ciklodidepsipeptida (Smelcerovic i saradnici, 2014).

Prirodni izvori iz kojih su izolovani pojedini predstavnici ciklodidepsipeptida su: patogena gljivica *Fusarium sporotrichioides* Sherb izolovana iz stabljike sveže biljke *Hypericum barbatum* Jacq. (Smelcerovic i saradnici, 2011), *Metarhizium* sp. TA2759 (Iijima i saradnici, 1992), *Bauveria bassiana* K-717 (Kagamizono i saradnici, 1995), *Cordyceps cicadae* Shing (Kuo i saradnici, 2002), *Gibberella lateritium* IFO 7188 (Hasumi i saradnici,

1993), *Bursatella leachii* (Suntornchashweij i saradnici, 2005), *Claviceps purpurea* (Abe i saradnici, 1959) i *Pseudomonas tabaci* (Woolley i saradnici, 1955).

Sinteza ciklodidepsipeptida se vrši inicijalnim formiranjem amidne ili estarske veze, nakon čega sledi intermolekulska ciklizacija (Smelcerovic i saradnici, 2014) (slika 17).



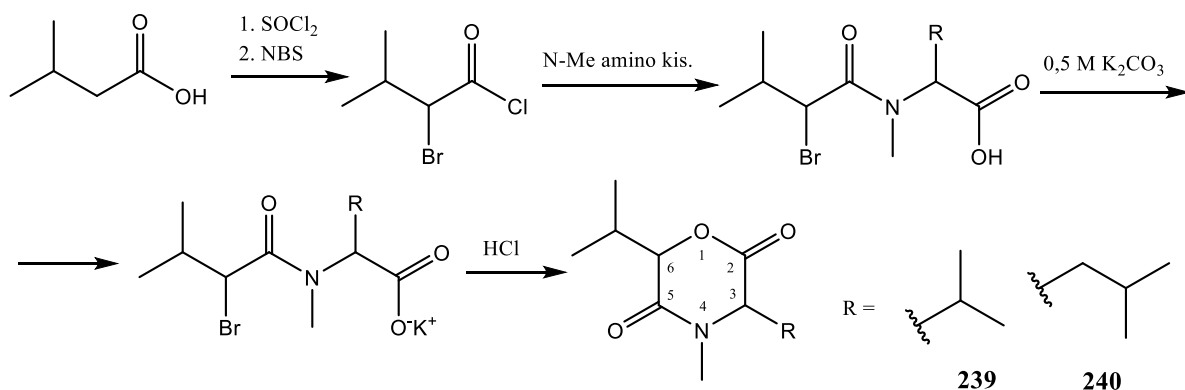
Slika 17. Šematski prikaz sinteze ciklodidepsipeptida (Smelcerovic i saradnici, 2014).

Ima podataka o antibakterijskoj (Pavlovic i saradnici, 2012a; Yancheva i saradnici, 2012), imunomodulatornoj (Iijima i saradnici, 1992; Pavlovic i saradnici, 2012a, 2012b), antioksidantnoj (Stankov-Jovanovic i saradnici, 2012) i antikoagulantnoj (Kagamizono i saradnici, 1995) aktivnosti ciklodidepsipeptida, o inhibiciji aktivnosti acil-CoA:holesterol aciltransferaze (Hasumi i saradnici, 1993) i α -glukozidaze (Arcelli i saradnici, 2004, 2005, 2007) ciklodidepsipeptidima.

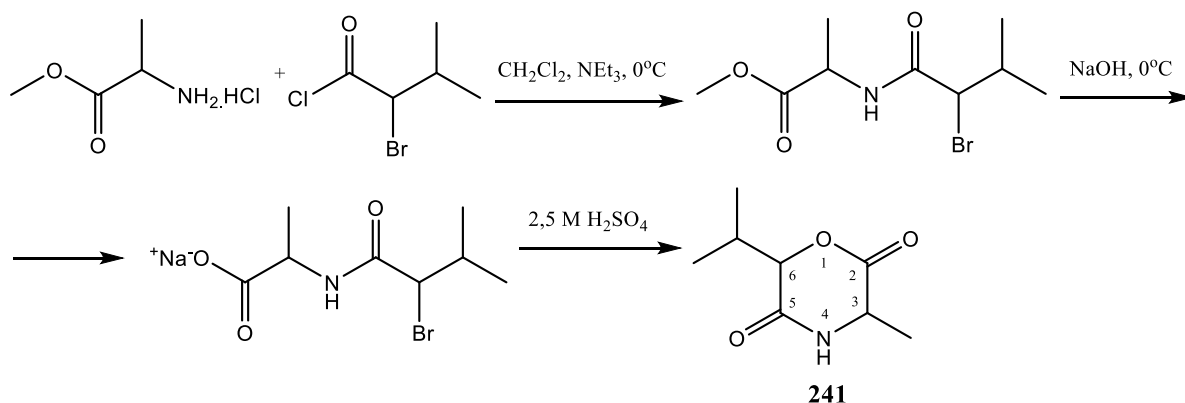
2.5.1.1. Hemijska struktura i biološka aktivnost 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona

Dva 6-(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-diona, 3,6-di(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-dion (**239**) i 3-(2-metilpropil)-6-(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-dion (**240**) (tabela 27), su prvi put identifikovana u prirodnim proizvodima kao potencijalni prekursori eniatina B u patogenoj gljivici *Fusarium sporotrichioides*, izolovanoj iz stabljike svežeg *Hypericum barbatum* Jacq. U cilju potvrđivanja strukture ova dva jedinjenja su dobijena sintetičkim putem (slika 18) (Smelcerovic i saradnici, 2011). Nedavno su Yancheva i saradnici (2012)

publikovali sintezu novog ciklodidepsipeptida, 6-(propan-2-il)-3-metil-morfolin-2,5-diona (**241**) (slika 19).

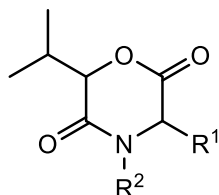


Slika 18. Šematski prikaz sinteze 3,6-di(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-diona (**239**) i 3-(2-metilpropil)-6-(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-diona (**240**) (Smelcerovic i saradnici, 2011).



Slika 19. Šematski prikaz sinteze 6-(propan-2-il)-3-metil-morfolin-2,5-diona (**241**) (Yancheva i saradnici, 2012).

Tabela 27. 6-(Propan-2-il)-morfolin-2,5-dioni **239-241** (Smelcerovic i saradnici, 2011; Yancheva i saradnici, 2012)



Opšta struktura jedinjenja 239-241

Jedinjenje	R ¹	R ²
239	CH(CH ₃) ₂	CH ₃
240	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
241	CH ₃	H

Ima podataka o antibakterijskoj (Pavlovic i saradnici, 2012a; Yancheva i saradnici, 2012), imunomodulatornoj (Pavlovic i saradnici, 2012a, 2012b) i antioksidantnoj (Stankov-Jovanovic i saradnici, 2012) aktivnosti 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona **239-241**.

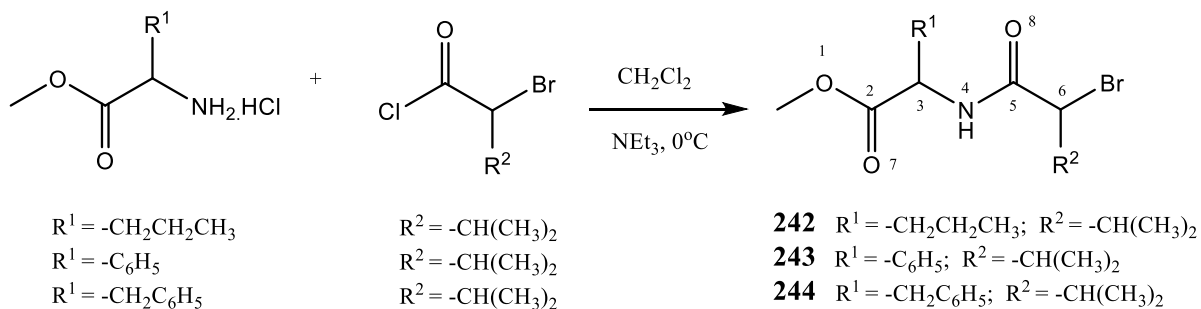
Antibakterijska aktivnost 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona **239-241** je ispitana na pet bakterijskih sojeva, dve Gram-pozitivne, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, i tri Gram-negativne bakterije, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella abony* NCTC 6017. Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija su bile u opsegu 2-25 mg/mL (Pavlovic i saradnici, 2012a; Yancheva i saradnici, 2012). Jedinjenje **239** je pokazalo jače antimikrobno dejstvo od jedinjenja **240** i **241**.

Jedinjenja **239** i **240** su pokazala stimulatívni efekat na proliferaciju timocita pacova i odsustvo toksičnosti u ispitivanim dozama (0,1 µg, 1 µg i 10 µg) (Pavlovic i saradnici, 2012a), dok su doze od 1 µg i 10 µg jedinjenja **241** inhibirale proliferaciju timocita (Pavlovic i saradnici, 2012b). Prisustvo metil grupe u poziciji 4 i/ili dužina alkil lanca u poziciji 3 morfolin-2,5-diona pokazuju uticaj na biološku aktivnost ispitivanih 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona.

Jedinjenja **239** i **240** su pokazala umerenu antioksidantnu aktivnost, za koju je odgovoran vodonik u poziciji C3 (Stankov-Jovanovic i saradnici, 2012).

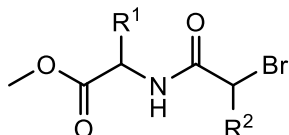
2.5.2. Hemijska struktura i biološka aktivnost *N*-(α -bromacil)- α -amino estara

Yancheva i saradnici (2015) su sintetisali tri aciklična *N*-(α -bromacil)- α -amino estara (slika 20), metil-2-(2-brom-3-metilbutanamido)-pentanoat (**242**), metil-2-(2-brom-3-metilbutanamido)-2-fenilacetat (**243**) i metil-2-(2-brom-3-metilbutanamido)-3-fenilpropanoat (**244**) (tabela 28).



Slika 20. Šematski prikaz sinteze *N*-(α -bromacil)- α -amino estara **242-244** (Yancheva i saradnici, 2015).

Tabela 28. *N*-(α -Bromacil)- α -amino estri **242-244** (Yancheva i saradnici, 2015)



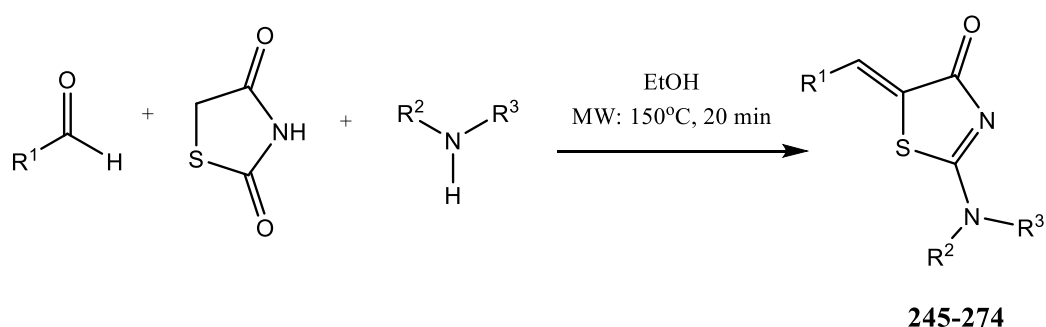
Opšta struktura jedinjenja 242-244

Jedinjenje	R^1	R^2
242	$(CH_2)_2CH_3$	$CH(CH_3)_2$
243	C_6H_5	$CH(CH_3)_2$
244	$CH_2C_6H_5$	$CH(CH_3)_2$

Ispitani *N*-(α -bromacil)- α -amino estri (jedinjenja **242-244**) su iskazali slabu citotoksičnost na HeLa i RAW264.7 ćelijama i odsustvo antiinflamatorne i antibakterijske aktivnosti u ispitivanim koncentracijama (Yancheva i saradnici, 2015).

2.6. Hemijska struktura i biološka aktivnost 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona

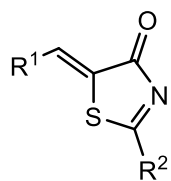
2-Amino-5-alkiliden-tiazol-4-on predstavlja obećavajuću strukturnu osnovu za pronalazak novih lekova (Tripathi i saradnici, 2014; Pulici i Quartieri, 2005) jer njegovi derivati pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su: antimikrobna (Hu i saradnici, 2004; Jukič i saradnici, 2013), antioksidantna (Zvezdanovic i saradnici, 2014), antiviralna (Abdel-Ghani, 1999), antiinflamatorna (Song i saradnici, 1999) i kardiotonična (Andreani i saradnici, 1996). Anderluh i saradnici (2009) su sintetisali (slika 21) trideset derivata 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona (**245-274**; tabela 29).



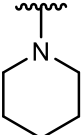
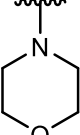
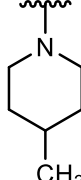
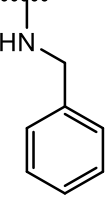
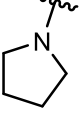
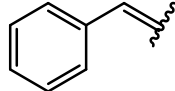
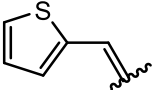
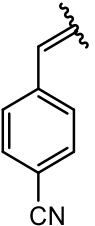
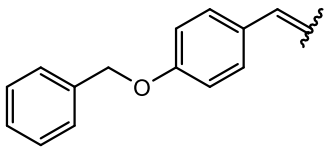
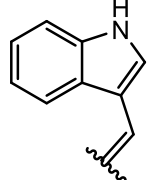
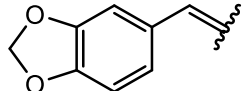
Slika 21. Šematski prikaz sinteze 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona **245-274** (Anderluh i saradnici, 2009).

Ima podataka o antibakterijskoj (Jukič i saradnici, 2013), antioksidantnoj (Zvezdanovic i saradnici, 2014) aktivnosti i citotoksičnosti (Jukič i saradnici, 2013) 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona, **245-274**. Većina ispitivanih supstanci je pokazala umerenu ili snažnu antibakterijsku aktivnost na sojevima *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*, dok je aktivnost na *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* izostala (Jukič i saradnici, 2013). Neki od ispitivanih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona su pokazali antioksidantnu aktivnost uporedivu sa standardnim antioksidansima (troloks, kvercetin, kafeinska kiselina i L-askorbinska kiselina) (Zvezdanovic i saradnici, 2014). Značajna karakteristika ispitivanih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona je slab efekat na vijabilnost HEK-293 ćelija (Jukič i saradnici, 2013).

Tabela 29. 2-Amino-5-alkiliden-tiazol-4-oni **245-274** (Anderluh i saradnici, 2009)



Opšta struktura jedinjenja 245-274

		R²					
R¹	Oznaka jedinjenja						
		245	246	247	248	249	
		250	251	252	253	254	
		255	256	257	258	259	
		260	261	262	263	264	
		265	266	267	268	269	
		270	271	272	273	274	

2.7. *In silico* ispitivanja inhibitora medicinski značajnih enzima

Kompjuterske metode su komplementarne sa laboratorijskim eksperimentima i postaju sve značajnije u ispitivanjima strukture i funkcije biomolekula (Rudnitskaya i saradnici, 2010). Najčešća i najznačajnija *in silico* ispitivanja inhibitora medicinski značajnih enzima su molekulski *docking*, kojim se predviđaju/razjašnjavaju interakcije inhibitora sa enzimom, i predviđanje fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških karakteristika inhibitora, u cilju procene mogućnosti njihove primene u terapiji.

2.7.1. Molekulski *docking* enzimskih inhibitora

Molekulski *docking* ima značajnu ulogu u dizajnu lekova. Iako su početni pokušaji molekuskog *docking*-a bili teški, usled ograničenih mogućnosti tehnologije, sa razvojem savremene kompjuterske tehnike došlo je i do povećanja efikasnosti metoda za virtuelni *screening* (Rudnitskaya i saradnici, 2010). *Docking* programi se koriste za predviđanje interakcija malih molekula sa ciljnim strukturama (kao što su, na primer, aktivni centri enzima) i obuhvataju ispitivanje mnoštva pozicija, konformacija i orijentacija u cilju određivanja energetski najpovoljnijih položaja. Bazirani su na komplementarnosti struktura liganda i ciljnog proteina (Kroemer, 2007). Strukture ciljnih proteina, dobijene na osnovu kristalografskih i/ili NMR studija, programi koriste u PDB formatu (<http://www.pdb.org>) (Rudnitskaya i saradnici, 2010). Neki od programa za molekulski *docking* su: AutoDock, DOCK, FlexX, FRED, Glide, GOLD, Hammerhead, ICM, LigandFit, QXP, SLIDE i Surflex Dock (Kroemer, 2007).

Obrada i vizuelizacija podataka o komplementarnosti i mogućim interakcijama enzima i inhibitora omogućava razjašnjenje mehanizma inhibicije enzima korišćenjem metodologije molekuskog *docking*-a (Rudnitskaya i saradnici, 2010). Poslednjih nekoliko godina, *docking* studije su postale sastavni deo ispitivanja i publikacija o novim inhibitorima medicinski značajnih enzima.

2.7.2. Predviđanje fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina *in silico* metodama

Preliminarno predviđanje/*screening* fizičko-hemijskih karakteristika omogućava i olakšava otkriće i razvoj novih potencijalno obećavajućih struktura u medicinskoj hemiji.

Vrednosti molekulske mase, oktanol/voda particionog koeficijenta (logP), broja akceptora i donora vodoničnih veza utvrđene "Pravilom pet" Lipinskog, za procenu rastvorljivosti i permeabilnosti jedinjenja, su: niska permeabilnost se očekuje ako je molekulska masa iznad 500, logP veće od 5, broj donora i akceptora vodoničnih veza veći od 5 i 10, respektivno (Lipinski i saradnici, 2012). Važan faktor u proceni efektivnosti vezivanja za receptore/kanale i optimalnu bioraspodivost je konformaciona fleksibilnost molekula, opisana brojem veza sa mogućnošću rotacije. Optimalan broj ovih veza je 10 i manji. "Pravila Vebera" su: prihvatljiv stepen oralne bioraspodivosti postoji ako molekul ima 10 ili manje veza sa mogućnošću rotacije, parametar koji opisuje sposobnost formiranja vodoničnih veza (polarost molekula) manji od 140 \AA^2 i 12 ili manje donora i akceptora vodoničnih veza (Veber i saradnici, 2002).

U cilju procene mogućnosti primene inhibitora medicinski značajnih enzima u terapiji, potrebno je uzeti u obzir i farmakokinetičke parametre (apsorpcija, distribucija, biotransformacija i ekskrecija).

Toksikološki parametri inhibitora medicinski značajnih enzima koji su od najvećeg značaja za procenu rizika ispoljavanja toksičnosti su: mutagenost, tumorogenost, iritabilni efekti i nepovoljni efekti na reproduktivni sistem. Identifikacija jedinjenja koje poseduju sposobnost kovalentnog vezivanja za proteine i/ili DNK je, takođe, od značaja u proceni toksičnosti.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu potrebu za pronalaskom novih inhibitora ksantin-oksidge osnovni cilj ove disertacije bio je ispitivanje uticaja depsipeptida i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona na aktivnost komercijalnog enzima ksantin-oksidge *in vitro* i ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova.

Jedan od ciljeva sprovedenih istraživanja bio je razjašnjavanje mehanizama inhibicije ksantin-oksidge ispitivanim depsipeptidima i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onima, koji su se pokazali kao najefikasniji inhibitori ovog enzima, metodom molekuskog *docking*-a.

U cilju procene mogućnosti primene depsipeptida i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona u terapiji gihta *in silico* metodama su predviđene osnovne fizičko-hemijske, farmakokinetičke i toksikološke karakteristike ispitivanih jedinjenja i poređene sa istim predviđenim svojstvima drugih inhibitora ksantin-oksidge.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitivani depsipeptidi i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-oni

4.1.1. Depsipeptidi

4.1.1.1. 6-(Propan-2-il)-morfolin-2,5-dioni

Tri ciklodidepsipeptida, 3,6-di(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-dion (**239**), 3-(2-metilpropil)-6-(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-dion (**240**) i 6-(propan-2-il)-3-metil-morfolin-2,5-dion (**241**) (tabela 27), koji su ispitivani u ovoj disertaciji su sintetisana i dobijena od doc. dr Denitse Yancheve (Institut za organsku hemiju sa Centrom za fitohemiju, Bugarska akademija nauka, Sofija, Bugarska). Jedinjenja **239** i **240** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Smelcerovic i saradnici (2011) (slika 18) dok je jedinjenje **241** sintetisano prema protokolu publikovanom u radu Yancheva i saradnici (2012) (slika 19).

4.1.1.2. Aciklični *N*-(α -bromacil)- α -amino estri

Tri ispitivana aciklična *N*-(α -bromacil)- α -amino estra, metil-2-(2-brom-3-metilbutanamido)-pentanoat (**242**), metil-2-(2-brom-3-metilbutanamido)-2-fenilacetat (**243**) i metil-2-(2-brom-3-metilbutanamido)-3-fenilpropanoat (**244**), su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Yancheva i saradnici (2015) (slika 20) i dobijena od doc. dr Denitse Yancheve (Institut za organsku hemiju sa Centrom za fitohemiju, Bugarska akademija nauka, Sofija, Bugarska).

