

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Jelena M. Konstantinović

**Dizajn i sinteza inhibitora botulinum
neurotoksina A i parazita *Plasmodium
falciparum*: benzotiofenski i steroidni
derivati aminohinolina**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Jelena M. Konstantinović

**Design and synthesis of botulinum
neurotoxin A and *Plasmodium
falciparum* parasite inhibitors:
benzothiophene and steroidal
derivatives of aminoquinoline**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Članovi komisije:

Akademik **Bogdan A. Šolaja**,
profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu u penziji (mentor)

dr Dragana Milić,
profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Igor Opsenica,
vanredni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Olgica Đurković-Đaković,
naučni savetnik Instituta za medicinska istraživanja
Univerziteta u Beogradu

Akademik **Vladimir S. Kostić**,
profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Velimir Popsavin, dopisni član SANU,
profesor Prirodno-matematičkog fakulteta
Univerziteta u Novom Sadu

Datum odbrane

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom akademika Bogdana Šolaje.

Svom profesoru i mentoru dr Bogdanu Šolaji dugujem zahvalnost na prenesenom znanju i brojnim idejama tokom svih godina rada u njegovoj istraživačkoj grupi. Hvala Vam što ste uvek očekivali mnogo i time me učili strpljenju, upornosti i odlučnosti; što ste mi ukazali poverenje i naučili me da razmišljam kao medicinski hemičar.

Članovima komisije, dr Dragani Milić, redovnom profesoru i dr Igoru Opsenici, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta, hvala na brojnim korisnim savetima tokom pisanja ovog rada i tokom svih godina studija na Hemijskom fakultetu. Dr Velimiru Popsavinu, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i akademiku Vladimiru Kostiću se posebno zahvaljujem što su prihvatili učešće u komisiji za pregled, ocenu i odbranu disertacije.

Dr Olgici Đurković-Đaković, naučnom savetniku Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu dugujem najiskreniju zahvalnost, ne samo što je kao jedan od članova komisije značajno poboljšala kvalitet ove disertacije, već i zato što mi je omogućila da sa njenim saradnicima Jelenom Srbljanović i dr Brankom Bobićem učestvujem u izvođenju bioloških testova. Koristim ovu priliku da se i njima zahvalim.

Zahvalnost dugujem dr Mariu Zlatoviću, dr Tatjani Verbić i dr Sandri Šegan na računarskom modelovanju i na brojnim eksperimentima koji su upotpunili ovu disertaciju.

Kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu se zahvaljujem na urađenim brojnim spektralnim analizama i na nesebičnoj pomoći i gostoprimstvu tokom višemesečnog boravka u njihovim laboratorijama. Posebnu zahvalnost dugujem dr Milki Jadrani i dr Bobanu Anđelkoviću na strpljenju i prenesenom znanju.

Dr Dejanu Opsenici se zahvaljujem što mi je, od našeg prvog susreta na vežbama iz Organske hemije, svojim entuzijazmom i ljubavlju prema nauci pomogao da uvidim lepotu ovog zanimanja i što me je vodio kroz prve korake eksperimentalne organske hemije.

Miri hvala na svemu što me je naučila, ne samo dok sam bila student, nego i u toku našeg šestogodišnjeg druženja tokom izvođenja vežbi.

Mojim dragim prijateljima i kolegama Milici, Životi, Nini, Katarini, Nataši, Vladimiru, Miklošu, Jovani, Mariji, Vuku i Miljanu hvala što su sa mnom delili trenutke sreće zbog dobrih rezultata, kao i trenutke neuspeha, koje smo zajedno uz smeh i nesebičnu podršku prevazilazili. Posebno se zahvaljujem dr Ivani Aljančić na savetima i razumevanju tokom svih godina provedenih u laboratoriji 432.

Mići, mom Profesoru hemije iz XII beogradske gimnazije, hvala na energiji i znanju kojima je zračio i zbog kojih je Hemija zasigurno postala moj životni poziv.

Dušanu hvala na ljubavi i razumevanju, kao i brojnim razgovorima i savetima iz hemije.

Hvala mojoj porodici što sam imala njihovu bezuslovnu podršku tokom svih ovih godina.

Naslov:

Dizajn i sinteza inhibitora botulinum neurotoksina A i parazita *Plasmodium falciparum*: benzotiofenski i steroidni derivati aminohinolina

Sažetak:

Botulinum neurotoksini su najjači poznati prirodni otrovi i izazivači botulizma – potencijalno smrtonosne neuromuskularne bolesti. U poslednje vreme, sve veći broj studija je usmeren ka pronalaženju inhibitora botulinum neurotoksina serotipa A (BoNT/A) aktivnih unutar ćelije, jer terapija antitelima ima uspeha jedino pre nego što toksin uđe u neuron. U okviru ove doktorske disertacije izvršena je sinteza i detaljno ispitivanje inhibitorne aktivnosti novih steroidnih i benzo[*b*]tiofenskih derivata 4-aminohinolina prema kratkom nizu (BoNT/A LC) i holotoksinu BoNT/A. U istraživanju je korišćen proteolitički *in vitro* esej i ćelijski esej u motornim neuronima razvijenim iz embrionalnih matičnih ćelija miša (mES-MN). Dodatno, molekularno modelovanje i uklapanje novih derivata u aktivno mesto enzima izvršeno je korišćenjem programa Schrödinger Suite 2016-4.

U *in vitro* proteolitičkom eseju, sintetisana jedinjenja su ostvarila do 85% inhibicije BoNT/A LC pri koncentraciji 20 μ M, dok su IC₅₀ vrednosti bile u opsegu 0,7–10,2 μ M. U preintoksikacionom modelu u motornim neuronima razvijenim iz embrionalnih matičnih ćelija miša (mES-MN) novi derivati su vršili zaštitu proteina SNAP-25ⁱ do 88%, u niskim mikromolarnim koncentracijama i u dozno-zavisnom režimu. Najaktivniji derivati su testirani u postintoksikacionom modelu, u kome se jedinjenja dodaju ćelijskoj kulturi 30 ili 60 minuta posle holotoksina. U oba modela je uočena korelacija procenta zaštite SNAP-25 i primenjene koncentracije jedinjenja. Jedinjenje **17 (JK141)** je pokazalo 99% zaštite SNAP-25 kada se administrira 30 minuta posle BoNT/A.

ⁱ U fiziološkim uslovima, SNAP-25 omogućava fuziju vezikula, koje sadrže neurotransmiter acetilholin, i membrane neurona. Acetilholin se oslobađa u sinaptičku šupljinu i vezuje za mišićne receptore, omogućavajući provođenje nervnih impulsa i kontrakciju mišića. U slučaju kada je došlo do intoksikacije, kratak niz BoNT/A LC vrši hidrolizu SNAP-25 čime onemogućava fuziju vezikule, zbog čega je važno da inhibitori imaju sposobnost da izvrše zaštitu SNAP-25 u što većoj meri.

Detaljnomo ADMET i farmakokinetičkom analizom pokazano je da jedinjenje **17 (JK141)** primenjeno oralno u modelu miša u dozi 600 mg/kg ne dovodi do neželjenih efekata i dostiže maksimalnu koncentraciju $C_{\max} > 10 \mu\text{M}$ u mišjem serumu. Ovo je prvi primer inhibitora kratkog niza sa antagonističkim dejstvom prema holotoksinu BoNT/A u mES-MN u postintoksikacionom modelu. Inhibitor kratkog niza BoNT/A koji je efikasan u *in vivo* uslovima kada se primeni posle intoksikacije još uvek ne postoji, zbog čega ostvareni rezultati predstavljaju vrlo dobru osnovu za detaljnije proučavanje slične klase jedinjenja.

Malarija je bolest koja uzrokuje milione smrtnih slučajeva godišnje. U okviru ove doktorske disertacije analizirana je efikasnost benzo[b]tiofenskih derivata aminohinolina da inhibiraju rast parazita *Plasmodium falciparum*. Ispitana je *in vitro* antimalarijska aktivnost jedinjenja prema aseksualnim formama tri *Plasmodium falciparum* soja (D6, W2, TM91C235) i prema gametocitima u fazi V soja 3D7. Sva sintetisana jedinjenja su pokazala poboljšanu aktivnost prema hlorokin-rezistentnom soju W2 u poređenju sa hlorokinom (CQ). Određeni broj jedinjenja se pokazao aktivnijim od CQ prema hlorokin-osetljivom soju D6, sa IC_{50} do 5 nM. Ispitana je *in vitro* toksičnost svih jedinjenja prema HepG2, kao i toksičnost najaktivnijih derivata u *in vivo* uslovima u modelu miša. Jedinjenje **77 (JK29)**, primenjeno oralno u dozi 160 mg/kg/dan \times 3 dana, pokazalo se kao netoksično i dovelo do izlečenja 5/5 miševa inficiranih parazitima *Plasmodium berghei*.

Ključne reči: botulinum neurotoksin, mali molekuli kao inhibitori, aminohinolin, steroid, benzotiofen, antimalarici, *Plasmodium falciparum*, farmakokinetika

Naučna oblast: Prirodne nauke

Uža naučna oblast: Organska hemija, medicinska hemija

UDK broj: 547

Title:

Design and synthesis of botulinum neurotoxin A and *Plasmodium falciparum* parasite inhibitors: benzothiophene and steroidal derivatives of aminoquinoline

Abstract:

Botulinum neurotoxins are the most poisonous (biological) substances known and causative agents of botulism – serious and potentially fatal neuromuscular illness. Recently, the majority of efforts have focused on identification of botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A) inhibitors with intracellular activity, because antibody-based treatments are successful only before toxin enters a neuron. In this doctoral dissertation synthesis and detailed evaluation of inhibitory potencies of new steroidal and benzo[*b*]thiophene 4-aminoquinoline derivatives against BoNT/A light chain (LC) and full length BoNT/A is reported. Both *in vitro* proteolytic assay and cell-based assay using mouse embryonic stem cell derived motor neurons (mES-MNs) were employed. To rationalize the inhibitory potencies of the new derivatives, structure-based docking simulations were performed using Schrödinger Suite 2016-4 and the modules therein.

Using *in vitro* HPLC-based assay, the newly synthesized molecules have shown BoNT/A LC inhibition up to 85% at 20 μM and IC_{50} values ranging from 0.7–10.2 μM . Compounds tested during BoNT/A challenge in mES-MNs in preintoxication model were found to protect SNAP-25 proteinⁱⁱ by up to 88% at low μM concentrations and in dose-dependent manner. The most effective derivatives were also tested in a post-exposure model, where compounds were added 30 or 60 minutes following holotoxin administration. In both pre- and postintoxication models, dose-dependent behavior was observed. Compound **17 (JK141)** showed 99% of SNAP-25 cleavage protection when administrated 30 minutes after BoNT/A.

ⁱⁱ In physiological conditions, SNAP-25 mediates fusion of neuronal membrane and vesicles containing neurotransmitter acetylcholine, which causes acetylcholine to be released into the synaptic cleft. Acetylcholine binds to the receptors on the outside of the muscle, and transmits the signal which leads to the muscle contraction. As SNAP-25 is cleaved by BoNT/A LC upon holotoxin endocytosis, it is very important to devise an inhibitor that effectuates the LC inhibition within the neuron so assuring the acetylcholine transfer.

Detailed ADMET and pharmacokinetic studies of compound **17 (JK141)** were done. Oral administration of **17 (JK141)** was well tolerated in the mouse up to 600 mg/kg, qd, with $C_{\max} > 10 \mu\text{M}$ found in mice serum. To the best of our knowledge, this is the first example of LC inhibitors antagonizing BoNT intoxication in mouse embryonic stem cell derived motor neurons in a postexposure model. Further work in this series is strongly supported, since, so far, there are no post symptomatically administered LC inhibitors significantly efficacious *in vivo*.

Malaria is a severe disease causing millions of deaths each year. Here, the efficacy of aminoquinolines coupled to benzo[b]thiophene moiety on inhibiting *Plasmodium falciparum* parasite growth is reported. Compounds were evaluated for their *in vitro* antimalarial activity against asexual stages of three *Plasmodium falciparum* strains (D6, W2, TM91C235) and against stage V gametocytes of 3D7 strain. All synthesized derivatives showed improved activities against chloroquine resistant strain W2 compared to chloroquine. Certain number of compounds also proved to be more active than CQ against chloroquine susceptible strain D6, with potencies down to $\text{IC}_{50} = 5 \text{ nM}$. All compounds were evaluated for their *in vitro* toxicity against HepG2 cells. The most active derivatives were tested for toxicity in mice model. Compound **77 (JK29)** proved to be non toxic *in vivo* and cured 5/5 *Plasmodium berghei* infected mice when dosed orally at 160 mg/kg/day \times 3 days.

Keywords: botulinum neurotoxin, small molecule inhibitors, aminoquinoline, steroid, benzothiophene, antimalarials, *Plasmodium falciparum*, pharmacokinetics

Scientific field: Life sciences

Scientific subfield: Organic chemistry, medicinal chemistry

UDK number: 547

Lista skraćenica i termina

ACT	kombinovana terapija artemizininom i drugim lekovima
ADMET	apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost
AGP	kiseli α -1 glikoprotein
ANS	8-anilinaftalen-1-sulfonska kiselina
ART	artemizinin
ATP	adenozin-trifosfat
AQn	<i>N</i> -(7-hlorhinolin-4-il)alkan-1,n-diamin ili <i>N</i> -hinolin-4-ilalkan-1,n-diamin
BAT	antitoksin za lečenje botulizma
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
BoNT	botulinum neurotoksin
Cbz	karbobenzoksi
CQ	hlorokin
D6	hlorokin-osetljiv <i>Plasmodium falciparum</i> soj
DBU	diazabicikloundecen
DCM	dihlormetan
DHFR	dihidrofolat-reduktaza
DHPS	dihidropteroat-sintaza
DMF	dimetil-formamid
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
FDA	Agencija za hranu i lekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i>)
FRET	eng. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GC/MS	gasna hromatografija - masena spektrometrija
GTP	guanozin-trifosfat
IC₅₀	<i>Inhibicija BoNT/A LC</i> : koncentracija pri kojoj jedinjenje inhibira aktivnost BoNT/A LC 50% <i>Malaria</i> : koncentracija jedinjenja pri kojoj dolazi do inhibicije proliferacije parazita 50% u odnosu na kontrolni uzorak <i>Citotoksičnost</i> : koncentracija pri kojoj je inhibirano preživljavanje 50% ispitivanih ćelija u odnosu na kontrolni uzorak
ICP	izotermalna kalorimetrijska titracija
HA	hemaglutinin

HC	dugi niz
HepG2	ćelijska linija humanog kancera jetre
hES-MN	motorni neuroni razvijeni iz embrionalnih matičnih ćelija čoveka
hiPSC	indukovana humana pluripotentna matična ćelija
HLM	humani mikrozomi jetre
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi (eng. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPPK	hidroksimetilpterin-pirofosfokinaza
HRMS	masena spektrometrija visoke rezolucije (eng. <i>high resolution mass spectrometry</i>)
HSA	humani serum albumin
HTS	visoko efikasni skrining (eng. <i>high throughput screening</i>)
Ki	konstanta inhibicije
K1	višestruko rezistentan <i>Plasmodium falciparum</i> soj
LC	kratki niz
LD₅₀	letalna doza, doza potrebna da ubije 50% ispitivanog uzorka
mES-MN	motorni neuroni razvijeni iz embrionalnih matičnih ćelija miša
MFQ	meflokin
MDR1-MDCK	Madin Darby ćelije psećeg bubrega sa MDR1 genom
MLM	mišji mikrozomi jetre
MPN	mišić hemidijafragme miša sa pridruženim freničnim nervom (eng. <i>mice phrenic nerve hemidiaphragm</i>)
NAP	protein koji gradi kompleks sa holotoksinom (eng. <i>neurotoxin-associated proteins</i>)
NF54	hlorokin-osetljiv <i>Plasmodium falciparum</i> soj
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirolidon
NMR	nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija
NMT	<i>N</i> -miristoiltransferaza
NTNHA	netoksični nehamglutininski protein (eng. <i>nontoxic non-hemagglutinin</i>)
PCC	piridinjum-hlorhromat
PCR	eng. <i>polymerase chain reaction</i>
PfCRT	transporter hlorokin-rezistentnog soja <i>Plasmodium falciparum</i>
PfFAS	<i>Plasmodium falciparum</i> sintetaza masnih kiselina
PfHT1	<i>Plasmodium falciparum</i> heksozni transporter
PPB	vezivanje za proteine plazme

RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne kiseonične vrste
SHMT	serin-hidroksimetil-transferaza
SMFA	esej kojim se određuje sposobnost jedinjenja da blokiraju transmisiju između čoveka i komarca (eng. <i>standard membrane feeding assay</i>)
SNAP-25	jedan od proteina SNARE kompleksa (eng. <i>Synaptosomal-Associated Protein 25</i>)
SNARE	proteinski kompleks neophodan za vezivanje sinaptičke vezikule (eng. <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor</i>)
SPhos	2-dicikloheksilfosfino-2',6'-dimetoksibifenil
Src	sarkoma
Syn	sintaksin
TFA	trifluorsirćetna kiselina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna hromatografija
TM91C235	višestruko rezistentan tajlandski <i>Plasmodium falciparum</i> soj
TPEN	<i>N,N,N',N'</i> -tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamin
TrxR-Trx	tioeredoksin reduktaza-tioeredoksin
TS	timidilat-sintaza
W2	hlorokin-rezistentan <i>Plasmodium falciparum</i> soj
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organization</i>)
3D7	višestruko osetljiv <i>Plasmodium falciparum</i> soj
3,4-DAP	3,4-diaminopiridin

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. BOTULINUM NEUROTOKSINI (BoNT)	3
2.1.1. Struktura i mehanizam dejstva BoNT	4
2.1.2. Inhibitori BoNT/A.....	8
2.1.2.1. Lečenje botulizma	8
2.1.2.2. Mali molekuli kao inhibitori.....	8
2.1.2.3. Inhibitori koji ne utiču na glavne korake mehanizma dejstva BoNT	14
2.1.2.4. Razvoj eseja za detekciju BoNT	17
2.1.2.5. <i>Ex vivo</i> studije	20
2.1.2.6. <i>In vivo</i> studije	21
2.2. MALARIJA	25
2.2.1. <i>Plasmodium</i> paraziti	25
2.2.2. Ciklus malarijskog parazita	25
2.2.3. Klinička slika malarije.....	27
2.2.4. Razvoj antimalarika i pojava rezistencije.....	27
2.2.5. Različiti mehanizmi inhibicije.....	29
2.2.6. Podela antimalarika prema fazi ciklusa malarijskog parazita u kojoj deluju	31
2.2.6.1. Antimalarici koji deluju u fazi jetre	32
2.2.6.2. Antimalarici koji deluju u eritrocitnoj fazi.....	33
2.2.6.3. Antimalarici koji blokiraju transmisiju	34
3. NAŠI RADOVI	37
3.1. Dizajn novih steroidnih i benzotiofenskih derivata aminohinolina	37
3.1.1. Molekulsko modelovanje novih derivata aminohinolina kao inhibitora BoNT/A LC	37
3.1.1.1. Steroidni derivati aminohinolina	37
3.1.1.2. Benzotiofenski derivati aminohinolina.....	44
3.1.2. Dizajn benzotiofenskih derivata aminohinolina kao inhibitora <i>P. falciparum</i> parazita ..	48
3.2. Sinteza novih benzotiofenskih i steroidnih derivata aminohinolina	50
3.2.1. Sinteza benzotiofenskih derivata aminohinolina.....	50
3.2.1.1. Sinteza benzotiofenskih derivata sa alifatičnim mostom normalnog niza i benzilaminoalkil-mostom	50
3.2.1.2. Sinteza benzotiofenskog derivata aminohinolina sa 1,2,4-triazolom u mostu	55
3.2.1.3. Sinteza benzotiofenskog derivata aminohinolina sa trostrukom vezom u mostu	57
3.2.2. Sinteza steroidnih derivata aminohinolina	57
3.2.3. Sinteza račvastih aminohinolina i aminohinolina normalnog niza.....	62
3.3. Inhibicija BoNT/A LC	65
3.3.1. <i>In vitro</i> HPLC proteolitički esej	65
3.3.2. Esej u motornim neuronima (preintoksikacioni model).....	75
3.3.3. Esej u motornim neuronima (postintoksikacioni model)	81
3.4. Metabolička i farmakokinetička analiza jedinjenja 17 (JK141)	85
3.4.1. ADMET osobine	85
3.4.2. <i>In vitro</i> proučavanje vezivanja 17 (JK141) za proteine plazme	87

3.4.2.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje konstante vezivanja 17 (JK141) za HSA i AGP.....	88
3.4.2.2. Hromatografsko određivanje procenta vezivanja 17 (JK141) za HSA i AGP.....	90
3.4.2.3. Proučavanje uticaja vezivanja jedinjenja 17 (JK141) na promenu sekundarne strukture HSA pomoću FTIR	90
3.4.3. <i>In vivo</i> farmakokinetička analiza.....	91
3.4.3.1. Validnost metoda za određivanje ukupne i slobodne koncentracije 17 (JK141)	92
3.4.3.2. Oralna administracija jedinjenja.....	95
3.4.3.3. Intraperitonealna administracija jedinjenja	98
3.4.3.4. Supkutana administracija jedinjenja.....	98
<i>3.5. Inhibicija parazita Plasmodium falciparum.....</i>	<i>101</i>
3.5.1. <i>In vitro</i> antimalarijska aktivnost prema aseksualnim formama parazita	101
3.5.2. Inhibicija nastajanja beta-hematina (BHIA).....	107
3.5.3. <i>In vitro</i> antimalarijska aktivnost prema seksualnoj formi parazita.....	108
3.5.4. <i>In vivo</i> antimalarijska aktivnost.....	109
<i>3.6. Ispitivanje toksičnosti u in vivo uslovima.....</i>	<i>115</i>
3.6.1. Model zebra ribice.....	115
3.6.2. Model miša.....	116
<i>3.7. Jedan hemotip – dve mete</i>	<i>118</i>
4. EKSPERIMENTALNI DEO.....	120
5. ZAKLJUČAK.....	225
6. CONCLUSION.....	228
7. PRILOG	230
8. LITERATURA	247

1. UVOD

Botulinum neurotoksini su najjači biološki toksini i predstavljaju veliku pretnju kao lako pristupačni i primenjivi bojni otrovi. Izazivaju botulizam, potencijalno smrtonosnu neuroparalitičku bolest kod ljudi i životinja. Osim intenzivne mehaničke ventilacije, upotreba antitela je za sada jedini odobren farmakološki pristup za lečenje BoNT intoksikacije, zbog čega se u poslednje vreme ulažu značajni naporu kako bi se razvili novi inhibitori.

Malarija je jedna od najrasprostranjenijih parazitskih bolesti na svetu. Procenjuje se da godišnje od malarije oboli više od 200 miliona ljudi, a oko pola miliona umre. U poslednje tri decenije, problem kontrole malarije je postao još izraženiji, zbog činjenice da je došlo do naglog porasta rezistencije parazita prema lekovima i nepovoljnih klimatskih promena, kao i ograničene upotrebe postojećih lekova usled visoke cene i toksičnosti.

Sinteza novih biološki aktivnih jedinjenja predstavlja izazov za svakog hemičara, a razvoj novih struktura sa unapređenim farmakološkim osobinama je ključan. Imajući u vidu brojne prednosti korišćenja malih molekula kao potencijalnih lekova (poput stabilnosti, bioraspoloživosti, načina administracije), cilj ove disertacije je sinteza novih steroidnih i benzo[b]tiofenskih derivata aminohinolina i ispitivanje njihovog antagonističkog dejstva prema botulinum neurotoksinu, kao i njihove antimalarijske aktivnosti prema različitim sojevima i formama parazita *Plasmodium falciparum*.

Ovaj rad se sastoji iz četiri dela:

■ U **Opštem delu** dati su podaci o botulinum neurotoksinu, opisan je mehanizam dejstva, dat pregled literature u kojoj su opisani najnoviji inhibitori ovog toksina, kao i dometi u polju razvoja leka. Ukratko je prikazana trenutna situacija u pogledu rasprostranjenosti malarije, pregled lekova koji se trenutno koriste, kao i novih struktura sa obećavajućom antimalarijskom aktivnošću.

■ U **Našim radovima** prikazan je dizajn i sinteza novih steroidnih i benzo[*b*]tiofenskih derivata aminohinolina, dati su rezultati ispitivanja njihove inhibitorne aktivnosti prema kratkom nizu botulinum neurotoksina serotipa A (BoNT/A LC), holotoksinu BoNT/A unutar neurona, kao i antimalarijska aktivnost benzo[*b*]tiofenskih derivata aminohinolina. Prikazana je i detaljna farmakokinetička analiza steroidnog derivata **17 (JK141)**.

■ U **Eksperimentalnom delu** detaljno su opisani postupci sinteze svih jedinjenja, kao i protokoli bioloških testova.

■ U **Zaključku** je dat pregled najvažnijih rezultata ostvarenih u okviru ove doktorske disertacije.

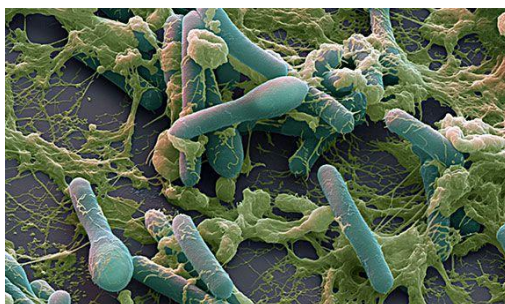
U **Prilogu** se nalaze aktivnosti jedinjenja testiranih u mES-MN; hromatogrami dobijeni prilikom farmakokinetičke analize **17 (JK141)**, dijagrami raspodele za određivanje pK_a , grafici određivanja rastvorljivosti, grafici aktivnosti jedinjenja u BHIA eksperimentu.

Priložen je i **CD** sa spektrima (NMR, IR, HRMS, GC-MS), HPLC hromatogramima, mikroanalizama i vrednostima optičke rotacije sintetisanih jedinjenja.

2. OPŠTI DEO

2.1. BOTULINUM NEUROTOKSINI (BoNT)

Botulinum neurotoksini (BoNT) su proteini koje luči anaerobna, Gram-pozitivna bakterija *Clostridium botulinum* (slika 1), ali i manje poznati sojevi poput *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* i *Clostridium argentinense*.¹ Postoji najmanje devet različitih serotipova: BoNT/A-G, BoNT/F5A(H)^{2,3} i nedavno identifikovan serotip BoNT/X.⁴ Do sada su to najjači poznati prirodni otrovi, sa letalnom dozom kod čoveka od 1 ng/kg telesne mase. Botulinum neurotoksini ispoljavaju toksičnost tako što blokiraju oslobađanje neurotransmitera acetilholina iz perifernih nervnih završetaka, što vodi respiratornoj i mišićnoj paralizi. Svi poznati serotipovi mogu da dovedu do trovanja kod ljudi i životinja, ali se serotip BoNT/A smatra najsmrtonosnijim, zbog čega je i najbolje ispitan.¹



Slika 1. Bakterija *Clostridium botulinum*⁵

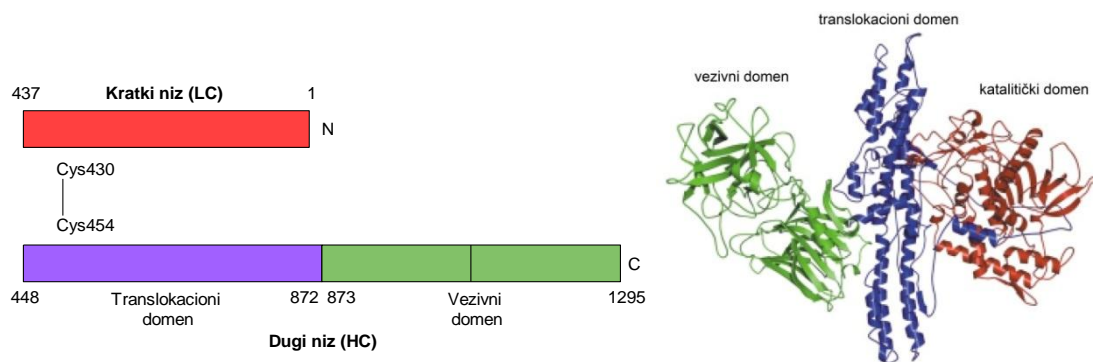
Neuroparalitički sindrom koji izazivaju ovi toksini poznat je kao botulizam i može biti prouzrokovan na nekoliko različitih načina: unosom hrane koja sadrži toksin, kontaminacijom traumatizovanog tkiva sporama *Clostridium botulinum* ili udisanjem toksina u obliku aerosola, a neretko se javlja i botulizam novorođenčeta.⁶ Nakon što toksin dospe do cirkulatornog sistema, a zatim i do nervnog tkiva gde ulazi u nervne ćelije i blokira sprovođenje nervnih impulsa, dolazi do kliničkog ispoljavanja bolesti koju karakteriše čitav niz kliničkih simptoma, poput slabosti skeletne muskulature, zamućenog vida, otežanog govora, gutanja i disanja. Svest je tokom bolesti očuvana.

Simptomi botulizma mogu da traju nekoliko meseci, a bolesnici osećaju slabost i do 1–2 godine nakon trovanja. Oporavak kod odraslih osoba je najčešće potpun, ali postoje slučajevi kada usled srčanog zastoja i opstrukcije disajnih puteva dolazi do smrtnog ishoda.¹ Mnogo veću pretnju, usled izuzetno niske LD₅₀, predstavlja upotreba botulinum neurotoksina u bioterorizmu,⁷ pa je tako još 1931. godine tokom japanske okupacije Mandžurije zatvorenicima davana hrana kontaminirana sporama *C. botulinum*, a 90-ih godina prošlog veka, nakon Zalivskog rata, Irak je proizveo 19 000 litara BoNT/A sa ciljem da ga koristi kao biološko oružje.⁸

Uprkos izraženoj toksičnosti, pravilna upotreba toksina u adekvatnim dozama našla je primenu u medicini u lečenju raznovrsnih oboljenja. Od strane FDA (američke Agencije za hranu i lekove, eng. *Food and Drug Administration, SAD*), odobrena je upotreba BoNT/A za lečenje različitih tipova mišićnih spazama, poput strabizma, blefarospazma i cervikalne distonije. Osim toga, upotreba ovog toksina je proširena i na oboljenja koja nisu neuromišićnog tipa, kao što su migrena, preterano znojenje ili miofascijalni bol. Pod trgovačkim nazivom *Botox*, BoNT/A se intenzivno koristi u različitim kozmetičkim tretmanima.⁹

2.1.1. Struktura i mehanizam dejstva BoNT

Botulinum neurotoksini se sintetišu kao neaktivni polipeptidni niz, mase ~ 150 kDa, koji se dejstvom intra- ili ekstracelularnih proteaza prevodi u aktivnu formu toksina, sastavljenu od dugog niza, mase ~100 kDa i kratkog niza, mase ~50 kDa. Dugi i kratki niz su međusobno povezani disulfidnom vezom preko aminokiselinskih ostataka Cys430-Cys454 (slika 2). Kratki niz (LC) je Zn²⁺-zavisna metaloproteaza i predstavlja katalitički domen neurotoksina. Dugi niz (HC) se sastoji od dva domena – translokacionog i vezivnog. N-terminalni translokacioni domen formira jonske kanale u lipidnom dvosloju, dok je C-terminalni vezivni domen odgovoran za vezivanje toksina za ganglioziide na površini motornih neurona.⁹



Slika 2. Struktura botulinum neurotoksina: prikaz kratkog niza koji predstavlja katalitički domen i dugog niza koji se sastoji iz vezivnog i translokacionog domena⁹

Na putu do neurona, botulinum neurotoksini moraju da prođu kroz gastrointestinalni trakt. Istraživanja su pokazala da je to omogućeno formiranjem kompleksa sa NAP proteinimaⁱⁱⁱ, koji se sastoje od netoksičnog nehemaglutininskog proteina^{iv} i tri hemaglutinin proteina^v. BoNT biva oslobođen iz kompleksa prilikom prelaska iz kisele u neutralnu sredinu, odnosno, iz gastrointestinalnog trakta u krvotok. Zaštitna uloga ovih proteina ogleda se u činjenici da je oralna letalna doza kompleksa 10–20 puta niža od letalne doze slobodnog toksina. U suprotnom, slobodan BoNT biva hidrolizovan tripsinom, kao i u uslovima kisele sredine, što je dokazano u *ex vivo* MPN esej^{vi}.¹⁰

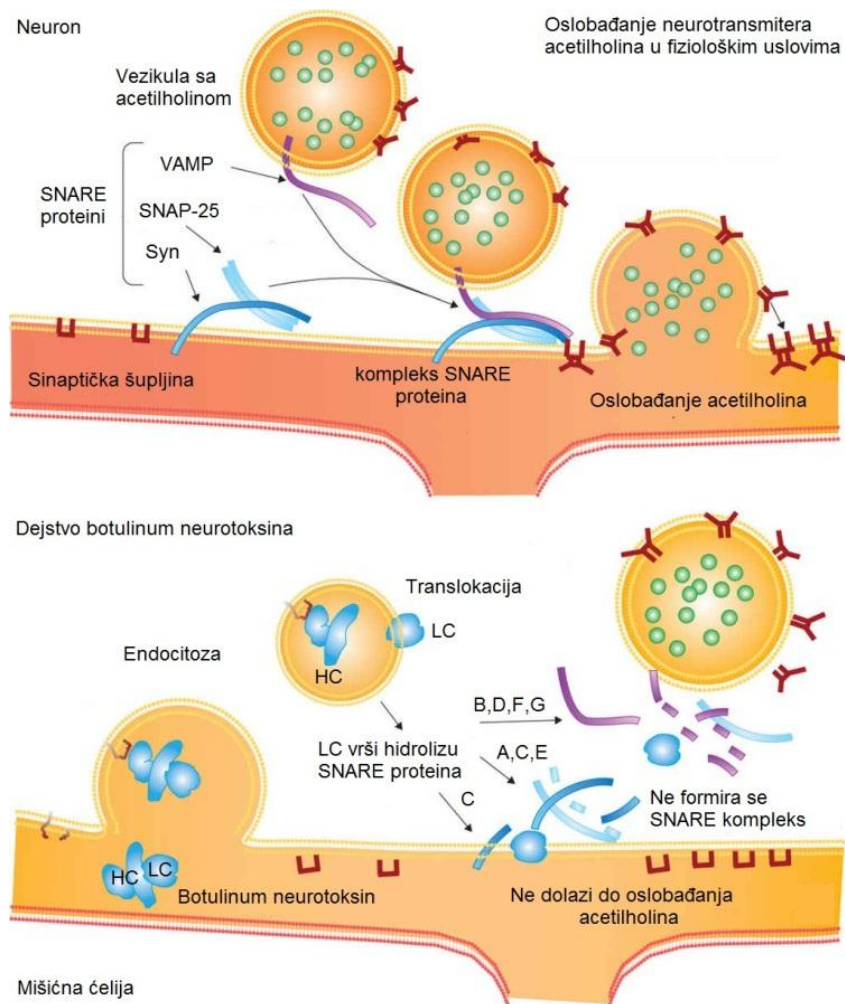
Nakon što prođu kroz gastrointestinalni trakt i epitel, botulinum neurotoksini bivaju dispergovani u ekstracelularne tečnosti, odakle dospevaju do limfnog sistema i cirkulacije. Ovi toksini nisu u stanju da prođu krvno-moždanu barijeru, pa ne predstavljaju pretnju za centralni nervni sistem, već njihovu glavnu metu predstavljaju holinergični nervni završeci. Botulinum neurotoksini su visoko specifični, imajući u vidu da se vezuju isključivo za periferne nervne završetke, i to uglavnom skeletnih i autonomnih nerava. Mehanizam dejstva botulinum neurotoksina odvija se u četiri faze (slika 3): 1) vezivanje toksina za receptore na površini motornih neurona, 2) endocitoza, 3) translokacija kratkog niza u citosol i 4) hidroliza SNARE proteinskog kompleksa (eng. *Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Receptor*).^{9,11}

ⁱⁱⁱ eng. *neurotoxin-associated proteins*

^{iv} eng. *NTNHA, nontoxic non-hemagglutinin*

^v eng. *HA, hemagglutinin*

^{vi} MPN esej koristi mišić hemidijafagme miša sa pridruženim freničnim nervom (eng. *mice phrenic nerve hemidiaphragm*).



Slika 3. Mehanizam dejstva botulinum neurotoksina¹²

Vezivanje za receptore – U prvoj fazi toksin se preko vezivnog domena dugog niza vezuje za oligosaharidnu jedinicu gangliozida na površini motornih neurona. Zatim sledi vezivanje za specifične receptore – transmembranske proteine sinaptotagmin (Syt) i SV2^{vii}. Ovi proteini, iako se nalaze unutar sinaptičke vezikule, postaju izloženi za vezivanje botulinum neurotoksina nakon fuzije sinaptičke vezikule i presinaptičke membrane.

Endocitoza – Nakon složenog dualnog mehanizma vezivanja, toksin endocitozom ulazi u citosol neurona. Za BoNT/A je poznato da brzo ulazi u nervnu ćeliju i da je broj molekula toksina u korelaciji sa brojem SV2 molekula u membrani.

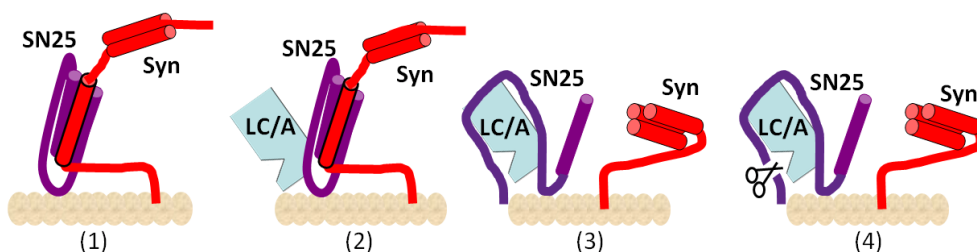
Translokacija – Posle endocitoze sledi proces translokacije kratkog niza (LC) iz sinaptičke vezikule u citosol neurona. Unutar endozomalne vezikule pH je niži (~ 4,5)

^{vii} protein sinaptičke vezikule (eng. *synaptic vesicle protein*)

zahvaljujući dejstvu protonске pumpe, koja inicira transport neurotransmitera i H^+ jona u endozomalnu vezikulu. U uslovima kisele sredine, kratki i dugi niz prodiru u lipidni dvosloj membrane. Kratki niz se oslobađa tako što tioredoksin reduktaza-tioredoksin sistem (TrxR-Trx) vrši raskidanje disulfidne veze između HC i LC.

Hidroliza SNARE proteina – U fiziološkim uslovima, uloga kompleksa SNARE proteina je da omogući fuziju vezikula koje sadrže neurotransmiter acetilholin i membrane neurona (slika 3). Acetilholin se tada oslobađa u sinaptičku šupljinu i vezuje za mišićne receptore, omogućavajući provođenje nervnih impulsa i kontrakciju mišića. Međutim, posle BoNT intoksikacije, oslobođeni kratki niz (metaloproteaza koja u aktivnom mestu sadrži Zn^{2+}), vrši hidrolizu kompleksa SNARE proteina (SNAP-25, sintaksin (Syn) i sinaptobrevin (VAMP^{viii})). Svaki od serotipova je specifičan za određeni protein, pa tako BoNT/A i BoNT/E hidrolizuju SNAP-25, BoNT/C SNAP-25 i sintaksin, dok BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F i BoNT/G hidrolizuju VAMP. Posledica hidrolize je nagomilavanje acetilholina unutar neurona, čime je sprečena egzocitoza acetilholina u sinaptičku šupljinu, što dovodi do paralize skeletne muskulature i muskulature unutrašnjih organa.

Mehanizam vezivanja kratkog niza BoNT/A za SNAP-25 je izuzetno složen i odvija se u nekoliko koraka. Na slici 4 prikazan je kompleks koji formiraju SNAP-25 i sintaksin (Syn). Za SNAP-25 se prvo vezuje α -egzodomen BoNT/A LC. Ovo vezivanje zatim indukuje vezivanje SNAP-25 za β -egzodomen, što dovodi do konformacionih promena formiranog kompleksa i ispoljavanja proteolitičke aktivnosti aktivnog mesta kratkog niza.¹³ Aktivno mesto kratkog niza sadrži karakterističan aminokiselinski niz His-Glu-Xaa-Xaa-His. Dva His i jedan Glu ostatak se koordinuju za Zn^{2+} , dok četvrto koordinaciono mesto okupira molekul vode.¹⁴



Slika 4. Vezivanje BoNT/A LC za SNAP-25¹³

^{viii} eng. vesicle-associated membrane protein

Uloga cinka kao enzimskog kofaktora u ispoljavanju proteolitičke aktivnosti, potvrđena je aktivnošću poznatog helatora jona teških metala, *N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN). TPEN dovodi do odlaganja dejstva botulinum neurotoksina A i B u mišićima hemidijafragme miša, ali je zbog izuzetno visoke toksičnosti u mišu odbačen kao potencijalni lek.^{15,16} Trenutno je velika pažnja posvećena razvoju raznovrsnih struktura kao potencijalnih inhibitora botulinum neurotoksina sa dejstvom u različitim fazama intoksikacije.

2.1.2. Inhibitori BoNT/A

2.1.2.1. Lečenje botulizma

Vakcina protiv botulizma postoji, ali se retko koristi usled slabe efikasnosti i neželjenih efekata.⁶ Trenutno, jedini farmakološki pristup u lečenju BoNT intoksikacije, koji je 2013. godine odobren od strane FDA, je upotreba antitela (*Botulism Antitoxin Heptavalent*, BAT).¹⁷ Upotreba antitela u lečenju BoNT intoksikacije je ograničena veoma malim terapijskim prozorom, jer antitela ne mogu da uđu u neuronske ćelije i stoga su efikasna jedino na neurotoksin koji se nalazi u cirkulaciji.¹⁸

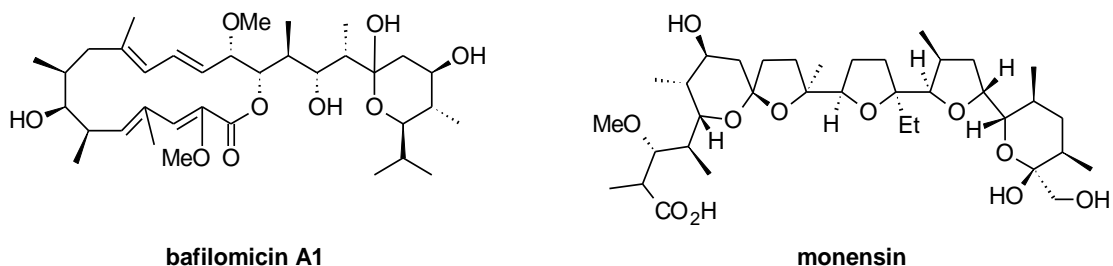
2.1.2.2. Mali molekuli kao inhibitori

Iz navedenih razloga, sve veću pažnju privlače novi mali molekuli kao potencijalni antagonisti BoNT. U zavisnosti od faze mehanizma u kojoj deluju, inhibitore BoNT je moguće podeliti u nekoliko grupa:

- **Inhibitori koji sprečavaju vezivanje BoNT za receptore na površini neurona** su polisijalovani gangliozidi GT1b koji se vezuju za toksin¹⁹ ili lektini biljnog i životinjskog porekla koji se umesto BoNT vezuju za receptore.²⁰ Mana ovih inhibitora je što su efikasni samo pre ulaska toksina u neurone, pa ne mogu da se upotrebe u terapijske svrhe.

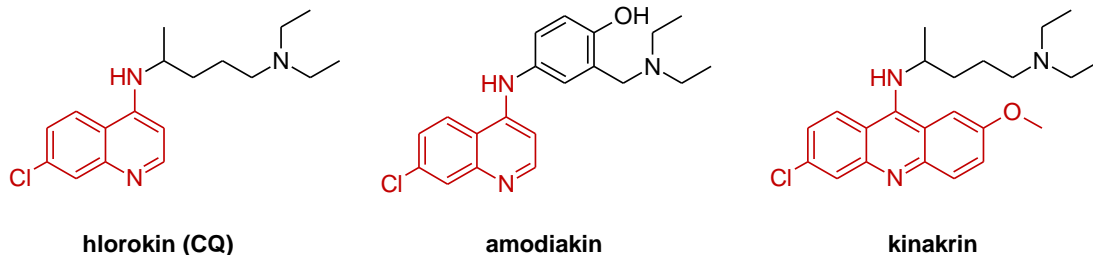
- **Inhibitori koji deluju u fazi translokacije** kontrolišu kiselost sredine, čime sprečavaju odvajanje kratkog niza od dugog i njegovo oslobađanje u citosol neurona. Takvi su inhibitori H⁺-ATP-aze poput bafilomicina A1²¹ ili jonofore koje povećavaju propustljivost membrane prema H⁺, K⁺ i Na⁺ jonima poput monensina²² prikazani na

slici 5. Međutim, ovi molekuli ne vrše inaktivaciju toksina, pa su slično gore navedenim inhibitorima, dovoljno efikasni samo ukoliko se primene pre toksina ili neposredno posle intoksikacije.



Slika 5. Inhibitori translokacije koji regulišu pH unutar endozomalne vezikule

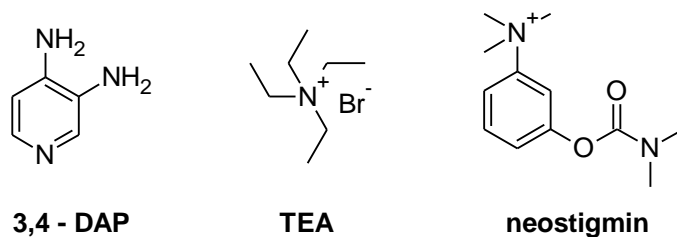
Otkriveno je da se i pojedini antimalarici hinolinske i akridinske strukture ponašaju kao inhibitori translokacije, sprečavajući snižavanje pH unutar endozomalne vezikule. Hlorokin, amodiakin i kinakrin prikazani na slici 6 dovode do odlaganja paralize mišića hemidijafragmi izolovanih iz CD-1 miševa.²³



Slika 6. Antimalarici kao antagonisti BoNT/A

▫ **Blokatori K⁺ kanala** deluju tako što utiču na povećanje koncentracije Ca²⁺ jona, koji dovode do prskanja vezikula sa neurotransmitterom acetilholinom. Najpoznatiji inhibitori koji pripadaju ovoj grupi su 3,4-diaminopiridin (**3,4-DAP**), tetraetilamonijum-bromid i neostigmin, od kojih je **3,4-DAP** najefikasniji (slika 7). Ipak, nekoliko problema je povezano sa upotrebom ovih inhibitora za lečenje botulizma. Osnovna mana je što se brzo eliminišu iz organizma, za razliku od botulinum neurotoksina, koji se u organizmu zadržava i do nekoliko meseci. Osim toga, aminopiridini poput **3,4-DAP** izazivaju izvesne toksične efekte, usled čega se ne mogu

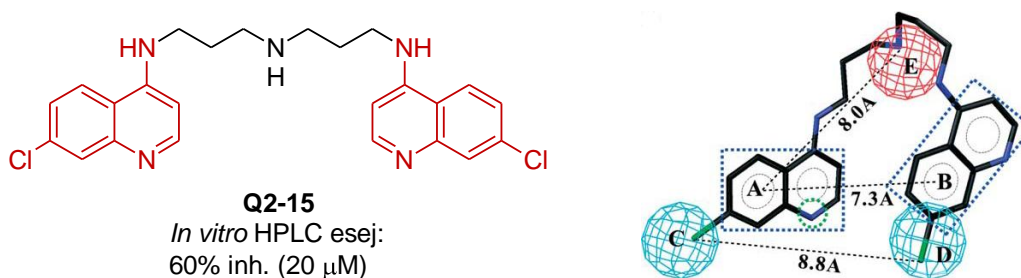
koristiti u visokim dozama. Upotreba **3,4-DAP** u kombinaciji sa tetraetilamonijum-bromidom (**TEA**) ili neostigminom, takođe se nije pokazala kao naročito uspešna.²⁴



Slika 7. Blokatori K⁺ kanala

▫ **Inhibitori BoNT metaloproteaze** su i dalje tema kojoj se pridaje najviše značaja kada je u pitanju razvoj novih malih molekula kao inhibitora botulinum neurotoksina.

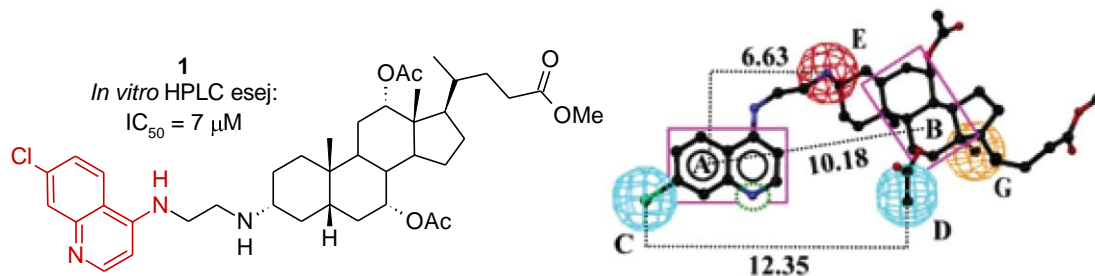
Bavari i saradnici su bili prvi koji su objavili male molekule kao inhibitore BoNT/A LC pri niskim μM koncentracijama i na osnovu molekulskog modelovanja predložili model farmakofore. Bis-aminohinolinski derivat **Q2-15** (slika 8) u *in vitro* eksperimentu pokazao je 60% inhibicije pri standardnoj koncentraciji od 20 μM . Predloženo je da komponente A i B budu na tačno određenom rastojanju i da komponenta A sadrži heteroatom koji bi vezivanjem za cink istisnuo katalitičku vodu. Osim dve hidrofobne komponente C i D, predloženo je da farmakofora sadrži i komponentu E, koja u slučaju **Q2-15** predstavlja jonizabilni alifatični amin.²⁵



Slika 8. Bis-aminohinolinski derivat **Q2-15** aktivan prema BoNT/A LC u *in vitro* HPLC esejima i predloženi model farmakofore²⁵

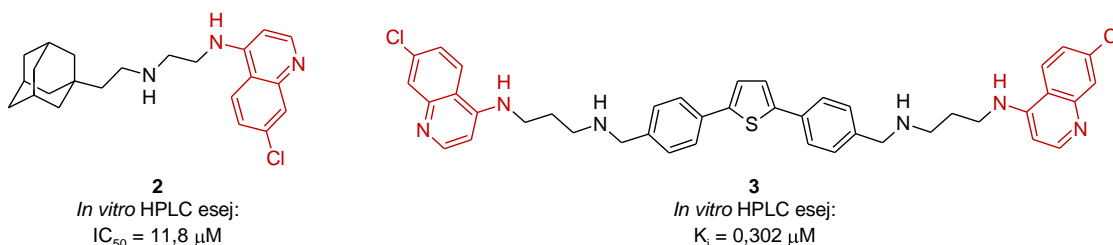
Nekoliko godina kasnije, istraživačka grupa profesora Šolaje je sintetisala steroidne derivate aminohinolina koji su se uklapali u prošireni model farmakofore sa

dotatnom hidrofobnom komponentom G, koja odgovara metil-grupi u položaju C(13) kod jedinjenja **1** (slika 9). Ovo jedinjenje je u *in vitro* HPLC eseju pokazalo izuzetnu aktivnost sa $IC_{50} = 7 \mu M$.²⁶



Slika 9. Steroidni derivat aminohinolina aktivan prema BoNT/A LC u *in vitro* HPLC eseju i predloženi model farmakofore²⁶

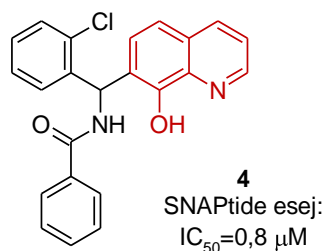
Ista istraživačka grupa je ubrzo razvila i adamantanske derivate, kao i 2,5-bis(4-amidinofenil)tiofenske derivate aminohinolina sa izuzetnom aktivnošću u *in vitro* eseju (slika 10).^{27,28}



Slika 10. Adamantanski i tiofenski derivati aminohinolina aktivni prema BoNT/A LC u *in vitro* HPLC eseju

Dickerson i saradnici su testiranjem serije komercijalno dostupnih i sintetisanih hinolinola otkrili jedinjenje **4** prikazano na slici 11, koje je u SNAPtide eseju^{ix} pokazalo submikromolarnu inhibiciju ($IC_{50} = 0,8 \mu M$).²⁹

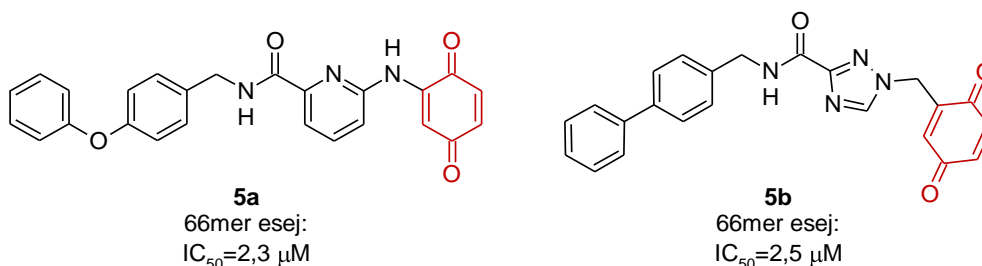
^{ix} U SNAPtide eseju se upotrebljava sintetički peptid sa *o*-aminobenzoevom kiselinom kao fluoroforom i 2,4-dinitrofenolom kao akceptorskom hromoforom.



Slika 11. Hinolinolski derivat aktivan u *in vitro* esejju

Izuzetne inhibitorne aktivnosti prema BoNT/A LC u *in vitro* esejima pokazali su i derivati hidroksamne kiseline^x, razvijeni od strane Jande i saradnika. Ovi inhibitori, poznati kao efikasni helatori Zn²⁺, bili su prvi mali molekuli koji su pokazali aktivnost prema BoNT/A LC u niskim nM koncentracijama.³⁰

Sva do sada navedena jedinjenja vrše inhibiciju BoNT/A LC kroz ostvarivanje nekovalentnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu kratkog niza ili kroz koordinaciju Zn²⁺. Međutim, zbog izuzetno dugog vremena poluživota BoNT/A, težnja za razvojem ireverzibilnih inhibitora je sve veća. Benzohinoni poput jedinjenja **5a** i **5b** prikazanih na slici 12, razvijeni od strane Jande i saradnika, predstavljaju primer kovalentnih inhibitora koji ireverzibilno inhibiraju BoNT/A LC kroz reakciju sa Cis165 koji se nalazi u aktivnom mestu.³¹

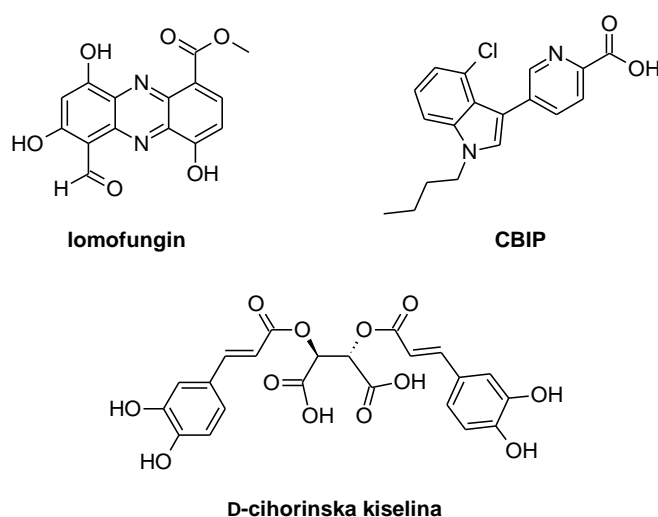


Slika 12. Kovalentni inhibitori benzohinonske strukture aktivni u *in vitro* esejju

Kratki niz BoNT/A, osim aktivnog mesta, poseduje dva dodatna egzodomena preko kojih ostvaruje interakciju sa prirodnim supstratom SNAP-25, čineći ih atraktivnim metama za dejstvo novih inhibitora. α-Egzodomen prepoznaje aminokiselinski fragment SNAP-25 (147-167) koji je u konformaciji α-heliksa. β-

^x Razmatrani u poglavlju 2.1.2.6.

Egzodomen ostvaruje interakcije sa aminokiselinama 201-204 iz β -nabrane konformacije proteina SNAP-25 i nalazi se u neposrednoj blizini veze koja se raskida. Lomofungin (slika 13), sekundarni metabolit izolovan iz Gram-pozitivne bakterije *Streptomyces lomodensis*, poseduje širok spektar biološke aktivnosti, uključujući antibakterijsku i antifungalnu. Osim toga, pokazano je da se ponaša kao nekompetitivni inhibitor BoNT/A LC, vezujući se za β -egzodomen ($K_i = 6,7 \mu\text{M}$).³² Kondenzovani aromatični prstenovi, nekoliko fenolnih OH-grupa, hidrolizabilna estarska funkcionalna grupa, kao i potencijalno reaktivna aldehidna grupa, čine lomofungin nepovoljnim za dalja ispitivanja. Zbog toga su Janda i saradnici nedavno sintetisali još jedan inhibitor koji se vezuje za β -egzodomen. U pitanju je **CBIP**, derivat pikolinske kiseline sa $\text{IC}_{50} = 2,9 \mu\text{M}$ (slika 13).³³ Za D-cihorinsku kiselinu (slika 13), koja pokazuje i kompetitivnu ($K_c = 0,7 \mu\text{M}$) i nekompetitivnu inhibiciju ($K_u = 1,6 \mu\text{M}$), pokazano je da se takođe vezuje za egzodomen, a ne za aktivno mesto. Rezultati dobijeni kada se lomofungin i D-cihorinska kiselina primene u kombinaciji ukazuju na to da se D-cihorinska kiselina najverovatnije vezuje za α -egzodomen.^{32,34}

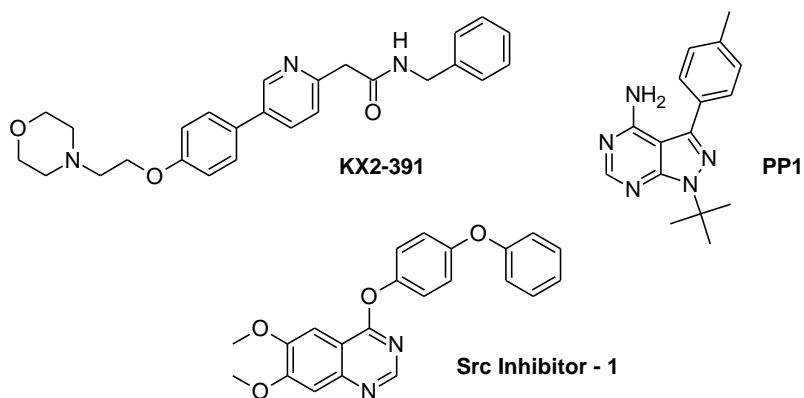


Slika 13. Primeri nekompetitivnih inhibitora BoNT/A LC

Izdvojena jedinjenja čine samo mali deo najrazličitijih klasa jedinjenja koja pokazuju aktivnost prema BoNT/A LC. Najveći broj do sada ispitanih inhibitora ni ne može da se svrsta u grupe sa srodnim strukturnim motivima. Razlog je izuzetno fleksibilno aktivno mesto BoNT/A LC koje može konformaciono da se prilagodi i da primi molekule raznovrsne po obliku, veličini i naelektrisanju.¹⁸

2.1.2.3. Inhibitori koji ne utiču na glavne korake mehanizma dejstva BoNT

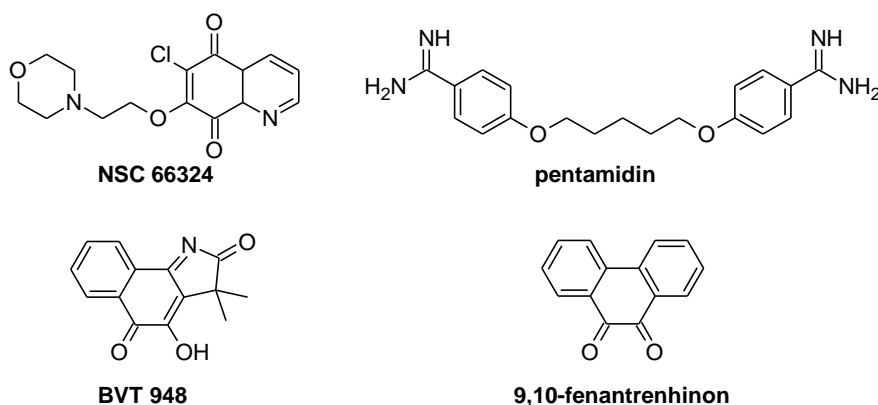
Osim prethodno spomenutog pristupa koji se zasniva na inhibiciji kratkog niza botulinum neurotoksina, u poslednje vreme pažnja se posvećuje lečenju botulizma kroz inhibiciju različitih procesa u motornim neuronima koji omogućavaju da dođe do BoNT intoksikacije. Poznato je da sarkoma (Src) kinaze vrše fosforilaciju BoNT/A LC i time utiču na njegovu proteolitičku aktivnost,³⁵ kao i da učestvuju u fosforilaciji samih SNARE proteina, procesu koji je neophodan za formiranje aktivnog SNARE kompleksa.³⁶ Stoga, Bavari i saradnici su objavili studiju u kojoj su ispitali uticaj različitih odobrenih inhibitora Src kinaza na proces BoNT intoksikacije u motornim neuronima razvijenim iz humanih embrionalnih matičnih ćelija (hES-MN).³⁷ Strukture nekoliko ispitanih inhibitora su prikazane na slici 14. Eksperiment je izvršen tako što su motorni neuroni termostatirani sa inhibitorima u opsegu koncentracija 1–30 μM , a zatim podvrgnuti dejstvu toksina i termostatirani naredna 4 h. Ovi inhibitori su se pokazali kao efikasni u zaštiti SNAP-25 i VAMP-2 i to prema više serotipova: BoNT/A, B i E. Najaktivnije jedinjenje je bilo **KX2-391**, koje štiti SNAP-25 ~90% pri koncentraciji 30 μM , dok IC_{50} iznosi $< 1 \mu\text{M}$. Sva jedinjenja su testirana i u *in vitro* HPLC eseju prema BoNT/A LC i pokazala su $\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{M}$, što potvrđuje da ovi inhibitori ne vrše zaštitu kroz inhibiciju proteolitičke aktivnosti, već učestvuju u drugim mehanizmima ćelijske regulacije.



Slika 14. Inhibitori Src kinaza

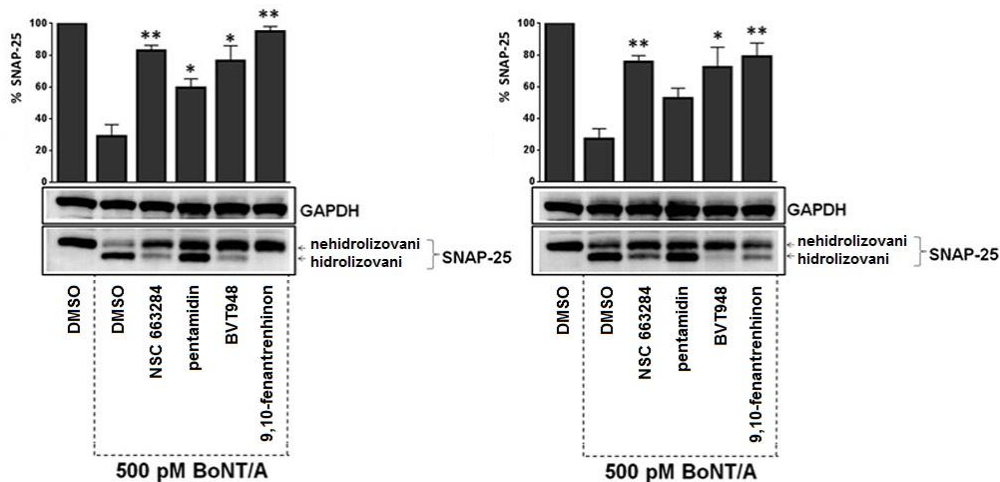
Ista grupa autora je izvršila ispitivanje male biblioteke inhibitora fosfataza i njihov uticaj na proces BoNT intoksikacije.³⁸ Izdvojili su četiri inhibitora fosfataza

(slika 15), koji antagonizuju BoNT/A, B i E, u hES-MN i u mES-MN (motornim neuronima razvijenim iz embrionalnih matičnih ćelija miša). Njihova aktivnost raste sa porastom koncentracije od 0,1–20 μM , kada se primene pre intoksikacije. Jedinjenje koje pokazuje najbolju aktivnost prema serotipu BoNT/A je 9,10-fenantrenhinon ($\text{IC}_{50} \sim 0,1\text{--}1 \mu\text{M}$).



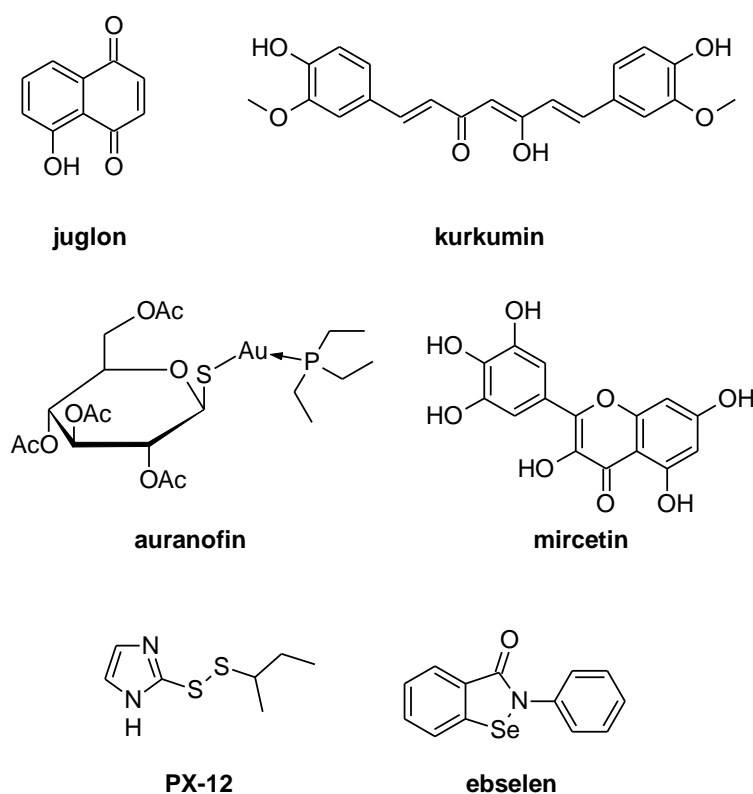
Slika 15. Inhibitori fosfataza

Za razliku od prethodno opisanih inhibitora Src kinaza, ova jedinjenja pokazuju izuzetnu aktivnost i kada se primene 30 i 60 minuta posle intoksikacije. Procenat netaknutog SNAP-25 prikazan je na slici 16. Mogućnost da ova jedinjenja iskazuju aktivnost kroz inhibiciju LC je odbačena, imajući u vidu da IC_{50} vrednosti u *in vitro* HPLC eseju iznose $> 20 \mu\text{M}$.



Slika 16. Zaštita SNAP-25 pomoću inhibitora fosfataza u hES-MN. Levo: jedinjenja dodata 30 min posle intoksikacije; desno: jedinjenja dodata 60 min posle intoksikacije³⁸

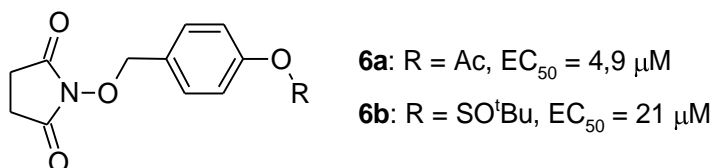
Tioredoxin reduktaza-tioredoxin sistem (TrxR-Trx) nalazi se na citosolnoj strani membrane sinaptičke vezikule i učestvuje u ključnom koraku ispoljavanja toksičnosti BoNT, tako što raskida disulfidne veze između kratkog i dugog niza holotoksina kod serotipova A, C i E. Pokazano je da molekuli koji deluju kao inhibitori ovog sistema takođe vrše zaštitu SNAP-25 od proteolitičke aktivnosti BoNT/A LC u motornim neuronima. Na slici 17 prikazani su inhibitori tioredoksin reduktaze i tioredoksina, ispitani od strane Pirazzini-ja i saradnika. Od svih testiranih inhibitora tioredoksin reduktaze, najbolju aktivnost u cerebelarnim granularnim neuronima pokazao je auranofin sa $IC_{50} \sim 0,5 \mu M$, dok kod inhibitora tioredoksina, PX-12 i ebselena, IC_{50} vrednosti iznosi $\sim 10\text{--}20 \mu M$. Sva jedinjenja su testirana tako što su dodata 30 minuta pre intoksikacije.³⁹



Slika 17. Inhibitori tioredoksin reduktaze i tioredoksina

Tioredoxin reduktaza kao potencijalna meta novih antagonista botulinum neurotoksina bila je predmet istraživanja i Jande i saradnika.⁴⁰ Derivati *N*-hidroksisukcinimida, acetil-estar **6a** i *terc*-butilsulfinil-estar **6b** testirani su u motornim neuronima humanih pluripotentnih matičnih ćelija (hiPSC) i pokazali su

zaštitu SNAP-25 kada se primene neposredno posle intoksikacije (slika 18). Autori su potvrdili da ova jedinjenja vrše inhibiciju TrxR sa IC_{50} vrednostima 0,71 i 5,39 μ M.