4.1.2. 2-Amino-5-alkiliden-tiazol-4-oni

Ispitivani 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-oni (**245-274**) su sintetisani reakcijom odgovarajućeg aldehida, rodanina i sekundarnog amina u mikrotalasnom reaktoru (slika 21) prema protokolu publikovanom u radu Anderluh i saradnici (2009) i dobijeni od prof. dr Marka Anderluha (Farmaceutski fakultet Univerziteta u Ljubljani, Slovenija).

4.2. *In vitro* ispitivanje inhibicije komercijalne ksantin-oksidade

Ispitivanje inhibicije komercijalne ksantin-oksidade iz goveđeg mleka (klasa I, amonijum sulfatna suspenzija; Sigma-Aldrich) je vršeno spektrofotometrijskim merenjem nastanka mokračne kiseline na 293 nm. Spektrofotometrijska merenja su vršena na spektrofotometru Beckman DU[®] 530.

Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 2150 μL . Prva grupa uzoraka je sadržala 50 μL rastvora 0,01 jedinice ksantin-oksidade u destilovanoj vodi, 100 μl rastvora ispitivane supstance u dimetil sulfoksidu (DMSO; čistoće $\geq 99,5\%$; Sigma-Aldrich), 232,5 μM ksantina (čistoće $\geq 99,5\%$; Sigma-Aldrich) i 46,5 mM TRIS-HCl pufera (pH 7,8). Druga grupa uzoraka je ispitivana u cilju određivanja uticaja rastvarača i sadržala je iste količine enzima, ksantina i TRIS-HCl pufera kao prva grupa. DMSO je dodavan umesto rastvora ispitivane supstance. Vreme predinkubacije je iznosilo 15 minuta, dok je inkubacija uzoraka trajala 15 minuta na temperaturi od 37°C. Enzimska reakcija je zaustavljena ledenom perhlornom kiselinom (100 μL). Kontrolni uzorci obe grupe su pripremani na isti način kao uzorci analize, samo je supstrat (ksantin) dodavan nakon dodavanja ledene perhlorne kiseline. Nakon zamrzavanja (dva sata na -20°C) i centrifugiranja (10 minuta na 3600 obrtaja/min korišćenjem cetrifuge Centric 322A Tehnica) vršena su spektrofotometrijska merenja. DMSO u finalnoj koncentraciji od 4,65% v/v ne utiče na aktivnost enzima. Alopurinol (čistoće $\geq 99\%$; Sigma-Aldrich) je korišćen kao pozitivna kontrola. Sva ispitivanja su rađena u triplikatu.

Aktivnost i inhibicija ksantin-oksidade su računati kao procentulni odnos razlike absorbancija analize i kontrole za ispitivana jedinjenja i DMSO. Sva jedinjenja su najpre ispitivana u koncentraciji od 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Za jedinjenja koja su u koncentraciji od 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pokazala inhibiciju veću od 50% računata su IC_{50} vrednosti na osnovu četiri koncentracije (50, 40, 25 i 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

U tabeli **30** je dat primer izračunavanja stepena inhibicije komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **239**.

Tabela 30. Primer izračunavanja uticaja jedinjenja **239** na aktivnost komercijalne ksantin-oksidge

Jedinjenje (koncentracija)	DMSO	239 (50 µg/mL)	239 (40 µg/mL)	239 (25 µg/mL)	239 (5 µg/mL)
Razlika absorbancija analize i kontrole ^a	0,532	0,171	0,246	0,371	0,502
	0,543	0,189	0,257	0,384	0,458
	0,584	0,163	0,298	0,367	0,486
Srednja vrednost razlike absorbancija analize i kontrole	0,553	0,174333	0,267	0,374	0,482
Aktivnost ksantin-oksidge (%)	100	31,53	48,28	67,63	87,16
Inhibicija ksantin-oksidge (%)	0	68,47	51,72	32,37	12,84

^a Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

4.3. *In vitro* ispitivanje inhibicije ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova

4.3.1. Dobijanje homogenata jetre pacova

Za istraživanja u ovom radu su korišćeni pacovi stari šest nedelja, težine 150 do 200 g, kupljeni od Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Eksperimentalne životinje su gajene i tretirane u vivarijumu Medicinskog fakulteta u Nišu na osnovu preporuka o gajenju i korišćenju laboratorijskih životinja. Pacovi su uvođeni u anesteziju ketaminom (60 mg/kg) i žrtvovani. Homogenat izolovanih, usitnjenih, jetri je dobijen pomoću homogenizatora (Ultra Turrax IKA[®] T18 basic). Homogenat (10% w/v) je 10 minuta centrifugiran na 1500 obrtaja/min na temperaturi od 4°C korišćenjem cetrifuge Centric 322A Tehnica. Supernatant je korišćen za ispitivanje inhibicije ksantin-oksidge.

4.3.2. Spektrofotometrijsko ispitivanje inhibicije ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova

Ispitivanje inhibicije ksantin-oksidade je vršeno spektrofotometrijskim merenjem nastanka mokraćne kiseline na 293 nm. Spektrofotometrijska merenja su vršena na spektrofotometru Beckman DU[®] 530.

Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 2200 μ L. Prva grupa uzoraka je sadržala 100 μ l 10%-nog homogenata jetre pacova, 100 μ l rastvora ispitivane supstance u DMSO (čistoće $\geq 99,5\%$; Sigma-Aldrich), 454,5 mM ksantina (čistoće $\geq 99,5\%$; Sigma-Aldrich) i 45,5 mM TRIS-HCl pufera (pH 7,8). Druga grupa uzoraka je ispitivana u cilju određivanja uticaja rastvarača i sadržala je iste količine homogenata jetre pacova, ksantina i TRIS-HCl pufera kao prva grupa. DMSO je dodavan umesto rastvora ispitivane supstance. Vreme predinkubacije je iznosilo 15 minuta, dok je inkubacija uzoraka trajala 30 minuta na temperaturi od 37°C. Enzimska reakcija je zaustavljena ledenom perhlornom kiselinom (100 μ L). Kontrolni uzorci obe grupe su pripremani na isti način kao uzorci analize, samo je supstrat (ksantin) dodavan nakon dodavanja ledene perhlorne kiseline. Nakon zamrzavanja (dva sata na -20°C) i centrifugiranja (10 minuta na 3600 obrtaja/min korišćenjem cetrifuge Centric 322A Tehnica) vršena su spektrofotometrijska merenja. DMSO u finalnoj koncentraciji od 4,55% v/v ne utiče na aktivnost enzima. Alopurinol (čistoće $\geq 99\%$; Sigma-Aldrich) je korišćen kao pozitivna kontrola. Sva ispitivanja su rađena u triplikatu.

Aktivnost i inhibicija ksantin-oksidade su računati kao procentulni odnos razlike absorbancija analize i kontrole za ispitivana jedinjenja i DMSO. Sva jedinjenja su najpre ispitivana u koncentraciji od 50 μ g/mL. Za jedinjenja koja su u koncentraciji od 50 μ g/mL pokazala inhibiciju veću od 50% računata su IC₅₀ vrednosti na osnovu tri koncentracije ispitivanih jedinjenja (50, 40 i 25 μ g/mL).

U tabeli **31** je dat primer izračunavanja stepena inhibicije ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova jedinjenjem **239**.

Tabela 31. Primer izračunavanja uticaja jedinjenja **239** na aktivnost ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova

Jedinjenje (koncentracija)	DMSO	239 (50 µg/mL)	239 (40 µg/mL)	239 (25 µg/mL)
Razlika absorbancija analize i kontrole ^a	0,175	0,058	0,106	0,142
	0,179	0,082	0,075	0,126
	0,192	0,073	0,088	0,164
Srednja vrednost razlike absorbancija analize i kontrole	0,182	0,071	0,089667	0,144
Aktivnost ksantin-oksidade (%)	100	39,01	49,27	79,12
Inhibicija ksantin-oksidade (%)	0	60,99	50,73	20,88

^a Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

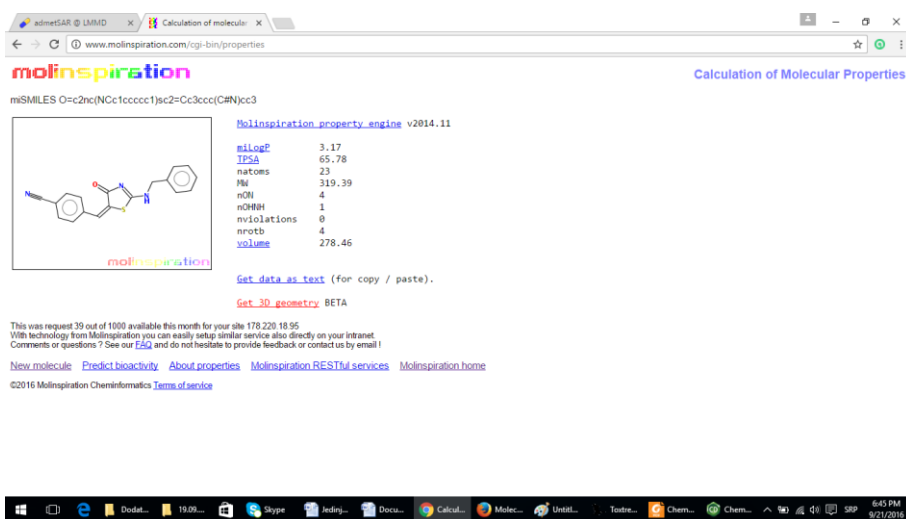
4.4. Docking studije interakcija ispitivanih depsipeptida i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona sa ksantin-oksidadom

Docking studije o interakcijama ispitivanih depsipeptida i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona sa ksantin-oksidadom su vršene upotrebom softvera MOE (Molecular Operating Environment, 2011.10) i FRED (OEDocking version 3.0.1. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>).

4.5. Predviđanje fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina inhibitora ksantin-oksidade *in silico* metodama

Predviđanje fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških karakteristika inhibitora ksantin-oksidade vršeno je primenom softvera *Molinspiration* (Molinspiration Cheminformatics, <http://www.molinspiration.com/>), *admetSAR* (admetSAR, <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/predict/>), *OSIRIS Property Explorer* (OSIRIS Property Explorer. <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) i *Toxtree* (Toxtree, v.2.6.13).

Na slikama 22-27 je dat primer predviđanja fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških karakteristika za jedinjenje **258**.



Slika 22. Fizičko-hemijski parametri jedinjenja **258** predviđeni softverom *Molinspiration* (Molinspiration Cheminformatics, <http://www.molinspiration.com/>).

admetSAR @ LMMD X Calculation of molecule: X

Immd.ecust.edu.cn:8000/predict/?smiles=O=Cc2nc(NCc1cccc1)sc2=Cc3ccc(C#N)cc3&action=A

Blood-Brain Barrier
Model A_BBB_I
The entire dataset were collected from Shen's work, which included 1839 compounds (1438 BBB+ and 401 BBB- compounds).
Q 0.9429 SE 0.0961
SP 0.788 AUC 0.9517
Reference

SMILES: O=Cc2nc(NCc1cccc1)sc2=Cc3ccc(C#N)cc3

ADMET Predicted Profile --- Classification

Model	Classification	Result	Probability
Absorption			
Blood-Brain Barrier	BBB+		0.9511
Human Intestinal Absorption	HIA+		0.9614
Caco-2 Permeability	Caco2-		0.5349
P-glycoprotein Substrate	Non-substrate		0.7456
P-glycoprotein Inhibitor	Inhibitor		0.6230
Renal Organic Cation Transporter	Non-inhibitor		0.5080
Distribution			
Metabolism			
CYP450 2C9 Substrate	Non-substrate		0.6709
CYP450 2D6 Substrate	Non-substrate		0.7883
CYP450 3A4 Substrate	Non-substrate		0.6147
CYP450 1A2 Inhibitor	Inhibitor		0.8819
CYP450 2C9 Inhibitor	Inhibitor		0.6713
CYP450 2D6 Inhibitor	Non-inhibitor		0.8247
CYP450 2C19 Inhibitor	Inhibitor		0.7381
CYP450 3A4 Inhibitor	Non-inhibitor		0.7369
CYP Inhibitory Promiscuity	High CYP Inhibitory Promiscuity		0.8994
Excretion			
Toxicity			
Human Ethanol-Related Gene	Weak inhibitor		0.9205

Slika 23. Parametri apsorpcije i metabolizma jedinjenja **258** predviđeni softverom *admetSAR* (admetSAR, <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/predict/>).

The screenshot displays the OSIRIS Property Explorer web application. The main window shows a chemical structure of a molecule. To the right, a 'Toxicity Risks' panel lists several parameters with their predicted values:

- mutagenic: [?]
- carcinogenic: [?]
- infant: [?]
- reproductive effective: [?]
- cLogP: 2.8
- Solubility: 5.3
- Molweight: 319.3
- TPA: 90.55
- Druglikeness: 6.46
- Drug-Score: 0.33

Below the structure, there is a 'DataWarrior' logo and a 'Do you know?' banner. The footer includes contact information for Thomas Sander at Actelion Pharmaceuticals Ltd.

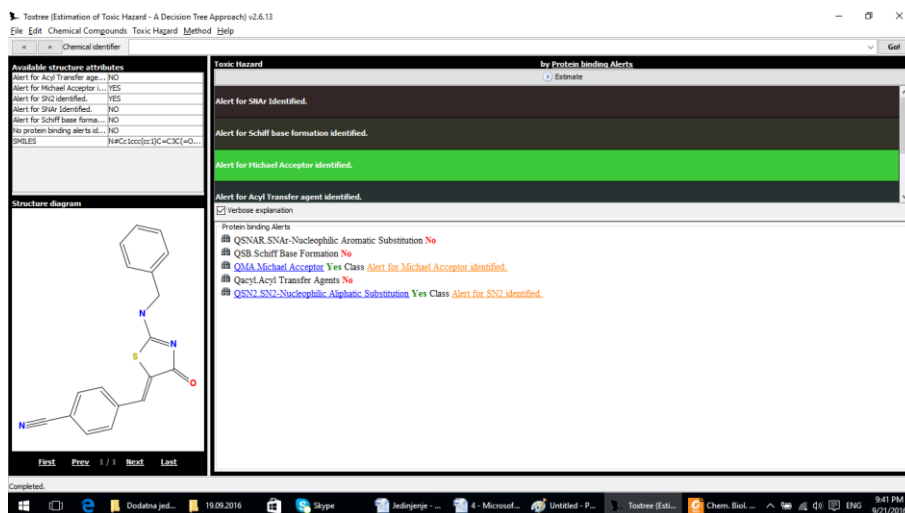
Slika 24. Toksikološki parametri jedinjenja 258 predviđeni softverom *OSIRIS Property Explorer* (OSIRIS Property Explorer. <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

The screenshot displays the admetSAR web application showing the predicted ADMET profile for a molecule. The page is divided into several sections:

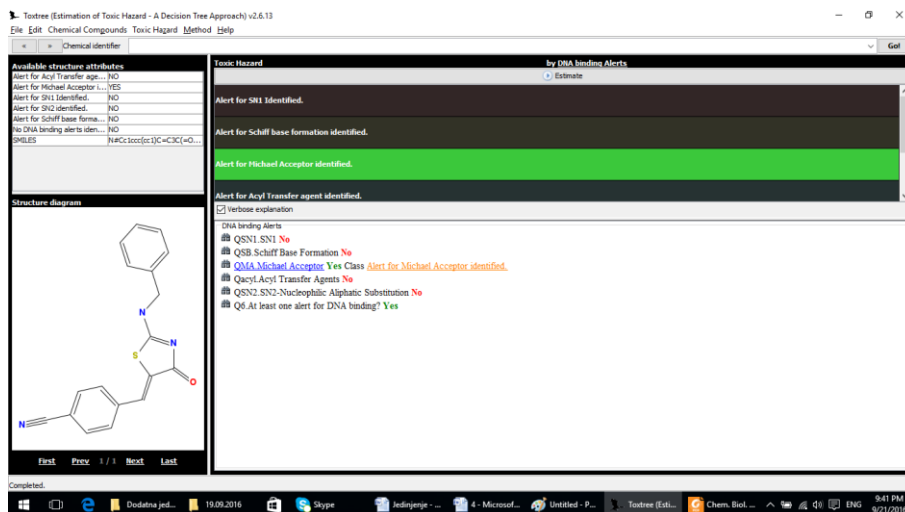
- Blood-Brain Barrier:** Model A_BBB_1. The entire dataset were collected from Shen's work, which included 1839 compounds (1438 BBB+ and 401 BBB- compounds). Q: 0.9429, SE: 0.9861, SP: 0.788, AUC: 0.9517.
- Excretion:** Human Ether-a-go-go-Related Gene Inhibition: Weak Inhibitor (0.9205); Ames Toxicity: Non-Ames (0.8092); Carcinogens: Non-carcinogens (0.5000); Fish Toxicity: High FHT (0.9350); Tetrahymena Pyriformis Toxicity: High TPT (0.9021); Honey Bee Toxicity: Low HBT (0.5916); Biodegradation: Not ready biodegradable (0.9880); Acute Oral Toxicity: III (0.5961); Carcinogenicity (Three-class): Non-required (0.5013).
- ADMET Predicted Profile --- Regression:**

Model	Value	Unit
Absorption		
Aqueous solubility	-3.1557	LogS
Caco-2 Permeability	1.2658	LogPapp, cm/s
Distribution		
Metabolism		
Excretion		
Toxicity		
Rat Acute Toxicity	2.6501	LD50, mol/kg
Fish Toxicity	1.5660	pLC50, mg/L
Tetrahymena Pyriformis Toxicity	0.8149	ptOC50, ug/L

Slika 25. Toksičnost jedinjenja 258 predviđena softverom *admetSAR* (admetSAR, <http://lmmdd.ecust.edu.cn:8000/predict/>).



Slika 26. Mogućnost vezivanja jedinjenja 258 za proteine predviđena softverom *Toxtree* (Toxtree, v.2.6.13).



Slika 27. Mogućnost vezivanja jedinjenja 258 za DNK predviđena softverom *Toxtree* (Toxtree, v.2.6.13).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Inhibicija ksantin-oksidade depsipeptidima

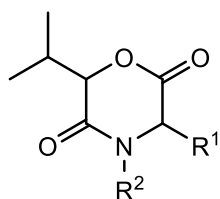
5.1.1. Inhibicija ksantin-oksidade 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-dionima

Uticao ciklodipeptida, 3,6-di(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-diona (**239**), 3-(2-metilpropil)-6-(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-diona (**240**) i 6-(propan-2-il)-3-metil-morfolin-2,5-diona (**241**), na aktivnost ksantin-oksidade je ispitan *in vitro* na komercijalnom enzimu i enzimu homogenata jetre pacova. Sva tri ispitivana 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona inhibiraju komercijalnu ksantin-oksidadu sa IC_{50} vrednostima nižim od 50 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 32, slike 28-31). Takođe, sva tri ispitivana 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona inhibiraju ksantin-oksidadu u homogenatu jetre pacova sa IC_{50} vrednostima nižim od 50 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 33, slike 32-34). 3,6-Di(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-dion (**239**) se pokazao kao najefikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidade ($IC_{50} = 37,08 \mu\text{g/mL}$) i ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova ($IC_{50} = 41,88 \mu\text{g/mL}$) (Šmelcerović i saradnici, 2015). Jedinjenje **241** se pokazalo kao najmanje efikasan inhibitor ksantin-oksidade.

Kako sva tri ispitivana jedinjenja (**239-241**) sadrže 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-dionsku strukturnu jedinicu, može se zaključiti da je prisustvo izopropil grupe u poziciji 3 i metil grupe u poziciji 4 morfolinskog prstena (koje poseduje jedinjenje **239**) povoljnije u smislu inhibicije ksantin-oksidade od prisustva izobutil grupe u poziciji 3 i metil grupe u poziciji 4 morfolinskog prstena (strukturne karakteristike jedinjenja **240**) ili prisustva metil grupe u poziciji 3 i odsustva supstituenta u poziciji 4 morfolinskog prstena (strukturne karakteristike jedinjenja **241**) (Šmelcerović i saradnici, 2015).

Alopinol, se pokazao kao efikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidade ($IC_{50} = 0,26 \mu\text{g/mL}$, slika 31) i ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova ($IC_{50} = 0,79 \mu\text{g/mL}$, slika 35) od tri ispitivana 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona.