Slika 18. Primeri ispitivanih inhibitora tioredoksin reduktaze i njihove EC_{50} vrednosti u hiPSC motornim neuronima

2.1.2.4. Razvoj eseja za detekciju BoNT

In vitro eseji se intenzivno koriste kao metod za odabir potencijalnih inhibitora botulinum neurotoksina. Njihova prednost nad ostalim metodama se ogleda u niskoj ceni, efikasnosti i visokoj reproducibilnosti. Za visoko efikasne skrining eseje^{xi}, kao najprimenjiviji pokazao se FRET esej^{xii} koji koristi SNAPtide supstrat, sintetički peptid sa *o*-aminobenzojevom kiselinom kao fluoroforom i 2,4-dinitrofenolom kao akceptorskom hromoforom.⁴¹ Osim ovog eseja, često se koriste oni kod kojih se proteolitička aktivnost određuje pomoću HPLC, praćenjem proizvoda hidrolize SNAP-25. 17-Mer HPLC esej koga su razvili Bavari i saradnici koristi sintetički supstrat od 17 aminokiselinskih ostataka (SNAP-25 (187-203), acetyl-SNKTRIDEANQRATKML-amid) i sadrži Gln197-Arg198 vezu koja se raskida u prirodnom supstratu SNAP-25.⁴² Janda i saradnici su razvili superiorniji 66-mer HPLC esej koji koristi sintetički supstrat SNAP-25 (141-206) i sadrži najveći deo prirodnog supstrata koji je odgovoran za prepoznavanje. Proizvod hidrolize je peptid od 9 aminokiselinskih ostataka, koji može da se detektuje UV ili MS analizom.⁴³

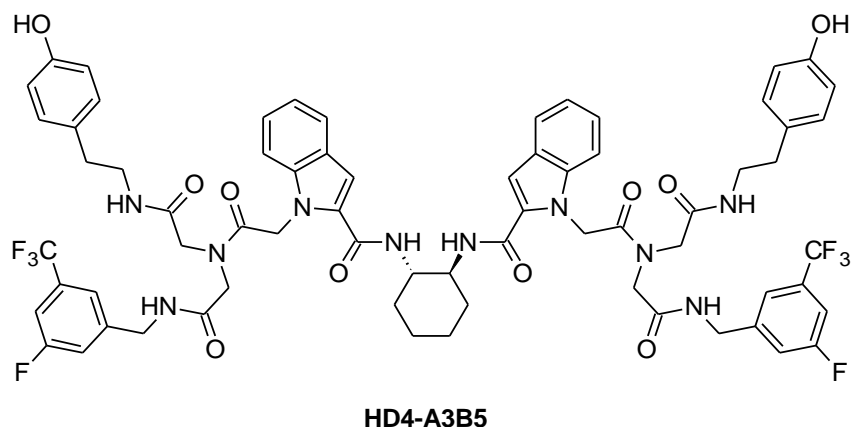
Poslednjih godina sve veću pažnju privlače različiti eseji u ćelijama, zato što simuliraju sve najvažnije korake u procesu intoksikacije, uključujući vezivanje holotoksina za površinu motornih neurona, endocitozu, translokaciju kratkog niza u citosol neurona i ispoljavanje njegove proteolitičke aktivnosti. Bez obzira na tip ćelije koja se koristi u tu svrhu, najčešći metod za detekciju BoNT aktivnosti je stepen

^{xi} eng. HTS, high throughput screening

^{xii} eng. fluorescence resonance energy transfer

hidrolize SNARE proteina Western blot analizom ili ELISA^{xiii} testom. Ćelijski modeli za detekciju BoNT se dele u tri grupe:⁴⁴

▫ **Kontinualne (besmrtne) ćelijske linije** – Iz ćelija raka razvijeno je nekoliko različitih kontinualnih ćelijskih linija, poput neuro-2a (neuroblastom miša), PC12 (feohromocitom pacova) i SH-SY5Y (neuroblastom čoveka). Ovakve ćelijske linije su jednostavne za održavanje i umnožavanje, ali je njihov osnovni nedostatak što su nedovoljno osetljive na BoNT, pa su za postizanje adekvatne proteolize SNARE proteina potrebna duga inkubaciona vremena i koncentracija BoNT u nM opsegu. Primer je jedinjenje **HD4-A3B5** koje je testirano u neuro-2a ćelijskom eseju i koje je pokazalo 61% zaštite SNAP-25 kada se primeni u isto vreme kada i BoNT/A holotoksin (slika 19).⁴⁵

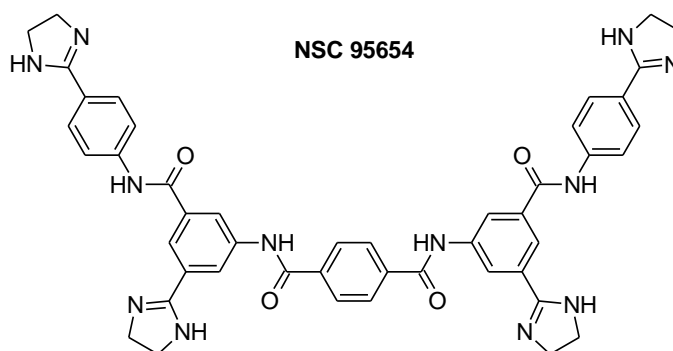


Slika 19. Primer jedinjenja testiranog u neuro-2a ćelijskom eseju

▫ **Primarni neuroni** – Eksperimenti rađeni na raznovrsnim primarnim ćelijama dobijenim iz embriona pileta, miša ili pacova pokazali su mnogo bolju osetljivost na BoNT od kontinualnih ćelijskih linija, ali je njihova mana što ih je izuzetno teško dobiti u dovoljnom broju. Bavari i saradnici su razvili izuzetno osetljiv esej na primarnim neuronima razvijenim iz embrionalnih ćelija pileta,⁴⁶ koji je potom korišćen za evaluaciju inhibitora BoNT/A. Pokazano je da se jedinjenje **NSC 95654**, prikazano na slici 20, ponaša kao inhibitor BoNT/A LC u *in vitro* HPLC eseju ($K_i = 1,80 \mu\text{M}$) i štiti SNAP-25 ~70% pri koncentraciji 40 μM kada se primeni 1 h posle intoksikacije.⁴⁷ Prethodno spomenuti prirodni proizvod lomofungin (slika 13) u primarnim

^{xiii} eng. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

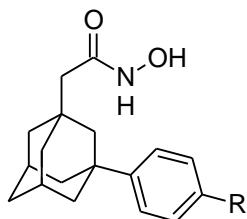
cerebelarnim neuronima pacova vrši zaštitu SNAP-25 >70% pri koncentraciji 150 μ M kada se primeni neposredno pre toksina. EC₅₀ iznosi 131 μ M, što je oko 20 puta veća vrednost od njegove aktivnosti u *in vitro* eseju. Ovaj podatak ukazuje na značaj korišćenja ćelija kao modela za BoNT jer predstavljaju kompleksan biološki sistem i daju realniju sliku mehanizma delovanja inhibitora.³²



Slika 20. Jedinjenje testirano u primarnim neuronima razvijenim iz embrionalnih ćelija pileta

▫ **Embrionalne matične ćelije** – Ovo su pluripotentne ćelije razvijene iz unutrašnje mase blastocista. Mogu da se razmnožavaju i zamrzavaju slično kontinualnoj ćelijskoj kulturi. Iz njih može dalje da se razvije bilo koji tip ćelija, uključujući i neurone. Imajući u vidu nedostatke korišćenja kontinualne ćelijske linije i primarnih neurona, Bavari i saradnici su razvili visoko selektivan model za BoNT - motorne neurone razvijene iz embrionalnih matičnih ćelija miša i čoveka (mES-MN i hES-MN).³⁷ Pokazano je da motorni neuroni razvijeni iz embrionalnih matičnih ćelija miša poseduju sva morfološka i biološka svojstva kao i motorni neuroni u *in vivo* uslovima, i što je još važnije, u stanju su da formiraju nervno-mišićne sinapse. Ipak, hES-MN predstavljaju vrlo važan model-sistem, što je pokazano neretkim slučajevima kada je postignuta različita aktivnost u mES-MN u odnosu na hES-MN.⁴⁸ U motornim neuronima razvijenim iz embrionalnih matičnih ćelija miša i čoveka testirani su prethodno navedeni inhibitori Src kinaza i fosfataza (slike 14 i 15).^{37,38} Detaljnom pretragom literature, ustanovljeno je da je osim ovih inhibitora testirana samo jedna grupa LC inhibitora i to u motornim neuronima razvijenim iz matičnih ćelija pacova. Kod inhibitora **7a-c** uočena je velika razlika u aktivnosti u *in vitro* eseju i u motornim

neuronima, u kojima su se ova jedinjenja pokazala kao toksična pri koncentraciji 20 μM , a pri nižim koncentracijama su bila potpuno neaktivna (slika 21).⁴⁹



7a-c: R = OMe, Br, NO₂

In vitro: IC₅₀ = 0,04-0,50 μM ; K_i = 0,027-0,13 μM

Motorni neuroni: neaktivno <20 μM

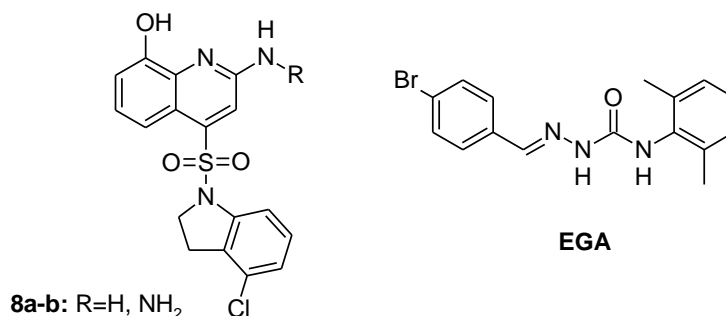
Slika 21. Adamantanski derivati testirani u motornim neuronima razvijenim iz matičnih ćelija pacova

Eksperimenti koji se vrše u ćelijama imaju niz prednosti nad *in vitro* HPLC esejima, koji služe za prvobitnu selekciju jedinjenja. Ovi eseji omogućavaju direktno ispitivanje aktivnosti i selektivnosti potencijalnog inhibitora, kao i indirektno proučavanje fizičko-hemijskih osobina poput rastvorljivosti, permeabilnosti i metaboličke stabilnosti. Jedinjenja koja pokazuju aktivnost u ovakvom eseju, kao i odsustvo citotoksičnosti, postaju glavni kandidati za dalja ispitivanja ADMET osobina i za *in vivo* studije.

2.1.2.5. *Ex vivo* studije

Važan korak u daljem razvoju potencijalnih kandidata za testiranje u životinjama predstavljaju *ex vivo* eksperimenti. U slučaju BoNT modela, razvijen je esej koji koristi hemidijafragmu miša i predstavlja standardni metod za merenje neuroparalitičke aktivnosti. Aktivnost jedinjenja se testira merenjem pokretljivosti mišića dijafragme koja je izložena dejstvu BoNT/A. Na slici 22 prikazana su jedinjenja koja trenutno pokazuju najbolje rezultate u *ex vivo* eseju. To su inhibitori **8a-b** na bazi hinolin-8-ola razvijeni od strane Jande i saradnika (50-60% produžavaju poluvreme paralize)⁵⁰ i **EGA** koga su razvili Pirazzini i saradnici (više od dva puta produžava $t_{1/2}$).⁵¹ **EGA** predstavlja interesantan primer inhibitora za koji je utvrđeno da ne ispoljava aktivnost ni u jednom od četiri glavna koraka mehanizma dejstva botulinum neurotoksina. Pretpostavlja se da

na neki drugi način utiče na kretanje toksina unutar neurona, najverovatnije sprečavajući da dođe do translokacije.



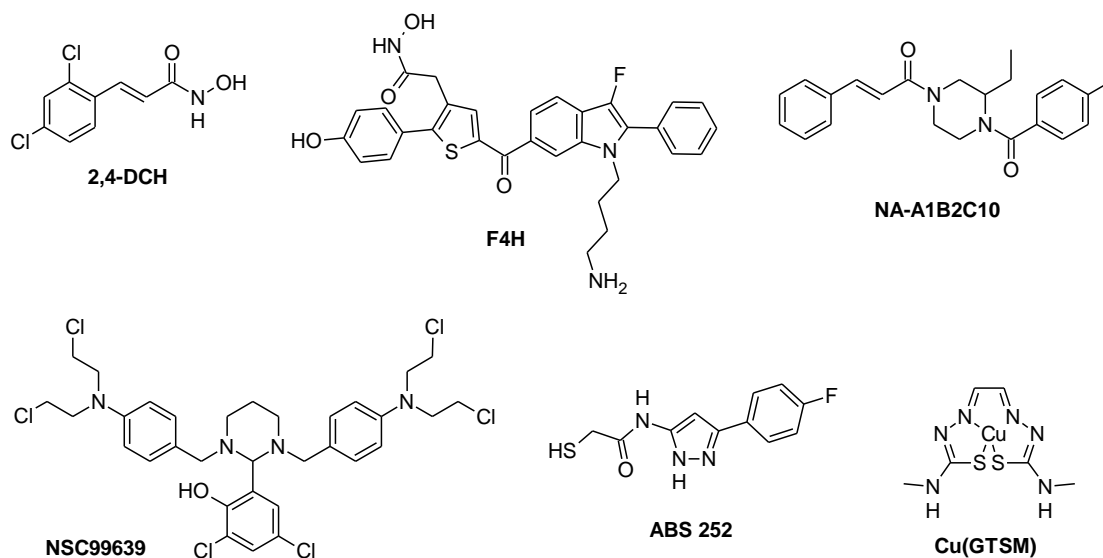
Slika 22. Jedinjenja koja pokazuju značajne aktivnosti u *ex vivo* eksperimentima

2.1.2.6. *In vivo* studije^{xiv}

Na slici 23 prikazana su najvažnija jedinjenja koja su testirana u *in vivo* uslovima. Derivat hidroksamne kiseline **2,4-DCH** sa $IC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ i $K_i = 0,3 \mu\text{M}$ u SNAPtide eseju,³⁰ testiran je u mišu, tako što je intravenski (i.v.) administriran 0,1 mL rastvora 1 mM koncentracije, a zatim intraperitonealno (i.p.) ubrizgan toksin (5LD₅₀). Ishod eksperimenta je svega 16% preživelih miševa bez simptoma botulizma.⁴⁵ Lipofilnije hidroksamne kiseline, veće molekulske mase, poput jedinjenja **F4H** takođe su testirane kao profilaktički agensi u *in vivo* uslovima. Ovo jedinjenje, administrirano i.p. u dozi 2 mg/kg, praćeno sa 5LD₅₀ BoNT/A, omogućilo je preživljavanje svega 10% miševa posle 5 dana.⁵² Interesantan primer predstavlja jedinjenje **NSC99639**, koje je otkriveno putem *in silico* pretrage i testirano u mišu bez ikakvih podataka o *in vitro* aktivnosti. Administracija je izvršena i.v., tako što je jedinjenje (u 100–4690 M višku u odnosu na letalnu dozu toksina) prethodno pomešano sa 1,05LD₁₀₀ BoNT/A i termostatirano 2 h. Rezultat je bio 50% preživelih miševa pri 1200 M višku i 100% preživelih miševa pri 2400–4690 M višku, posle 6 dana. Ipak, u slučaju kada je jedinjenje administrirano neposredno posle toksina, svi miševi su umrli.⁵³ Jedinjenje **NA-A1B2C10**, iako umereno aktivno ($IC_{50} = 12,5 \mu\text{M}$ i 20% zaštite SNAP-25 u N2a ćelijama), testirano je u *in vivo* uslovima. Kada je administrirano i.v. (0,1 mL, koncentracija 2,5 M), praćeno i.p. administracijom 5LD₅₀ BoNT/A, odložilo je smrt za

^{xiv} Tabela prikazuje jedinjenja testirana u *in vivo* uslovima dat je u Prilogu (tabela P1).

oko 3 h u odnosu na kontrolu, ali nije omogućilo preživljavanje miševa.⁴⁵ Jedinjenje **ABS 252** predstavlja LC inhibitor koji pokazuje izuzetnu aktivnost u primarnim cerebelarnim neuronima pacova čak i kada se primeni 30 minuta posle intoksikacije (štiti SNAP-25 ~50% pri koncentraciji 20 μ M i >90% pri koncentraciji većoj od 60 μ M). Ipak, i.v. administracija 1 mg ovog jedinjenja u *in vivo* uslovima ne dovodi do preživljavanja miševa, već samo do produžetka života jedan i po put u odnosu na kontrolu.⁵⁴

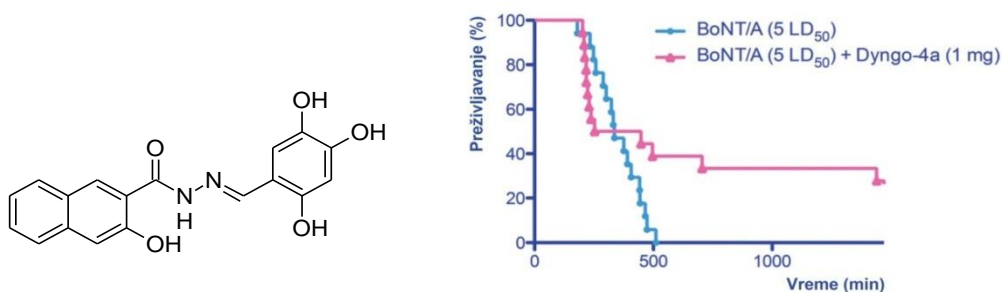


Slika 23. Jedinjenja testirana u *in vivo* eksperimentima

Uprkos svim ovim pokušajima, i dalje ne postoji inhibitor BoNT/A koji se može smatrati efikasnim u *in vivo* modelu, pogotovo kada se primeni posle intoksikacije. Nedavno je Janda sa saradnicima objavio komplekse Cu(II) sa ditiokarbamatima i bis(tiosemikarbazonima) kao inhibitore BoNT/A LC, aktivne i u motornim neuronima humanih pluripotentnih matičnih ćelija (hiPSC). BoNT/A je ubrizgan u miševе i.p. u dozi 5LD₅₀, a jedinjenja su administrirana supkutano (s.c.) posle 1 h u dozi 4,6 mg/kg. Pri ovakvim uslovima eksperimenta, jedinjenje **Cu(GTSM)** prikazano na slici 23 takođe samo dovodi do produžetka života u odnosu na kontrolu, ali ne i do izlečenja.⁵⁵

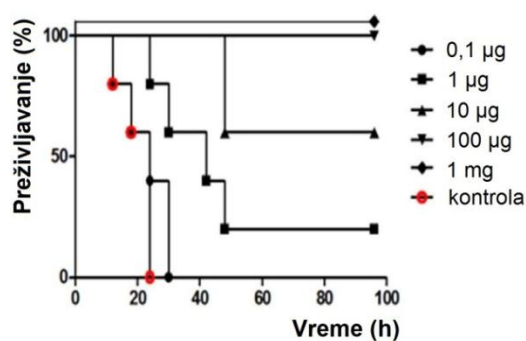
Jedinjenje **Dyngo-4a** prikazano na slici 24 je interesantan primer inhibitora sa dvostrukim mehanizmom delovanja. Prvobitno su Meunier i saradnici ustanovili da vrši inhibiciju dinamina, GTPaze odgovorne za odvajanje novoformirane vezikule sa toksinom u procesu endocitoze.⁵⁶ Nekoliko godina kasnije, Janda sa saradnicima je

utvrdio da se ovo jedinjenje ponaša i kao LC inhibitor. Jedinjenje se pokazalo neaktivno u SNAPtide eseju, ali je pokazalo aktivnost u 66mer eseju, kao kompetitivni inhibitor sa $K_i = 0,32 \mu\text{M}$, ukazujući time na mogućnost vezivanja za egzodomene BoNT/A. Ovo jedinjenje je trenutno jedini mali molekul koji pokazuje aktivnost kada se primeni posle intoksikacije. Administrirano i.p. u dozi 50 mg/kg 3 h posle toksina (5LD₅₀, i.p.) omogućava preživljavanje 30% miševa posle 24 h.⁵⁷



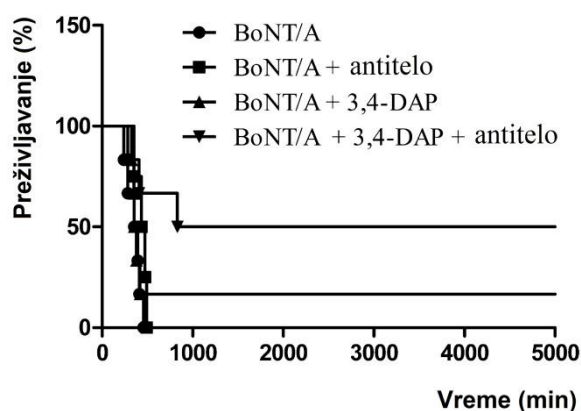
Slika 24. Preživljavanje zaraženih miševa pod dejstvom **Dyngo-4a**⁵⁷

Nedavno su razvijeni i peptidni inhibitori, koji se smatraju najefikasnijim inhibitorima BoNT/A u *in vivo* uslovima do sada. Njihova prednost u odnosu na male molekule leži u tome što su zbog veličine u mogućnosti da istovremeno izvrše inhibiciju i aktivnog mesta BoNT/A LC, ali i drugih vezivnih mesta preko kojih LC stupa u interakciju sa SNAP-25. Dizajn ovih inhibitora je izvršen prema supstratu kratkog niza, odnosno prema segmentu SNAP-25(80-196). Polipeptidni inhibitor **R12-R1-RGF** (oligoarginin-SNAP-25(80-196) sa RGF na C terminusu), pomešan sa 4LD₅₀ BoNT/A LC 30 minuta pre administracije, omogućava preživljavanje svih miševa (slika 25).⁵⁸



Slika 25. Polipeptidni inhibitor **R12-R1-RGF** u *in vivo* uslovima⁵⁸

Poznato je da antitela kao potencijalni terapeutici gube efikasnost nakon što toksin uđe u neuron, odnosno, mogu da se primene jedino na toksin koji se nalazi u cirkulaciji. S druge strane, mana malih molekula je izuzetno kratko vreme poluživota, u odnosu na zadržavanje BoNT u organizmu, koje može da traje i do nekoliko meseci. Zbog toga su Janda i saradnici došli na ideju o kombinovanoj terapiji, odnosno o upotrebi antitela zajedno sa 3,4-diaminopiridinom (**3,4-DAP**), poznatim blokatorom K⁺ kanala. Sa slike 26 se jasno vidi da administracija antitela ili **3,4-DAP**-a nezavisno ne dovodi do izlečenja. Međutim, primenom kombinovane terapije (antitelo administrirano 2 h posle toksina, a **3,4-DAP** u dozi 10 mg/kg administriran 3 h posle toksina), 50% miševa ostaje živo do kraja eksperimenta (5000 min).⁵⁹



Slika 26. Kombinovana terapija antitela i **3,4-DAP**-a⁵⁹

Za uspešno lečenje BoNT intoksikacije neophodno je da inhibitori dospeju do nervno-mišićne šupljine i da uđu u neuron, zbog čega je ključno da se ispita biorasploživost potencijalnog leka. *In vitro* ADMET parametri poput rastvorljivosti, mikrozomalne stabilnosti, permeabilnosti i vezivanja za proteine plazme su osnova za odabir jedinjenja sa potencijalno dobrim farmakokinetičkim osobinama. Od svih do sada testiranih jedinjenja u *in vivo* eksperimentima, jedinjenje **F4H** (prikazano na slici 23) je jedno od retkih za koje je izvršena farmakokinetička analiza. Kada se administrira intraperitonealno u dozi 2 mg/kg, maksimalna koncentracija u krvi iznosi 1,3 μM, a T_{1/2} = 6,5 h.⁵² Imajući u vidu ovu biorasploživost, prethodno navedeni rezultat *in vivo* eksperimenta nije iznenađujuć (10% preživelih miševa).

2.2. MALARIJA

Malarija je jedna od najrasprostranjenijih parazitskih bolesti u svetu, koja zahvata tropske i suptropske regije Afrike, jugoistočne Azije i oblasti reke Amazon. Prema proceni Svetske zdravstvene organizacije (eng. *WHO, World Health Organization*) u 2016. godini od malarije je obolelo 216 miliona ljudi, od toga 445 000 slučajeva sa smrtnim ishodom.⁶⁰ Zbog sve većeg širenja malarije usled pojave rezistentnih sojeva *Plasmodium* parazita i nepovoljne promene klimatskih uslova, postoji velika potreba za razvojem novih lekova koji bi bili jeftini i lako dostupni, posebno u veoma siromašnim delovima sveta, efikasni prilikom oralne administracije i koji bi pokazivali dobru toleranciju.

2.2.1. *Plasmodium* paraziti

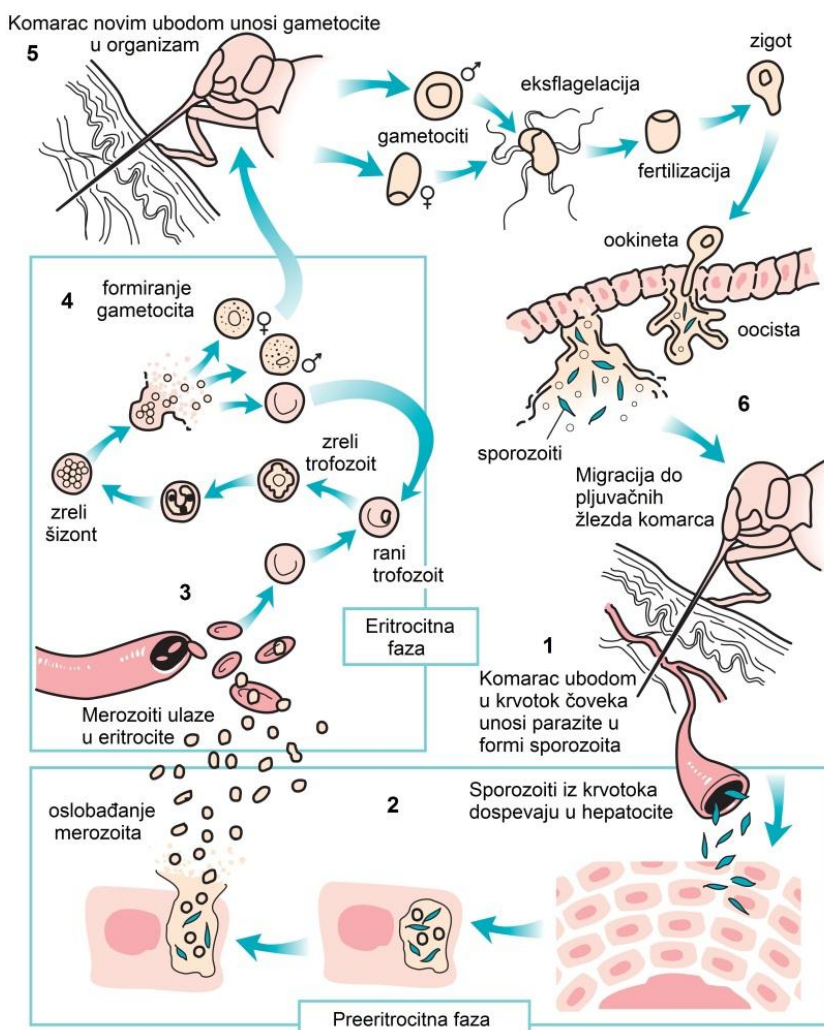
Uzročnici malarije kod čoveka su paraziti iz roda *Plasmodium* – jednoćelijski organizmi koji ne mogu da prežive izvan domaćina. Postoji pet različitih vrsta parazita infektivnih za ljude: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* i *P. knowlesi*. Najozbiljniji oblik malarije izazivaju paraziti *P. falciparum*, koji su u 2016. godini bili odgovorni za >99% slučajeva infekcije u Podсахarskoj Africi.^{60,61}

2.2.2. Ciklus malarijskog parazita

Zajedničko za sve vrste *Plasmodium* parazita je životni ciklus koji se odvija kroz dve faze: aseksualnu fazu odnosno šizogoniju, koja se sastoji iz preeritrocitne i eritrocitne faze i seksualnu fazu odnosno sporogoniju (slika 27). Šizogonija se odvija u prelaznom domaćinu (čoveku), dok se sporogonija odvija u definitivnom domaćinu (komarcu).

Infekcija započinje ubodom ženke komarca roda *Anopheles*, koji u krvotok čoveka unosi parazite u formi sporozoita. Sporozoitima je potrebno oko 60 minuta da stignu do jetre, gde započinje preeritrocitna faza šizogonije. Ova faza traje od 8 do 25 dana, u zavisnosti od vrste *Plasmodium* parazita. Sporozoiti sazrevaju u hepatocitima i oslobađaju se u krvotok u vidu merozoita, koji se potom vezuju za specifične receptore

na površini eritrocita i ulaze u njih. Na taj način započinje eritrocitna faza šizogonije tokom koje se merozoiti brzo razmnožavaju, prolazeći kroz forme prstena (eng. *ring*), trofozoita i šizonta. Posledica je pucanje eritrocita i oslobađanje merozoita koji napadaju nove eritrocite. Deo merozoita se u eritrocitima razvija u muške i ženske polne ćelije – gametocite. Ako bolesnika u ovoj fazi ubode ženka komarca roda *Anopheles* započinje seksualna faza malarijskog parazita. U želucu komarca gametociti se oslobađaju iz eritrocita i transformišu u zigote, a potom u ookinete. One dalje migriraju kroz zid creva i formiraju oociste u kojima se razmnožavaju sporozoiti. Posle pucanja oociste, oslobođeni sporozoiti dospevaju do pljuvačnih žlezda komarca, koji ih novim ubodom prenosi u čoveka, čime započinje novi ciklus malarijskog parazita. Iz prethodno navedenog proizilazi da je faza sporogonije neophodna za dalje prenošenje malarije.^{61,62}



Slika 27. Ciklus malarijskog parazita⁶¹

Unutar malarijskog parazita nalazi se hranljiva vakuola, organela u kojoj se odigrava katabolizam hemoglobina. Peptidaze vrše hidrolizu hemoglobina do pojedinačnih aminokiselina, koje su neophodne za ishranu parazita. Osim aminokiselina, kao proizvod razgradnje hemoglobina nastaje feroprotoporfirin IX, koji se oksiduje do feriprotoporfirina IX. Feriprotoporfirin IX je toksičan za parazita, zato što može da izvrši lizu membrane, da dovede do generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i izvrši inhibiciju mnogih drugih procesa. Stoga, parazit vrši detoksikaciju konverzijom feriprotoporfirina IX u kristalni hemozoin, odnosno malarijski pigment.⁶³

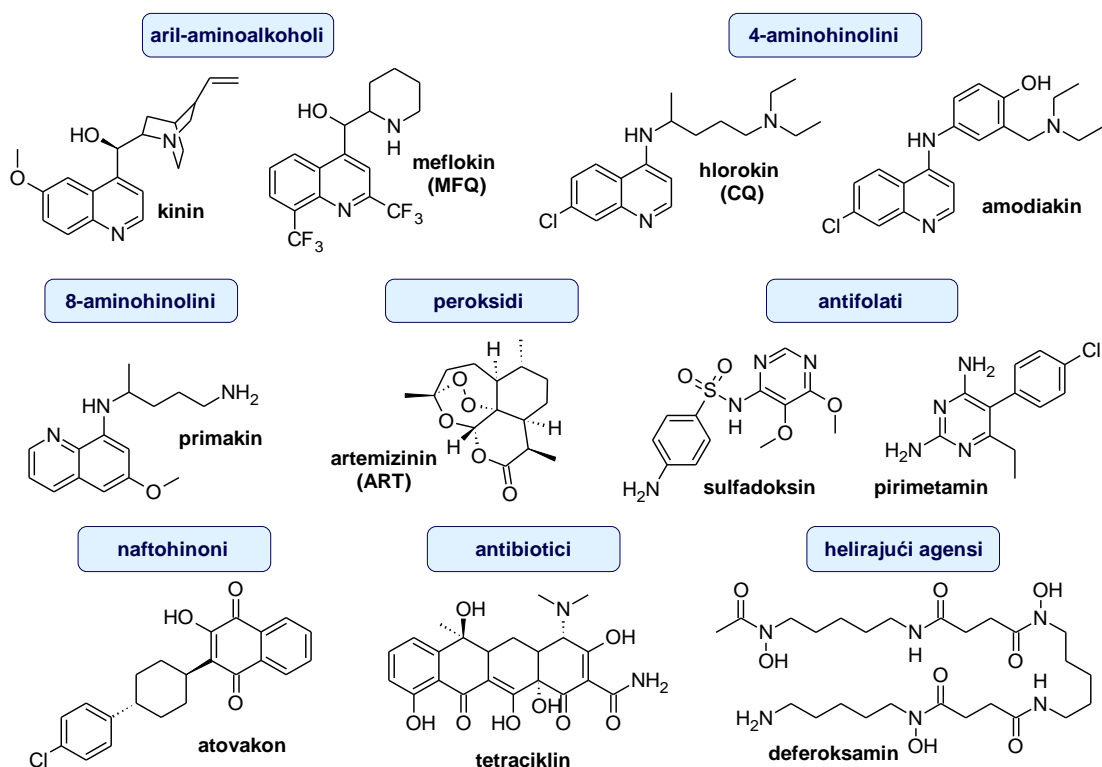
2.2.3. Klinička slika malarije

Iako se malarija najčešće prenosi ubodom komarca, čovek se može inficirati i putem transfuzije krvi, korišćenjem zaraženih igala ili transplacentno. Malarični paroksizam, koji počinje 10 do 15 dana posle uboda inficiranog komarca, povezan je sa umnožavanjem parazita unutar crvenih krvnih zrnaca, a prvi simptomi su povezani sa pucanjem eritrocita i oslobađanjem merozoita u krvotok. Malarični napad započinje glavoboljom, bolom u kostima i ostalim simptomima nalik prehladi. Sledi stadijum groznice koji traje 15 do 60 minuta, a potom dolazi do febrilnog stadijuma sa telesnom temperaturom preko 40 °C, koji traje 2-4 h. Malarični napadi se ponavljaju u pravilnim intervalima, ali različito u zavisnosti od vrste parazita. Dugotrajna infekcija malarijskim parazitom bilo koje *Plasmodium* vrste može dovesti do oštećenja jetre i slezine, usled deponovanja nerastvornog malarijskog pigmenta (hemozoina). Najteži klinički oblik malarije izazivaju paraziti *P. falciparum* koji mogu da inficiraju preko 50% eritrocita i koji mogu da izazovu cerebralnu malariju kao najozbiljniju komplikaciju bolesti. Prelazak parazita kroz krvno-moždanu barijeru vodi nagomilavanju parazita u moždanim kapilarima, što dovodi do kome, a potom i do smrti.⁶¹

2.2.4. Razvoj antimalarika i pojava rezistencije

Podela antimalarika može da se izvrši prema strukturi, mehanizmu delovanja ili fazi ciklusa malarijskog parazita u kojoj ispoljavaju svoje dejstvo. Prema strukturi i

mehanizmu dejstva poznati antimalarici koji su bili u upotrebi ili se i dalje koriste mogu da se razvrstaju u najmanje 8 različitih grupa prikazanih na slici 28.



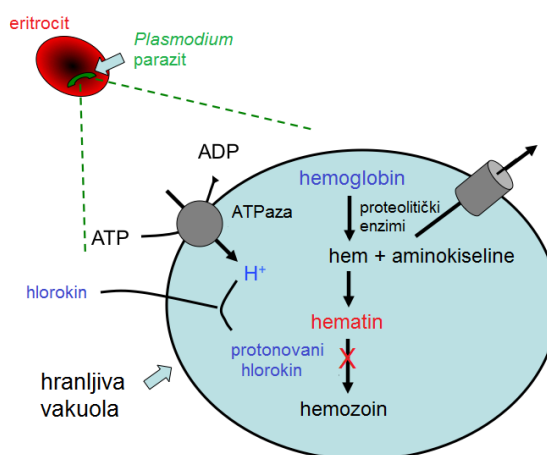
Slika 28. Antimalarici podeljeni u 8 grupa prema strukturi i mehanizmu delovanja

Lekovi koji se u današnje vreme koriste za lečenje malarije su jedinjenja izolovana iz biljaka čija su lekovita svojstva poznata već vekovima – artemizinin, izolovan iz biljke *Artemisia annua* i kinin, izolovan iz *Cinchona* drveta. Pored ovih lekova, razvijeni su brojni sintetički derivati, koji su dugo bili veoma efikasni i jeftini, poput hlorokina i sulfadoksin-pirimetamina, u terapijske i profilaktičke svrhe, sve do pojave rezistencije na hlorokin krajem 60-ih godina prošlog veka. Smatra se da je glavni uzrok rezistencije parazita na hlorokin mutacija *pfcr* gena koji kodira PfCRT protein - transporter preko kog dolazi do izbacivanja hlorokina iz hranljive vakuole, za koju se smatra da je mesto gde hlorokin ispoljava antimalarijsko dejstvo.⁶⁴ Brzina širenja hlorokin-rezistentnih sojeva uticala je na uvođenje kombinovanih terapija najčešće različitim analogima meflokina, atovakona i artemizinina (artemetar, artesunat, dihidroartemizinin i drugi peroksidni antimalarici).⁶⁵ Međutim, duž granice Kambodža-Tajland uveliko je registrovana rezistencija prema kombinovanim terapijama

artemizinina, upravo zbog nekontrolisanog korišćenja artemizinina kao monoterapeutika.^{66,67} Strukture spomenutih lekova prikazane su na slici 28.

2.2.5. Različiti mehanizmi inhibicije

Jedan od prihvaćenih mehanizma dejstva **aril-aminoalkohola** i **4-aminohinolina** je njihovo nagomilavanje u hranljivoj vakuoli parazita, gde inhibiraju formiranje hemozoina iz hematina^{xv}, koji je toksičan za parazita (slika 29).



Slika 29. Mehanizam dejstva hlorokina⁶⁸

Hlorokin je tercijarni amin koji slobodno difunduje kroz membranu hranljive vakuole. U kiseloj sredini hlorokin se protonuje i u tom obliku ne može da napusti vakuolu. Usled nagomilavanja hlorokina, dolazi do povećanja pH vrednosti, usled čega se remeti formiranje hemozoina iz hematina.⁶⁹ Hlorokin se ponaša kao krvni šizonticid^{xvi} i deluje na aseksualne eritrocitne forme. Primenuje se oralno u ukupnoj dozi od 25 mg/kg tokom tri dana kao fosfatna so. Apsorpcija je efikasna i maksimalna koncentracija u plazmi se dostiže u toku 2–3 h. Detekcija hlorokina i njegovih metabolita u plazmi je moguća i do 2 meseca posle administracije.⁷⁰

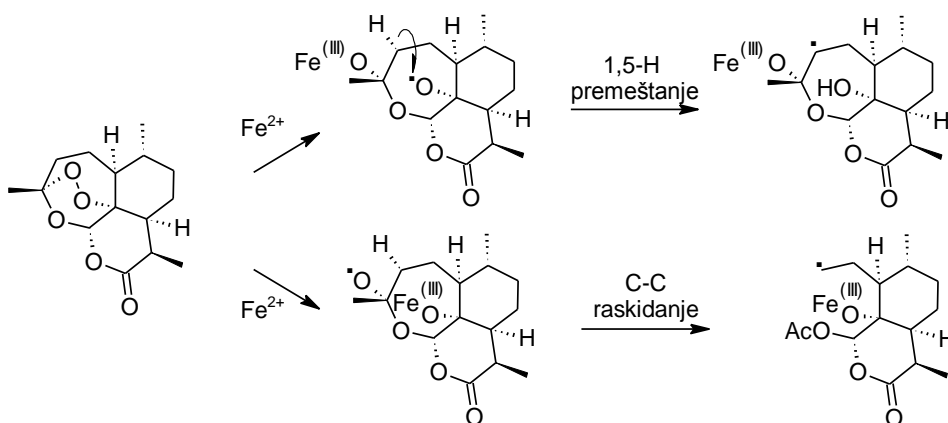
Za **8-aminohinoline**, poput primakina (slika 28), mehanizam dejstva i dalje nije razjašnjen. Jedna od pretpostavki je da dovodi do generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) koje su toksične za parazita.⁷¹

^{xv} Hematin je feriprotoporfirin IX-hidroksid.

^{xvi} Deluje na različite forme parazita u krvotoku. Naziv potiče od naziva parazita u formi šizonta (slika 27).

Deferoksamin (slika 28), predstavnik **helirajućih agenasa**, ispoljava svoje dejstvo tako što koordinuje gvožđe unutar malarijskog parazita. Ipak, njegova upotreba je ograničena zbog toga što izuzetno sporo prodire u inficirane eritrocite i zato što je potrebna intravenska administracija.⁷²

Peroksidni antimalarici, poput artemizina, učestvuju u nizu reakcija sa Fe^{2+} reakcionim vrstama. Posledica je nastajanje radikala $RO\cdot$ i $R\cdot$, koji adicijom na esencijalne enzime parazita mogu da zaustave njihovu funkciju ili da izazovu peroksidaciju membrana i njihovu rupturu i tako ispolje toksičnost (Slika 30).⁷³



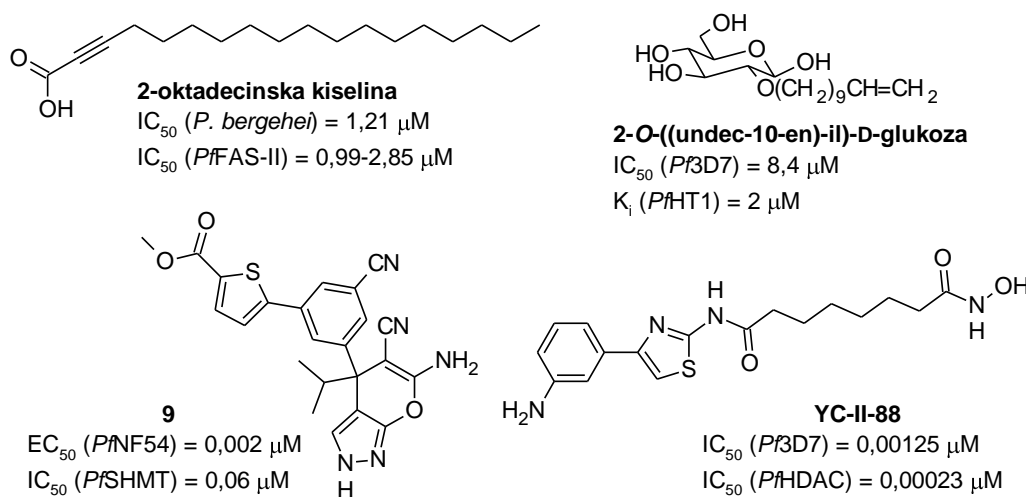
Slika 30. Oksidativno raskidanje peroksidne veze i formiranje slobodnoradikalskih vrsta⁷⁴

Najvažniji **antifolatni lekovi** protiv malarije su pirimetamin i sulfadoksin (slika 28). Ustanovljeno je da pirimetamin vrši inhibiciju dihidrofolat-reduktaze (DHFR), koja čini bifunkcionalni protein sa timidilat-sintazom (TS). S druge strane, meta sulfa-lekova je dihidropteroat-sintaza (DHPS) iz bifunkcionalnog proteina sa hidroksimetilpterin-pirofosfokinazom (HPPK). DHPS je protein koji se nalazi samo u parazitu, za razliku od DHFR, koji je karakterističan i za čoveka i za parazita i učestvuje u regulaciji količine tetrahydrofolata u ćelijama, koji je vrlo važan za sintezu nukleotida DNK.⁷⁵

Atovakon pripada grupi **naftohinona** (slika 28). Predstavlja strukturni analog koenzima Q i utiče na inhibiciju transfera elektrona, što dovodi do gubitka membranskog potencijala mitohondrije. Osim toga, ometa i biosintezu pirimidina. Inhibicija ova dva procesa dovodi do smrti parazita. Na ovaj način, respiratorni lanac čoveka nije ugrožen, što govori o selektivnosti leka koja se javlja kao posledica razlike u strukturi između koenzima čoveka i parazita. Mitohondrija predstavlja metu delovanja

i pojedinih **antibiotika**. Tetraciklin (slika 28) se vezuje za 30S ribozom u mitohondriji i inhibira sintezu proteina, sprečavajući vezivanje amino-acil-tRNK za akceptorsko mesto na iRNK-ribozom kompleksu, što onemogućava vezivanje novih aminokiselina za rastući peptid.⁷⁵

Osim ovih mehanizama dejstva, u skorije vreme otkriveno je nekoliko **enzima** koji se smatraju potencijalnim meta delovanja novih antimalarika. Takvi su *P. falciparum* enoil-ACP reduktaza,⁷⁶ sintetaza masnih kiselina (PfFAS),⁷⁷ *N*-miristoiltransferaza (NMT),⁷⁸ heksozni transporter (PfHT1),⁷⁹ serin-hidroksimetil-transferaza (SHMT),⁸⁰ histon-deacetilaza⁸¹ i mnogi drugi. Na slici 31 prikazano je nekoliko inhibitora različitih enzima malarijskog parazita. Iako se ne može sa sigurnošću tvrditi da je antimalarijska aktivnost prikazanih molekula posledica isključivo inhibicije prethodno spomenutih enzima, pronalaženje novih inhibitora je vrlo važno za ispitivanje funkcija enzima i proučavanje metaboličkih puteva.



Slika 31. Primeri inhibitora različitih enzima malarijskog parazita

2.2.6. Podela antimalarika prema fazi ciklusa malarijskog parazita u kojoj deluju

Ciklus malarijskog parazita je izuzetno složen i da bi se bolest potpuno eliminisala potrebno je da se svaka pojedinačna faza razmotri kao potencijalna meta delovanja lekova. Od posebne važnosti su oni lekovi koji deluju u više faza ciklusa.

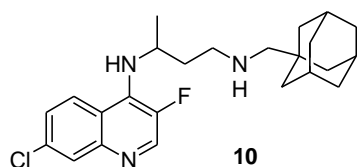
2.2.6.1. Antimalarici koji deluju u fazi jetre

Tokom uzimanja krvnog obroka, komarac unese parazite u krvotok čoveka. Već u toku jednog sata oni migriraju do jetre gde se dalje razmnožavaju pre nego što uđu u eritrocitnu fazu. Lekovi koji deluju u fazi jetre (asimptomatska faza) su od izuzetne važnosti za suzbijanje bolesti kao profilaktički agensi, jer se simptomi malarije javljaju tek kada paraziti napadnu eritrocite.⁸²

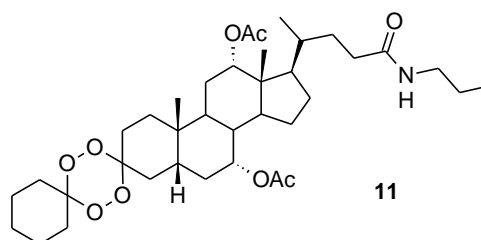
Pokazano je da antifolatni lek – pirimetamin (slika 28), koji je neko vreme posle pojave rezistencije na hlorokin intenzivno korišćen u kombinaciji sa sulfadoksinom, deluje u asimptomatskoj fazi razvoja parazita. Primenjen oralno na C57BL/6 miševе, sprečava nastajanje aseksualnih formi parazita u 9/9 miševa, za razliku od kontrole gde je parazitemija zabeležena već trećeg dana posle inokulacije sporozoitа.⁸³

Plasmodium vivax je najzastupljenija vrsta malarijskog parazita izvan Afrike i predstavlja posebnu opasnost zbog moguće reaktivacije infekcije usled aktiviranja uspavanih hipnozoita u jetri. Jedina klinička terapija koja se primenjuje u ovim slučajevima je primakin (slika 28), predstavnik 8-aminohinolina (22,5–30 mg/dan, 14 dana). Ipak, primakin je poznat po tome da izaziva hemolitičku anemiju kod bolesnika sa deficijencijom glukoza-6-fosfatdehidrogenaze, zbog čega je potraga za novim, netoksičnim lekovima koji se lako administriraju sve veća.⁸⁴

Nedavno su u grupi profesora Šolaje sintetisani prvi 4-aminohinolinski i peroksidni derivati aktivni u fazi jetre (slika 32). Istovremeno, prikazani 4-aminohinolinski derivat **10** pokazuje aktivnost u *in vivo* uslovima u Thomson-ovom modelu.⁸⁵



Faza jetre:
IC₅₀ = 310 nM; 92% redukcija parazitemije pri dozi 80 mg/kg
P. berghei *in vivo*:
80 mg/kg × 3 dana, 6/6 izlečenih miševa



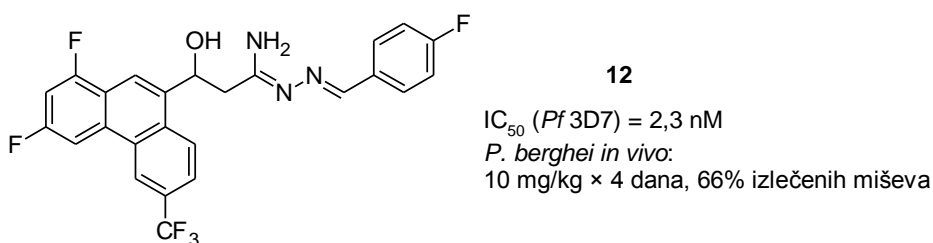
Faza jetre:
IC₅₀ = 330 nM
91% redukcija parazitemije pri dozi 100 mg/kg

Slika 32. 4-aminohinolinski i peroksidni derivati aktivni u fazi jetre

2.2.6.2. Antimalarici koji deluju u eritrocitnoj fazi

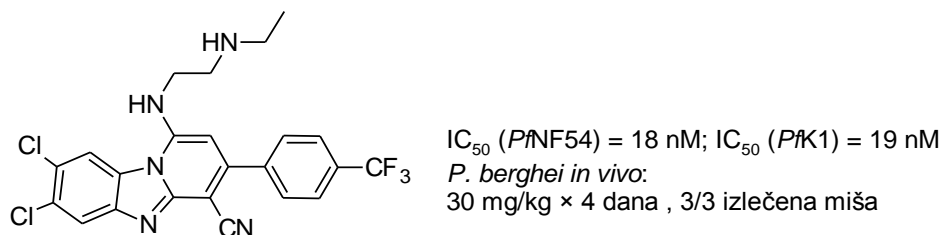
Krvni šizonticidi deluju na različite forme parazita u krvotoku i predstavljaju najznačajniju i najispitaniju grupu antimalarika. Ovoj grupi lekova pripadaju već spomenuti hlorokin, kinin, meflokin, pirimetamin, sulfadoksin, tetraciklin i mnogi drugi (slika 28).

Potruga za novim raznovrsnim strukturama koje će pokazivati bolju aktivnost i prevazići problem rezistencije najzastupljenijih *Plasmodium* sojeva na postojeće lekove se nastavlja. Optimizacijom strukture 3-hidroksi-*N*'-arilidenpropanhidrazonamida dobijeni su novi derivati sa nanomolarnom aktivnošću prema višestruko osetljivom soju *P. falciparum* 3D7, koji pokazuju aktivnost i u *in vivo* uslovima (10 mg/kg × 4 dana, slika 33).⁸⁶



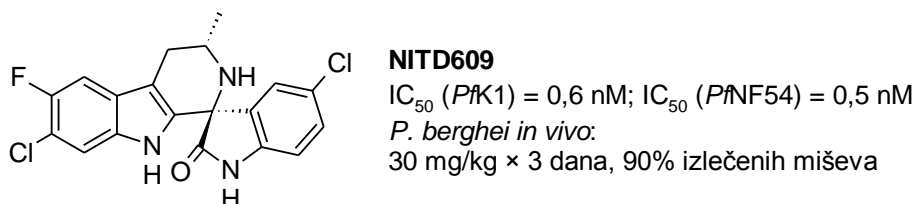
Slika 33. Novi 3-hidroksi-*N*'-arilidenpropanhidrazonamid sa antimalarijskom aktivnošću u eritrocitnoj fazi i u *in vivo* uslovima

Novi pirido[1,2a]benzoimidazoli nedavno razvijeni od strane Chibale i saradnika pokazali su dobru aktivnost u *in vitro* uslovima prema hlorokin-osetljivom NF54 i višestruko rezistentnom soju K1. Jedinjenje **13** prikazano na slici 34 u *in vivo* modelu dovodi do izlečenja 3/3 miša inficirana parazitima *P. berghei* kada se primeni u dozi 30 mg/kg × 4 dana. Grupa jedinjenja slične strukture pokazala se metabolički stabilna pri oralnoj administraciji. Osim toga, pokazuju dobre aktivnosti i u fazi jetre, kao i prema gametocitima, što ih čini potencijalnim kandidatima za pretklinička ispitivanja.⁸⁷



Slika 34. Novi pirido[1,2a]benzimidazol sa *in vitro* i *in vivo* antimalarijskom aktivnošću

Spiroindolon **NITD609** koji se nalazi u II fazi kliničkih ispitivanja prikazan je na slici 35. Pokazuje izuzetnu aktivnost prema parazitima u aseksualnoj eritrocitnoj fazi, i to prema višestruko rezistentnom soju K1, kao i prema hlorokin-osetljivom soju NF54. Ostvaruje aktivnost u *in vivo* uslovima kada se primeni u dozi 30 mg/kg × 3 dana. Osim toga, nije zanemarljiva ni aktivnost ovog jedinjenja prema seksualnoj fazi parazita. Prema predloženom mehanizmu, jedinjenje **NITD609** vrši inhibiciju membranskog transportera PfATP4, što drastično povećava koncentraciju Na⁺ jona i dovodi do smrti parazita.⁸⁸

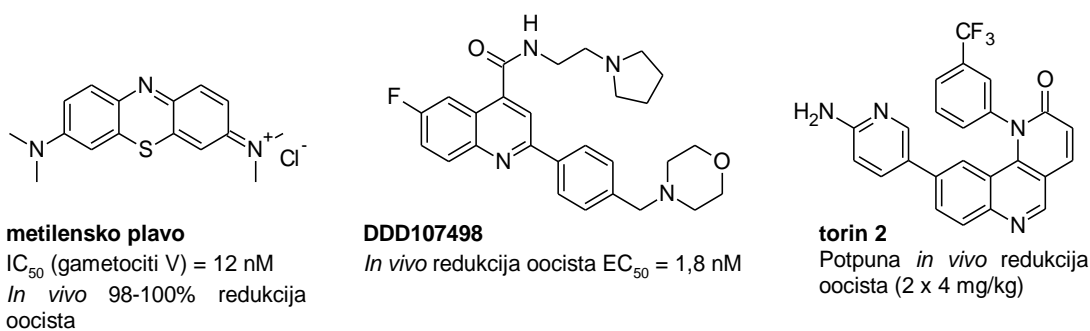


Slika 35. Spiroindolon **NITD609**, aktivan prema parazitima u aseksualnoj eritrocitnoj fazi, kao i u *in vivo* uslovima

2.2.6.3. Antimalarici koji blokiraju transmisiju

Lekovi koji sprečavaju transmisiju deluju tako što ubijaju zrele gametocite formirane u domaćinu ili tako što zaustavljaju njihovo dalje razmnožavanje u komarcu. To podrazumeva da dovoljna količina leka bude preuzeta od strane komarca prilikom uzimanja krvnog obroka i da dospe do njegovog želuca. U domaćinu gametociti prolaze kroz nekoliko faza, pri čemu samo gametociti u fazi V mogu da inficiraju komarca. Kod

P. falciparum zreli gametociti se pojavljuju već posle ~12 dana od pojave simptoma i cirkulišu u krvotoku gde se zadržavaju i do 22 dana.⁸² Većina do sada odobrenih antimalarika je uglavnom aktivna samo prema eritrocitnim formama parazita i prema gametocitima u fazi III i IV, što nikada ne dovodi do potpune eliminacije zrelih gametocita. Osim toga, ustanovljeno je da neki lekovi poput hlorokina⁸⁹ i sulfadoksin-pirimetamina⁹⁰ indukuju gametocitogenezu i povećavaju broj transmisija i novih infekcija. Trenutno, jedini lek koji je efikasan protiv gametocita je primakin (slika 28), koji je preporučen od strane WHO u jednoj dozi od 0,25 mg/kg zajedno sa ACT^{xvii} za sve bolesnike kod kojih je parazitološki potvrđena malarija, osim za trudnice i decu mlađu od godinu dana.⁹¹ Ipak, zbog poznate toksičnosti primakina, potraga za novim lekovima koji suzbijaju transmisiju je sve veća. Na slici 36 prikazana su neka od malobrojnih jedinjenja koja deluju u ovoj fazi ciklusa malarijskog parazita. Metilensko plavo ispoljava gametocitocidnu aktivnost i u *in vitro*⁹² i u *in vivo*⁹³ uslovima. Jedinjenje **DDD107498** takođe značajno utiče na formiranje oocista u komarcu. Kada se testira u SMFA eseju^{xviii},⁹⁴ EC₅₀ vrednosti iznose 1,8 nM (kada se jedinjenje primeni 24 h pre hranjenja komarca) i 10 nM (kada se jedinjenje primeni u trenutku hranjenja).⁹⁵ **Torin 2**, poznati inhibitor mTOR kinaze, dovodi do potpune redukcije oocista u želucu komarca kada se testira u modelu miša u dozi 4 mg/kg (dve doze sa razmakom od 3 h). Eksperiment se izvodi tako što se inficirani miševi tretiraju jedinjenjem, a zatim se komarcima vrsta *Anopheles stephensi* omogući hranjenje krvlju zaraženih miševa.⁹⁶

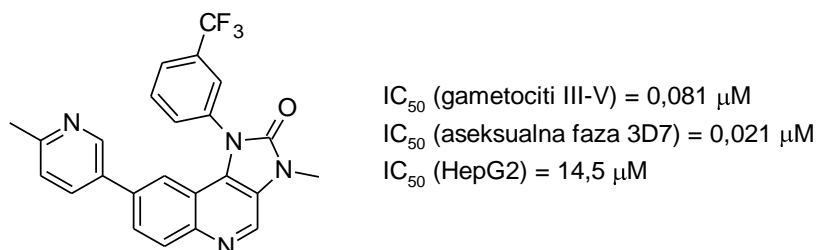


Slika 36. Primeri jedinjenja sa gametocitocidnom aktivnošću

^{xvii} Kombinovana terapija artemizininom i drugim lekovima.

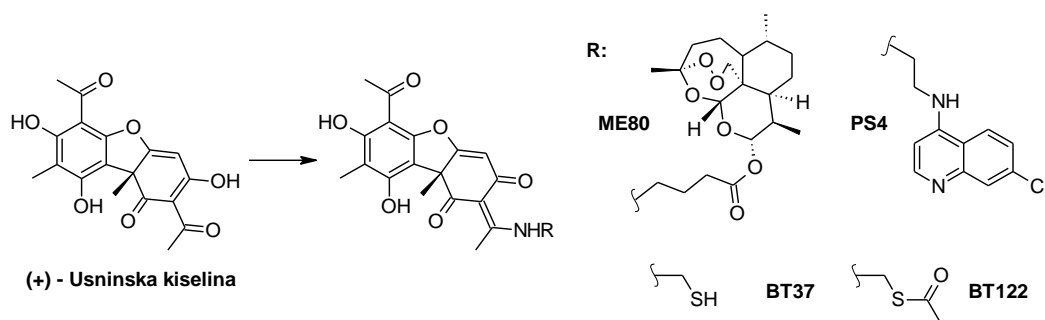
^{xviii} Esej kojim se određuje sposobnost jedinjenja da blokira transmisiju između čoveka i komarca (eng. *standard membrane feeding assay*).

Zbog strukturne sličnosti sa **torinom 2**, nedavno je razvijena serija imidazo[4,5-c]hinolin-2-ona i ispitana njihova aktivnost prema aseksualnoj fazi parazita soja 3D7, prema gametocitima u fazi III–V, kao i HepG2 toksičnost. Na slici 37 prikazano je jedinjenje koje je pokazalo izuzetnu aktivnost i nisku toksičnost.⁹⁷



Slika 37. Novi derivat aktivan prema fazi III–V gametocita

(+)-Usninska kiselina je sekundarni metabolit pronađen u lišajevima za koji se ispostavilo da pokazuje mikromolarnu antimalarijsku aktivnost u eritrocitnoj fazi, ali i u fazi jetre.⁹⁸ U cilju poboljšanja antimalarijske aktivnosti, povećanja rastvorljivosti i smanjenja toksičnosti same usninske kiseline, sintetisani su različiti enaminski derivati. Neki od njih su prikazani na slici 38. Derivat **ME80** pokazao je odličnu *in vitro* aktivnost prema *P. falciparum* K1 soju sa IC_{50} = 1,4 nM,⁹⁹ dok su derivati **PS4**, **BT37** i **BT122** u SMFA eseju pokazali izuzetnu aktivnost (inhibiraju nastanak oocista u želucu komarca 99,3–100% pri koncentraciji 250 μ g/mL). Dodatno, za jedinjenja **BT37** i **BT122** određene su IC_{50} vrednosti koje iznose 97–142 μ M i 35–234 μ M.¹⁰⁰



Slika 38. (+) – Usninska kiselina i njeni derivati

3. NAŠI RADOVI

3.1. Dizajn novih steroidnih i benzotiofenskih derivata aminohinolina

Cilj ovog rada je sinteza novih steroidnih i benzo[*b*]tiofenskih^{xix} derivata aminohinolina i ispitivanje njihove inhibitorne aktivnosti prema BoNT/A i prema proliferaciji parazita *Plasmodium falciparum*. Stoga je prvobitno izvršen dizajn novih derivata, shodno saznanjima dobijenim detaljnom pretragom literature i našim prethodnim rezultatima u ovim oblastima.

3.1.1. Molekulsko modelovanje novih derivata aminohinolina kao inhibitora BoNT/A LC

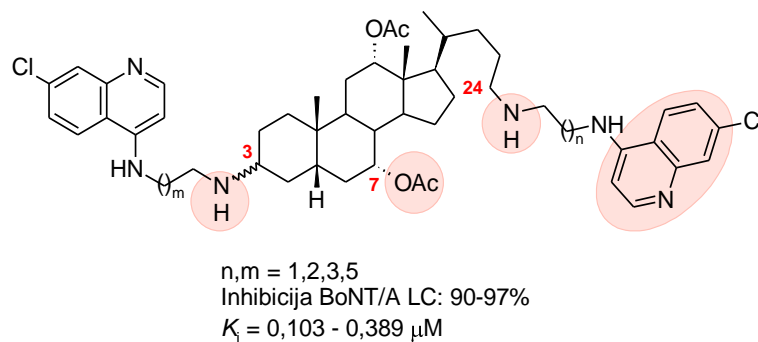
Doking simulacije novih steroidnih i benzotiofenskih derivata aminohinolina izvršene su pomoću programa Schrödinger Suite 2016-4,¹⁰¹ dok su dijagrami sa interakcijama liganada u aktivnom mestu enzima dobijeni u programima Schrödinger Suite 2016-4 i 2017-1. Struktura BoNT/A LC metaloproteaze, dobijena X-ray kristalografijom, preuzeta je iz PDB^{xx} (PDB:3DS9).¹⁰²

3.1.1.1. Steroidni derivati aminohinolina

Naša prethodna istraživanja u oblasti steroidnih derivata aminohinolina kao inhibitora BoNT/A, dovela su do otkrića bis-aminohinolinskih derivata, koji pokazuju izuzetne aktivnosti u *in vitro* HPLC proteolitičkom eseju. Ova jedinjenja vrše inhibiciju BoNT/A LC u vrednosti 90–97%, sa K_i vrednostima u opsegu 0,103–0,389 μM (slika 39).¹⁰¹

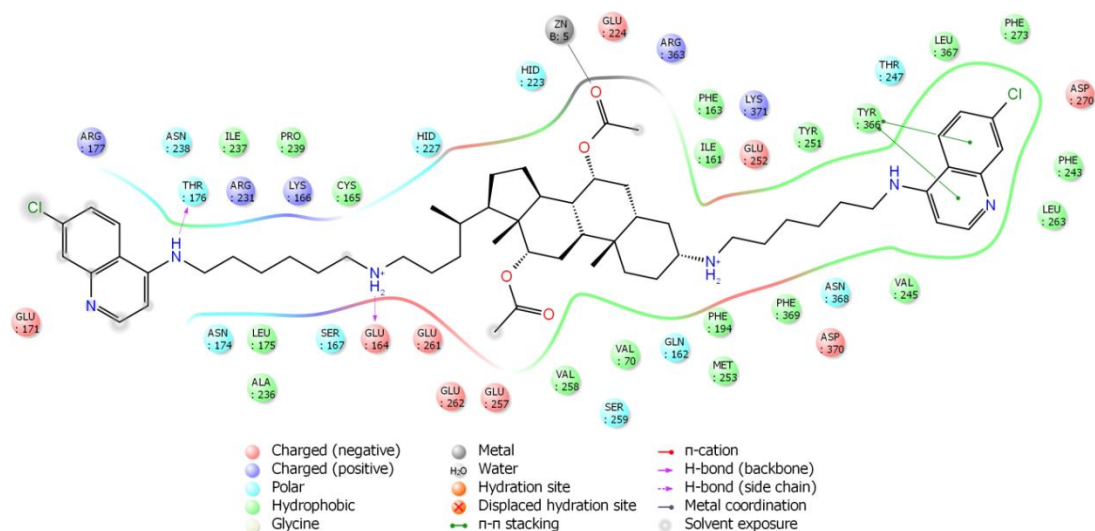
^{xix} U daljem tekstu se upotrebljava skraćeni termin benzotiofen.

^{xx} eng. *Protein Data Bank*



Slika 39. Bis-aminohinolinski steroidni derivati koji pokazuju aktivnost prema BoNT/A LC

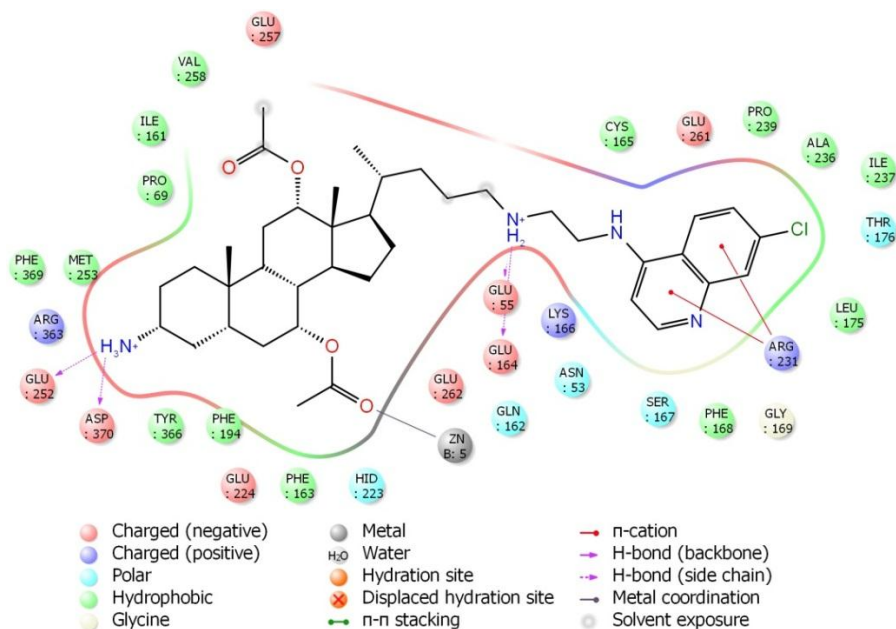
Molekulskim modelovanjem bis-aminohinolinskih derivata steroida u aktivnom mestu BoNT/A LC, izdvojeno je nekoliko strukturnih motiva za koje se smatra da su ključni za visoku inhibitornu aktivnost – amino-grupa u položaju C(3), acetoksi-grupa u položaju C(7), amino-grupa u položaju C(24) i aminohinolinska strukturna jedinica povezana mostom za C(24) položaj (slika 39). Na slici 40 prikazane su osnovne interakcije koje α -C(3) izomer **15 (DOJK09-D)** ostvaruje u aktivnom mestu BoNT/A LC. Jedinjenje **15 (DOJK09-D)** je u našem prethodnom istraživanju pokazalo 95% inhibicije BoNT/A LC i $K_i = 0,285 \mu\text{M}$.¹⁰¹



Slika 40. Vezivanje bis-aminohinolinskog derivata **15 (DOJK09-D)** za aktivno mesto BoNT/A LC. Prikazane su specifične interakcije liganda sa enzimom na pH $7,0 \pm 1,0$.¹⁰¹

U potrazi za strukturom koja bi mogla da bude potencijalni lek, potrebno je da se sagleda nekoliko osnovnih faktora koji bi mogli da utiču na njegov razvoj od prvobitnog istraživanja do kliničkih testova. Prethodno spomenuti bis-aminohinolinski derivati su dobijani kao smeša α - i β -C(3) diastomera, koji su potom razdvajani višestrukom flash hromatografijom. Sinteza ovih jedinjenja i razdvajanje diastereomernih smeša predstavlja ozbiljan sintetički poduhvat, a osim toga, poznato je da jedinjenja sa molarnom masom >900 mogu da imaju poteškoće da stignu do željene mete u organizmu. Stoga je jedan od važnih ciljeva našeg istraživanja bio pojednostavljenje strukture.

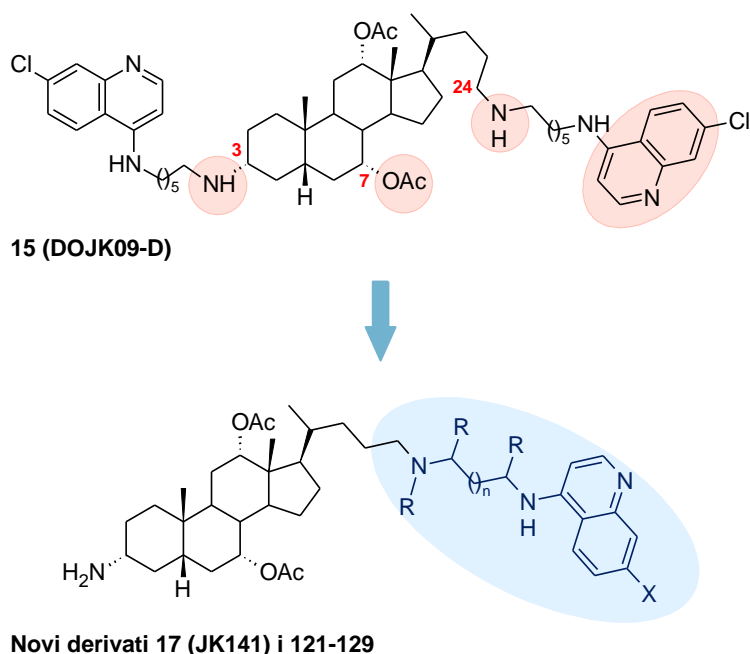
Osim spomenutih bis-aminohinolinskih derivata, izuzetne aktivnosti prema BoNT/A LC pokazali su i mono-aminohinolinski derivati, takođe objavljeni u našoj prethodnoj studiji. Modelovanjem ovih jedinjenja uočene su slične interakcije sa aminokiselinama iz aktivnog mesta BoNT/A LC, koje su prikazane na primeru jedinjenja **16** (slika 41).¹⁰¹ U *in vitro* HPLC proteolitičkom eseju, jedinjenje **16** ostvarilo je $IC_{50} = 0,81 \mu M$ i $K_i = 3,22 \mu M$, dok je u primarnim spinalnim neuronima embriona piletu pokazalo zaštitu SNAP-25 77% pri koncentraciji $30 \mu M$.¹⁰¹



Slika 41. Vezivanje mono-aminohinolinskog derivata **16** za aktivno mesto BoNT/A LC.