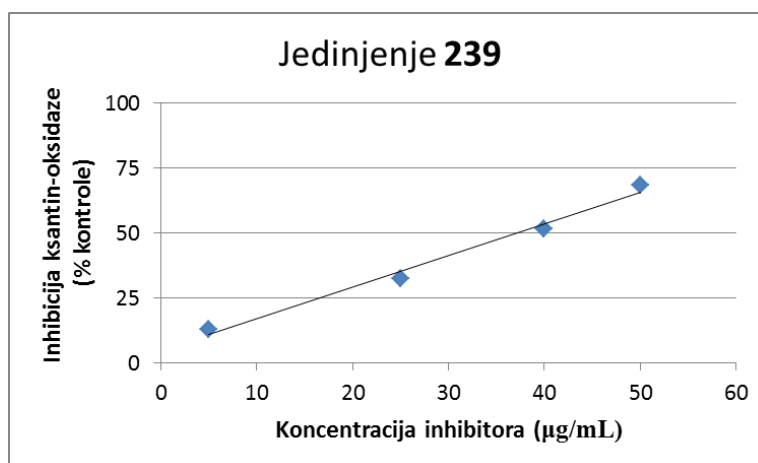
Tabela 32. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-dionima 239-241



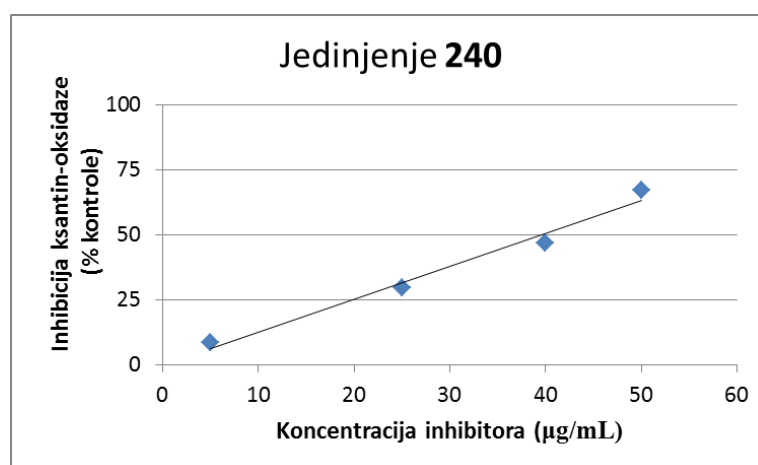
Opšta struktura jedinjenja 239-241

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [µg/mL]
239	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	37,08
240	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	39,33
241	CH ₃	H	49,39

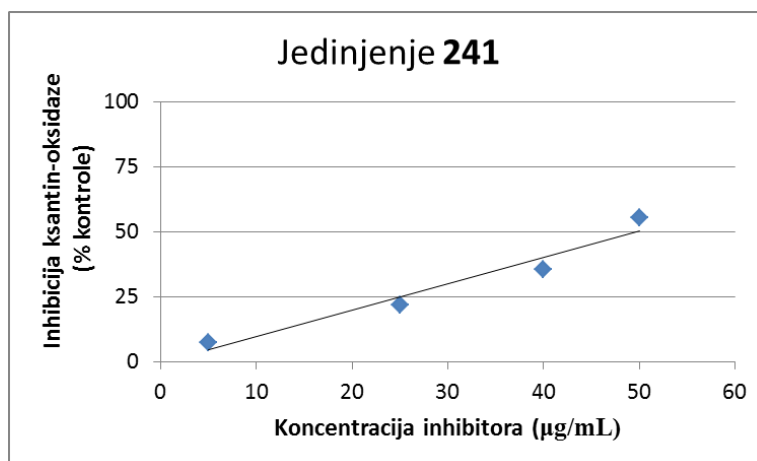
Pozitivna kontrola alopurinol, IC₅₀ = 0,26 µg/mL



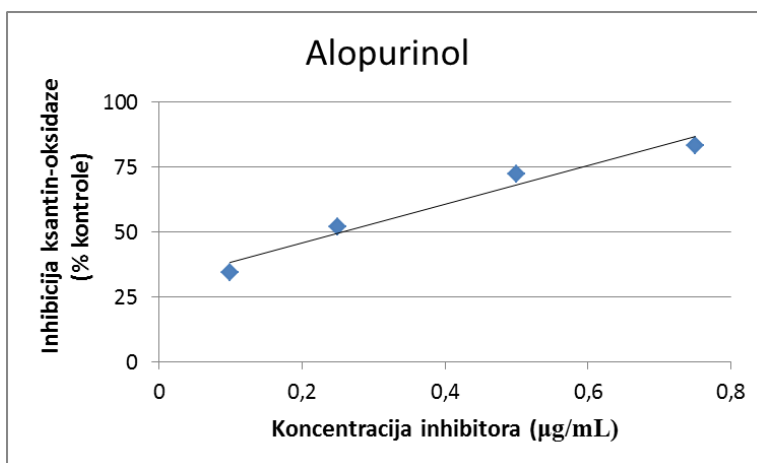
Slika 28. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem 239.



Slika 29. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem 240.

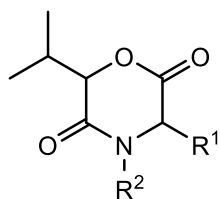


Slika 30. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **241**.



Slika 31. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade alopurinolom.

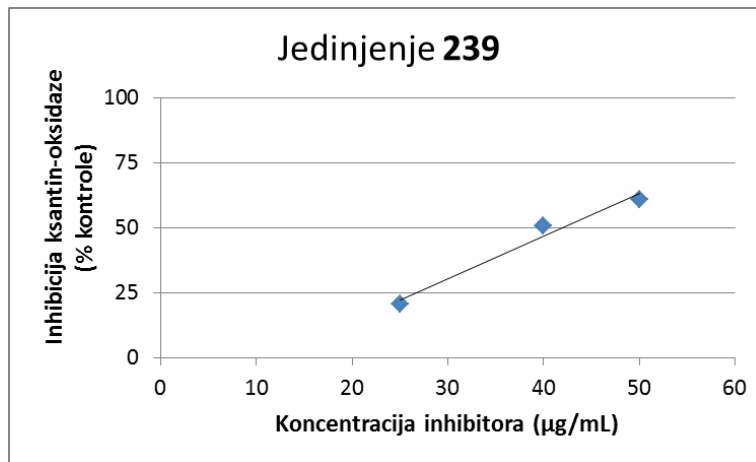
Tabela 33. Inhibicija ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-dionima **239-241** (Šmelcerović i saradnici, 2015)



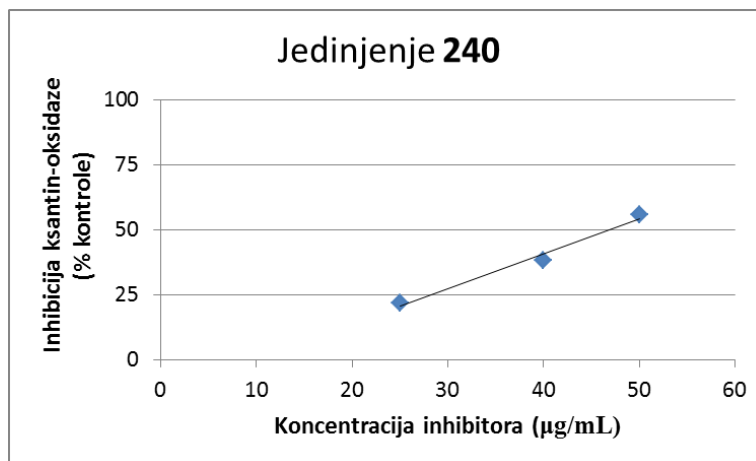
Opšta struktura jedinjenja **239-241**

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [µg/mL]
239	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	41,88
240	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	46,66
241	CH ₃	H	49,82

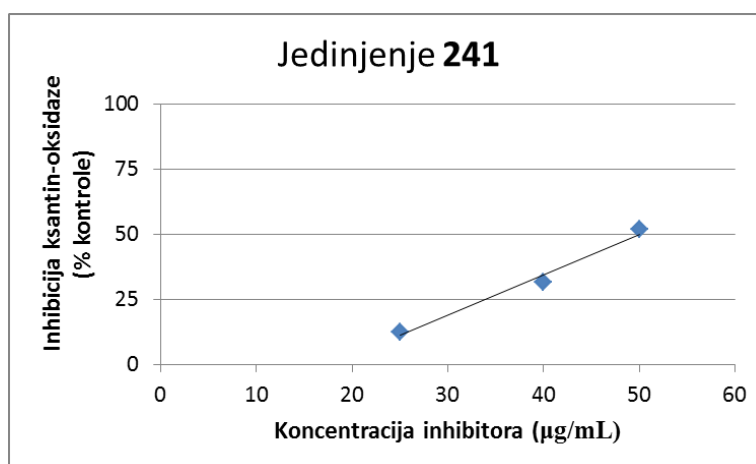
Pozitivna kontrola alopurinol, IC₅₀ = 0,79 µg/mL



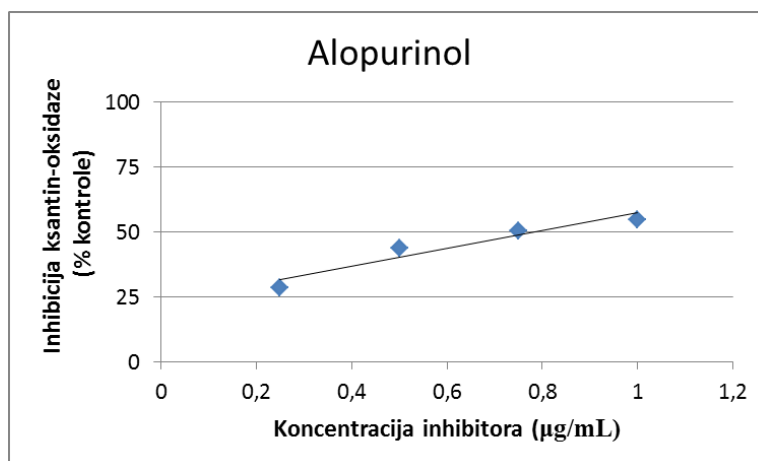
Slika 32. Inhibicija ksantin-oksidadaze u homogenatu jetre pacova jedinjenjem 239.



Slika 33. Inhibicija ksantin-oksidadaze u homogenatu jetre pacova jedinjenjem 240.

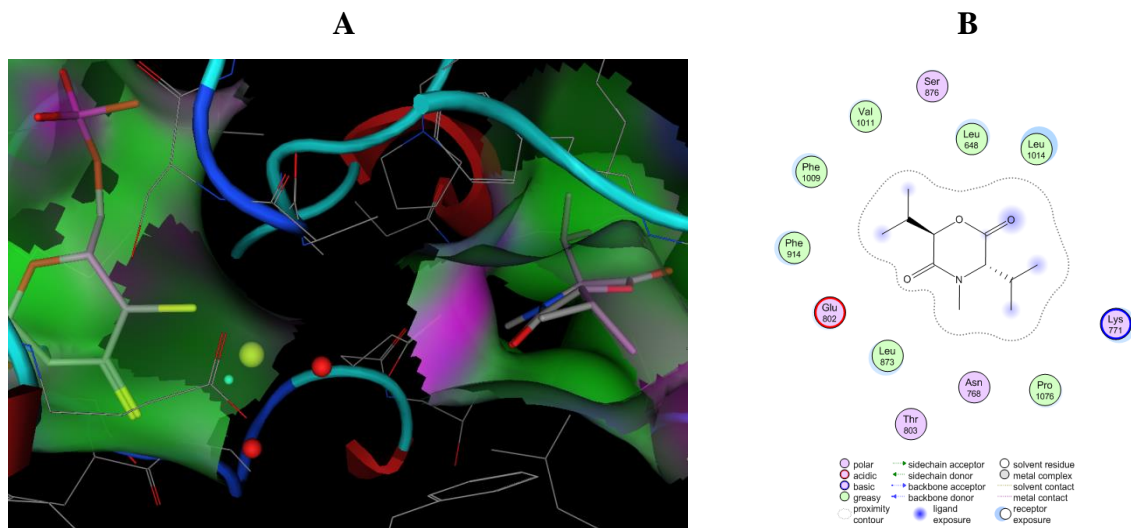


Slika 34. Inhibicija ksantin-oksidadaze u homogenatu jetre pacova jedinjenjem 241.

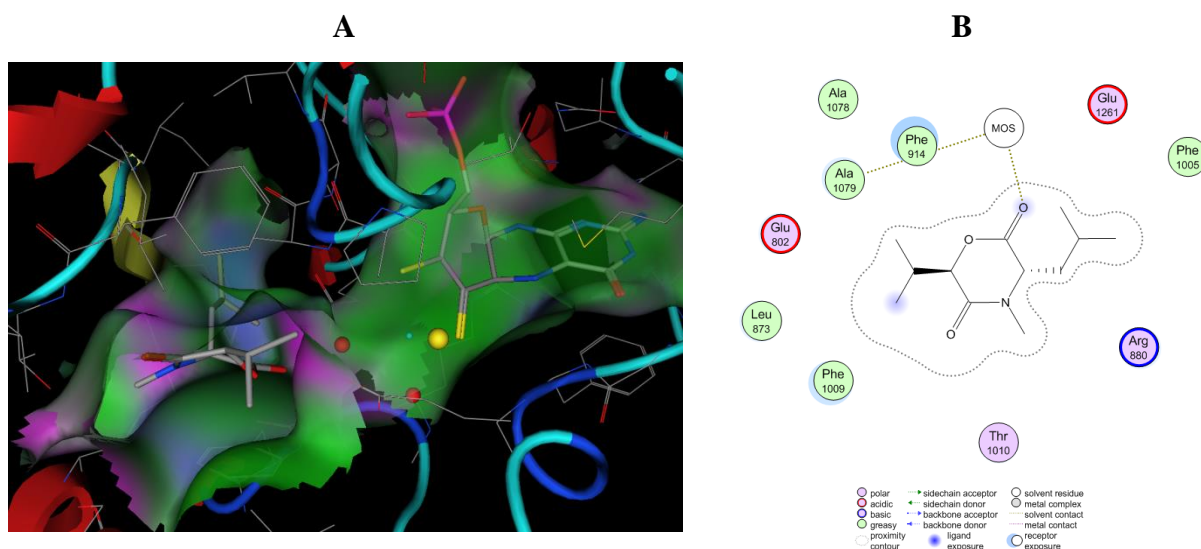


Slika 35. Inhibicija ksantin-oksidadze u homogenatu jetre pacova alopurinolom.

Poznato je da mali molekuli, kao salicilna kiselina, mogu da inhibiraju enzim bez vezivanja za metalni kompleks, blokirajući pristup potencijalnih supstrata prema molibdenu (Enroth i saradnici, 2000). Tri ispitivana 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona (**239-241**) sadrže nepurinski skelet, alkil i karbonilne grupe, preko kojih interaguju sa ksantin-oksidadzom. Predikcija *docking* konformacija (**A**) i dvodimenzionalni prikaz interakcija (**B**) jedinjenja **239** i **240** sa ksantin-oksidadzom iz goveđeg mleka (PDB entry code: 1FIQ) upotrebom MOE softvera su dati na slikama 36 i 37.



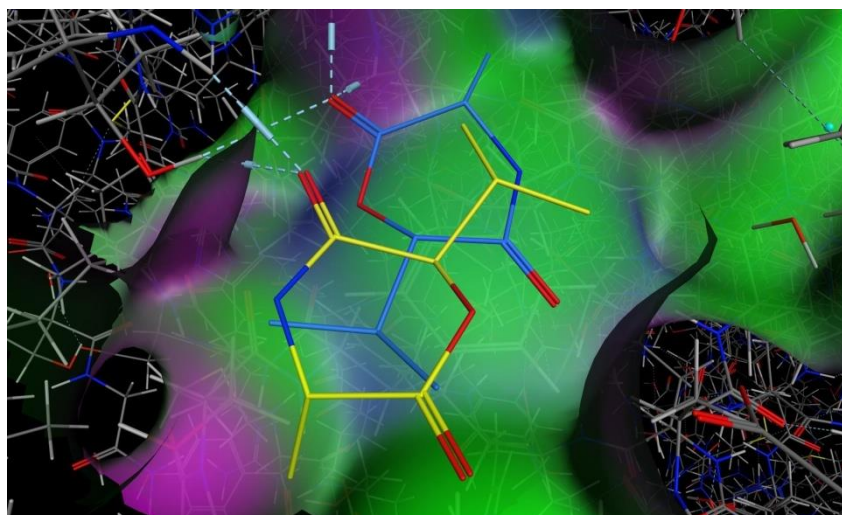
Slika 36. *Docking* konformacija (**A**) i dvodimenzionalni prikaz interakcija (**B**) jedinjenja **239** sa ksantin-oksidadzom iz goveđeg mleka (PDB entry code: 1FIQ) (Smelcerovic i saradnici, 2013).



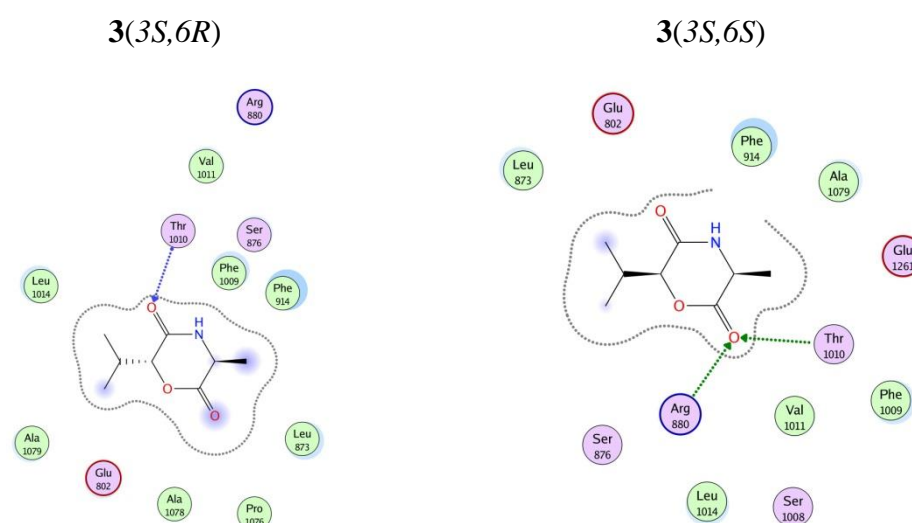
Slika 37. *Docking* konformacija (A) i dvodimenzionalni prikaz interakcija (B) jedinjenja **240** sa ksantin-oksidadom iz goveđeg mleka (PDB entry code: 1FIQ) (Smelcerovic i saradnici, 2013).

Jedinjenja **239** i **240** odlično fituju sa aktivnim centrom enzima. Jedinjenje **240** ulazi dublje u aktivni centar nego **239**. Estarska karbonilna grupa jedinjenja **240** interaguje sa dioksotiomolibdenskom jedinicom molibdo-pterinskog centra (slika 37B). Jedinjenje **239** ne interaguje direktno sa dioksotiomolibdenskom jedinicom, ali vrlo efikasno blokira pristup potencijalnih supstrata metalu. Lipofilne interakcije sa susednim amino kiselinama stabilizuju vezivanje jedinjenja **239** i **240** za aktivni centar ksantin-oksidade (slike 36B i 37B).

Jedinjenje **241** je sintetisano kao smeša dva diastereoizomera (Yancheva i saradnici, 2012). *Docking* konformacije ispitivanih diastereoizomera (**241(3S,6R)** i **241(3S,6S)**) su prikazane na slici 38, dok je na slici 39 dat dvodimenzionalni prikaz interakcija navedenih diastereoizomera jedinjenja **241** sa ksantin-oksidadom.



Slika 38. Docking konformacije diastereoizomera (3*S*,6*R*) i (3*S*,6*S*) jedinjenja **241** sa ksantin-oksidadom iz goveđeg mleka (PDB entry code: 1FIQ). Kod diastereoizomera (3*S*,6*R*) ugljenik je obeležen žutom bojom, dok je kod izomera (3*S*,6*S*) obeležen plavom bojom (Šmelcerović i saradnici, 2015).

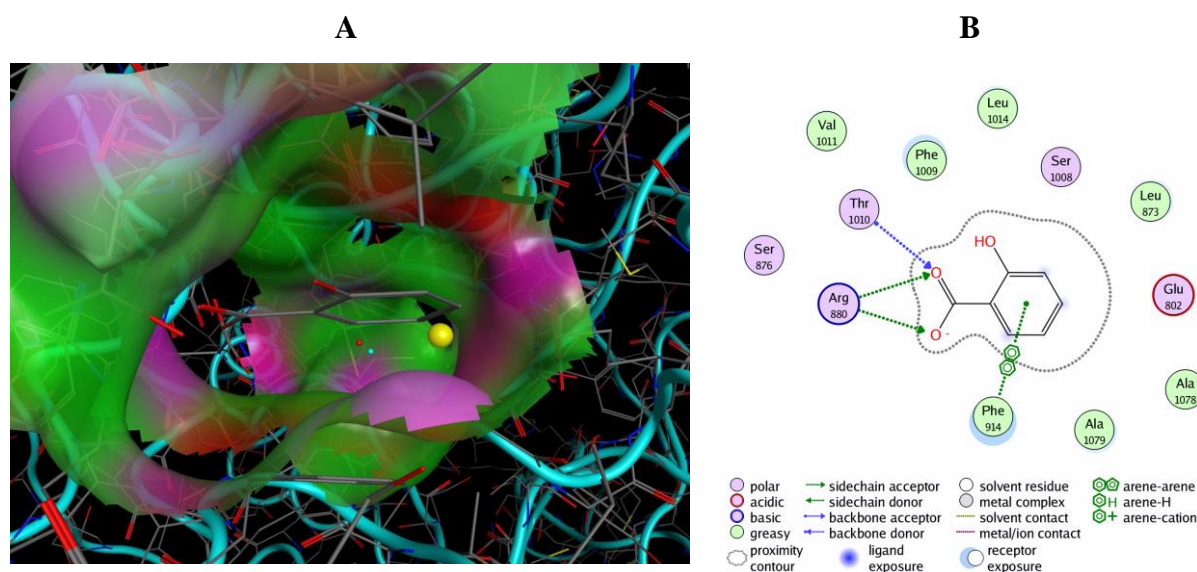


Slika 39. Dvodimenzionalni prikaz interakcija diastereoizomera (3*S*,6*R*) i (3*S*,6*S*) jedinjenja **241** sa ksantin-oksidadom iz goveđeg mleka (PDB entry code: 1FIQ) (Šmelcerović i saradnici, 2015).