Prikazane su specifične interakcije liganda sa enzimom na pH $7,0 \pm 1,0$.¹⁰¹

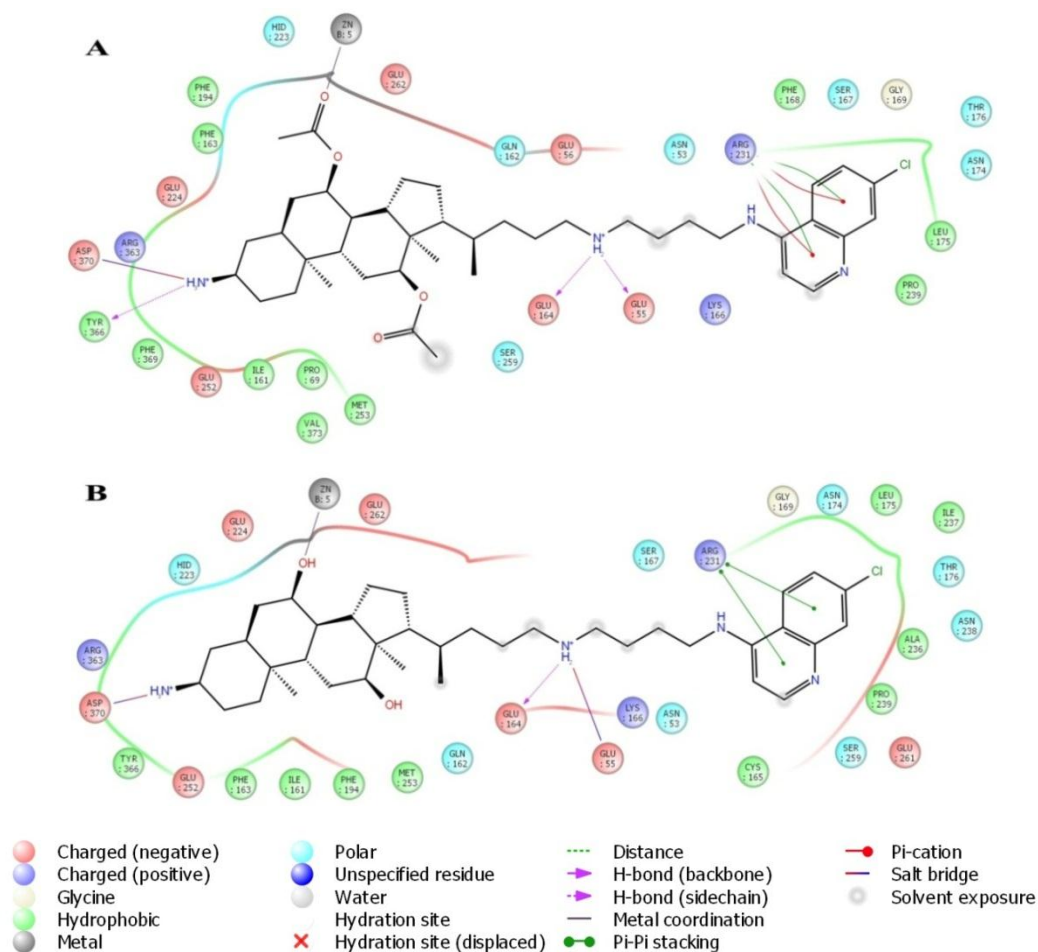
Kao jedan od ciljeva ovog rada postavljena je sinteza novih steroidnih derivata koji u položaju C(3) imaju primarnu amino-grupu, različite diaminoalkil-mostove između steroidnog i aminohinolinskog dela strukture, kao i različito supstituisano hinolinsko jezgro (slika 42). Alifatični nizovi, posebno ona mesta koja se nalaze u susedstvu azota, smatraju se metom brojnih enzima,^{103,104} koji dovode do alfa-hidroksilacije, a zatim i do generisanja potencijalno toksičnih metabolita (aldehida). Očekuje se da monoaminohinolinski derivati pokazuju bolju metaboličku stabilnost u odnosu na bisaminohinolinske derivate zbog posedovanja samo jednog alifatičnog diaminoalkil-niza.



Slika 42. Struktura jedinjenja **15 (DOJK09-D)** sa naznačenim osnovnim strukturnim motivima (crvena boja) i opšta struktura novih derivata sa označenim delom strukture u kome su planirane modifikacije (plava boja)

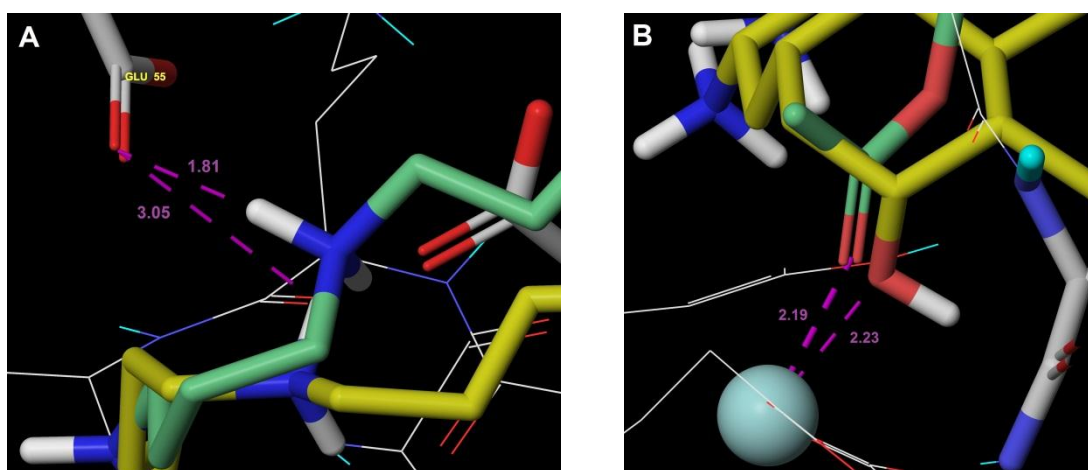
Prvobitno je izvršeno molekularno modelovanje novih derivata u aktivnom mestu BoNT/A LC. Interakcije koje ostvaruju ovi derivati sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu BoNT/A LC, prikazane su na primeru jedinjenja **17 (JK141)** (slika 43-A). Jedinjenje **17 (JK141)** se odlično uklapa u aktivno mesto enzima, ostvarujući brojne povoljne interakcije. Amonijum-katjon u položaju C(3) formira jak soni most sa Asp370 i vodoničnu vezu sa Tyr366. Amonijum-katjon u položaju C(24) ostvaruje dve vodonične veze sa Glu164 i Glu55. Karbonilni kiseonik acetoksi-grupe sa C(7) je na

pogodnom rastojanju za ostvarivanje interakcije sa Zn^{2+} enzima, istiskujući pritom katalitičku vodu (2,19 Å, slika 44-B). Osim toga, hinolinski deo strukture odgovoran je za značajne katjon- π i π - π interakcije sa Arg231. Poređenjem jedinjenja **16** i **17** (**JK141**) u aktivnom mestu enzima (slike 42 i 43-A) zapaža se da novi derivat **17** (**JK141**) ostvaruje veći broj povoljnih interakcija. Kod jedinjenja **16** ne postoje π - π interakcije sa Arg231 i umesto jakog sonog mosta sa Asp370, amonijum-katjon u položaju C(3) formira slabiju H-vezu.

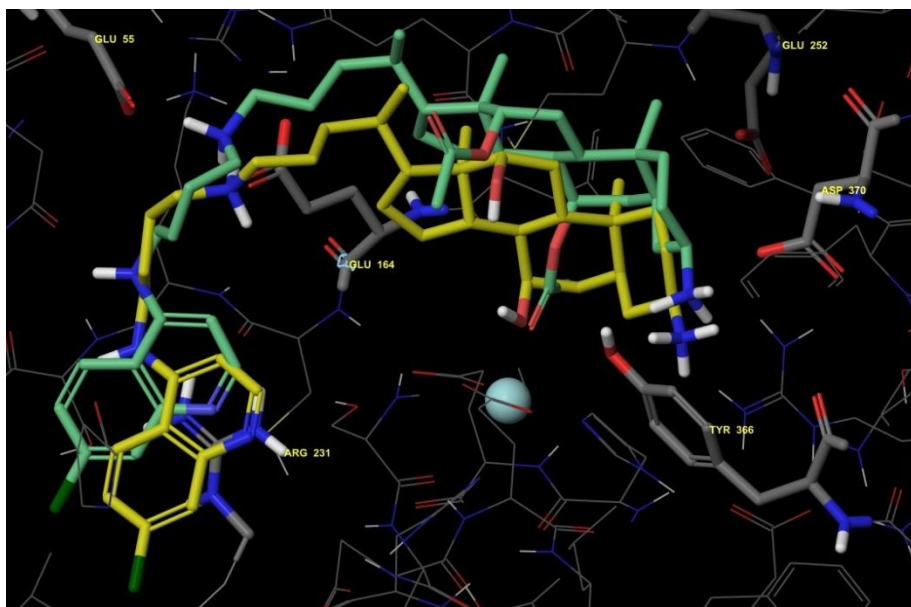


Slika 43. Jedinjenja **17** (**JK141**) (A) i **18** (**JK227**) (B) u aktivnom mestu BoNT/A LC. Prikazane su specifične interakcije liganada sa enzimom na pH 7,0±1,0.

Prema prethodno utvrđenom modelu, jedna od osnovnih interakcija koje ligand ostvaruje u aktivnom mestu je koordinacija Zn^{2+} enzima. Zbog toga je izvršeno modelovanje derivata **18 (JK227)**, koji u položajima C(7) i C(12) umesto acetoksi-grupa ima hidroksilne grupe (slika 43-B). Značaj jačine koordinacije Zn^{2+} od strane potencijalnog inhibitora ispitan je direktnim poređenjem acetoksi- i hidroksi-analoga, **17 (JK141)** i **18 (JK227)**, u aktivnom mestu BoNT/A LC (slike 43-45). Radi ostvarivanja interakcije sa Zn^{2+} enzima (2,23 Å, slika 44-B), **18 (JK227)** mora da uđe dublje u katalitičku šupljinu, usled čega gubi vodoničnu vezu između amonijum-katjona u položaju C(3) i Tyr366. Interakcija sa Glu55 je oslabljena, jer je rastojanje između amonijum-katjona i ovog aminokiselinskog ostatka veće (3,05 Å kod **18 (JK227)** i 1,81 Å kod **17 (JK141)**, slika 44-A). Osim toga, hinolinsko jezgro više nije u pogodnom položaju za ostvarivanje interakcije sa Arg231.



Slika 44. A: Rastojanje **17 (JK141)**-Glu55 (1,81 Å) i **18 (JK227)**-Glu55 (3,05 Å); B: Rastojanje **17 (JK141)**- Zn^{2+} (2,19 Å) i **18 (JK227)**- Zn^{2+} (2,23 Å) na pH 7,0±1,0.



Slika 45. Preklopljene strukture **17 (JK141)** (zeleno) i **18 (JK227)** (žuto) u aktivnom mestu BoNT/A LC. Prikazane su specifične interakcije liganda sa enzimom na pH $7,0 \pm 1,0$.

Osim što ostvaruje veći broj povoljnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu BoNT/A LC, jedinjenje **17 (JK141)** pokazuje i niže vrednosti energija (skorova) u odnosu na jedinjenje **18 (JK227)**. Rezultati modelovanja dobijeni za različite vrste energija prikazani su u tabeli 1. Niža vrednost skora znači da se ligand bolje uklapa u aktivno mesto enzima.

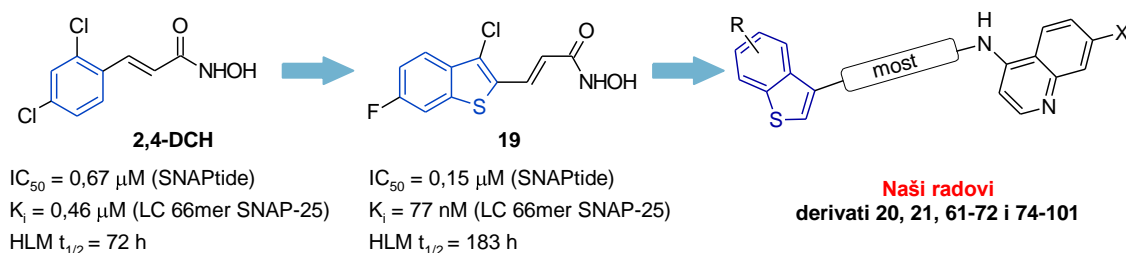
Tabela 1. Rezultati modelovanja **17 (JK141)** i **18 (JK227)**

Jedinjenje/skor	17 (JK141)	18 (JK227)
Doking skor ¹⁰⁵	-10,685	-9,697
Glajd skor ¹⁰⁶	-10,685	-9,697
Emodel ¹⁰⁷	-110,664	-99,034
Asp:370 Eint	-54,216	-50,774
Tyr:366 Eint	-8,81	-8,36
Glu:252 Eint	-48,758	-37,488
Arg:231 Eint	23,86	25,911
Glu:164 Eint	-70,57	-63,814
Glu:55 Eint	-65,916	-56,733

Sa ciljem unapređenja aktivnosti steroidnih BoNT/A LC inhibitora, a na osnovu prethodnih rezultata inhibitornih aktivnosti i molekuskog modelovanja, osmišljena je sinteza grupe mono-aminohinolinskih derivata, sa primarnom amino-grupom u položaju C(3) i četiri do šest metilenskih jedinica u diaminoalkil-mostu. Potom je ispitana njihova aktivnost prema BoNT/A.

3.1.1.2. Benzotiofenski derivati aminohinolina

Benzotiofensko jezgro je prvi put uvedeno kao farmakofora za BoNT kako bi se prevazišle nepovoljne karakteristike jedinjenja **2,4-DCH**,³⁰ poput izuzetno hidrofobne 2,4-dihlorfenil-jedinice (slika 46). Sintetisano je jedinjenje **19**, sa poboljšanim IC_{50} , K_i i HLM^{xxi} vrednostima (slika 46).¹⁰⁸ Međutim, hidroksamna funkcionalna grupa koja je odgovorna za vezivanje Zn^{2+} u katalitičkoj šupljini enzima, ima sposobnost vezivanja i drugih metala u različitim metaloproteazama. Pored toga, jedinjenja **2,4-DCH** i **19** se ponašaju kao dobri Michael-ovi akceptori, što dovodi u pitanje njihovu reaktivnost i stabilnost u *in vivo* uslovima.¹⁰⁹ Na osnovu ovih saznanja, sa ciljem poboljšanja inhibitorne aktivnosti prema BoNT/A LC, u okviru ove doktorske disertacije je osmišljena serija benzotiofenskih derivata aminohinolina (slika 46).



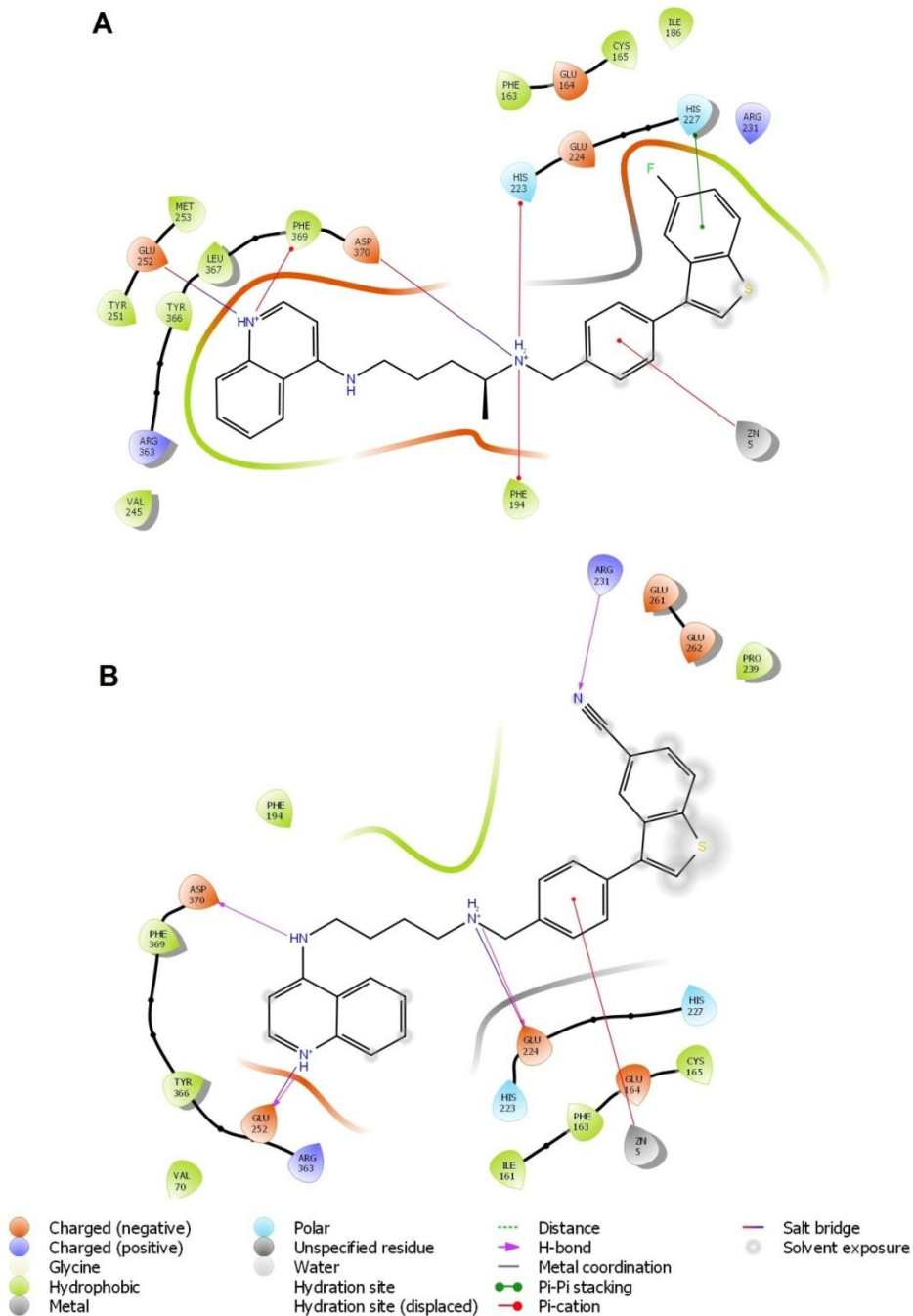
Slika 46. Racionalizacija strukture poznatih inhibitora botulinum neurotoksina – dizajn benzotiofenskih derivata aminohinolina sa ciljem poboljšanja inhibitorne aktivnosti prema BoNT/A LC

Radi ispitivanja uticaja različite dužine i strukture mosta između dva aromatična jezgra na aktivnost, osim jednostavnog alifatičnog mosta normalnog niza, odlučeno je da se ispitaju i derivati sa benzilaminoalkil-mostom. Za benzenov prsten se očekuje da

^{xxi} Humani mikrozomi jetre (*Human Liver Microsomes*)

će da smanji broj konformacionih izomera koje molekul može da zauzme u aktivnom mestu enzima, a samim time da utiče na rigidnost molekula i na interakcije koje će ono da ostvari sa aminokiselinskim ostacima. Molekulsko modelovanje novih benzotiofenskih derivata aminohinolina u aktivnom mestu BoNT/A LC je izvršeno prema modelu uspostavljenom za prethodno spomenute steroidne derivate aminohinolina.

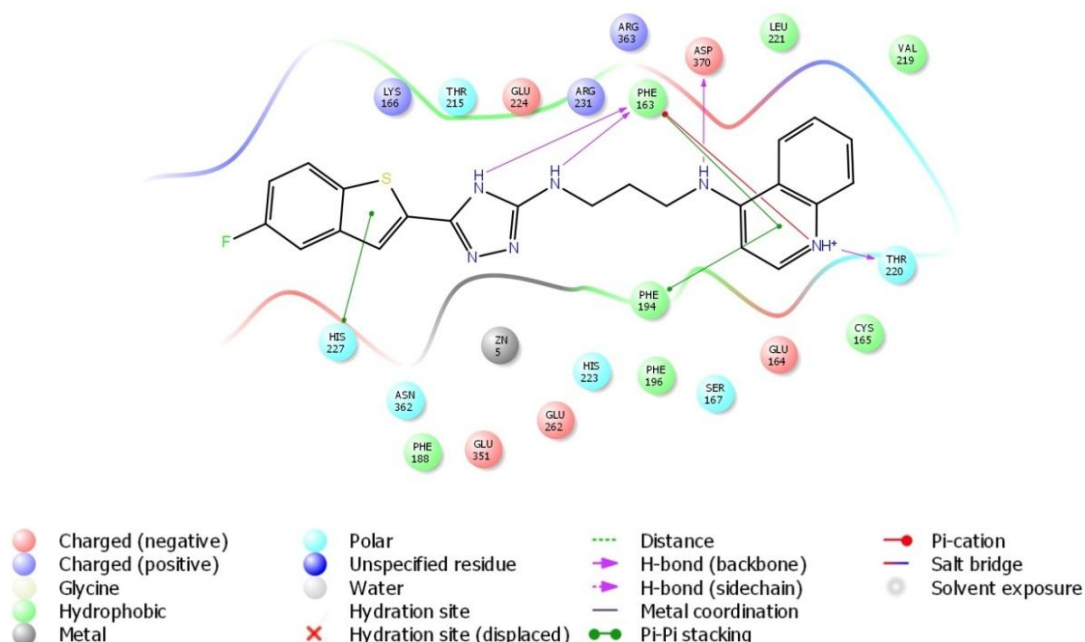
Na slikama 47-A i 47-B prikazane su najvažnije interakcije koje dva odabrana benzotiofenska derivata, **20** i **21**, ostvaruju u aktivnom mestu BoNT/A LC. Poređenjem steroidnih i benzotiofenskih derivata u aktivnom mestu enzima, uočava se da i jedni i drugi derivati ostvaruju slične interakcije, ali da je aminohinolinski fragment benzotiofenskih derivata usmeren na suprotnu stranu od Arg231 (slika 47-A i B). Kod benzotiofenskih derivata protonovani azot hinolina ostvaruje soni most i katjon- π interakciju sa Glu252 i Phe369, dok Zn^{2+} ostvaruje katjon- π interakciju sa benzenovim prstenom iz mosta. Arg231 ostvaruje vodoničnu vezu sa cijano-grupom derivata **21** (slika 47-B). Amonijum-katjon sekundarne amino-grupe takođe učestvuje u vezivanju za aminokiselinske ostatke u aktivnom mestu – u slučaju derivata **20**, formira soni most sa Asp370 i katjon- π interakcije sa His223 i Phe194 (slika 47-A), dok u slučaju jedinjenja **21** formira soni most i vodoničnu vezu sa Glu224 (slika 47-B). Na osnovu dobijenih rezultata modelovanja, pretpostavljeno je da bi novi benzotiofenski derivati aminohinolina mogli da pokažu inhibitornu aktivnost prema BoNT/A LC.



Slika 47. Jedinjenja **20** (A) i **21** (B) u aktivnom mestu BoNT/A LC. Prikazane su specifične interakcije liganda sa enzimom na pH 7,0±1,0.

U narednom koraku želja je bila da se benzenov prsten iz mosta zameni heterocikličnim jezgrom, sa ciljem da se osim katjon- π interakcije sa cinkom omoguće dodatne polarne elektrostatičke interakcije, prvenstveno vodonična veza sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu enzima. Od raznovrsnih heterocikličnih

jezgara odabran je 1,2,4-triazol, kao strukturni motiv koji se nalazi u velikom broju biološki aktivnih jedinjenja.¹¹⁰ Očekuje se da bi uvođenje ovog heterocikličnog prstena osim jačeg vezivanja za aktivno mesto doprinelo i poboljšanju rastvorljivosti jedinjenja. Na slici 48 prikazane su osnovne interakcije koje jedinjenje **22** ostvaruje u aktivnom mestu BoNT/A.

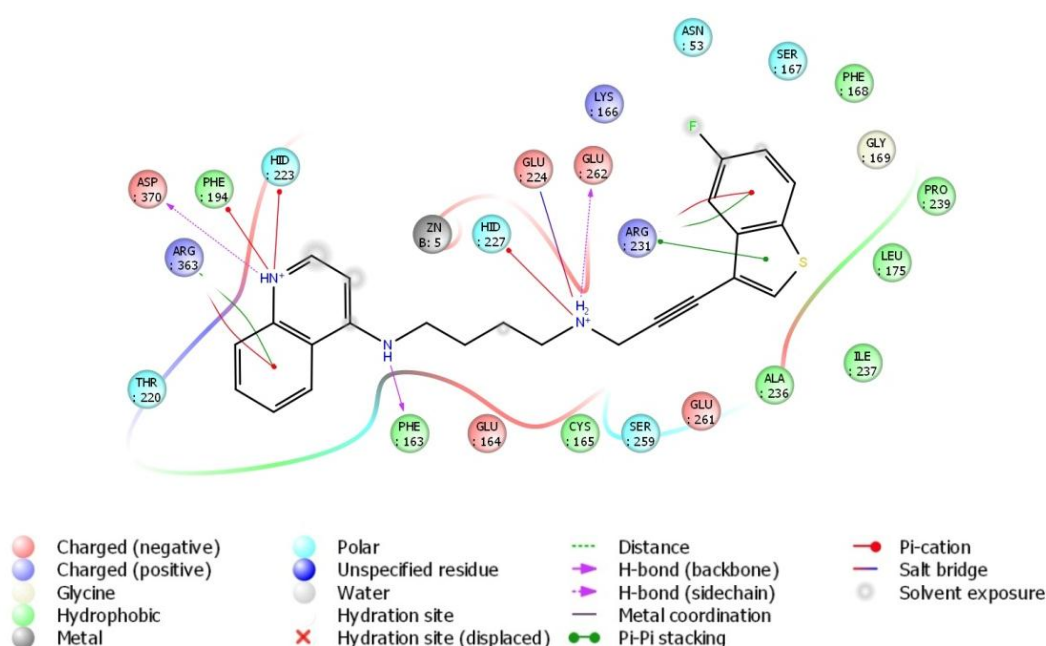


Slika 48. Jedinjenje **22** u aktivnom mestu BoNT/A LC. Prikazane su specifične interakcije liganda sa enzimom na pH 7,0±1,0.

Direktna interakcija sa cinkom nije uočena, ali je pozicija jedinjenja u aktivnom mestu takva da blokira pristup cinku. Na osnovu molekulskog modelovanja, protonovani azot iz hinolina bi trebalo da ostvari vodoničnu vezu sa Thr220 i katjon- π interakciju sa Phe163. Dodatno, Phe163 gradi dve vodonične veze sa azotom iz triazolskog prstena i sa amino-grupom iz mosta, kao i π - π steking interakciju sa hinolinskim jezgrom. Hinolinsko jezgro ostvaruje i π - π steking interakciju sa Phe194. Osim toga, celokupnom vezivanju u aktivnom mestu doprinosi i π - π steking interakcija koju ostvaruje benzotiofensko jezgro sa His227 (slika 48).

Osim zamene benzenovog prstena 1,2,4-triazolom, dizajnirano je i jedinjenje **23** koje u mostu poseduje trostruku vezu (slika 49). Za trostruku vezu se pretpostavlja da će slično benzenovom jezgru uticati na rigidnost molekula i da će obezbediti katjon- π

interakciju sa cinkom. Dodatno, molarna masa takvog jedinjenja će biti manja, što odgovara osnovnim konceptima u medicinskoj hemiji. Umesto očekivane katjon- π interakcije između trostruke veze i Zn^{2+} , molekulskim modelovanjem je dobijena konformacija jedinjenja koja ostvaruje više značajnih interakcija u aktivnom mestu enzima. Protonovani azot iz hinolina ostvaruje vodoničnu vezu sa Asp370 i dve katjon- π interakcije sa Phe194 i His223. Alifatična amino-grupa, koja je takođe protonovana, ostvaruje jednu vodoničnu vezu sa Glu262, jedan soni most sa Glu224 i jednu katjon- π interakciju sa His227. Pored toga, benzotiofensko jezgro gradi π - π steking interakcije sa Arg231.



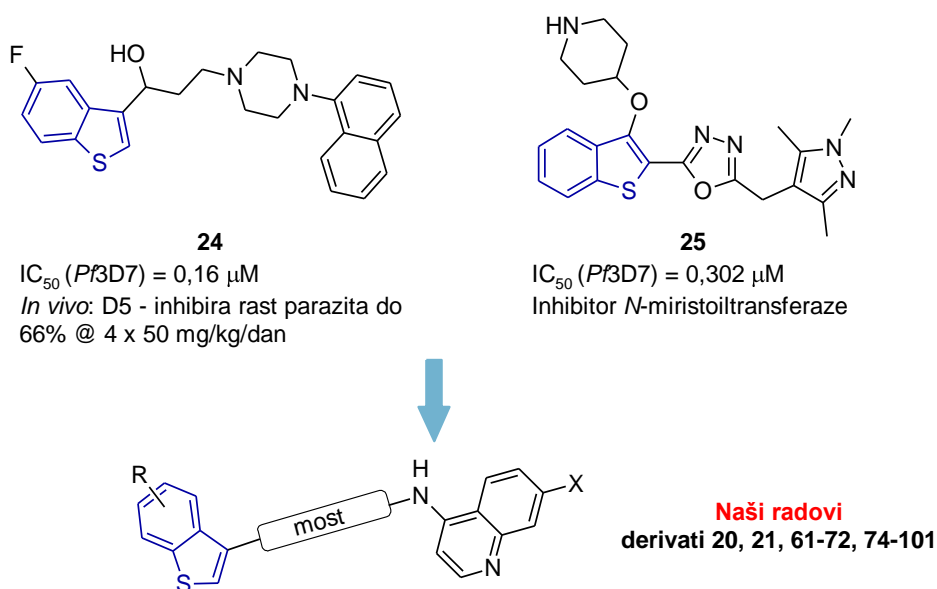
Slika 49. Jedinjenje **23** u aktivnom mestu BoNT/A LC.

Prikazane su specifične interakcije liganda sa enzimom na pH $7,0 \pm 1,0$.

3.1.2. Dizajn benzotiofenskih derivata aminohinolina kao inhibitora *P. falciparum* parazita

Osim ispitivanja inhibitorne aktivnosti prema BoNT/A LC metaloproteazi, cilj ovog rada je i ispitivanje aktivnosti sintetisanih derivata prema parazitima *Plasmodium falciparum*. U literaturi do sada postoje podaci za dve grupe benzotiofenskih derivata koji pokazuju aktivnost prema *P. falciparum* parazitima (slika 50). Jedinjenje **24** pokazuje nisku μM aktivnost prema 3D7 soju i inhibira rast parazita *in vivo*,¹¹¹ dok se

jedinjenje **25** ponaša kao inhibitor *N*-mirstoiltransferaze, dok istovremeno IC₅₀ prema 3D7 soju iznosi 0,302 μM.^{78b} Benzotiofenski derivati koji su dizajnirani sa pretpostavkom da će pokazivati aktivnost prema BoNT/A LC su se uklapali u model jedinjenja koji bi mogao potencijalno da bude aktivan i prema parazitima *P. falciparum*. U ovim derivatima je zadržana benzotiofenska strukturna jedinica, a dodatno, jedinjenja poseduju i aminohinolin, strukturni motiv koji se nalazi u velikom broju antimalarika (slika 50).



Slika 50. Dizajn benzotiofenskih derivata aminohinolina

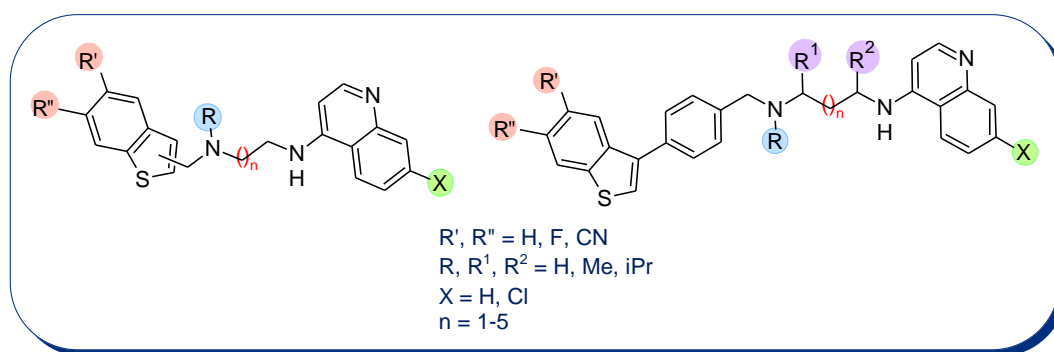
3.2. Sinteza novih benzotiofenskih i steroidnih derivata aminohinolina

U ovom radu je sintetisano 44 benzotiofenska i 12 steroidnih derivata aminohinolina i ispitana njihova biološka aktivnost prema BoNT/A i parazitima *Plasmodium falciparum*.

3.2.1. Sinteza benzotiofenskih derivata aminohinolina

3.2.1.1. Sinteza benzotiofenskih derivata sa alifatičnim mostom normalnog niza i benzilaminoalkil-mostom

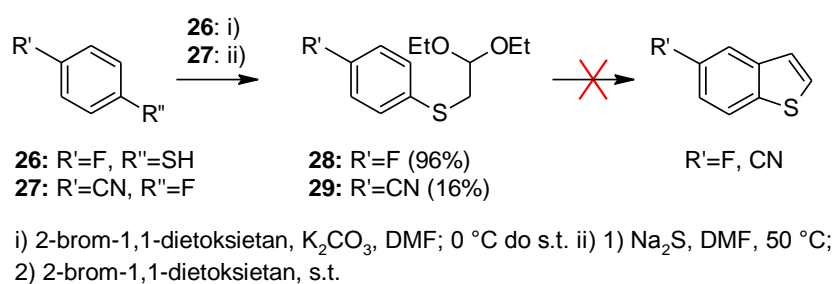
Prema strukturi mosta koji povezuje benzotiofensko i hinolinsko jezgro, sintetisani benzotiofenski derivati aminohinolina su podeljeni u dve grupe (slika 51). Sintetisano je 26 derivata koji sadrže alifatični most normalnog niza i 16 derivata koji sadrže benzilaminoalkil-most. Dodatno, derivati koji sadrže alifatični most, podeljeni su u dve podgrupe – derivati kod kojih se most nalazi u položaju C(2) ili C(3) benzotiofena. Sintetisana jedinjenja se razlikuju i po supstituciji na benzotiofenskom i aminohinolinskom jezgru.



Slika 51. Novi benzotiofenski derivati aminohinolina

Prvobitan pristup sintezi 5-fluor- i 5-cijano-supstituisanih benzotiofenskih derivata prikazan je na shemi 1. Reakcijom 4-fluortiofenola **26** i 2-brom-1,1-dietoksietana u dimetil-formamidu, u prisustvu sprasenog kalijum-karbonata, sintetisan je acetal **28** u prinosu 96%.¹¹² Odgovarajući 5-cijano-analog, acetal **29** sintetisan je u

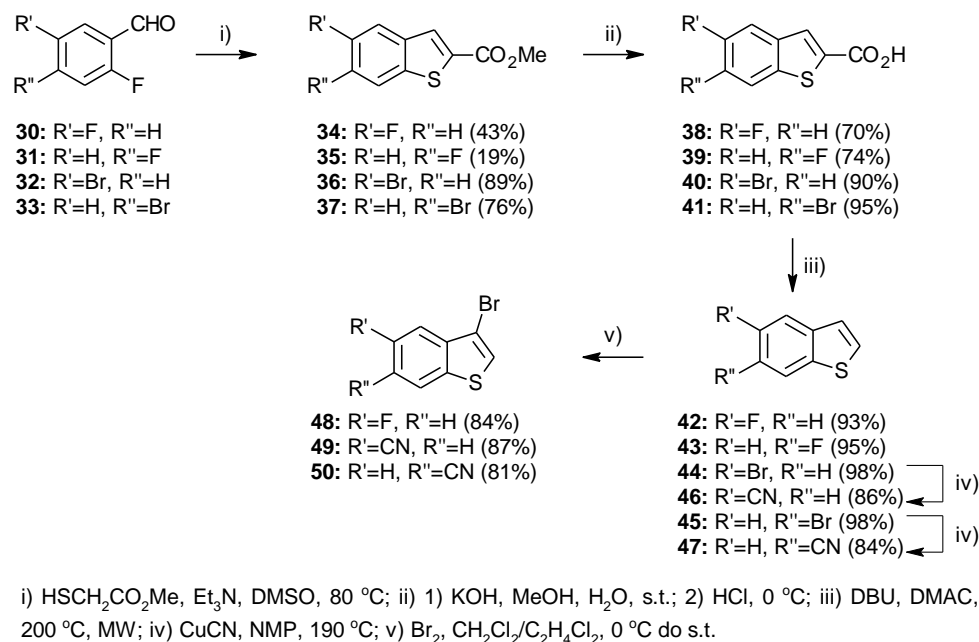
prinosu svega 16% polazeći od komercijalno dostupnog 4-fluorbenzonitrila **27**, pomoću natrijum-sulfida u dimetil-formamidu, praćeno dodatkom 2-brom-1,1-dietoksietana (proizvod karakterisan samo GC/MS analizom). U oba slučaja, korak zatvaranja benzotiofenskog jezgra pokazao se neuspešnim korišćenjem nekoliko različitih reakcionih uslova - Eaton-ov reagens na 70 °C; termalno zatvaranje u difenil-etru na tački ključanja; polifosforna kiselina u hlorbenzenu na 130 °C; bortrifluorid-eterat u dihlormetanu. U ovim reakcijama željeni proizvod ili uopšte nije dobijen, ili je dobijen u tragovima zbog komplikovanih obrada reakcionih smeša.



Shema 1. Prvobitni pristup u sintezi fluor-supstuisanih benzotiofena

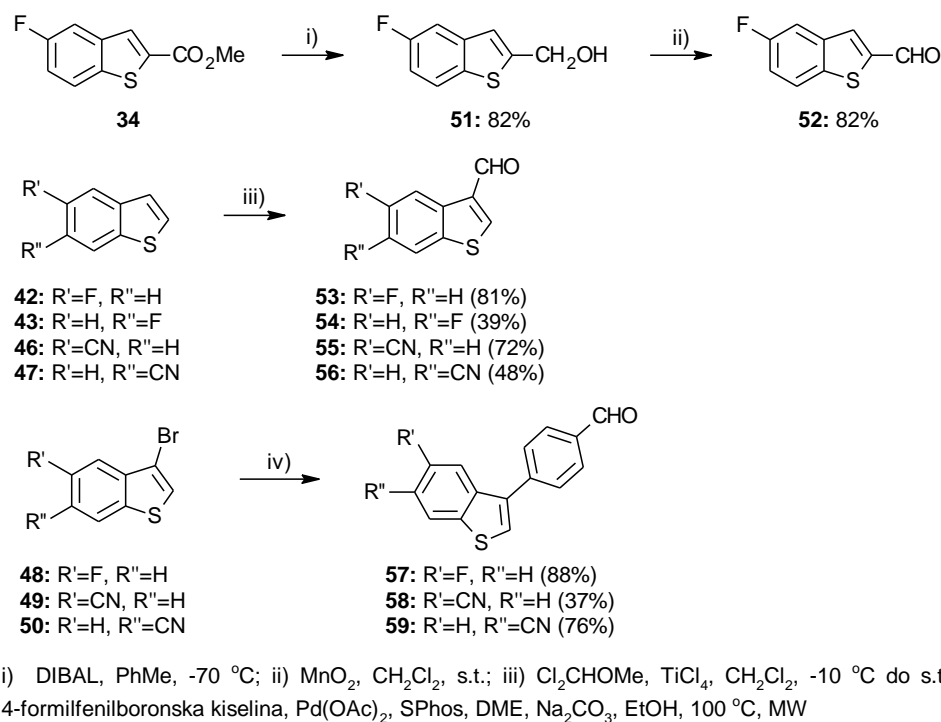
Novi pristup sintezi fluor- i cijano-supstuisanih benzotiofenskih jezgara prikazan je na shemi 2. Kondenzacijom komercijalno dostupnih dihalogen-supstuisanih benzaldehida (2,5-difluorbenzaldehyda (**30**), 2,4-difluorbenzaldehyda (**31**), 5-brom-2-fluorbenzaldehyda (**32**) i 4-brom-2-fluorbenzaldehyda (**33**)) i metil-tioglikolata zatvoreno je benzotiofensko jezgro.¹¹³ Metil-estri sa fluorovanim benzotiofenskim jezgrom, **34** i **35** dobijeni su u niskom prinosu, 43% i 19%, dok su metil-estri sa bromovanim benzotiofenskim jezgrom, **36** i **37** dobijeni u visokom prinosu, 89% i 76%. Metil-estri su baznom hidrolizom pomoću kalijum-hidroksida u smesi metanol/voda i naknadnim zakišeljavanjem prevedeni u odgovarajuće karboksilne kiseline **38–41** u visokim prinosima (70–95%).¹¹⁴ Dekarboksilacijom u mikrotalasnom reaktoru na 200 °C u dimetil-acetamidu (DMAC) u prisustvu diazabicykloundecena (DBU), sintetisani su fluor- i brom-supstuisani benzotiofeni **42–45** u visokim prinosima (93–98%).¹¹⁵ Zagrevanjem **44** i **45** u prisustvu bakar(I)-cijanida u *N*-metilpirolidonu (NMP) na 190 °C tokom 12 h, brom-benzotiofeni su prevedeni u odgovarajuće cijano-derivate **46** i **47** u prinosu 86% i 84%.¹¹⁶

Bromovanjem **42**, **46** i **47** pomoću broma u dihlormetanu ili dihloretanu, sintetisana su jedinjenja **48–50** u prinosima od 81–87%.¹¹⁷



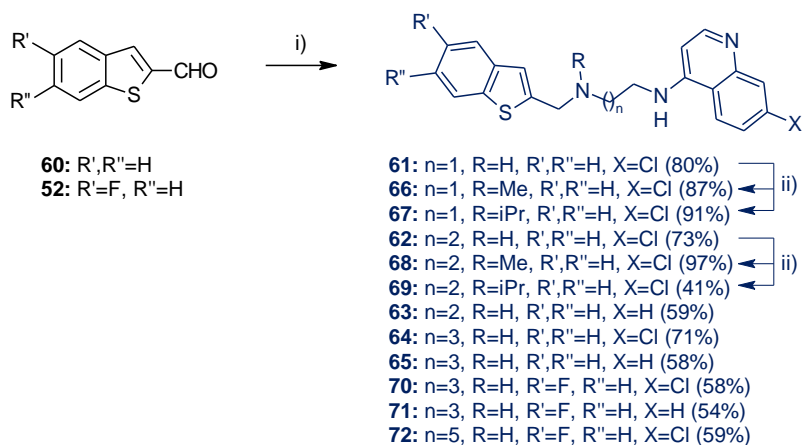
Shema 2. Sinteza fluor- i cijano-supstituisanih benzotiofenskih jezgara

Benzotiofenski derivati aminohinolina dobijeni su reakcijom reduktivnog aminovanja, polazeći od odgovarajućeg aldehida i aminohinolina. Korišćena su dva komercijalno dostupna aldehida, a ostalih osam je sintetisano (shema 3). Redukcijom metil-estra **34** pomoću diizobutil-aluminijumhidrida u toluenu na -70 °C, umesto očekivanog aldehida dobijen je alkohol **51** u prinosu 82%. Aldehid **52** je dobijen u prinosu 82% oksidacijom alkohola **51** pomoću mangan(IV)-oksida u dihlormetanu na sobnoj temperaturi. Supstituisani benzotiofen-3-karbaldehidi **53–56** dobijeni su Rieche-ovim formilovanjem **42**, **43**, **46** i **47** pomoću dihlormetil-metil-etra, u prisustvu titanijum-tetrahlorida, na -10 °C, u suvom dihlormetanu.¹¹⁸ Suzuki-jevim kuplovanjem brom-supstituisanih benzotiofena **48–50** i 4-formilfenilboronske kiseline, u mikrotalasnom reaktoru na 100 °C, u prisustvu katalitičkih količina Pd(OAc)₂ i SPhos, dobijeni su aldehidi **57–59**. Za razliku od aldehida **57** i **59** koji su dobijeni u zadovoljavajućem prinosu, 88% i 76%, **58** je dobijen u relativno niskom prinosu (37% – sirov proizvod je primenjen u sledećoj reakciji reduktivnog aminovanja).



Shema 3. Sinteza aldehida kao reakcionih partnera u reakciji reduktivnog aminovanja

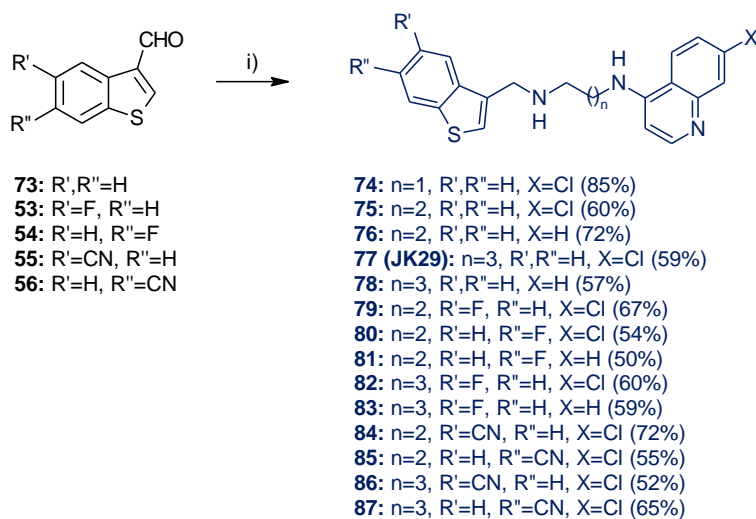
Sinteza C(2)-benzotiofenskih derivata aminohinolina sa alifatičnim mostom normalnog niza prikazana je shemom 4. Reduktivnim aminovanjem komercijalno dostupnog 1-benzotiofen-2-karbaldehida **60** i odgovarajućih aminohinolina dobijeni su derivati **61–65** u prinosu 58–80%. Kao redukciono sredstvo korišćen je natrijum-borhidrid u metanolu uz dodatak sirćetne kiseline. Sinteza derivata sa tercijarnom amino-grupom izvršena je reakcijom reduktivnog aminovanja derivata **61** i **62** i odgovarajućeg karbonilnog jedinjenja, u prisustvu natrijum-cijanoborhidrida i cink-hlorida u metanolu.¹¹⁹ Kada je kao karbonilno jedinjenje korišćen 37% vodeni rastvor formaldehida, dobijeni su *N*-metilovani derivati **66** i **68** u visokom prinosu (87% i 97%), a kada je korišćen aceton, dobijeni su *N*-izopropilovani derivati **67** i **69** u prinosu 91% i 41%. Fluorom supstituisani benzotiofenski derivati **70–72** sintetisani su u umerenim prinosima (54–59%), reakcijom reduktivnog aminovanja pod istim uslovima, polazeći od aldehida **52**.



i) 1) aminohinolin, AcOHglac, MeOH/CH₂Cl₂, s.t. 2) NaBH₄, s.t.; ii) HCHO/aceton, ZnCl₂, NaBH₃CN, MeOH, s.t.

Shema 4. Sinteza C(2)-benzotiofenskih derivata aminohinolina sa alifatičnim mostom normalnog niza

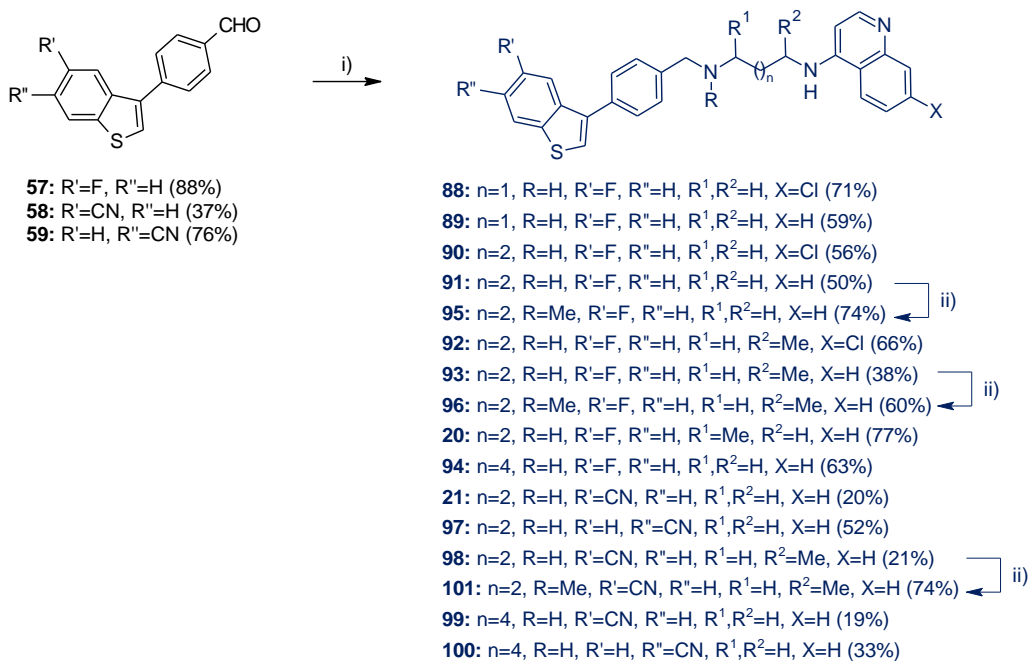
C(3)-benzotiofenski derivati aminohinolina sa alifatičnim mostom normalnog niza sintetisani su reakcijom reduktivnog aminovanja prema prethodno opisanom postupku za C(2)-benzotiofenske derivate (shema 5). Reakcijom komercijalno dostupnog 1-benzotiofen-3-karbaldehida **73** i odgovarajućih aminohinolina dobijeni su derivati **74–76**, **77 (JK29)** i **78** u prinosu 57–85%. 5-Fluoro- i 6-fluoro- (**79–83**), kao i 5-cijano- i 6-cijano-supstituisani benzotiofenski derivati aminohinolina (**84–87**), sintetisani su u prinosima od 52–72%, polazeći od aldehida **53–56**.



i) 1) aminohinolin, AcOH glac, MeOH/CH₂Cl₂, s.t. 2) NaBH₄, s.t.

Shema 5. Sinteza C(3)-benzotiofenskih derivata aminohinolina sa alifatičnim mostom normalnog niza

Sinteza benzotiofenskih derivata aminohinolina sa benzilaminoalkil-mostom prikazana je na shemi 6. Iz aldehida **57–59**, reakcijom reduktivnog aminovanja pod uslovima istim kao kod prethodne grupe jedinjenja, sintetisano je 13 derivata **20, 21, 88–94 i 97–100** u prinosu od 19–77%. Posebno nizak prinos zapažen je u slučaju cijano-derivata **21, 98 i 99** (19–21%), što je uzrokovano višestrukim hromatografskim prečišćavanjem, usled nemogućnosti da se aldehyd **58** dobije čist u reakciji Suzuki-jevog kuplovanja. Iz derivata **91, 93 i 98** sintetisani su *N*-metilovani derivati **95, 96 i 101** (shema 6), u umerenom prinosu 60–74%, pod istim reakcionim uslovima kao u slučaju jedinjenja **66 i 68** (shema 4).



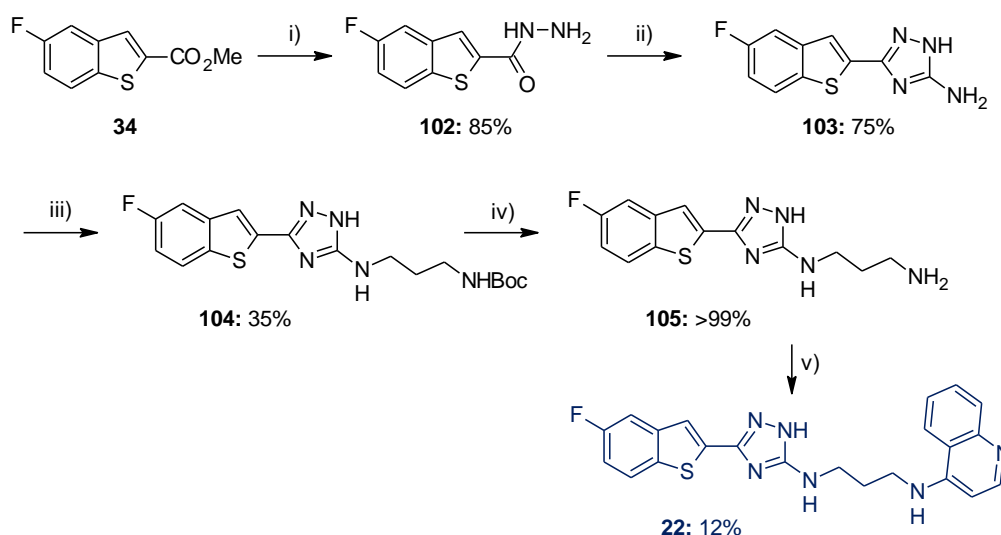
i) 1) aminohinolin, AcOHglac, MeOH/CH₂Cl₂, s.t. 2) NaBH₄, s.t.; ii) HCHO, ZnCl₂, NaBH₃CN, MeOH, s.t.

Shema 6. Sinteza benzotiofenskih derivata aminohinolina sa benzilaminoalkil-mostom

3.2.1.2. Sinteza benzotiofenskog derivata aminohinolina sa 1,2,4-triazolom u mostu

Derivat **22** sa 1,2,4-triazolskim prstenom u mostu sintetisan je u pet reakcionih koraka polazeći od metil-estra **34** (shema 7). Dejstvom hidrazin-hidrata u etanolu na 78 °C¹²⁰ dobijen je hidrazid **102** u prinosu 85%. Triazolski prsten je zatvoren

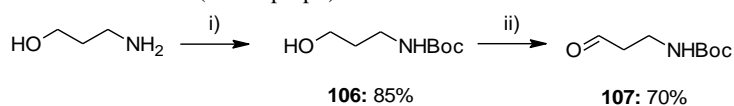
zagrevanjem nastalog hidrazida sa *S*-metilzotiourea-sulfatom, u etanolu na 120 °C, u prisustvu natrijum-hidroksida.¹²¹ Jedinjenje **103** je dobijeno u prinosu 75%. Reakcijom reduktivnog aminovanja amina **103** sa aldehidnim partnerom **107**^{xxii} u metanolu dobijeno je jedinjenje **104** u prinosu 35%. Kao redukciono sredstvo korišćen je natrijum-cijanoborhidrid u metanolu, u prisustvu glacijalne sirćetne kiseline. Uklanjanjem zaštitne funkcionalne grupe iz derivata **104** u kvantitativnom prinosu sintetisan je amin **105**. Tako dobijeni amin je stopljen sa 4-hlorhinolinom zagrevanjem u uljanom kupatilu na 140 °C, a zatim podvrgnut dejstvu mikrotalasnog zračenja u *n*-propanolu na 170 °C. Benzotiofenski derivat **22** je dobijen u prinosu od svega 12%.



i) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, 78 °C; ii) *S*-metilzotiourea-sulfat, NaOH, EtOH, 120 °C; iii) 1) **107**, MeOH, AcOHglac, s.t. 2) NaBH_3CN , s.t.; iv) 1) CF_3COOH , CH_2Cl_2 , s.t.; v) 4-hlorhinolin, 140 °C; MW, *n*-PrOH, 170 °C

Shema 7. Sinteza benzotiofenskog derivata sa 1,2,4-triazolom u mostu

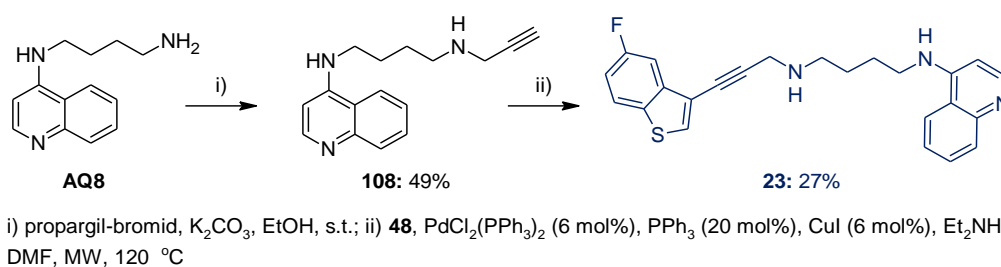
^{xxii} Sinteza *tert*-butil(3-oksopropil)karbamata **107**:



i) Boc_2O , CH_2Cl_2 , 0 °C do s.t.; ii) PCC, CH_2Cl_2 , s.t.

3.2.1.3. Sinteza benzotiofenskog derivata aminohinolina sa trostrukom vezom u mostu

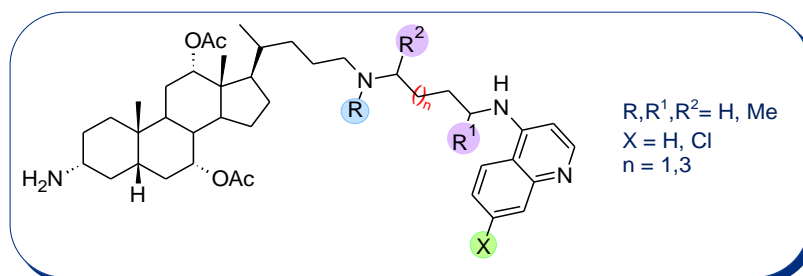
Sinteza benzotiofenskog derivata aminohinolina sa trostrukom vezom u mostu prikazana je shemom 8. Alkilovanjem primarne amino-grupe aminohinolina **AQ8** propargil-bromidom u prisustvu prašenog kalijum-karbonata u etanolu, dobijeno je jedinjenje **108** u prinosu 49%.¹²² Reakcijom Sonogashira kuplovanja terminalnog alkina i jedinjenja **48** u mikrotalasnom reaktoru na 120 °C u *N,N*-dimetil-formamidu, sintetisano je jedinjenje **23** u prinosu 27%, pri čemu je kao katalizator upotrebljen sistem PdCl₂(PPh₃)₂/PPh₃/CuI i baza dietil-amin.



Shema 8. Sinteza benzotiofenskog derivata aminohinolina sa trostrukom vezom u mostu

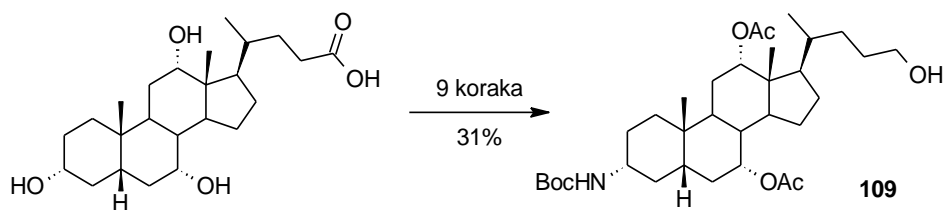
3.2.2. Sinteza steroidnih derivata aminohinolina

Opšta struktura novih steroidnih derivata aminohinolina prikazana je na slici 52.



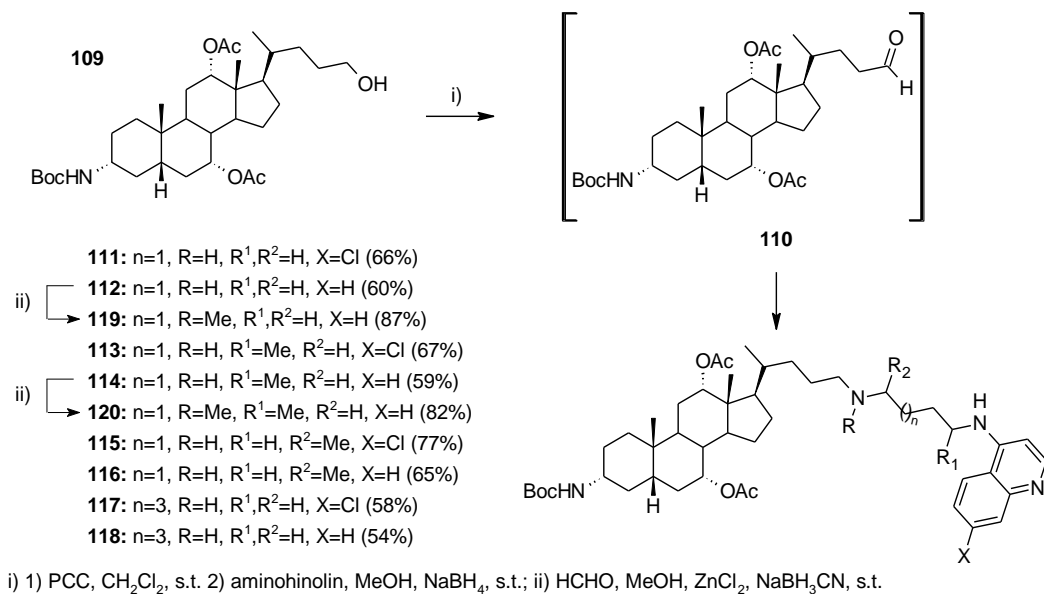
Slika 52. Novi steroidni derivati aminohinolina

Polazeći iz holne kiseline, prema postupku opisanom u literaturi, u devet reakcionih koraka sintetisan je alkohol **109** u ukupnom prinosu 31% (shema 9).¹⁰¹



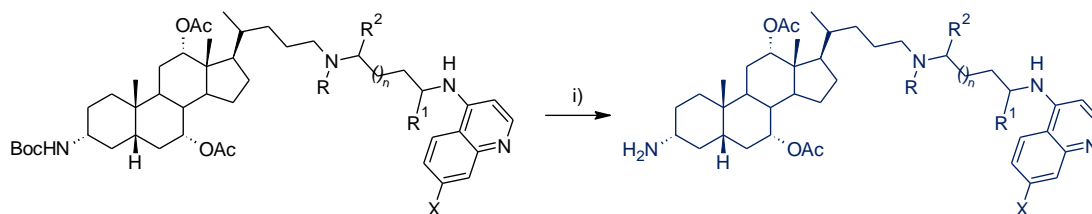
Shema 9. Sinteza alkohola **109**

Alkohol **109** je pomoću piridinijum-hlorhromata u dihlormetanu preveden u aldehid **110** koji je sirov podvrgnut reakciji reduktivnog aminovanja odgovarajućim aminohinolinima. Dobijeni su derivati **111–118** u prinosu 54–77% (shema 10). Boc-zaštićeni derivati **112** i **114** su podvrgnuti reakciji *N*-metilovanja pomoću 37% vodenog rastvora formaldehida. Kao redukciono sredstvo korišćen je natrijum-cijanoborhidrid u metanolu, u prisustvu cink-hlorida.¹¹⁹ Dobijeni su derivati **119** i **120** u visokom prinosu, 87% i 82% (shema 10).



Shema 10. Sinteza 3-*N*-Boc-zaštićenih steroidnih derivata aminohinolina

Posle uklanjanja zaštitne *terc*-butiloksikarbonil-grupe pomoću trifluorsirćetne kiseline u dihlormetanu, dobijeni su derivati **17 (JK141)** i **121–129** u prinosu 48–97% (shema 11).



111: n=1, R=H, R¹,R²=H, X=Cl

112: n=1, R=H, R¹,R²=H, X=H

119: n=1, R=Me, R¹,R²=H, X=H

113: n=1, R=H, R¹=Me, R²=H, X=Cl

114: n=1, R=H, R¹=Me, R²=H, X=H

120: n=1, R=Me, R¹=Me, R²=H, X=H

115: n=1, R=H, R¹=H, R²=Me, X=Cl

116: n=1, R=H, R¹=H, R²=Me, X=H

117: n=3, R=H, R¹,R²=H, X=Cl

118: n=3, R=H, R¹,R²=H, X=H

17 (JK141): n=1, R=H, R¹,R²=H, X=Cl (97%)

121: n=1, R=H, R¹,R²=H, X=H (48%)

122: n=1, R=Me, R¹,R²=H, X=H (56%)

123: n=1, R=H, R¹=Me, R²=H, X=Cl (97%)

124: n=1, R=H, R¹=Me, R²=H, X=H (71%)

125: n=1, R=Me, R¹=Me, R²=H, X=H (60%)

126: n=1, R=H, R¹=H, R²=Me, X=Cl (72%)

127: n=1, R=H, R¹=H, R²=Me, X=H (94%)

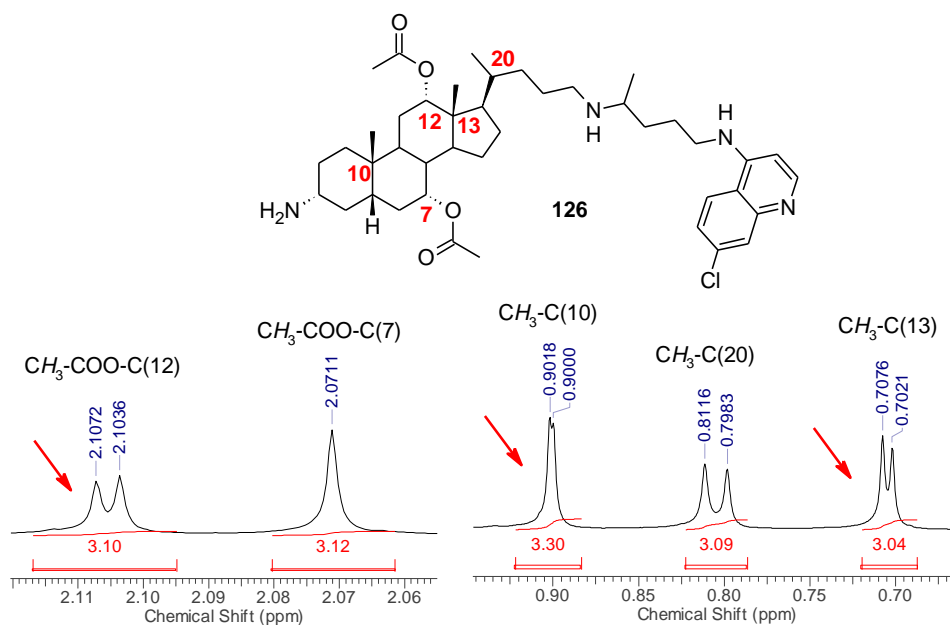
128: n=3, R=H, R¹,R²=H, X=Cl (92%)

129: n=3, R=H, R¹,R²=H, X=H (76%)

i) CF₃COOH, CH₂Cl₂, s.t.

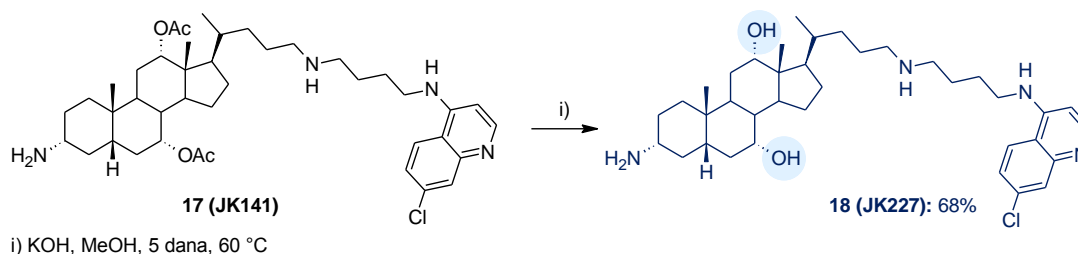
Shema 11. Deprotekcija zaštitne *N*-Boc funkcionalne grupe: dobijanje željenih inhibitora

Jedinjenja **123–127** su dobijena kao smeša diastereomera, usled prisustva metil-grupe u mostu koji povezuje steroidni i aminohinolinski deo strukture. Diastereomeri imaju iste R_f vrednosti na silika-gelu i ne mogu da se razdvoje običnom hromatografijom (dry-flash, flash). Međutim, ¹H NMR spektri jasno ukazuju na prisustvo smeše jedinjenja (uvećan deo ¹H NMR spektra jedinjenja **126**, slika 53). Za signale označene crvenom strelicom se očekuje da budu singleti, dok se u ovim jedinjenjima pojavljuju kao preklapljeni singleti i njihovi ukupni integrali odgovaraju broju protona u metil-grupama. Dodatno, signali protona metil-grupa sa C(10) se nalaze na sličnijem pomeranju od signala protona metil-grupa sa C(13), što ukazuje na blizinu metil-grupe iz mosta i njen uticaj na pomeranje ovih protona.



Slika 53. Deo ^1H NMR spektra jedinjenja **126** koji ukazuje na prisustvo diastereomera

Molekulsko modelovanje jedinjenja **17 (JK141)** i hidroksi-analoga **18 (JK227)** u aktivnom mestu BoNT/A LC ukazuje na značajno lošije uklapanje jedinjenja **18 (JK227)**^{xxiii}. Ipak, kako bi se izvršila provera modela i pretpostavljene koordinacije Zn^{2+} karbonilnim kiseonikom acetoksi-grupe sa C(7), jedinjenje **18 (JK227)** je sintetisano polazeći od **17 (JK141)** (shema 12). Izvršena je bazna hidroliza estarskih funkcionalnih grupa u položajima C(7) i C(12), pomoću kalijum-hidroksida u metanolu. Jedinjenje **18 (JK227)** je dobijeno u prinosu 68%.

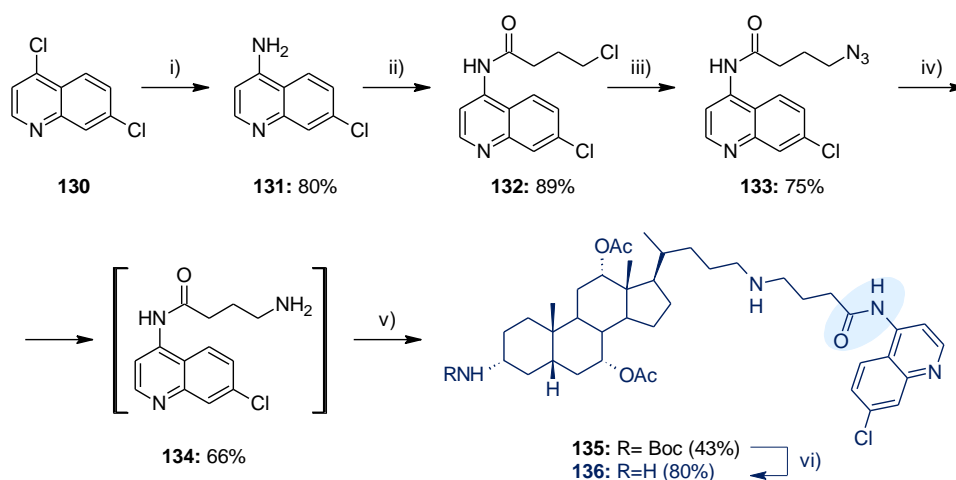


Shema 12. Sinteza jedinjenja **18 (JK227)**

Svi prethodno prikazani steroidni derivati poseduju sekundarnu amino-grupu na hinolinskom jezgru. Radi ispitivanja uticaja promene pK_a , kao i konformacije molekula

^{xxiii} Analizirano u poglavlju 3.1.1.1.

na aktivnost, sintetisan je derivat **136** sa amidnom funkcionalnom grupom (shema 13). U prvom koraku je, polazeći od komercijalno dostupnog 4,7-dihlorhinolina **130**, reakcijom nukleofilne aromatične susptitucije sa amonijum-karbonatom u fenolu, dobijen amin **131** u prinosu 80%.¹²³ Reakcijom nastalog amina sa 4-hlorbutanoil-hloridom u prisustvu trietil-amina, dobijen je hinolinski amid **132** u prinosu 89%. Nukleofilnom supstitucijom pomoću natrijum-azida u *N,N*-dimetil-formamidu, a potom redukcijom azida pomoću trifenilfosfina u tetrahidrofuranu, uz dodatak jednog ekvivalenta vode¹²⁴ dobijen je amino-derivat **134** (66%). Ovaj derivat je prikazan u uglastoj zagradi (shema 13), zato što je podložan spontanom razlaganju (shema 14). Zbog toga je, odmah posle redukcije i brzog prečišćavanja pomoću hromatografije na koloni, sirov upotrebljen u reakciji reduktivnog aminovanja sa steroidnim C(24) aldehidom **110** (koji je prethodno dobijen oksidacijom alkohola **109** pomoću piridinium-hlorhromata) u prisustvu natrijum-borhidrida u metanolu. 3-*N*-Boc-zaštićeni steroidni derivat **135** je dobijen u prinosu 43%, a posle uklanjanja zaštitne funkcionalne grupe pomoću trifluorsirćetne kiseline u dihlorometanu, dobijeno je jedinjenje **136** u prinosu 80%.

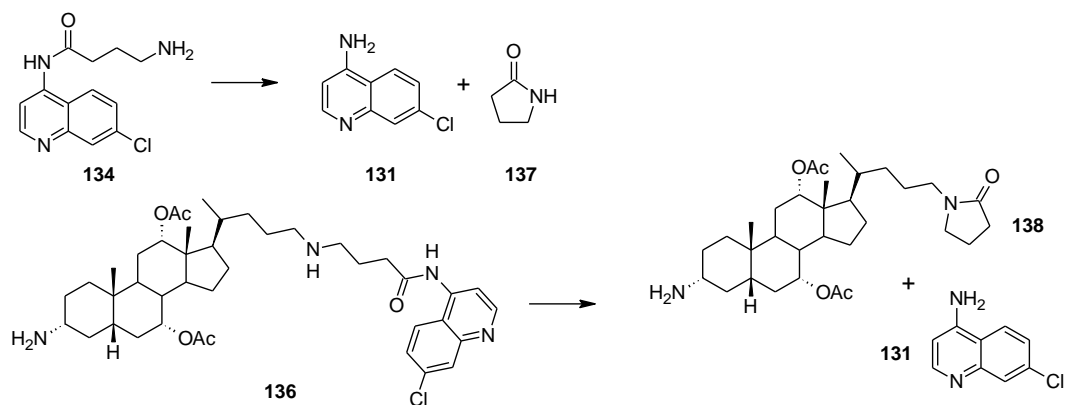


i) $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, fenol, 110 do 165 °C; ii) 4-hlorbutanoil-hlorid, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0 °C do s.t.; iii) NaN_3 , DMF, 80 °C; iv) Ph_3P , THF, H_2O , 65 °C; v) 1) **110**, suvi MeOH, s.t. 2) NaBH_4 , s.t.; vi) CF_3COOH , CH_2Cl_2 , s.t.

Shema 13. Sinteza amidnog derivata **136**

Međutim, ispostavilo se da je i krajnji proizvod **136** podložan razlaganju, poput amina **134** (shema 14). Hromatografijom na koloni ili stajanjem, dobijeni amin **134**

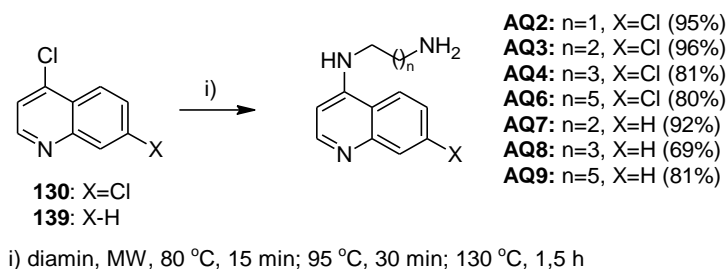
podleže intramolekulском građenju laktama **137** i oslobađanju spomenutog jedinjenja **131**. Krajnji proizvod **136** je stabilan ukoliko se čuva na niskoj temperaturi ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) i bez prisustva rastvarača. U suprotnom, stajanjem u metanolnom rastvoru, podleže intramolekulском građenju laktama **138**, uz oslobađanje amina **131** (potvrđeno HRMS analizom).



Shema 14. Proizvodi spontanog razlaganja **134** i **136**

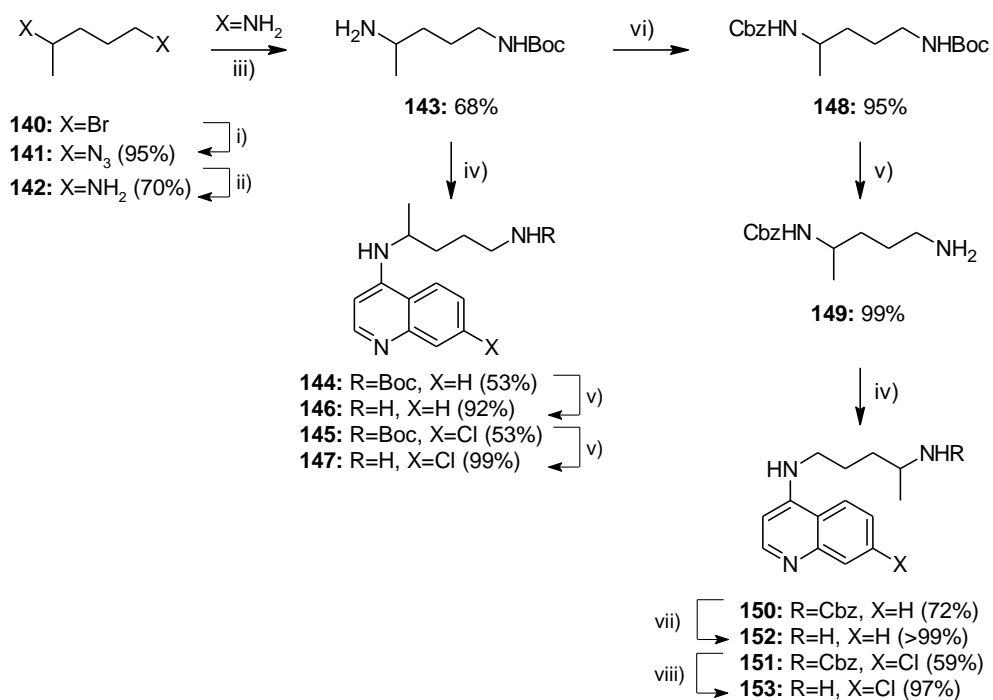
3.2.3. Sinteza račvastih aminohinolina i aminohinolina normalnog niza

U prethodno opisanim reakcijama reduktivnog aminovanja za dobijanje benzotiofenskih i steroidnih derivata korišćeni su aminohinolini normalnog i račvastog alkil-niza. Aminohinolini normalnog alkil-niza **AQ2**, **AQ3**, **AQ4**, **AQ6**, **AQ7**, **AQ8** i **AQ9** sintetisani su u prinosu 69–96% reakcijom nukleofilne aromatične supstitucije 4,7-dihlorhinolina **130** ili 4-hlorhinolina **139** i odgovarajućih diamina, zagrevanjem u mikrotalasnom reaktoru (shema 15).



Shema 15. Sinteza aminohinolina normalnog alkil-niza

Sinteza aminohinolina račvastog alkil-niza prikazana je na shemi 16. Komercijalno dostupan 1,4-dibrompentan **140** je nukleofilnom supstitucijom pomoću natrijum-azida u dimetil-formamidu na temperaturi 60 °C preveden u **141** u visokom prinosu. Redukcijom azida pomoću trifenil-fosfina u toluenu na 120 °C, uz dodatak jednog ekvivalenta vode,¹²⁴ a potom dodatkom metanalnog rastvora HCl, dobijen je diamin u obliku soli. Destilacijom preko čvrstog natrijum-hidroksida, diamin **142** je dobijen u prinosu 70%. Zagrevanjem dobijenog diamina u apsolutnom etanolu na 90 °C, u prisustvu *tert*-butilfenilkarbonata, dobijeno je u prinosu od 68% jedinjenje **143**, u kome je *tert*-butiloksikarbonil-grupa uvedena na sterno manje zaštićeni amin.¹²⁵ Jedinjenja **144** i **145** su dobijena u prinosu 53% u reakciji nukleofilne aromatične supstitucije 4-hlorhinolina/4,7-dihlorhinolina sa mono-Boc zaštićenim diaminom **143** zagrevanjem na 120–130 °C.²⁷ Deprotekcijom zaštitne grupe trifluorsirćetnom kiselinom u dihlormetanu dobijeni su u visokom prinosu aminohinolini sa metil-grupom bližom hinolinskom jezgru, **146** i **147**. Sintetisana su i dva aminohinolina kod kojih je metil-grupa u α -položaju u odnosu na alifatičnu amino-grupu. Mono-Boc zaštićeni diamin **143** je podvrgnut reakciji sa benzil-hlorformijatom u prisustvu trietil-amina u dihlormetanu i dobijeno je jedinjenje **148** u visokom prinosu. Uklanjanjem Boc zaštitne grupe dobijen je mono-Cbz amin **149** u prinosu 99%. U sledećem koraku, 4-hlorhinolin i 4,7-dihlorhinolin su podvrgnuti nukleofilnoj aromatičnoj supstituciji reakcijom sa aminom **149**. Zagrevanjem u uljanom kupatilu sintetisana su jedinjenja **150** i **151** u prinosu 72% i 59%. Aminohinolini sa metil-grupom u α -položaju u odnosu na alifatičnu amino-grupu **152** i **153** dobijeni su deprotekcijom Cbz- zaštitne grupe u gotovo kvantitativnom prinosu, >99% i 97%. U slučaju jedinjenja **152** za deprotekciju je upotrebljen metod hidrogenizacije sa Pd(C) kao katalizatorom, na pritisku 20 psi (1,4 bar), dok je u slučaju aminohinolina **153** jedinjenje **151** zagrevano u trifluorsirćetnoj kiselini na temperaturi 70–80 °C. Metod hidrogenizacije se u slučaju **151** pokazao kao neuspešan, zato što je istovremeno dolazilo i do hidrogenolize atoma hlora u položaju C(7) hinolinskog jezgra.



i) NaN₃, DMF, 60 °C; ii) Ph₃P, PhMe, 120 °C; MeOH (zas. HCl), 0 °C; iii) terc-butil-fenilkarbonat, aps. EtOH, 90 °C; iv) 4,7-dihlorhinolin/4-hlorhinolin, 80 °C do 120-130 °C; v) CF₃COOH/CH₂Cl₂, s.t.; vi) benzil-hlorformijat, Et₃N, CH₂Cl₂, s.t.; vii) H₂, Pd(C) (10%), MeOH, 20 psi, s.t.; viii) CF₃COOH, 70-80 °C

Shema 16. Sinteza aminohinolina račvastog alkil-niza

3.3. Inhibicija BoNT/A LC

Većina dosadašnjih studija o inhibiciji botulinum neurotoksina pomoću malih molekula zasniva se na *in vitro* proteolitičkim esejima, kao što je diskutovano u opštem delu.^{25,26,27,28,30} Ipak, težnja za razvojem eseja za ispitivanje antagonista BoNT/A u fiziološki relevantnim sistemima je sve veća.⁴⁴ Jedinjenja sintetisana u ovom radu prvobitno su testirana u *in vitro* HPLC proteolitičkom esej, a zatim u motornim neuronima razvijenim iz embrionalnih matičnih ćelija miša (mES-MN).

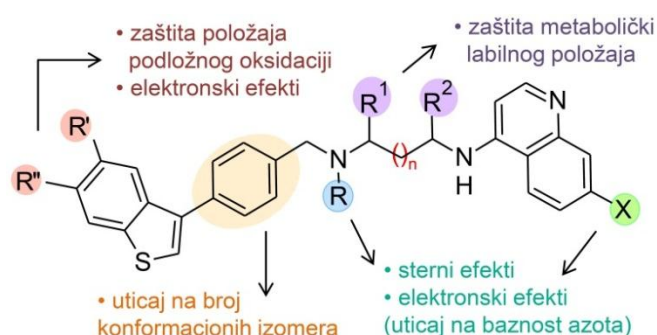
3.3.1. *In vitro* HPLC proteolitički esej

Prilikom određivanja inhibitorne aktivnosti derivata prema BoNT/A LC, kao supstrat je korišćen sintetički polipeptid od 17 aminokiselina. Ovaj peptid odgovara segmentu 187-203 proteina SNAP-25. Proteolitička aktivnost je određena poređenjem površina ispod signala nastalih proizvoda i netaknutog supstrata.⁴² U tabelama 2–4, 6 i 7 prikazane su vrednosti procenata inhibicije BoNT/A LC pri standardnoj koncentraciji ispitivanih jedinjenja 20 μ M, kao i odgovarajuće IC_{50} vrednosti. U *in vitro* proteolitičkom esej testirano je 44 benzotiofenska i 12 steroidnih derivata aminohinolina.

■ Benzotiofenski derivati aminohinolina

U nameri da se ispita veza između strukture i aktivnosti, analizirani su derivati koji se razlikuju po supstituentima na benzotiofenskom i aminohinolinskom jezgru (slika 54). Zamena vodonika na benzotiofenskom jezgru nekim drugim supstituentom je jedan od načina da se zaštiti položaj koji je podložan metaboličkoj oksidaciji. U okviru ove doktorske disertacije ispitivali smo mogućnost uvođenja fluora i cijano-grupe u položaj C(5) i C(6) na benzotiofenskom jezgru. Fluor je mali atom kod koga sterna efekti nisu toliko izraženi, ali usled izuzetno visoke elektronegativnosti značajno menja elektronsku gustinu u benzotiofenskom jezgru, čime utiče na interakcije koje ono ostvaruje u aktivnom mestu enzima. Osim toga, C-F veza je najjača ugljenik-heteroatom veza (523 kJ/mol), što je čini izuzetno stabilnom u metaboličkim uslovima. Slično fluoru, elektron-privlačna cijano-grupa takođe utiče na raspodelu elektronske gustine, a osim

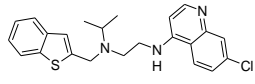
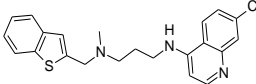
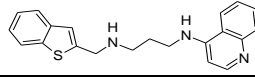
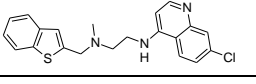
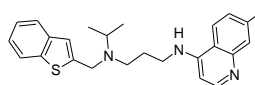
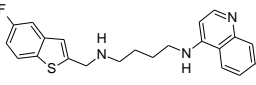
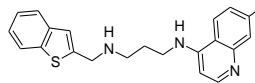
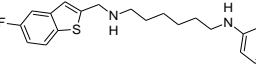
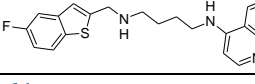
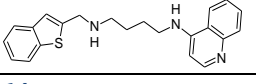
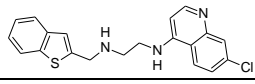
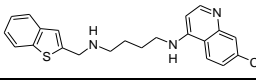
toga ima mogućnost da preko slobodnog elektronskog para na azotu ostvari dodatne interakcije u aktivnom mestu enzima. Stabilnost u metaboličkim uslovima, kao i značajan doprinos smanjenju lipofilnosti, čine dodatne razloge što se cijano-grupa nalazi u velikom broju biološki aktivnih jedinjenja.¹²⁶ Prisustvo hlora na hinolinskom jezgru je takođe razmatrano sa strane elektronskih i sternih faktora. Pored toga, ispitivali smo i uticaj različite dužine i strukture mosta koji povezuje dva heterociklična jezgra. Kao što je već ranije spomenuto, pretpostavlja se da bi uvođenje benzenovog prstena uticalo na rigidnost molekula i broj konformacionih izomera u aktivnom mestu enzima. U nameri da ispitamo da li baznost amina i sterni efekti imaju uticaj na inhibitornu aktivnost, testirali smo derivate sa tercijarnom alifatičnom amino-grupom.



Slika 54. Uticaj različitih strukturnih promena na aktivnost

U *in vitro* esejima prvobitno su testirani benzotiofenski derivati aminohinolina sa alifatičnim mostom normalnog niza. Dvanaest derivata kod kojih su benzotiofensko i hinolinsko jezgro spojeni mostom u položaju C(2) benzotiofena inhibiraju BoNT/A LC metaloproteazu u opsegu 3–54% pri koncentraciji od 20 μ M (tabela 2). Supstitucija vodonika fluorom na benzotiofenskom jezgru ne utiče pozitivno na aktivnost (**70**, 36% i **71**, 33% u odnosu na **64**, 54% i **65**, 39%). Alkilovanje sekundarnog amina ne menja značajno aktivnost (metilovani derivati **66** i **68** pokazuju neznatno višu aktivnost od nemetilovanih analoga **61** i **62**, dok je izopropil-derivat **67** potpuno neaktivan). Najviši stepen inhibicije ostvaruje jedinjenje **64** (54%), sa četiri metilenske grupe u mostu i hlorom u položaju C(7) aminohinolinskog jezgra.

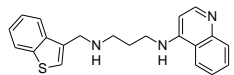
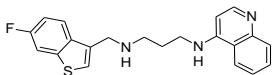
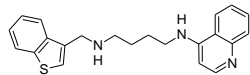
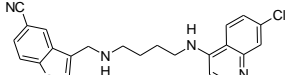
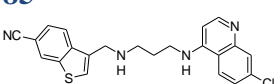
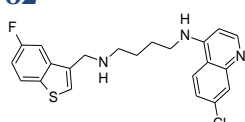
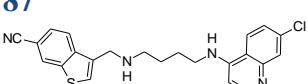
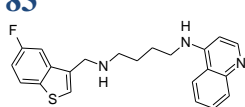
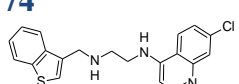
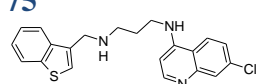
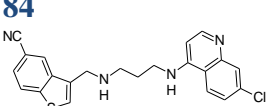
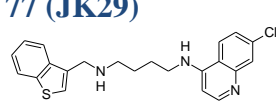
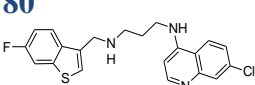
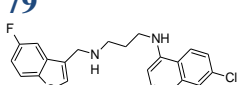
Tabela 2. *In vitro* inhibitorne aktivnosti C(2) serije benzotiofenskih derivata aminohinolina sa alifatičnim mostom normalnog niza prema BoNT/A LC metaloproteazi

Jedinjenje	% inhibicije BoNT/A LC (20 μ M)	Jedinjenje	% inhibicije BoNT/A LC (20 μ M)
67 	3	68 	35
63 	22	66 	36
69 	32	70 	36
62 	33	72 	39
71 	33	65 	39
61 	34	64 	54

^aRezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Četnaest derivata kod kojih su benzotiofensko i hinolinsko jezgro spojeni mostom u položaju C(3) benzotiofena pokazuje inhibiciju 14–47% (tabela 3). IC₅₀ vrednosti su određene samo za **81** i **75** i iznose 4,3 i 16,6 μ M. Svi cijano-derivati (**84–87**) pokazuju stepen inhibicije <40%. Supstitucija vodonika fluorom kod ove grupe jedinjenja, posebno u položaju C(5) benzotiofenskog jezgra, malo ali pozitivno utiče na aktivnost (**79**, **82** i **83** pokazuju aktivnost >40%), za razliku od prethodno opisane C(2) serije benzotiofenskih derivata.

Tabela 3. *In vitro* inhibitorne aktivnosti C(3) serije benzotiofenskih derivata aminohinolina sa alifatičnim mostom normalnog niza prema BoNT/A LC metaloproteazi^a

Jedinjenje	% inhibicije BoNT/A LC (20 μ M)	Jedinjenje	% inhibicije BoNT/A LC (20 μ M)	IC ₅₀ (μ M)
76 	14	81 	36	4,3
78 	22	86 	37	-
85 	26	82 	40	-
87 	32	83 	43	-
74 	32	75 	45	16,6
84 	33	77 (JK29) 	46	-
80 	33	79 	47	-

^aRezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Iako nijedan od C(3)-benzotiofenskih derivata ne pokazuje inhibiciju >50%, ova serija u odnosu na C(2)-benzotiofenske derivate uopšteno pokazuje bolju aktivnost (5 derivata pokazuje inhibitornu aktivnost >40%). Osim toga, malim promenama u strukturi je moguće uticati na procenat vezivanja. Zbog toga je ispitana inhibitorna aktivnost grupe benzotiofenskih derivata sa benzilaminoalkil-mostom, takođe povezanim u položaju C(3). Rezultati su prikazani u tabeli 4. Sintetisano je 16 derivata sa različitim suspsituentima na benzotiofenskom i aminohinolinskom jezgri, sa različitim brojem metilenskih grupa u mostu, sa račvastim i mostom normalnog niza i sa tercijarnom amino-grupom. IC₅₀ vrednosti ovih derivata kreću se u rasponu 3,3–10,2

μM . Derivati koji ne poseduju tercijarnu amino-grupu pokazali su se značajno aktivnijim od metilovanih analoga (**93** (69%) i **98** (61%) u poređenju sa **96** (48%) i **101** (27%)). Derivati sa cijano-grupom umesto F u položaju C-5 pokazuju viši stepen inhibicije (**21** (84%) i **99** (75%) u poređenju sa F-supstituisanim **91** (34%) i **94** (56%)). Poređenjem slika 47-A i 47-B^{xxiv}, na kojima su prikazane interakcije liganada **20** i **21** sa aktivnim mestom enzima dobijene molekulskim modelovanjem, uočava se dodatna vodonična veza koju ostvaruje cijano-grupa iz jedinjenja **21** sa Arg231. Pretpostavlja se da je ova vodonična veza odgovorna za zaključavanje konformacije liganda i bolje uklapanje u aktivno mesto. S druge strane, promena položaja CN grupe iz C-5 u C-6 negativno se odražava na aktivnost (**98** (61%), **99** (75%) i **21** (84%) u poređenju sa **97** (23%) i **100** (8%)), za šta je najverovatnije odgovoran gubitak vodonične veze sa Arg231, jer cijano-grupa više nije u pogodnom položaju da ostvari ovu interakciju.

Prisustvo hlora na aminohinolinskom jezgru ima veliki uticaj ne samo sa sternog, već i sa elektronskog aspekta. Kada je reč o sternim faktorima, zamena vodonika hlorom u velikoj meri menja sposobnost uklapanja liganda u aktivno mesto. Međutim, elektronski uticaj hlora je mnogo veći, imajući u vidu da usled elektronegativnosti značajno menja baznost hinolinskog azota. U tabeli 5 su prikazane eksperimentalno izmerene pK_a vrednosti za tri izabrana derivata, od kojih jedan poseduje hlor u položaju C(7). Kao što se iz tabele 5 vidi, hinolinski azot je najmanje bazan kod jedinjenja **92** ($pK_{a1} = 6,93$), pa će na fiziološkom pH ovo jedinjenje biti u većoj meri +1 naelektrisano, dok će des-hlor derivati poput **91** ($pK_{a1} = 7,78$) biti u većoj meri +2. Molekulsko modelovanje ukazuje da je za ostvarivanje interakcija sa Glu252 u aktivnom mestu enzima BoNT/A LC neophodan pozitivno naelektrisan hinolinski azot.^{xxv} Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4, izvodi se zaključak da se uopšteno, des-hlor aminohinolinski derivati jače vezuju za aktivno mesto enzima i ostvaruju viši procenat inhibicije.

^{xxiv} Videti poglavlje 3.1.1.2.

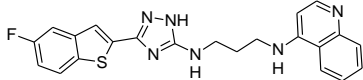
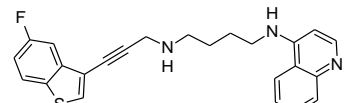
^{xxv} Razmatrano u poglavlju 3.1.1.2.

Tabela 5. Eksperimentalno izmerene pKa vrednosti tri benzotiofenska derivata aminohinolina

	Eksperimentalno izmerene vrednosti	
	pK _{a1}	pK _{a2}
91	7,78	9,16
92	6,93	8,44
93	7,44	9,05

Benzotiofenski derivati aminohinolina sa benzilaminoalkil-mostom pokazali su značajan pomak u inhibitorskim aktivnostima prema BoNT/A LC metaloproteazi. Kao naredni korak, ispitana je mogućnost zamene benzenovog prstena nekim drugim donatorom π -elektrona. U tu svrhu testirani su derivati **22** sa 1,2,4-triazolskom jedinicom i **23** sa trostrukom vezom u mostu (tabela 6).

Tabela 6. *In vitro* inhibitorne aktivnosti prema BoNT/A LC metaloproteazi benzotiofenskih derivata aminohinolina u kojima je benzenov prsten zamenjen 1,2,4-triazolom ili trostrukom vezom^a

Jedinjenje	% inhibicije BoNT/A LC (20 μ M)
<p>22</p> 	18
<p>23</p> 	29

^aRezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Prethodnom analizom benzotiofenskih derivata sa benzilaminoalkil-mostom izveden je zaključak da des-hlor aminohinolinski derivati pokazuju viši stepen inhibicije. Zbog toga su spomenuti derivati **22** i **23** dizajnirani tako da u strukturi ne

sadrže hlor. Iz tabele 6 se vidi da oba derivata ostvaruju izuzetno nizak procenat inhibitorne aktivnosti, bez obzira na povoljne interakcije koje su pretpostavljene molekulskim modelovanjem.^{xxvi} Na osnovu ovih rezultata se izvodi pretpostavka da je za ostvarivanje visoke aktivnosti benzotiofenskih derivata neophodan benzenov prsten, što u značajnoj meri potkrepljuje SAR analizu. Osim toga, ovi podaci ukazuju na to da rezultati dobijeni molekulskim modelovanjem ne smeju da igraju presudnu ulogu u odabiru jedinjenja za *in vitro* testiranja.

■ Steroidni derivati aminohinolina

Steroidni derivati aminohinolina koji su sintetisani u ovom radu međusobno se razlikuju po dužini i tipu mosta, po tome da li u strukturi sadrže tercijarnu amino-grupu i da li je na aminohinolinskom delu strukture prisutan hlor. Dodatno, ispitana je aktivnost jedinjenja koji u položajima C(7) i C(12) steroidnog jezgra ima hidroksilne-grupe i aktivnost jedinjenja koji u mostu poseduje amidnu funkcionalnu grupu. *In vitro* inhibitorna aktivnost je određena HPLC proteolitičkim esejom, kao i u slučaju benzotiofenskih derivata. Procenti inhibitorne aktivnosti iznose 37–85%, a IC₅₀ vrednosti su u opsegu 0,7-7,1 μM (tabela 7). Kao kontrolno jedinjenje korišćen je bis-aminohinolinski derivat **15 (DOJK09-D)**, koji je pokazao 90% inhibicije, što je u odličnoj saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatom^{xxvii}.¹⁰¹ Novi steroidni derivati aminohinolina, sa pojednostavljenom strukturom, ponašaju se kao izuzetno efikasni inhibitori BoNT/A LC *in vitro*, sa procentom inhibicije koji je uporediv sa prethodno najaktivnijim bis-aminohinolinskim derivatima.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 7 zaključuje se da je za ostvarivanje visokog stepena inhibicije povoljniji umereno dugački most (4 umesto 6 metilenskih grupa). Zamena hlora vodonikom u položaju C(7) hinolinskog jezgra povoljno se odražava na aktivnost u slučaju derivata koji imaju most normalnog niza, kao i kod onih kod kojih je metil-grupa u mostu bliža steroidnom delu molekula (**121** (80%) i **127** (75%) u poređenju sa **17 (JK141)** (66%) i **126** (54%)). Uvođenje metil-grupe u most ima pozitivan uticaj na aktivnost samo u slučaju 7-hloraminohinolinskog derivata i to kada se metil-grupa uvede u poziciju bližu hinolinskom delu strukture (**123** (77%) u

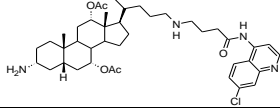
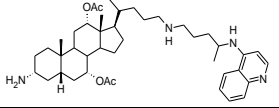
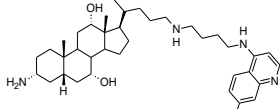
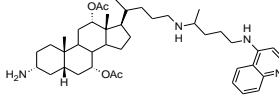
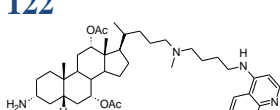
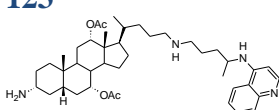
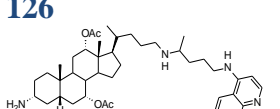
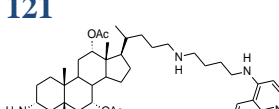
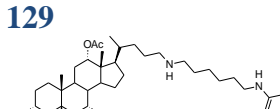
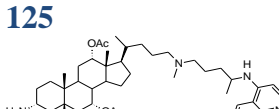
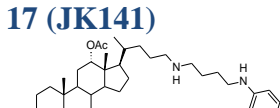
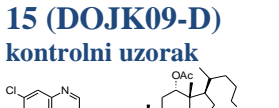
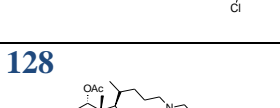
^{xxvi} Razmatrano u poglavlju 3.1.1.2.

^{xxvii} U prethodnom testu ovo jedinjenje je ostvarilo 95% inibicije BoNT/A LC pri koncentraciji od 20 μM.

odnosu na **17 (JK141)** (66%). Aktivnost opada u slučaju uvođenja metil-grupe bliže steroidnom delu (**126** (54%)), kao i u slučaju des-hlor derivata (**124** (71%) i **127** (75%) u odnosu na **121** (80%). Najviši procenat inhibicije i najnižu IC₅₀ vrednost pokazuje derivat **125**, sa metil-grupom iz mosta bližom hinolinskom delu strukture i tercijarnom amino-grupom (85% inhibicije pri koncentraciji 20 μM i IC₅₀ = 0,7 μM).

Jedinjenje **18 (JK227)** u ovom eseju pokazuje svega 48% inhibicije, što je značajno slabiji rezultat od gotovo svih steroidnih derivata, uključujući i njegov acetoksi-analog **17 (JK141)** (66% inhibicije). Za ovaj rezultat se može reći da je očekivan, imajući u vidu slabije uklapanje u aktivno mesto BoNT/A LC (manji broj interakcija i lošiji doking skor koji predviđa Schrödinger program za molekularno modelovanje, slike 43–45 i tabela 1). Jedinjenje **136** sa amidnom funkcionalnom grupom inhibira BoNT/A LC svega 37%, što drastično odskače od aktivnosti ostalih steroidnih derivata aminohinolina.

Tabela 7. Inhibitorne *in vitro* aktivnosti steroidnih derivata aminohinolina prema BoNT/A LC metaloproteazi^a

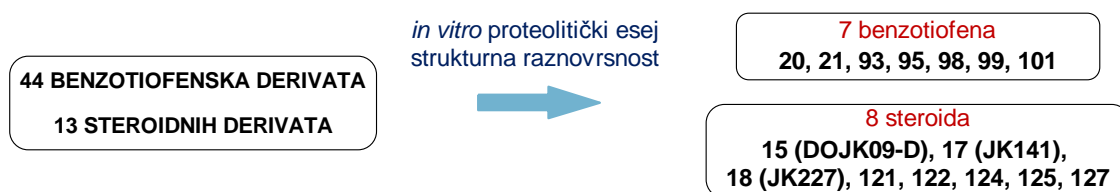
Jedinjenje	% inh BoNT/A LC (20 μM)	IC ₅₀ (μM)	Jedinjenje	% inh BoNT/A LC (20 μM)	IC ₅₀ (μM)
136 	37	-	124 	71	2,7
18 (JK227) 	48	-	127 	75	3,0
122 	52	1,5	123 	77	2,4
126 	54	-	121 	80	5,7
129 	64	7,1	125 	85	0,7
17 (JK141) 	66	4,5	15 (DOJK09-D) kontrolni uzorak 	90	12,4
128 	67	3,5			

^aRezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta.

3.3.2. Esej u motornim neuronima (preintoksikacioni model)

In vitro ispitivanje aktivnosti je važno za prvobitnu selekciju jedinjenja, ali ne daje pravu sliku o inhibiciji u citosolu neuronske ćelije. Zbog toga je kao naredni korak u ispitivanju aktivnosti novih inhibitora primenjen esej u motornim neuronima razvijenim iz embrionalnih matičnih ćelija miša (mES-MN). Ovim eksperimentom se, osim inhibitorne aktivnosti, ispituje i sposobnost prolaska jedinjenja kroz membranu neurona. Takođe, za razliku od *in vitro* proteolitičkog eseja, umesto kratkog niza BoNT/A upotrebljava se holotoksin. Step en inhibitorne aktivnosti izražava se kao procenat očuvanja SNAP-25. Kvantifikacija razloženog i nerazloženog (očuvanog) SNAP-25 vrši se Western blot analizom, korišćenjem anti-SNAP-25 antitela. Glicerladehid-3-fosfat-dehidrogenaza (GAPDH) je protein koji se nalazi u velikim količinama u skoro svim ćelijama, zbog čega se koristi kao kontrolni protein preko koga se vrši normalizacija rezultata. DMSO se koristi kao negativna, a DMSO sa toksinom kao pozitivna kontrola. Detaljan opis izvođenja eseja je dat u eksperimentalnom delu.^{127,128}

Na osnovu procenta inhibitorne aktivnosti, vrednosti IC₅₀ i strukturne raznovrsnosti, od 44 benzotiofenska i 13 steroidnih derivata aminohinolina (12 novosintetisanih i jedinjenje **15 (DOJK09-D)** koje je korišćeno kao kontrola), odabrano je ukupno 15 jedinjenja za testiranje u motornim neuronima (slika 55).



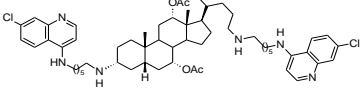
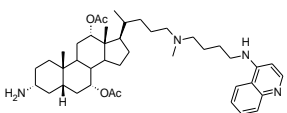
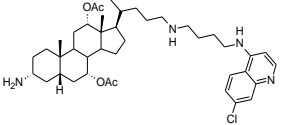
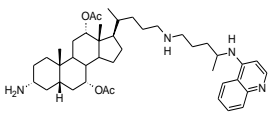
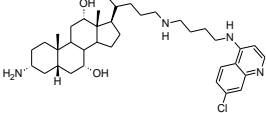
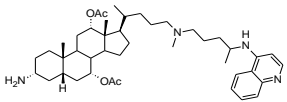
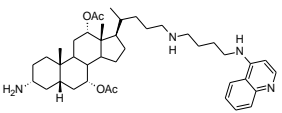
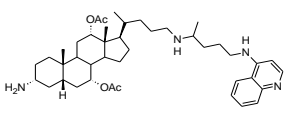
Slika 55. Benzotiofenski i steroidni derivati odabrani za esej u mES-MN

▣ mES-MN esej – jedinjenja pri koncentracijama 10 i 20 μ M dodata pre toksina

U ovom eksperimentu jedinjenja su, u dve različite koncentracije – 10 i 20 μ M, dodata 30 minuta pre holotoksina BoNT/A, primenjenog u koncentraciji od 500 pM. Posle termostatiranja tokom 4 h, određen je procenat očuvanog SNAP-25. Jedino je jedinjenje **18 (JK227)**, u nezavisnom eksperimentu, testirano pri koncentracijama 8 i 16 μ M.

Odabrani steroidni derivati, prikazani u tabeli 8, pokazuju izuzetno visok procenat očuvanja SNAP-25 pri koncentraciji 20 μ M, pri čemu jedinjenje **17 (JK141)** najefikasnije štiti SNAP-25 (88%). Pri nižoj koncentraciji (10 μ M), jedinjenje **127** omogućava očuvanje SNAP-25 čak 86%. Bis-steroidni derivat **15 (DOJK09-D)**, koji je korišćen radi direktnog poređenja sa mono-aminohinolinskim derivatima, pri obe koncentracije pokazao je izuzetnu aktivnost (70% očuvanog SNAP-25 na 10 μ M i 84% na 20 μ M). Jedinjenje **18 (JK227)**, uprkos nižoj aktivnosti u proteolitičkom esej u poređenju sa ostalim steroidnim derivatima, u preintoksikacionom modelu pokazalo je umerenu aktivnost (58% pri koncentraciji 16 μ M). Najaktivniji steroidni derivat **125** na osnovu *in vitro* eksperimenta (85% inhibicije BoNT/A LC), u mES-MN štiti SNAP-25 svega 41% pri koncentraciji 20 μ M, što se može pripisati otežanom prolasku kroz membranu neurona ili metaboličkoj nestabilnosti u ćelijskom okruženju. Ipak, izuzetno dobro slaganje ostalih rezultata sa onim dobijenim u *in vitro* proteolitičkom esej u, pružaju dobru osnovu za tvrdnju da steroidni derivati ispoljavaju inhibitornu aktivnost tako što vrše inhibiciju BoNT/A LC.

Tabela 8. Aktivnost steroidnih derivata aminohinolina u mES-MN eseju kada su jedinjenja primenjena pre toksina^a

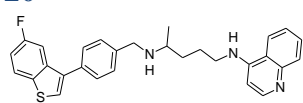
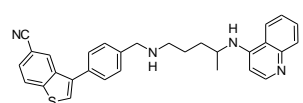
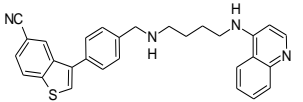
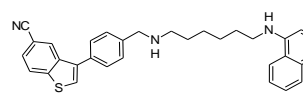
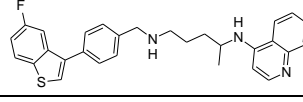
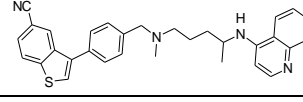
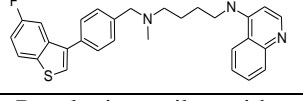
Jedinjenje	% očuvanog SNAP-25		Jedinjenje	% očuvanog SNAP-25	
	10 μ M	20 μ M		10 μ M	20 μ M
15 (DOJK09-D) 	70	84	122 	70	69
17 (JK141) 	72	88	124 	67	69
18 (JK227)^b 	46 ^b	58 ^b	125 	20	41
121 	28	67	127 	86	87

^aRezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta; SEM < 19%; % očuvanog SNAP-25 u pozitivnoj kontroli (DMSO+toksin) iznosi 17%; ^bTestirano pri koncentracijama 8 i 16 μ M.

Kod benzotiofenskih derivata, slika nije jednoznačna (tabela 9). Jedinjenja **99** i **21**, koja u *in vitro* testu pokazuju izuzetno visok procenat inhibicije (75% i 84%), u motornim neuronima pri koncentraciji 20 μ M štite SNAP-25 svega 43% i 27%. Ovaj rezultat (kao i u slučaju steroidnog derivata **125**) može da ukazuje na problem prolaska jedinjenja kroz ćelijsku membranu neurona. S druge strane, jedinjenje **101** koje se u *in vitro* testu pokazalo kao slabo aktivno (inhibicija 27%), u eksperimentu u motornim neuronima omogućava zaštitu SNAP-25 64% pri koncentraciji 20 μ M. Ovaj podatak je od izuzetnog značaja, jer pruža dodatne informacije o mehanizmu delovanja. Jedna od pretpostavki je da derivat **101** ne ispoljava svoju aktivnost inhibiranjem proteolitičke aktivnosti toksina, nego da delimično sprečava ulazak toksina u ćeliju, vezujući se za receptore na površini motornog neurona. Još jedna od mogućnosti je da učestvuje u

drugim procesima koji su odgovorni za ispoljavanje toksičnosti BoNT/A (npr. inhibicija nekog drugog enzima).

Tabela 9. Aktivnost benzotiofenskih derivata aminohinolina u mES-MN eseju kada su jedinjenja primenjena pre toksina^a

Jedinjenje	% očuvanog SNAP-25		Jedinjenje	% očuvanog SNAP-25	
	10 μ M	20 μ M		10 μ M	20 μ M
20 	58	68	98 	34	53
21 	22	27	99 	36	43
93 	62	62	101 	59	64
95 	44	55			

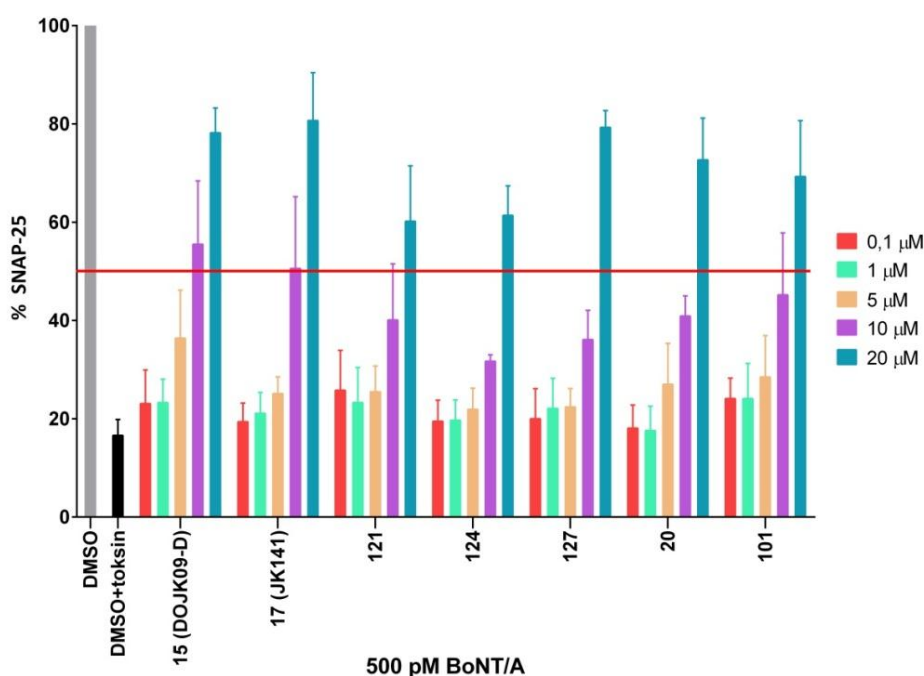
^aRezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta; SEM < 25%; % očuvanog SNAP-25 u pozitivnoj kontroli (DMSO+toksin) iznosi 17%.

■ mES-MN esej – jedinjenja u različitim koncentracijama dodata pre toksina

U nastavku istraživanja najaktivniji derivati su testirani u neuronima pri 5 različitim koncentracija (0,1, 1, 5, 10 i 20 μ M). Za ovaj eksperiment odabrano je 5 steroidnih (**15 (DOJK09-D)**, **17 (JK141)**, **121**, **124** i **127**) i 2 benzotiofenska derivata (**20** i **101**). Primenjeni su identični uslovi kao i u prethodnom eksperimentu. Rezultati su prikazani na grafiku 1.

Potvrđen je visok procenat aktivnosti, pri čemu se posebno izdvajaju steroidni derivati **15 (DOJK09-D)**, **17 (JK141)** i **127** i benzotiofenski derivati **20** i **101**. Na

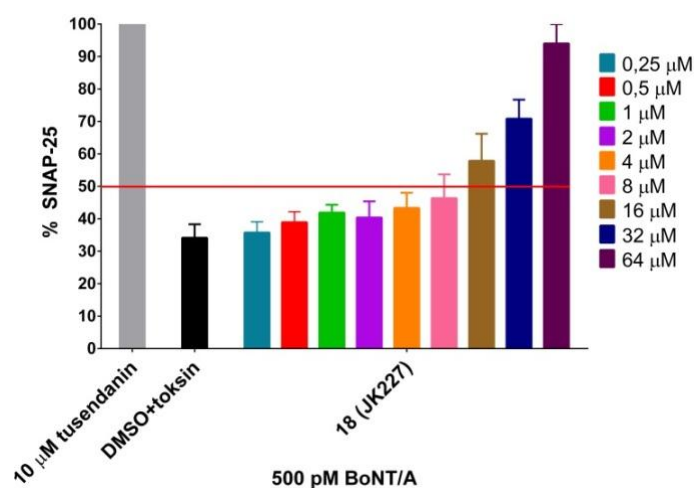
osnovu rezultata se može zaključiti da uvođenje hlora u C(7) položaj na aminohinolinskom jezgru u velikoj meri pozitivno utiče na aktivnost steroidnih derivata u motornim neuronima (IC_{50} (**17 (JK141)**) $\sim 10 \mu\text{M}$; IC_{50} (**121**) = $10\text{--}20 \mu\text{M}$). Jedinjenja **124** i **127** koja se razlikuju samo po položaju metil-grupe u mostu, takođe pokazuju različito ponašanje. Pri koncentraciji $20 \mu\text{M}$, jedinjenje **127** sa metil-grupom bližom N-C(24) mnogo efikasnije štiti SNAP-25 od proteolize, dok je pri nižim koncentracijama aktivnost ova dva jedinjenja podjednaka. Bis-aminohinolinski derivat **15 (DOJK09-D)** pokazuje izuzetnu aktivnost sa $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$. Oba benzotiofenska derivata **20** i **101** pokazuju IC_{50} vrednosti u opsegu $10\text{--}20 \mu\text{M}$. Uopšteno govoreći, pokazano je da jedinjenja ispoljavaju različitu aktivnost pri različitim koncentracijama (sa porastom koncentracije od $0,1$ ka $20 \mu\text{M}$, raste i procenat očuvanog SNAP-25), što ukazuje na mehanizam kompetitivne inhibicije.



Grafik 1. Zavisnost očuvanja SNAP-25 od koncentracije primenjenog jedinjenja ($0,1 \rightarrow 20 \mu\text{M}$) u mES-MN kada su jedinjenja dodata pre toksina (rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm SEM, vrednosti date u Prilogu, tabela P2)

Od novosintetisanih steroidnih derivata najviši stepen inhibicije pokazuje jedinjenje **17 (JK141)** (81% očuvanog SNAP-25 pri koncentraciji 20 μM). Imajući u vidu strukturu jedinjenja **17 (JK141)** i činjenicu da se u crevima i jetri miša nalazi veliki broj karboksiesteraza, za dihidroksi analog **18 (JK227)** može da se očekuje da je potencijalni metabolit u *in vivo* uslovima. Iz tog razloga, jedinjenje **18 (JK227)** je nezavisno testirano pri devet različitih koncentracija (0,25 do 64 μM , grafik 2). Kao i u slučaju jedinjenja **17 (JK141)**, pokazano je da procenat očuvanog SNAP-25 raste sa porastom koncentracije (dozno-zavisno). Jedinjenje vrši zaštitu SNAP-25 do 94% pri koncentraciji 64 μM , sa $\text{IC}_{50} = 8\text{--}16 \mu\text{M}$.

Činjenica da jedinjenje **17 (JK141)** i njegov pretpostavljeni metabolit **18 (JK227)** pokazuju izuzetnu aktivnost u motornim neuronima, predstavlja dobru osnovu za dalja ispitivanja biološke aktivnosti ovih jedinjenja.



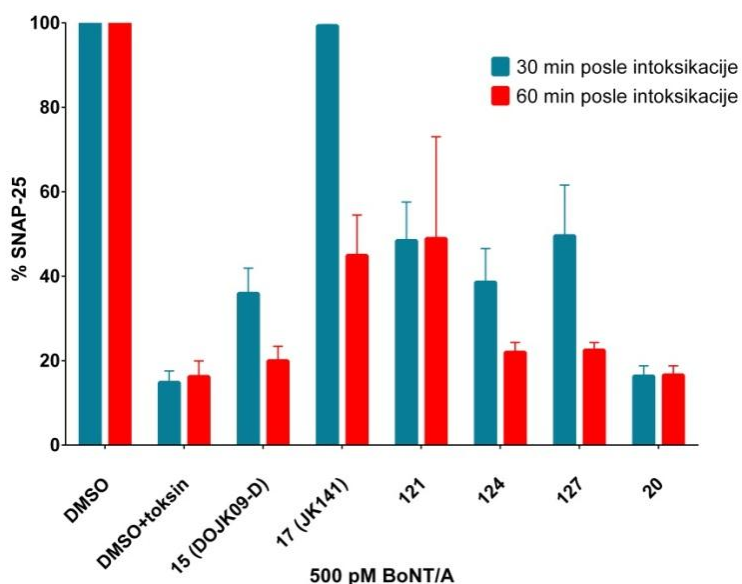
Grafik 2. Zavisnost očuvanja SNAP-25 od koncentracije jedinjenja **18 (JK227)** (0,25 \rightarrow 64 μM) u mES-MN kada se jedinjenje doda pre toksina (rezultati su prikazani kao srednja vrednost dva nezavisna eksperimenta \pm SEM, vrednosti date u Prilogu, tabela P3)

3.3.3. Esej u motornim neuronima (postintoksikacioni model)

Da bi neko jedinjenje moglo da ima primenu u terapijske, a ne u profilaktičke svrhe, potrebno je da se ispita njegova inhibitorna aktivnost kada se primeni nakon što toksin uđe u citosol neurona. Zbog toga je od posebnog značaja za dalji odabir potencijalnih inhibitora botulinum neurotoksina eksperiment koji se vrši tako što se jedinjenja u koncentraciji 20 μM dodaju u ćelijsku kulturu mES-MN 30 i 60 minuta posle holotoksina BoNT/A.

■ mES-MN esej – jedinjenja pri koncentraciji 20 μM dodata 30 i 60 minuta posle toksina

U ovom eksperimentu testirana je aktivnost 5 steroidnih (15 (DOJK09-D), 17 (JK141), 121, 124 i 127) i jednog benzotiofenskog derivata aminohinolina (20) pri koncentraciji 20 μM . Rezultati su prikazani na grafiku 3.



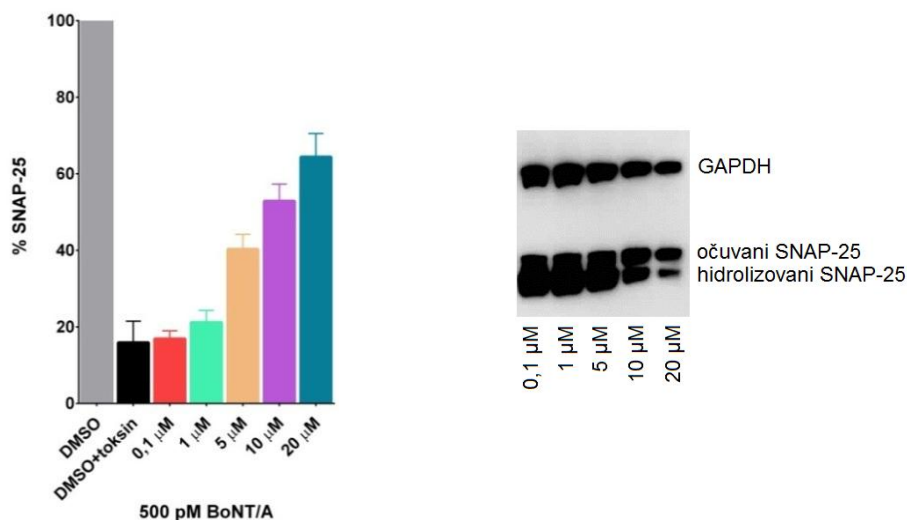
Grafik 3. Zaštita SNAP-25 u mES-MN kada se jedinjenja primene posle intoksikacije pri koncentraciji 20 μM (rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta +/- SEM, vrednosti date u Prilogu, tabela P4).

Benzotiofenski derivat **20** sa inhibitornom aktivnošću 16% posle 30 i 60 minuta, gotovo da uopšte ne vrši zaštitu SNAP-25 u mES-MN. Od svih testiranih derivata, jedini derivat koji efikasno štiti SNAP-25 kada se primeni 30 minuta posle intoksikacije je steroidni derivat **17 (JK141)** i to čak 99%. Kada se primeni 60 minuta posle intoksikacije, vrši zaštitu SNAP-25 45%. Posebno je interesantno poređenje rezultata bis-aminohinolinskog derivata **15 (DOJK09-D)** sa rezultatom dobijenim za **17 (JK141)**. Bez obzira na izuzetnu aktivnost u *in vitro* proteolitičkom eseju (inhibicija 90%), pa čak i u motornim neuronima u preintoksikacionom modelu ($IC_{50} < 10 \mu M$), aktivnost derivata **15 (DOJK09-D)** drastično opada kada se primeni posle intoksikacije. Jedinjenje **15 (DOJK09-D)** u ovom eksperimentu ostvaruje svega 36% zaštite SNAP-25 posle 30 minuta i 20% zaštite posle 60 minuta. Ovim eksperimentom je izvršeno direktno poređenje između bis- i mono-aminohinolinskih steroidnih derivata i opravdana ideja o pojednostavljivanju prvobitne strukture.

■ mES-MN esej – jedinjenje **17 (JK141)** pri pet različitih koncentracija dodato 30 minuta posle toksina

Kako bi se ispitala dozna zavisnost procenta zaštite SNAP-25 od primenjene koncentracije jedinjenja **17 (JK141)**, izvršen je eksperiment u motornim neuronima, pri koncentracijama 0,1; 1; 5; 10 i 20 μM . Eksperiment je izvršen u kvadruplikatu, a jedinjenje **17 (JK141)** je dodato 30 minuta posle toksina. Jedinjenje je pokazalo veoma dobru korelaciju između koncentracije i aktivnosti (grafik 4).

U ovom eksperimentu, jedinjenje **17 (JK141)** je ostvarilo nešto nižu efikasnost – 53% zaštite SNAP-25 pri 10 μM i 64% pri koncentraciji 20 μM . Ipak, detaljnim pregledom literature je ustanovljeno da je ovo prvi primer malih molekula inhibitora LC koji vrše zaštitu SNAP-25 u motornim neuronima razvijenim iz embrionalnih matičnih ćelija miša, kada se primene posle intoksikacije (postoje podaci za LC inhibitore koji se primenjuju posle intoksikacije, ali u spinalnim motornim neuronima embriona pileta).⁴⁷

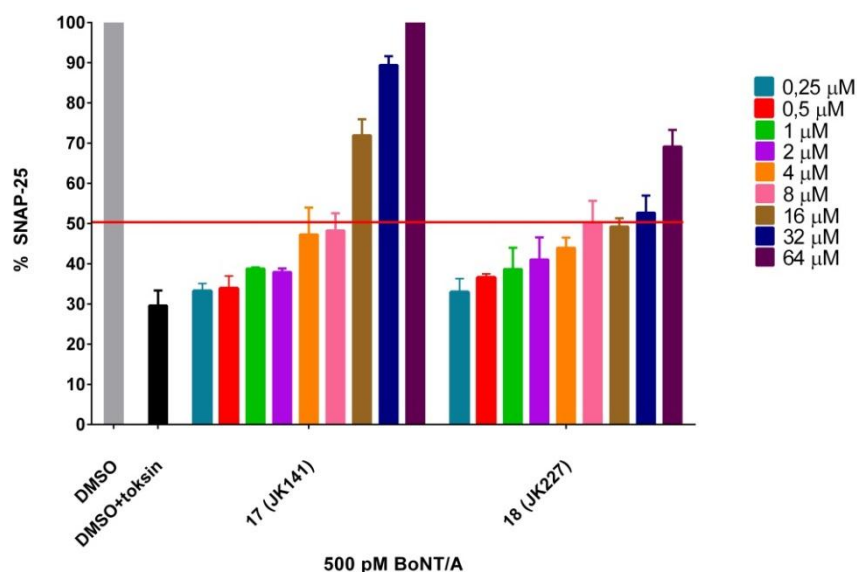


Grafik 4. Zaštita SNAP-25 u mES-MN kada se jedinjenje **17 (JK141)** primeni 30 minuta posle intoksikacije – *dose response* eksperiment u opsegu koncentracija 0,1 do 20 μM - (rezultati su prikazani kao srednja vrednost 4 nezavisna eksperimenta +/- SEM, vrednosti date u Prilogu, tabela P5). $\text{IC}_{50} = 5\text{--}10 \mu\text{M}$. Western blot prikaz je dat za jedan od četiri eksperimenta.

■ **mES-MN esej – jedinjenja 17 (JK141) i 18 (JK227) pri devet različitih koncentracija dodata 30 minuta posle toksina**

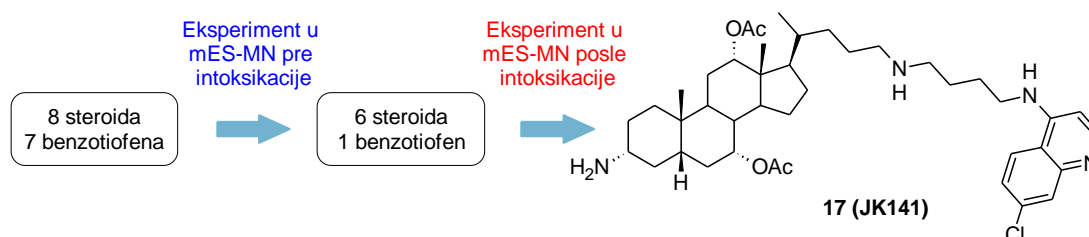
Prethodnim eksperimentima je pokazano da **17 (JK141)** ostvaruje izuzetno visok procenat inhibicije u mES-MN, čak i kada se primeni posle intoksikacije (Grafici 3 i 4). Sa ciljem daljeg ispitivanja jedinjenja **17 (JK141)** i njegovog potencijalnog metabolita **18 (JK227)**, izvršen je dodatni eksperiment u kome su jedinjenja pri devet različitih koncentracija (0,25 do 64 μM) dodata u ćelijsku kulturu 30 minuta posle toksina. Rezultati su prikazani na grafiku 5. U ovom eksperimentu, jedinjenje **17 (JK141)** je pokazalo dobru korelaciju između inhibicije i primenjene koncentracije, sa $\text{IC}_{50} \sim 8 \mu\text{M}$. Aktivnost jedinjenja **18 (JK227)** u ovom, kao i u preintoksikacionom modelu ukazuje na značaj primene ćelijskog esej za ispitivanje novih inhibitora (imajući u vidu nizak stepen inhibicije koji jedinjenje **18 (JK227)** ostvaruje u *in vitro* esej, 48%). Ovim eksperimentom je dobijena dodatna potvrda izuzetne aktivnosti

jedinjenja **17 (JK141)** i njegovog potencijalnog metabolita **18 (JK227)**, što jedinjenje **17 (JK141)** čini dobrim kandidatom za primenu u profilaktičke i terapijske svrhe.



Grafik 5. Zaštita SNAP-25 u mES-MN kada se jedinjenja **17 (JK141)** i **18 (JK227)** primene 30 minuta posle intoksikacije – *dose response* eksperiment u opsegu koncentracija 0,25 do 64 μM – (rezultati su prikazani kao srednja vrednost 2 nezavisna eksperimenta +/- SEM, vrednosti date u Prilogu, tabela P6). **17 (JK141)** pokazuje potencijalnu toksičnost pri koncentraciji 64 μM, usled slabije vidljive Western blot trake za GAPDH (Prilog).

Serijom eksperimenata koji uključuju *in vitro* određivanje proteolitičke aktivnosti BoNT/A LC i zaštitu SNAP-25 u motornim neuronima, od 44 benzotiofenska i 13 steroidnih derivata, izbor inhibitora pogodnih za dalja istraživanja sveden je na jedinjenje **17 (JK141)** (slika 56).



Slika 56. Prikaz sužavanja izbora inhibitora tokom eksperimenata u mES-MN

3.4. Metabolička i farmakokinetička analiza jedinjenja 17 (JK141)

U nastavku naših istraživanja izvršena je detaljna metabolička i farmakokinetička analiza jedinjenja **17 (JK141)**. Ispitane su ADMET osobine i vezivanje za proteine plazme. Osim toga, sistematično je ispitano ponašanje jedinjenja u *in vivo* uslovima (model miša), pri različitim načinima administracije (oralno, intraperitonealno i supkutano) i u različitim dozama (2,5–600 mg/kg).

3.4.1. ADMET osobine

U ranim fazama razvoja nekog leka, važno je da se analiziraju različite fizičko-hemijske osobine. Lipofilnost ($\log D$) ima veliki uticaj na permeabilnost jedinjenja kroz različite membrane u biološkom sistemu. Ispitivanje lipofilnosti jedinjenja **17 (JK141)** izvršeno je reverzno-faznom tankoslojnom hromatografijom ($\text{pH} = 1$) i *shake-flask* metodom ($\text{pH} = 7,3$). Obema metodama je pokazano da jedinjenje **17 (JK141)** ima umerenu lipofilnost koja iznosi 2,55 ($\text{pH} = 1$) i 2,07 ($\text{pH} = 7,3$), i smatra se optimalnom za oralnu apsorpciju, metaboličku stabilnost i prolazak kroz krvno-moždanu barijeru.¹²⁹ Metodom reverzno-fazne tankoslojne hromatografije određena je i lipofilnost jedinjenja **18 (JK227)**^{xxviii}, i iznosila je 2,97 ($\text{pH} = 1$).

Optimalna vrednost $\log D$ predstavljala je dobru osnovu za *in vitro* metaboličku analizu jedinjenja **17 (JK141)**. Ovo jedinjenje je podvrgnuto ispitivanju rastvorljivosti, stabilnosti u mikrozomima i plazmi, permeabilnosti kroz membrane, kao i određivanju inhibicije CYP enzima i stepena vezivanja za proteine plazme.¹³⁰

- Određivanje stabilnosti jedinjenja u plazmi je značajno zbog toga što jedinjenja koja se brzo razlažu u plazmi uglavnom pokazuju lošu *in vivo* aktivnost. S druge strane, jetra je najvažnije mesto odigravanja metabolizma nekog leka, pa mikrozomalna suspenzija može da se iskoristi za *in vitro* određivanje klirensa, odnosno brzine razgradnje jedinjenja (*intrinsic clearance*).

- Citohrom P450 je grupa enzima koji igraju važnu ulogu u metabolizmu potencijalnog leka. Hidroksilacija je jedna od najčešćih strukturnih modifikacija do koje dolazi dejstvom ovih enzima. S druge strane, ukoliko lek u velikoj meri vrši inhibiciju

^{xxviii} Pretpostavljeni metabolit jedinjenja **17 (JK141)**.

ovih enzima, u slučajevima kada se vrši administracija više lekova može doći do najrazličitijih sporednih reakcija, što u velikoj meri može da doprinese toksičnosti. Zbog toga je određivanje stepena inhibicije CYP450 enzima izuzetno važno.

- P-glikoprotein (P-gp) je jedan od najvažnijih transportera u mnogim tkivima i organima, poput mozga, bubrega i creva. MDR1-MDCK esej permeabilnosti^{xxix} služi za identifikaciju supstrata ovog proteina, odnosno, koliko će efikasno da se vrši transport jedinjenja kroz membrane.

- Na kraju, jačina i stepen kojim će se potencijalni lek vezivati za proteine plazme, u velikoj meri određuje distribuciju jedinjenja do željenih tkiva i organa. Postoje različiti načini da se odredi procenat vezivanja za proteine plazme. Najčešći metod je dijaliza, zato što je u poređenju sa ultrafiltracijom, nespecifično vezivanje svedeno na minimum.

Rezultati su prikazani u tabeli 10. Rastvorljivost jedinjenja je, osim metodom laserske nefelometrije, potvrđena i preciznijom *shake-flask* metodom sa spektrofotometrijskom detekcijom. Dobijen je podatak od 640 µg/mL, što ukazuje na jako dobru rastvorljivost u poređenju sa optimalnom vrednošću. Jedinjenje pokazuje i odličnu stabilnost u plazmi, imajući u vidu da je posle 1 h termostiranja količina preostalog jedinjenja >85%. Pokazuje izuzetnu stabilnost u humanoj i mišjoj mikrozomalnoj suspenziji jetre, sa vremenom poluživota >60 minuta i klirensom <23 µL/min/mg. U MDR1-MDCK esej pokazuje dobru permeabilnost ($45,3 \times 10^{-6}$ cm/s u A→B smeru i $24,6 \times 10^{-6}$ cm/s u B→A smeru, gde je A apikalna, a B bazolateralna površina ćelijskog monosloja). Vrednosti IC₅₀ za inhibiciju enzima CYP3A4/BQ, CYP3A4/DBF, CYP3A4/BFC i CYP2C19/CEC su nešto lošije i kreću se od 1–10 µM, dok je za CYP2D6/AMMC vrednost IC₅₀ > 10 µM. Jedini parametar koji potencijalno eliminiše jedinjenje **17 (JK141)** iz daljih istraživanja u ovoj oblasti je izuzetno visok procenat vezivanja za proteine plazme (>99%, na osnovu metode dijalize). Ipak, mnogi lekovi koji su u intenzivnoj upotrebi takođe pokazuju visok procenat vezivanja za proteine plazme.¹³¹

^{xxix} MDR1-MDCK ćelije su nastale transfekcijom MDCK ćelija (Madin Darby canine kidney) MDR1 genom, koji kodira P-glikoprotein.

Tabela 10. *In vitro* metabolička analiza **17 (JK141)**

ADMET osobine		Optimalne vrednosti
Rastvorljivost na pH 7.4 ^a (µg/mL)	>50	>50
Stabilnost u mikrozmomima ^b	T _{1/2} (min)	>30
	CL _{int} (µL/min/mg)	<23
Stabilnost u plazmi ^c (%)	>85	>85
CYP450 inhibicija IC ₅₀ ^d (µM)	1-10	>10
	P _{app} (A-B, 10 ⁻⁶ cm/s)	45,3
MDR1-MDCK ^e	P _{app} (B-A, 10 ⁻⁶ cm/s)	24,6
	P _{gp} Efflux Ratio	0,54
Vezivanje za proteine plazme ^f (%)	>99	/

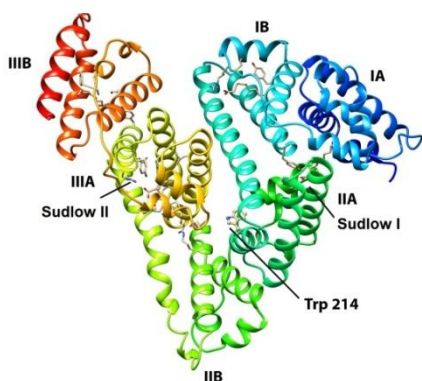
^aRastvorljivost ($n=3$) je određena laserskom nefelometrijom. ^bJedinjenje je termostatirano sa humanim i mišjim mikrozmomima jetre 1 h na 37 °C. ^cStabilnost u plazmi je određena nakon termostatiranja 1 h na 37°C. ^dIC₅₀ vrednosti su dobijene merenjem fluorescencije nakon inkubacije sa CYP450 enzimom i odgovarajućim supstratom na 37 °C. IC₅₀ vrednosti su iznosile: CYP3A4/BQ (1,1 µM), CYP3A4/DBF (1,2 µM), CYP3A4/BFC (1,4 µM), CYP2C19/CEC (5 µM) i CYP2D6/AMMC (>10 µM). ^eKonstanta permeabilnosti (P_{app}) je određena nakon inkubacije jedinjenja na apikalnoj i bazolateralnoj površini ćelijskog monosloja tokom 1 h na 37 °C. Efflux Ratio (transmembranska ravnotežna konstanta) je količnik P_{app} konstante u B→A i A→B smeru. ^fOdređeno metodom dijalize.

3.4.2. *In vitro* proučavanje vezivanja **17 (JK141)** za proteine plazme

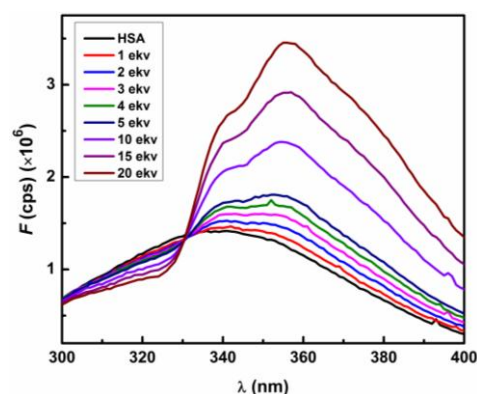
Podatak o procentu vezivanja **17 (JK141)** za proteine plazme dobijen metodom dijalize, naveo nas je na detaljnije proučavanje interakcija koje ovo jedinjenje ostvaruje sa dva najzastupljenija proteina u plazmi, a to su humani serum albumin (HSA) i kiseli α-1 glikoprotein (eng. AGP, *α-1 acid glycoprotein*). Naš naredni cilj je bio detaljno ispitivanje jačine i stepena vezivanja jedinjenja **17 (JK141)** za HSA i AGP, kao i ispitivanje uticaja vezivanja jedinjenja **17 (JK141)** na promenu sekundarne strukture HSA.

3.4.2.1. Spektrofluorimetrijsko određivanje konstante vezivanja 17 (JK141) za HSA i AGP

HSA je protein koji čini više od 50% ukupnih proteina plazme (slika 57). Specifično vezivanje 17 (JK141) za HSA je praćeno promenom fluorescencije ovog proteina po dodatku jedinjenja 17 (JK141) (1–20 ekvivalenata). Sa slike 58 se uočava da sa porastom koncentracije 17 (JK141) raste fluorescencija slobodnog jedinjenja (oblast >330 nm), dok fluorescencija HSA neznatno opada (oblast <330 nm), što ukazuje da u maloj meri dolazi do formiranja kompleksa HSA-17(JK141). HSA poseduje dva glavna mesta vezivanja - Sudlow mesta I i II (slika 56), koja imaju afinitet prema negativno naelektrisanim ligandima.¹³² Eksperimentalno određene kiselinske konstante ($pK_{a1} = 7,09 \pm 0,12$; $pK_{a2} = 9,18 \pm 0,06$ i $pK_{a3} = 10,48 \pm 0,27$) ukazuju da je jedinjenje 17 (JK141) pozitivno naelektrisano (+2/+3) na pH 7,4 (dijagram raspodele dat je u Prilogu). Stoga, za očekivati je da će se slabo vezivati za ova dva mesta.

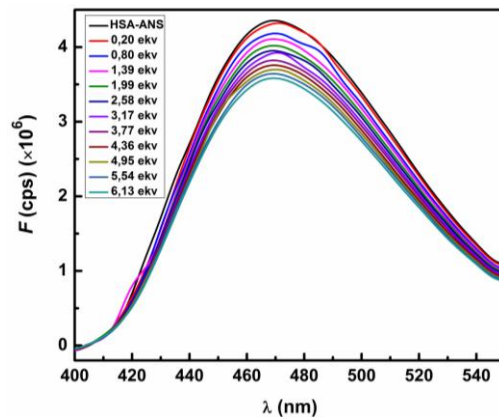


Slika 57. Kristalna struktura HSA (PDB ID 1BJ5) sa naznačenim Sudlow I i II mestima. Slika je generisana korišćenjem programa Chimera.¹³³



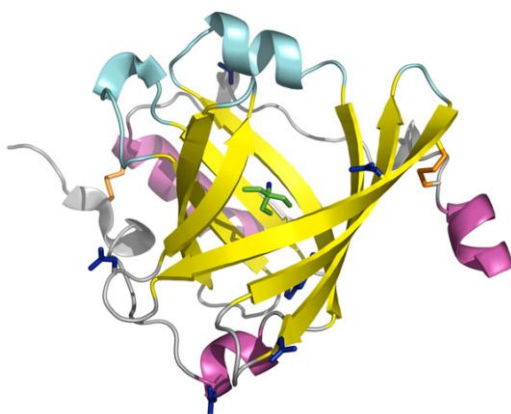
Slika 58. Promene u fluorescentnom spektru HSA ($c = 5 \times 10^{-7}$ M) po dodatku 17 (JK141) u PBS, pH 7,36, $c_{tot} = 30$ mM, $t = 25,0 \pm 0,1$ °C.

Za ispitivanje nespecifičnih interakcija između HSA i liganda, često se koristi eksperiment izmene sa ANS (8-anilinaftalen-1-sulfonska kiselina). U ovom eksperimentu, za HSA je prvo vezan ANS, a zatim je dodavan 17 (JK141) (0,20–6,13 ekvivalenata). Sa slike 59 se uočava intenzitet fluorescencije kompleksa HSA-ANS opada po dodatku 17 (JK141), što ukazuje da 17 (JK141) istiskuje ANS sa hidrofobnih mesta na površini HSA.

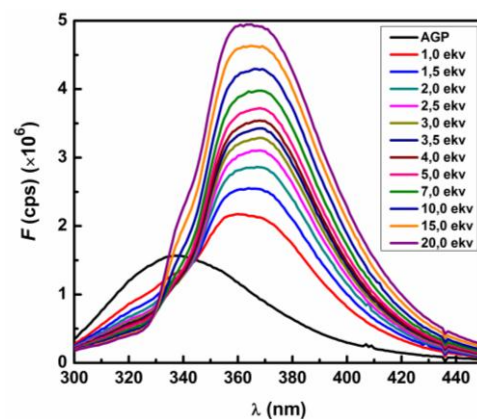


Slika 59. Promene u fluorescentnom spektru kompleksa HSA-ANS ($c = 5 \times 10^{-7}$ M, molski odnos HSA/ANS 1:1) po dodatku **17 (JK141)** u fosfatnom puferu pH 7,36, $c_{\text{tot}} = 30$ mM, $t = 25,0 \pm 0,1$ °C

AGP je drugi po zastupljenosti protein u ukupnim proteinima plazme (slika 60). Na slici 61 je prikazan fluorescentni spekatar AGP po dodatku **17 (JK141)** (1–20 ekvivalenata). Intenzitet fluorescencije AGP opada po dodatku **17 (JK141)** (u opsegu talasnih dužina 300-330 nm), dok intenzitet fluorescencije slobodnog **17 (JK141)** raste (u opsegu talasnih dužina 330-450 nm). Gašenje fluorescencije AGP pomoću **17 (JK141)** ukazuje na građenje kompleksa AGP-**17(JK141)**.