Obe forme jedinjenja **241** se vezuju na ulazu šupljine/tunela prema dioksotiomolibdenskoj jedinici aktivnog centra ksantin-oksidaze, blokirajući prilaz supstratima prema atomu metala. Lipofilne interakcije sa susednim amino kiselinama i vodonične veze sa Thr1010 i Arg880 stabilizuju vezivanje (slika 39). Kod diastereoizomera **241**(3*S*,6*R*) obrazuju se vodonične veze između amidne karbonilne grupe i Thr1010, dok

diastereoizomer **241**(3*S*,6*S*) interaguje sa Thr1010 i Arg880 preko estarske karbonilne grupe. Diastereoizomer **241**(3*S*,6*S*) ulazi dublje u šupljinu aktivnog centra ksantin-oksidade.

Način vezivanja ispitivanih 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona (**239-241**) za aktivni centar ksantin-oksidade je sličan načinu vezivanja salicilne kiseline (Enroth i saradnici, 2000) i febuksostata (Okamoto i saradnici, 2003) za navedeni enzim, jer ispitivana jedinjenja ne obrazuju kovalentne veze sa atomom molibdena. Salicilna kiselina se vezuje za aktivni centar ksantin-oksidade preko karbonilne grupe koja obrazuje vodonične veze sa Arg880 i Thr1010, i fenil grupe sa Phe914 (slika 40).



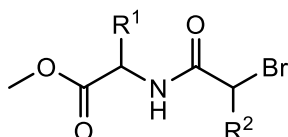
Slika 40. Docking konformacija (A) i dvodimenzionalni prikaz interakcija (B) salicilne kiseline sa ksantin-oksidadom iz goveđeg mleka (PDB entry code: 1FIQ) (Smelcerovic i saradnici, 2013).

5.1.2. Inhibicija ksantin-oksidade acikličnim *N*-(α -bromacil)- α -amino estrima

Tri aciklična *N*-(α -bromacil)- α -amino estra, metil-2-(2-brom-3-metilbutanamido)-pentanoat (**242**), metil-2-(2-brom-3-metilbutanamido)-2-fenilacetat (**243**) i metil-2-(2-brom-3-metilbutanamido)-3-fenilpropanoat (**244**), nisu pokazala značajniji uticaj na aktivnost komercijalne ksantin-oksidade i ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova (tabele 34 i 35). Potencijalni uzrok zabeleženog odsustva značajnije inhibicije ksantin-oksidade može predstavljati aciklična struktura jedinjenja **242-244**, što je u saglasnosti sa pretpostavkom da je ciklična struktura neophodna za ispoljavanje biološke aktivnosti depsipeptida (Lemmens-Gruber i saradnici, 2009). Međutim, usled odsustva biološke aktivnosti, ispitivani estri mogu

potencijalno biti implementirani za dizajn nosača u sintezi prolekova (Šmelcerović i saradnici, 2016).

Tabela 34. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade acikličnim *N*-(α -bromacil)- α -amino estrima **242-244** (Šmelcerović i saradnici, 2016)

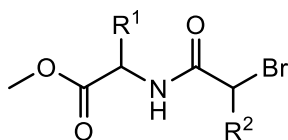


Opšta struktura jedinjenja 242-244

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μg/mL]
242	(CH ₂) ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	> 50
243	C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂	> 50
244	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂	> 50

Pozitivna kontrola alopurinol, IC₅₀ = 0,26 μg/mL

Tabela 35. Inhibicija ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova acikličnim *N*-(α -bromacil)- α -amino estrima **242-244** (Šmelcerović i saradnici, 2016)



Opšta struktura jedinjenja 242-244

Jedinjenje	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μg/mL]
242	(CH ₂) ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	> 50
243	C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂	> 50
244	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂	> 50

Pozitivna kontrola alopurinol, IC₅₀ = 0,79 μg/mL

5.2. Inhibicija ksantin-oksidade 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onima

Uticaj 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona na aktivnost ksantin-oksidade je ispitan *in vitro* na komercijalnom i na enzimu homogenata jetre pacova. Devetnaest od trideset ispitivanih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona inhibiraju komercijalnu ksantin-oxidazu sa IC₅₀

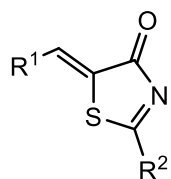
vrednostima nižim od 50 µg/mL (tabela 36, slike 41-59). Osam jedinjenja inhibiraju ksantin-oksidadu u homogenatu jetre pacova sa IC₅₀ vrednostima nižim od 50 µg/mL (tabela 37, slike 60-67).

4-((2-Benzilamino-4-oksotiazol-5(4*H*)-iliden)-metil)-benzonitril (jedinjenje **258**) se pokazao kao najefikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidade (IC₅₀ = 17,16 µg/mL) i ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova (IC₅₀ = 24,50 µg/mL).

Jedinjenja koja sadrže 4-cijanobenzilidensku grupu (jedinjenja **255-259**) ili (indol-3-il)-metilensku grupu (jedinjenja **265-269**) u položaju 5 tiazol-4-onske strukture inhibiraju komercijalnu ksantin-oksidadu sa IC₅₀ vrednostima nižim od 50 µg/mL (tabela 36). Navedena jedinjenja koja sadrže 4-cijanobenzilidensku grupu, sa izuzetkom jedinjenja **255** koje sadrži piperidinil grupu kao 2-amino supstituent, inhibiraju ksantin-oksidadu u homogenatu jetre pacova sa IC₅₀ vrednostima nižim od 50 µg/mL. Jedinjenja koja sadrže (indol-3-il)-metilensku grupu kao supstituent u položaju 5 inhibiraju ksantin-oksidadu u homogenatu jetre pacova sa IC₅₀ vrednostima višim od 50 µg/mL (tabela 37).

Alopurinol, se pokazao kao efikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidade (IC₅₀ = 0,26 µg/mL, slika 31) i ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova (IC₅₀ = 0,79 µg/mL, slika 35) od ispitivanih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona **245-274** (Smelcerovic i saradnici, 2015).

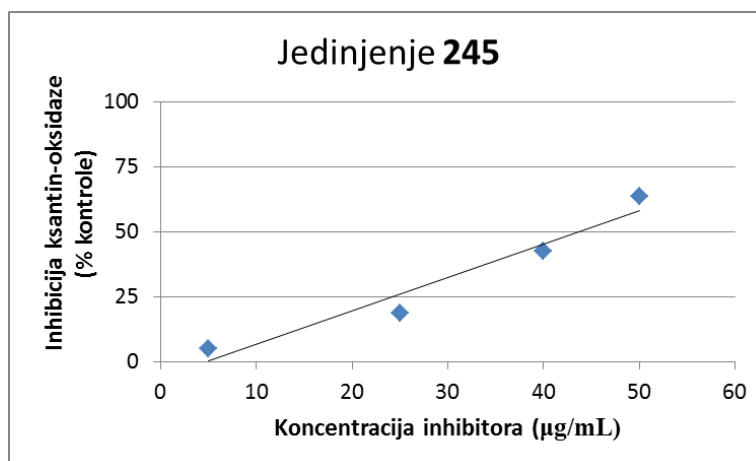
Tabela 36. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onima **245-274** (Smelcerovic i saradnici, 2015)



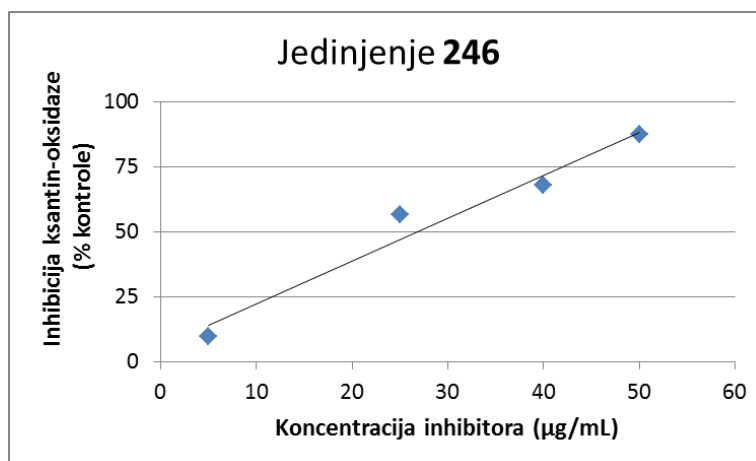
Opšta struktura jedinjenja 245-274

R¹	R² Oznaka jedinjenja IC₅₀ (µg/mL)	R²					
	245 43,45	246 26,67	247 >50	248 >50	249 >50		
	250 >50	251 25,82	252 >50	253 37,57	254 39,41		
	255 33,18	256 24,73	257 25,98	258 17,16	259 32,53		
	260 >50	261 >50	262 >50	263 31,77	264 >50		
	265 21,43	266 23,17	267 27,03	268 33,62	269 44,08		
	270 27,24	271 >50	272 >50	273 39,77	274 33,85		

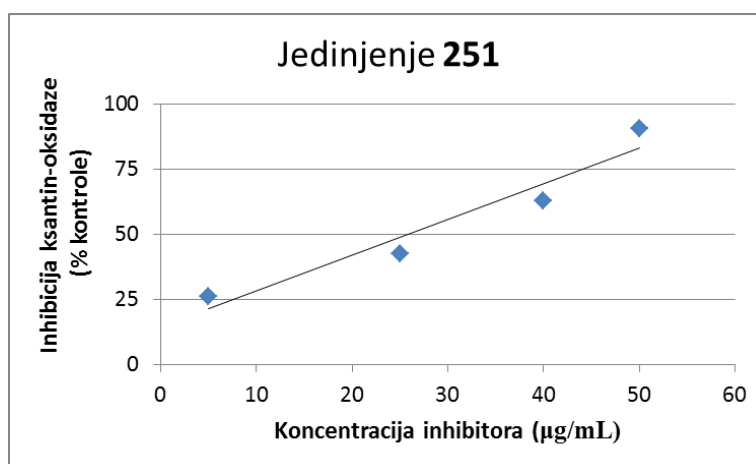
Pozitivna kontrola alopurinol, IC₅₀ = 0,26 µg/mL



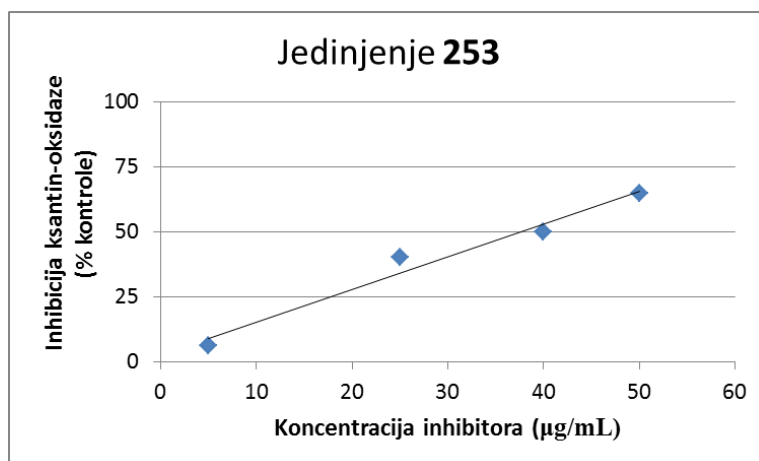
Slika 41. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **245**.



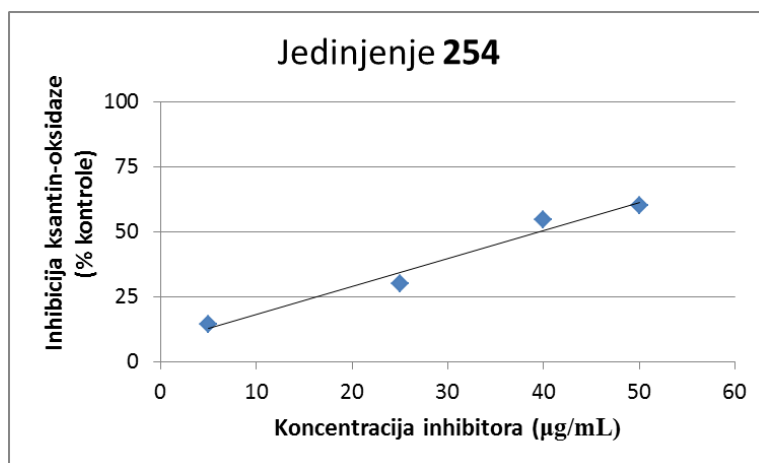
Slika 42. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **246**.



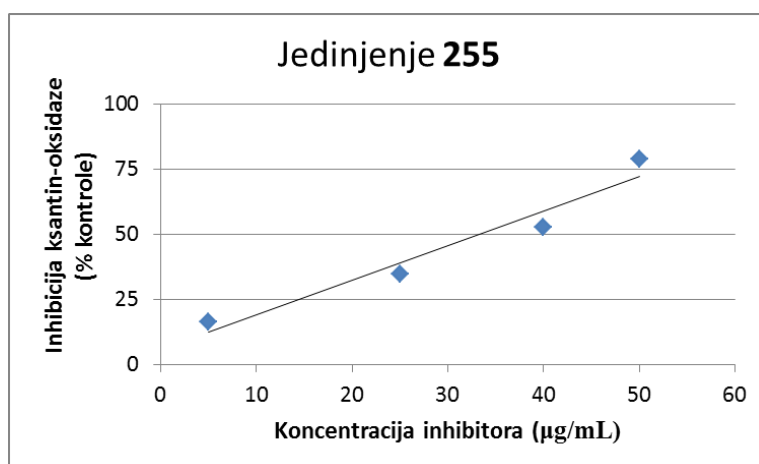
Slika 43. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **251**.



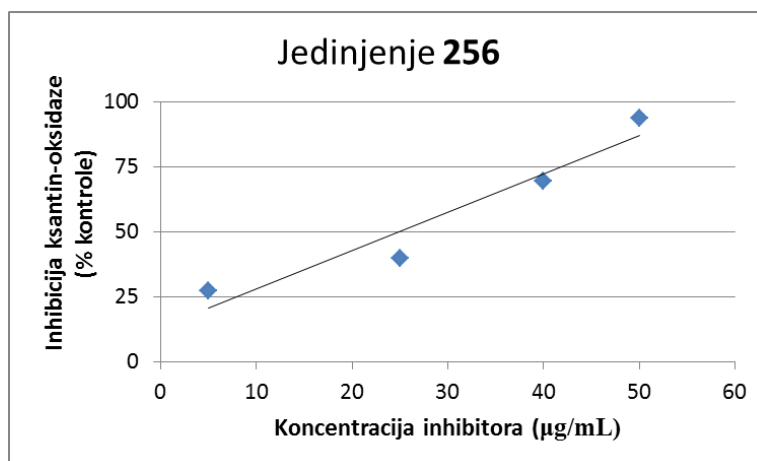
Slika 44. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem 253.



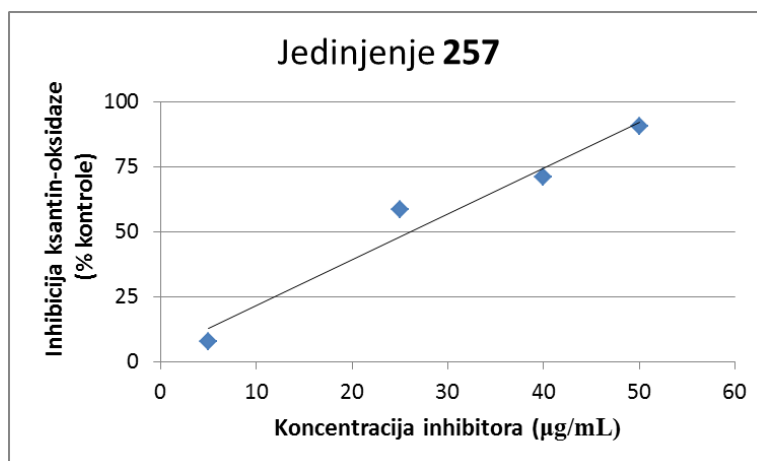
Slika 45. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem 254.



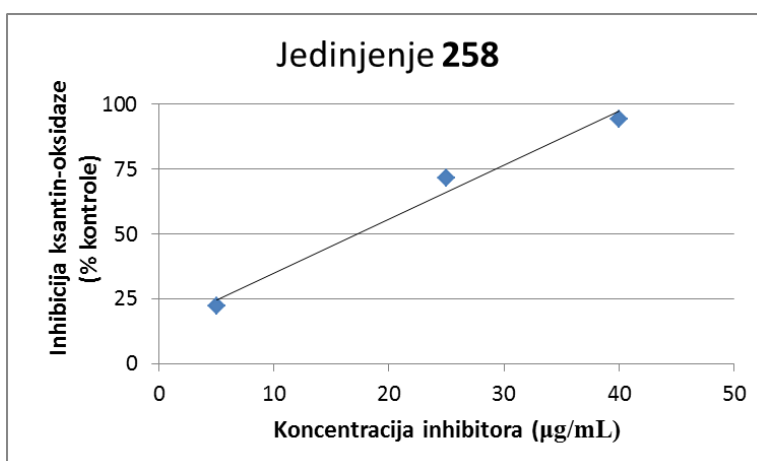
Slika 46. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem 255.



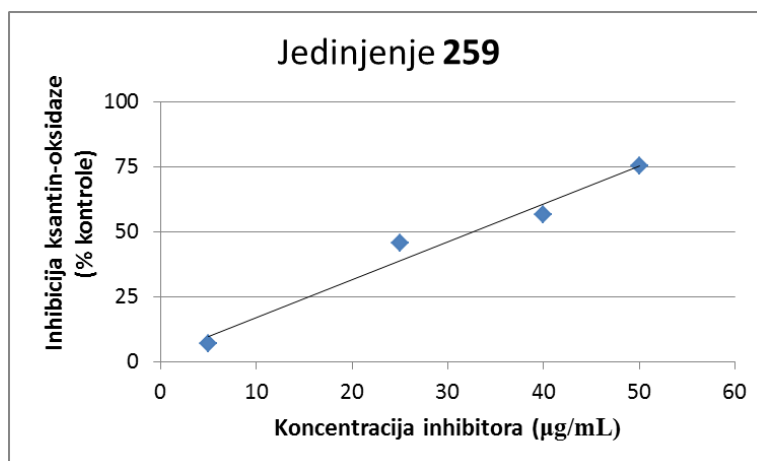
Slika 47. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem 256.



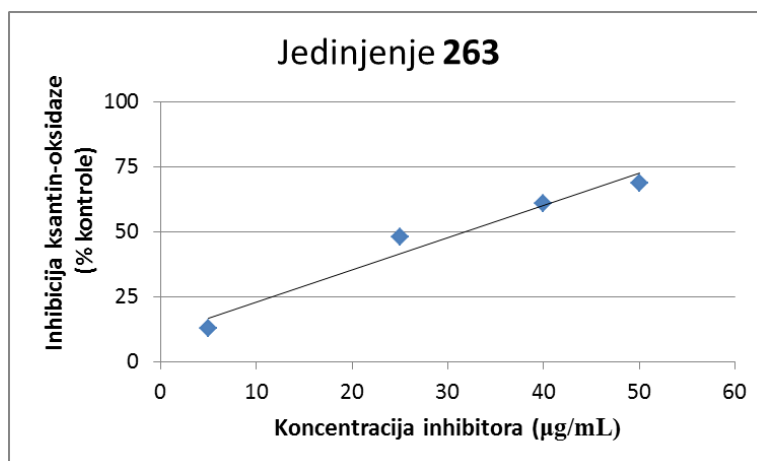
Slika 48. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem 257.