Slika 60. Kristalna struktura humanog AGP sa vezanim molekulom Tris (označen zelenom bojom) pri rezoluciji 1,8 Å.¹³⁴



Slika 61. Promene u fluorescentnom spektru AGP ($c = 5 \times 10^{-7}$ M) po dodatku **17 (JK141)** u PBS, pH 7,34, $c_{\text{tot}} = 30$ mM, $t = 25,0 \pm 0,1$ °C.

Na osnovu ovih eksperimenata određene su i Stern-Volmer-ove konstante vezivanja¹³⁵ **17 (JK141)** za HSA i AGP. Poređenjem dobijenih vrednosti, uočava se da se **17 (JK141)** oko 10 puta jače vezuje za AGP nego za HSA.

$$K_{sv} = (4,56 \pm 0,27) \times 10^4 \text{ za HSA}$$

$$K_{sv} = (6,99 \pm 0,25) \times 10^5 \text{ za AGP}$$

Vrednosti konstanti vezivanja koje su dobijene u ovom eksperimentu su od izuzetne važnosti. One ukazuju na to da je interakcija između proteina plazme i **17 (JK141)** optimalna da obezbedi transport leka i da ga oslobodi na mestu gde treba da deluje ($K_{sv} = 10^4 - 10^6$). Ova pretpostavka potkrepljena je detaljnim revijama o interakcijama između leka i ova dva proteina.^{136,137}

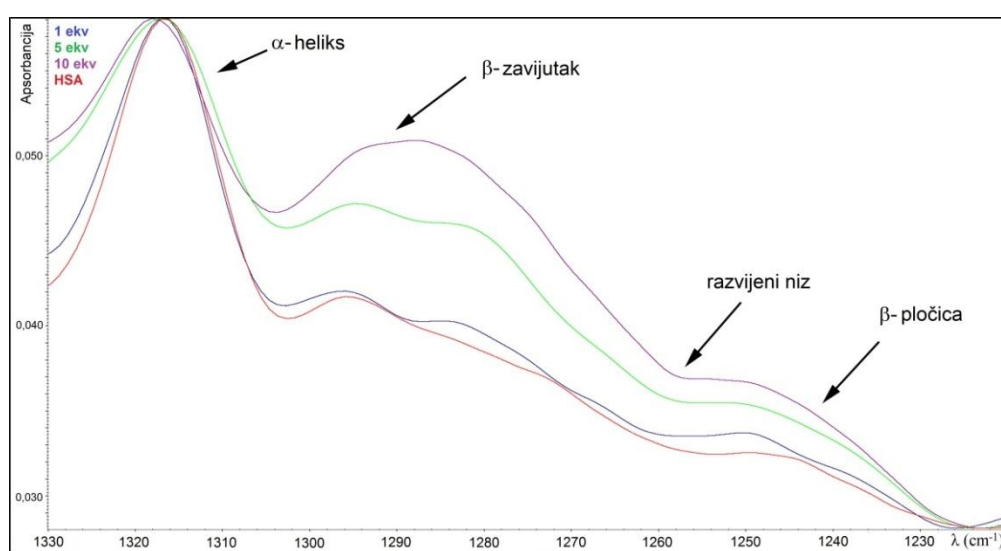
3.4.2.2. Hromatografsko određivanje procenta vezivanja 17 (JK141) za HSA i AGP

Procenat vezivanja **17 (JK141)** za HSA i AGP određen je i hromatografskom metodom, korišćenjem stacionarnih faza koje imaju hemijski vezane ove proteine. Jedinjenje je naneto na kolonu, a zatim hromatogram praćen pomoću UV detektora. U oba slučaja, jedini signal koji je detektovan je signal koji potiče od dimetil-sulfoksida (Prilog), što ukazuje na izuzetno visok procenat vezivanja jedinjenja **17 (JK141)** za HSA i za AGP. Vezivanje za HSA je procenjeno na 99,1%, dok je procenat vezivanja **17 (JK141)** za AGP nemerljivo visok.

3.4.2.3. Proučavanje uticaja vezivanja jedinjenja 17 (JK141) na promenu sekundarne strukture HSA pomoću FTIR

Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom je metoda koja se intenzivno koristi za ispitivanje interakcija između malih molekula i proteina. Amidna traka III (1230–1410 cm^{-1}) je odabrana za proučavanje interakcija jedinjenja **17 (JK141)** sa HSA zato što, za razliku od amidne trake I, kod nje ne dolazi do interferencije sa karbonilnim grupama iz molekula. Amidna traka III potiče najvećim delom od C-N valencione vibracije koja se kupluje sa N-H deformacionim vibracijama. Na slici 62

prikazane su amidne trake III za različite odnose HSA:**17(JK141)** i označeni su regioni sekundarnih struktura. Spektar HSA je označen crvenom bojom. U slučaju odnosa 1:1 (plava boja), ne dolazi ni do kakve promene u sekundarnoj strukturi proteina. U slučaju 5 i 10 ekvivalenata **17 (JK141)** u odnosu na HSA (ljubičasta i zelena boja) u najvećoj meri raste procenat β -zavijutaka, dok najzastupljeniji oblik sekundarne strukture (α -heliks) ostaje nepromenjen. Ovaj podatak je izuzetno važan, jer govori o tome da jedinjenje **17 (JK141)** ne menja u velikoj meri sekundarnu strukturu proteina HSA, a samim tim ne remeti njegovu funkciju u organizmu.



Slika 62. Promena amidnog III regiona HSA po dodatku **17 (JK141)**, sa označenim regionima sekundarnih struktura

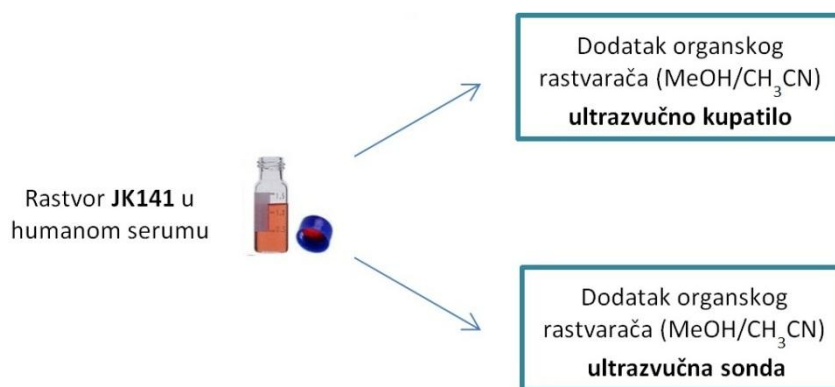
3.4.3. *In vivo* farmakokinetička analiza

Bez obzira na visok procenat vezivanja za proteine plazme, ostale ADMET karakteristike jedinjenja **17 (JK141)** su se pokazale kao izuzetno dobre. Zbog toga je izvršena detaljna farmakokinetička analiza u *in vivo* uslovima. Određena je maksimalna koncentracija jedinjenja u serumu posle oralne i supkutane administracije. Serum je analiziran i na prisustvo najčešćih metabolita. Uzorci krvi su vađeni iz srca miša u različitim vremenskim intervalima. Posle centrifugiranja, serumi su odvojeni i čuvani na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do trenutka analize. Koncentracija jedinjenja je izmerena pomoću

UPLC-MS/MS instrumenta. Kalibracione prave su konstruisane pravljenjem standardnih rastvora u humanom serumu.

3.4.3.1. Validnost metoda za određivanje ukupne i slobodne koncentracije 17 (JK141)

Ukupna koncentracija jedinjenja u serumu predstavlja zbirnu koncentraciju slobodnog jedinjenja i jedinjenja koje je vezano za proteine plazme. Ukupna koncentracija se određuje tako što se prvo izvrši denaturacija proteina, kako bi došlo do oslobađanja jedinjenja iz kompleksa sa proteinom, jer jedino slobodno jedinjenje može da se detektuje pomoću UPLC-MS/MS. Poznato je da proteini mogu da se denurišu na različite načine (dodatkom organskog rastvarača, amonijum-sulfata, promenom temperature ili pH). Dodatak organskog rastvarača, poput acetonitrila ili metanola, se uobičajeno koristi u slučajevima rada sa serumom. U slučaju jedinjenja **17 (JK141)**, dodatni razlog za odabir ovih denaturišućih agenasa je dobra rastvorljivost jedinjenja u organskim rastvaračima. Ispitan je uticaj dva rastvarača, acetonitrila i metanola, uz korišćenje ultrazvučnog kupatila i ultrazvučne sonde (slika 63).



Slika 63. Optimizacija uslova za određivanje ukupne koncentracije 17 (JK141)

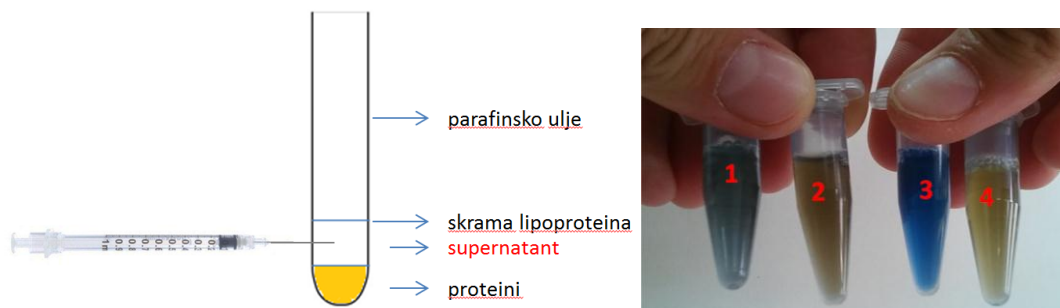
Rezultati efikasnosti procesa denaturacije/ekstrakcije praćeni su pomoću UPLC-MS/MS, merenjem površine ispod signala koji odgovara jedinjenju. U rastvor jedinjenja **17 (JK141)** u humanom serumu koncentracije 100 µg/mL, dodato je dve zapremine organskog rastvarača, a zatim tako dobijeni rastvor ostavljen u ultrazvučnom

kupatilu tokom 30 minuta. Posle centrifugiranja (10 minuta, 13 400 rpm), odvojeni supernatant je injektovan. U drugom slučaju umesto ultrazvučnog kupatila korišćena je ultrazvučna sonda (jačina 7, 15 minuta). Iz tabele 11 se može videti da su najbolji rezultati dobijeni korišćenjem acetonitrila i ultrazvučnog kupatila.

Tabela 11. Ispitivanje uslova za određivanje ukupne koncentracije **17 (JK141)**

Metod	Površina ispod signala
CH ₃ CN + ultrazvučno kupatilo (30 min)	571886
MeOH + ultrazvučna sonda (15 min)	275364
CH ₃ CN + ultrazvučna sonda (15 min)	365672

Koncentracija slobodnog (nevezanog) jedinjenja se određuje nakon što se iz uzorka uklone proteini (oni za koje je vezano jedinjenje i oni za koje nije). Pri tome je potrebno da se vodi računa da ne dođe do njihove denaturacije, što bi dovelo do (delimičnog) oslobađanja jedinjenja iz kompleksa sa proteinima. Denaturaciju proteina može da izvrši i sama mobilna faza na hromatografskoj koloni (acetonitril, 0,2% mravlja kiselina), zbog čega je neophodno da uzorak koji se injektuje bude u što većoj meri oslobođen od proteina. Za odvajanje proteina iz rastvora koriste se različite tehnike, poput ultrafiltracije, dijalize i ultracentrifugiranja. Mana dijalize je što ne može da se primeni na male zapremine uzorka, a mana ultrafiltracije je mogućnost vezivanja za membranu ne samo proteina, nego i malog molekula. Zbog navedenih razloga, za određivanje koncentracije slobodnog **17 (JK141)** korišćena je metoda ultracentrifugiranja (Beckman Coulter, rotor SW55 Ti). Prvobitno je izvršena optimizacija uslova centrifugiranja pod kojima će u supernatantu zaostati minimalna količina proteina. U tu svrhu je korišćen humani serum, kao matriks koji je napribližniji mišjem serumu. Posle centrifugiranja uziman je alikvot, a količina zaostalih proteina praćena dodatkom Bradford-ovog reagensa (slika 64, desno). Prilikom centrifugiranja humanog seruma uočeno je stvaranje nekoliko slojeva u kiveti. U donjem, žuto obojenom sloju nalazi se većina istaloženih proteina. U srednjem sloju ne bi trebalo da ima proteina, dok se na vrhu nalazi bela skrama lipoproteina. Do vrha kivete je pre samog centrifugiranja naliven sloj parafinskog ulja, kako bi se sprečilo ulubljanje kivete (slika 64, levo).



Slika 64. Levo: uzimanje uzorka supernatanta; desno: optimizacija uslova ultracentrifugiranja dodatkom Bradford-ovog reagensa (1 – prisutni proteini, 2 – proteini u tragovima, 3 – pozitivna proba na prisustvo proteina, 4 – negativna proba na prisustvo proteina)

Optimizovani uslovi (24 h, 25 000 rpm, 4 °C) dodatno su provereni određivanjem koncentracije zaostalih proteina bicinhoninskom metodom. Ovom metodom meri se apsorbancija na 540 nm, koja potiče od kompleksa bicinhoninske kiseline i Cu^{1+} (koji nastaje u reakciji proteina i Cu^{2+} u baznoj sredini). Koncentracija proteina je određena iz kalibracione prave dobijene merenjem apsorbancije serije standardnih rastvora BSA (goveđeg seruma albumina). U tabeli 12 prikazani su rezultati dobijeni prilikom određivanja koncentracije proteina u početnom humanom serumu i posle centrifugiranja pod optimizovanim uslovima. Na ovaj način je izračunato da je pod optimizovanim uslovima u supernatantu zaostalo svega 1,04% proteina.

Tabela 12. Određivanje koncentracije zaostalih proteina

Uzorak	Izmerena apsorbancija na 540 nm	Izračunata koncentracija (mg/mL)		Koncentracija proteina u početnom serumu (mg/mL)
Serum razblažen 50 puta	0,816	1,61	80,6	
Uzorak posle centrifugiranja	0,424	0,84	1,04	% zaostalih proteina

3.4.3.2. Oralna administracija jedinjenja

U prethodnim *in vitro* eksperimentima izmeren je visok procenat vezivanja jedinjenja **17 (JK141)** za proteine plazme (>99%). Zbog toga je odlučeno da se u *in vivo* uslovima pri oralnoj adiministraciji primeni visoka doza (400 i 600 mg/kg), u pokušaju da se zasite sva vezivna mesta na proteinima plazme kako bi ostalo dovoljno slobodnog jedinjenja koje bi moglo da stigne do željene mete. Prvobitno je testirana toksičnost jedinjenja **17 (JK141)** tako što su grupe od po 5 zdravih miševa primile jedinjenje u dozi 400 i 600 mg/kg. Sa obe doze svi miševi su bili živi 30 dana, odnosno do kraja eksperimenta, bez vidljivih znakova toksičnosti.

Farmakokinetička analiza je izvršena korišćenjem 7 miševa u slučaju doze 400 mg/kg i 6 miševa u slučaju doze 600 mg/kg. Jedinjenje **17 (JK141)** je administrirano oralno u obliku rastvora pomoću gavažne sonde. Krv je vađena iz srca u intervalu 15–120 minuta, a miševi su prethodno anestetizirani pomoću hloroforma. Uzorci seruma su analizirani na prisustvo jedinjenja **17 (JK141)** i potencijalnih metabolita korišćenjem UPLC-MS/MS. Pre analize su svi uzorci tretirani dvema zapreminama acetonitrila, kako bi bili oslobođeni od proteina.^{xxx} U tabeli 13 su prikazani rezultati ukupne koncentracije jedinjenja **17 (JK141)** u serumu, posle primene oralne doze od 400 i 600 mg/kg. Primećuje se da je u slučaju obe primenjene doze koncentracija jedinjenja **17 (JK141)** u serumu niska, što govori o lošoj bioraspodivnosti. U slučaju doze od 400 mg/kg, maksimalna koncentracija iznosi 5,5 µg/mL (7,8 µM) posle 22 minuta od trenutka administracije, dok u slučaju doze od 600 mg/kg jedinjenje dostiže maksimalnu koncentraciju 8,5 µg/mL (11,9 µM) posle 15 minuta.

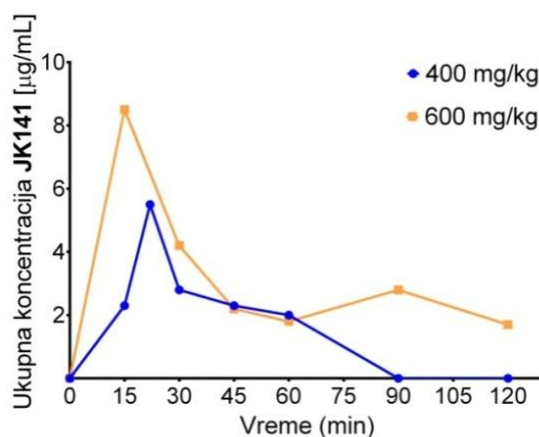
^{xxx} Detaljan opis izvođenja farmakokinetičke analize dat je u poglavlju Eksperimentalni deo, a odgovarajući hromatogrami nalaze se u Prilogu.

Tabela 13. Ukupna koncentracija **17 (JK141)** u serumu miševa posle oralne doze od 400 i 600 mg/kg^a

Vreme (min)	Doza 400 mg/kg	Doza 600 mg/kg
	Koncentracija µg/mL (µM)	Koncentracija µg/mL (µM)
15	2,3 (3,3)	8,5 (11,9)
22	5,5 (7,8)	- ^b
30	2,8 (4,0)	4,2 (5,9)
45	2,3 (3,3)	2,2 (3,1)
60	2,0 (2,8)	<LOQ ^c
90	<LOD	2,8 (4,0)
120	<LOD	<LOQ ^d

^aKoncentracija [µg/mL] je određena pomoću UPLC-MS/MS. Koncentracija u µM je data u zagradama. Rezultati predstavljaju vrednost dobijenu za jednog miša za svaku vremensku tačku. LOD = limit detekcije; LOQ = Limit kvantifikacije. ^bUzorak nije uzet u ovoj vremenskoj tački. ^cKoncentracija je procenjena na 1,8 µg/mL (2,5 µM)<LOQ. ^dKoncentracija je procenjena na 1,7 µg/mL (2,4 µM)<LOQ

Na grafiku 6 je prikazana promena ukupne koncentracije **17 (JK141)** u serumu miša u zavisnosti od vremena.



Grafik 6. Ukupna koncentracija **17 (JK141)** u serumu u prva dva sata od administracije

Bez obzira na nisku ukupnu koncentraciju jedinjenja, uzorci seruma su podvrgnuti određivanju slobodne koncentracije metodom ultracentrifugiranja, pod optimizovanim uslovima (Beckman Coulter, rotor SW55 Ti, 24 h, 25 000 rpm, 4 °C). Iz supernatanta je pomoću šprica uzimana mala zapremina uzorka (slika 63, levo) i

analizirana pomoću UPLC-MS/MS. Nažalost, ni u jednom uzorku nije zabeležen signal koji potiče od jedinjenja, što znači da je sva količina **17 (JK141)** koja se nalazi u krvi vezana za proteine plazme (na nivou detekcije). Vezivanje za proteine plazme (PPB^{xxxi}) je procenjeno na >99%, što je u skladu sa rezultatima dobijenim primenom *in vitro* metoda. U tabeli 14 su sumirani podaci dobijeni u ovim eksperimentima.

Tabela 14. *In vivo* farmakokinetički parametri za jedinjenje **17 (JK141)** posle oralne administracije u dve različite doze

parametar	400 mg/kg	600 mg/kg
T_{max} (min)	22	15
C_{max} (μ M)	7,8	11,9
AUC_{0-120} (μ M·min)	253	526
$t_{1/2}$ (min) ^a	43	23
vreme $T_c > 3\mu$ M ^b (min)	>45	>45
PPB (%) ^c	>99%	>99%

^aVrednosti $t_{1/2}$ (min) izračunate su sa grafika 6 korišćenjem programa GraphPad Prism 6; ^bVreme tokom kog je ukupna koncentracija > 3 μ M. ^cMetodom ultracentrifugiranja nije detektovan slobodan **17 (JK141)**.

Prilikom oralne administracije jedinjenje prolazi kroz želudac, creva i jetru pre nego što dospe do krvotoka. Na tom putu podložno je dejstvu različitih enzima, pri čemu najčešće dolazi do oksidacije i nastajanja metabolita M+16 i M+32. Osim toga, dejstvom karboksi-esteraza potencijalno može da dođe do mono- i bis-deacetilovanja. Ukoliko bi došlo do deacetilovanja obe estarske funkcionalne grupe, iz **17 (JK141)** bi nastao hidroksi-analog **18 (JK227)**. Zbog toga su uzorci seruma analizirani na prisustvo sledećih metabolita: M+16, M+32, MonoAc, MonoAc+16, MonoAc+32, JK227, JK227+16 i JK227+32 (tabela 15). Ni u jednom uzorku nisu detektovani ovi metaboliti.

^{xxxi} eng. *plasma protein binding*

Tabela 15. Mase praćenih jona potencijalnih metabolita

Metabolit	[M+H]⁺
JK141+16	725
JK141+32	741
MonoAc	667
MonoAc+16	683
MonoAc+32	699
JK227	624,97 ^a
JK227+16	641
JK227+32	657

^aMasa jona je praćena na dve decimale, zato što za ovo jedinjenje postoji odgovarajući standard.

3.4.3.3. Intraperitonealna administracija jedinjenja

Intraperitonealna administracija (i.p.) je mnogo invazivnija metoda u poređenju sa oralnom primenom, ali se u najvećem broju slučajeva bioraspoloživost leka na ovaj način poboljšava. Zbog toga je jedinjenje **17 (JK141)** i.p. putem dato u značajno nižim dozama – 10 mg/kg i 2,5 mg/kg. Jedinjenje je za i.p. administraciju rastvoreno u smeši 50%PEG400/50%voda. Dozom od 10 mg/kg tretiran je jedan miš. Smrt je nastupila posle 11 minuta, uz izrazito jake konvulzije. Dozom od 2,5 mg/kg tretirana su 3 miša. Smrt je nastupila posle 16, 25 i 30 minuta, pa samim time uzorci krvi za analizu u ovom eksperimentu nisu uzimani.

3.4.3.4. Supkutana administracija jedinjenja

Administracija jedinjenja supkutanim putem (s.c.) je manje invazivna od intraperitonealnog načina davanja. Ispitana je toksičnost jedinjenja **17 (JK141)** u dozi od 10 mg/kg, tako što je jedinjenje prethodno rastvoreno u smeši 25%PEG400-75%H₂O. Od 5 miševa preživela su 4 miša. U nižoj dozi (5 mg/kg) u smeši rastvarača 12,5%PEG/87,5%H₂O, jedinjenje nije ispoljilo toksičnost.^{xxxii} Eksperiment u kome su miševi podvrgnuti vađenju krvi iz srca i praćenju farmakokinetike izvršen je pri nižoj, netoksičnoj dozi, u istoj smeši rastvarača. U ovaj eksperiment je bilo uključeno 20

^{xxxii} Neposredno posle administracije zapaža se neobično ponašanje: lokalna iritacija na koži, miševi se češu i ližu (svrab=pruritus).

miševa, a krv je vađena u vremenskom intervalu od 5 minuta do 24 h. Nažalost, u svim uzorcima jedinjenje je detektovano samo u tragovima, uz izuzetno otežanu kvantifikaciju usled preklapanja signala sa pozadinskim šumom (Prilog). Dobijene vrednosti za ukupnu koncentraciju **17 (JK141)** u serumu prikazane su u tabeli 16.

Svi uzorci su potom analizirani na prisustvo metabolita, kao i u slučaju oralne administracije (tabela 15). Detektovani su joni koji odgovaraju masama monoacetilovanog derivata, kao i mono- i bis-hidroksilovanog **18 (JK227)** (JK227+16 i JK227+32). U značajnijoj količini pronađen je samo jon koji odgovara masi JK227+32. Međutim, HRMS analizom je utvrđeno da se masa pronađenog jona (TOF: 657,3666; Orbitrap: 657,36199) razlikuje od mase željenog na prvoj decimali (657,41411), što znači da u *in vivo* uslovima nije došlo do nastanka pretpostavljenog metabolita (na nivou detekcije).

Tabela 16. Ukupna koncentracija **17 (JK141)** u serumu miševa
posle s.c. administracije

Uzorak	Koncentracija (µg/mL)	Koncentracija (µM)
JK141_sc_5min	0,16	0,22
JK141_sc_10min	0,17	0,23
JK141_sc_50min	0,58	0,82
JK141_sc_60min	0,47	0,66
JK141_sc_150min	0,71	1,00
JK141_sc_4h	0,37	0,52

U ostalim uzorcima jedinjenje ili nije detektovano ili kvantifikacija nije bila moguća zbog limita detekcije.

Iz prethodnih eksperimenata izvodi se nekoliko zaključaka. Prilikom oralne administracije, jedinjenje je netoksično čak i u izuzetno visokoj dozi (600 mg/kg), ali je bioraspoloživost loša. S druge strane, kada je jedinjenje primenjeno intraperitonealno u dozi 2,5 mg/kg, primećena je akutna toksičnost. Svi miševi su umrli uz izuzetno jake konvulzije, ubrzo nakon administracije jedinjenja. Jedna od pretpostavki je da prilikom oralne administracije dolazi do nedovoljne apsorpcije jedinjenja, te se većina metaboliše na različite načine i izlučuje iz organizma. S druge strane, prilikom intraperitonealnog doziranja, jedinjenje stiže do krvotoka značajno brže. Kako je ustanovljeno da se ovo

jedinjenje vezuje za proteine plazme >99%, moguće je da se vezuje i za druge proteine u organizmu, blokirajući time njihovu funkciju i dovodeći do smrti. Supkutanom administracijom takođe nije postignuta željena koncentracija jedinjenja u krvi. Ipak, imajući u vidu izuzetnu aktivnost jedinjenja **17 (JK141)** u mES-MN u postintoksikacionom modelu, izvanredne ADMET osobine, optimalne K_{sv} vrednosti i činjenicu da pri oralnoj administraciji može da se detektuje u serumu u koncentraciji od 11,9 μM , predmet budućih istraživanja bi trebalo da bude optimizacija uslova administracije u cilju postizanja dužeg poluvremena života, uz održavanje niske (netoksične) koncentracije.

3.5. Inhibicija parazita *Plasmodium falciparum*

Cilj ovog rada je i ispitivanje sintetisanih derivata kao inhibitora parazita *Plasmodium falciparum*. *In vitro* antimalarijska aktivnost sintetisanih jedinjenja određena je prema aseksualnim formama tri *P. falciparum* soja: D6 (hlorokin-osetljiv soj), W2 (hlorokin-rezistentan soj) i TM91C235 (višestruko rezistentni tajlandski soj). Kao pozitivne kontrole korišćeni su hlorokin (CQ) i meflokin (MFQ). Osim toga, ispitana je aktivnost odabranih jedinjenja prema seksualnoj formi parazita, odnosno prema gametocitima u fazi V soja 3D7. Kao pozitivna kontrola korišćeno je metilensko plavo. Antimalarijska aktivnost jedinjenja u *in vivo* uslovima testirana je u *P. berghei* inficiranim miševima, korišćenjem modifikovanog Thompson-ovog testa.

3.5.1. *In vitro* antimalarijska aktivnost prema aseksualnim formama parazita

U okviru ove doktorske disertacije ispitivali smo *in vitro* antimalarijsku aktivnost četrdeset jednog benzotiofenskog derivata aminohinolina (tabela 17). Poredeći dve serije benzotiofenskih derivata sa alifatičnim mostom normalnog niza, dolazi se do zaključka da su derivati C(2) serije^{xxxiii} manje aktivni prema D6, W2 i TM91C235 sojevima *P. falciparum* od C(3) serije^{xxxiv}. Od svih derivata iz C(2) serije, izdvaja se jedino jedinjenje **70**, koje je značajno aktivnije od hlorokina prema W2 i TM91C235 sojevima, dok je prema D6 soju podjednako aktivno. Uopšteno, derivati bez hlora na hinolinskom jezgru pokazali su nižu aktivnost od njihovih analoga sa hlorom. Uvođenje metil- i izopropil-grupe na sekundarni alifatični azot dovelo je do smanjenja aktivnosti prema sva tri soja, osim u slučaju **67**, koji je prema D6 i W2 sojevima nešto aktivniji od svog prekursora **61**. Produžetak mosta od dve do četiri metilenske jedinice kod nesupstituisanih benzotiofenskih derivata, doveo je do poboljšanja aktivnosti prema sva tri soja (**64** vs **61**). Oba derivata sa fluorom u položaju C(5) benzotiofenskog jezgra, **70** i **72**, pokazala su bolju aktivnost u odnosu na derivate bez fluora. Od 14 sintetisanih C(3) derivata, pet je aktivnije od hlorokina prema D6 soju, deset prema TM91C235, a svi derivati su aktivniji prema W2 soju. Pored toga, šest derivata je aktivnije od meflokina prema D6 i TM91C235 sojevima. Uvođenje fluora ili cijano-grupe u položaj C(5) ili

^{xxxiii} Odnosi se na derivate kod kojih je most vezan za C(2) položaj benzotiofena.

^{xxxiv} Odnosi se na derivate kod kojih je most vezan za C(3) položaj benzotiofena.

C(6) benzotiofenskog jezgra, nije pokazalo jednoznačan uticaj na aktivnost. Kao i kod C(2) serije, i kod derivata C(3) serije uklanjanje hlora iz položaja C(7) na hinolinskom jezgru se nepovoljno odrazilo na aktivnost prema sva tri soja. Objašnjenje za ovakav trend može da leži u činjenici da su 7-hloraminohinolini manje bazni od des-hloraminohinolina, usled čega su na fiziološkom pH pretežno monoprotinovani, dok će des-hloraminohinolini biti dvostruko protonovani. Pretpostavlja se da je njihov ulazak u hranljivu vakuolu u tom obliku otežan.¹³⁸

Svi derivati sa benzilaminoalkil-mostom pokazali su bolju aktivnost od hlorokina prema W2 soju. Osim toga, tri derivata su se pokazala podjednako aktivna kao i hlorokin prema D6 soju, dok je derivat **21** aktivniji od hlorokina prema sva tri soja, a od meflokina prema D6 soju. Poređenje *in vitro* aktivnosti fluorovanih i cijano analoga **93-98** i **94-99** ukazuje na to da cijano derivati ostvaruju bolju aktivnost prema D6 soju. Radi ispitivanja uticaja položaja cijano grupe na aktivnost, sintetisani su analozi **21-97** i **99-100**. Derivati sa cijano grupom u položaju C(5) benzotiofenskog jezgra pokazuju bolju aktivnost od C(6) izomera. Takođe, uočeno je da kraći most (četiri metilenske grupe umesto šest) utiče na poboljšanje aktivnosti prema D6 soju (jedinjenje **21** je dvostruko aktivnije od jedinjenja **99**), ali istovremeno na značajno smanjenje aktivnosti prema W2 i TM91C235 sojevima. Za razliku od benzotiofenske serije sa alifatičnim mostom normalnog niza, uticaj hlora u položaju C(7) na hinolinskom jezgru je ovde nešto drugačiji. Derivat **93** bez hlora je dvostruko aktivniji prema D6 soju i 2,7 puta aktivniji prema TM91C235 soju od derivata **92**, koji poseduje hlor u položaju C(7). Takođe, des-hlor derivat **89** je četverostruko aktivniji od **88** prema D6 soju. Uvođenje tercijarne amino grupe, nema jednoznačan uticaj. Povoljno utiče na aktivnost samo prema D6 soju kod para **93-96**, prema W2 i TM91C235 sojevima kod para **91-95**, dok negativan efekat na sva tri soja pokazuje kod para **98-101**. Interesantno je veliko odstupanje aktivnosti derivata **20** prema sva tri soja, u poređenju sa ostalim derivatima slične strukture. Kako je **20** jedini derivat sa metil grupom u mostu bližom alifatičnom azotu, jedna od pretpostavki je da je pad u aktivnostima prema sva tri soja posledica ove promene u strukturi. Uopšteno govoreći, čitava serija benzotiofenskih derivata sa benzilaminoalkil-mostom nije dovela do unapređenja aktivnosti C(3) serije derivata sa alifatičnim mostom normalnog niza.

Određena je stabilnost pet derivata sa alifatičnim mostom normalnog niza u humanoj i mišjoj mikrozomalnoj suspenziji. Četiri derivata C(2) serije sa tercijarnom amino-grupom (**66–69**) pokazala su izuzetno lošu stabilnost, sa MLM i HLM vrednostima ≤ 9 min. Derivat **74** iz C(3) serije se pokazao nešto stabilnijim sa MLM = 23 min i HLM = 24 min.

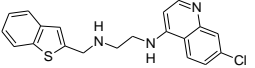
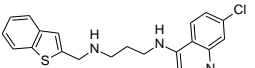
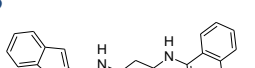

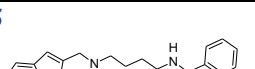

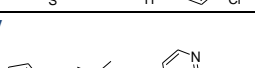
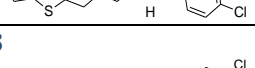
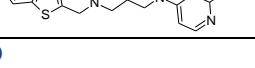
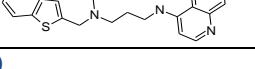
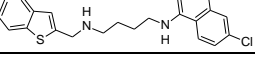
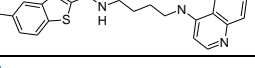
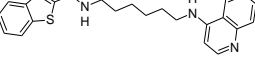
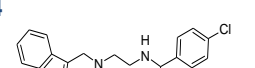
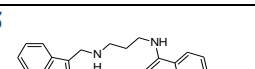
Indeks selektivnosti (SI), dobijen kao količnik citotoksičnosti prema HepG2 ćelijskoj liniji i aktivnosti prema D6 soju, prikazan je u tabeli 17. Benzotiofenski derivati sa benzilaminoalkil-mostom pokazuju najlošije vrednosti indeksa selektivnosti (29–401). Derivati C-2 grupe sa alifatičnim mostom normalnog niza pokazuju bolji, ali i dalje prilično nizak indeks selektivnosti (41–608), dok se u C-3 grupi indeksi selektivnosti nalaze u opsegu 58–1111. Treba imati u vidu da za jedinjenja koja se pokažu kao toksična u *in vitro* testu ne znači nužno da će ispoljiti toksičnost u *in vivo* uslovima, te stoga ovaj parameter ne sme da se koristi kao jedini za odabir jedinjenja koja će ići u dalja testiranja. Jedinjenje **75** sa IC_{50} (HepG2) = 7780 nM se pokazalo toksično u *in vivo* uslovima (kada je dato u dozi 160 mg/kg/dan \times 3 dana umrlo je 3/5 miševa). S druge strane, jedinjenje **77 (JK29)** (IC_{50} (HepG2) = 2258 nM) primenjeno u istoj dozi nije ispoljilo toksičnost, što ukazuje na veliki značaj *in vivo* eksperimenata.^{xxxv}

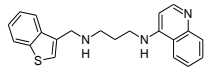
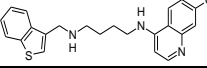
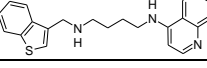
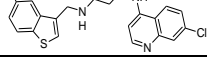
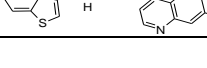
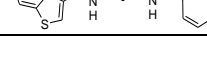
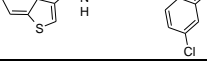
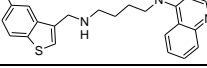
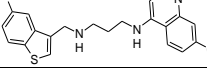
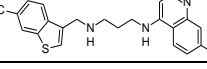
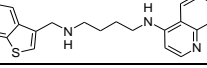
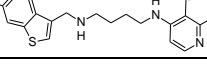
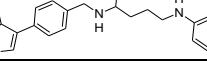
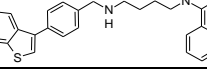
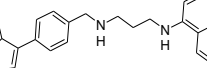
Indeks rezistencije (RI) predstavlja odnos aktivnosti jedinjenja prema CQ-rezistentnom (W2) i CQ-osetljivom (D6) soju (tabela 17). Sva testirana jedinjenja pokazala su značajno niži indeks rezistencije (0,2–31,3) u poređenju sa hlorokinom (RI = 39,7), a posebno jedinjenja **20, 74, 80, 88 i 92**, koja su pokazala RI < 1. Ovi rezultati su izuzetno važni, jer razvoj novih struktura sa poboljšanim antimalarijskim aktivnostima prema CQ-rezistentnim sojevima ima važnu ulogu u prevazilaženju problema rezistencije.

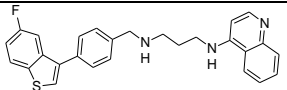
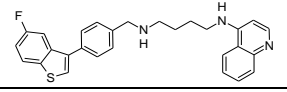
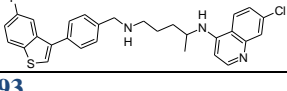
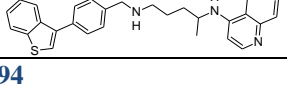
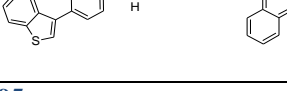
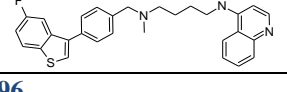
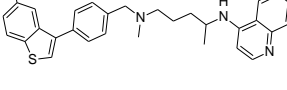
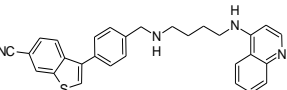
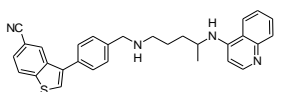
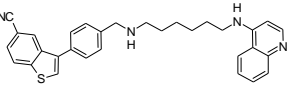
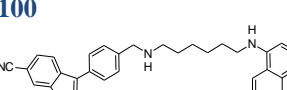
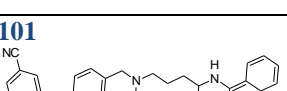
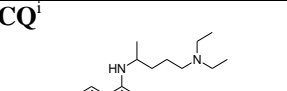
U tabeli 17 date su i eksperimentalno izmerene log*D* vrednosti iz kojih se vidi da većina jedinjenja pokazuje umerenu lipofilnost, kojom se postiže ravnoteža između rastvorljivosti i permeabilnosti, a optimalna je i za dobru oralnu bioraspoloživost i metaboličku stabilnost.¹²⁹

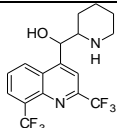
^{xxxv} Toksičnost odabranih derivata aminohinolina u *in vivo* uslovima detaljno je obrađena je u poglavlju 3.6.2.

Tabela 17. *In vitro* antimalarijska aktivnost sintetisanih benzotiofenskih derivata

Jedinjenje	eksp. logD ^a	<i>In vitro</i> antimalarijska aktivnost (<i>P. falciparum</i> , IC ₅₀ , nM) ^b			HepG2 ^f (IC ₅₀ , nM)	SI ^g HepG2/ D6	RI ^h (W2/D6)
		D6 ^c	W2 ^d	TM91C235 ^e			
61 	1,97	55	97	48	33438	608	1,8
62 	2,38	44	87	64	1906	43	2,0
63 	2,94	20	104	107	8867	440	5,2
64 	2,63	20	45	37	866	43	2,2
65 	3,00	14	191	205	4867	339	13,6
66 	2,69	120	296	256	5741	48	2,5
67 	3,12	34	68	56	7305	215	2,0
68 	2,76	86	177	119	7336	85	2,1
69 	2,94	75	231	137	3054	41	3,1
70 	2,57	14	41	29	4435	317	2,9
71 	2,94	32	240	177	3227	101	7,5
72 	2,88	20	36	32	3871	194	1,8
74 	2,44	30	22	19	6120	204	0,7
75 	2,82	6	24	17	7780	1111	4,0
76 	3,18	89	283	280	5144	58	3,2

							
77 (JK29) 	3,06	8	31	68	2258	282	3,9
78 	3,30	65	275	299	4673	72	4,2
79 	2,63	28	50	78	2463	88	1,8
80 	2,76	32	28	20	5543	168	0,9
81 	3,12	21	185	191	4477	211	8,8
82 	2,82	10	26	19	1649	165	2,6
83 	3,24	16	201	177	2726	172	12,6
84 	2,11	5	32	24	3971	794	6,4
85 	2,24	17	47	52	3880	228	2,8
86 	2,31	12	40	36	2929	244	3,3
87 	2,51	10	40	24	3808	381	4,0
20 	3,85	609	573	690	3162	5	0,9
21 	3,67	6	188	129	2575	401	31,3
88 	3,48	130	100	154	3750	29	0,8
89	3,73	28	144	111	3825	136	5,1

							
91 	3,98	11	125	147	2360	214	11,4
92 	3,79	71	12	121	2087	29	0,2
93 	3,98	36	55	45	2345	65	1,5
94 	3,92	60	277	242	2233	37	4,6
95 	3,98	13	91	74	3432	264	7,0
96 	3,98	29	126	126	4998	173	4,3
97 	3,73	13	197	93	3577	276	15,1
98 	3,67	13	44	46	2413	192	3,4
99 	3,85	12	81	51	1976	162	6,8
100 	3,92	55	102	29	2049	37	1,8
101 	3,42	24	65	65	8363	348	2,7
CQⁱ 		15 (6)	595 (5)	206 (5)			39,7
MFQⁱ		23 (6)	7 (5)	55 (5)			0,3

							
<p>^a log<i>D</i> vrednosti su merene reverzno-faznom hromatografijom na pH=10 (aceton/NH₃/H₂O=85/5/10); ^b IC₅₀ vrednosti (nM) testiranih jedinjenja prema različitim sojevima <i>P. falciparum</i> (Malaria SYBR Green Fluorescence Assay). Svi eksperimenti su izvođeni kao tehnički kvadruplikati; prikazane su srednje vrednosti; ^c CQ osetljiv <i>P. falciparum</i> afrički D6 soj; ^d CQ rezistentni <i>P. falciparum</i> W2 soj (Indokina); ^e Multirezistentni <i>P. falciparum</i> C235 soj (Tajland); ^f <i>In vitro</i> citotoksičnost na HepG2 ćelijsku liniju; ^g Indeks selektivnosti; ^h Indeks rezistencije; ⁱ Kontrole: CQ kao difosfat, MFQ kao HCl so. Rezultat predstavlja srednju vrednost broja ponavljanja datih u zagradama.</p>							

3.5.2. Inhibicija nastajanja beta-hematina (BHIA)

U eritrocitnoj fazi, malarijski parazit razlaže hemoglobin u hranljivim vakuolama kako bi iz proteina obezbedio slobodne aminokiseline neophodne za ishranu. U ovom procesu 4 ekvivalenta hema (feroprotoporfirina IX) bivaju oslobođena, a zatim i oksidovana do hematina,^{xxxvi} koji je toksičan za mikroorganizme, pa se vrši detoksikacija konverzijom u hemozoin (β-hematin) ili malarijski pigment. U ovom radu je ispitana sposobnost deset benzotiofenskih derivata aminohinolina da inhibiraju nastajanje β-hematina.^{xxxvii} Poređenjem vrednosti iz tabele 18, primećuje se da 9 od 10 benzotiofenskih derivata pokazuje IC₅₀ vrednosti niže od hlorokin-difosfata. Cijanoderivati **84**, **85** i **87** pokazuju lošiju inhibiciju od fluorovanih i nesupstituisanih benzotiofenskih derivata. Pored toga, promena položaja F iz C(5) u C(6) vodi smanjenju inhibicije (**79** (0,41) u poređenju sa **80** (0,50)). Uočava se i da najefikasniju inhibiciju nastajanja β-hematina ostvaruju benzotiofenski derivati **82** (0,38) i **77 (JK29)** (0,34) sa mostom od četiri metilenske grupe. Na kraju, derivat **76** koji jedini ne poseduje hlor na hinolinskom jezgru, pokazuje IC₅₀ vrednost veću od one dobijene za hlorokin-difosfat. Dobijeni rezultati su u dosta dobroj korelaciji sa *in vitro* rezultatima prikazanim u tabeli 17. Jedinjenja **77 (JK29)** i **82** koja su pokazala najbolju aktivnost u BHIA eksperimentu takođe se nalaze među najaktivnijim derivatima prema D6 i W2 soju, dok je najmanje aktivno jedinjenje u BHIA eksperimentu **76** pokazalo oko 10 puta više IC₅₀ vrednosti prema ova dva soja. Rezultati dobijeni ovim eksperimentom ukazuju na to da je

^{xxxvi} α-hematin ili samo hematin je feriprotoporfirin IX-hidroksid.

^{xxxvii} β-Hematin je sintetički hemozoin. U ovom eksperimentu se koristi hemin (feriprotoporfirin IX-hlorid), koji se *in situ* transformiše u hematin (feriprotoporfirin IX-hidroksid). Formiranje β-hematina se inicira dodatkom acetatnog pufera (pH=5,2).

najverovatniji mehanizam delovanja novih benzotiofenskih derivata aminohinolina inhibicija nastajanja β -hematina, kao i u slučaju standardnog leka hlorokina.^{xxxviii}

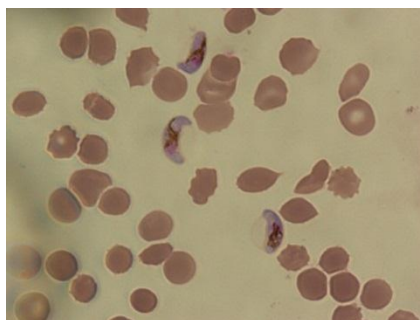
Tabela 18. Vrednosti inhibicije nastajanja β -hematina za odabrane benzotiofenske derivate

Jedinjenje	IC ₅₀ ^a	Jedinjenje	IC ₅₀ ^a
77 (JK29)	0,34	62	0,85
82	0,38	84	0,99
79	0,41	87	1,07
80	0,50	76	1,54
75	0,66	hlorokin-difosfat	1,18
85	0,78		

^aIC₅₀ vrednosti predstavljaju molarne ekvivalente jedinjenja u odnosu na hemin, koji inhibiraju formiranje β -hematina za 50% (eksperiment je izvršen u triplikatu, osim za CQ koji je testiran šest puta).

3.5.3. *In vitro* antimalarijska aktivnost prema seksualnoj formi parazita

Dvanaest benzotiofenskih derivata aminohinolina je podvrgnuto ispitivanju aktivnosti prema seksualnoj formi parazita, odnosno prema gametocitima 3D7 soja u fazi V (slika 65), zato što je aktivnost jedinjenja u ovoj fazi od esencijalne važnosti za suzbijanje daljeg prenošenja infekcije.



Slika 65. Gametociti u fazi V (oblik banane)

^{xxxviii} Mehanizam dejstva hlorokina prikazan je na slici 29.

Iz tabele 19 se vidi da odabrani derivati uopšteno ne pokazuju značajnu aktivnost prema ovoj formi parazita. Ipak, 4 derivata pokazuju $IC_{50} \leq 0,9 \mu\text{M}$, što donekle ukazuje na mogućnost daljeg razvijanja ovih struktura kao potencijalnih gametocitocida.

Tabela 19. Aktivnost jedinjenja prema gametocitima 3D7 soja

Jedinjenje	$IC_{50} (\mu\text{M})^{a,b}$	Jedinjenje	$IC_{50} (\mu\text{M})^{a,b}$
91	0,6	87	1,8
90	0,7	75	2,3
98	0,7	88	2,4
89	0,9	23	3,8
92	1,1	62	9,9
78	1,3	metilensko-plavo^c	0,04
82	1,3		

^a IC_{50} vrednosti testiranih jedinjenja prema gametocitima u fazi V soja 3D7 *P.*

falciparum; ^bSvi eksperimenti su izvođeni u duplikatu; prikazane su srednje vrednosti;

^cPozitivna kontrola.

3.5.4. *In vivo* antimalarijska aktivnost

Sedam benzotiofenskih derivata aminohinolina je na osnovu analize rezultata dobijenih u BHIA eksperimentu i *in vitro* antimalarijskih aktivnosti odabrano za određivanje aktivnosti u *in vivo* uslovima, odnosno u modelu eksperimentalne malarije miša. Jedinjenja **77 (JK29)**, **79**, **80** i **82** su odabrana zato što su se pokazala kao najaktivnija u BHIA eksperimentu ($IC_{50} \leq 0,50$). Jedinjenje **92** je odabrano zbog dobre aktivnosti prema W2 soju ($IC_{50} = 12 \text{ nM}$) i niskog indeksa rezistencije ($RI = 0,2$). Indeks rezistencije < 1 kvalifikovao je i jedinjenje **74** za određivanje antimalarijske aktivnosti u *in vivo* uslovima. Jedinjenje **81** odabrano je zbog strukturne sličnosti sa **80** (des-hlor analog **80**, kako bi se ispitaio uticaj stepena protonovanosti na aktivnost i napravila korelacija sa *in vitro* aktivnostima). Osim toga, sva jedinjenja su se pokazala kao netoksična u *in vivo* uslovima primenjena u dozi $160 \text{ mg/kg/dan} \times 3 \text{ dana}$, sa izuzetkom **79**. Jedinjenja su prvobitno rastvorena u dimetil-sulfoksidu, zatim

suspendovana u smeši 0,5% hidroksetilceluloza–0,1% Tween 80 u vodi i administrirana oralno jednom dnevno (3 ili 4 dana), polazeći od trećeg dana posle infekcije. Primenjene doze i rezultati su prikazani u tabeli 20. Kod svih netretiranih kontrolnih miševa parazitemija je zabeležena trećeg dana. Šestog dana parazitemija je bila između 11,2% i 30%. Svi zaraženi miševi koji nisu tretirani jedinjenjem umrli su između šestog i osmog dana. Parazitemija je određena posmatranjem razmaza krvi (Giemsa) iz repa miša pod svetlosnim mikroskopom.

Primenjena u najvišoj dozi (160 mg/kg/dan × 3 dana) jedinjenja **74** i **81** nisu omogućila preživljavanje miševa (miševi su umirali od D12 do D30). Ipak, srednje vreme preživljavanja u slučaju oba jedinjenja je bilo značajno duže (MST^{xxxix} = 17-18,6 dana) u poređenju sa kontrolom (svi miševi umrli od D6-D8). Dodatno, u slučaju jedinjenja **81** kod 2/5 miševa do D10 nije detektovana parazitemija^{xl} (D7: 5 miševa negativno, D10: 2 miša negativna, 3 miša pozitivna 0,2-0,4%). Kada je u istoj dozi (160 mg/kg/dan × 3 dana) primenjeno jedinjenje **92**, preživeo je 1 od 4 miša, ali sa visokom parazitemijom (D31: 79%). Bez obzira na negativan rezultat u smislu izlečenja miševa, aktivnost ovog jedinjenja nije zanemarljiva ako se uzme u obzir da je srednje vreme preživljavanja produženo 3 puta u odnosu na kontrolu (MST = 20,8). Jedinjenje **80**, sa fluorom u položaju C(6) benzotiofenskog jezgra, primenjeno u dozi 160 mg/kg/dan × 3 dana, dovelo je do preživljavanja 3/5 zaraženih miševa, ali kao i **92**, uz visoku parazitemiju (D28: 27,2–59,4%). Iako nije dovelo do izlečenja, jedinjenje **80** je produžilo vreme preživljavanja čak četiri puta u odnosu na kontrolu. 5-Fluoro-analog jedinjenja **80**, jedinjenje **79**, pokazalo se kao toksično kada se primeni u dozi 160 mg/kg/dan × 3 dana, zbog čega je testirano u nižoj dozi (80 mg/kg/dan × 3 dana). Nažalost, sva četiri miša su umrla (D15). S druge strane, jedinjenje **82** koje se od **79** razlikuje po tome što ima jednu metilensku grupu više u mostu, nije ispoljilo toksičnost kada je dato u visokoj dozi. Primenjeno u ovoj dozi na miševe zaražene *P. berghei*, dovelo je do preživljavanja 3 od 4 miša. Kao i kod **92** i **80**, sva tri miša koja su preživela pokazala su visok procenat parazitemije (D28: 15–79,4). Osim toga, za razliku od svog izomera **79**, jedinjenje **82** je omogućilo preživljavanje jednog od 5 miševa primenjeno u dozi 80 mg/kg/dan × 3 dana, uz dvostruko duže srednje vreme preživljavanja. Iako nije

^{xxxix} MST = Mean survival time (srednje vreme preživljavanja)

^{xl} Provera parazitemije je vršena mikroskopiranjem krvnog razmaza. Za potvrdu eliminacije parazitemije, neophodno je da se izvrši eksperiment na molekularnom nivou (qPCR).

omogućilo izlječenje, jedinjenje **82** je dovelo do produžetka srednjeg vremena preživljavanja sa 25,6 na 30,2 dana u odnosu na hlorokin primenjen u istoj dozi.

Interesantno je i direktno poređenje aktivnosti jedinjenja **80** i **81**. Jedinjenje **80** sa hlorom u položaju C(7) na hinolinskom jezgru omogućilo je preživljavanje 3/5 miševa i pokazalo se aktivnije od svog des-hlor analoga **81** u čijem slučaju su svi miševi umrli. Ovaj podatak je od izuzetne važnosti, jer je u odličnoj korelaciji sa postignutim *in vitro* rezultatima (jedinjenje **80** je pokazalo 6,6 puta nižu IC₅₀(W2) od jedinjenja **81**). Na ovaj način je dobijena dodatna potvrda da je ulazak dvostruko protonovanih jedinjenja u hranljivu vakuolu otežan.

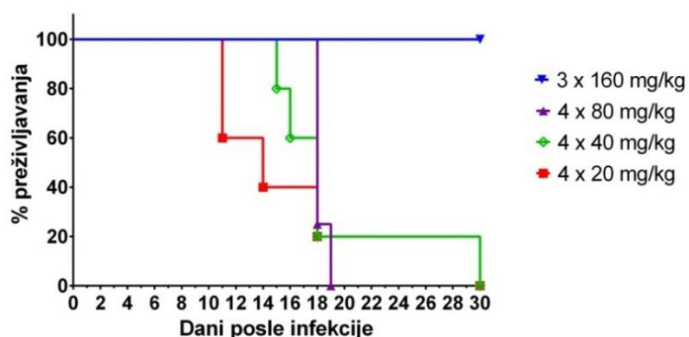
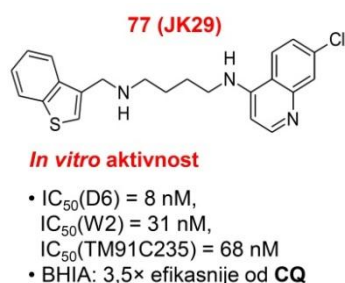
Tabela 20. *In vivo* antimalarijska aktivnost benzotiofenskih derivata^{a,b}

Jedinjenje	mg/kg/dan	Parazitemija	Broj uginulih miševa/dan smrti	Broj živih miševa - D31	Srednje vreme preživljavanja (MST, dan)
74	160	D7: 5 miševa pozitivno 0,2-0,3%; D10: 5 miševa pozitivno 0,3 – 7%; D14: 3 miša pozitivna 4 – 6,9%; D17: 2 miša pozitivna 4,6 – 9,3%; D21: 2 miša pozitivna 55,2 –57%; D24: 1 miš pozitivan 82%; D28: 1 miš pozitivan 86%	2/12 1/15 1/24 1/30	0/5	18,6
77 (JK29)	20°	D7: 2 miša negativna, 3 miša pozitivna 0,1 – 0,2%; D11: 3 miša pozitivna 0,8 – 1,9%; D14: 2 miša pozitivna 1,6 – 3,7%; D18: 1 miš pozitivan 6%; D21: 1 miš pozitivan 26,5%; D25: 1 miš pozitivan 63%; D28: 1 miš pozitivan 66%	2/11 1/14 1/18 1/30	0/5	16,8
	40°	D7: 5 miševa negativno; D11: 5 miševa negativno; D14: 5 miševa pozitivno 0,6 – 2,4%; D18: 1 miš pozitivan 2,2%; D21: 1 miš pozitivan 7,3%; D25: 1 miš pozitivan 37%; D28: 1 miš pozitivan 53%	1/15 1/16 2/18 1/30	0/5	19,4
	80°	D7: 4 miša negativna; D11: 4 miša negativna; D14: 4 miša pozitivna 0,1 – 0,5%; D18: 1 miš pozitivan 2,3%	3/18 1/19	0/4	18,2
	160	D7-D31: 5 miševa		5/5	>31

		negativno			
79	80	D7: 4 miša pozitivna 0,2 – 0,3%; D10: 4 miša pozitivna 0,4 – 0,6%; D14: 4 miša pozitivna 1,3 – 2,7%	4/15	0/4	15
80	160	D7: 5 miševa negativno; D10: 5 miševa negativno; D14: 5 miševa negativno; D17: 5 miševa pozitivno 0,3 – 4,4%; D21: 4 miša pozitivna 2,3 – 3,8%; D24: 3 miša pozitivna 6,7 – 19,7% D28: 3 miša pozitivna 27,2 – 59,4%	1/18 1/21	3/5	26,4
81	160	D7: 5 miševa negativno; D10: 2 miša negativna, 3 miša pozitivna 0,2 – 0,4%; D14: 5 miševa pozitivno 0,2 – 8,2%; D17: 1 miš pozitivan 31,4%; D21: 1 miš pozitivan 41,3%	3/15 1/17 1/23	0/5	17
82	80	D7: 5 miševa negativno; D10: 5 miševa pozitivno 0,2 – 0,4%; D14: 5 miševa pozitivno 0,6 – 3,5%; D17: 5 miševa pozitivno 1,2 – 6,5%; D21: 5 miševa pozitivno 2,4 – 15,2%; D24: 5 miševa pozitivno 6 – 43%; D28: 4 miša pozitivna 6,8 – 66,3%	1/27 3/31	1/5	30,2
	160	D7: 4 miša negativna; D10: 3 miša negativna, 1 miš pozitivan 0,2%; D14: 4 miša pozitivna 0,2 – 1,2%; D17: 4 miša pozitivna 0,5 – 1,7%; D21: 4 miša pozitivna 1 – 37%; D24: 4 miša pozitivna 7,4 – 26,8%; D28: 3 miša pozitivna 15 – 79,4%	1/27	3/4	30
92	160	D7: 4 miša pozitivna 0,2 – 0,4%; D10: 4 miša pozitivna 0,3 – 0,6%; D14: 4 miša pozitivna 0,5 – 0,8%; D17: 2 miša pozitivna 1,5 – 3,7%; D21: 1 miš pozitivan 2,7%; D24: 1 miš pozitivan 51,6%; D28: 1 miš pozitivan 72%; D31: 1 miš pozitivan 79%	2/17 1/18	1/4	20,8
CQ	160	D3: 5 miševa 0,4 – 0,9%; D6–D31: 5 miševa negativno		5/5	>31
	80	D3: 5 miševa 0,5 – 0,9%; D6: 5 miševa negativno;	1/17 1/18	3/5	25,6

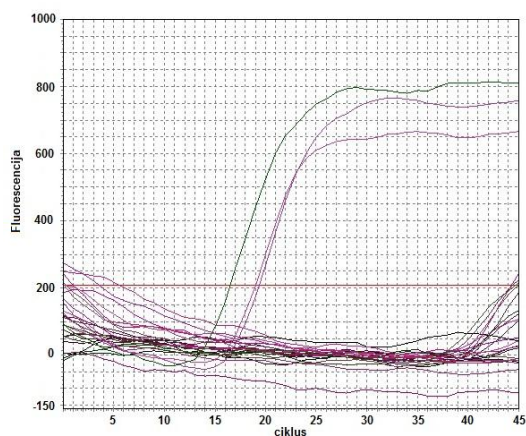
		D10: 5 miševa negativno; D14: 3 miša negativna, 2 miša 0,2%; D17: 3 miša negativna, 1 miš 4%; D21: 3 miša negativna; D31: 3 miša negativna		
Inficirani neleženi kontrolni miševi	0	Svi miševi su umrli od 6-8 dana		
<p>^aGrupe od po 5 miševa zaraženih parazitima <i>P. berghei</i> (ANKA soj) tretirane su aminohinolinima suspendovanim u smeši 0,5% hidroksietilceluloza-0,1% Tween 80 u vodi, p.o. jednom dnevno od 3. do 5. dana posle infekcije. Miševi koji su živi 31. dana bez parazita u krvnom razmazu smatraju se izlečenim. U slučaju jedinjenja 77 (JK29) eliminacija parazitemije je potvrđena qPCR analizom. ^bSva jedinjenja su u zasebnim ogleđima testirana na toksičnost u primenjenim dozama. Nijedno jedinjenje nije ispoljilo toksičnost kada se primeni u dozi 160 mg/kg/dan × 3 dana, osim 79, koje je zbog toga testirano u dozi 80 mg/kg/dan × 3 dana. ^cTerapija je trajala 4 dana (3. do 6. dan posle infekcije).</p>				

Jedinjenje **77 (JK29)** dato u dozi 160 mg/kg/dan × 3 dana pokazalo se kao najefikasnije, jer je izlečilo 5/5 zaraženih miševa (D31: svi miševi negativni na parazitemiju). Kada je dato u nižim dozama (80, 40 i 20 mg/kg/dan × 4 dana) svi miševi su umrli (od D11 do D30) (tabela 20), ali je ovo jedinjenje čak i u slučaju najniže doze (20 mg/kg/dan × 4 dana) dovelo do produžetka srednjeg vremena preživljavanja dva puta u odnosu na netretirane kontrolne miševe. Rezultati *in vitro* i *in vivo* antimalarijske aktivnosti jedinjenja **77 (JK29)** sumirani su na grafiku 7.



Grafik 7. *In vitro* antimalarijska aktivnost i kriva preživljavanja za jedinjenje **77 (JK29)**

Potpuna eliminacija parazitemije u slučaju kada je jedinjenje **77 (JK29)** primenjeno u dozi 160 mg/kg × 3 dana dodatno je potvrđena PCR (eng. *polymerase chain reaction*) analizom krvi i homogenata jetre svih 5 preživelih miševa.¹³⁹ Kao pozitivna kontrola korišćeni su uzorci *P. berghei* gDNK. Uzorci iz svih 5 miševa pokazali su se negativni na *P. berghei* DNK (slika 66).



Slika 66. qPCR analiza za uzorke krvi i homogenata jetre 5 miševa tretiranih jedinjenjem **77 (JK29)**. Uzorci kod kojih je $Ct \geq 40$ (Ct , pragovni ciklus) i nalaze se ispod crvene linije (eng. *threshold*) su smatrani negativnim. Kao pozitivna kontrola korišćena je *P. berghei* gDNK (iznad crvene linije).

Dobijeni *in vivo* rezultati su donekle u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u BHIA eksperimentu. Najnižu IC_{50} pokazala su jedinjenja **77 (JK29)** i **82**. Jedinjenje **77 (JK29)** leči 5/5 miševa zaraženih parazitima *P. berghei* u dozi 160 mg/kg/dan × 3 dana, dok je u slučaju jedinjenja **82** datog u dozi 160 mg/kg/dan × 3 dana preživelo 3/4, a u dozi 80 mg/kg/dan 1/5 miševa (uz visok procenat parazitemije). Bez obzira što nije dovelo do izlečenja na kraju eksperimenta, jedinjenje **82** je dovelo do produžetka srednjeg vremena preživljavanja oko četiri puta u odnosu na kontrolu, što ukazuje na potencijalnu mogućnost primene ovog jedinjenja u kombinovanim terapijama.

Jedan od razloga za sintezu prikazanih benzotiofenskih derivata aminohinolina je poređenje dobijenih aktivnosti sa benzotiofenskim derivatima poznatim u literaturi.^{xii} Kako je *in vitro* aktivnost tih derivata prikazana na 3D7 soju (IC_{50} do 0,16 μ M), direktno poređenje nije moguće. Međutim, značajan napredak se uočava poređenjem *in vivo* rezultata. Dok jedinjenje **24** (Slika 50) petog dana inhibira rast parazita do 66% pri koncentraciji 50 mg/kg/dan × 4 dana,¹¹¹ primenom jedinjenja **77 (JK29)** u dozi 40 mg/kg/dan × 4 dana paraziti nisu detektovani u krvnom razmazu zaključno sa D11. Najvažnije od svega, ovo jedinjenje dovodi do izlečenja 5/5 miševa kada se primeni u

^{xii} Diskutovano u poglavlju 3.1.2.

dozi 160 mg/kg/dan × 3 dana. Na osnovu svega iznetog, zaključuje se da je istraživanje sprovedeno u okviru ove disertacije dovelo do otkrića jedinjenja sa poboljšanom antimalarijskom aktivnošću u *in vivo* uslovima.

3.6. Ispitivanje toksičnosti u *in vivo* uslovima

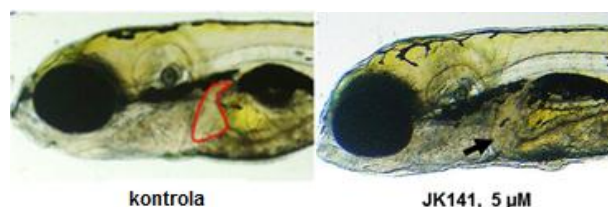
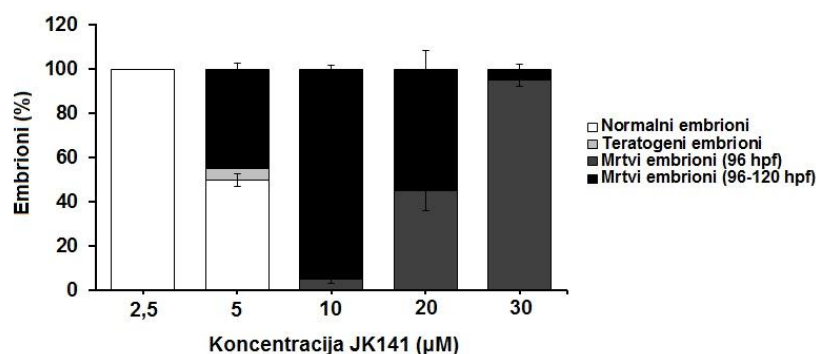
Za ispitivanje toksičnosti potencijalnih lekova koriste se brojni sistemi, uključujući *in vitro* ćelijske eseje, višćelijske organizme (poput dafnija ili vodenih buva i morskih ježeva) i više organizme poput miševa. Brojna istraživanja su pokazala da viši organizmi imaju niz prednosti u odnosu na jednostavnije eseje u ćelijama, zato što omogućavaju praćenje ponašanja i preživljavanja jedinki pod uticajem primenjenog leka tokom dužeg vremenskog perioda. Rezultati dobijeni ovakvim metodama su daleko vredniji, zato što uzimaju u obzir i faktore poput rastvorljivosti, permeabilnosti, bioraspodivnosti i metaboličke stabilnosti leka u organizmu. Miševi se vrlo često koriste za ispitivanje toksičnosti, ali treba imati u vidu da su bez obzira na filogenetsku povezanost sa čovekom ovi organizmi tokom evolucije postali veoma različiti i da je rezultate potrebno obazrivo tumačiti.¹⁴⁰ U poslednjih nekoliko godina zebra ribice (*Danio rerio*) se sve više koriste kao model za ispitivanje toksičnosti. Prednosti upotrebe ovog modela se ogledaju u lakom rukovanju i visokoj reproducibilnosti rezultata. Osim toga, transparentnost embriona zebra ribica omogućava praćenje velikog broja parametara, uključujući malformacije organa, praćenje kardio- i hepatotoksičnosti.¹⁴¹ Takođe, ovi modeli se smatraju pogodnim za selekciju jedinjenja u ranim fazama razvoja leka zbog dobre korelacije rezultata sa rezultatima u ljudskom organizmu.¹⁴²

U okviru ove disertacije korišćena su dva modela za ispitivanje toksičnosti u *in vivo* uslovima – model zebra ribice i model miša.

3.6.1. Model zebra ribice

Steroidni derivat **17 (JK141)**, koji je pokazao izuzetnu aktivnost prema BoNT/A LC i holotoksinu BoNT/A u mES-MN, podvrgnut je ispitivanju toksičnosti (letaliteta i teratogenosti) prema embrionima zebra ribica (*Danio rerio*). Sa slike 67 se uočava da

letalitet primenjenog jedinjenja zavisi od koncentracije ($LD_{50} = 5,51 \mu\text{M}$). U preživelim embrionima nisu zabeležene nikakve teratogene malformacije, osim kod nekoliko embriona tretiranih sa $5 \mu\text{M}$ **17 (JK141)** ($6/120 = 5\%$). Odsustvo kardio- i hepatotoksičnosti u najvećem broju tretiranih embriona je važan podatak, imajući u vidu da ova dva tipa toksičnosti predstavljaju najčešće neželjene efekte lekova koji se nalaze u humanoj upotrebi.



Slika 67. Rezultati toksičnosti jedinjenja **17 (JK141)** prema embrionima zebra ribica ($LD_{50} = 5,51 \mu\text{M}$). Prikazana je morfologija embriona 120 hpf posle tretmana sa jedinjenjem **17 (JK141)** ($5 \mu\text{M}$). Kod nekoliko embriona uočena je tamnija jetra (crna strelica) u poređenju sa netretiranim embrionima (negativna kontrola, crveno zaokružena regija), što ukazuje na moguću slabu hepatotoksičnost.

3.6.2. Model miša

Za jedinjenja koja su se pokazala kao najaktivnija prema BoNT/A i jedinjenja koja su pokazala interesantnu *in vitro* antimalarijsku aktivnost (a pre *in vivo* testiranja)^{xlii}, izvršeno je i testiranje toksičnosti u modelu miša. Jedinjenja su prvobitno rastvorena u dimetil-sulfoksidu, zatim suspendovana u smeši 0,5% hidroksietilceluloza

^{xlii} U poglavlju 3.5.1. prikazane su vrednosti *in vitro* toksičnosti prema HepG2 ćelijskoj liniji.

– 0,1% Tween 80 u vodi i administrirana oralno jednom dnevno (tokom 1-3 dana). Rezultati su prikazani u tabeli 21.

Tabela 21. Određivanje toksičnosti u miševima

Jedinjenje	Doza	Broj živih miševa/ ukupan broj miševa
17 (JK141)	160 mg/kg/dan × 3 dana	5/5
127	160 mg/kg/dan × 3 dana	3/5
122	160 mg/kg/dan × 3 dana	4/5
20	160 mg/kg/dan × 3 dana	5/5
62	160 mg/kg/dan × 3 dana	5/5
64	160 mg/kg/dan × 3 dana	2/5
74	160 mg/kg/dan × 3 dana	4/5
75	160 mg/kg/dan × 3 dana	2/5
77 (JK29)	160 mg/kg/dan × 3 dana	4/4
81	160 mg/kg/dan × 3 dana	4/5
82	160 mg/kg/dan × 3 dana	4/4
84	160 mg/kg/dan × 3 dana	1/5
88	300 mg/kg × 1 dan	5/5
91	300 mg/kg × 1 dan	3/5
92	160 mg/kg/dan × 3 dana	5/5

Iz tabele 21 se vidi da su se, u ovim dozama, jedinjenja **17 (JK141)**, **20**, **62**, **77 (JK29)**, **82**, **88** i **92** pokazala kao potpuno netoksična, s obzirom na to da je svih 5 miševa preživelo 30 dana, odnosno do kraja eksperimenta. Interesantno je da se kao najtoksičnije jedinjenje pokazalo **84**, sa CN supstituentom na benzenovom prstenu. Od tri testirana steroidna derivata, jedino **17 (JK141)** nije ispoljio toksičnost, kada se administracija vrši oralnim putem. S druge strane, pri intraperitonealnoj administraciji jedinjenja **17 (JK141)**, čak i u dozi 2,5 mg/kg/dan svi miševi su umrli posle nekoliko minuta, uz izuzetno jake konvulzije. Isto jedinjenje je bilo moguće administrirati supkutano u dozi do 5 mg/kg, bez ispoljavanja toksičnosti.^{xliii}

^{xliii} Detaljno opisano u poglavlju 3.4.3.