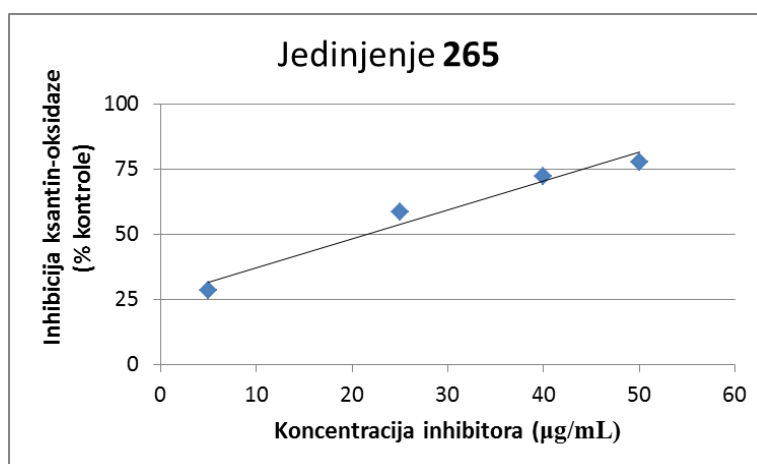
Slika 49. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem 258.



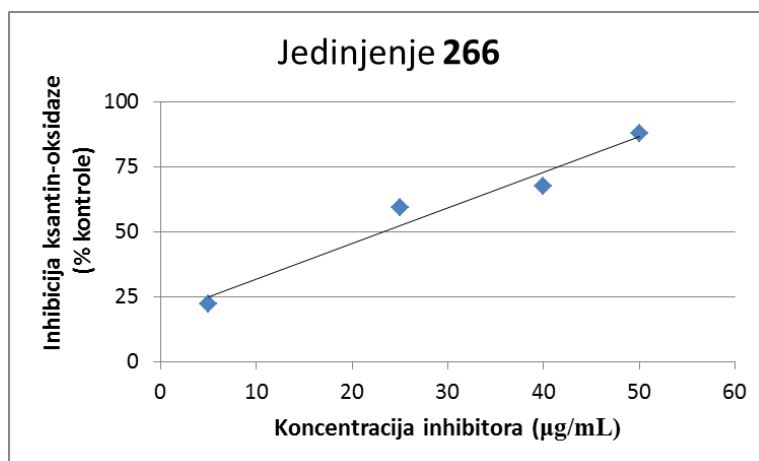
Slika 50. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **259**.



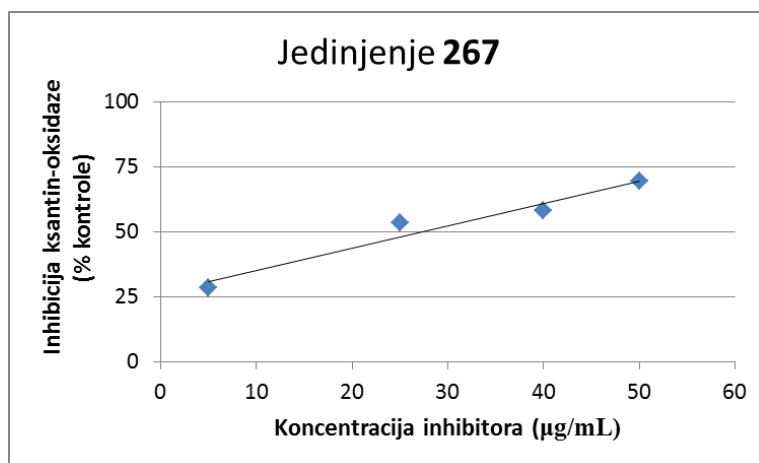
Slika 51. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **263**.



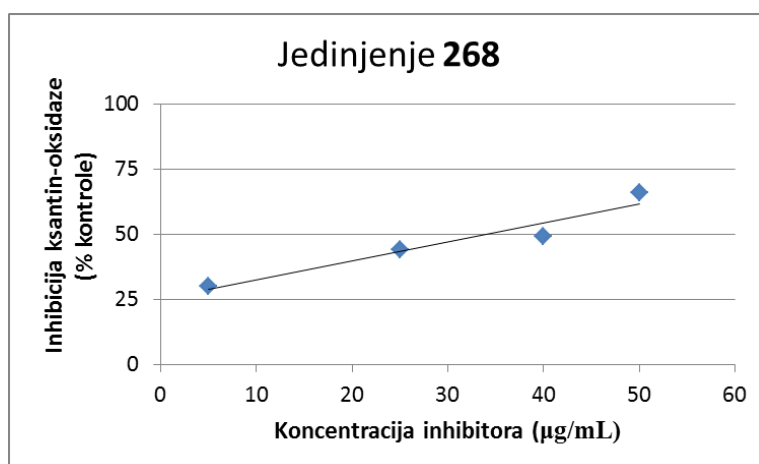
Slika 52. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **265**.



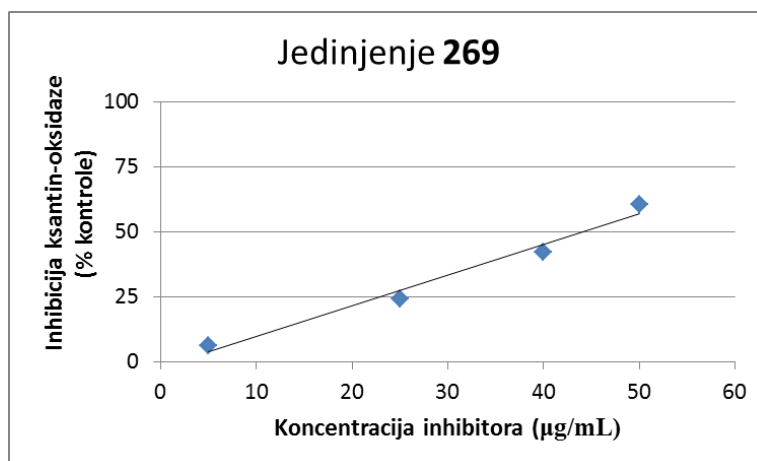
Slika 53. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **266**.



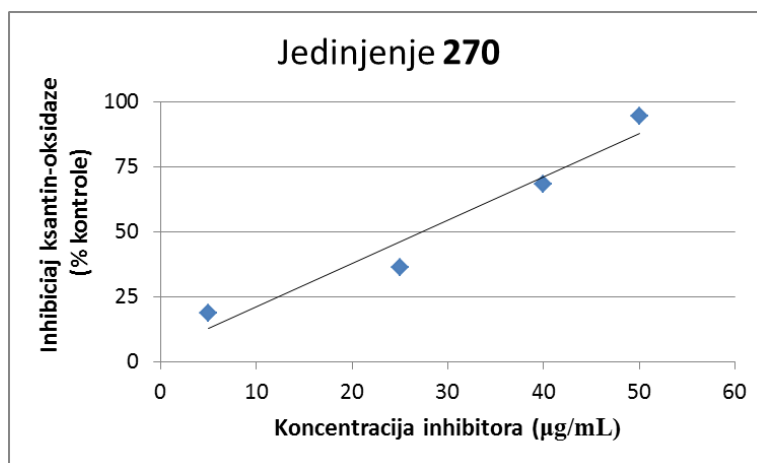
Slika 54. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **267**.



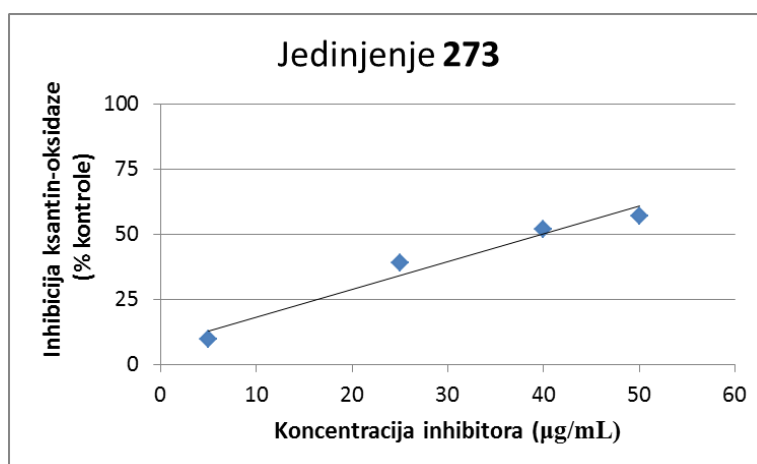
Slika 55. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **268**.



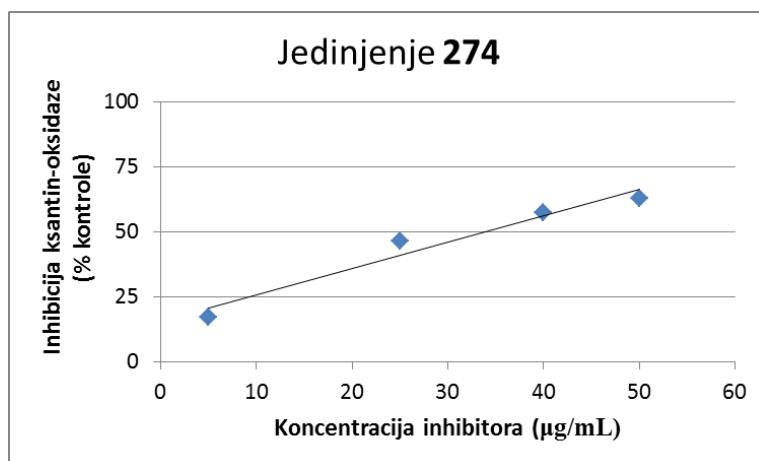
Slika 56. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **269**.



Slika 57. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **270**.

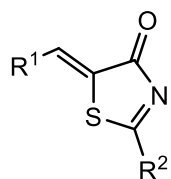


Slika 58. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **273**.



Slika 59. Inhibicija komercijalne ksantin-oksidade jedinjenjem **274**.

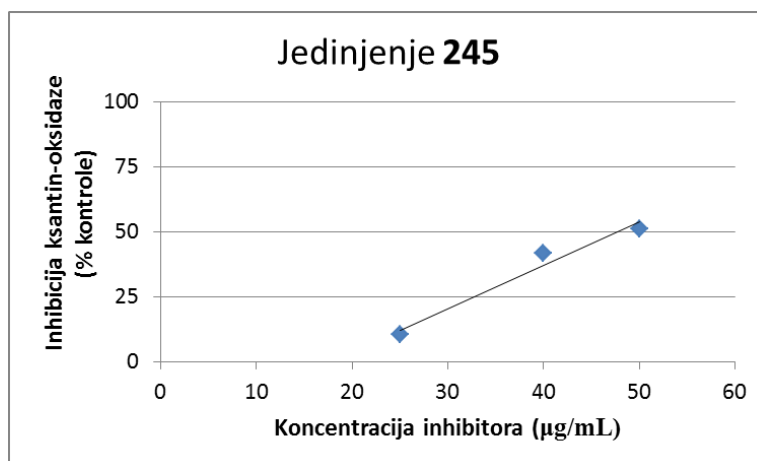
Tabela 37. Inhibicija ksantin-oksidadze u homogenatu jetre pacova 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onima **245-274** (Smelcerovic i saradnici, 2015)



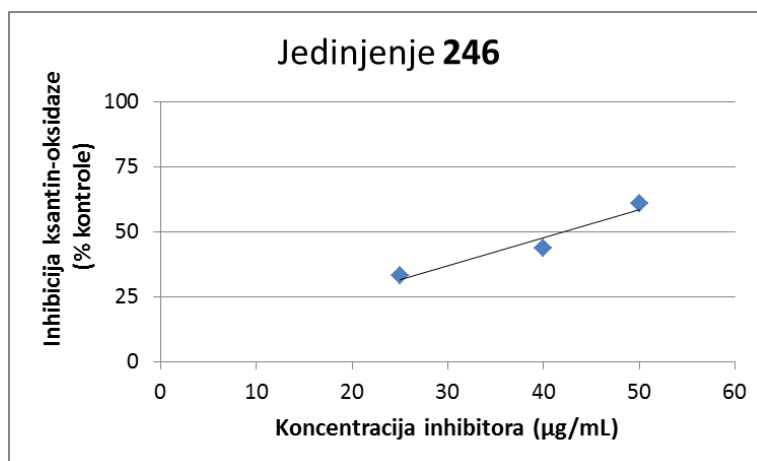
Opšta struktura jedinjenja 245-274

R ¹	R ²					
	Oznaka jedinjenja IC ₅₀ (µg/mL)					
	245 47,71	246 42,02	247 >50	248 >50	249 >50	
	250 >50	251 >50	252 >50	253 40,87	254 >50	
	255 >50	256 33,98	257 29,25	258 24,50	259 48,16	
	260 >50	261 >50	262 >50	263 >50	264 >50	
	265 >50	266 >50	267 >50	268 >50	269 >50	
	270 48,56	271 >50	272 >50	273 >50	274 >50	

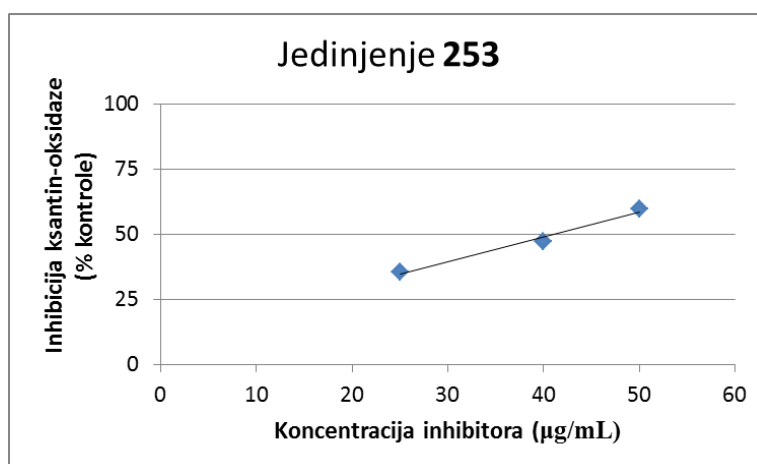
Pozitivna kontrola alopurinol, IC₅₀ = 0,79 µg/mL



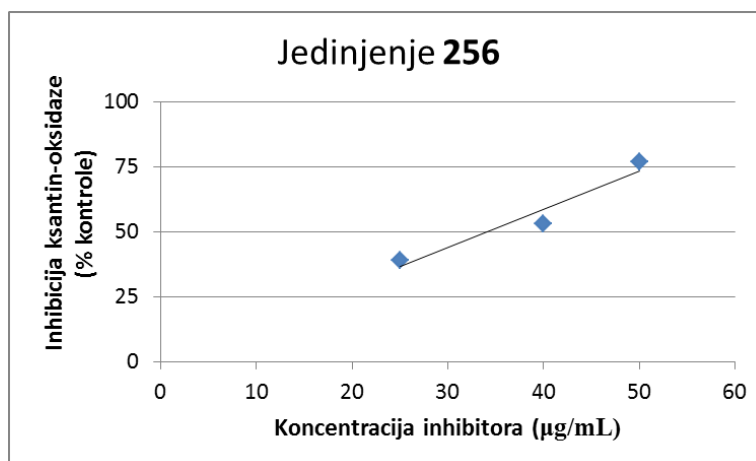
Slika 60. Inhibicija ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova jedinjenjem **245**.



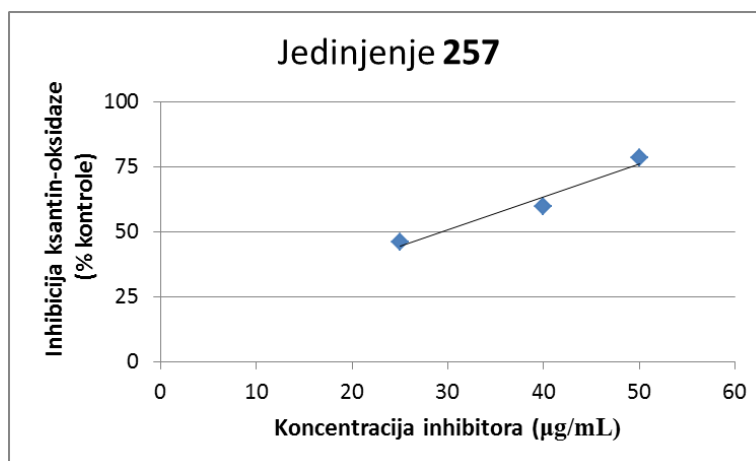
Slika 61. Inhibicija ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova jedinjenjem **246**.



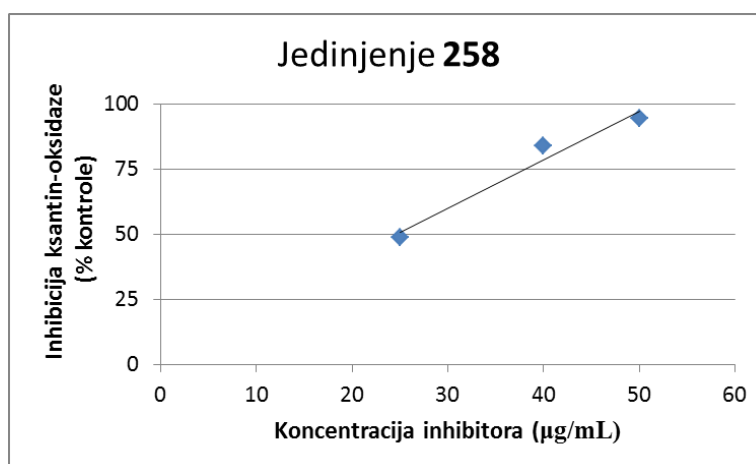
Slika 62. Inhibicija ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova jedinjenjem **253**.



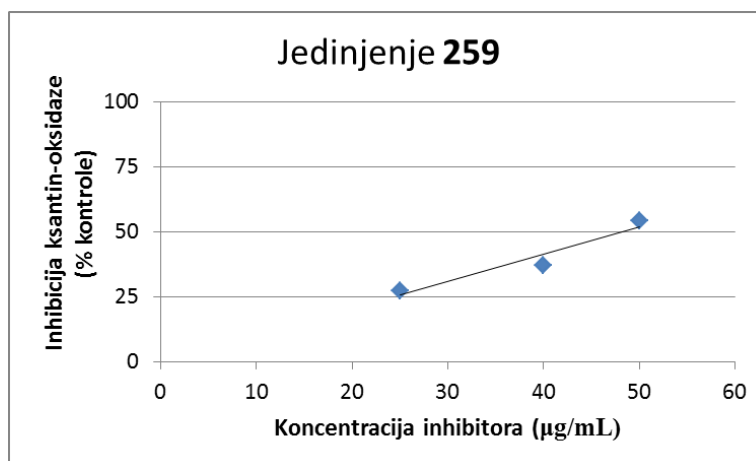
Slika 63. Inhibicija ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova jedinjenjem **256**.



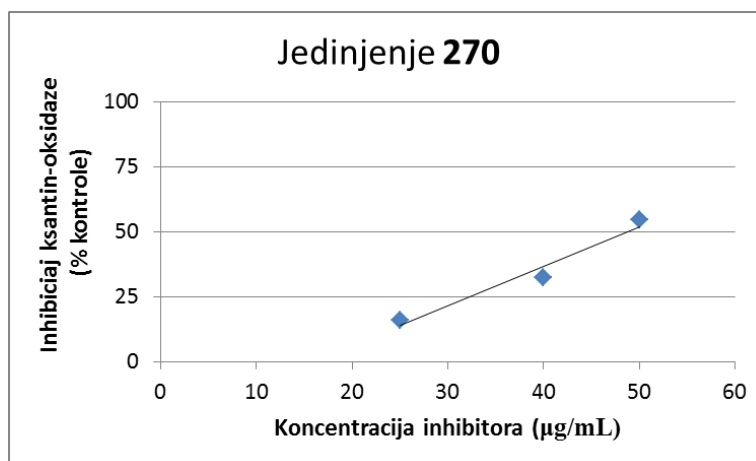
Slika 64. Inhibicija ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova jedinjenjem **257**.



Slika 65. Inhibicija ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova jedinjenjem **258**.