3.7. Jedan hemotip – dve mete

Postojanje jednog hemotipa koji je aktivan prema više različitih meta je značajno iz dva razloga. S jedne strane, takva jedinjenja se mogu smatrati za PAINS,^{xliv} što je nepovoljan parametar u razvoju nekog leka. U nedavno objavljenoj reviji, skrenuta je pažnja na veliki broj strukturnih motiva koji mogu da izvrše kovalentnu modifikaciju (izotiazoloni, Michael-ovi akceptori), vežu brojne metale (hidroksifenil-hidrazoni) ili dovedu do generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (hinoni, fenol-sulfonamidi), ispoljavajući na taj način toksičnost. Posebnu meru opreza treba imati kada je u pitanju stabilnost jedinjenja u biološkim sistemima, zato što se nestabilna jedinjenja razlažu na manje molekule i daju lažne rezultate testova.¹⁴³ S druge strane, ukoliko je finim modifikacijama strukture moguće kontrolisati aktivnost, ukupni troškovi povezani sa sintezom bi bili smanjeni, a dobila bi se jedinjenja slične strukture koja leče više različitih oboljenja. U okviru ove doktorske disertacije, ispitivali smo inhibitornu aktivnost **benzotiofenskih derivata aminohinolina** prema BoNT/A, kao i prema parazitima *P. falciparum*. Uopšteno govoreći, benzotiofenski derivati sa benzilaminoalkil-mostom su pokazali bolju aktivnost prema BoNT/A LC, dok su derivati sa alifatičnim mostom normalnog niza aktivniji prema parazitima *P. falciparum*. Izdvojeno je nekoliko benzotiofenskih derivata sa najznačajnijim aktivnostima.

▫ Jedinjenja **75**, **77 (JK29)** i **84** su pokazala niske nM aktivnosti prema D6 (IC₅₀ = 5-8 nM) i W2 (IC₅₀ = 24-32 nM) sojevima *P. falciparum*. Dodatno, jedinjenje **77 (JK29)** primenjeno u dozi 160 mg/kg/dan × 3 dana, dovodi do izlečenja svih miševa inficiranih parazitima *P. berghei*. S druge strane, ova jedinjenja vrše inhibiciju BoNT/A LC <50%.

▫ Jedinjenja **80** i **82** i koja nisu dovela do izlečenja, ali su u Thomson-ovom testu omogućila preživljavanje 3/5 i 3/4 miševa zaraženih parazitima *P. falciparum*, pokazala su lošu aktivnost prema BoNT/A LC (33-40% inhibicije).

▫ Jedinjenje **20**, koje u preintoksikacionom modelu u mES-MN omogućava očuvanje SNAP-25 do 68% pri koncentraciji 20 μM, najmanje je aktivan benzotiofenski derivat prema tri soja *P. falciparum* (IC₅₀ > 570 nM).

^{xliv} Pan-Assay Interference Compounds, jedinjenja koja pokazuju aktivnost prema više različitih meta.

▫ Prisustvo hlora u položaju C(7) hinolinskog jezgra povoljno se odrazilo na benzotiofenske derivate sa alifatičnim mostom normalnog niza koji su pokazali bolje aktivnosti prema parazitima *P. falciparum* od svojih analoga bez hlora. Suprotno tome, najviši stepen inhibicije BoNT/A LC zabeležen je kod benzotiofenskih derivata sa benzilaminoalkil-mostom koji ne sadrže hlor u datom položaju.

Steroidni derivati aminohinolina su, u okviru ove doktorske disertacije, razmatrani kao inhibitori BoNT/A LC u *in vitro* proteolitičkom eseju i kao inhibitori holotoksina BoNT/A u mES-MN. Najaktivniji derivat **17 (JK141)** omogućava izvrsnu zaštitu SNAP-25 (čak 99% na 20 μ M) kada se primeni 30 minuta posle intoksikacije, čime se izdvaja ne samo u odnosu na ostale derivate ispitane u okviru ovog rada, nego i u odnosu na sve ostale do sada poznate inhibitore BoNT/A LC. Iako antimalarijska aktivnost steroidnih derivata aminohinolina nije bila predmet istraživanja ovog rada, jedinjenje **17 (JK141)** je testirano prema aseksualnim formama tri *P. falciparum* soja (D6, W2 i TM91C235) i ostvarilo je zanemarljivu aktivnost sa IC₅₀ vrednostima u opsegu 412-612 nM.

Dva najznačajnija jedinjenja **77 (JK29)** i **17 (JK141)** koja su proistekla iz istraživanja u okviru ove disertacije, ostvarila su izuzetnu aktivnost samo prema jednoj od dve ispitane mete. Imajući na umu prethodno spomenute nepovoljne karakteristike PAINS molekula, ova jedinjenja se mogu smatrati dobrim kandidatima za buduća istraživanja u polju antimalarika i inhibitora botulinum neurotoksina.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Tačke topljenja određivane su na aparatu Boetius PMHK i nisu korigovane. IR spektri su snimani na Thermo-Scientific Nicolet 6700 FT-IR diamond crystal spektrofotometru. Položaji apsorpcionih traka izraženi su u cm^{-1} . Oznake intenziteta apsorpcionih traka u IR spektrima: sl-slabo, sr-srednja, j-jaka. ^1H NMR i ^{13}C NMR spektri snimani su na Varian Gemini-200 spektrometru (na 200 i 50 MHz) i Bruker Ultrashield Advanced III spektrometru (na 500 i 125 MHz) u navedenom rastvaraču, sa TMS-om kao internim standardom. Hemijska pomeranja izražena su u ppm, konstante kuplovanja (J) u Hz, a multiplicitet signala je označen kao s (singlet), ps (proširen singlet), d (dublet), t(triplet), q (kvartet), quin (kvintet), sext (sextet), dd (dublet dubleta), td (triplet dubleta) i m (multiplet). ESI-MS spektri snimani su na Agilent Technologies 1200 Series, instrumentu koji je opremljen degaserom, autosemplerom, kolonom Zorbax Eclipse Plus C18 ($100 \times 2,1$ mm i. d.; $1,8 \mu\text{m}$) i DAD detektorom u kombinaciji sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies) u pozitivnom ili negativnom jon-modu sa $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ sa 0,2% HCOOH kao nosećim rastvaračem uzorka. Uzorci su rastvarani u čistom CH_3CN ili MeOH (HPLC čistoće). GC/MS analiza vršena je na sistemu koji čine: Agilent Technologies 7890A gasni hromatogram, 5975 MSD i FID detektor, DB-5 MS kolona ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ nm} \times 0,25 \mu\text{m}$). Kao noseći gas korišćen je He ($1,0 \text{ mL/min}$), a temperatura je linearno programirana u oblasti $40\text{-}310 \text{ }^\circ\text{C}$ ($6 \text{ }^\circ\text{C/min}$). Injekciona zapremina bila je $1 \mu\text{L}$, a temperatura $220 \text{ }^\circ\text{C}$. Temperatura FID detektora: $300 \text{ }^\circ\text{C}$. EI maseni spektri (70 eV) su snimani u opsegu $30\text{-}550 \text{ m/z}$. Za tankoslojnu hromatografiju korišćene su ploče SiO_2 i RP-18 (Merck). Za flash hromatografiju korišćen je Biotage SP1 sistem sa UV detektorom. Za dry flash hromatografiju korišćen je SiO_2 ($40\text{-}63 \mu\text{m}$). Reakcije izvedene pod uslovima ozračivanja MW rađene su u reaktoru Biotage Initiator 2.5. Čistoća (HPLC) jedinjenja je određivana pomoću Agilent 1200 HPLC sistema opremljenog sa Quat Pump (G1311B), Injector (G1329B) 1260 ALS, TCC 1260 (G1316A) i Detector 1260 DAD VL+ (G1315C). Čistoća jedinjenja (HPLC) je određivana pomoću Agilent 1200 HPLC sistema opremljenog sa Quat Pump (G1311B),

Injector (G1329B) 1260 ALS, TCC 1260 (G1316A) i Detector 1260 DAD VL+ (G1315C). HPLC analize su vršene u pet različitih sistema:

Metoda A. Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 x 150mm, 1.8 μ , S.N. USWKY01594 je korišćen kao stacionarna faza. Eluent se sastojao iz sledećih rastvarača: 0,2% HCOOH u vodi (A) i MeOH (B). Analize su vršene na UV maksimumu jedinjenja (na 330 nm za jedinjenja **17 (JK141), 20-22, 61-65, 67-72, 74-76, 78-89, 92-101, 121, 122, 125, 127-129**, na 254 nm za jedinjenja **66, 77 (JK29) i 124** i na 250 nm za jedinjenje **91**) da bi se postigla maksimalna selektivnost. Jedinjenja su rastvorena u MeOH, konačne koncentracije su bile ~1 mg/mL. Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min.

Jedinjenja **63, 65, 83, 92 i 93** su eluirana koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A.

Jedinjenja **20, 21, 66-69, 74, 75, 77 (JK29), 78, 81, 95-100, 122, 124, 125, 127** su eluirana koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A, 14-15 min 95%A.

Jedinjenje **22** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-5 min 95%A→5%A, 5-17 min 5%A, 17-19 min 5%A→95%A, 19-20 min 95%A.

Jedinjenja **61, 72, 79, 80, 82, 86, 88, 94** su eluirana koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A, 14-16 min 95%A.

Jedinjenja **62, 84 i 89** su eluirana koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A, 14-18 min 95%A.

Jedinjenja **17 (JK141), 121, 128, 129** su eluirana koristeći gradijent: 0-1,5 min 95%A, 1,5-5 min 95%A→5%A, 5-16 min 5%A, 16-18 min 5%A→95%A.

Jedinjenje **91** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A, 14-17 min 95%A.

Jedinjenje **101** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-13 min 5%A→95%A.

Metoda B. Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 x 150mm, 1.8 μ , S.N. USWKY01594 je korišćen kao stacionarna faza. Eluent se sastojao iz sledećih rastvarača: 0,2% HCOOH u vodi (A) i CH₃CN (B). Analize su vršene na UV maksimumu jedinjenja (na 330 nm za jedinjenja **17 (JK141), 20, 22, 61, 63-72, 74-76, 77 (JK29), 78, 79, 81, 83, 85, 86, 91, 93-97, 100, 101, 121, 122, 124, 125, 127-129** i na 254 nm za jedinjenja **21, 80, 82, 87, 89, 92, 98, 99** da bi se postigla maksimalna selektivnost. Jedinjenja su rastvorena u

MeOH, konačne koncentracije su bile ~1 mg/mL. Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min.

Jedinjenja **61, 63-65, 70-72, 76, 79, 83, 85-87, 89, 92-94** su eluirana koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A.

Jedinjenja **20, 21, 66-69, 74, 75, 77 (JK29), 78, 80-82, 95-101, 122, 124, 127** su eluirana koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A, 14-15 min 95%A.

Jedinjenja **17 (JK141), 121, 128, 129** su eluirana koristeći gradijent: 0-1,5 min 95%A, 1,5-5 min 95%A→5%A, 5-16 min 5%A, 16-18 min 5%A→95%A.

Jedinjenje **22** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-5 min 95%A→5%A, 5-17 min 5%A, 17-19 min 5%A→95%A, 19-20 min 95%A.

Jedinjenje **91** je eluirano koristeći gradijent: 0-1,5 min 95%A, 1-5 min 95%A→5%A, 5-16 min 5%A, 16-18 min 5%A→95%A, 18-20 min 95%A.

Jedinjenje **125** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-4 min 95%A→5%A, 4-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A, 14-15 min 95%A.

Metoda C. Poroshell 120 EC-C18, 4.6 x 50mm, 2.7 μ , S.N. USCFU07797 je korišćen kao stacionarna faza. Eluent se sastojao iz sledećih rastvarača: 0,2% HCOOH u vodi (A) i CH₃CN (B). Analize su rađene na UV maksimumu jedinjenja (na 254 nm za jedinjenja **62, 84, 88**) da bi se postigla maksimalna selektivnost. Jedinjenja su rastvorena u MeOH, konačne koncentracije su bile ~1 mg/mL. Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min.

Jedinjenja **62 i 84** su eluirana koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A, 14-17 min 95%A.

Jedinjenje **88** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→5%A, 6-11 min 5%A, 11-13 min 5%A→95%A, 13-17 min 95%A.

Metoda D. Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 x 100 mm, 1.8 μ , S.N. USUXU04444 je korišćen kao stacionarna faza. Eluent se sastojao iz sledećih rastvarača: 0,2% HCOOH u vodi (A) i MeOH (B). Analize su rađene na UV maksimumu jedinjenja (na 330 nm za jedinjenja **18 (JK227), 123, 126**, na 270 nm za jedinjenje **136** i na 254 nm za jedinjenja **23, 90**) da bi se postigla maksimalna selektivnost. Jedinjenja su rastvorena u MeOH, konačne koncentracije su bile ~1 mg/mL. Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min.

Jedinjenje **18 (JK227)** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-2 min 95%A→5%A, 2-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→95%A, 14-18 min 95%A.

Jedinjenje **90** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→ 5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→ 95%A, 14-18 min 95%A.

Jedinjenje **123** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→ 5%A, 6-11 min 5%A, 11-15 min 5%A→ 95%A, 15-20 min 95%A.

Jedinjenje **23, 126, 136** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→ 5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→ 95%A, 14-20 min 95%A.

Metoda E. Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 x 100 mm, 1.8 μ , S.N. USUXU04444 je korišćen kao stacionarna faza. Eluent se sastojao iz sledećih rastvarača: 0,2% HCOOH u vodi (A) i CH₃CN (B). Analize su rađene na UV maksimumu jedinjenja (na 330 nm za jedinjenje **126**, na 270 nm za jedinjenje **136** i na 254 nm za jedinjenja **18 (JK227), 23, 90, 123** da bi se postigla maksimalna selektivnost. Jedinjenja su rastvorena u MeOH, konačne koncentracije su bile ~1 mg/mL. Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min.

Jedinjenja **123** i **126** su eluirana koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→ 5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→ 95%A, 14-20 min 95%A.

Jedinjenja **18 (JK227)** i **90** su eluirana koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→ 5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→ 95%A, 14-18 min 95%A.

Jedinjenje **23** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-6 min 95%A→ 5%A, 6-11 min 5%A, 11-14 min 5%A→ 95%A, 14-20 min 95%A.

Jedinjenje **136** je eluirano koristeći gradijent: 0-1 min 95%A, 1-8 min 95%A→ 5%A, 8-12 min 5%A, 12-16 min 5%A→ 95%A, 16-20 min 95%A.

▣ Opšti eksperimentalni postupci

Postupak A: Sinteza metil-estara.¹¹³

Rastvoru difluorbenzaldehida ili bromfluorbenzaldehida (1 ekv) u deaerisanom DMSO, doda se metil-tioglikolat (1 ekv) i trietilamin (3 ekv) na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Smeša se zagreje na 80 °C i meša 2 h. Dobijeni proizvod se ekstrahuje etil-acetatom. Organski sloj se ispere destilovanom vodom, a zatim vodeni sloj ekstrahuje etil-acetatom. Spojeni organski slojevi se isperu zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

Postupak B: Sinteza karboksilnih kiselina baznom hidrolizom metil-estara.¹¹⁴

Metil-estar (1 ekv) se rastvori u smeši metanol/voda (8:1, v:v), a zatim se doda sprášeni KOH (3–5 ekv) i smeša se meša na sobnoj temperaturi 24 h. Upari se do suva, ohladi u ledenom kupatilu i doda voda. Ukapavanjem koncentrovane HCl, pH se podesi na 1. Proizvod se ekstrahuje smešom EtOAc/THF (5:1, v:v), ispere zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suši iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

Postupak C: Dekarboksilacija karboksilnih kiselina zagrevanjem u mikrotalasnom reaktoru.¹¹⁵

Rastvoru karboksilne kiseline (1 ekv) u *N,N*-dimetil-acetamidu doda se DBU (2,5 ekv) i reakciona smeša podvrgne dejstvu mikrotalasnog zračenja na 200 °C tokom 2 h. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

Postupak D: Sinteza cijano-derivata benzotiofena pomoću CuCN.^{116,144}

U spaljenom sudu, u atmosferi argona, brombenzotiofen (1 ekv) se rastvori u NMP. Doda se CuCN (2 ekv), smeša zagreje na 190 °C i meša 15 h. Posle hlađenja u ledenom kupatilu, doda se 33% vodeni rastvor etilendiamina. Reakciona smeša se prebaci u levak za odvajanje. Vodeni sloj se ispere tri puta dietil-etrom. Spojeni organski slojevi se isperu zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

Postupak E: Bromovanje benzotiofena.¹¹⁷

Fluor- ili cijano-supstituisani benzotiofen (1 ekv) se rastvori u dihlormetanu ili dihloretanu i ohladi u ledenom kupatilu. Zatim se doda rastvor Br₂ (1,1 ekv) u odgovarajućem rastvaraču. Reakciona smeša se meša 10 minuta na 0 °C, a zatim na sobnoj temperaturi. Tok reakcije se prati pomoću TLC (RP, MeOH) od 2 h do 4 dana. Reakcija se prekida dodavanjem čvrstog Na₂S₂O₃ do obezbojavanja reakcione smeše. Doda se voda i proizvod ekstrahuje dihlormetanom. Spojeni organski slojevi se isperu zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

Postupak F: Sinteza C-3 benzotiofenskih aldehida Rieche-ovim formilovanjem.¹¹⁸

U rastvor TiCl₄ (3–5 ekv) u dihlormetanu na –10 °C, polako, u kapima, se doda rastvor dihlorometil-metil-etra (6–10 ekv) u dihlormetanu. U taj rastvor se zatim doda rastvor benzotiofena (1 ekv) u dihlormetanu, smeša se meša na –10 °C tokom 1 h, a zatim

ostavi da se spontano zagreje do sobne temperature i mešanje produži tokom 24 h. Reakciona smeša se izlije u led/vodu, doda se koncentrovana HCl i meša sledećih 30 minuta. Proizvod se ekstrahuje dihlormetanom. Organski sloj se ispere zasićenim vodenim rastvorom NaHCO₃, zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suši iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

Postupak G: Sinteza aldehida Suzuki-jevim kuplovanjem.

Pd(OAc)₂ (5,00 mol%) se suspenduje u prethodno deaerisanom DME u inertnoj atmosferi Ar. Zatim se doda SPhos (20,0 mol%) u DME i meša 10 minuta. Doda se rastvor bromovanog benzotiofena (1 ekv) u DME, pa 2 M vodeni rastvor Na₂CO₃. Posle 5 minuta, doda se rastvor 4-formilfenilboronske kiseline (1,2 ekv) u deaerisanom EtOH. Smeša se još jedanput deariše pomoću argona i zagreva u mikrotalasnom reaktoru na 100 °C tokom 2 h. Reakciona smeša se pomoću dihlormetana prebaci u levak za odvajanje. Organski sloj se ispere destilovanom vodom i suši iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

Postupak H: Sinteza aminohinolina nukleofilnom aromatičnom supstitucijom.

Smeša 4,7-dihlorhinolina/4-hlorhinolina (1 ekv) i diaminoalkana (7 ekv) zagreva se u mikrotalasnom reaktoru (*Biotage Initiator 2.5 apparatus*) po sledećem režimu: 15 minuta na 80 °C, 30 minuta na 95 °C i 1,5 h na 130 °C. Reakciona smeša se izlije u smešu led/voda i izdvojeni talog procedi na Büchner-ovom levku ili se pomoću CH₂Cl₂/1M NaOH prenese u levak za odvajanje i organski sloj ispere 1M vodenim rastvorom NaOH. Suši se iznad anhidrovanog Na₂SO₄. U slučaju obrade reakcione smeše ekstrakcijom, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni.

Postupak I: Sinteza N-Boc i N-Cbz zaštićenih aminohinolina.²⁷

Smeša 4,7-dihlorhinolina/4-hlorhinolina (1 ekv) i mono-Boc ili mono-Cbz zaštićenog diaminoalkana (1,1–1,5 ekv) se postepeno zagreva do 80 °C tokom 1 h, a zatim se mešanje produži 6–8 h na 120–130 °C. Posle hlađenja do s.t., reakciona smeša se pomoću CH₂Cl₂/1M NaOH prenese u levak za odvajanje i organski sloj ispere 1M vodenim rastvorom NaOH. Suši se iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni.

Postupak J: Deprotekcija Boc-zaštitne grupe pomoću CF₃COOH.

Rastvor N-Boc-zaštićenog amina u smeši CF₃COOH/CH₂Cl₂ (1:10, v:v), meša se na s.t. tokom 6 h. Rastvarači se upare na vakuum-uparivaču, a čvrsti ostatak se pomoću

CH₂Cl₂/2,5M NaOH prenese u levak za odvajanje i organski sloj ispere 2,5 M vodenim rastvorom NaOH. Suši se iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom.

Postupak K: Opšta metoda za reduktivno aminovanje.

Amin (1,5 ekv) i odgovarajući aldehid (1 ekv) se rastvore u smeši MeOH/CH₂Cl₂ (2:1, v:v). Doda se glac. AcOH (1,5 ekv) i smeša se meša na sobnoj temperaturi tokom 3 h. Doda se NaBH₄ (6 ekv) i mešanje produži narednih 18 h. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom, a ostatak se pomoću CH₂Cl₂ i 2M NH₄OH prenese u levak za odvajanje. Organski sloj se ispere 2M NH₄OH, zasićenim vodenim rastvorom NaCl, i suši iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

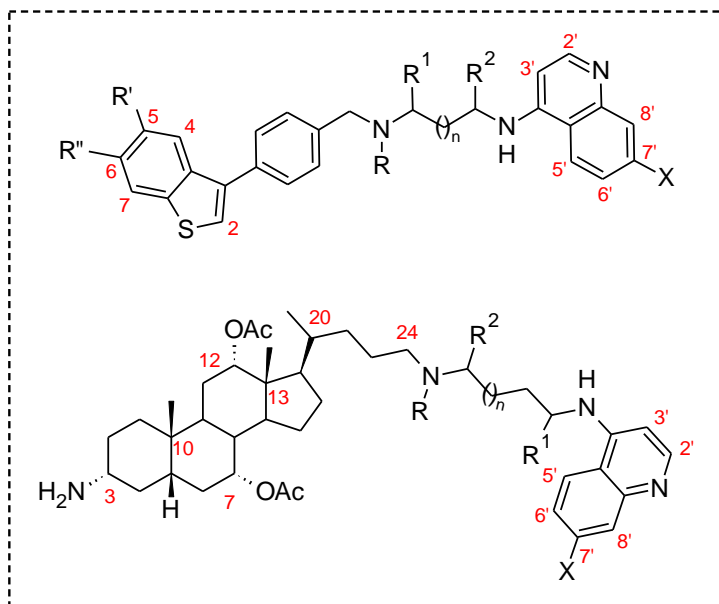
Postupak L: N-alkilovanje aminohinolina.¹¹⁹

Rastvoru aminohinolina (1 ekv) u MeOH doda se odgovarajuće karbonilno jedinjenje (2–7 ekv), a zatim smeša ZnCl₂ (2–4 ekv) i NaHB₃CN (1–7 ekv) u MeOH. Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi tokom 4 h. pH se podesi na 10 dodatkom 0,4 M vodenog rastvora NaOH i rastvarač ukloni pod sniženim pritiskom. Ostatak se pomoću CH₂Cl₂ prenese u levak za odvajanje. Organski sloj se ispere vodenim rastvorom amonijaka, zasićenim vodenim rastvorom NaHCO₃ i zasićenim vodenim rastvorom NaCl. Suši se iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

Postupak M: Sinteza steroidnih derivata reduktivnim aminovanjem.¹⁰¹

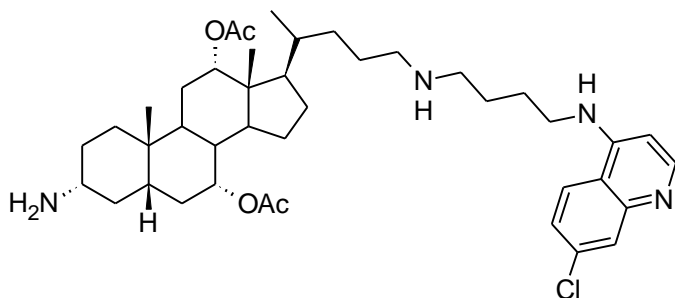
Alkohol (1 ekv) se rastvori u CH₂Cl₂. Doda se PCC (1,4–1,5 ekv) i smeša se meša na sobnoj temperaturi tokom 3,5 h. Reakciona smeša se procedi kroz kratku kolonu SiO₂ (eluent CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/EtOAc gradijent od 9/1 do 7/3). Sirovi aldehid se rastvori u suvom MeOH, doda se odgovarajući amin (1–1,4 ekv) i smeša se meša na sobnoj temperaturi preko noći. Zatim se doda NaBH₄ (1,4–1,9 ekv) i mešanje produži još 4–6 h. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom, a proizvod prečisti hromatografijom na stubu.

▣ Opšta numeracija benzotiofenskih i steroidnih derivata aminohinolina



▣ Sinteza

(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-((4-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]butil)amino)holan-7,12-diil-diacetat (**17**=JK141).

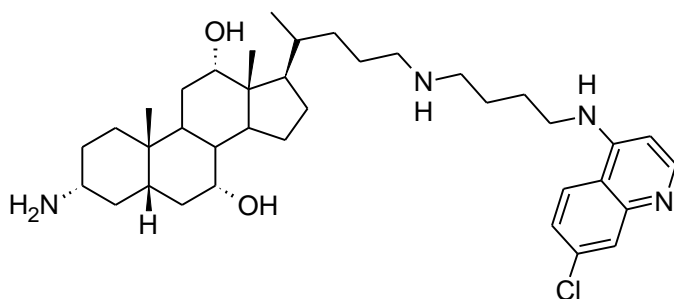


Jedinjenje **17** (JK141) se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **111** (590,0 mg, 0,7288 mmol) i CF₃COOH/CH₂Cl₂ (25 mL). Prinos 502,4 mg (97%). Pena,

bele boje, topi se na 79–82 °C. $[\alpha]_D^{20} = +78,2$ (MeOH). IR (ATR): 3554sl, 3401sl, 3329sl, 2935j, 2863sr, 1941sl, 1727j, 1647sl, 1610sl, 1580j, 1542sl, 1448sl, 1374sr, 1332sl, 1246sr, 1134sl, 1078sl, 1026sl, 969sl, 930sl, 891sl, 848sl, 809sl, 773sl, 721sl, 570sl, 537sl, 455sl, 423sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,53-8,49 (m, H-C(2')), 7,96-7,92 (m, H-C(8')), 7,72 (d, $J = 8,9$, H-C(5')), 7,34-7,30 (m, H-C(6')), 6,38-6,35 (m, H-C(3')), 6,03 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 5,10-5,06 (m, H-C(12)), 4,91-4,86 (m, H-

C(7)), 3,33-3,27 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,73-2,68 (m, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂-), 2,65-2,53 (m, 2H-C(24) i H-C(3)), 2,11 (s, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,07 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,82 (d, 3H, *J* = 6,4, CH₃-C(20)), 0,72 (s, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,65; 170,62; 152,06; 149,96; 149,17; 134,65; 128,70; 124,88; 121,38; 117,30; 98,83; 75,51; 70,91; 51,64; 50,52; 49,14; 47,54; 45,01; 43,40; 43,18; 41,50; 39,51; 37,76; 35,51; 34,95; 34,36; 33,36; 31,43; 31,25; 28,98; 27,85; 27,26; 26,53; 26,27; 25,58; 22,78; 21,63; 21,47; 17,88; 12,19. HRMS: *m/z* 709,44393 odgovara molekularnoj formuli C₄₁H₆₁ClN₄O₄H⁺ (greška u ppm - 2,08). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 9,189, površina 95,02%; metoda B: RT 7,825, površina 97,26%.

(3α,5β,7α,12α)-3-Amino-24-({4-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]butil}amino)holan-7,12-diol (18=JK227).

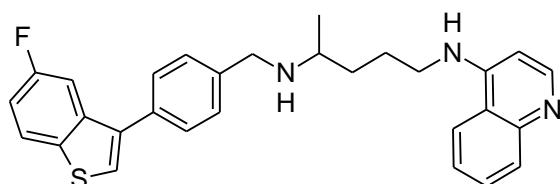


17 (JK141) (20,0 mg, 0,0282 mmol) se rastvori u MeOH (1 mL), doda se čvrst KOH (31,6 mg, 0,564 mmol) i smeša zagreva na 60 °C tokom 5 dana. Rastvarač se ukloni pod sniženim

pritiskom, a suvi ostatak pomoću CH₂Cl₂ i vode prenese u levak za odvajanje. Organski sloj se ispere vodom i suši iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, RP kolona, 12+M, eluent MeOH/H₂O gradijent od 7/3 do 1/9, MeOH). Prinos 12 mg (68%). Pena, bleđožute boje, omekšava na 116–119 °C. [α]_D²⁰ = +26,2 (MeOH). IR (ATR): 3282sr, 2932j, 2861sr, 1609sl, 1581j, 1541sl, 1453sr, 1372sr, 1333sl, 1281sl, 1251sl, 1201sl, 1136sl, 1081sl, 1038sl, 982sl, 952sl, 908sl, 878sl, 852sl, 807sl, 767sl, 736sl, 645sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,49 (d, *J* = 5,5, H-C(2')), 7,97-7,92 (m, H-C(8')), 7,78 (d, *J* = 8,8, H-C(5')), 7,34-7,29 (m, H-C(6')), 6,44 (ps, H-N), 6,36 (d, *J* = 5,4, H-C(3')), 3,97-3,91 (m, H-C(12)), 3,85-3,79 (m, H-C(7)), 3,34-3,24 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,75-2,67 (m, 3H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂- i H-C(3)), 2,65-2,51 (m, 4H, 2H-C(24) i 2 H-O), 0,98-0,93 (m, 3H, CH₃-C(20)), 0,87 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,64 (s, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 152,03; 150,24; 149,17; 134,66; 128,53; 124,84; 121,90; 117,48;

98,82; 72,80; 68,13; 51,72; 50,46; 49,10; 46,90; 46,32; 43,26; 41,94; 41,89; 39,60; 35,87; 35,44; 34,68; 34,58; 33,42; 28,29; 27,73; 27,55; 26,59; 26,36; 26,19; 23,21; 22,67; 17,71; 12,48. HRMS: m/z 625,42214 odgovara molekulknoj formuli $C_{37}H_{57}ClN_4O_2H^+$ (greška u ppm -3,42). HPLC čistoća: metoda D ($\lambda = 330$ nm): RT 8,685, površina 97,90%; metoda E ($\lambda = 254$ nm): RT 8,713, površina 96,63%.

N^4 -[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]- N^1 -hinolin-4-ilpentan-1,4-diamin (20).

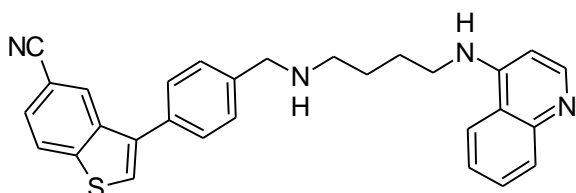


Jedinjenje **20** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **57** (170 mg, 0,66 mmol), N^1 -(hinolin-4-il)pentan-1,4-diamin **152** (213 mg, 0,929

mmol), glac. AcOH (50 μ L, 0,9 mmol), $NaBH_4$ (150,6 mg, 3,980 mmol) i MeOH/ CH_2Cl_2 (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/1, MeOH; flash, Biotage SP1, SiO_2 kolona, eluent EtOAc/MeOH+ NH_3 (9/1) gradijent od 95/5 do 65/35). Prinos 239 mg (77%). Pena, bele boje, topi se na 41 – 44 $^{\circ}C$. IR (ATR): 3257sr, 3070sr, 2958sr, 2866sr, 1581j, 1540sr, 1495sl, 1438sr, 1374sl, 1340sl, 1252sl, 1196sl, 1117sl, 1020sl, 883sl, 862sl, 809sl, 768sl, 652sl, 438sl cm^{-1} . 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$, δ): 8,53 (d, $J = 5,3$, H-C(2')), 7,98-7,95 (m, H-C(8')), 7,81 (dd, $J_1 = 8,7$, $J_2 = 4,8$, H-C(7)), 7,73-7,70 (m, H-C(5')), 7,60-7,52 (m, 2H, H-C(7') i H-C(4)), 7,51-7,47 (m, 2H-Ar), 7,46-7,42 (m, 3H, 2H-Ar i H-C(2)), 7,34-7,29 (m, H-C(6')), 7,16-7,10 (m, H-C(6)), 6,39 (d, $J = 5,3$, H-C(3')), 5,67 (ps, H-N izmenjiv sa D_2O), 3,93; 3,82 (ABq, 2H, $J_{AB} = 13,0$, Ar CH_2 -), 3,36-3,26 (m, 2H, ArNH CH_2 -), 2,88-2,80 (m, Ar $CH_2NHCH(CH_3)$ -), 2,06 (ps, H-N izmenjiv sa D_2O), 1,94-1,78 (m, 2H, ArNH CH_2CH_2 -), 1,69-1,55 (m, 2H, ArNH $CH_2CH_2CH_2$ -), 1,18 (d, 3H, $J = 6,3$, Ar $CH_2NHCH(CH_3)$ -). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, δ): 161,08 (d, $J = 239,6$); 151,02; 149,79; 148,38; 140,15; 139,08 (d, $J = 9,0$); 137,59 (d, $J = 4,1$); 135,97; 134,26; 129,87; 128,91; 128,62; 128,57; 125,60; 124,43; 123,98 (d, $J = 9,0$); 119,42; 118,77; 113,31 (d, $J = 25,3$); 108,50 (d, $J = 23,5$); 98,67; 52,17; 50,97; 43,48; 34,60; 25,10; 20,50. HRMS: m/z 470,20588 odgovara molekulknoj

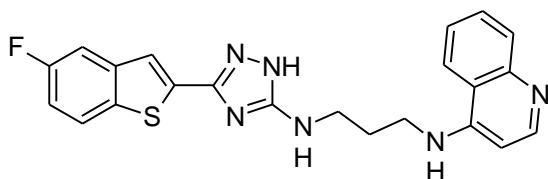
formuli $C_{29}H_{28}FN_3SH^+$ (greška u ppm -0,40). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 7,766, površina 95,04%; metoda B: RT 7,737, površina 95,17%.

3-[4-([4-(Hinolin-4-ilamino)butil]amino)metil]fenil]-1-benzotiofen-5-karbonitril (21).



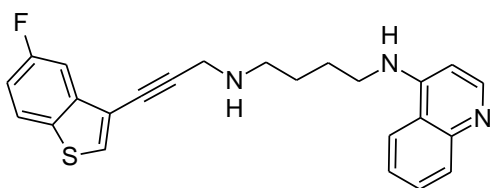
Jedinjenje **21** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **58** (97,4 mg, 0,370 mmol), **AQ8** (119,5 mg, 0,5548 mmol), glac. AcOH (32 μ L, 0,55 mmol), $NaBH_4$ (84,0 mg, 2,22 mmol) i MeOH/ CH_2Cl_2 (18 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 7/3; flash, Biotage SP1, SiO_2 kolona, eluent EtOAc/MeOH+ NH_3 (9/1) gradijent od 95/5 do 8/2). Prinos 35,9 mg (20%). Pena, bele boje, topi se na 54–60 $^{\circ}C$. IR (ATR): 3280sr, 3078sr, 2932sr, 2856sr, 2225sr, 1617sl, 1580j, 1541sr, 1495sl, 1437sl, 1398sl, 1374sl, 1341sr, 1256sl, 1222sl, 1129sl, 1058sl, 808sr, 765sr, 655sl, 560sl cm^{-1} . 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ): 8,54 (d, $J = 5,2$, H-C(2')), 8,21-8,18 (m, H-C(4)), 8,01-7,95 (m, H-C(7) i H-C(8')), 7,75 (d, $J = 8,4$, H-C(5')), 7,62-7,57 (m, H-C(7') i H-C(6')), 7,52 (s, H-C(2)), 7,51-7,46 (m, 4H-Ar), 7,37-7,32 (m, H-C(6')), 6,41 (d, $J = 5,2$, H-C(3')), 5,69 (ps, H-N izmenjiv sa D_2O), 3,92 (s, 2H, $ArCH_2-$), 3,39-3,33 (m, 2H, $ArNHCH_2-$), 2,80 (t, $J = 6,8$, 2H, $ArCH_2NHCH_2-$), 1,95-1,83 (m, 3H, $ArNHCH_2CH_2-$ i H-N izmenjiv sa D_2O), 1,80-1,71 (m, 2H, $ArCH_2NHCH_2CH_2-$). ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$, δ): 150,90; 149,88; 148,26; 144,75; 140,35; 137,90; 133,31; 129,75; 128,94; 128,74; 128,71; 127,71; 126,27; 125,52; 124,43; 123,91; 119,51; 119,42; 118,76; 108,14; 98,62; 53,63; 48,74; 43,18; 27,76; 26,46. HRMS: m/z 232,10162 odgovara molekulskej formuli $C_{29}H_{26}N_4SH_2^{2+}$ (greška u ppm 1,88); m/z 463,19503 odgovara molekulskej formuli $C_{29}H_{26}N_4SH^+$ (greška u ppm -0,14). HPLC čistoća: metoda A ($\lambda = 330$ nm): RT 8,902, površina 96,09%; metoda B ($\lambda = 254$ nm): RT 7,653, površina 96,05%.

***N*-[3-(5-fluor-1-benzotien-2-il)-1*H*-1,2,4-triazol-5-il]-*N'*-(hinolin-4-il)propan-1,3-diamin (22).**



Smeša **105** (182 mg, 0,288 mmol) i 4-hlorhinolina (39,3 mg, 0,240 mmol) se zagreva na 140 °C tokom 1,5 h u uljanom kupatilu. Nakon što smeša očvrstne, doda se *n*-PrOH (1 mL) i reakciona smeša zagreje na 170 °C u mikrotalasnom reaktoru (*Biotage Initiator 2.5 apparatus*). Posle 2 h, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent DCM, DCM/MeOH(NH₃ zas.) gradijent od 95/5 do 9/1; flash, Biotage SP, NH kolona, 12+M, eluent heksan/EtOAc gradijent od 2/8 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9). Prinos 12,6 mg (12%). Čvrsta praškasta supstanca, bele boje, topi se na 248–249 °C. IR (ATR): 3439sl, 3266sl, 3225sl, 3181sl, 3136sl, 3064sl, 2954sl, 2845sl, 2668sl, 1637sr, 1583j, 1536sr, 1496sl, 1453sl, 1397sl, 1375sl, 1343sr, 1288sl, 1200sl, 1128sl, 1057sl, 997sl, 953sl, 928sl, 889sl, 852sl, 807sl, 751sr, 714sl, 652sl, 532sl, 475sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, d-TFA, δ): 8,26 (d, *J* = 7, H-C(2')), 8,18 (d, *J* = 8,2, H-C(8')), 7,96-7,92 (m, H-C(6')), 7,89 (s, H-C(3)), 7,83-7,78 (m, 2H, H-C(5') i H-C(7)), 7,75-7,70 (m, H-C(7')), 7,54-7,50 (m, H-C(4)), 7,27-7,21 (m, H-C(6)), 6,82 (d, *J* = 7,3, H-C(3')), 3,85-3,77 (m, 4H, ArNHCH₂CH₂CH₂-), 3,41-3,32 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, d-TFA, δ): 163,98 (d, *J* = 241,9); 159,03; 153,48; 148,96; 143,52; 141,90 (d, *J* = 9,9); 139,65; 138,67; 136,82; 130,29; 129,78 (d, *J* = 4,5); 126,92; 125,70 (d, *J* = 9,0); 123,42; 121,98; 118,98 (d, *J* = 26,2); 118,92; 112,41 (d, *J* = 23,5); 99,86; 43,57; 42,88; 29,14. HRMS: *m/z* 210,07548 odgovara molekulskej formuli C₂₂H₁₉FN₆SH₂²⁺ (greška u ppm -2,84); *m/z* 419,14528 odgovara molekulskej formuli C₂₂H₁₉FN₆SH⁺ (greška u ppm 0,98). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 9,024, površina 98,71%; metoda B: RT 7,520, površina 97,95%.

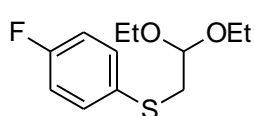
***N*-[3-(5-fluor-1-benzotien-3-il)prop-2-in-1-il]-*N'*-(hinolin-4-il)butan-1,4-diamin (23).**



U spaljenu kivetu (dimenzija 0,2-0,5 mL) u atmosferi Ar sipa se redom: rastvor **48** (11,7 mg, 0,0507 mmol) u DMF (0,1 mL), PdCl₂(PPh₃)₂ (2,1 mg, 6,0 mol%), PPh₃ (2,6

mg, 20 mol%), rastvor **108** (10,7 mg, 0,0422 mmol) u DMF (0,1 mL), CuI (0,6 mg, 6 mol%) i Et₂NH (78 μL, 0,71 mmol). Smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru (*Biotage Initiator 2.5 apparatus*) na 120 °C tokom 25 minuta. Posle hlađenja do s.t., smeša se prebaci u levak za odvajanje, doda se CH₂Cl₂ i organski sloj ispere zasićenim vodenim rastvorom NaCl (uz kap vodenog NH₃). Suši se iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, NH kolona, 12+M, eluent heksan/EtOAc gradijent od 2/8 do EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/1). Prinos 5,4 mg (27%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3440sl, 3250sr, 3067sr, 2930sr, 2858sr, 1582j, 1542sr, 1442sr, 1396sl, 1374sl, 1340sr, 1298sl, 1248sl, 1196sl, 1129sl, 1100sl, 1036sl, 947sl, 874sl, 808sl, 764sr, 736sl, 650sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ): 8,53 (d, *J* = 5,6, H-C(2')), 8,01-7,93 (m, H-C(8')), 7,83-7,71 (m, 2H, H-C(5') i H-C(7)), 7,70-7,50 (m, 3H, H-C(7'), H-C(4) i H-C(2)), 7,45-7,34 (m, H-C(6')), 7,21-7,08 (m, H-C(6)), 6,40 (d, *J* = 5,6, H-C(3')), 5,72 (ps, *H-N*), 3,78 (s, 2H, -CH₂C≡C-Ar), 3,41-3,29 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,98-2,87 (m, 2H, ArNH(CH₂)₃CH₂-), 2,01-1,68 (m, 5H, ArNHCH₂CH₂CH₂- i *H-N*). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 161,21 (d, *J* = 241,9); 150,66; 150,04; 147,99; 134,12; 131,93; 129,50; 129,05; 124,53; 123,82 (d, *J* = 9,0); 119,62; 118,74; 117,95; 113,99 (d, *J* = 25,3); 111,78; 108,52 (d, *J* = 23,5); 98,55; 90,30; 76,47; 48,12; 43,18; 39,11; 27,57; 26,43. HRMS: *m/z* 404,15750 odgovara molekularnoj formuli C₂₄H₂₂FN₃SH⁺ (greška u ppm -4,00). HPLC čistoća (λ = 254 nm): metoda D: RT 10,106, površina 96,11%; metoda E: RT 8,432, površina 95,69%.

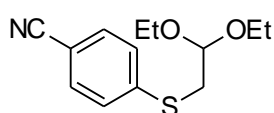
1-[(2,2-Dietoksietil)sulfanil]-4-fluorbenzen (**28**).¹¹²



4-Fluortiofenol (165 μL, 1,56 mmol) se rastvori u sveže destilovanom i deaerisanom DMF-u (2 mL) u atmosferi argona. Doda se 2-brom-1,1-dietoksietan (235 μL, 1,56 mmol) i balon ohladi u ledenom kupatilu. Doda se čvrst, sprášeni K₂CO₃ (431 mg, 3,12 mmol), reakciona smeša se meša 5 minuta na 0 °C, a zatim 2 h na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša se pomoću etil-acetata prenese u levak za odvajanje i ispere dva puta vodom. Organski sloj se suši iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent 95/5 do 8/2). Prinos 366,7 mg (96%). Bezbojna tečnost. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 7,42-7,37 (m, 2H-Ar), 7,01-6,96 (m, 2H-Ar), 4,61 (t, *J* = 5,5, H-C(2)), 3,69-3,61 (m,

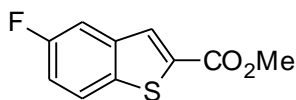
2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,56-3,49 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,07 (d, $J = 5,5$, 2H-C(1)), 1,19 (t, $J = 7,1$, 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 161,81 (d, $J = 245,5$); 132,40 (d, $J = 8,1$); 131,23; 115,91 (d, $J = 21,7$); 101,79; 62,05; 38,58; 15,19.

4-[(2,2-Dietoksietil)sulfanil]benzonitril (29).



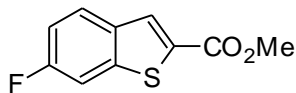
Rastvor natrijum-sulfida-monohidrata (198,3 mg, 0,8257 mmol) u DMF-u (1 mL) zagreva se na 50 °C u atmosferi argona. Odvojeno se napravi rastvor 4-fluorbenzonitrila (100,0 mg, 0,8257 mmol) u DMF-u (1 mL) i ukapa u rastvor natrijum-sulfida. Posle 4 h doda se 2-brom-1,1-dietoksietan (125 μL , 0,826 mmol) i mešanje nastavi na sobnoj temperaturi preko noći. Rastvarač se upari na vakuum-uparivaču. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent 95/5 do 9/1). Prinos 33,8 mg (16%). GC/MS (m/z , %): 251,1 ($[\text{M}^+]$, 1), 205,0 (33), 103,1 (100).

Metil-5-fluor-1-benzotiofen-2-karboksilat (34).¹⁴⁵



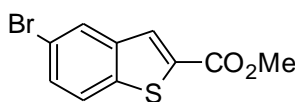
Jedinjenje **34** se sintetiše po opštem postupku A, korišćenjem 2,5-difluorbenzaldehida (5,00 g, 35,2 mmol), metil-tioglikolata (3,15 mL, 35,2 mmol) i trietilamina (14,7 mL, 105,6 mmol) u DMSO (20 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc = 95/5). Prinos 3,18 g (43%). Bezbojna kristalna supstanca, topi se na 68 – 71 °C. IR (ATR): 3409sl, 3240sl, 3087sl, 2961sl, 2846sl, 2772sl, 1717j, 1607sl, 1574sl, 1527j, 1497sl, 1430sr, 1327sl, 1295sl, 1253j, 1204j, 1144sl, 1078sl, 1057sl, 944sl, 876sl, 809sl, 770sl, 750sl, 708sl, 651sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,00 (s, H-C(3)), 7,80 (dd, $J_1 = 4,6$, $J_2 = 8,7$, H-C(7)), 7,55-7,51 (m, H-C(4)), 7,25-7,20 (m, H-C(6)), 3,95 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 162,89; 160,90 (d, $J = 241,9$); 139,54 (d, $J = 9,9$); 137,65; 135,73; 129,98 (d, $J = 4,5$); 124,08 (d, $J = 9,0$); 116,19 (d, $J = 25,3$); 110,56 (d, $J = 22,6$); 52,60. GC/MS (m/z , %): 210,0 ($[\text{M}^+]$, 64), 179,0 (100), 151,0 (20), 107,0 (45).

Metil-6-fluor-1-benzotiofen-2-karboksilat (35).¹⁴⁶



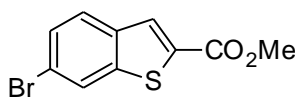
Jedinjenje **35** se sintetiše po opštem postupku A, korišćenjem 2,4-difluorbenzaldehida (7,91 g, 55,6 mmol), metil-tioglikolata (4,97 mL, 55,6 mmol) i trietilamina (23,3 mL, 167 mmol) u DMSO (25 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc = 95/5). Prinos 2,22 g (19%). Bezbojna kristalna supstanca, topi se na 86 – 89 °C. IR (ATR): 3413sl, 3106sl, 3065sl, 2960sl, 2847sl, 1726j, 1609sl, 1567sl, 1527sr, 1465sl, 1434sl, 1338sl, 1308sl, 1250j, 1193sr, 1068sl, 1045sl, 960sl, 908sl, 884sl, 849sl, 803sl, 777sl, 751sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,02 (s, H-C(3)), 7,83 (dd, *J*₁ = 5,2, *J*₂ = 8,8, H-C(4)), 7,55-7,51 (m, H-C(7)), 7,19-7,14 (m, H-C(5)), 3,94 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 162,88; 162,02 (d, *J* = 247,3); 143,36 (d, *J* = 10,8); 135,23; 133,18 (d, *J* = 3,6); 130,08; 126,89 (d, *J* = 9,0); 114,48 (d, *J* = 25,4); 108,69 (d, *J* = 25,3); 52,52. HRMS: *m/z* 211,02230 odgovara molekulknoj formuli C₁₀H₇FO₂SH⁺ (greška u ppm -0,27).

Metil-5-brom-1-benzotiofen-2-karboksilat (36).¹⁴⁷



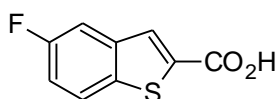
Jedinjenje **36** se sintetiše po opštem postupku A, korišćenjem 5-brom-2-fluorbenzaldehida (1,00 g, 4,92 mmol), metil-tioglikolata (0,44 mL, 4,9 mmol) i trietilamina (2,06 mL, 14,8 mmol) u DMSO (7 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc = 95/5). Prinos 1,19 g (89%). Kristalna supstanca, bleožute boje, topi se na 110 °C. IR (ATR): 3083sl, 2999sl, 2956sl, 1720j, 1554sr, 1517j, 1435sr, 1310sl, 1285sr, 1251j, 1196sr, 1168sr, 1062sr, 949sl, 882sr, 796sr, 750sr, 711sl, 542sl, 479sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,02-8,00 (m, H-C(4)), 7,98-7,96 (m, H-C(3)), 7,74-7,70 (m, H-C(7)), 7,54 (dd, *J*₁ = 1,9, *J*₂ = 8,6, H-C(6)), 3,95 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 162,76; 140,64; 140,17; 135,12; 130,02; 129,43; 127,96; 124,10; 118,91; 52,64. HRMS: *m/z* 270,94220 odgovara molekulknoj formuli C₁₀H₇BrO₂SH⁺ (greška u ppm -0,32).

Metil-6-brom-1-benzotiofen-2-karboksilat (37).¹⁴⁸



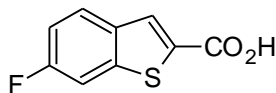
Jedinjenje **37** se sintetishe po opštem postupku A, korišćenjem 4-brom-2-fluorbenzaldehyda (5,00 g, 24,6 mmol), metil-tioglikolata (2,20 mL, 24,6 mmol) i trietilamina (10,3 mL, 73,8 mmol) u DMSO (20 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc = 9/1). Prinos 5,1 g (76%). Kristalna supstanca, bleđozute boje, topi se na 114 °C. IR (ATR): 3405sl, 3068sl, 2956sl, 2842sl, 1805sl, 1710j, 1580sr, 1503sr, 1429sr, 1380sr, 1329sl, 1307sr, 1283j, 1192sr, 1169j, 1136sr, 1086j, 1062j, 956sl, 917sr, 865j, 809j, 751j, 719sr, 700sl, 641sl, 565sr, 490sl, 456sl, 429sr, 403sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,02-7,99 (m, H-C(7) i H-C(2)), 7,72 (d, *J* = 8,4, H-C(4)), 7,51 (dd, *J*₁ = 1,7, *J*₂ = 8,6, H-C(5)), 3,94 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 162,84; 143,47; 137,34; 133,90; 130,09; 128,58; 126,54; 125,28; 121,26; 52,60. GC/MS (*m/z*, %): 271,9 ([M⁺], 87), 269,9 (89), 240,9 (100), 210,9 (22), 168,9 (20), 131,9 (41).

5-Fluor-1-benzotiofen-2-karboksilna kiselina (38).¹⁴⁹



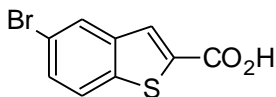
Jedinjenje **38** se sintetishe po opštem postupku B, korišćenjem metil-estra **34** (1,3 g, 6,2 mmol) i KOH (1,73 g, 30,9 mmol) u smeši MeOH/H₂O (160 mL/20 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH gradijent 9/1 do 7/3). Prinos 850 mg (70%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 220–224 °C. IR (ATR): 2966sr, 2848sr, 2803sr, 2633sr, 2565sr, 2524sr, 1677j, 1603sl, 1571sl, 1525j, 1446sl, 1409sr, 1332sl, 1305j, 1271j, 1242sl, 1209j, 1147sl, 1130sl, 1079sl, 1055sl, 954sl, 930sl, 882sl, 809sl, 760sl, 711sl, 655sl, 598sl, 509sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,03-8,01 (m, H-C(3)), 7,94-7,90 (m, H-C(7)), 7,64 (dd, *J*₁ = 2,5, *J*₂ = 9,2, H-C(4)), 7,28 (td, *J*₁ = 2,8, *J*₂ = 8,9, H-C(6)). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 166,55; 162,33 (d, *J* = 240,1); 141,31 (d, *J* = 9,9); 139,21; 131,21 (d, *J* = 3,6); 131,11; 125,39 (d, *J* = 9,0); 116,94 (d, *J* = 25,3); 111,42 (d, *J* = 22,6). HRMS: *m/z* 194,99273 odgovara molekulske formuli [C₉H₅SFO₂-H]⁻ (greška u ppm 2,98).

6-Fluor-1-benzotiofen-2-karboksilna kiselina (39).¹⁴⁹



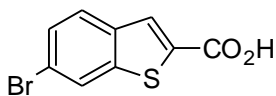
Jedinjenje **39** se sintetiše po opštem postupku B, korišćenjem metil-estra **35** (247 mg, 1,18 mmol) i KOH (329,6 mg, 5,875 mmol) u smeši MeOH/H₂O (16 mL/2 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH=9/1). Prinos 171 mg (74%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 182–186 °C. IR (ATR): 2811sl, 2575sl, 1665j, 1604sr, 1566sl, 1523j, 1468sl, 1438sr, 1341sl, 1319sr, 1279sl, 1255sr, 1196sr, 1177sl, 1062sl, 921sl, 870sl, 845sl, 806sl, 759sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,04-8,03 (m, H-C(3)), 7,94 (dd, *J*₁ = 5,3, *J*₂ = 8,7, H-C(4)), 7,70-7,66 (m, H-C(7)), 7,22 (td, *J*₁ = 2,5, *J*₂ = 9,2, H-C(5)). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 165,38; 163,45 (d, *J* = 244,6); 144,88 (d, *J* = 10,8); 137,06; 135,81 (d, *J* = 3,6); 131,13; 128,29 (d, *J* = 9,9); 115,29 (d, *J* = 24,4); 109,55 (d, *J* = 25,3). HRMS: *m/z* 194,99178 odgovara molekulknoj formuli [C₉H₅SFO₂-H]⁻ (greška u ppm -1,91).

5-Brom-1-benzotiofen-2-karboksilna kiselina (40).¹⁴⁷



Jedinjenje **40** se sintetiše po opštem postupku B, korišćenjem metil-estra **36** (1,19 g, 4,39 mmol) i KOH (738,1 mg, 13,15 mmol) u smeši MeOH/H₂O (80 mL/10 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH=9/1). Prinos 1,01 g (90%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 234–236 °C. IR (ATR): 2977sr, 2828sr, 2662sr, 2557sr, 1667j, 1551j, 1517j, 1439sr, 1401sl, 1302j, 1265sr, 1178j, 1072sl, 1042sl, 936sl, 886sr, 799sr, 759sr, 711sl, 600sl, 507sl, 473sl, 424sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,11-8,09 (m, H-C(4)), 8,00-7,98 (m, H-C(3)), 7,84-7,81 (m, H-C(7)), 7,56 (dd, *J*₁ = 1,9, *J*₂ = 8,7, H-C(6)). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 165,24; 142,17; 141,96; 137,87; 130,95; 130,55; 129,05; 125,41; 119,80. HRMS: *m/z* 254,91145 odgovara molekulknoj formuli [C₉H₅BrO₂S-H]⁻ (greška u ppm -2,52).

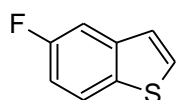
6-Brom-1-benzotiofen-2-karboksilna kiselina (41).¹⁵⁰



Jedinjenje **41** se sintetiše po opštem postupku B, korišćenjem metil-estra **37** (2,00 g, 7,38 mmol) i KOH (1,24 g, 22,1 mmol) u smeši MeOH/H₂O (200 mL/25 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent 9/1

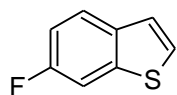
do 1/1). Prinos 1,80 g (95%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 260–265 °C. IR (ATR): 3082sr, 2982sr, 2839sr, 2690sr, 2579sr, 1664j, 1586sr, 1552sl, 1513sr, 1425sr, 1383sl, 1333sl, 1316sr, 1276sl, 1244sl, 1181sl, 1139sl, 1090sl, 1051sl, 918sl, 871sl, 803sl, 754sl, 564sl, 514sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD+CDCl₃, δ): 8,10-8,08 (m, H-C(7)), 8,01 (bs, H-C(3)), 7,81 (d, *J* = 8,5, H-C(4)), 7,55-7,52 (m, H-C(5)). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD+CDCl₃, δ): 165,42; 144,71; 138,91; 130,78; 129,35; 127,61; 126,12; 121,83. HRMS: *m/z* 254,91154 odgovara molekulknoj formuli [C₉H₅BrO₂S-H]⁻ (greška u ppm -2,13).

5-Fluor-1-benzotiofen (42).¹⁵¹



Jedinjenje **42** se sintetiše po opštem postupku C, korišćenjem karboksilne kiseline **38** (1,40 g, 7,13 mmol) i DBU (2,71 g, 17,8 mmol) u *N,N*-dimetilacetamidu (7 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan). Prinos 1,00 g (93%). Bezbojna tečnost. IR (film): 3907sl, 3084sl, 3012sl, 2927sl, 2372sl, 2175sl, 1879sl, 1781sl, 1725sl, 1618sl, 1582sl, 1563sr, 1525sl, 1501sl, 1455sl, 1422sr, 1319sl, 1267sl, 1248sr, 1232sl, 1139sr, 1092sl, 1051sl, 942sl, 891sr, 862j, 833sr, 808j, 750j, 694j, 632sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 7,81-7,77 (m, H-C(7)), 7,52 (d, *J* = 5,3, H-C(3)), 7,48 (dd, *J*₁ = 2,5, *J*₂ = 9,4, H-C(4)), 7,30-7,27 (m, H-C(2)), 7,13-7,08 (m, H-C(6)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 160,80 (d, *J* = 240,1); 140,58 (d, *J* = 9,0); 135,12; 128,78; 123,56 (d, *J* = 4,5); 123,46; 113,11 (d, *J* = 24,4); 108,98 (d, *J* = 22,6). GC/MS (*m/z*, %): 152,0 ([M⁺], 100).

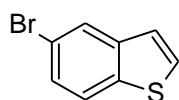
6-Fluor-1-benzotiofen (43).¹⁵¹



Jedinjenje **43** se sintetiše po opštem postupku C, korišćenjem karboksilne kiseline **39** (163 mg, 0,831 mmol) i DBU (316 mg, 2,08 mmol) u *N,N*-dimetilacetamidu (1 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan). Prinos 121 mg (95%). Bezbojna tečnost. IR (film): 3106sl, 3073sl, 2927sl, 1879sl, 1754sl, 1697sl, 1625sl, 1606sr, 1565sr, 1530sl, 1496sl, 1467j, 1392sl, 1342sl, 1310sl, 1251j, 1218j, 1184sl, 1118sl, 1081sl, 1040sl, 912j, 884sl, 844sr, 811j, 783sl, 745sl, 689sr, 649sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ): 7,75 (dd, *J*₁ = 5,3, *J*₂ = 8,7, H-C(4)), 7,60-7,51 (m, H-C(7)), 7,38; 7,30 (ABq, *J*_{AB} =

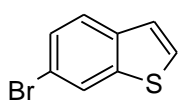
14,1, H-C(2) i H-C(3)), 7,18-7,06 (m, H-C(5)). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ): 162,94; 136,50; 136,10; 125,98 (d, $J = 3,6$); 124,48 (d, $J = 9,1$); 123,35; 113,25 (d, $J = 23,7$); 108,43 (d, $J = 24,6$). GC/MS (m/z , %): 152,0 ($[\text{M}^+]$, 100).

5-Brom-1-benzotiofen (44).¹⁵²



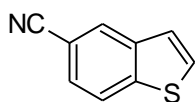
Jedinjenje **44** se sintetise po opstem postupku C, korišćenjem karboksilne kiseline **40** (1,00 g, 3,89 mmol) i DBU (1,48 g, 9,72 mmol) u *N,N*-dimetilacetamidu (7 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan). Prinos 814 mg (98%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 43–44 °C. IR (ATR): 3102sr, 2924sr, 2850sl, 2176sl, 2004sl, 1874sl, 1775sl, 1730sl, 1579j, 1545sr, 1491sr, 1431j, 1404j, 1310sr, 1272sl, 1250sr, 1223sr, 1191j, 1151sr, 1090sr, 1061j, 940sl, 887sr, 866sr, 811j, 798j, 751j, 727j, 691j, 546sl, 475sr, 412sl, 402sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 7,97-7,95 (m, H-C(4)), 7,75-7,71 (m, H-C(7)), 7,48-7,46 (m, H-C(2)), 7,45-7,41 (m, H-C(6)), 7,28-7,26 (m, H-C(3)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 141,22; 138,34; 128,14; 127,26; 126,23; 123,76; 123,10; 118,22. GC/MS (m/z , %): 213,9 ($[\text{M}^+]$, 100), 211,9 ($[\text{M}^+]$, 100), 133,0 (55), 89,0 (45).

6-Brom-1-benzotiofen (45).¹⁵⁰



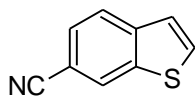
Jedinjenje **45** se sintetise po opstem postupku C, korišćenjem karboksilne kiseline **41** (1,00 g, 3,89 mmol) i DBU (1,48 g, 9,72 mmol) u *N,N*-dimetilacetamidu (7 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan). Prinos 811 mg (98%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 53–54 °C. IR (ATR): 3105sl, 3076sl, 1576sr, 1541sl, 1482sl, 1439sr, 1377sr, 1336sr, 1300sl, 1246sl, 1200sl, 1061sr, 950sl, 866sr, 816j, 744sr, 689sr, 566sr, 427sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,01 (s, H-C(7)), 7,69-7,64 (m, H-C(4)), 7,48-7,44 (m, H-C(5)), 7,41; 7,29 (AMq, $J_{AM} = 5,5$, H-C(2) i H-C(3)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 141,26; 138,32; 127,62; 126,90; 124,96; 124,65; 123,54; 118,14. GC/MS (m/z , %): 213,9 ($[\text{M}^+]$, 100), 211,9 (99), 133,0 (48), 89,0 (38).

1-Benzotiofen-5-karbonitril (46).¹⁵³



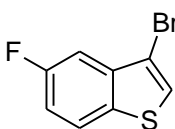
Jedinjenje **46** se sintetiše po opštem postupku D, korišćenjem brombenzotiofena **44** (735 mg, 3,45 mmol) i CuCN (617,8 mg, 6,898 mmol) u *N*-metilpirolidinonu (4 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc = 9/1). Prinos 472 mg (86%). Bezbojna kristalna supstanca, topi se na 67–69 °C. IR (ATR): 3107j, 3087sr, 2223j, 1777sl, 1594sl, 1540sl, 1429sr, 1320sr, 1257sr, 1225sl, 1134sl, 1090sr, 1050sl, 907sr, 823j, 758sr, 704j, 623sl, 598sl, 574sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,15 (s, H-C(4)), 7,99-7,95 (m, H-C(7)), 7,63-7,59 (m, H-C(2)), 7,57-7,54 (m, H-C(6)), 7,43-7,39 (m, H-C(3)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 143,80; 139,31; 129,05; 128,16; 126,14; 123,68; 123,44; 119,36; 107,96. GC/MS (*m/z*, %): 159,0 ([M⁺], 100).

1-Benzotiofen-6-karbonitril (47).^{144,154}



Jedinjenje **47** se sintetiše po opštem postupku D, korišćenjem brombenzotiofena **45** (600,0 mg, 2,816 mmol) i CuCN (504,4 mg, 5,631 mmol) u *N*-metilpirolidinonu (3,5 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc = 9/1). Prinos 380 mg (84%). Čvrsta supstanca, bleožute boje, topi se na 41–42 °C. IR (ATR): 3818sl, 3541sl, 3415sl, 3102sr, 2971sl, 2782sl, 2621sl, 2275sl, 2225j, 2173sl, 1907sl, 1774sl, 1647sl, 1594sr, 1550sl, 1484sl, 1454sr, 1391sr, 1344sr, 1311sr, 1259sr, 1192sr, 1137sl, 1084sr, 1049sl, 959sl, 893sr, 825j, 777sr, 760sr, 702sr, 633sl, 604sr, 510sl, 485sl, 455sr, 406sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,22-8,20 (m, H-C(7)), 7,91-7,88 (m, H-C(4)), 7,73-7,70 (m, H-C(3)), 7,61-7,58 (m, H-C(5)), 7,43-7,41 (m, H-C(2)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 142,40; 139,58; 131,20; 127,27; 126,81; 124,30; 123,94; 119,27; 107,56. GC/MS (*m/z*, %): 159,0 ([M⁺], 100).

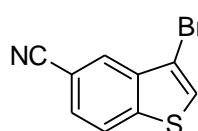
3-Brom-5-fluor-1-benzotiofen (48).



Jedinjenje **48** se sintetiše po opštem postupku E, korišćenjem fluor-supstituisanog benzotiofena **42** (250 mg, 1,6 mmol) i Br₂ (91 μL, 1,8 mmol) u CH₂Cl₂ (6,3 mL + 6,3 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan). Prinos 320 mg (84%). Bezbojna kristalna supstanca, topi se na 70–73 °C. IR (ATR): 3964sl, 3856sl, 3818sl,

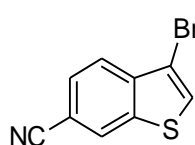
3795sl, 3739sl, 3641sl, 3145sl, 3099j, 3072sr, 3021sl, 2925sl, 2889sl, 2732sl, 2684sl, 2623sl, 2561sl, 2423sl, 2378sl, 2264sl, 2214sl, 2162sl, 2103sl, 2055sl, 1945sl, 1880sl, 1834sl, 1712sl, 1665sl, 1602j, 1564sl, 1538sl, 1494sr, 1425j, 1326sl, 1293sr, 1244sr, 1188j, 1126sr, 1064sl, 971sr, 857j, 807sr, 761j, 716sl, 642sl, 614sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 7,78 (dd, $J_1 = 4,8$, $J_2 = 8,9$, H-C(7)), 7,53-7,48 (m, H-C(4) i H-C(2)), 7,19-7,14 (m, H-C(6)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 161,36 (d, $J = 241,2$), 138,92 (d, $J = 9,9$), 133,92, 125,89, 124,01 (d, $J = 9,5$), 114,36 (d, $J = 25,3$), 108,87 (d, $J = 24,4$), 107,02 (d, $J = 4,5$). GC/MS (m/z , %): 231,9 ($[\text{M}^+]$, 100), 229,9 (99), 151,0 (22), 107,0 (58).

3-Brom-1-benzotiofen-5-karbonitril (49).



Jedinjenje **49** se sintetiše po opštem postupku E, korišćenjem cijano-supstituisanog benzotiofena **46** (100,0 mg, 0,6281 mmol) i Br_2 (35 μL , 0,69 mmol) u DCE (2,5 mL + 2,5 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 97/3 do 9/1). Prinos 130 mg (87%). Bezbojna kristalna supstanca, topi se na 144 – 147 $^\circ\text{C}$. IR (ATR): 3116j, 3074sr, 2224j, 1768sr, 1597sr, 1572sr, 1497sr, 1431j, 1322sr, 1293sr, 1253sr, 1154sl, 1128sl, 1058sr, 966sl, 887sr, 808sr cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,16-8,14 (m, H-C(7)), 7,97-7,93 (m, H-C(4)), 7,64-7,61 (m, H-C(6)), 7,60 (s, H-C(2)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 142,68; 137,68; 127,76; 127,20; 126,11; 123,78; 118,82; 109,03; 107,72. GC/MS (m/z , %): 239,8 ($[\text{M}^+]$, 100).

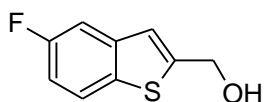
3-Brom-1-benzotiofen-6-karbonitril (50).¹⁵⁵



Jedinjenje **50** se sintetiše po opštem postupku E, korišćenjem cijano-supstituisanog benzotiofena **47** (1,05 g, 6,60 mmol) i Br_2 (0,37 mL, 7,2 mmol) u DCE (26,3 mL + 26,3 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 97/3 do 1/9, EtOAc). Prinos 320 mg (84%). Bezbojna kristalna supstanca, topi se na 140 – 144 $^\circ\text{C}$ (EtOAc). IR (ATR): 3950sl, 3858sl, 3821sl, 3422sr, 3145sr, 3096j, 3070j, 3034sr, 2979sr, 2935sr, 2873sl, 2852sr, 2805sl, 2718sl, 2659sr, 2629sl, 2582sl, 2528sl, 2492sl, 2225j, 2176sr, 2048sl, 1903sl, 1788sr, 1770sr, 1640sr, 1598sl, 1548sr, 1513sr, 1484sl, 1455sr, 1413j, 1392sr, 1350sl, 1322j, 1258j, 1195j, 1164sr, 1135sr, 1058sl,

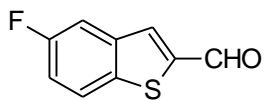
937j, 894sr, 816j, 769j, 709sr, 605sr cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,19-8,18 (m, H-C(7)), 7,93-7,90 (m, H-C(4)), 7,71-7,68 (m, H-C(2) i H-C(5)). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , δ): 140,37; 138,56; 128,16; 127,64; 127,39; 123,93; 118,69; 108,92; 108,05. GC/MS (m/z , %): 238,9 ($[\text{M}^+$], 100); 158,0 (16); 114,0 (36).

(5-Fluor-1-benzotiofen-2-il)metanol (**51**).¹⁵¹



Metil-estar **34** (590 mg, 2,8 mmol) se rastvori u suvom PhMe (15 mL) u atmosferi Ar na $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Zatim se polako, u kapima, doda 0,6 M DIBAL (19 mL, 11 mmol), a temperatura sve vreme održava na $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Reakcija se zaustavlja posle 1 h, dodatkom smeše MeOH/ H_2O (4:1, v:v). Rastvarač se upari na vakuum-uparivaču, a suvi ostatak pomoću dihlormetana prenese u levak za odvajanje. Organski sloj se ispere vodom, zasićenim rastvorom NaCl i suši iznad anhidrovanog Na_2SO_4 . Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 7/3). Prinos 420 mg (82%). Bela praškasta supstanca, topi se na $89 - 90\text{ }^\circ\text{C}$. IR (ATR): 3249j, 2932sr, 2352sl, 1750sl, 1601sr, 1576sl, 1538sl, 1442j, 1362sl, 1297sl, 1251sl, 1192sl, 1143j, 1014j, 947sl, 876j, 839sl, 812j, 779sl, 721sl, 693sl, 664sl, 641sl, 588sl cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ): 7,72 (dd, $J_1 = 4,8$, $J_2 = 8,7$, H-C(7)), 7,40-7,36 (m, H-C(4)), 7,18-7,15 (m, H-C(3)), 7,07 (td, $J_1 = 2,5$, $J_2 = 8,9$, H-C(6)), 4,94-4,90 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 2,05-2,00 (m, H-O). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , δ): 160,85 (d, $J = 239,2$); 147,48; 140,51 (d, $J = 9,9$); 135,21; 123,54 (d, $J = 9,0$); 121,01 (d, $J = 4,5$); 113,08 (d, $J = 25,3$); 108,98 (d, $J = 23,5$); 60,82. GC/MS (m/z , %): 182,0 ($[\text{M}^+$], 95), 165,0 (90), 153,0 (100), 109,0 (53).

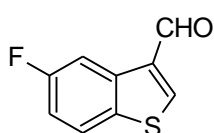
5-Fluor-1-benzotiofen-2-karbaldehid (**52**).¹⁵¹



Alkohol **51** (300,0 mg, 1,646 mmol) se rastvori u dihlormetanu (30 mL), a zatim se doda MnO_2 (1,4 g, 16 mmol). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi tokom 1 h. Posle ceđenja kroz celit, rastvarač se upari na vakuum-uparivaču. Aldehid **52** se koristi u narednom koraku bez dodatnog prečišćavanja. Prinos 240 mg (82%). Bela praškasta supstanca, topi se na $117 - 119\text{ }^\circ\text{C}$. IR (ATR): 3449j, 3101sl, 3065sl, 2921sl, 2850sl, 2793sl, 1886sl, 1671j, 1566sl, 1518sl, 1440sl, 1383sl, 1330sl, 1282sl, 1247sl, 1167sr, 1115sl,

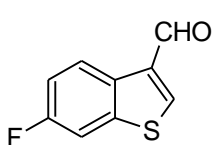
952sl, 868sl, 808sl, 718sl, 657sl, 597sl, 489sl, 418sl, 403sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 10,11 (s, 1H, CHO), 7,99 (s, H-C(3)), 7,87-7,83 (m, H-C(7)), 7,62-7,58 (m, H-C(4)), 7,31-7,26 (m, H-C(6)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 184,46; 161,01 (d, $J = 242,8$); 145,52; 139,45 (d, $J = 9,9$); 138,16; 133,47 (d, $J = 4,5$); 124,68 (d, $J = 9,0$); 117,40 (d, $J = 25,3$); 111,20 (d, $J = 22,6$). GC/MS (m/z , %): 180,0 ($[\text{M}^+]$, 100), 179 (91), 151 (20), 107 (48).

5-Fluor-1-benzotiofen-3-karbaldehid (53).¹⁵⁶



Jedinjenje **53** se sintetiše po opštem postupku F, korišćenjem fluor-supstituisanog benzotiofena **42** (300,0 mg, 1,971 mmol), dihlormetil-metil-etra (1,78 mL, 19,7 mmol) i TiCl_4 (1,08 mL, 9,86 mmol) u CH_2Cl_2 (2 mL + 1,5 mL + 1,5 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc = 9/1). Prinos 290 mg (81%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 111–112 °C. IR (ATR): 3324sl, 3168sl, 3089sr, 2954sl, 2888sl, 2832sl, 2806sl, 2740sl, 1670j, 1628sr, 1600sr, 1568sr, 1502sr, 1449sr, 1433sr, 1385sr, 1348sl, 1312sl, 1286sl, 1250sr, 1196sr, 1144sr, 1090sl, 1040sl, 912sr, 866sr, 798sr, 737sl, 716sl, 641sl, 626sl, 535sl, 472sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 10,11 (s, 1 H, CHO), 8,41-8,36 (m, H-C(2) i H-C(4)), 7,82 (dd, $J_1 = 4,8$, $J_2 = 8,9$, H-C(7)), 7,26-7,20 (m, H-C(6)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 185,06; 161,86 (d, $J = 242,8$); 144,89; 136,41 (d, $J = 9,9$); 136,14 (d, $J = 4,5$); 135,72; 123,48 (d, $J = 9,0$); 115,15 (d, $J = 25,3$); 110,80 (d, $J = 24,4$). GC/MS (m/z , %): 180,0 ($[\text{M}^+]$, 96), 179,0 (100), 151,0 (21), 107,0 (49).

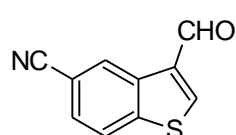
6-Fluor-1-benzotiofen-3-karbaldehid (54).⁸⁵



Jedinjenje **54** se sintetiše po opštem postupku F, korišćenjem fluor-supstituisanog benzotiofena **43** (350 mg, 2,3 mmol), dihlormetil-metil-etra (1,25 mL, 13,8 mmol) i TiCl_4 (0,76 mL, 6,9 mmol) u CH_2Cl_2 (2,5 mL + 2 mL + 2 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc = 95/5). Prinos 160 mg (39%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 92–96 °C. IR (ATR): 3319sl, 3110sr, 3073sl, 2991sl, 2843sl, 2745sl, 1667j, 1622sr, 1601sr, 1570sr, 1498sr, 1470j, 1388sr, 1323sl, 1242sr, 1207sr, 1152sl, 1129sr, 1085sl, 1039sl, 896sr, 858sr, 827sr, 715sr, 676sl, 445sl cm^{-1} . ^1H

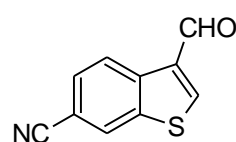
NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 10,11 (s, 1H, CHO), 8,68-8,63 (m, H-C(4)), 8,28 (s, H-C(2)), 7,58-7,55 (m, H-C(7)), 7,30-7,24 (m, H-C(5)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 185,15; 161,24 (d, *J* = 245,5); 142,73; 141,37 (d, *J* = 9,9); 135,95; 131,64; 126,09 (d, *J* = 9,0); 115,11 (d, *J* = 23,5); 108,57 (d, *J* = 25,3). GC/MS (*m/z*, %): 180,0 ([M⁺], 96), 179,0 (100), 151,0 (24), 107,0 (48).

3-Formil-1-benzotiofen-5-karbonitril (**55**).⁸⁵



Jedinjenje **55** se sintetiše po opštem postupku F, korišćenjem cijano-supstituisanog benzotiofena **46** (392,5 mg, 2,465 mmol), dihlormetil-metil-etra (2,68 mL, 29,5 mmol) i TiCl₄ (1,62 mL, 14,8 mmol) u CH₂Cl₂ (3 mL + 3 mL + 5 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 95/5 do 3/7). Prinos 331 mg (72%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 107–108 °C. IR (ATR): 3824sl, 3317sl, 3084j, 2931sl, 2838sl, 2744sl, 2358sl, 2228sr, 1907sl, 1810sl, 1676j, 1597sl, 1545sl, 1507sl, 1437sr, 1387sl, 1352sl, 1305sl, 1259sl, 1168sr, 1099sl, 1041sl, 906sl, 885sl, 861sl, 812sr, 736sl, 715sl, 695sl, 637sl, 512sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 10,16 (s, 1H, CHO), 9,05 (ps, H-C(2)), 8,47 (ps, H-C(4)), 8,02-7,98 (m, H-C(7)), 7,71-7,66 (m, H-C(6)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 184,86; 144,65; 144,14; 135,91; 135,11; 129,62; 128,27; 123,43; 118,74; 110,18. GC/MS (*m/z*, %): 187,0 ([M⁺], 76), 186,0 (100), 158,0 (20), 114,0 (40).

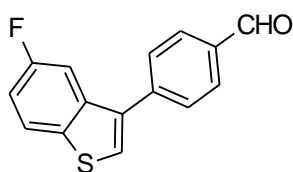
3-Formil-1-benzotiofen-6-karbonitril (**56**).⁸⁵



Jedinjenje **56** se sintetiše po opštem postupku F, korišćenjem cijano-supstituisanog benzotiofena **47** (120 mg, 0,75 mmol), dihlormetil-metil-etra (0,68 mL, 7,5 mmol) i TiCl₄ (0,41 mL, 3,8 mmol) u CH₂Cl₂ (1 mL + 1 mL + 1 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 95/5 do 3/7). Prinos 68 mg (48%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 129–132 °C. IR (ATR): 3821sl, 3417sl, 3325sl, 3096sr, 3066sr, 2838sl, 2750sl, 2222sr, 1932sl, 1797sl, 1666j, 1595sl, 1494sr, 1458sl, 1396sr, 1263sl, 1191sl, 1142sl, 1098sr, 1044sl, 1007sl, 902sl, 839sr, 719sl, 650sl, 614sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃+CD₃OD, δ): 10,00 (s, 1H, CHO), 8,63 (d, *J* = 8,4, H-C(4)), 7,56 (ps, H-C(2)), 8,15-8,12 (m, H-C(7)), 7,63-7,59 (m, H-

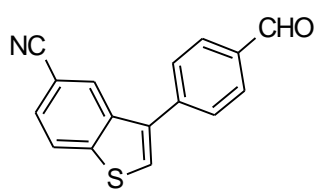
C(5)). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$, δ): 185,36; 147,02; 140,15; 137,98; 135,66; 128,50; 126,99; 125,31; 118,30; 109,13. GC/MS (m/z , %): 187,0 ($[\text{M}^+]$, 76), 186,0 (100), 158,0 (20), 114,0 (40).

4-(5-Fluor-1-benzotien-3-il)benzaldehyd (57).



Jedinjenje **57** se sintetiše po opštem postupku G, korišćenjem brom-supstituisanog benzotiofena **48** (241 mg, 1,04 mmol), 4-formilfenilboronske kiseline (195 mg, 1,30 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (11,6 mg, 0,0519 mmol), SPhos (85,3 mg, 0,208 mmol), 2M Na_2CO_3 (1,6 mL), DME (2 mL + 2 mL) i EtOH (2 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc 9/1). Prinos 235 mg (88%). Kristalna supstanca, bele boje, topi se na 125 – 127 °C. IR (ATR): 3094sl, 2831sl, 2736sl, 1979sl, 1702j, 1606j, 1568sl, 1493sl, 1439sr, 1388sl, 1306sl, 1282sl, 1255sl, 1208sl, 1171sl, 1117sl, 885sl, 860sl, 836sl, 816sl, 790sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 10,08 (s, CHO), 8,03-7,99 (m, 2H-Ar), 7,85 (dd, $J_1 = 4,9$, $J_2 = 8,8$, H-C(7)), 7,75-7,71 (m, 2H-Ar), 7,59 (s, H-C(2)); 7,58-7,54 (m, H-C(4)), 7,21-7,15 (m, H-C(6)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 191,68; 161,25 (d, $J = 241,0$); 141,59; 138,47 (d, $J = 9,0$); 136,57 (d, $J = 4,5$); 136,09; 135,56; 130,33; 128,97; 127,41; 124,20 (d, $J = 9,9$); 113,75 (d, $J = 25,3$); 108,33 (d, $J = 23,5$). GC/MS (m/z , %): 256,0 ($[\text{M}^+]$, 100), 226,0 (35), 183,0 (31).

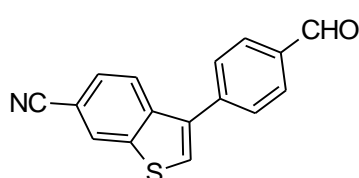
3-(4-Formilfenil)-1-benzotiofen-5-karbonitril (58).



Jedinjenje **58** se sintetiše po opštem postupku G, korišćenjem cijano-supstituisanog benzotiofena **49** (300,0 mg, 1,260 mmol), 4-formilfenilboronske kiseline (236,2 mg, 1,575 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (14,1 mg, 0,0628 mmol), SPhos (103,4 mg, 0,2519 mmol), 2M Na_2CO_3 (2,4 mL), DME (3,6 mL + 3,6 mL) i EtOH (3,6 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/ CH_2Cl_2 gradijent od 9/1 do 1/9, CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9/1$). Prinos 120 mg (37%). Praškasta supstanca, bleožute boje, topi se na 210 – 215 °C. IR (ATR): 3084sr, 2854sr, 2756sl, 2229j, 2011sl, 1686j, 1604j, 1568sl, 1438sl, 1389sr, 1344sl, 1303sl, 1211j, 1167sr, 1106sr, 1059sl, 1014sl, 893sl, 856sl, 833j, 811j, 798sr, 737sl, 654sl,

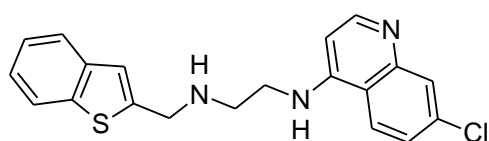
560sl, 485sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ): 10,23 (s, H-CHO), 10,19* (s, 0,18H), 8,36-8,33 (m, H-C(4)), 8,12 (d, $J = 8,2$, H-C(7)), 8,10-8,07 (m, 2H-Ar), 8,07-8,04* (m, 0,40H), 7,97 (s, H-C(2)), 7,84-7,81* (m, 0,39H), 7,77-7,73 (m, 2H-Ar), 7,71-7,68 (m, H-C(6)). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ): 192,58; 145,72; 141,19; 138,04; 137,36*; 136,85; 136,31; 131,08; 131,00*; 130,03; 129,34; 128,81*; 128,19; 127,54; 125,21; 124,29; 120,27; 109,35. Signali označeni * potiču od 4-formilfenilboronske kiseline. GC/MS (m/z , %): 263,0 ($[\text{C}_{16}\text{H}_9\text{NOS}^+]$, 71), ($[\text{C}_7\text{H}_7\text{BO}_3^+]$, 29).

3-(4-Formilfenil)-1-benzotiofen-6-karbonitril (**59**).



Jedinjenje **59** se sintetiše po opštem postupku G, korišćenjem cijano-supstituisanog benzotiofena **50** (89,3 mg, 0,375 mmol), 4-formilfenilboronske kiseline (70,3 mg, 0,469 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (4,2 mg, 0,019 mmol), SPhos (30,8 mg, 0,0750 mmol), 2M Na_2CO_3 (0,7 mL), DME (1 mL + 1 mL) i EtOH (1 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/ CH_2Cl_2 gradijent od 9/1 do 2/8). Prinos 75 mg (76%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 186 – 188 °C. IR (ATR): 3083sr, 2982sl, 2837sr, 2747sr, 2225j, 2176sl, 1998sl, 1686j, 1603j, 1572sr, 1489sr, 1454sl, 1396sr, 1348sr, 1307sr, 1264sl, 1215j, 1171sr, 1105sl, 886sl, 858sl, 823j, 791sr, 717sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 10,11 (s, H-CHO), 8,29-8,27 (m, H-C(7)), 8,06-8,02 (m, 2H-Ar), 7,99-7,96 (m, H-C(4)), 7,78 (s, H-C(2)), 7,75-7,72 (m, 2H-Ar), 7,68-7,64 (m, H-C(5)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 191,56; 140,74; 140,64; 140,14; 137,06; 135,87; 130,38; 129,46; 129,23; 127,78; 127,36; 123,41; 118,94; 108,29. HRMS: m/z 264,04675 odgovara molekulskoj formuli $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{NOSH}^+$ (greška u ppm -3,84).

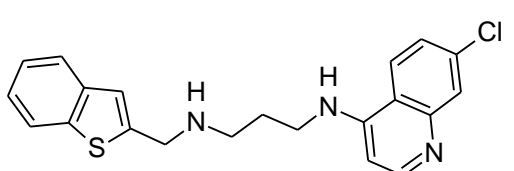
N-(1-benzotien-2-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)etan-1,2-diamin (**61**).⁸⁵



Jedinjenje **61** se sintetiše po opšem postupku K, korišćenjem komercijalno dostupnog 1-benzotiofen-2-karbaldhida (140 mg, 0,86 mmol), **AQ2** (286,9 mg, 1,295 mmol), glac. AcOH (75 μL , 1,3 mmol), NaBH_4 (196 mg, 5,18 mmol) i MeOH/ CH_2Cl_2 (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc,

EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2). Prinos 254 mg (80%). Praškasta supstanca, bleđožute boje, topi se na 135 – 139 °C. IR (ATR): 3225sr, 3062sl, 2943sl, 2879sl, 2841sl, 1579j, 1451sr, 1431sl, 1375sl, 1329sl, 1285sl, 1253sl, 1212sl, 1166sl, 1138sl, 1078sl, 1026sl, 963sl, 897sl, 849sl, 813sl, 780sl, 743sl, 723sl, 641sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,49 (d, *J* = 5,3, H-C(2')), 7,97-7,93 (m, H-C(8')), 7,82-7,79 (m, H-C(7)), 7,76 (d, *J* = 9,0, H-C(5')), 7,70-7,67 (m, H-C(4)), 7,38-7,35 (m, H-C(6')), 7,35-7,28 (m, 2H, H-C(5) i H-C(6)), 7,17-7,14 (m, H-C(3)), 6,34 (d, *J* = 5,5, H-C(3')), 5,90-5,85 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 4,15-4,13 (m, 2H, ArCH₂-), 3,34-3,29 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,10-3,06 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 1,86 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 152,01; 149,78; 149,10; 144,98; 139,65; 139,45; 134,74; 128,65; 125,18; 124,32; 124,11; 123,16; 122,34; 121,56; 121,38; 117,34; 99,12; 48,56; 46,44; 42,09. HRMS: *m/z* 368,09836 odgovara molekularnoj formuli C₂₀H₁₈ClN₃SH⁺ (greška u ppm 0,23). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 8,938 min, površina 98,50%; metoda B: RT 8,116 min, površina 98,14%.

***N*-(1-benzotien-2-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,3-diamin (62).**⁸⁵

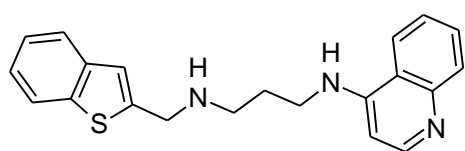


Jedinjenje **62** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem komercijalno dostupnog 1-benzotiofen-2-karbaldehida (140 mg, 0,86 mmol), **AQ3** (305,2 mg, 1,295 mmol), glac.

AcOH (75 μL, 1,3 mmol), NaBH₄ (195,9 mg, 5,179 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2; flash, Biotage SP1, NH kolona, 25+M, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 240 mg (73%). Praškasta supstanca, bleđožute boje, topi se na 120 – 122 °C. IR (ATR): 3267sl, 3113sl, 3065sl, 3012sl, 2978sl, 2939sl, 2877sl, 2850sl, 1612sl, 1580j, 1551sl, 1492sl, 1460sl, 1431sl, 1367sl, 1338sl, 1310sl, 1287sl, 1260sl, 1232sl, 1212sl, 1177sl, 1128sl, 1083sl, 1062sl, 1015sl, 897sl, 873sl, 840sl, 797sl, 748sl, 725sl, 647sl, 595sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,48 (d, *J* = 5,3, H-C(2')), 7,92-7,89 (m, H-C(8')), 7,82-7,77 (m, H-C(7)), 7,72-7,68 (m, H-C(4)), 7,57 (d, *J* = 8,9, H-C(5')), 7,39-7,30 (m, 2H, H-C(5) i H-C(6)), 7,16 (s, H-C(3)), 7,11 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 7,05-7,01 (m, H-C(6')), 6,31

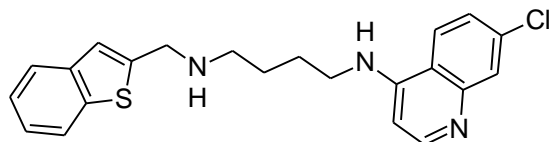
(d, $J = 5,3$, H-C(3')), 4,12 (s, 2H, ArCH₂-), 3,43-3,38 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,98-2,94 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,99-1,77 (m, 3H, ArNHCH₂CH₂- i H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 152,02; 150,25; 149,09; 144,04; 139,62; 139,54; 134,58; 128,41; 124,87; 124,44; 124,24; 123,25; 122,40; 122,02; 121,98; 117,43; 98,38; 49,34; 48,51; 43,36; 27,54. HRMS: m/z 382,11399 odgovara molekulknoj formuli C₂₁H₂₀ClN₃SH⁺ (greška u ppm 0,17). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm) metoda A: RT 7,941 min, površina 98,67%; ($\lambda = 254$ nm) metoda C: RT 5,254 min, površina 98,63%.

***N*-(1-benzotien-2-ilmetil)-*N'*-(hinolin-4-il)propan-1,3-diamin (63).**



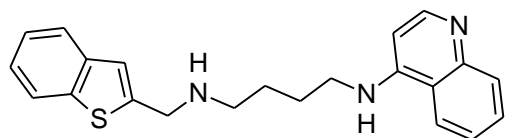
Jedinjenje **63** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem komercijalno dostupnog 1-benzotiofen-2-karbaldehida (94 mg, 0,58 mmol), **AQ7** (175 mg, 0,870 mmol), glac. AcOH (50 μ L, 0,8 mmol), NaBH₄ (131,6 mg, 3,480 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/1; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃ (9/1) gradijent od 95/5 do 1/1). Prinos 119 mg (59%). Ulje, svetložute boje. IR (ATR): 3262sl, 3059sl, 2928sl, 2838sl, 1617sl, 1585j, 1542sr, 1458sl, 1438sl, 1396sl, 1372sl, 1339sl, 1284sl, 1243sl, 1131sl, 862sl, 810sl, 765sr, 728sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,55-8,48 (m, H-C(2')), 7,98-7,91 (m, H-C(8')), 7,79 (d, $J = 7,8$, H-C(5')), 7,73-7,67 (m, 2H, H-C(7) i H-C(4)), 7,58-7,53 (m, H-C(7')), 7,37-7,28 (m, 2H, H-C(5) i H-C(6)), 7,21-7,15 (m, 2H, H-C(6') i H-C(3)), 6,96 (bs, H-N izmenjiv sa D₂O), 6,35-6,32 (m, H-C(3')), 4,12 (s, 2H, ArCH₂-), 3,45-3,39 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,96-2,92 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,15 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 1,95-1,89 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ): 150,77; 150,36; 144,26; 139,65; 139,56; 129,25; 128,94; 124,32; 124,10; 123,19; 122,37; 121,84; 120,40; 118,91; 113,18; 98,06; 49,27; 48,27; 43,12; 27,62. HRMS: m/z 348,15289 odgovara molekulknoj formuli C₂₁H₂₁N₃SH⁺ (greška u ppm 0,07). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 10,408, površina 96,80%; metoda B: RT 8,140, površina 96,44%.

***N*-(1-benzotien-2-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,4-diamin (64).**⁸⁵



Jedinjenje **64** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem komercijalno dostupnog 1-benzotiofen-2-karbaldehida (140 mg, 0,86 mmol), **AQ4** (323,3 mg, 1,295 mmol), glac. AcOH (75 μ L, 1,3 mmol), NaBH₄ (195,9 mg, 5,179 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/1; flash, Biotage SP1, NH kolona, 25+M, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 242 mg (71%). Praškasta supstanca, bleđožute boje, topi se na 101 – 104 °C. IR (ATR): 3230sr, 3105sl, 3055sl, 3018sl, 2961sl, 2935sl, 2865sl, 2823sl, 1611sl, 1580j, 1541sr, 1444sr, 1366sl, 1332sr, 1276sl, 1246sl, 1204sl, 1165sl, 1137sl, 1083sl, 896sl, 866sl, 849sl, 811sl, 744sr, 725sl, 635sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,50 (d, *J* = 5,5, H-C(2')), 7,94-7,91 (m, H-C(8')), 7,81-7,76 (m, H-C(7)), 7,70-7,67 (m, H-C(4)), 7,66 (d, *J* = 9,2, H-C(5')), 7,35-7,26 (m, 2H, H-C(5) i H-C(6)), 7,25-7,21 (m, H-C(6')), 7,14 (s, H-C(3)), 6,36 (d, *J* = 5,3, H-C(3')), 5,74-5,65 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 4,09 (s, 2H, ArCH₂-), 3,33-3,27 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,78 (t, 2H, *J* = 6,6, ArCH₂NHCH₂-), 1,91-1,82 (m, ArNHCH₂CH₂-), 1,74-1,45 (m, 3H, ArCH₂NHCH₂CH₂- i H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 152,06; 149,82; 149,16; 144,90; 139,70; 139,53; 134,68; 128,73; 125,05; 124,25; 123,98; 123,11; 122,34; 121,38; 121,18; 117,22; 98,91; 49,11; 48,35; 43,17; 27,64; 26,25. HRMS: *m/z* 396,12788 odgovara molekularnoj formuli C₂₂H₂₂ClN₃SH⁺ (greška u ppm -4,26). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 11,020 min, površina 98,99 %; metoda B: RT 8,229 min, površina 97,99 %.

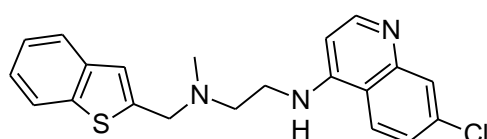
***N*-(1-benzotien-2-ilmetil)-*N'*-(hinolin-4-il)butan-1,4-diamin (65).**



Jedinjenje **65** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem komercijalno dostupnog 1-benzotiofen-2-karbaldehida (120 mg, 0,74 mmol), **AQ8** (240 mg, 1,1 mmol), glac. AcOH (63 μ L, 1,1 mmol), NaBH₄ (167,9 mg, 4,439 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent

heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9). Prinos 160 mg (58%). Ulje, svetložute boje. IR (ATR): 3649sl, 3626sl, 3436sl, 3250sr, 3117sl, 3060sr, 2929sr, 2855sr, 1617sl, 1582j, 1541sr, 1457sr, 1438sr, 1396sl, 1374sl, 1342sr, 1280sl, 1260sl, 1225sl, 1129sl, 1065sl, 1016sl, 972sl, 861sl, 811sl, 764sr, 744sr, 703sl, 589sl, 558sl, 476sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 8,52 (d, $J = 5,2$, H-C(2')), 7,99-7,94 (m, H-C(8')), 7,80-7,73 (m, 2H, H-C(4) i H-C(7)), 7,70-7,66 (m, H-C(5')), 7,61-7,55 (m, H-C(7')), 7,35-7,25 (m, 3H, H-C(5), H-C(6) i H-C(6')), 7,13 (s, H-C(3)), 6,37 (d, $J = 5,2$, H-C(3')), 5,62-5,56 (m, H-N izmenjiv sa D_2O), 4,08 (s, 2H, ArCH_2-), 3,33-3,26 (m, 2H, ArNHCH_2-), 2,75 (t, $J = 6,8$, 2H, $\text{ArCH}_2\text{NHCH}_2-$), 1,87-1,80 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2-$), 1,72-1,64 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 150,98; 149,78; 148,35; 145,07; 139,70; 139,53; 129,77; 128,86; 124,40; 124,17; 123,88; 123,08; 122,32; 121,27; 119,51; 118,76; 98,60; 49,07; 48,36; 43,09; 27,60; 26,30. HRMS: m/z 362,16771 odgovara molekulkovoj formuli $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{SH}^+$ (greška u ppm -2,30). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 8,370, površina 96,73%; metoda B: RT 8,293, površina 97,83%.

***N*-(1-benzotien-2-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)-*N*-metiletan-1,2-diamin (**66**).⁸⁵**

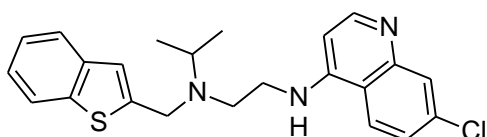


Jedinjenje **66** se sintetiše po opštem postupku

L, korišćenjem **61** (200,0 mg, 0,5436 mmol), 37% vodenog rastvora formaldehida (81 μL , 1,1 mmol), ZnCl_2 (148,1 mg, 1,087 mmol), NaBH_3CN (136,6 mg, 2,174 mmol) i MeOH (6 mL + 3 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/1). Prinos 180 mg (87%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3395sl, 3060sl, 2950sl, 2846sl, 2801sl, 1609sr, 1581j, 1527sr, 1452sr, 1366sl, 1330sl, 1275sl, 1241sl, 1206sl, 1130sl, 1076sl, 1032sl, 879sl, 809sl, 747sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,49 (d, $J = 5,3$, H-C(2')), 7,96-7,94 (m, H-C(8')), 7,86 (d, $J = 9,0$, H-C(5')), 7,82-7,79 (m, H-C(7)), 7,71-7,66 (m, H-C(4)), 7,43-7,39 (m, H-C(6')), 7,35-7,28 (m, 2H, H-C(5) i H-C(6)), 7,16 (s, H-C(3)), 6,31 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 5,98-5,91 (m, H-N izmenjiv sa D_2O), 3,89 (s, 2H, ArCH_2-), 3,32-3,26 (m, 2H, ArNHCH_2-), 2,85-2,81 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 2,40 (s, 3H, CH_3-N). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 151,94; 149,79; 149,00; 143,64; 139,66; 139,51; 134,78; 128,54; 125,15; 124,38; 124,29;

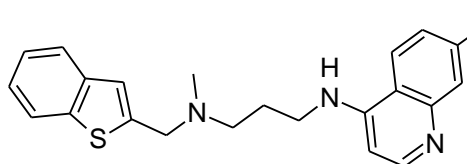
123,23; 122,47; 122,34; 121,62; 117,33; 99,08; 57,52; 53,92; 41,73; 39,62. HRMS: m/z 382,11463 odgovara molekulknoj formuli $C_{21}H_{20}ClN_3SH^+$ (greška u ppm 1,86). Mikroanaliza ($C_{21}H_{20}ClN_3S \times 0,5H_2O$) izračunato: C, 64,52; H, 5,41; N, 10,75; S, 8,20; nađeno: C, 64,82; H, 5,05; N, 10,88; S, 8,56. HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda A: RT 8,685 min, površina 95,12%; ($\lambda = 330$ nm) metoda B: RT 7,428 min, površina 95,57%.

***N*-(1-benzotien-2-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)-*N*-izopropiletan-1,2-diamin (67).**⁸⁵



Jedinjenje **67** se sintetise po opštem postupku L, korišćenjem **61** (183,8 mg, 0,4996 mmol), acetona (257 μ L, 3,50 mmol), $ZnCl_2$ (272,5 mg, 2,000 mmol), $NaBH_3CN$ (219,9 mg, 3,499 mmol) i MeOH (4 mL + 4 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 7/3). Prinos 186,8 mg (91%). Praškasta supstanca, žute boje, topi se na 127 °C. IR (ATR): 3388j, 2960sl, 2869sl, 2829sl, 1608sl, 1583j, 1523sr, 1477sr, 1363sl, 1328sr, 1265sl, 1237sl, 1173sl, 1122sl, 1077sl, 882sl, 841sl, 794sl, 748sr cm^{-1} . 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ): 8,47 (d, $J = 5,2$, H-C(2')), 7,95-7,91 (m, H-C(8')), 7,78-7,73 (m, 2H, H-C(5') i H-C(7')), 7,66-7,61 (m, H-C(4)), 7,36-7,33 (m, H-C(6')), 7,33-7,26 (m, 2H, H-C(6) i H-C(5)), 7,16-7,13 (m, H-C(3)), 6,29 (d, $J = 5,3$, H-C(3')), 5,97-5,91 (m, H-N izmenjiv sa D_2O), 3,90-3,87 (m, 2H, $ArCH_2-$), 3,28-3,22 (m, 2H, $ArNHCH_2-$), 3,13 (sept, 1H, $J = 6,6$, $(CH_3)_2CH-$), 2,94-2,89 (m, 2H, $ArCH_2N(iPr)CH_2-$), 1,13 (d, 6H, $J = 6,6$, $(CH_3)_2CH-$). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, δ): 151,96; 149,83; 149,08; 146,10; 139,74; 139,44; 134,70; 128,59; 125,11; 124,35; 124,14; 123,07; 122,33; 121,76; 121,59; 117,44; 99,14; 49,09; 48,88; 46,94; 39,86; 17,89. HRMS: m/z 410,14550 odgovara molekulknoj formuli $C_{23}H_{24}ClN_3SH^+$ (greška u ppm 0,67). Mikroanaliza ($C_{23}H_{24}ClN_3S$) izračunato: C, 67,38; H, 5,90; N, 10,25; S, 7,82; nađeno: C, 67,09; H, 6,28; N, 10,16; S, 8,09. HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 9,325 min, površina 98,75 %; metoda B: RT 7,604 min, površina 97,41 %.

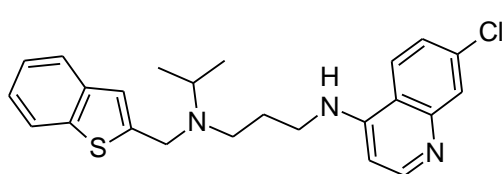
***N*-(1-benzotien-2-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)-*N*-metilpropan-1,3-diamin (68).**⁸⁵



Jedinjenje **68** se sintetiše po opštem postupku L, korišćenjem **62** (200,0 mg, 0,5237 mmol), 37% vodenog rastvora formaldehida (78 μ L, 1,0 mmol), ZnCl₂ (142,6 mg, 1,047 mmol),

NaBH₃CN (131,6 mg, 2,095 mmol) i MeOH (4 mL + 3 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/1). Prinos 202 mg (97%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3270sr, 3060sl, 2949sr, 2845sl, 2804sl, 1610sr, 1582j, 1539sl, 1456sl, 1368sl, 1333sl, 1138sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,50 (d, *J* = 5,4, H-C(2')), 7,92-7,90 (m, H-C(8')), 7,75-7,72 (m, H-C(7)), 7,69-7,66 (m, H-C(4)), 7,40 (d, *J* = 9,0, H-C(5')), 7,38-7,29 (m, 2H, H-C(5) i H-C(6)), 7,16-7,14 (m, H-C(3)), 7,05-7,02 (m, H-C(6')), 6,75-6,78 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 6,35 (d, *J* = 5,2, H-C(3')), 3,87-3,83 (m, 2H, ArCH₂-), 3,46-3,40 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,67-2,64 (m, 2H, ArCH₂N(CH₃)CH₂-), 2,43 (s, 3H, CH₃-N), 1,95-1,90 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 152,00; 150,21; 149,14; 143,00; 139,83; 139,50; 134,59; 128,47; 124,94; 124,39; 124,29; 123,26; 122,94; 122,38; 121,64; 117,44; 98,57; 58,17; 55,84; 42,74; 42,25; 24,82. HRMS: *m/z* 396,13031 odgovara molekularnoj formuli C₂₂H₂₂ClN₃SH⁺ (greška u ppm 1,87). Mikroanaliza (C₂₂H₂₂ClN₃S×0,5H₂O) izračunato: C, 65,25; H, 5,72; N, 10,38; S, 7,92; nađeno: C, 65,73; H, 5,91; N, 10,66; S, 7,75. HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 8,443 min, površina 95,02 %; metoda B: RT 7,444 min, površina 96,11 %.

***N*-(1-benzotien-2-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)-*N*-izopropilpropan-1,3-diamin (69).**⁸⁵

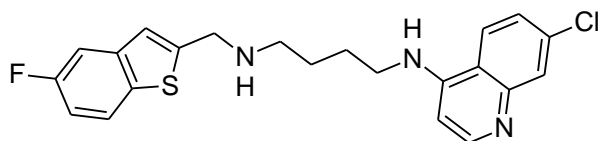


Jedinjenje **69** se sintetiše po opštem postupku L, korišćenjem **62** (250,0 mg, 0,6546 mmol), acetona (336 μ L, 4,58 mmol), ZnCl₂ (357 mg, 2,62 mmol), NaBH₃CN (290 mg, 4,6 mmol) i

MeOH (6 mL + 6 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH/NH₃ gradijent od 18/1/1 do 9/1/1). Prinos 115 mg

(41%). Praškasta supstanca, bledožute boje, topi se na 86–88 °C. IR (ATR): 3240sl, 3060sl, 2964sr, 1610sl, 1580j, 1534sl, 1455sl, 1366sl, 1330sl, 1280sl, 1221sl, 1169sl, 1135sl, 1079sl, 1022sl, 879sl, 853sl, 810sl, 744sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,45 (d, $J = 5,4$, H-C(2')), 7,87-7,85 (m, H-C(8')), 7,77-7,74 (m, H-C(7)), 7,69-7,65 (m, H-C(4)), 7,39-7,29 (m, 2H, H-C(5) i H-C(6)), 7,17-7,14 (m, 2H, H-C(5') i H-C(3')), 6,89-6,85 (m, H-C(6')), 6,32 (d, $J = 5,4$, H-C(3')), 6,00-5,93 (m, H-N izmenjiv sa D_2O), 3,87-3,84 (m, 2H, ArCH_2-), 3,45-3,40 (m, 2H, ArNHCH_2-), 3,17 (sept, 1H, $J = 6,7$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH-N}$), 2,70-2,65 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{N}(\text{iPr})\text{CH}_2-$), 2,01 (ps, H-N izmenjiv sa D_2O), 1,89-1,83 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{N}(\text{iPr})\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,08 (d, 6H, $J = 6,7$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH-N}$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 151,89; 149,82; 149,07; 146,12; 139,80; 139,59; 134,53; 128,42; 124,77; 124,40; 124,18; 123,14; 122,41; 122,11; 121,39; 117,19; 98,65; 49,40; 49,15; 47,51; 41,74; 25,45; 17,57. HRMS: m/z 424,16183 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{SH}^+$ (greška u ppm 2,25). Mikroanaliza ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{S}\times 0,5\text{H}_2\text{O}$) izračunato: C, 66,57; H, 6,28; N, 9,70; S, 7,41; nađeno: C, 66,94; H, 6,44; N, 9,54; S, 6,95. HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 8,478 min, površina 95,72%; metoda B: RT 7,472 min, površina 95,45%.

***N*-(7-hlorhinolin-4-il)-*N'*-[(5-fluor-1-benzotien-2-il)metil]butan-1,4-diamin (70).**⁸⁵

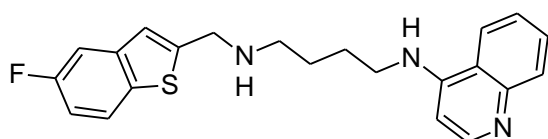


Jedinjenje **70** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **52** (97,4 mg, 0,540 mmol), **AQ4** (202,5

mg, 0,8108 mmol), glac. AcOH (47 μL , 0,81 mmol), NaBH_4 (122,7 mg, 3,243 mmol) i $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2). Prinos 128 mg (58%). Praškasta supstanca, bledožute boje, topi se na 105 – 106 °C. IR (ATR): 3232sr, 3062sl, 2934sr, 2862sl, 1582j, 1545sr, 1448sr, 1366sr, 1332sl, 1279sl, 1250sl, 1204sl, 1137sr, 1083sl, 952sl, 900sl, 864sr, 802sr, 765sl, 675sl, 639sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,30 (d, $J = 5,7$, H-C(2')), 8,07 (d, $J = 9,2$, H-C(5')), 7,77-7,72 (m, 2H, H-C(8') i H-C(7)), 7,40-7,35 (m, 2H, H-C(6') i H-C(4)), 7,19-7,17 (m, H-C(3')), 7,05 (td, $J_1 = 2,5$, $J_2 = 8,9$, H-C(6)), 6,48 (d, $J = 5,7$, H-C(3')), 4,05-4,03 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{NH}-$), 3,38-3,34 (m, 2H, ArNHCH_2-), 2,71 (t, 2H, $J = 7,2$, $\text{ArCH}_2\text{NHCH}_2-$), 1,83-1,75 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2-$), 1,72-1,65 (m,

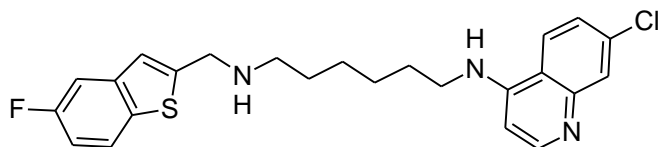
2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 162,27 (d, *J* = 238,3); 152,87; 152,14; 149,39; 148,07; 142,35; 136,42; 127,35; 125,99; 124,58 (d, *J* = 9,9); 124,35; 123,09 (d, *J* = 4,5); 118,72; 113,54 (d, *J* = 25,3); 109,50 (d, *J* = 23,5); 99,63; 49,38; 43,81; 27,96; 27,07. HRMS: *m/z* 414,12065 odgovara molekularnoj formuli C₂₂H₂₁ClN₃SFH⁺ (greška u ppm 1,20). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 7,750 min, površina 96,09%; metoda B: RT 7,897 min, površina 96,80%.

***N*-[(5-fluor-1-benzotien-2-il)metil]-*N'*-(hinolin-4-il)butan-1,4-diamin (71).**⁸⁵



Jedinjenje **71** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **52** (90,0 mg, 0,499 mmol), **AQ8** (161,3 mg, 0,7492 mmol), glac. AcOH (43 μL, 0,75 mmol), NaBH₄ (113,4 mg, 2,996 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (18 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃(9/1) gradijent od 95/5 do 3/7). Prinos 101 mg (54%). Ulje, svetložute boje. IR (ATR): 3435sl, 3266sr, 3117sl, 3063sr, 3012sl, 2933sr, 2858sr, 1580j, 1541sr, 1495sl, 1443sr, 1396sl, 1374sl, 1341sr, 1282sl, 1255sl, 1223sl, 1206sl, 1152sr, 1128sr, 952sl, 864sl, 803sl, 764sr, 737sl, 689sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,54 (d, *J* = 5,5, H-C(2')), 7,97 (d, *J* = 8,5, H-C(8')), 7,74 (d, *J* = 8,5, H-C(5')), 7,69 (dd, *J*₁ = 4,9, *J*₂ = 8,8, H-C(7)), 7,63-7,58 (m, H-C(7')), 7,38-7,32 (m, 2H, H-C(4) i H-C(6')), 7,10 (s, H-C(3)), 7,07-7,01 (m, H-C(6)), 6,40 (d, *J* = 5,5, H-C(3')), 5,48 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 4,09 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,37-3,31 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,78 (t, 2H, *J* = 6,8, ArCH₂NHCH₂-), 1,91-1,67 (m, 5H, ArCH₂NHCH₂CH₂CH₂- i H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 160,82 (d, *J* = 239,2); 151,03; 149,74; 148,38; 147,99; 140,71 (d, *J* = 9,9); 134,87; 129,89; 128,92; 124,46; 123,41 (d, *J* = 9,0); 120,91 (d, *J* = 4,5); 119,38; 118,75; 112,62 (d, *J* = 25,3); 108,61 (d, *J* = 22,6); 98,67; 49,16; 48,51; 43,15; 27,66; 26,38. HRMS: *m/z* 380,15894 odgovara molekularnoj formuli C₂₂H₂₂N₃SFH⁺ (greška u ppm -0,48); *m/z* 190,58286 odgovara molekularnoj formuli C₂₂H₂₂N₃SFH₂²⁺ (greška u ppm -1,77). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 8,950 min, površina 97,85%; metoda B: RT 7,746 min, površina 97,41%.

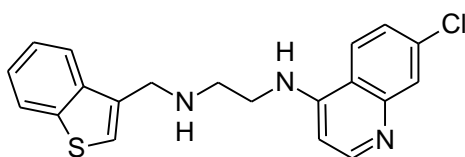
***N*-(7-hlorhinolin-4-il)-*N'*-[(5-fluor-1-benzotien-2-il)metil]heksan-1,6-diamin (72).**⁸⁵



Jedinjenje **72** se sintetiše po opštem postupku **K**, korišćenjem aldehida **52** (73,5 mg, 0,408 mmol), **AQ6** (169,9 mg, 0,6118 mmol), glac.

AcOH (35 μ L, 0,61 mmol), NaBH₄ (92,6 mg, 2,45 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (15 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 106 mg (59%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 71 – 74 °C. IR (ATR): 3226sr, 3108sl, 3066sl, 3011sl, 2929sr, 2888sl, 2855sl, 2832sl, 2774sl, 1733sl, 1700sl, 1652sl, 1581j, 1546sl, 1492sl, 1472sl, 1443sr, 1370sl, 1331sl, 1298sl, 1255sl, 1208sl, 1166sl, 1130sl, 1085sl, 1028sl, 974sl, 952sl, 906sl, 884sl, 863sl, 808sl, 777sl, 757sl, 736sl, 680sl, 647sl, 600sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,54-8,51 (m, H-C(2')), 7,98-7,94 (m, H-C(8')), 7,68 (dd, $J_1 = 4,8$, $J_2 = 8,7$, H-C(7)), 7,63 (d, $J = 8,9$, H-C(5')), 7,36-7,32 (m, 2H, H-C(4) i H-C(6')), 7,09 (s, H-C(3)), 7,06-7,00 (m, H-C(6)), 6,40 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 4,98 (bs, H-N izmenjiv sa D₂O), 4,06 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,33-3,27 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,70 (t, 2H, $J = 7,0$, ArCH₂NHCH₂-), 1,80-1,66 (m, 3H, ArNHCH₂CH₂- i H-N izmenjiv sa D₂O), 1,60-1,52 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-), 1,52-1,41 (m, 4H, ArCH₂NHCH₂CH₂CH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 160,78 (d, $J = 239,2$), 152,02; 149,66; 149,07; 148,46; 140,74 (d, $J = 9,0$); 134,85 (d, $J = 4,5$); 128,81; 125,26; 123,36 (d, $J = 9,9$); 120,76; 120,70 (d, $J = 3,6$); 117,06; 112,50 (d, $J = 25,3$); 108,54 (d, $J = 23,5$); 99,05; 49,20; 49,02; 43,17; 29,91; 28,81; 27,00; 26,96. HRMS: m/z 442,15060 odgovara molekulskoj formuli C₂₄H₂₅ClN₃SFH⁺ (greška u ppm -1,93). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 9,345 min, površina 99,36 %; metoda B: RT 8,823 min, površina 99,17%.

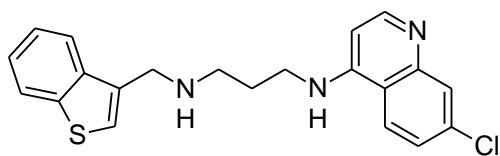
***N*-(1-benzotien-3-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)etan-1,2-diamin (74).**⁸⁵



Jedinjenje **74** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem 1-benzotiofen-3-karbaldehida (200,0 mg, 1,233 mmol), **AQ2** (410,0 mg, 1,850 mmol), glac. AcOH (100 μ L, 2 mmol), NaBH₄ (280 mg,

7,4 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (30 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc = 1/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 7/3). Prinos 385,5 mg (85%). Praškasta supstanca, bleožute boje, topi se na 104 – 108 °C. IR (ATR): 3324sl, 3219sr, 3063sr, 2967sl, 1583j, 1490sl, 1454sr, 1427sr, 1372sl, 1334sl, 1281sl, 1242sl, 1211sl, 1167sl, 1136sl, 1078sl, 898sl, 850sl, 797sl, 761sl, 731sr, 641sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,48 (d, *J* = 5,2, H-C(2')), 7,93-7,91 (m, H-C(8')), 7,91-7,85 (m, 2H-Ar), 7,41-7,34 (m, 3H-Ar), 7,30 (s, H-C(2)), 7,26-7,23 (m, H-C(6')), 6,31 (d, *J* = 5,2, H-C(3')), 5,79-5,73 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 4,10 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,32-3,26 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,11-3,06 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 1,75 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 151,99; 149,71; 149,03; 140,86; 138,21; 134,69; 134,59; 128,58; 125,10; 124,51; 124,08; 123,69; 123,07; 121,88; 121,23; 117,24; 99,11; 47,16; 46,78; 41,95. HRMS: *m/z* 368,09643 odgovara molekulskoj formuli C₂₀H₁₈ClN₃SH⁺ (greška u ppm -5,00). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 8,402 min, površina 98,48%; metoda B: RT 7,404 min, površina 98,45%.

***N*-(1-benzotien-3-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,3-diamin (75).**⁸⁵

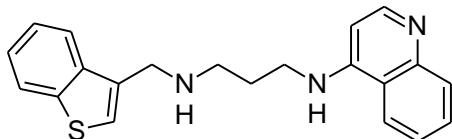


Jedinjenje **75** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem 1-benzotiofen-3-karbaldehida (200,0 mg, 1,233 mmol), **AQ3** (435,0 mg, 1,850 mmol), glac. AcOH (100 μ L, 2 mmol),

NaBH₄ (280 mg, 7,4 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (30 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent EtOAc/heksan gradijent od 1/1 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 7/3 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃(9/1) gradijent od 95/5 do 7/3). Prinos 280 mg (60%). Praškasta supstanca, bleožute boje, topi se na 122

– 123 °C. IR (ATR): 3298sl, 3214sr, 3059sl, 2952sl, 2888sl, 2827sl, 1611sl, 1581j, 1539sr, 1456sr, 1426sr, 1358sl, 1327sr, 1277sl, 1224sl, 1168sl, 1139sl, 1112sl, 1082sl, 893sl, 848sl, 811sl, 764sr, 731sr, 636sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,48-8,43 (m, H-C(2')), 7,93-7,90 (m, H-C(7)), 7,89-7,86 (m, H-C(8')), 7,80-7,77 (m, H-C(4)), 7,42-7,33 (m, 3H, H-N izmenjiv sa D_2O i H-C(5) i H-C(2)), 7,32-7,28 (m, 2H, H-C(6) i H-C(5')), 6,94-6,89 (m, H-C(6')), 6,27 (d, $J = 5,4$, H-C(3')), 4,11-4,07 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{NH-}$), 3,43-3,37 (m, 2H, ArNHCH_2-), 3,07-3,01 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{NHCH}_2-$), 2,03-1,92 (m, 3H, $\text{ArCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ i H-N izmenjiv sa D_2O). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 151,85; 150,38; 148,84; 140,67; 138,12; 134,56; 134,45; 128,17; 124,79; 124,62; 124,27; 123,49; 123,05; 121,88; 121,43; 117,33; 98,24; 49,41; 47,59; 43,81; 27,38. HRMS: m/z 382,11218 odgovara molekulkovoj formuli $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{SH}^+$ (greška u ppm - 4,57). Mikroanaliza ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{S}$) izračunato: C, 66,04; H, 5,28; N, 11,00; S, 8,40; nađeno: C, 65,69; H, 5,54; N, 10,84; S, 8,00. HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 8,487 min, površina 99,20%; metoda B: RT 7,438 min, površina 99,18%.

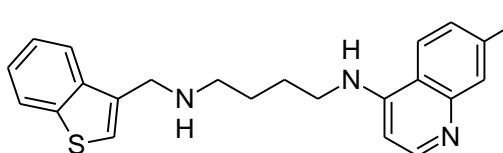
***N*-(1-benzotien-3-ilmetil)-*N'*-(hinolin-4-il)propan-1,3-diamin (76).**⁸⁵



Jedinjenje **76** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem 1-benzotiofen-3-karbaldehida (115,6 mg, 0,7126 mmol), **AQ7** (215,2 mg, 1,069 mmol), glac. AcOH (61 μL , 1,1 mmol), NaBH_4 (161,8 mg, 4,278 mmol) i $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent EtOAc/heksan=1/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 7/3). Prinos 177,1 mg (72%). Ulje, žute boje. IR (film): 3750sl, 3673sl, 3648sl, 3447j, 2917sl, 2845sl, 1650sl, 1576sl, 1557sl, 1541sl, 1458sl, 1433sl, 1397sl, 1370sl, 1338sl, 1132sl, 763sl, 732sl, 617sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 -izmena sa D_2O , δ): 8,51-8,48 (m, H-C(2')), 7,94-7,88 (m, 2H, H-C(7) i H-C(8')), 7,84-7,80 (m, H-C(4)), 7,56-7,49 (m, 2H, H-C(5') i H-C(7')), 7,38-7,31 (m, 3H, H-C(6') i H-C(5) i H-C(2)), 7,14-7,09 (m, H-C(6)), 6,35-6,31 (m, H-C(3')), 4,10 (s, 2H, $\text{ArCH}_2\text{NH-}$), 3,45-3,40 (m, 2H, ArNHCH_2-), 3,04-2,99 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{NHCH}_2-$), 2,00-1,93 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 150,66; 150,26; 147,46; 140,68; 138,17; 134,49; 129,07; 128,85; 124,56; 124,41; 124,24; 123,47; 123,02; 121,47; 120,28; 118,77; 97,92; 49,20; 47,64; 43,65; 27,57. HRMS: m/z

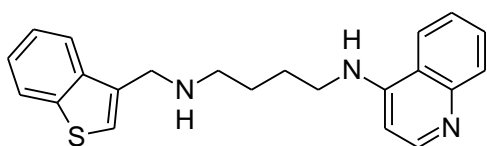
348,15179 odgovara molekularnoj formuli $C_{21}H_{21}N_3SH^+$ (greška u ppm -3,18). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 8,708 min, površina 97,43%; metoda B: RT 7,815 min, površina 97,16%.

***N*-(1-benzotien-3-ilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,4-diamin (77=JK29).**⁸⁵



Jedinjenje **77 (JK29)** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem 1-benzotiofen-3-karbaldehida (80,0 mg, 0,493 mmol), **AQ4** (184,7 mg, 0,7398 mmol), glac. AcOH (42 μ L, 0,74 mmol), $NaBH_4$ (111,9 mg, 2,959 mmol) i MeOH/ CH_2Cl_2 (18 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP1, SiO_2 kolona, eluent EtOAc/MeOH+ NH_3 (9/1) gradijent od 95/5 do 7/3). Prinos 115 mg (59%). Praškasta supstanca, bleđožute boje, topi se na 82 – 85 °C. IR (ATR): 3304sl, 3220sl, 3056sl, 2927sl, 2851sl, 2817sl, 1582j, 1540sr, 1459sr, 1427sl, 1365sl, 1327sl, 1276sl, 1255sl, 1228sl, 1164sl, 1136sl, 1079sl, 1022sl, 898sl, 864sl, 835sl, 749sl, 724sl, 638sl cm^{-1} . 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ): 8,49 (d, $J = 5,5$, H-C(2')), 7,93-7,90 (m, H-C(8')), 7,89-7,85 (m, H-C(7)), 7,82-7,78 (m, H-C(4)), 7,58 (d, $J = 8,9$, H-C(5')), 7,39-7,33 (m, 2H, H-C(5) i H-C(6)), 7,30 (s, H-C(2)), 7,14-7,09 (m, H-C(6')), 6,34 (d, $J = 5,4$, H-C(3')), 5,83 (bs, H-N izmenjiv sa D_2O), 4,08-4,04 (m, 2H, $ArCH_2NH-$), 3,32-3,26 (m, 2H, $ArNHCH_2-$), 2,81 (t, 2H, $J = 6,6$, $ArCH_2NHCH_2-$), 1,92-1,84 (m, 2H, $ArNHCH_2CH_2-$), 1,80 (bs, H-N izmenjiv sa D_2O), 1,75-1,68 (m, 2H, $ArCH_2NHCH_2CH_2-$). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, δ): 151,95; 149,94; 149,00; 140,70; 138,20; 134,83; 134,71; 128,55; 124,98; 124,47; 124,08; 123,01; 122,97; 121,54; 121,20; 117,20; 98,84; 48,88; 47,59; 43,14; 27,68; 26,30. HRMS: m/z 396,12784 odgovara molekularnoj formuli $C_{22}H_{22}ClN_3SH^+$ (greška u ppm -4,38). HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda A: RT 8,153 min, površina 97,42%; ($\lambda = 330$ nm) metoda B: RT 7,519 min, površina 97,71%.

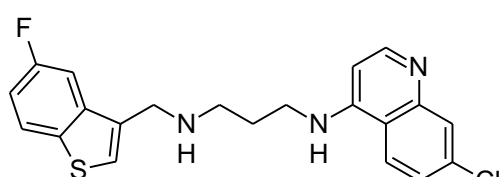
***N*-(1-benzotien-3-ilmetil)-*N'*-(hinolin-4-il)butan-1,4-diamin (78).**⁸⁵



Jedinjenje **78** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem 1-benzotiofen-3-karbaldehida (80,0 mg, 0,493 mmol), **AQ8** (159,3 mg, 0,7398 mmol), glac. AcOH (42 μ L, 0,74

mmol), NaBH₄ (111,9 mg, 2,959 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (18 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent EtOAc/heksan gradijent od 2/8 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent 95/5 → 1/9; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 7/3 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 101 mg (57%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3307sr, 3077sr, 2935sr, 2859sr, 2818sr, 1585j, 1547sr, 1500sl, 1442sr, 1401sl, 1376sl, 1343sl, 1283sl, 1257sl, 1226sl, 1130sl, 1035sr, 809sl, 766sr, 733sl, 652sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,31 (d, *J* = 5,4, H-C(2')), 8,08-8,04 (m, H-C(8')), 7,86-7,83 (m, H-C(7')), 7,82-7,79 (m, H-C(4')), 7,79-7,77 (m, H-C(5')), 7,62-7,58 (m, H-C(7')), 7,42 (ps, H-C(2)), 7,41-7,30 (m, 3H, H-C(5) i H-C(6) i H-C(6')), 6,46 (d, *J* = 5,7, H-C(3')), 4,01-3,99 (m, 2H, ArCH₂NH-), 3,36 (t, 2H, *J* = 6,9, ArNHCH₂-), 2,73 (t, 2H, *J* = 7,2, ArCH₂NHCH₂-), 1,82-1,74 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,73-1,65 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 152,69; 151,12; 148,80; 141,93; 139,68; 135,53; 130,46; 128,69; 125,55; 125,46; 125,13; 124,54; 123,76; 122,57; 122,20; 120,26; 99,14; 49,96; 47,56; 43,76; 28,02; 27,21. HRMS: *m/z* 362,16853 odgovara molekularnoj formuli C₂₂H₂₃N₃SH⁺ (greška u ppm -0,05). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 8,366 min, površina 97,01%; metoda B: RT 7,416 min, površina 96,78%.

***N*-(7-hlorhinolin-4-il)-*N'*-[(5-fluor-1-benzotien-3-il)metil]propan-1,3-diamin (79).**⁸⁵

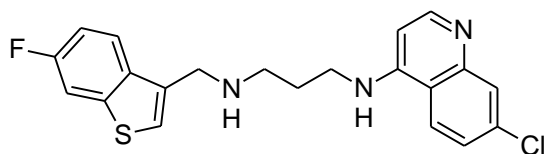


Jedinjenje **79** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **53** (180,0 mg, 0,9989 mmol), **AQ3** (353,2 mg, 1,498 mmol), glac. AcOH (85 μL, 1,5 mmol), NaBH₄ (226,7 mg,

5,993 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc=1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 4/6; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃(9/1) gradijent od 95/5 do 7/3). Prinos 269 mg (67%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 133 – 134 °C. IR (ATR): 3240sr, 3060sl, 2953sr, 2852sl, 1607sr, 1579j, 1535sr, 1435sr, 1360sl, 1329sr, 1279sl, 1251sl, 1230sl, 1205sl, 1137sl, 1104sl, 1082sl, 913sl, 850sl, 800sl, 761sl, 718sl, 665sl, 642sl

cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,50-8,47 (m, H-C(2')), 7,90-7,88 (m, H-C(8')), 7,83 (dd, *J*₁ = 4,8, *J*₂ = 8,9, H-C(7)), 7,48-7,44 (m, H-C(4)), 7,43 (s, H-C(2)), 7,35 (d, *J* = 9,0, H-C(5')), 7,17-7,09 (m, H-C(6) i H-N izmenjiv sa D₂O), 7,01-6,97 (m, H-C(6')), 6,32 (d, *J* = 5,5, H-C(3')), 4,06 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,46-3,40 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,07-3,03 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,02-1,95 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-), 1,69 (bs, H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 160,88 (d, *J* = 240,1); 152,04; 150,24; 149,05; 139,37 (d, *J* = 9,0); 135,98; 134,57; 134,37 (d, *J* = 4,5); 128,48; 125,89; 124,81; 124,17 (d, *J* = 9,9); 121,61; 117,36; 113,51 (d, *J* = 25,3); 107,28 (d, *J* = 22,6); 98,39; 49,36; 47,64; 43,68; 27,60. HRMS: *m/z* 400,10388 odgovara molekulknoj formuli C₂₁H₁₉ClFN₃SH⁺ (greška u ppm -1,56). Mikroanaliza (C₂₁H₁₉ClFN₃S) izračunato: C, 63,07; H, 4,79; N, 10,51; S, 8,02; nađeno: C, 63,09; H, 4,77; N, 10,30; S, 7,72. HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 8,998 min, površina 98,73%; metoda B: RT 8,544 min, površina 99,17%.

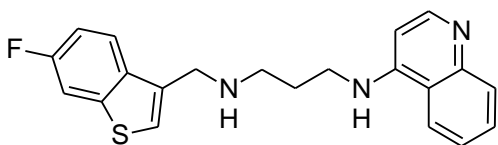
***N*-(7-Hlorhinolin-4-il)-*N'*-[(6-fluor-1-benzotien-3-il)metil]propan-1,3-diamin (80).**⁸⁵



Jedinjenje **80** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **54** (160,0 mg, 0,8879 mmol), **AQ3** (313,9 mg, 1,3318 mmol), glac. AcOH (75 μL, 1,3 mmol), NaBH₄ (201,5 mg, 5,327 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc=1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 4/6; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃(9/1) gradijent od 95/5 do 3/7). Prinos 194 mg (54%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 149 – 150 °C. IR (ATR): 3433sl, 3294sr, 3210sr, 3067sr, 3015sr, 2927sr, 2853sr, 1606sr, 1581j, 1539sr, 1466sr, 1430sr, 1369sr, 1330sr, 1282sl, 1251sr, 1208sr, 1168sl, 1139sr, 1109sl, 1080sl, 896sr, 854sr, 807sr, 761sl, 737sl, 683sl, 646sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,51-8,46 (m, H-C(2')), 7,90 (ps, H-C(8')), 7,74-7,70 (m, H-C(4)), 7,60-7,57 (m, H-C(7)), 7,35 (d, *J* = 8,7, H-C(5')), 7,30 (s, H-C(2)), 7,22 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 7,07-7,02 (m, H-C(5)), 7,01-6,96 (m, H-C(6')), 6,31 (d, *J* = 5,3, H-C(3')), 4,08 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,45-3,40 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,07-3,02 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,01-

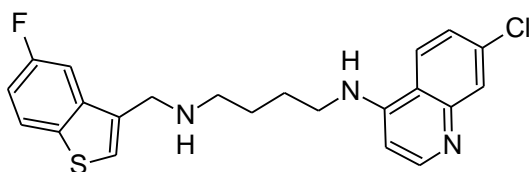
1,95 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-), 1,76 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 160,70 (d, *J* = 243,7); 151,97; 150,31; 148,92; 141,61 (d, *J* = 9,9); 134,71; 134,12; 128,39; 124,83; 122,97 (d, *J* = 3,6); 122,46 (d, *J* = 9,0); 121,70; 117,33; 113,28 (d, *J* = 23,5); 109,07 (d, *J* = 25,3); 98,36; 49,37; 47,69; 43,75; 27,52. HRMS: *m/z* 400,10427 odgovara molekulknoj formuli C₂₁H₁₉ClFN₃SH⁺ (greška u ppm -0,56). HPLC čistoća (λ = 330 nm) metoda A: RT 9,049 min, površina 95,99 %; (λ = 254 nm) metoda B: RT 7,455 min, površina 97,07 %.

***N*-[(6-fluor-1-benzotien-3-il)metil]-*N'*-(hinolin-4-il)propan-1,3-diamin (81).**



Jedinjenje **81** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **54** (164,3 mg, 0,9117 mmol), **AQ7** (275,3 mg, 1,368 mmol), glac. AcOH (78 μL, 1,4 mmol), NaBH₄ (206,9 mg, 5,471 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 4/6; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃ (9/1) gradijent od 95/5 do 3/7). Prinos 165 mg (50%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3252sr, 3072sr, 2925sr, 2850sr, 2359sl, 1583j, 1539sr, 1466sr, 1398sl, 1372sl, 1338sl, 1283sl, 1252sl, 1210sl, 1132sl, 1051sl, 895sl, 851sl, 811sl, 765sl, 736sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,53-8,48 (m, H-C(2')), 7,93 (d, *J* = 8,6, H-C(8')), 7,76-7,71 (m, H-C(4)), 7,58-7,52 (m, 2H, H-C(7)) i H-C(7')), 7,50 (d, *J* = 8,2, H-C(5')), 7,29 (s, H-C(2)), 7,15-7,09 (m, H-C(6')), 7,09-6,98 (m, H-C(5) i H-N izmenjiv sa D₂O), 6,34-6,31 (m, H-C(3')), 4,07 (s, 2H, ArCH₂-), 3,45-3,39 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,04-2,98 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,05-1,90 (m, 3H, ArCH₂NHCH₂CH₂- i H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 160,64 (d, *J* = 243,2); 150,82; 150,30; 148,09; 141,56 (d, *J* = 9,6); 134,75; 134,20; 129,41; 128,88; 124,24; 122,89 (d, *J* = 3,5); 122,54 (d, *J* = 8,8); 120,06; 118,87; 113,20 (d, *J* = 24,5); 108,97 (d, *J* = 25,4); 98,10; 49,17; 47,75; 43,49; 27,74. HRMS: *m/z* 366,14294 odgovara molekulknoj formuli C₂₁H₂₀FN₃SH⁺ (greška u ppm -1,45). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 8,353, površina 98,30%; metoda B: RT 7,413, površina 95,19%.

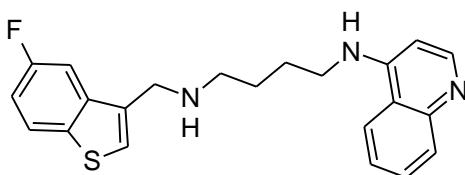
***N*-(7-fluorhinolin-4-il)-*N'*-[(5-fluor-1-benzotien-3-il)metil]butan-1,4-diamin (**82**).⁸⁵**



Jedinjenje **82** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **53** (181,1 mg, 1,005 mmol), **AQ4** (376,0 mg, 1,507 mmol), glac. AcOH (85 μ L, 1,5 mmol),

NaBH₄ (228,1 mg, 6,030 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc=1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/1; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃(9/1) gradijent od 95/5 do 1/1). Prinos 251 mg (60%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 110 – 113 °C. IR (ATR): 3228sr, 3063sl, 2945sr, 2855sl, 2810sl, 1579j, 1543sr, 1490sl, 1433sr, 1366sl, 1330sl, 1279sl, 1245sl, 1225sl, 1196sl, 1161sl, 1134sl, 1078sl, 954sl, 898sl, 854sl, 806sl, 782sl, 640sl, 619sl, 543sl, 483sl, 452sl, 423sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,50 (d, *J* = 5,2, H-C(2')), 7,94-7,91 (m, H-C(8')), 7,77 (dd, *J*₁ = 4,8, *J*₂ = 8,7, H-C(7)), 7,59 (d, *J* = 8,9, H-C(5')), 7,51-7,46 (m, H-C(4)), 7,38 (s, H-C(2)), 7,19-7,14 (m, H-C(6')), 7,14-7,07 (m, H-C(6)), 6,36 (d, *J* = 5,3, H-C(3')), 5,65 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 4,00 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,33-3,27 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,80 (t, *J* = 6,6, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 1,92-1,83 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,76-1,58 (m, 3H, ArCH₂NHCH₂CH₂- i H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 160,74 (d, *J* = 240,1); 152,02; 149,82; 149,08; 139,46 (d, *J* = 9,0); 135,97; 134,79 (d, *J* = 3,6); 134,71; 128,68; 125,43; 125,02; 123,98 (d, *J* = 9,0); 121,05; 117,18; 113,29 (d, *J* = 24,4); 107,47 (d, *J* = 22,6); 98,91; 48,99; 47,67; 43,14; 27,69; 26,40. HRMS: *m/z* 414,11939 odgovara molekulskoj formuli C₂₂H₂₁ClFN₃SH⁺ (greška u ppm -1,85). HPLC čistoća (λ = 330 nm) metoda A: RT 9,136 min, površina 99,72%; (λ = 254 nm) metoda B: RT 7,522 min, površina 95,22%.

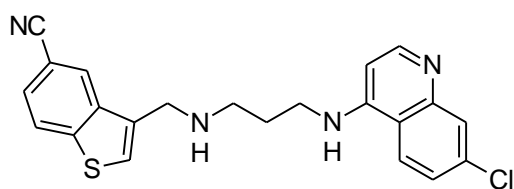
***N*-(5-fluor-1-benzotien-3-il)metil]-*N'*-(hinolin-4-il)butan-1,4-diamin (**83**).**



Jedinjenje **83** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **53** (90,0 mg, 0,499 mmol), **AQ8** (161,3 mg, 0,7492 mmol), glac. AcOH (43 μ L, 0,75 mmol), NaBH₄ (113,4 mg, 2,997 mmol)

i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 112 mg (59%). Ulje, svetložute boje. IR (ATR): 3649sl, 3566sl, 3255sr, 3074sr, 2933sr, 2858sr, 1582j, 1541sr, 1438sr, 1396sl, 1374sl, 1342sr, 1249sl, 1198sl, 1130sl, 1082sl, 1035sl, 914sl, 855sl, 808sl, 765sl, 736sl, 647sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,53 (d, *J* = 5,2, H-C(2')), 7,97-7,94 (m, H-C(8')), 7,76 (dd, *J*₁ = 4,8, *J*₂ = 8,7, H-C(7)), 7,71-7,68 (m, H-C(5')), 7,60-7,55 (m, H-C(7')), 7,52-7,47 (m, H-C(4)), 7,37 (s, H-C(2)), 7,30-7,25 (m, H-C(6')), 7,13-7,07 (m, H-C(6)), 6,37 (d, *J* = 5,2, H-C(3')), 5,55 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 4,01-3,97 (m, 2H, ArCH₂-), 3,33-3,27 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,78 (t, *J* = 6,9, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 1,89-1,81 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,80-1,66 (m, 3H, H-N izmenjiv sa D₂O i ArNHCH₂CH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 160,70 (d, *J* = 240,1); 150,97; 149,75; 148,33; 139,49 (d, *J* = 9,0); 135,94; 134,89 (d, *J* = 4,5); 129,78; 128,87; 125,33; 124,38; 123,92 (d, *J* = 9,0); 119,40; 118,74; 113,20 (d, *J* = 25,3); 107,50 (d, *J* = 23,5); 98,60; 49,02; 47,67; 43,07; 27,68; 26,42. HRMS: *m/z* 190,58320 odgovara molekulknoj formuli C₂₂H₂₂N₃SFH₂²⁺ (greška u ppm 0,00); *m/z* 380,15904 odgovara molekulknoj formuli C₂₂H₂₂N₃SFH⁺ (greška u ppm -0,21). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 10,817, površina 98,73%; metoda B: RT 8,234, površina 97,72%.