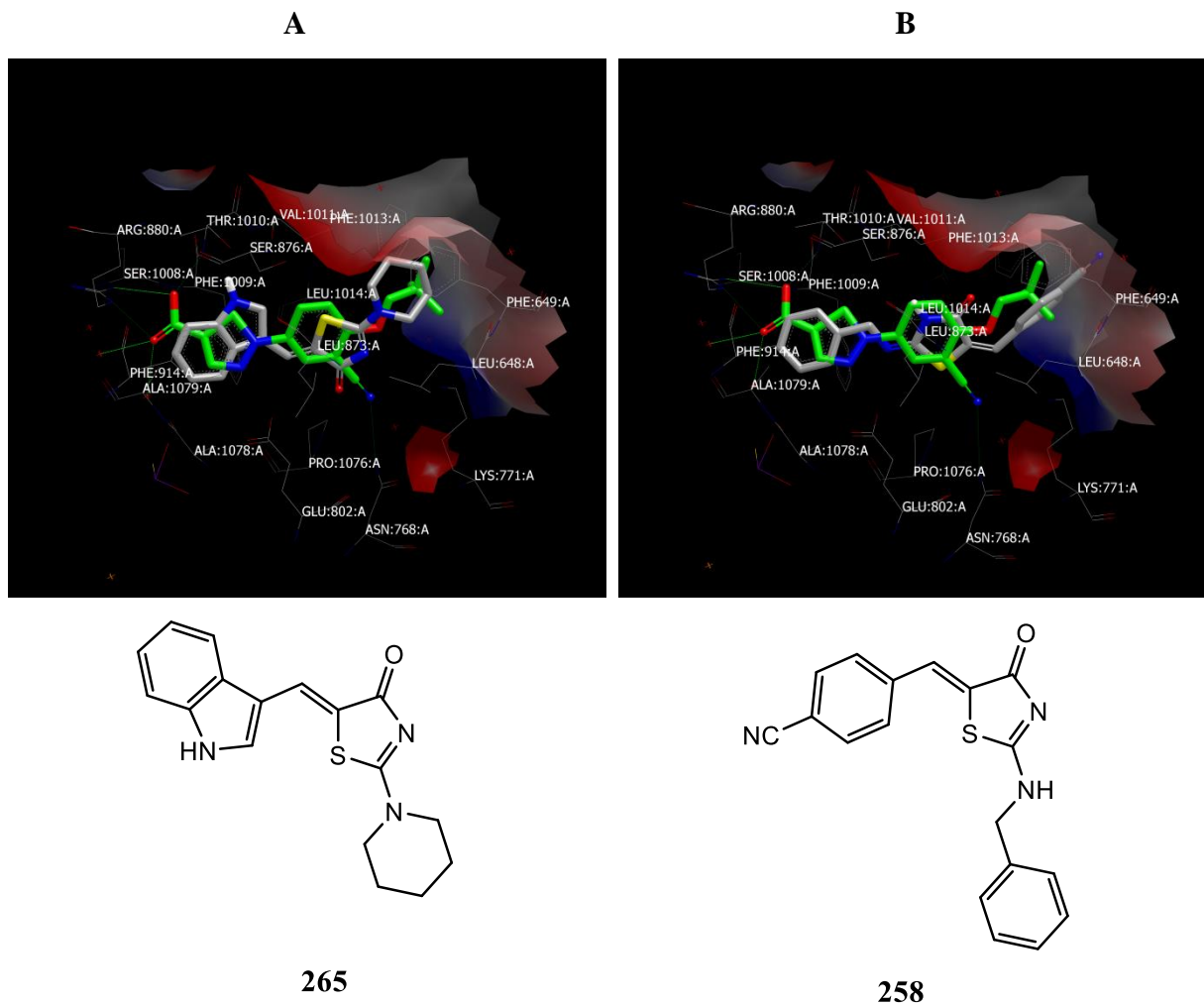


Slika 66. Inhibicija ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova jedinjenjem **259**.



Slika 67. Inhibicija ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova jedinjenjem **270**.

Docking studija pomoću FRED softvera (OEDocking version 3.0.1. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>) je ukazala na dva moguća načina interakcije ispitivanih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona sa ksantin-oksidgeom, koji zavise od prirode amino grupe. Jedinjenja sa tercijarnom cikličnom amino strukturom interaguju ariliden ostatkom sa Arg880, dok je amino grupa van vezujućeg mesta ("amine-out" način vezivanja). Jedinjenja sa benzilamino grupom stupaju preko ove funkcionalne grupe u interakciju sa Arg880 ostatkom enzima ("amine-in" način vezivanja) (slika 68).



Slika 68. Dva predložena načina vezivanja ispitivanih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona sa ksantin-oksidadom iz goveđeg mleka kokristalisanom sa 1-[3-cijano-4-(dimetilpropoksi)-fenil]-pirazol-4-karboksilnom kiselinom (PDB entry code: 1VDV): **A** – "amine-out" način vezivanja na primeru jedinjenja **265**, i **B** – "amine-in" način vezivanja na primeru jedinjenja **258**. Ugljenikovi atomi standardnog inhibitora ksantin-oksidade, 1-[3-cijano-4-(dimetilpropoksi)-fenil]-pirazol-4-karboksilne kiseline, su prikazani zelenom bojom. *Docking* studija je izvedena pomoću FRED softvera (OEDocking version 3.0.1. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>) (Smelcerovic i saradnici, 2015).

5.3 Fizičko-hemijske, farmakokinetičke i toksikološke osobine inhibitora ksantin-oksidade predviđene *in silico* metodama

5.3.1. Fizičko-hemijske karakteristike inhibitora ksantin-oksidade

Sumirajući *in silico* predviđene fizičko-hemijske parametre inhibitora ksantin-oksidade (tabela 38), jedinjenja **1-14, 16-47, 49-69, 72-88, 90-101, 103-134, 136-142, 144-183, 185-191, 199, 200, 202-209, 212, 213, 216, 218-235, 237, 239-261, 264-274** ispunjavaju "Pravilo pet" Lipinskog i kriterijume dobre rastvorljivosti i permeabilnosti. Ova jedinjenja ispunjavaju i "pravila Vebera", pa se smatra da mogu penetrirati biološke membrane i pokazati zadovoljavajući stepen bioraspoloživosti.

Tabela 38. Fizičko-hemijski parametri inhibitora ksantin-oksidade predviđeni softverom *Molinspiration* (Molinspiration Cheminformatics, <http://www.molinspiration.com/>)

Fizičko-hemijski parametri	Inhibitori ksantin-oksidade
$m_i \log P^a > 5$	15, 48, 70, 71, 89, 135, 192-198, 210, 211, 214, 215, 217, 262, 263
$m_i \log P < 5$	1-14, 16-47, 49-69, 72-88, 90-134, 136-191, 199-209, 212, 213, 216, 218-261, 264-274
$m_i \log P < 0$	1, 165, 219-221
$TPSA^b > 140 \text{ \AA}^2$	142, 143, 153-155, 177, 184, 201, 236, 238
$TPSA < 140 \text{ \AA}^2$	1-141, 144-152, 156-176, 178-183, 185-200, 202-235, 237, 239-274
$TPSA < 60 \text{ \AA}^2$	25, 45-48, 90, 129-131, 133-135, 156, 185, 187-198, 210-215, 217, 239-255, 257, 259-270, 272, 274
$MW^c > 500$	143, 184, 201
$MW < 500$	1-142, 144-183, 185-200, 202-274
$N_{ON}^d > 10$	184, 201, 236, 238
$N_{ON} \leq 10$	1-183, 185-200, 202-235, 237, 239-274
$N_{OHNH}^e > 5$	102, 143, 238
$N_{OHNH} \leq 5$	1-101, 103-142, 144-237, 239-274
$N_{rotb.}^f > 10$	184, 201
$N_{rotb.} \leq 10$	1-183, 185-200, 202-274

^aparticioni koeficijent oktanol/voda

^bpolarnost, kapacitet formiranja vodoničnih veza

^cmolekulska masa

^dbroj akceptora vodoničnih veza (O i N atomi)

^ebroj donora vodoničnih veza (OH i NH grupe)

^fbroj veza sa mogućnošću rotacije

5.3.2. Farmakokinetički parametri inhibitora ksantin-oksidadze

Farmakokinetički parametri selektovanih inhibitora ksantin-oksidadze (**1-274**) su predviđeni *admetSAR* softverom (*admetSAR*, <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/predict/>). Dobijene vrednosti (tabela 39) pokazuju da je povoljan stepen humane intestinalne apsorpcije predviđen za sve inhibitore, osim za **201** i **238**, što navodi na zaključak da veliki broj selektovanih jedinjenja predstavlja kandidate za nastavak evaluacije. Veliki broj (polovina) jedinjenja su adekvatnog stepena lipofilnosti za penetraciju preko hematoencefalne barijere. P-glikoprotein pokazuje uticaj na preuzimanje i na ekskreciju leka. Ovaj protein prepoznaje molekul leka nakon preuzimanja, intracelularne distribucije i metabolizma u jetri i bubrezima, a pre intracelularne distribucije i metabolizma u intestinumu. Zbog preklapanja specifičnosti za supstrat i koekspresije CYP3A izoenzima i P-glikoproteina u intestinumu, bubrezima i jetri, P-glikoprotein ima značajnu ulogu u biotransformaciji leka. Poput CYP-posredovanih interakcija leka, interakcije posredovane P-glikoproteinom su izvesne u slučaju istovremene primene njegovih supstrata i inhibitora/induktora. Iako manje učestalosti, farmakokinetičke posledice inhibicije/indukcije P-glikoproteina su slične onim nastalim inhibicijom/indukcijom CYP izoenzima (Lin i Yamazaki, 2003). Sa druge strane, i organski katjonski transporteri učestvuju u apsorpciji i distribuciji leka. Različiti su mehanizmi prenosa leka organskim katjonskim transporterima u apsorpciji i distribuciji u bubrezima, jetri i intestinumu (Zhang i saradnici, 1998). Procena da li selektovani inhibitori ksantin-oksidadze predstavljaju supstrate i/ili inhibitore P-glikoproteina i/ili renalnog organskog katjonskog transportera je od značaja sa aspekta apsorpcije, biotransformacije i ekskrecije. Procenjeno je da veći broj jedinjenja (tabela 39) predstavlja supstrate za P-glikoprotein, što značajno utiče na njihovu bioraspoloživost. Jedinjenja za koja se predviđa da su inhibitori jedne od dve izoforme P-glikoproteina, odgovorne za multi-rezistenciju na lek, su: **18-20, 23, 24, 28-31, 45, 46, 48, 51, 59, 63, 81-85, 87, 89, 111, 120-122, 134, 138, 145-150, 179, 182, 184, 192-198, 201, 202, 204, 208, 210-213, 216-218, 240, 245-247, 250-252, 255-258, 260-272**, od kojih jedinjenja **89, 184, 192-195, 197, 198, 201, 210-212, 255, 257, 260-262, 264-267** mogu inhibirati obe izoforme P-glikoproteina. Navedena jedinjenja mogu imati nizak stepen bioraspoloživosti.

Tabela 39. Parametri apsorpcije inhibitora ksantin-oksidade predviđeni softverom *admetSAR* (admetSAR, <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/predict/>)

Parametri apsorpcije	Inhibitori ksantin-oksidade
Hematoencefalna barijera - penetracija +	1-6, 8, 10, 11, 13-25, 30-48, 51-57, 59, 60, 63, 64, 66-71, 79-81, 84-88, 90, 91, 95, 103-109, 111-136, 142-144, 146-151, 153-183, 185-198, 202, 204, 206-208, 210-274
Hematoencefalne barijera - penetracija -	7, 9, 12, 26-29, 49, 50, 58, 61, 62, 65, 72-78, 82, 83, 89, 92-94, 96-102, 110, 137-141, 145, 152, 184, 199-201, 203, 205, 209
Humana intestinalna apsorpcija +	1-200, 202-237, 239-274
Humana intestinalna apsorpcija -	201, 238
Caco2 permeabilnost +	2, 3, 19-22, 24, 25, 32-48, 51-57, 59, 63, 64, 90-103, 105, 109, 116, 129, 130, 136-138, 143, 144, 151, 152, 156, 178-182, 189, 192-199, 203, 205-207, 210-218, 239-247, 249-252, 254-257, 259, 265, 267, 269, 270, 272
Caco2 permeabilnost -	1, 4-18, 23, 26-31, 49, 50, 58, 60-62, 65-89, 104, 106-108, 110-115, 117-128, 131-133, 139-142, 145-150, 153-155, 157-177, 183-188, 190, 191, 200-202, 204, 208, 209, 219-238, 248, 253, 258, 260-264, 266, 268, 271, 273, 274
P-glikoprotein supstrat +	4, 5, 50, 61, 66-71, 82, 92, 137-141, 143, 145-155, 157-164, 199, 201-212, 222, 223, 237, 238, 245, 247, 252, 257, 260-262, 264-267, 269-272, 274
P-glikoprotein supstrat -	1-3, 6-49, 51-60, 62-65, 72-81, 83-91, 93-136, 142, 144, 156, 165-198, 200, 213-221, 224-236, 239-244, 246, 248-251, 253-256, 258, 259, 263, 268, 273
P-glikoprotein inhibitor (Klasa I) +	89, 134, 184, 192-195, 197, 198, 201, 210-213, 240, 245-247, 250-252, 255-257, 260-

	262, 264-267, 270-272
P-glikoprotein inhibitor (Klasa I) -	1-88, 90-133, 135-183, 185-191, 196, 199, 200, 202-209, 214-239, 241-244, 248, 249, 253, 254, 258, 259, 263, 268, 269, 273, 274
P-glikoprotein inhibitor (Klasa II) +	18-20, 23, 24, 28-31, 45, 46, 48, 51, 59, 63, 81-85, 87, 89, 111, 120-122, 138, 145-150, 179, 182, 184, 192-198, 201, 202, 204, 208, 210-212, 216-218, 255, 257, 258, 260-269
P-glikoprotein inhibitor (Klasa II) -	1-17, 21, 22, 25-27, 32-44, 47, 49, 50, 52-58, 60-62, 64-80, 86, 88, 90-110, 112-119, 123-137, 139-144, 151-178, 180, 181, 183, 185-191, 199, 200, 203, 205-207, 209, 213-215, 219-254, 256, 259, 270-274
Renalni organski katjon transporter inhibitor +	245-247, 249, 250, 252, 254-257, 259-267, 269, 270
Renalni organski katjon transporter inhibitor -	1-244, 248, 251, 253, 258, 268, 271-274

Parametri metabolizma predviđeni primenom softvera *admetSAR* (*admetSAR*, <http://Immd.ecust.edu.cn:8000/predict/>) razlikuju se među selektovanim inhibitorima (tabela 40). Selektovana jedinjenja su podvrgnuta proceni da li su supstrati/inhibitori određenih CYP450 izoenzima. Nijedno od ispitivanih jedinjenja nije procenjeno kao supstrat CYP2C9 i 2D6 izoenzima, dok je za veći broj procena da se mogu ponašati kao supstrat za CYP3A4 izoenzim. Jedinjenja za koja se predviđa da su inhibitori CYP450 enzima, prevashodno predstavljaju inhibitore CYP3A4, 1A2, 2C9 i 2C19 izoenzima. Za jedinjenja sa niskim CYP inhibitornim potencijalom se pretpostavlja da će imati adekvatno poluvreme eliminacije sa aspekta mogućnosti dugotrajne primene i manje verovatnoće stupanja u interakcije.

Tabela 40. Parametri metabolizma inhibitora ksantin-oksidade predviđeni softverom *admetSAR* (admetSAR, <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/predict/>)

Parametri metabolizma	Inhibitori ksantin-oksidade
CYP2C9 supstrat	-
CYP2D6 supstrat	-
CYP3A4 supstrat	19, 20, 23-25, 28, 29, 50, 54, 60, 76, 83, 89, 109-111, 114, 117, 118, 120-123, 125-128, 134, 137, 152, 162, 173, 179, 184-198, 201, 213, 216, 227, 232, 239-242, 244-247, 251, 252, 255-257, 260-262, 264-267, 269-272, 274
CYP1A2 inhibitor	2, 3, 19, 21, 23-28, 30, 31, 33-53, 55-59, 61, 63-74, 76-81, 83-85, 87, 88, 91-109, 111-113, 115, 117-120, 123, 125-127, 129-133, 134-141, 143, 144, 151, 152, 156-158, 165, 167-174, 176-182, 185-222, 225-235, 237, 243-274
CYP2C9 inhibitor	2, 25, 31, 33-36, 38-41, 44, 46-48, 50-53, 55-59, 61, 63, 64, 66-74, 76, 77, 81, 82, 84, 85, 87, 89, 91, 92, 97, 98, 100-106, 113, 115, 132, 134-138, 142-144, 151, 153-155, 157-159, 163, 183, 185-199, 202, 203, 205-214, 217, 245, 247-250, 253-255, 257-260, 262-265, 267-269, 273
CYP2D6 inhibitor	217, 273
CYP2C19 inhibitor	2, 20, 24, 25, 31, 33-40, 44, 47, 49, 55, 56, 59, 63-73, 76-78, 81-85, 87-89, 92, 103, 105-107, 113-115, 122, 125-128, 134-136, 138, 142-144, 151, 153-155, 178-183, 185-199, 203, 205-218, 245-274
CYP3A4 inhibitor	3, 22, 30, 31, 41, 42, 44, 68, 69, 71-73, 75, 91, 97, 98, 100-102, 104, 125, 126, 128, 132, 136-138, 139-141, 143, 144, 151, 182, 185, 192-198, 210-213, 215, 216, 265, 270, 271, 273, 274
CYP inhibitorni potencijal - visok	2, 3, 13-16, 18, 20, 22, 24-27, 30, 31, 33-39, 41-44, 47, 50, 58, 59, 61, 63-74, 76-78, 80-82, 84, 85, 87-103, 128, 132, 133, 134, 136-141, 144, 151, 156-159,

	163, 173, 174, 178-183, 185-214, 216-218, 241-244, 251
CYP inhibitorni potencijal - nizak	1, 4, 5, 6-12, 17, 19, 21, 23, 28, 29, 32, 40, 45, 46, 48, 49, 51-57, 60, 62, 75, 79, 83, 86, 104-127, 129-131, 135, 142, 143, 145-150, 152-155, 160-162, 164-172, 175-177, 184, 215, 219-240, 245-250, 252-274

5.3.3. Toksikološki parametri inhibitora ksantin-oksidge

Toksikološki parametri inhibitora ksantin-oksidge su predviđeni softverima *OSIRIS Property Explorer* (OSIRIS Property Explorer. <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) i *admetSAR* (admetSAR, <http://lmm.d.ecust.edu.cn:8000/predict/>) (tabele 41 i 42). Selektovani inhibitori ksantin-oksidge su klasifikovani u zavisnosti od procenjenog rizika za ispoljavanje mutagenog, tumorogenog, iritabilnog i nepovoljnih reproduktivnih efekata. Za veliki broj inhibitora softver *OSIRIS Property Explorer* predviđa odsustvo ispitivanih toksičnih efekata (tabela 41).

Tabela 41. Toksikološki parametri inhibitora ksantin-oksidge predviđeni softverom *OSIRIS Property Explorer* (OSIRIS Property Explorer. <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>)

Toksikološki parametri	Inhibitori ksantin-oksidge niskog rizika toksičnosti	Inhibitori ksantin-oksidge srednjeg rizika toksičnosti	Inhibitori ksantin-oksidge visokog rizika toksičnosti
Mutagenost	1-18, 25-29, 31-46, 49-65, 67-69, 71-89, 91-97, 99-109, 111, 112, 114-131, 133, 135, 141, 143-150, 152, 156, 159, 163-180, 182-191, 199-201, 203, 205-207, 217, 219-235, 237-241, 245-274	19-24, 30, 66, 90, 110, 134, 181, 210, 211, 213-216, 218, 236	47, 48, 70, 98, 113, 132, 136-140, 142, 151, 153-155, 157, 158, 160-162, 192-198, 202, 204, 208, 209, 212, 242-244
Tumorogenost	1-22, 24, 25, 30, 34,	23, 90, 124, 136-140,	26-29, 31-33, 36,

	35, 37-39, 41, 43, 45-89, 91-123, 125-130, 132-135, 141, 143-150, 152-211, 213-274	142	40, 42, 44, 131, 151, 212
Iritabilni efekti	1-3, 6-8, 10, 11, 14-19, 21, 22, 24-26, 28, 31-35, 37-39, 42-58, 60-69, 71-89, 91-97, 99-109, 111-123, 125-159, 162-198, 200-208, 210-235, 237-274	12, 23, 29, 40, 70, 90, 98, 110, 160, 161, 199, 209, 236	4, 5, 9, 13, 20, 27, 30, 36, 41, 59, 124
Toksični efekti na reproduktivni sistem	2, 4-113, 115-135, 141, 143, 144, 152-193, 195-218, 237-242, 244-269	3, 136-140, 142, 194, 219-224, 243	1, 114, 145-151, 225-236, 270-274

Procenjeno je da veliki broj ispitivanih jedinjenja ne pokazuje AMES toksičnost i kancerogenost. Sva jedinjenja pripadaju kategoriji III rizika po akutnu oralnu toksičnost (sa vrednostima LD₅₀ većim od 500 mg/kg, ali manjim od 5000 mg/kg), osim jedinjenja **139-141, 143, 151, 153-155, 199, 214** i **237**, za koje se predviđaju niže vrednosti LD₅₀. Na osnovu vrednosti TD₅₀ ispitivana jedinjenja uglavnom nisu procenjena kao kancerogena. Izuzetak predstavljaju jedinjenja **200** i **216**, sa TD₅₀ vrednostima većim od 10 mg/kg telesne težine dnevno, i jedinjenja **103, 105, 177-182, 192-197, 218** i **235** sa TD₅₀ vrednostima manjim od 10 mg/kg telesne težine dnevno.

Tabela 42. Toksičnost inhibitora ksantin-oksidadze predviđena softverom *admetSAR* (admetSAR, <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/predict/>)

Toksičnost	Inhibitori ksantin-oksidadze
AMES toksičnost +	3, 23, 26-31, 49, 50, 72, 74, 76, 79, 83-85, 90, 103, 110, 134, 152, 156, 173, 174, 177-182, 192-207, 209, 213, 216, 218, 233, 235, 236
AMES toksičnost -	1, 2, 4-22, 24, 25, 32-48, 51-71, 73, 75, 77, 78, 80-82, 86-89, 91-102, 104-109, 111-133, 135-151, 153-155, 157-172, 175, 176, 183-191, 208, 210-212, 214, 215, 217, 219-232, 234, 237-274
Kancerogenost +	75
Kancerogenost -	1-74, 76-274
Akutna oralna toksičnost – II (LD ₅₀ ^a vrednosti veće od 50 mg/kg, manje od 500 mg/kg)	139-141, 143, 151, 153-155, 199, 214, 237
Akutna oralna toksičnost – III (LD ₅₀ vrednosti veće od 500 mg/kg, manje od 5000 mg/kg)	1-138, 142, 144-150, 152, 156-198, 200-213, 215-236, 238-274
Kancerogenost – bez opasnosti	1-102, 104, 106-176, 183-191, 198, 199, 201-215, 217, 219-234, 236-274
Kancerogenost – TD ₅₀ ^b > 10 mg/kg	200, 216
Kancerogenost – TD ₅₀ ≤ 10 mg/kg	103, 105, 177-182, 192-197, 218, 235

^asmrtonosna doza kod 50% testiranih

^bdoza koja prouzrokuje toksične efekte kod 50% testiranih

5.3.4. Mogućnost vezivanja inhibitora ksantin-oksidadze za proteine i DNK

Identifikacija jedinjenja koja poseduju sposobnost kovalentnog vezivanja za proteine i/ili DNK je od značaja u proceni toksičnosti. Svrstavanje jedinjenja u kategoriju sa procenjenom sposobnošću vezivanja za proteine i/ili DNK ne može se poistovetiti sa sigurnom toksičnošću. Prisustvo strukturnih predispozicija molekula za interakciju sa

biološkim makromolekulima ne podrazumeva definitivno i reagovanje. Čak iako jedinjenje formira kovalentnu vezu sa biološkim makromolekulom, faktori toksikokinetičkog/toksikodinamičkog profila i biološki mehanizmi reparacije mogu prevenirati nepovoljan ishod (Enoch i saradnici, 2011). Strukturne predispozicije kao inicijalni preduslovi za kovalentno vezivanje sa biomakromolekulima mogu biti: mogućnost acilacije, *Michael* adicije, formiranja *Schiff*-ovih baza, aromatične nukleofilne supstitucije, mono- i bimolekulske alifatične nukleofilne supstitucije i reakcije slobodnih radikala (Enoch i saradnici, 2010). Procena strukturnih preduslova za kovalentno reagovanje jedinjenja sa biomakromolekulima je moguća *in silico* primenom *Toxtree* softvera (*Toxtree*, v.2.6.13). Dobijeni rezultati procene za inhibitore ksantin-oksidge (tabela 43) su sledeći: jedinjenja **1**, **158-164** i **220** ne pokazuju strukturne predispozicije za vezivanje ni za proteine ni za DNK, jedinjenja **4**, **5**, **157**, **165** i **219** ne pokazuju predispozicije za vezivanje za proteine, dok jedinjenja **3**, **133**, **166**, **221-224**, **241** i **242** ne pokazuju strukturne predispozicije za vezivanje za DNK.

Tabela 43. Mogućnost vezivanja inhibitora ksantin-oksidge za proteine i DNK predviđena softverom *Toxtree* (*Toxtree*, v.2.6.13)

Predispozicije za vezivanje za proteine						Predispozicije za vezivanje za DNK				
Jedinjenje	Acilacija ^a	<i>Michael</i> adicija ^b	S _N 2 ^c	S _N Ar ^d	Formiranje <i>Schiff</i> baza ^e	Acilacija	<i>Michael</i> adicija	S _N 1 ^f	S _N 2	Formiranje <i>Schiff</i> baza
1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
2	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
3	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne
4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	da
5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	da
6	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
7	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
8	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
9	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
10	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
11	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
12	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne

13	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
14	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
15	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
16	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
17	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
18	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
19	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
20	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
21	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
22	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
23	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
24	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
25	ne	ne	da	da	ne	ne	da	ne	ne	ne
26	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
27	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
28	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
29	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
30	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
31	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
32	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
33	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
34	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
35	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
36	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
37	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
38	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
39	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
40	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
41	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
42	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
43	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
44	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne

45	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
46	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
47	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
48	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
49	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
50	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
51	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
52	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
53	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
54	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
55	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
5	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
57	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	da	ne
58	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
59	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
60	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
61	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
62	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
63	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
64	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
65	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
66	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
67	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
68	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
69	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
70	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
71	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
72	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
73	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
74	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
75	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
76	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne

77	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
78	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
79	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
80	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
81	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
82	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
83	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
84	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
85	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
86	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
87	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
88	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
89	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
90	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
91	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
92	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
93	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
94	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
95	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
96	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
97	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
98	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
99	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
100	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
101	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
102	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
103	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
104	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
105	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
106	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
107	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
108	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne

109	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
110	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
111	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
112	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
113	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
114	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
115	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
116	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
117	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
118	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
119	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
120	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
121	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
122	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
123	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
124	ne	da	ne	ne	da	ne	da	ne	ne	da
125	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
126	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
127	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
128	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
129	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
130	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
131	ne	da	ne	da	ne	ne	da	ne	ne	ne
132	ne	ne	ne	da	ne	ne	da	ne	ne	ne
133	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne
134	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
135	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
136	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
137	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
138	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
139	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
140	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne

141	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
142	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
143	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
144	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
145	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
146	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
147	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
148	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
149	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
150	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
151	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
152	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
153	da	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
154	da	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
155	da	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
156	ne	da	ne	da	ne	ne	da	da	ne	ne
157	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne
158	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
159	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
160	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
161	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
162	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
163	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
164	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
165	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne
166	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
167	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
168	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
169	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
170	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
171	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
172	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne

173	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
174	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
175	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
176	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
177	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
178	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
179	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
180	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
181	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
182	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
183	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
184	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
185	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
186	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
187	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
188	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
189	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
190	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
191	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
192	da	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
193	da	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
194	da	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
195	da	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
196	da	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
197	da	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
198	da	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
199	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
200	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
201	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
202	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
203	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
204	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne

205	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
206	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
207	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
208	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
209	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
210	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
211	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
212	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
213	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
214	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
215	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
216	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
217	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
218	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
219	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne
220	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
221	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
222	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
223	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
224	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
225	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
226	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
227	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
228	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
229	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
230	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
231	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
232	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
233	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
234	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
235	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
236	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne

237	da	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
238	da	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
239	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne
240	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne
241	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
242	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
243	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
244	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
245	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
246	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
247	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
248	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
249	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
250	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
251	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
252	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
253	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
254	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
255	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
256	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
257	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
258	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
259	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
260	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
261	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
262	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
263	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
264	ne	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
265	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
266	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
267	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
268	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne

269	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
270	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
271	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
272	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne
273	ne	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne
274	ne	da	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	ne

^amogućnost acilacije

^bmogućnost *Michael* adicije

^cmogućnost S_N2 alifatične nukleofilne supstitucije

^dmogućnost aromatične nukleofilne supstitucije (S_NAr)

^emogućnost formiranja *Schiff*-ovih baza

^fmogućnost S_N1 alifatične nukleofilne supstitucije

6. ZAKLJUČAK

Ciljevi doktorske disertacije "Inhibicija ksantin-oksidge depsipectidima i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onima" su ostvareni:

- ispitivanjem uticaja depsipectida (**239-244**) i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona (**245-274**) na aktivnost komercijalnog enzima ksantin-oksidge *in vitro* i ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova,
- razjašnjavanjem mehanizama inhibicije ksantin-oksidge ispitivanim depsipectidima i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onima, koji su se pokazali kao najefikasniji inhibitori ovog enzima, metodom molekuskog *docking-a*, i
- predviđanjem osnovnih fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina ispitivanih jedinjenja (**239-274**) i drugih inhibitora ksantin-oksidge (**1-238**) *in silico* metodama.

Najznačajniji rezultati dobijeni ispitivanjem uticaja depsipectida i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona na aktivnost ksantin-oksidge su:

- 6-(Propan-2-il)-morfolin-2,5-dioni (**239-241**) inhibiraju komercijalnu ksantin-oksidge i ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova sa IC_{50} vrednostima nižim od 50 $\mu\text{g/mL}$. 3,6-Di(propan-2-il)-4-metil-morfolin-2,5-dion (**239**) se pokazao kao najefikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidge ($IC_{50} = 37,08 \mu\text{g/mL}$) i ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova ($IC_{50} = 41,88 \mu\text{g/mL}$). Jedinjenje **241** se pokazalo kao najmanje efikasan inhibitor ksantin-oksidge. Alopurinol je efikasniji inhibitor komercijalne ksantin-oksidge ($IC_{50} = 0,26 \mu\text{g/mL}$) i ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova ($IC_{50} = 0,79 \mu\text{g/mL}$) od tri ispitivana 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona.
- Tri aciklična *N*-(α -bromacil)- α -amino estra (**242-244**), nisu pokazala značajniji uticaj na aktivnost komercijalne ksantin-oksidge i ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova.
- Devetnaest od trideset ispitivanih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona (**245-274**) inhibiraju komercijalnu ksantin-oksidge sa IC_{50} vrednostima nižim od 50 $\mu\text{g/mL}$. Osmam jedinjenja inhibiraju ksantin-oksidge u homogenatu jetre pacova sa IC_{50} vrednostima nižim od 50 $\mu\text{g/mL}$. 4-((2-Benzilamino-4-oksotiazol-5(4*H*)-iliden)-metil)-benzonitril (jedinjenje **258**) se pokazao kao najefikasniji inhibitor komercijalne

ksantin-oksidade ($IC_{50} = 17,16 \mu\text{g/mL}$) i ksantin-oksidade u homogenatu jetre pacova ($IC_{50} = 24,50 \mu\text{g/mL}$).

Metoda molekuskog *docking*-a je korišćena za razjašnjavanje mehanizama inhibicije ksantin-oksidade ispitivanim depsipeptidima i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-onima. Dobijeni su sledeći rezultati:

- Način vezivanja 6-(propan-2-il)-morfolin-2,5-diona (**239-241**) za aktivni centar ksantin-oksidade je sličan načinu vezivanja salicilne kiseline i febuksostata za navedeni enzim, jer ispitivana jedinjenja ne obrazuju kovalentne veze sa atomom molibdena.
- Postoje dva moguća načina interakcije ispitivanih 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona (**245-274**) sa ksantin-oksidadom, koji zavise od prirode amino grupe. Jedinjenja sa tercijarnom cikličnom amino strukturom interaguju ariliden ostatkom sa Arg880, dok je amino grupa van vezujućeg mesta ("amine-out" način vezivanja). Jedinjenja sa benzilamino grupom stupaju preko ove funkcionalne grupe u interakciju sa Arg880 ostatkom enzima ("amine-in" način vezivanja).

Sumirajući *in silico* predviđene fizičko-hemijske, farmakokinetičke i toksikološke parametre jedinjenja **1-274** mogu se dobiti sledeći zaključci:

- Jedinjenja **1-14, 16-47, 49-69, 72-88, 90-101, 103-134, 136-142, 144-183, 185-191, 199, 200, 202-209, 212, 213, 216, 218-235, 237, 239-261, 264-274** ispunjavaju "Pravilo pet" Lipinskog i kriterijume dobre rastvorljivosti i permeabilnosti. Ova jedinjenja ispunjavaju i "pravila Vebera", pa se smatra da mogu penetrirati biološke membrane i pokazati zadovoljavajući stepen bioraspoloživosti.
- Farmakokinetički parametri predviđaju povoljan stepen humane intestinalne apsorpcije predviđen za sve inhibitore, osim za jedinjenja **201** i **238**.
- Sva jedinjenja pripadaju kategoriji III rizika po akutnu oralnu toksičnost sa vrednostima LD_{50} većim od 500 mg/kg, ali manjim od 5000 mg/kg, osim jedinjenja **139-141, 143, 151, 153-155, 199, 214** i **237**, za koje se predviđaju niže vrednosti LD_{50} . Na osnovu vrednosti TD_{50} ispitivana jedinjenja uglavnom nisu procenjena kao kancerogena. Izuzetak predstavljaju jedinjenja **200** i **216**, sa TD_{50} vrednostima većim od 10 mg/kg telesne težine dnevno, i jedinjenja **103, 105, 177-182, 192-197, 218** i **235** sa TD_{50} vrednostima manjim od 10 mg/kg telesne težine dnevno.

- Jedinjenja **1**, **158-164** i **220** ne pokazuju strukturne predispozicije za vezivanje ni za proteine ni za DNK, jedinjenja **4**, **5**, **157**, **165** i **219** ne pokazuju predispozicije za vezivanje za proteine, dok jedinjenja **3**, **133**, **166**, **221-224**, **241** i **242** ne pokazuju strukturne predispozicije za vezivanje za DNK.

Generalni zaključak ove doktorske disertacije je da najefikasniji inhibitori ksantin-oksidaze iz grupe ispitivanih depsipeptida i 2-amino-5-alkiliden-tiazol-4-ona, kao što su jedinjenja **239** i **258**, predstavljaju obećavajuće strukture za dizajn novih inhibitora ksantin-oksidaze, potencijalnih kandidata za lek u terapiji hiperurikemije i gihta.

7. LITERATURA

- Abdel-Ghani E. Regioselective base-induced condensations of acrylic acid derivatives. *J Chem Res Synops* 1999; 3: 174-175.
- Abe M, Yamano T, Yamatodani S, Kozu Y, Kosumoto M, Komatsu H, Yamada S. On the new peptide-type ergot alkaloids, ergosecaline and ergosecalinine. *Bull Agric Chem Soc Jpn* 1959; 23: 246-248.
- admetSAR, <http://lmmnd.ecust.edu.cn:8000/predict/>, accessed 2014, 2015 and 2016.
- Ali HI, Fujita T, Akaho E, Nagamatsu T. A comparative study of AutoDock and PMF scoring performances, and SAR of 2-substituted pyrazolotriazolopyrimidines and 4-substituted pyrazolopyrimidines as potent xanthine oxidase inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* 2010; 24(1): 57-75.
- Anderluh M, Jukič M, Petrič R. Three-component one-pot synthetic route to 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Tetrahedron* 2009; 65: 344-350.
- Andreani A, Rambaldi M, Leoni A, Locatelli A, Bossa R, Chiericozzi M, Galatulas I, Salvatore G. Synthesis and cardiotoxic activity of imidazo[2,1-b]thiazoles bearing a lactam ring. *Eur J Med Chem* 1996; 31: 383-387.
- Arcelli A, Balducci D, Grandi A, Porzi G, Sandri M, Sandri S. Chiral 1,4-morpholine-2,5-diones. Synthesis and evaluation as glucosidase inhibitors. *Monatsh Chem* 2004; 135: 951-958.
- Arcelli A, Balducci D, Grandi A, Porzi G, Sandri M, Sandri S. Chiral 1,4-morpholin-2,5-dione derivatives as α -glucosidase inhibitors: Part 2. *Tetrahedron: Asymm* 2005; 16: 1495-1501.
- Arcelli A, Balducci D, Neto SFE, Porzi G, Sandri M. Synthesis of new chiral 1,4-morpholin-2,5-dione derivatives and evaluation as α -glucosidase inhibitors. Part 3. *Tetrahedron: Asymm* 2007; 18: 562-568.
- Arimboor R, Rangan M, Aravind SG, Arumughan C. Tetrahydroamentoflavone (THA) from *Semecarpus anacardium* as a potent inhibitor of xanthine oxidase. *J Ethnopharmacol* 2011; 133(3): 1117-1120.
- Bagavananthen Andavan GS, Lemmens-Gruber R. Cyclodepsipeptides from marine sponges: Natural agents for drug research. *Mar Drugs* 2010; 8: 810-834.
- Bandgar BP, Adsul LK, Chavan HV, Shringare SN, Korbadi BL, Jalde SS, Lonikar SV, Nile SH, Shirfule AL. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking of N-{3-[3-(9-methyl-9H-carbazol-3-yl)-acryloyl]-phenyl}-benzamide/amide derivatives as

- xanthine oxidase and tyrosinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2012; 20(18): 5649-5957.
- Biagi G, Costantini A, Costantino L, Giorgi I, Livi O, Pecorari P, Rinaldi M, Scartoni V. Synthesis and biological evaluation of new imidazole, pyrimidine, and purine derivatives and analogs as inhibitors of xanthine oxidase. *J Med Chem* 1996; 39(13): 2529-2535.
- Biagi G, Giorgi I, Pacchini F, Livi O, Scartoni V. 2-Alkylalkoxyalkylthiohypoxanthines as new potent inhibitors of xanthine oxidase. *Farmaco* 2001; 56(11): 809-813.
- Borges F, Fernandes E, Roleira F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem* 2002; 9(2): 195-217.
- Chandrika BR, Kulkarni-Almeida A, Katkar KV, Khanna S, Ghosh U, Keche A, Shah P, Srivastava A, Korde V, Nemmani KV, Deshmukh NJ. Identification of novel isocytosine derivatives as xanthine oxidase inhibitors from a set of virtual screening hits. *Bioorg Med Chem* 2012; 20(9): 2930-2939.
- Chen S, Zhang T, Wang J, Wang F, Niu H, Wu C, Wang S. Synthesis and evaluation of 1-hydroxy/methoxy-4-methyl-2-phenyl-1*H*-imidazole-5-carboxylic acid derivatives as non-purine xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2015; 103: 343-353.
- Choi EY, Stockert AL, Leimkühler S, Hille R. Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *J Inorg Biochem* 2004; 98: 841-848.
- Costantino L, Rastelli G, Albasini A. A rational approach to the design of flavones as xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 1996; 31(9): 693-699.
- Dhiman R, Sharma S, Singh G, Nepali K, Singh Bedi PM. Design and synthesis of aza-flavones as a new class of xanthine oxidase inhibitors. *Arch Pharm* 2013; 346(1): 7-16.
- Enoch SJ, Cronin MT. A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent DNA binding. *Crit Rev Toxicol* 2010; 40(8): 728-748.
- Enoch SJ, Ellison CM, Schultz TW, Cronin MT. A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent protein binding relevant to toxicity. *Crit Rev Toxicol* 2011; 41(9): 783-802.
- Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *PNAS* 2000; 97(20): 10723-10728.
- Evenäs J, Edfeldt F, Lepistö M, Svitacheva N, Synnergren A, Lundquist B, Gränse M, Rönnholm A, Varga M, Wright J, Wei M. HTS followed by NMR based

- counterscreening. Discovery and optimization of pyrimidones as reversible and competitive inhibitors of xanthine oxidase. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24(5): 1315-1321.
- FRED, OEDocking version 3.0.1. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>.
- Guan Q, Cheng Z, Ma X, Wang L, Feng D, Cui Y, Bao K, Wu L, Zhang W. Synthesis and bioevaluation of 2-phenyl-4-methyl-1,3-selenazole-5-carboxylic acids as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2014; 85: 508-516.
- Gupta S, Rodrigues LM, Esteves AP, Oliveira-Campos AM, Nascimento MS, Nazareth N, Cidade H, Neves MP, Fernandes E, Pinto M, Cerqueira NM. Synthesis of *N*-aryl-5-amino-4-cyanopyrazole derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2008; 43(4): 771-780.
- Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002; 33(6): 774-797.
- Hasumi K, Shinohara C, Iwanaga T, Endo A. Lateritin, a new inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Gibberella lateritium* IFO 7188. *J Antibiot* 1993; 46: 1782-1787.
- Hofmann E, Webster J, Do T, Kline R, Snider L, Hauser Q, Higginbottom G, Campbell A, Ma L, Paula S. Hydroxylated chalcones with dual properties: Xanthine oxidase inhibitors and radical scavengers. *Bioorg Med Chem* 2016; 24(4): 578-587.
- Hosoya T, Ohno I, Nomura S, Hisatome I, Uchida S, Fujimori S, Yamamoto T, Hara S. Effects of topiroxostat on the serum urate levels and urinary albumin excretion in hyperuricemic stage 3 chronic kidney disease patients with or without gout. *Clin Exp Nephrol* 2014; 18(6): 876-884.
- Hu Y, Helm JS, Chen L, Ginsberg C, Gross B, Kraybill B, Tiyanont K, Fang X, Wu T, Walker S. Identification of selective inhibitors for the glycosyltransferase MurG via high-throughput screening. *Chem Biol* 2004; 11: 703-711.
- Hu L, Hu H, Wu W, Chai X, Luo J, Wu Q. Discovery of novel xanthone derivatives as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(13): 4013-4015.
- Iijima M, Masuda T, Nakamura H, Naganawa H, Kurasawa S, Okami Y, Ishizuka M, Takeuchi T, Iitaka Y. Metacytofilin, a novel immunomodulator produced by *Metharizium* sp. TA2759. *J Antibiot* 1992; 45: 1553-1556.

- Ishibuchi S, Morimoto H, Oe T, Ikebe T, Inoue H, Fukunari A, Kamezawa M, Yamada I, Naka Y. Synthesis and structure–activity relationships of 1-phenylpyrazoles as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11(7): 879-882.
- Jukič M, Đorđević A, Lazarević J, Gobec M, Šmelcerović A, Anderluh M. Antimicrobial activity and cytotoxicity of some 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Mol Divers* 2013; 17: 773-780.
- Kagamizono T, Nishino E, Matsumoto K, Kawashima A, Kishimoto M, Sakai N, He BM, Chen ZX, Adachi T, Morimoto S, Hanada K. Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717. *J Antibiot* 1995; 48: 1407-1412.
- Khanna S, Burudkar S, Bajaj K, Shah P, Keche A, Ghosh U, Desai A, Srivastava A, Kulkarni-Almeida A, Deshmukh NJ, Dixit A. Isocytosine-based inhibitors of xanthine oxidase: Design, synthesis, SAR, PK and in vivo efficacy in rat model of hyperuricemia. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22(24): 7543-7546.
- Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević VB, Nikolić J, Pavlović DD, Kocić G. *Biohemija*. IV izdanje. Beograd, Savremena administracija a.d; 2006.
- Kroemer RT. Structure-based drug design: Docking and scoring. *Curr Protein Pept Sci* 2007; 8: 312-328.
- Kumar D, Kaur G, Negi A, Kumar S, Singh S, Kumar R. Synthesis and xanthine oxidase inhibitory activity of 5, 6-dihydropyrazolo/pyrazolo[1,5-c]quinazoline derivatives. *Bioorg Chem* 2014; 57: 57-64.
- Kuo YC, Lin LC, Don MJ, Liao HF, Tsai YP, Lee GH, Chou CJ. Cyclodesipeptide and dioxomorpholine derivatives isolated from the insect-body portion of the fungus *Cordyceps cicadae*. *J Chin Med* 2002; 13: 209-219.
- Lee C, Liu X, Zweier JL. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000; 275: 9369-9376.
- Lemmens-Gruber R, Kamyar MR, Dornetshuber R. Cyclodepsipeptides- Potential drugs and lead compounds in the drug development process. *Curr Med Chem* 2009; 16: 1122-1137.
- Li DQ, Zhao J, Li SP, Zhang QW. Discovery of xanthine oxidase inhibitors from a complex mixture using an online, restricted-access material coupled with column-switching liquid chromatography with a diode-array detection system. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406(7): 1975-1984.
- Lin CM, Chen CS, Chen CT, Liang YC, Lin JK. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294(1): 167-172.

- Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42(1): 59-98.
- Lin S, Zhang G, Pan J, Gong D. Deciphering the inhibitory mechanism of genistein on xanthine oxidase *in vitro*. *J Photochem Photobiol B* 2015a; 153: 463-472.
- Lin S, Zhang G, Liao Y, Pan J. Inhibition of chrysin on xanthine oxidase activity and its inhibition mechanism. *Int J Biol Macromolec* 2015b; 81: 274-282.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 4-17.
- Liu HX, He MT, Tan HB, Gu W, Yang SX, Wang YH, Li L, Long CL. Xanthine oxidase inhibitors isolated from *Piper nudibaccatum*. *Phytochem Lett* 2015; 12: 133-137.
- Lü JM, Yao Q, Chen C. 3,4-Dihydroxy-5-nitrobenzaldehyde (DHNB) is a potent inhibitor of xanthine oxidase: a potential therapeutic agent for treatment of hyperuricemia and gout. *Biochem Pharmacol* 2013; 86(9): 1328-1337.
- Marcolongo R. Gout: the king of diseases and the disease of kings. *J Siena Acad Sci* 2012; 4: 7-17.
- Masuda T, Shingai Y, Takahashi C, Inai M, Miura Y, Honda S, Masuda A. Identification of a potent xanthine oxidase inhibitor from oxidation of caffeic acid. *Free Radical Biol Med* 2014; 69: 300-307.
- MOE, Molecular Operating Environment, 2011.10.
- Molinspiration Cheminformatics, <http://www.molinspiration.com/>; accessed 2014, 2015 and 2016.
- Murata K, Nakao K, Hirata N, Namba K, Nomi T, Kitamura Y, Moriyama K, Shintani T, Iinuma M, Matsuda H. Hydroxychavicol: a potent xanthine oxidase inhibitor obtained from the leaves of betel, *Piper betle*. *J Nat Med* 2009; 63(3): 355-359.
- Nepali K, Agarwal A, Sapra S, Mittal V, Kumar R, Banerjee UC, Gupta MK, Satti NK, Suri OP, Dhar KL. *N*-(1,3-Diaryl-3-oxopropyl)-amides as a new template for xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2011a; 19(18): 5569-5576.
- Nepali K, Singh G, Turan A, Agarwal A, Sapra S, Kumar R, Banerjee UC, Verma PK, Satti NK, Gupta MK, Suri OP. A rational approach for the design and synthesis of 1-acetyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro(1*H*)pyrazoles as a new class of potential non-purine xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2011b; 19(6): 1950-1958.

- Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase-mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J* 2008; 275(13): 3278-3289.
- Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Kondo S, Pai EF, Nishino T. An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. *J Biol Chem* 2003; 278(3): 1848-1855.
- OSIRIS Property Explorer, <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>, accessed 2014, 2015 and 2016.
- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58(1): 87-114.
- Pavlovic V, Djordjevic A, Cherneva E, Yancheva D, Smelcerovic A. Stimulatory effect on rat thymocytes proliferation and antimicrobial activity of two 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones. *Food Chem Toxicol* 2012a; 50: 761-766.
- Pavlovic V, Cherneva E, Yancheva D, Smelcerovic A. 6-(Propan-2-yl)-3-methyl-morpholine-2,5-dione, a novel cyclodipeptide with modulatory effect on rat thymocytes. *Food Chem Toxicol* 2012b; 50: 3014-3018.
- Petronijević ŽB, Opšta i primenjena enzimologija II, Tehnološki fakultet, Leskovac, u pripremi.
- Pulici M, Quartieri F. Traceless solid-phase synthesis of 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Tetrahedron Lett* 2005; 46: 2387-2391.
- Rudnitskaya A, Török B, Török M. Molecular docking of enzyme inhibitors: A computational tool for structure-based drug design. *Biochem Mol Biol Educ* 2010; 38: 261-265.
- Ryu HW, Lee JH, Kang JE, Jin YM, Park KH. Inhibition of xanthine oxidase by phenolic phytochemicals from *Broussonetia papyrifera*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2012; 55(5): 587-594.
- Sarabia F; Chammaa S, Sanchez Ruiz A, Martin Ortiz L, Lopez Herrera FJ. Chemistry and biology of cyclic depsipeptides of medicinal and biological interest. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1309-1332.
- Sathisha KR, Khanum SA, Chandra JN, Ayisha F, Balaji S, Marathe GK, Gopal S, Rangappa KS. Synthesis and xanthine oxidase inhibitory activity of 7-methyl-2-(phenoxyethyl)-5H-[1,3,4]thiadiazolo[3,2-a]pyrimidin-5-one derivatives. *Bioorg Med Chem* 2011; 19(1): 211-220.

- Sharma S, Sharma K, Ojha R, Kumar D, Singh G, Nepali K, Bedi PM. Microwave assisted synthesis of naphthopyrans catalysed by silica supported fluoroboric acid as a new class of non purine xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24(2): 495-500.
- Shen L, Ji HF. Insights into the inhibition of xanthine oxidase by curcumin. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19(21): 5990-5993.
- Shi DH, Huang W, Li C, Liu YW, Wang SF. Design, synthesis and molecular modeling of aloe-emodin derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2014; 75: 289-296.
- Shintani H. Determination of xanthine oxidase. *Pharm Anal Acta* 2013; S7.
- Shukla S, Kumar D, Ojha R, Gupta MK, Nepali K, Bedi P. 4,6-Diaryl/heteroarylpyrimidin-2 (1*H*)-ones as a new class of xanthine oxidase inhibitors. *Arch Pharm* 2014; 347(7): 486-495.
- Singh H, Sharma S, Ojha R, Gupta MK, Nepali K, Bedi PM. Synthesis and evaluation of naphthoflavones as a new class of non purine xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24(17): 4192-4197.
- Smelcerovic A, Yancheva D, Cherneva E, Petronijevic Z, Lamshoeft M, Herebian D. Identification and synthesis of three cyclodipeptides as potential precursors of enniatin B in *Fusarium sporotrichioides*. *J Mol Struct* 2011; 985: 397-402.
- Smelcerovic A, Rangelov M, Smelcerovic Z, Veljkovic A, Cherneva E, Yancheva D, Nikolic GM, Petronijevic Z, Kocic G. Two 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones as new non-purine xanthine oxidase inhibitors and anti-inflammatory agents. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 493-497.
- Smelcerovic A, Dzodic P, Pavlovic V, Cherneva E, Yancheva D. Cyclodipeptides with a promising scaffold in medicinal chemistry. *Amino Acids* 2014; 46: 825-840.
- Smelcerovic Z, Veljkovic A, Kocic G, Yancheva D, Petronijevic Z, Anderluh M, Smelcerovic A. Xanthine oxidase inhibitory properties and anti-inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Chem Biol Interact* 2015; 229: 73-81.
- Šmelcerović Ž, Rangelov M, Cherneva E, Kocić G, Stojanović S, Jevtović-Stoimenov T, Petronijević Ž, Yancheva D. Inhibition mechanism and molecular modeling studies of the interactions of 6-(propan-2-yl)-3-methyl-morpholine-2,5-dione with xanthine oxidase. *Bulg Chem Commun* 2015; 47: 783-787.

- Šmelcerović Ž, Tomović K, Yancheva D, Cherneva E, Kocić G, Petronijević Ž. Xanthine oxidase inhibitory properties and *in silico* study of three *N*-(α -bromoacyl)- α -amino esters. *Acta Med Median* 2016; DOI: 10.5633/amm.2016.0402.
- Song Y, Connor DT, Doubleday R, Sorenson RJ, Sercel AD, Unangst PC, Roth BD, Gilbertsen RB, Chan K, Schrier DJ, Guglietta A, Bornemeier DA, Dyer RD. Synthesis, structure-activity relationships, and *in vivo* evaluations of substituted di-*tert*-butylphenols as a novel class of potent, selective, and orally active cyclooxygenase-2 inhibitors. 1. Thiazolone and oxazolone series. *J Med Chem* 1999; 42: 1151-1160.
- Song JU, Choi SP, Kim TH, Jung CK, Lee JY, Jung SH, Kim GT. Design and synthesis of novel 2-(indol-5-yl)-thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25(6): 1254-1258.
- Song JU, Jang JW, Kim TH, Park H, Park WS, Jung SH, Kim GT. Structure-based design and biological evaluation of novel 2-(indol-2-yl)-thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2016; 26(3): 950-954.
- Stankov-Jovanovic V, Tabet JC, Dzodic P, Daskalova L, Cherneva E, Yancheva D, Smelcerovic A. *In vitro* antioxidant activity of two 6-(propan-2-yl)-4-methylmorpholine-2,5-diones. *Acta Chim Slov* 2012; 59: 939-943.
- Su ZR, Fan SY, Shi WG, Zhong BH. Discovery of xanthine oxidase inhibitors and/or α -glucosidase inhibitors by carboxyalkyl derivatization based on the flavonoid of apigenin. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25(14): 2778-2781.
- Suntornchashweij S, Chaichit N, Isobe M, Suwanborirux K. Hectochlorin and morpholine derivatives from the Thai sea hare, *Bursatella leachii*. *J Nat Prod* 2005; 68: 951-955.
- Takahama U, Koga Y, Hirota S, Yamauchi R. Inhibition of xanthine oxidase activity by an oxathiolanone derivative of quercetin. *Food Chem* 2011; 126(4): 1808-1811.
- Toxtree, v.2.6.13, accessed 2015 and 2016.
- Tripathi CA, Gupta SJ, Fatima GN, Sonar PK, Verma A, Saraf SK. 4-Thiazolidinones: The advances continue... *Eur J Med Chem* 2014; 72: 52-77.
- Tsai SF, Lee SS. Neolignans as xanthine oxidase inhibitors from *Hyptis rhomboides*. *Phytochemistry* 2014; 101: 121-127.
- Unno T, Sugimoto A, Kakuda T. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *J Ethnopharmacol* 2004; 93(2): 391-395.

- Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 2002; 45(12): 2615-2623.
- Wang S, Yan J, Wang J, Chen J, Zhang T, Zhao Y, Xue M. Synthesis of some 5-phenylisoxazole-3-carboxylic acid derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010; 45(6): 2663-2670.
- Woolley DW, Schaffner G, Braun AC. Studies on the structure of the phytopathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*. *J Biol Chem* 1955; 215: 485-493.
- Yancheva D, Daskalova L, Cherneva E, Mikhova B, Djordjevic A, Smelcerovic Z, Smelcerovic A. Synthesis, structure and antimicrobial activity of 6-(propan-2-yl)-3-methyl-morpholine-2,5-dione. *J Mol Struct* 2012; 1016: 147-154.
- Yancheva D, Cherneva E, Quick M, Mikhova B, Shivachev B, Nikolova R, Djordjevic A, Untergehrer M, Jürgenliem G, Kraus B, Smelcerovic A. Synthesis, crystal structure and biological activity screening of novel N-(α -bromoacyl)- α -amino esters containing valyl moiety. *Acta Chim Slov* 2015; 62: 689-699.
- Zhang L, Brett CM, Giacomini KM. Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38(1): 431-460.
- Zvezdanovic J, Daskalova L, Yancheva D, Cvetkovic D, Markovic D, Anderluh M, Smelcerovic A. 2-Amino-5-alkylidenethiazol-4-ones as promising lipid peroxidation inhibitors. *Monatsh Chem* 2014; 145: 945-952.

BIOGRAFIJA AUTORA

Lični podaci

Žaklina Šmelcerović je rođena 30.03.1975. godine u Leskovcu. Živi i radi u Nišu. Udata je i ima dva sina.

Podaci o dosadašnjem obrazovanju

Osnovnu školu „Vasa Pelagić“ i srednju hemijsko-tehnološku školu „Zdravlje“ je završila u rodnom gradu sa odličnim uspehom.

2003. godine je diplomirala na smeru Hemijsko i biohemijsko inženjerstvo Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, sa prosečnom ocenom 7,41, i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Oktobra 2011. godine je upisala doktorske studije na studijskom programu Tehnološko inženjerstvo na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu. Položila je sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 9,90.

Profesionalna karijera

Od 2010. godine radi u Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku u Naučno-istraživačkom centru za biomedicinu na Medicinskom fakultetu u Nišu.

Pregled naučnog i stručnog rada kandidata

Žaklina Šmelcerović je publikovala jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (kategorija M21), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorija M22), četiri rada u međunarodnim časopisima (kategorija M23), dva rada u časopisima nacionalnog značaja (kategorija M52), tri saopštenje sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (kategorija M34) i četiri saopštenje sa nacionalnog skupa štampana u izvodu (M64).

Zvezdicom su označeni radovi iz doktorske disertacije.

Objavljeni radovi:

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)

1. * Smelcerovic A, Rangelov M, **Smelcerovic Z**, Veljkovic A, Cherneva E, Yancheva D, Nikolic GM, Petronijevic Z, Kocic G. Two 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones as new non-purine xanthine oxidase inhibitors and anti-inflammatory agents. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 493-497.

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

1. * **Smelcerovic Z**, Veljkovic A, Kocic G, Yancheva D, Petronijevic Z, Anderluh M, Smelcerovic A. Xanthine oxidase inhibitory properties and anti-inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Chem-Biolog Interact* 2015; 229: 73-81.

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. Tadic Lj, Marjanovic G, Macukanovic-Golubovic L, Krstic M, Jevtovic-Stoimenov T, Kostov M, **Smelcerovic Z**, Stojanovic M. The importance of Myd88 L265P mutation, clinical and immunohistochemical prognostic factors for the survival of patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma treated by immunochemotherapy in southeast Serbia. *J BUON* 2016; 21: 1259-1267.
2. * **Šmelcerović Ž**, Rangelov M, Cherneva E, Kocić G, Stojanović S, Jevtović-Stoimenov T, Petronijević Ž, Yancheva D. Inhibition mechanism and molecular modeling studies of the interactions of 6-(propan-2-yl)-3-methyl-morpholine-2,5-dione with xanthine oxidase. *Bulg Chem Commun* 2015; 47: 783-787.
3. Yancheva D, Daskalova L, Cherneva E, Mikhova B, Djordjevic A, **Smelcerovic Z**, Smelcerovic A. Synthesis, structure and antimicrobial activity of 6-(propan-2-yl)-3-methyl-morpholine-2,5-dione. *J Mol Struct* 2012; 1016: 147-154.
4. Smelcerovic A, Spiteller M, Ligon AP, **Smelcerovic Z**, Raabe N. Essential oil composition of *Hypericum* L. species from Southeastern Serbia and their chemotaxonomy. *Biochem Syst Ecol* 2007; 35: 99-113.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

1. * Yancheva D, **Šmelcerović Ž**, Cherneva E, Kocić G, Petronijević Ž, Šmelcerović A. Synthesis of 6-(propan-2-yl)-3-methyl-morpholine-2,5-diones and inhibitory activity toward xanthine oxidase. Book of Abstracts of the 33rd European Peptide Symposium, Sofia, Bulgaria, August – September 2014, published in Journal of Peptide Science 2014, 20, Issue Supplement S1, S133.
2. * Yancheva Pantaleeva D, Rangelov M, **Smelcerovic Z**, Cherneva E, Smelcerovic A, Petronijevic Z, Kocic G. Molecular interactions of 6-(propan-2-yl)-3-methyl-morpholine-2,5-dione to bovine xanthine oxidase as determined by molecular modeling. Book of Abstracts of the European UGM and Conference 2013, Amsterdam, Netherlands, April 2013, 5.
3. * **Šmelcerović Ž**, Yancheva D, Daskalova L, Cherneva E, Šmelcerović A, Petronijević Ž, Kocić G. 6-(Propan-2-il)-3-methyl-2,5-dione, a novel xantine oxidase inhibitor. Book of Abstracts of the 32nd Balkan Medical Week, Niš, Serbia, September 2012, P64.

Rad u časopisu nacionalnog značaja (M52)

1. * Šmelcerović Ž, Tomović K, Yancheva D, Cherneva E, Kocić G, Petronijević Ž. Xanthine oxidase inhibitory properties and *in silico* study of three *N*-(α -bromoacyl)- α -amino esters. Acta Med Median 2016; DOI: 10.5633/amm.2016.0402.
2. Šmelcerović A, **Šmelcerović Ž**. Screening for secondary metabolites from microorganisms. Lek sirov (Matières Médicales) 2002; 22: 3-10.

Saopštenje sa nacionalnog skupa štampano u izvodu (M64)

1. Šmelcerović A, Đorđević S, **Šmelcerović Ž**. HPLC analiza najznačajnijih bioaktivnih komponenti kantariona *Hypericum perforatum* L. *spp. angustifolium*. (HPLC analysis of most significant bioactive components of amber *Hypericum perforatum* L. *spp. angustifolium*). Book of Abstracts of the 5th Symposium "Modern Technologies and Economy Development", Leskovac, Serbia, October 2003, pp. 27 (in Serbian).
2. Šmelcerović A, Đorđević S, **Šmelcerović Ž**, Veličković D, Dimić M. Marine microorganisms, a new source of pharmacologically important substances. Book of

Abstracts of the 2nd Congress of Macedonian microbiologists, Ohrid, Macedonia, May 2002, pp. 144.

3. Šmelcerović A, Đorđević S, **Šmelcerović Ž**, Veličković D, Dimić M. Strategies for new active substances discovery. Book of Abstracts of the 2nd Congress of Macedonian microbiologists, Ohrid, Macedonia, May 2002, pp. 143.
4. Šmelcerović A, Đorđević S, **Šmelcerović Ž**. TLC identifikacija bioaktivnih komponenti u ekstraktima kantariona *Hypericum perforatum* L. (TLC identification of bioactive components in extracts of the amber *Hypericum perforatum* L.). Book of Abstracts of the 4th Symposium "Modern Technologies and Economy Development", Leskovac, Serbia, October 2001, pp. 68 (I volume) (in Serbian).

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ИНХИБИЦИЈА КСАНТИН-ОКСИДАЗЕ ДЕПСИПЕПТИДИМА И 2-АМИНО-5-АЛКИЛИДЕН-ТИАЗОЛ-4-ОНИМА

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Лесковцу, _____.

Потпис аутора дисертације:

Жаклина Шмелцеровић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ИНХИБИЦИЈА КСАНТИН-ОКСИДАЗЕ ДЕПСИПЕПТИДИМА
И 2-АМИНО-5-АЛКИЛИДЕН-ТИАЗОЛ-4-ОНИМА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Лесковцу, _____.

Потпис аутора дисертације:

Жаклина Шмелцеровић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ИНХИБИЦИЈА КСАНТИН-ОКСИДАЗЕ ДЕПСИПЕПТИДИМА И 2-АМИНО-5-АЛКИЛИДЕН-ТИАЗОЛ-4-ОНИМА

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Лесковцу, _____.

Потпис аутора дисертације:

Жаклина Шмелцеровић