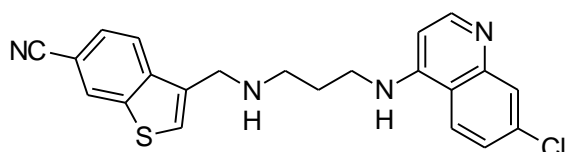
3-[(3-[(7-Hlorhinolin-4-il)amino]propil)amino)metil]-1-benzotiofen-5-karbonitril (84).⁸⁵



Jedinjenje **84** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **55** (79,6 mg, 0,425 mmol), **AQ3** (150,3 mg, 0,6378 mmol), glac. AcOH (36 μL, 0,64 mmol), NaBH₄ (96,5 mg, 2,55 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (15 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2). Prinos 124 mg (72%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 129 – 130 °C. IR (ATR): 3215sr, 3061sr, 3013sr, 2965sr, 2838sr, 2225sr, 1581j, 1439sr, 1367sl, 1282sl, 1261sl, 1235sl, 1137sl, 1079sl, 897sl, 851sl, 801sl, 768sl, 735sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,49 (d, *J* = 5,2, H-C(2')),

8,14-8,12 (m, H-C(4)), 7,97-7,94 (m, H-C(7)), 7,90-7,87 (m, H-C(8')), 7,55-7,52 (m, H-C(6)), 7,49 (s, H-C(2)), 7,35 (d, $J = 8,8$, H-C(5')), 7,02-6,99 (m, H-C(6')), 6,82 (s, H-N izmenjiv sa D₂O), 6,32 (d, $J = 5,2$, H-C(3')), 4,11-4,09 (m, 2H, ArCH₂NH-), 3,45-3,39 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,05-3,01 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,02-1,95 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-), 1,82 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 152,07; 150,04; 149,03; 144,77; 138,13; 134,84; 134,50; 128,56; 126,43; 126,36; 125,80; 124,74; 123,90; 121,38; 119,19; 117,28; 107,95; 98,55; 49,06; 47,41; 43,26; 27,79. HRMS: m/z 407,10826 odgovara molekularnoj formuli C₂₂H₁₉ClN₄SH⁺ (greška u ppm -2,23). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm) metoda A: RT 8,036 min, površina 98,36%; ($\lambda = 254$ nm) metoda C: RT 5,223 min, površina 97,09%.

3-[(3-[(7-Hlorhinolin-4-il)amino]propil)amino]metil]-1-benzotiofen-6-karbonitril (85).⁸⁵

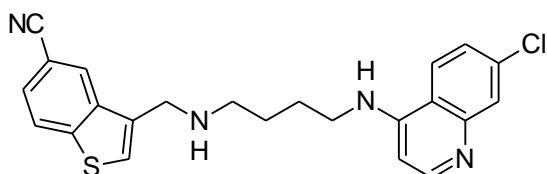


Jedinjenje **85** se sintetisuje po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **56** (58,5 mg, 0,312 mmol), **AQ3** (110,5 mg, 0,4687 mmol), glac. AcOH (27 μ L, 0,47

mmol), NaBH₄ (70,9 mg, 1,87 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (15 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 75/25; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃(9/1) gradijent od 95/5 do 1/1). Prinos 70,3 mg (55%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 48 – 50 °C. IR (film): 3256sr, 3058sr, 2945sr, 2849sr, 2226sr, 1916sl, 1610sr, 1581j, 1537sr, 1454sr, 1429sr, 1367sr, 1331sr, 1281sl, 1264sl, 1242sl, 1199sl, 1169sl, 1139sr, 1078sl, 1052sl, 899sl, 878sr, 851sr, 818sr, 766sl, 736j, 702sl, 646sl, 606sl, 503sl, 458sl, 432sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,52-8,47 (m, H-C(2')), 8,22-8,19 (m, H-C(7)), 7,92-7,89 (m, H-C(8')), 7,86 (d, $J = 8,4$, H-C(4)), 7,61 (s, H-C(2)), 7,51-7,47 (m, H-C(5)), 7,37-7,32 (m, H-C(5')), 7,05-6,85 (m, 2H, H-C(6') i H-N izmenjiv sa D₂O), 6,33-6,30 (m, H-C(3')), 4,12 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,45-3,39 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,06-3,01 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,02-1,96 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-), 1,77 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 152,04; 150,13; 149,89; 141,01;

140,55; 134,97; 133,95; 128,99; 128,07; 127,62; 126,84; 124,79; 122,37; 121,46; 118,98; 117,26; 107,98; 98,48; 49,22; 47,42; 43,50. HRMS: m/z 407,10922 odgovara molekulknoj formuli $C_{22}H_{19}ClN_4SH^+$ (greška u ppm 0,13). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 8,763 min, površina 96,57 %; metoda B: RT 7,719 min, površina 97,71%.

3-[(4-[(7-Hlorhinolin-4-il)amino]butil)amino]metil]-1-benzotiofen-5-karbonitril (86).⁸⁵

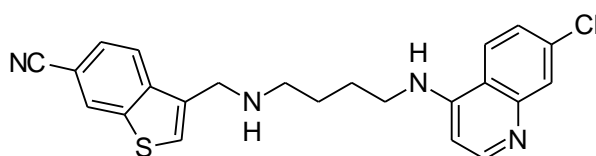


Jedinjenje **86** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **55** (117,9 mg, 0,6297 mmol), **AQ4** (235,9 mg, 0,9446 mmol), glac. AcOH (54 μ L, 0,94 mmol),

$NaBH_4$ (142,9 mg, 3,778 mmol) i MeOH/ CH_2Cl_2 (15 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 137 mg (52%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 112 – 113 °C. IR (ATR): 3309sr, 3270sl, 3106sl, 3054sl, 3005sl, 2972sl, 2944sl, 2875sl, 2840sl, 2227sr, 1613sl, 1579j, 1545sr, 1455sl, 1432sl, 1367sl, 1332sl, 1308sl, 1277sl, 1240sl, 1203sl, 1140sl, 1108sl, 1085sl, 1047sl, 925sl, 895sl, 865sl, 846sl, 803sr, 761sl, 743sl, 677sl, 627sl, 602sl, 567sl, 542sl cm^{-1} . 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$, δ): 8,55-8,49 (m, H-C(2')), 8,22 (s, H-C(4)), 7,96-7,91 (m, H-C(7) i H-C(8')), 7,60 (d, $J = 9,0$, H-C(5')), 7,56-7,52 (m, H-C(6)), 7,45 (ps, H-C(2)), 7,25-7,20 (m, H-C(6')), 6,38 (d, $J = 5,4$, H-C(3')), 5,44 (ps, H-N izmenjiv sa D_2O), 4,07 (s, 2H, $ArCH_2NH-$), 3,35-3,30 (m, 2H, $ArNHCH_2-$), 2,82 (t, 2H, $J = 6,8$, $ArCH_2NHCH_2-$), 1,93-1,85 (m, 2H, $ArNHCH_2CH_2-$), 1,77-1,70 (m, 2H, $ArCH_2NHCH_2CH_2-$), 1,60 (ps, H-N izmenjiv sa D_2O). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$, δ): 151,14; 150,49; 148,18; 144,82; 138,05; 135,08; 134,46; 127,20; 126,38; 126,20; 125,83; 125,06; 123,78; 121,68; 119,28; 117,05; 107,41; 98,48; 46,91; 42,72; 27,18; 26,01. HRMS: m/z 421,12435 odgovara molekulknoj formuli $C_{23}H_{21}ClN_4SH^+$ (greška u ppm -1,11); m/z 211,06568 odgovara molekulknoj formuli $C_{23}H_{21}ClN_4SH_2^{2+}$ (greška u ppm -1,76). HPLC čistoća (λ

= 330 nm): metoda A: RT 8,920 min, površina 99,20%; metoda B: RT 8,539 min, površina 96,73%.

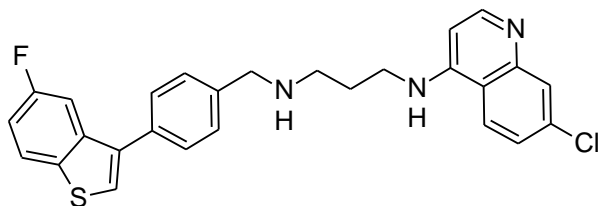
3-[(4-[(7-Hlorhinolin-4-il)amino]butil)amino]metil]-1-benzotiofen-6-karbonitril (87).⁸⁵



Jedinjenje **87** se sintetise po opstem postupku K, korišćenjem aldehida **56** (62,7 mg, 0,335 mmol), **AQ4** (125,4 mg, 0,5024 mmol), glac. AcOH (29 μ L,

0,50 mmol), NaBH₄ (76,0 mg, 2,01 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (15 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 8/2). Prinos 88,2 mg (65%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 62–65 °C. IR (ATR): 3296sr, 3125sr, 3052sr, 2938j, 2863sr, 2821sr, 2222sr, 1611sr, 1580j, 1538sr, 1455sr, 1371sr, 1326sr, 1282sl, 1256sl, 1199sl, 1139sl, 1080sl, 1022sr, 907sl, 874sl, 855sl, 823sr, 800sr, 606sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,53-8,50 (m, H-C(2')), 8,20-8,17 (m, H-C(7)), 7,95-7,93 (m, H-C(8')), 7,91 (d, *J* = 8,2, H-C(4)), 7,61-7,56 (m, 3H, H-C(2) i H-C(5) i H-C(5')), 7,23-7,18 (m, H-C(6')), 6,38 (d, *J* = 5,5, H-C(3')), 5,48 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 4,10-4,05 (m, 2H, ArCH₂NH-), 3,36-3,29 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,81 (t, 2H, *J* = 6,8, ArCH₂NHCH₂-), 1,92-1,84 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,77-1,69 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-), 1,64 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃ + CD₃OD, δ): 151,02; 150,48; 148,03; 141,02; 140,46; 135,18; 134,62; 128,12; 127,54; 127,26; 126,65; 125,15; 122,31; 121,62; 119,04; 116,99; 107,52; 98,53; 48,88; 46,92; 42,78; 27,21; 26,02. HRMS: *m/z* 421,12558 odgovara molekulskoj formuli C₂₃H₂₁ClN₄SH⁺ (greška u ppm 1,81). HPLC čistoća (λ = 330 nm) metoda A: RT 10,621 min, površina 98,74%; (λ = 254 nm) metoda B: RT 7,777 min, površina 95,86%.

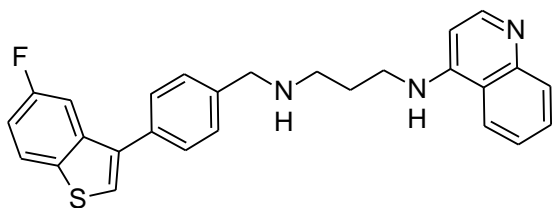
***N*-(7-hlorhinolin-4-il)-*N'*-[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]propan-1,3-diamin (88).**



Jedinjenje **88** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **57** (118 mg, 0,460 mmol), **AQ3** (162,8 mg, 0,6906 mmol), glac. AcOH (40 μ L, 0,7 mmol), NaBH₄ (104,5 mg,

2,762 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (18 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/1, MeOH; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent CH₂Cl₂/MeOH+NH₃ (9/1) gradijent od 95/5 do 3/7). Prinos 156,5 mg (71%). Pena, bleđožute boje, topi se na 39 – 40 °C. IR (ATR): 3239sl, 3062sl, 2935sl, 2844sl, 1583j, 1537sr, 1492sl, 1437sr, 1368sl, 1332sl, 1282sl, 1251sl, 1197sl, 1138sl, 1114sl, 883sl, 853sl, 806sr, 784sl, 650sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8,50 (d, *J* = 5,3, H-C(2')), 7,92-7,90 (m, H-C(8')), 7,84 (dd, *J*₁ = 4,8, *J*₂ = 8,9, H-C(7)), 7,59-7,53 (m, 5H, 2H-Ar, H-C(4), H-C(5') i H-N izmenjiv sa D₂O), 7,50 (s, H-C(2)), 7,48-7,44 (m, 2H-Ar), 7,19-7,11 (m, 2H, H-C(6) i H-C(6')), 6,32 (d, *J* = 5,2, H-C(3')), 3,92 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,45-3,40 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,05-3,01 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,02-1,95 (m, 2H ArCH₂NHCH₂CH₂-), 1,86 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 161,13 (d, *J* = 240,7); 152,13; 150,40; 149,15; 139,14; 138,98; 137,37 (d, *J* = 4,7); 136,03; 134,70; 134,58; 128,83; 128,74; 128,53; 125,86; 124,79; 124,05 (d, *J* = 8,5); 122,04; 117,50; 113,40 (d, *J* = 25,6); 108,45 (d, *J* = 23,7); 98,32; 54,01; 49,32; 43,97; 27,45. HRMS: *m/z* 476,13504 odgovara molekulskoj formuli C₂₇H₂₃ClN₃SFH⁺ (greška u ppm -1,60), *m/z* 238,57136 odgovara molekulskoj formuli C₂₇H₂₃ClN₃SFH₂²⁺ (greška u ppm -0,75). HPLC čistoća: metoda A (λ = 330 nm): RT 9,741, površina 96,57%; metoda C (λ = 254 nm): RT 5,816, površina 95,63%.

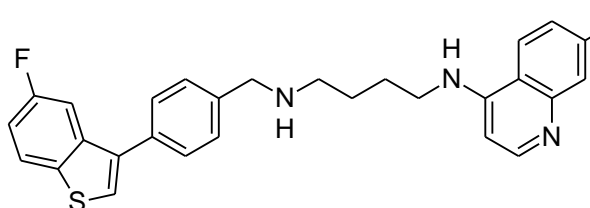
***N*-[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]-*N'*-hinolin-4-ilpropan-1,3-diamin (89).**



Jedinjenje **89** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **57** (65,3 mg, 0,255 mmol), **AQ7** (76,9 mg, 0,382 mmol), glac. AcOH (22 μ L, 0,38 mmol), NaBH₄ (57,8 mg, 1,53 mmol) i

MeOH/CH₂Cl₂ (18 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 4/6). Prinos 66,2 mg (59%). Pena, bleđožute boje, topi se na 37 – 40 °C. IR (ATR): 3648sl, 3254sr, 3063sr, 2927sr, 2849sr, 1720sl, 1583j, 1542sr, 1495sl, 1438sr, 1401sl, 1371sl, 1338sl, 1255sl, 1196sl, 1132sl, 884sl, 863sl, 808sl, 766sr, 737sr, 651sl, 542sl, 432sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,51 (d, *J* = 5,2, H-C(2')), 7,96 (d, *J* = 7,8, H-C(8')), 7,84 (dd, *J*₁ = 4,9, *J*₂ = 8,8, H-C(7)), 7,71-7,67 (m, H-C(4)), 7,59-7,53 (m, 4H-Ar), 7,50-7,46 (m, 3H-Ar), 7,26-7,22 (m, H-C(6')), 7,18-7,12 (m, H-C(6)), 6,35 (d, *J* = 5,5, H-C(3')), 3,92 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,47-3,42 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,05-3,00 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,64 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 2,03-1,96 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 161,13 (d, *J* = 240,1); 150,72; 150,50; 147,71; 139,18; 139,05 (d, *J* = 9,0), 137,48 (d, *J* = 4,5); 136,01; 134,62; 129,09; 128,91; 128,70; 125,77; 124,34; 124,05 (d, *J* = 9,0); 120,47; 118,92; 113,39 (d, *J* = 25,3); 108,48 (d, *J* = 23,5), 98,00; 54,07; 49,24; 43,87; 27,60. HRMS: *m/z* 221,59133 odgovara molekulknoj formuli C₂₇H₂₄N₃SFH₂²⁺ (greška u ppm 1,38); *m/z* 442,17549 odgovara molekulknoj formuli C₂₇H₂₄N₃SFH⁺ (greška u ppm 1,61). HPLC čistoća: metoda A (λ = 330 nm): RT 11,323, površina 96,48%; metoda B (λ = 254 nm): RT 7,986, površina 95,32%.

***N*-(7-hlorhinolin-4-il)-*N'*-[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]butan-1,4-diamin (90).**

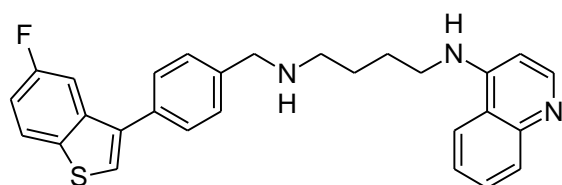


Jedinjenje **90** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **57** (93,2 mg, 0,364 mmol), **AQ4** (136,3 mg, 0,5458 mmol), glac.

AcOH (31 μ L, 0,54 mmol), NaBH₄ (82,6 mg, 2,18 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (15 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan,

heksan/EtOAc 1/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 3/7, MeOH). Prinos 99,1 mg (56%). Pena, bele boje, omekšava na 112 – 114 °C. IR (ATR): 3266sr, 3068sr, 2932sr, 2854sr, 2565sl, 1608sr, 1578j, 1535sr, 1490sl, 1471sl, 1435sr, 1367sr, 1331sr, 1280sl, 1249sr, 1195sr, 1135sl, 1114sl, 1060sl, 1019sl, 970sl, 902sl, 881sl, 850sl, 804sl, 781sl, 735sl, 647sl, 619sl, 570sl, 543sl, 517sl, 430sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8,51 (d, *J* = 5,5, H-C(2')), 7,94-7,92 (m, H-C(8')), 7,85-7,80 (m, H-C(7)), 7,66-7,62 (m, H-C(5')), 7,58-7,50 (m, 3H, 2H-Ar i H-C(4)), 7,48-7,42 (m, 3H, 2H-Ar i H-C(2)), 7,23-7,19 (m, H-C(6')), 7,17-7,12 (m, H-C(6)), 6,38 (d, *J* = 5,5, H-C(3')), 5,88 (s, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,90 (s, 2H, ArCH₂NH-), 3,35-3,29 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,82-2,77 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 1,94-1,87 (m, 2H ArNHCH₂CH₂-), 1,78-1,60 (m, 3H, ArCH₂NHCH₂CH₂- i H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 161,09 (d, *J* = 241,0); 152,07; 149,90; 149,16; 139,64; 139,06 (d, *J* = 9,9); 137,52 (d, *J* = 3,6); 135,98; 134,70; 134,37; 128,73; 128,61; 128,52; 125,68; 125,00; 124,00 (d, *J* = 9,0); 121,26; 117,25; 113,32 (d, *J* = 25,3); 108,48 (d, *J* = 24,4); 98,89; 53,68; 48,68; 43,21; 27,77; 26,37. HRMS: *m/z* 490,15075 odgovara molekularnoj formuli C₂₈H₂₅ClN₃SFH⁺ (greška u ppm -1,43). HPLC čistoća (λ = 254 nm): metoda D: RT 10,920, površina 96,15%; metoda E: RT 9,897, površina 96,40%.

***N*-[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]-*N'*-hinolin-4-ilbutan-1,4-diamin (**91**).¹³²**

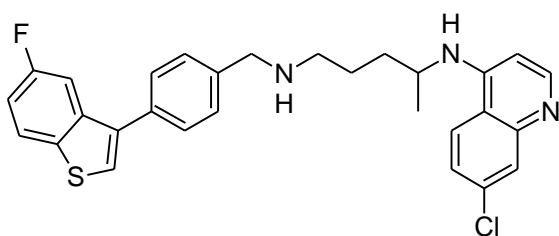


Jedinjenje **91** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **57** (158 mg, 0,615 mmol), **AQ8** (199 mg, 0,923 mmol), glac. AcOH (53 μL, 0,92

mmol), NaBH₄ (139,6 mg, 3,690 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 4/6; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent CH₂Cl₂/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 140 mg (50%). Ulje, bledožute boje. IR (ATR): 3241sl, 3067sl, 2929sl, 2855sl, 1579j, 1538sr, 1494sl, 1437sr, 1398sl, 1373sl, 1339sl, 1251sl, 1194sl, 1126sl, 763sl, 650sl, 542sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,55 (d, *J* = 5,2, H-C(2')), 7,99-7,95 (m, H-C(8')), 7,83 (dd, *J*₁ = 4,8, *J*₂ = 8,7, H-C(7)), 7,75-7,72 (m, H-C(5')), 7,62-7,57 (m, H-C(7')), 7,57-7,54 (m, H-C(4)), 7,54-7,50 (m, 2H-Ar), 7,47-7,43

(m, 3H, 2H-Ar i H-C(2)), 7,35-7,31 (m, H-C(6')), 7,17-7,12 (m, H-C(6)), 6,41 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 5,69 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,90 (s, 2H, ArCH₂-), 3,38-3,32 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,80 (t, 2H, $J = 6,8$, ArCH₂NHCH₂-), 1,94-1,87 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,78-1,63 (m, 3H, ArCH₂NHCH₂CH₂- i H-N izmenjiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 161,10 (d, $J = 240,1$); 151,02; 149,84; 148,38; 139,80; 139,09 (d, $J = 9,5$); 137,59 (d, $J = 4,5$); 135,98; 134,30; 129,87; 128,92; 128,58; 128,56; 125,62; 124,41; 123,99 (d, $J = 9,5$); 119,51; 118,80; 113,33 (d, $J = 25,3$); 108,51 (d, $J = 23,5$); 98,64; 53,72; 48,76; 43,20; 27,79; 26,47. HRMS: m/z 456,19032 odgovara molekularnoj formuli C₂₈H₂₆N₃SFH⁺ (greška u ppm -0,22). HPLC čistoća: metoda A (λ = 250 nm): RT 12,236, površina 95,18%; metoda B (λ = 330 nm): RT 7,869, površina 98,42%.

***N*⁴-(7-hlorhinolin-4-il)-*N*¹-[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]pentan-1,4-diamin (92).**

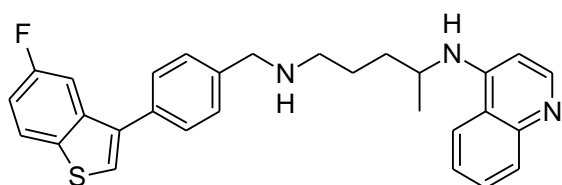


Jedinjenje **92** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **57** (61,5 mg, 0,240 mmol), *N*⁴-(7-hlorohinolin-4-il)pentan-1,4-diamin **147** (94,9 mg, 0,360 mmol), glac. AcOH (21

μL, 0,36 mmol), NaBH₄ (54,5 mg, 1,44 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (15 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 6/4). Prinos 79,4 mg (66%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 44 – 47 °C. IR (ATR): 3247sl, 3074sl, 2929sl, 2858sl, 1607sr, 1576j, 1536sl, 1491sl, 1441sr, 1375sl, 1334sl, 1252sl, 1197sl, 1142sl, 882sl, 810sl, 649sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,51 (d, $J = 5,2$, H-C(2')), 7,95-7,92 (m, H-C(8')), 7,83 (dd, $J_1 = 4,8$, $J_2 = 8,8$, H-C(7)), 7,64 (d, $J = 9,2$, H-C(5')), 7,58-7,54 (m, H-C(4)), 7,53; 7,44 (ABq, $J_{AB} = 8,2$, 4H-Ar), 7,46 (s, H-C(2)), 7,28-7,24 (m, H-C(6')), 7,15 (td, $J_1 = 2,6$, $J_2 = 8,6$, H-C(6)), 6,41 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 5,36-5,29 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,86 (s, 2H, ArCH₂-), 3,77-3,68 (m, 1H, ArNHCH(CH₃)-), 2,77-2,71 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 1,86-1,47 (m, 5H, ArNHCH(CH₃)CH₂- i ArNHCH(CH₃)CH₂CH₂- i H-N izmenjiv sa D₂O), 1,33 (d, $J = 6,4$, 3H, ArNHCH(CH₃)-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 161,08 (d, $J = 240,1$); 152,00; 149,35; 148,98; 139,79; 139,08 (d, $J = 9,0$); 137,56 (d, $J = 3,6$); 135,98; 134,73; 134,30; 128,82; 128,56; 128,54; 125,63; 125,00; 123,98 (d, $J = 9,0$); 121,05; 117,27;

113,31 (d, $J = 25,3$); 108,49 (d, $J = 23,5$); 99,17; 53,75; 49,00; 48,30; 34,14; 26,47; 20,24. HRMS: m/z 252,58726 odgovara molekulknoj formuli $C_{29}H_{27}ClN_3SFH_2^{2+}$ (greška u ppm 0,26); m/z 504,16695 odgovara molekulknoj formuli $C_{29}H_{27}ClN_3SFH^+$ (greška u ppm -0,30). HPLC čistoća: metoda A ($\lambda = 330$ nm): RT 9,825, površina 97,97%; metoda B ($\lambda = 254$ nm): RT 8,027, površina 96,12%.

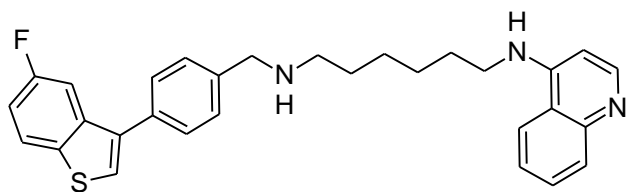
N^1 -[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]- N^4 -hinolin-4-ilpentan-1,4-diamin (93).



Jedinjenje **93** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **57** (94,2 mg, 0,368 mmol), N^4 -(hinolin-4-il)pentan-1,4-diamin **146** (126,4 mg,

0,5513 mmol), glac. AcOH (30 μ L, 0,5 mmol), $NaBH_4$ (83,4 mg, 2,20 mmol) i MeOH/ CH_2Cl_2 (24 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 4/6; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 66,1 mg (38%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3265sl, 3068sl, 2928sr, 2855sl, 1579j, 1536sr, 1496sl, 1439sr, 1396sl, 1341sl, 1254sl, 1224sl, 1196sl, 1135sl, 1116sl, 885sl, 865sl, 808sl, 766sl, 737sl cm^{-1} . 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$, δ): 8,53 (d, $J = 5,2$, H-C(2')), 7,96 (d, $J = 8,4$, H-C(8')), 7,82 (dd, $J_1 = 5,0$, $J_2 = 8,8$, H-C(7')), 7,72 (d, $J = 8,2$, H-C(5')), 7,62-7,57 (m, H-C(7')), 7,57-7,54 (m, H-C(4)), 7,50; 7,42 (ABq, $J_{AB} = 8,0$, 4H-Ar), 7,45 (s, H-C(2)), 7,37-7,33 (m, H-C(6')), 7,17-7,11 (m, H-C(6)), 6,42 (d, $J = 5,3$, H-C(3')), 5,24-5,19 (m, H-N izmenjiv sa D_2O), 3,86 (s, 2H, $ArCH_2-$), 3,79-3,70 (m, 1H, $ArNHCH(CH_3)-$), 2,78-2,69 (m, 2H, $ArCH_2NHCH_2-$), 1,85-1,50 (m, 5H, $ArNHCH(CH_3)CH_2-$ i $ArNHCH(CH_3)CH_2CH_2-$ i H-N izmenjiv sa D_2O), 1,33 (d, $J = 6,4$, 3H, $ArNHCH(CH_3)-$). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, δ): 161,05 (d, $J = 240,1$); 151,00; 148,84; 148,62; 139,91; 139,06 (d, $J = 9,0$); 137,58 (d, $J = 4,5$); 135,94; 134,19; 129,97; 128,85; 128,53; 128,50; 125,56; 124,32; 123,95 (d, $J = 9,0$); 119,31; 118,80; 113,27 (d, $J = 25,3$); 108,48 (d, $J = 24,4$); 98,86; 53,72; 49,05; 48,16; 34,18; 26,52; 20,30. HRMS: m/z 470,20471 odgovara molekulknoj formuli $C_{29}H_{28}N_3SFH^+$ (greška u ppm -2,90). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 10,651, površina 97,28%; metoda B: RT 8,430, površina 97,16%.

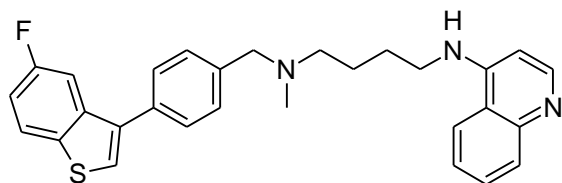
***N*-[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]-*N'*-hinolin-4-ilheksan-1,6-diamin (**94**).**



Jedinjenje **94** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **57** (62,8 mg, 0,245 mmol), **AQ9** (89,4 mg, 0,368 mmol), glac. AcOH

(21 μ L, 0,37 mmol), NaBH₄ (55,6 mg, 1,47 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (18 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent EtOAc/heksan gradijent od 1/9 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 2/8; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 74,2 mg (63%). Ulje, bleožute boje. IR (ATR): 3258sl, 3068sl, 2930sr, 2855sl, 1584j, 1540sr, 1495sl, 1439sr, 1397sl, 1374sl, 1342sr, 1252sl, 1196sl, 1117sl, 884sl, 864sl, 809sl, 768sr, 738sr, 652sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,57-8,52 (m, H-C(2')), 8,00-7,96 (m, H-C(8')), 7,81 (dd, $J_1 = 4,9$, $J_2 = 8,8$, H-C(7')), 7,73 (d, $J = 8,0$, H-C(5')), 7,63-7,58 (m, H-C(7')), 7,58-7,54 (m, H-C(4)), 7,52-7,48 (m, 2H-Ar), 7,45-7,41 (m, 3H, 2H-Ar i H-C(2)), 7,41-7,37 (m, H-C(6')), 7,16-7,10 (m, H-C(6)), 6,40 (d, $J = 5,4$, H-C(3')), 5,09 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,85 (s, 2H, ArCH₂-), 3,30-3,27 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,69 (t, $J = 7,1$, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 1,94 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 1,80-1,72 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,62-1,54 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-), 1,53-1,40 (m, 4H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 161,03 (d, $J = 240,1$); 150,93; 149,67; 148,27; 140,09; 139,07 (d, $J = 9,0$); 137,62 (d, $J = 4,5$); 135,93; 134,09; 129,80; 128,94; 128,54; 128,45; 125,51; 124,51; 123,93 (d, $J = 9,0$); 119,20; 118,63; 113,24 (d, $J = 24,4$); 108,47 (d, $J = 23,5$); 98,69; 53,74; 49,32; 43,12; 29,99; 28,82; 27,04. HRMS: m/z 484,22010 odgovara molekulske formuli C₃₀H₃₀N₃SFH⁺ (greška u ppm -3,35). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 9,792, površina 95,26%; metoda B: RT 8,382, površina 95,22%.

***N*-[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]-*N*-metil-*N'*-hinolin-4-ilbutan-1,4-diamin (**95**).**

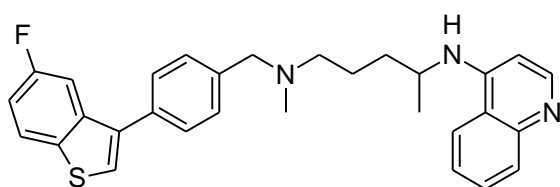


Jedinjenje **95** se sintetiše po opštem postupku L, korišćenjem **91** (30,0 mg, 0,0658 mmol), 37% vodenog rastvora formaldehida (10 μ L, 0,1 mmol), ZnCl₂

(17,9 mg, 0,132 mmol), NaBH₃CN (16,6 mg, 0,263 mmol) i MeOH (1 mL + 1 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP1, NH kolona,

eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃(9/1) gradijent od 95/5 do 2/8). Prinos 23,0 mg (74%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3647sl, 3252sr, 3069sr, 2927j, 2852sr, 2793sr, 1730sl, 1582j, 1541sr, 1494sl, 1438sr, 1374sl, 1342sr, 1252sr, 1195sr, 1118sl, 969sl, 883sl, 864sl, 807sl, 765sr, 737sl, 653sl, 628sl, 572sl, 543sl, 422sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 8,53 (d, *J* = 5,2, H-C(2')), 7,99-7,95 (m, H-C(8')), 7,82 (dd, *J*₁ = 4,6, *J*₂ = 8,8, H-C(7)), 7,74-7,71 (m, H-C(5')), 7,61-7,54 (m, H-C(7') i H-C(4)), 7,51-7,48 (m, 2H-Ar), 7,47-7,44 (m, 2H-Ar i H-C(2)), 7,35-7,30 (m, H-C(6')), 7,17-7,11 (m, H-C(6)), 6,40 (d, *J* = 5,3, H-C(3')), 5,76 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,60 (s, 2H, ArCH₂-), 3,36-3,30 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,52 (t, 2H, *J* = 6,8, ArCH₂NHCH₂-), 2,27 (s, 3H, CH₃-N), 2,19 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 1,89 (quin, 2H, *J* = 6,8, ArNHCH₂CH₂-), 1,76 (quin, 2H, *J* = 7,0, ArNHCH₂CH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 161,08 (d, *J* = 240,1); 150,87; 150,00; 148,21; 139,05 (d, *J* = 9,0); 138,43; 137,58 (d, *J* = 4,5); 135,98; 134,35; 129,70; 129,57; 128,96; 128,38; 125,61; 124,38; 123,98 (d, *J* = 9,9); 119,58; 118,76; 113,30 (d, *J* = 25,3); 108,50 (d, *J* = 23,5); 98,62; 61,89; 56,75; 43,19; 42,51; 26,48; 25,21. HRMS: *m/z* 470,20631 odgovara molekulskoj formuli C₂₉H₂₈N₃SF⁺ (greška u ppm 0,50). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 9,126, površina 97,87%; metoda B: RT 7,770, površina 96,71%.

N¹-[4-(5-fluor-1-benzotien-3-il)benzil]-N¹-metil-N⁴-hinolin-4-ilpentan-1,4-diamin (96).

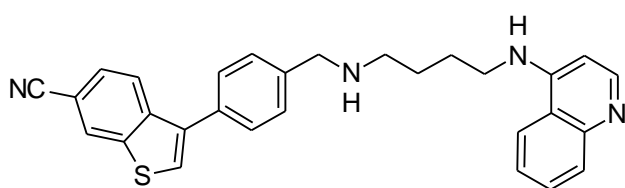


Jedinjenje **96** se sintetiše po opštem postupku L, korišćenjem **93** (20,0 mg, 0,0426 mmol), 37% vodenog rastvora formaldehida (6,4 μL, 0,085 mmol),

ZnCl₂ (11,6 mg, 0,0852 mmol), NaBH₃CN (10,7 mg, 0,170 mmol) i MeOH (1 mL + 1 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/1; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH). Prinos 12,3 mg (60%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3730sl, 3625sl, 3276sr, 3068sr, 2932sr, 2851sr, 2792sr, 1720sl, 1579j, 1536sr, 1496sl, 1439sr, 1395sl, 1342sr, 1253sr, 1195sr, 1136sl, 1115sl, 1058sl, 1019sl,

883sl, 864sl, 807sl, 765sl, 736sl, 654sl, 571sl, 542sl, 423sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 8,51 (d, $J = 5,4$, H-C(2')), 7,98-7,95 (m, H-C(8')), 7,82 (dd, $J_1 = 4,8$, $J_2 = 8,8$, H-C(7)), 7,73-7,69 (m, H-C(5')), 7,62-7,55 (m, H-C(7') i H-C(4)), 7,50; 7,43 (ABq, $J_{AB} = 8,2$, 4H-Ar), 7,46 (s, H-C(2)), 7,38-7,33 (m, H-C(6')), 7,17-7,11 (m, H-C(6)), 6,41 (d, $J = 5,4$, H-C(3')), 5,22-5,16 (m, H-N izmenjiv sa D_2O), 3,78-3,68 (m, 1H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$), 3,56 (s, 2H, ArCH_2-), 2,51-2,41 (m, 2H, $\text{ArCH}_2\text{NHCH}_2-$), 2,23 (s, 3H, CH_3-N), 2,19 (ps, H-N izmenjiv sa D_2O), 1,82-1,65 (m, 4H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ i $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,33 (d, $J = 6,4$, 3H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 161,07 (d, $J = 240,1$); 150,91; 148,96; 148,52; 139,08 (d, $J = 9,0$); 138,64; 137,63 (d, $J = 4,5$); 135,98; 134,25; 129,88; 129,49; 128,91; 128,34; 125,57; 124,34; 123,97 (d, $J = 9,0$); 119,32; 118,79; 113,28 (d, $J = 25,3$); 108,52 (d, $J = 23,5$); 98,91; 62,06; 57,02; 48,11; 42,38; 34,28; 23,91; 20,33. HRMS: m/z 484,22192 odgovara molekularnoj formuli $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{SFH}^+$ (greška u ppm 0,41). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 9,127, površina 97,38%; metoda B: RT 7,846, površina 97,18%.

3-[4-({[4-(Hinolin-4-ilamino)butil]amino}metil)fenil]-1-benzotiofen-6-karbonitril (97).

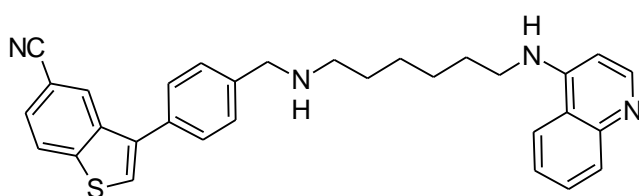


Jedinjenje **97** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **59** (100,0 mg, 0,3798 mmol), **AQ8** (122,6 mg, 0,5697 mmol), glac.

AcOH (33 μL , 0,57 mmol), NaBH_4 (86,2 mg, 2,28 mmol) i $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (18 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/ EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc , EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH , $\text{EtOAc}/\text{MeOH}(\text{NH}_3 \text{ zas.})=95/5$; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent $\text{EtOAc}/\text{heksan}$ gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc , EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 7/3; flash, Biotage SP1, SiO_2 kolona, eluent $\text{EtOAc}/\text{MeOH}+\text{NH}_3$ (9/1) gradijent od 95/5 do 8/2). Prinos 92,2 mg (52%). Pena, bele boje, topi se na 75–80 $^\circ\text{C}$. IR (ATR): 3620sl, 3269sr, 3067sr, 2935sr, 2858sr, 2224sr, 1616sl, 1580j, 1539sr, 1449sr, 1396sl, 1374sl, 1341sr, 1258sl, 1194sl, 1129sl, 946sl, 825sr, 765sr, 622sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,54 (d, $J = 5,3$, H-C(2')), 8,24-8,22 (m, H-C(7)), 7,99-7,96 (m, H-C(4)), 7,96-7,93 (m, H-C(8')), 7,75-7,72 (m, H-C(5')), 7,63 (s, H-C(2)), 7,61-7,57 (m, 2H, H-

= 6,2, ArNHCH(CH₃)-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 150,87; 148,93; 148,47; 144,74; 140,47; 137,90; 133,23; 129,86; 128,93; 128,72; 128,66; 127,71; 126,25; 125,49; 124,38; 123,89; 119,42; 119,32; 118,76; 108,11; 98,86; 53,66; 49,03; 48,19; 34,19; 26,52; 20,33. HRMS: *m/z* 239,10924 odgovara molekularnoj formuli C₃₀H₂₈N₄SH₂²⁺ (greška u ppm 0,95); *m/z* 477,21086 odgovara molekularnoj formuli C₃₀H₂₈N₄SH⁺ (greška u ppm 0,25). HPLC čistoća: metoda A (λ = 330 nm): RT 8,915, površina 98,20%; metoda B (λ = 254 nm): RT 7,647, površina 95,15%.

3-[4-({[6-(Hinolin-4-ilamino)heksil]amino}metil)fenil]-1-benzotiofen-5-karbonitril (99).

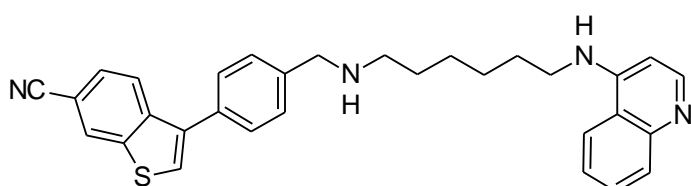


Jedinjenje **99** se sintetisuje po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **58** (113,8 mg, 0,4322 mmol), **AQ9** (157,8 mg, 0,6486 mmol), glac.

AcOH (37 μL, 0,65 mmol), NaBH₄ (98,1 mg, 2,59 mmol) i MeOH/CH₂Cl₂ (22,5 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 7/3; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃ (9/1) gradijent od 95/5 do 7/3). Prinos 42,0 mg (19%). Pena, bele boje, topi se na 45–49 °C. IR (ATR): 3302sr, 3074sr, 2928sr, 2854sr, 2225sr, 1618sl, 1579j, 1540sr, 1495sl, 1457sl, 1436sl, 1397sl, 1374sl, 1340sr, 1254sl, 1222sl, 1128sl, 1057sl, 765sr cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,54 (d, *J* = 5,2, H-C(2')), 8,20-8,18 (m, H-C(4)), 8,00-7,96 (m, H-C(7) i H-C(8')), 7,73 (d, *J* = 8,0, H-C(5')), 7,64-7,60 (m, H-C(7')), 7,60-7,56 (m, H-C(6)), 7,52 (s, H-C(2)), 7,50-7,46 (m, 4H-Ar), 7,44-7,39 (m, H-C(6')), 6,42 (d, *J* = 5,2, H-C(3')), 5,06 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,88 (s, 2H, ArCH₂-), 3,36-3,30 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,71 (t, *J* = 7,1, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 1,88 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 1,83-1,75 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,64-1,56 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂CH₂-), 1,56-1,43 (m, 4H, ArCH₂NHCH₂CH₂CH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 151,01; 149,62; 148,37; 144,74; 140,76; 137,98; 137,93; 133,14; 129,94; 128,92; 128,75; 128,63; 127,74; 126,24; 125,43; 124,52; 123,88; 119,44; 119,14; 118,66; 108,10; 98,74; 53,72; 49,33; 43,16; 30,05; 28,88; 27,08. HRMS: *m/z*

246,11747 odgovara molekulknoj formuli $C_{31}H_{30}N_4SH_2^{2+}$ (greška u ppm 2,58); m/z 491,22632 odgovara molekulknoj formuli $C_{31}H_{30}N_4SH^+$ (greška u ppm -0,15). HPLC čistoća: metoda A ($\lambda = 330$ nm): RT 9,042, površina 99,09%; metoda B ($\lambda = 254$ nm): RT 7,712, površina 96,73%.

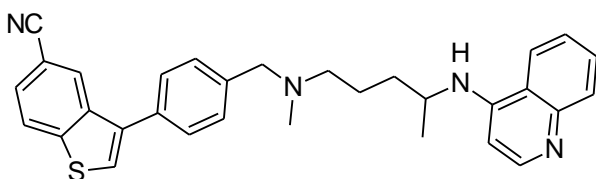
3-[4-([6-(Hinolin-4-ilamino)heksil]amino)metil]fenil]-1-benzotiofen-6-karbonitril (100).



Jedinjenje **100** se sintetiše po opštem postupku K, korišćenjem aldehida **59** (98,0 mg, 0,372 mmol), **AQ9** (135,9

mg, 0,5585 mmol), glac. AcOH (32 μ L, 0,56 mmol), $NaBH_4$ (84,4 mg, 2,23 mmol) i MeOH/ CH_2Cl_2 (18 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH(NH_3 zas.)=95/5; flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 7/3; flash, Biotage SP1, RP kolona, eluent MeOH/ H_2O gradijent od 7/3 do 9/1, MeOH). Prinos 60,1 mg (33%). Pena, bele boje, topi se na 68–75 °C. IR (ATR): 3402sl, 3266sl, 3069sl, 2927sr, 2853sr, 2225sr, 1669sl, 1616sl, 1580j, 1539sr, 1452sl, 1396sl, 1374sl, 1341sr, 1258sl, 1193sl, 1127sl, 1019sl, 946sl, 862sl, 825sl, 765sr, 622sl cm^{-1} . 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ): 8,55 (d, $J = 5,5$, H-C(2')), 8,24-8,22 (m, H-C(7)), 7,99-7,97 (m, H-C(4)), 7,97-7,94 (m, H-C(8')), 7,73-7,70 (m, H-C(5')), 7,64-7,58 (m, 3H, H-C(7')), H-C(2) i H-C(5)), 7,51-7,44 (m, 4H-Ar), 7,44-7,39 (m, H-C(6')), 6,42 (d, $J = 5,2$, H-C(3')), 5,00 (ps, H-N, izmenjiv sa D_2O), 3,87 (s, 2H, $ArCH_2NH-$), 3,35-3,30 (m, 2H, $ArNHCH_2-$), 2,71 (t, $J = 7,1$, 2H, $ArCH_2NHCH_2-$), 1,83-1,75 (m, 2H, $ArNHCH_2CH_2-$), 1,72-1,56 (m, 3H, $ArCH_2NHCH_2CH_2-$ i H-N izmenjiv sa D_2O), 1,55-1,44 (m, 4H, $ArNHCH_2CH_2CH_2CH_2-$). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, δ): 151,03; 149,61; 148,40; 140,76; 140,66; 140,53; 138,19; 133,34; 130,00; 128,95; 128,66; 127,77; 127,63; 126,93; 124,56; 123,65; 119,19; 119,09; 118,66; 107,75; 98,76; 53,77; 49,45; 43,16; 30,06; 28,89; 27,09. HRMS: m/z 491,22593 odgovara molekulknoj formuli $C_{31}H_{30}N_4SH^+$ (greška u ppm -0,94). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 8,949, površina 98,93%; metoda B: RT 7,699, površina 98,28%.

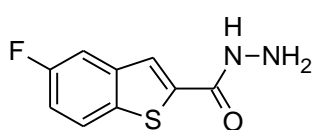
3-[4-({Metil[4-(hinolin-4-ilamino)pentil]amino}metil)fenil]-1-benzotiofen-5-karbonitril (101).



Jedinjenje **101** se sintetiše po opštem postupku L, korišćenjem **98** (15,8 mg, 0,0331 mmol), 37% vodenog rastvora formaldehida (5,1 μ L, 0,066 mmol),

ZnCl₂ (9,0 mg, 0,066 mmol), NaBH₃CN (8,3 mg, 0,13 mmol) i MeOH (1 mL + 1 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP1, NH kolona, eluent EtOAc/heksan gradijent od 8/2 do 9/1, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 95/5 do 1/9, MeOH; flash, Biotage SP1, SiO₂ kolona, eluent EtOAc/MeOH+NH₃(9/1) gradijent od 95/5 do 65/35). Prinos 12,1 mg (74%). Bezbojno ulje. IR (film): 3375j, 3104j, 2971j, 2796sr, 2346sl, 2306sl, 2227sr, 1963sl, 1703sr, 1601j, 1553j, 1498sr, 1460j, 1405sr, 1342sr, 1264sr, 1224sr, 1146sr, 1058sr, 1014sl, 888sl, 860sl, 805sr, 767sr, 735sr, 702sl, 654sr, 614sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,51 (d, *J* = 5,2, H-C(2')), 8,21-8,19 (m, H-C(4)), 8,01-7,98 (m, H-C(8')), 7,98-7,95 (m, H-C(7)), 7,74-7,71 (m, H-C(5')), 7,63-7,57 (m, H-C(6) i H-C(7')), 7,52 (s, H-C(2)), 7,49-7,44 (m, 4H-Ar), 7,39-7,35 (m, H-C(6')), 6,42 (d, *J* = 5,6, H-C(3')), 5,22-5,16 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,79-3,70 (m, 1H, ArNHCH(CH₃)-), 3,58 (s, 2H, ArCH₂-), 2,50-2,45 (m, 2H, ArCH₂NHCH₂-), 2,24 (s, 3H, CH₃-N), 2,10 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 1,84-1,67 (m, 4H, ArNHCH(CH₃)CH₂CH₂-), 1,35 (d, 3H, *J* = 6,2, ArNHCH(CH₃)-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 150,77; 149,03; 148,36; 144,78; 139,28; 137,96; 137,92; 133,28; 129,79; 129,64; 129,00; 128,50; 127,76; 126,27; 125,50; 124,42; 123,91; 119,46; 119,32; 118,76; 108,12; 98,91; 62,02; 57,03; 48,14; 42,39; 34,27; 23,90; 20,35. HRMS: *m/z* 491,22662 odgovara molekularnoj formuli C₃₁H₃₀N₄SH⁺ (greška u ppm 0,45). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 8,785, površina 96,50%; metoda B: RT 7,734, površina 97,90%.

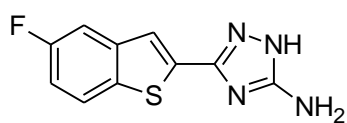
5-Fluor-1-benzotiofen-2-karbohidrazid (102).



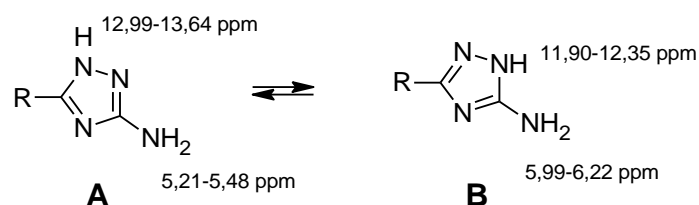
Prema postupku opisanom u literaturi,¹²⁰ metil-estar **34** (500,0 mg, 2,378 mmol) se suspenduje u apsolutnom EtOH (5 mL), doda se hidrazin-monohidrat (0,58 mL, 11,9 mmol) i reakciona smeša se meša uz refluktovanje tokom 24 h, pri čemu dolazi do izdvajanja

belog pahuljičastog taloga. Reakciona smeša se ohladi u ledenom kupatilu, talog procedi i ispere ledenim EtOH. Prinos 426 mg (85%). Čvrsta supstanca, bele boje, topi se na 174–179 °C. IR (ATR): 3303sr, 3256sr, 3204j, 3068sl, 3016sr, 1648sl, 1618j, 1555sr, 1516sr, 1439sl, 1342sr, 1294sl, 1220sl, 1171sl, 1130sl, 1090sl, 1066sl, 970sl, 869sl, 841sl, 796sl, 699sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, d-DMSO, δ): 10,08 (ps, H-N), 8,06-8,02 (m, H-C(7)), 7,96 (s, H-C(3)), 7,77-7,72 (m, H-C(4)), 7,35-7,29 (m, H-C(6)), 4,58 (ps, H-N). ¹³C NMR (125 MHz, d-DMSO, δ): 160,4 (d, *J* = 238,3); 161,07; 141,07; 140,22 (d, *J* = 9,9); 135,78; 124,65 (d, *J* = 9,0); 123,85; 114,90 (d, *J* = 25,3); 110,23 (d, *J* = 22,6). HRMS: *m/z* 211,03311 odgovara molekulknoj formuli C₉H₇FN₂OSH⁺ (greška u ppm -2,26).

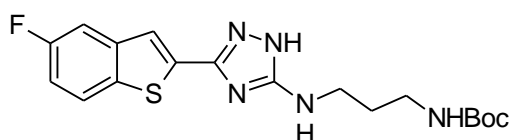
3-(5-Fluor-1-benzotien-2-il)-1*H*-1,2,4-triazol-5-amin (103).



Prema postupku opisanom u literaturi,¹²¹ **102** (400,0 mg, 1,903 mmol) se rastvori u apsolutnom EtOH (20 mL), doda se čvrst NaOH (190,3 mg, 4,757mmol) i *S*-metilizotiourea-sulfat (530 mg, 3,8 mmol). Reakciona smeša se zagreje na 120 °C i meša 15 h. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se pomoću EtOAc prenese u levak za odvajanje, organski sloj ispere vodom i zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suši iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan/EtOAc gradijent od 8/2 do 2/8, EtOAc, EtOAc/MeOH=9/1). Prinos 333 mg (75%). Čvrsta supstanca, bleožute boje, topi se na 267–268 °C. IR (ATR): 3477j, 3329sr, 3256sr, 3205sr, 3064sr, 2958j, 2920j, 2853sr, 2815sl, 2771sl, 1731sl, 1644j, 1608sl, 1585sr, 1561sl, 1493sl, 1467sl, 1437sl, 1391sr, 1348sl, 1290sl, 1238sl, 1200sr, 1128sl, 1094sl, 1040sl, 951sl, 932sl, 866sl, 816sl, 750sl, 712sl, 655sl, 614sl, 532sl, 436sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, d-DMSO, δ): 12,27 (ps, H-N), 7,98-7,93 (m, H-C(7)), 7,69 (ps, H-C(3)), 7,69-7,65 (m, H-C(4)), 7,24-7,18 (m, H-C(6)), 6,20 (ps, 2H, -NH₂). ¹³C NMR (125 MHz, d-DMSO, δ): 160,3 (d, *J* = 237,4); 157,54; 154,60; 140,93 (d, *J* = 9,0); 138,26; 134,49; 124,11 (d, *J* = 9,0); 120,41; 113,21 (d, *J* = 25,3); 109,19 (d, *J* = 23,5). HRMS: *m/z* 235,04395 odgovara molekulknoj formuli C₁₀H₇FN₄SH⁺ (greška u ppm -3,71). Hemijska pomeranja signala u ¹H NMR na 12,27 ppm i 6,20 ppm odgovaraju pomeranjima signala protona sa azota u tautomeru **B**, kako je detaljno proučeno u literaturi.¹⁵⁷

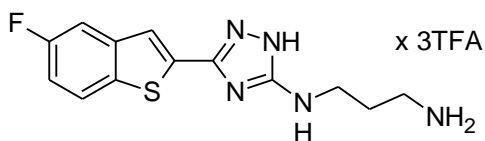


Terc-butyl-(3-{{[3-(5-fluor-1-benzotien-2-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il]amino}propil)karbamat (104).



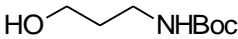
Amin **103** (277 mg, 1,18 mmol) se rastvori u suvom MeOH (15 mL). Doda se aldehyd **107** (650 mg, 3,7 mmol) i glac. AcOH (202 μ L, 3,54 mmol) i reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi. Posle 8 h doda se NaBH₃CN (595 mg, 9,46 mmol) i mešanje produži preko noći. pH se podesi na 10 dodatkom trietil-amina. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent EtOAc, EtOAc/MeOH=9/1, MeOH; flash, Biotage SP, NH kolona, 40+M, eluent heksan/EtOAc gradijent od 2/8 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9). Prinos 160,5 mg (35%). Čvrsta praškasta supstanca, bele boje, topi se na 199 °C. IR (ATR): 3344sr, 3230sr, 3016sr, 2980sr, 2937sr, 2887sr, 2808sl, 2731sl, 1674j, 1622j, 1554sl, 1522sr, 1480sl, 1451sl, 1390sl, 1371sl, 1330sl, 1283sr, 1252sl, 1208sl, 1172sl, 1140sl, 1117sl, 1059sl, 1036sl, 1018sl, 954sl, 931sl, 885sl, 861sl, 802sl, 746sl, 710sl, 652sl, 632sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, d-DMSO, δ): 7,99-7,93 (m, H-C(7)), 7,72 (ps, H-C(3)), 7,70-7,63 (m, H-C(4)), 7,25-7,18 (m, H-C(6)), 6,88-6,81 (m, H-N), 6,70 (ps, H-N), 3,20-3,13 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,02-2,95 (m, 2H, BocNHCH₂-), 1,67-1,59 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,37 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃). ¹³C NMR (125 MHz, d-DMSO, δ): 160,34 (d, $J = 238,3$); 158,09; 155,71; 154,68; 140,89 (d, $J = 9,9$); 138,13; 134,51; 124,11 (d, $J = 9,0$); 120,65; 113,22 (d, $J = 25,3$); 109,17 (d, $J = 22,6$), 77,55; 40,34; 37,46; 29,59; 28,27. HRMS: m/z 392,15380 odgovara molekulskej formuli C₁₈H₂₂FN₅O₂SH⁺ (greška u ppm -3,32).

***N*-[3-(5-fluor-1-benzotien-2-il)-1*H*-1,2,4-triazol-5-il]propan-1,3-diamin-
tristrifluoracetat (**105**).**

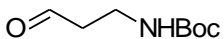


Jedinjenje **105** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **104** (113 mg, 0,289 mmol) i CF₃COOH/CH₂Cl₂ (5,5 mL, 1:10, v/v). Reakciona smeša se ne obrađuje ekstrakcijom, već se rastvarač ukloni pod sniženim pritiskom. Prinos 182 mg (>99%). IR (ATR): 3090j, 2957j, 1677j, 1620j, 1560sr, 1437sl, 1388sl, 1357sl, 1290sl, 1202j, 1130j, 1030sl, 956sl, 935sl, 868sl, 838sl, 800sl, 748sl, 719sl, 655sl, 535sl, 508sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, d-TFA, δ): 7,93 (ps, H-C(3)), 7,83-7,78 (m, H-C(7)), 7,55-7,50 (m, H-C(4)), 7,28-7,21 (m, H-C(6)), 3,80-3,74 (m, 2H, ArNHCH₂-), 3,48-3,42 (m, 2H, NH₂CH₂-), 2,38-2,29 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-). ¹³C NMR (125 MHz, d-TFA, δ): 163,98 (d, *J* = 242,8); 153,54; 149,00; 141,91 (d, *J* = 9,9); 138,74; 129,90; 126,74; 125,71 (d, *J* = 9,0); 119,02 (d, *J* = 26,2); 112,43 (d, *J* = 23,5); 42,77; 40,47; 28,38. HRMS: *m/z* 292,10364 odgovara molekulskoj formuli C₁₃H₁₄FN₅SH⁺ (greška u ppm 3,33).

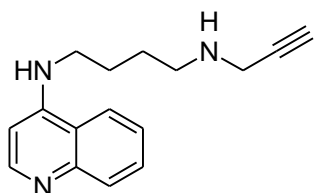
***Terc*-butil-(3-hidroksipropil)karbamat (**106**).**¹⁵⁸

 3-Amino-1-propanol (500,0 mg, 6,657 mmol) se rastvori u CH₂Cl₂ (22 mL) i reakciona smeša ohladi na 0 °C. Polako se doda Boc₂O (1,52 g, 6,99 mmol), meša 5 minuta na 0 °C, a zatim još 2,5 h na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša se prenese u levak za odvajanje, doda CH₂Cl₂ i voda. Organski sloj se ispere vodom, zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suši iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/9, EtOAc/MeOH = 9/1). Prinos 985 mg (85%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3358sr, 2976sl, 2937sl, 1690j, 1526sr, 1452sl, 1393sl, 1367sl, 1278sr, 1253sr, 1173j, 1048sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ): 4,91 (ps, H-O), 3,75-3,55 (m, 2H, HOCH₂-), 3,35-3,20 (m, 2H, BocNHCH₂-), 1,79-1,59 (m, 2H, HOCH₂CH₂-), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ): 157,13; 79,53; 59,16; 36,84; 32,74; 28,28.

Terc-butil-(3-oksopropil)karbamat (107).¹⁵⁹

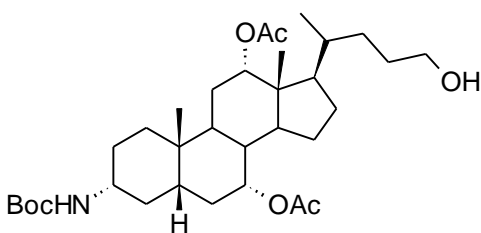
 *Terc*-butil-(3-hidroksipropil)karbamat **106** (965 mg, 5,51 mmol) se rastvori u CH₂Cl₂ (20 mL), doda PCC (2,6 g, 12 mmol) i smeša se meša na sobnoj temperaturi 3,5 h. Reakciona smeša se procedi kroz kratku kolonu SiO₂ (eluent heksan/EtOAc gradijent od 8/2 do 6/4). Prinos 670 mg (70%). Bezbojno ulje. Bez karakterizacije se koristi u reakciji reduktivnog aminovanja.

N-(prop-2-in-1-il)-N'-(hinolin-4-il)butan-1,4-diamin (108).



Prema postupku opisanom u literaturi,¹²² **AQ8** (203,6 mg, 0,9457 mmol) se rastvori u apsolutnom EtOH (10 mL), doda se K₂CO₃ (130,7 mg, 0,9457 mmol), a zatim propargilbromid (36 μL, 0,47 mmol). Smeša se meša na sobnoj temperaturi 24 h. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH gradijent od 7/3 do 3/7). Prinos 59 mg (49%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3287sr, 3066sr, 2931sr, 2856sr, 1617sl, 1579j, 1540sr, 1457sl, 1438sl, 1395sl, 1373sl, 1339sr, 1281sl, 1251sl, 1225sl, 1170sl, 1127sl, 1036sl, 867sl, 808sl, 763sr, 651sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ): 8,54 (d, *J* = 5,6, H-C(2)), 8,01-7,93 (m, H-C(8)), 7,82-7,75 (m, H-C(5)), 7,66-7,55 (m, H-C(7)), 7,45-7,34 (m, H-C(6)), 6,38 (d, *J* = 5,6, H-C(3)), 5,88-5,74 (m, *H-N*), 3,46-3,43 (m, 2H, -CH₂C≡CH), 3,36-3,23 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,82-2,72 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂-), 2,27-2,20 (m, 1H, -C≡CH), 1,93-1,77 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,75-1,59 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂CH₂-). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ): 151,01; 149,85; 148,37; 129,74; 128,85; 124,37; 119,64; 118,80; 98,50; 81,82; 71,50; 47,85; 43,01; 38,05; 27,39; 26,24. HRMS: *m/z* 254,16429 odgovara molekulskoj formuli C₁₆H₁₉N₃H⁺ (greška u ppm -3,47).

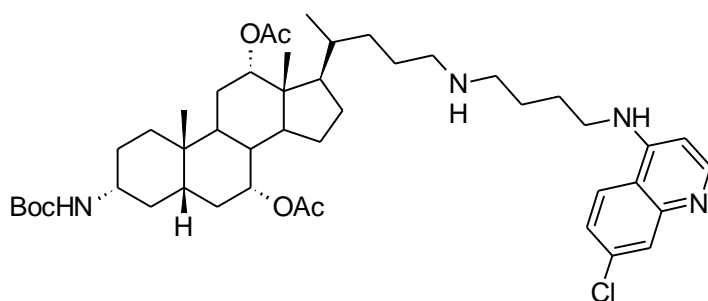
(3α,5β,7α,12α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-hidroksiholan-7,12-diil-diacetat (109).¹⁰¹



Alkohol **109** se sintetiše u 9 reakcionih koraka, polazeći od komercijalno dostupne holne kiseline u ukupnom prinosu 31%. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 5,11-5,07 (m, H-C(12)), 4,92-4,88 (m, H-C(7)), 4,46-4,35 (m, H-N),

3,67-3,55 (m, 2H-C(24)), 3,27 (ps, H-O), 2,12 (s, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,07 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 0,91 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,83 (d, 3H, *J* = 6,4, CH₃-C(20)), 0,73 (s, 3H, CH₃-C(13)).

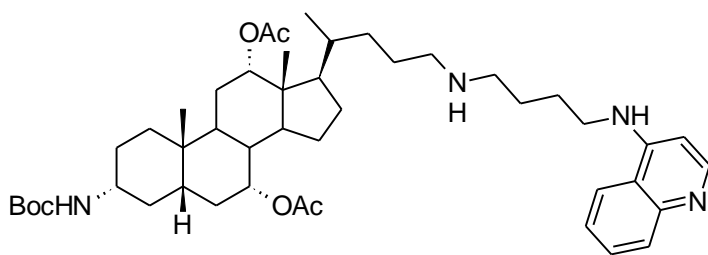
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-({4-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]butil}amino)holan-7,12-diil-diacetat (111**).**



Po opštem postupku M, alkohol **109** (430,0 mg, 0,7442 mmol) se transformiše u aldehid **110** pomoću PCC (230 mg, 1,1 mmol) u CH₂Cl₂ (35 mL). Dobijeni aldehid se

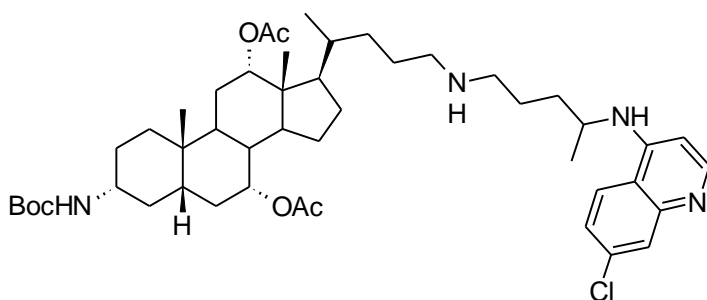
zatim korišćenjem amina **AQ4** (230,8 mg, 0,9242 mmol), NaBH₄ (46,7 mg, 1,23 mmol) i MeOH (20 mL) prevede u proizvod **111**. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH (NH₃ zas.)=9/1). Prinosa 396,3 mg (66%). Bezbojno ulje. $[\alpha]_D^{20} = +62,2$ (MeOH). IR (ATR): 3311sl, 3054sl, 2935j, 2866sr, 2157sl, 1724j, 1610sl, 1581j, 1535sl, 1450sl, 1370sr, 1331sl, 1248j, 1170sl, 1135sl, 1064sl, 1022sl, 999sl, 965sl, 880sl, 851sl, 808sl, 768sl, 736sl, 702sl, 647sl, 609sl, 411sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,51 (d, *J* = 5,5, H-C(2')), 7,96-7,92 (m, H-C(8')), 7,71 (d, *J* = 8,9, H-C(5')), 7,34-7,30 (m, H-C(6')), 6,37 (d, *J* = 5,2, H-C(3')), 6,03 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 5,11-5,07 (m, H-C(12)), 4,92-4,88 (m, H-C(7)), 4,43 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,34-3,24 (m, 3H, ArNHCH₂- i H-C(3)), 2,73-2,67 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂-), 2,64-2,52 (m, 2H-C(24)), 2,10 (s, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,06 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,84-0,81 (m, 3H, CH₃-C(20)), 0,72 (s, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,38; 170,26; 155,13; 152,08; 149,95; 149,19; 134,64; 128,71; 124,88; 121,38; 117,31; 98,83; 79,17; 75,46; 70,84; 50,53; 49,15; 47,52; 44,98; 43,36; 43,19; 41,52; 37,68; 36,37; 35,47; 34,93; 34,22; 33,36; 31,28; 28,84; 28,39; 27,87; 27,26; 26,52; 26,28; 25,48; 22,77; 22,67; 21,59; 21,36; 17,91; 12,18. HRMS: *m/z* 809,49621 odgovara molekulskoj formuli C₄₆H₆₉ClN₄O₆H⁺ (greška u ppm -2,01).

(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-{[4-(hinolin-4-ilamino)butil]amino}holan-7,12-diil-diacetat (112**).**



Po opštem postupku M, alkohol **109** (445 mg, 0,770 mmol) se transformiše u aldehyd **110** pomoću PCC (239 mg, 1,10 mmol) u CH₂Cl₂ (35 mL). Dobijeni aldehyd se zatim korišćenjem amina **AQ8** (211,5 mg, 0,9823 mmol), NaBH₄ (49,5 mg, 1,31 mmol) i MeOH (20 mL) prevede u proizvod **112**. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH (NH₃ zas.)=9/1). Prinos 360 mg (60%). Bezbojno ulje. $[\alpha]_D^{20} = +38,9$ (MeOH). IR (ATR): 3320sl, 3052sl, 2935j, 2866sr, 1724j, 1618sl, 1582j, 1540sr, 1441sl, 1375sr, 1342sl, 1310sl, 1250j, 1171sr, 1126sl, 1064sl, 1023sl, 999sl, 965sl, 884sl, 854sl, 808sl, 765sl, 736sr, 702sl, 610sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,54 (d, $J = 5,3$, H-C(2')), 7,97 (d, $J = 8,2$, H-C(8')), 7,76 (d, $J = 8,2$, H-C(5')), 7,64-7,59 (m, H-C(7')), 7,42-7,37 (m, H-C(6')), 6,40 (d, $J = 5,2$, H-C(3')), 5,77 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 5,10-5,07 (m, H-C(12)), 4,92-4,88 (m, H-C(7)), 4,42 (bs, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,35-3,21 (m, 3H, ArNHCH₂- i H-C(3)), 2,73-2,66 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂-), 2,65-2,54 (m, 2H-C(24)), 2,10 (s, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,05 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,82 (d, 3H, $J = 6,6$, CH₃-C(20)), 0,71 (s, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,39; 170,27; 155,12; 151,05; 149,85; 148,42; 129,87; 128,87; 124,32; 119,57; 118,83; 98,58; 79,16; 75,48; 70,86; 50,55; 49,29; 47,49; 44,99; 43,36; 43,18; 41,53; 37,70; 36,39; 35,48; 34,90; 34,24; 33,36; 31,29; 28,85; 28,40; 27,85; 27,26; 26,46; 26,43; 25,49; 22,80; 22,68; 21,60; 21,37; 17,91; 12,18. HRMS: m/z 775,53542 odgovara molekulskoj formuli C₄₆H₇₀N₄O₆H⁺ (greška u ppm -1,79).

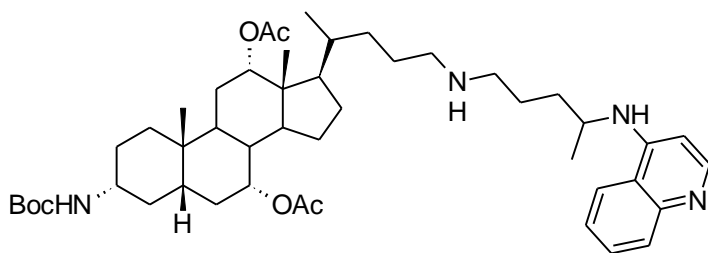
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-({4-[7-(hlorhinolin-4-ilamino)pentil]amino)holan-7,12-diil-diacetat (113**: Smeša diastereomera).**



Po opštem postupku M, alkohol **109** (150,0 mg, 0,2596 mmol) se transformiše u aldehid **110** pomoću PCC (80,6 mg, 0,374 mmol) u CH₂Cl₂ (15 mL). Dobijeni

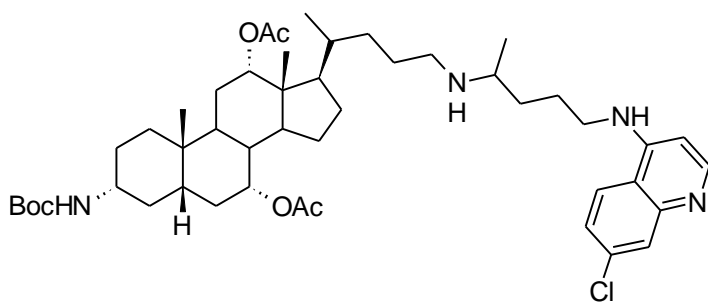
aldehid se zatim korišćenjem amina **147** (80,4 mg, 0,305 mmol), NaBH₄ (15,4 mg, 0,406 mmol) i MeOH (10 mL) prevede u proizvod **113**. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH (NH₃ zas.)=9/1). Prinos 142,9 mg (67%). Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. Bezbojno ulje. [α]_D²⁰ = +51.1 (MeOH). IR (ATR): 3364sl, 3317sl, 2934j, 2868sr, 1716j, 1612sl, 1578j, 1535sr, 1450sr, 1374sr, 1335sl, 1246j, 1170sr, 1064sl, 1024sl, 965sl, 940sl, 880sl, 852sl, 810sl, 767sl, 605sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,52-8,49 (m, H-C(2')), 7,95-7,92 (m, H-C(8')), 7,68 (d, *J* = 8,9, H-C(5')), 7,34-7,30 (m, H-C(6')), 6,40 (d, *J* = 5,5, H-C(3')), 5,48-5,43 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 5,10-5,06 (m, H-C(12)), 4,91-4,87 (m, H-C(7)), 4,43 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 3,75-3,66 (m, 1H, ArNHCH(CH₃)-), 3,27 (ps, H-C(3)), 2,67-2,61 (m, 2H, ArNHCH(CH₃)CH₂CH₂CH₂-), 2,60-2,48 (m, 2H-C(24)), 2,10 i 2,09 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,06 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 1,31 (d, 3H, *J* = 6,4, ArNHCH(CH₃)-), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,82 (d, 3H, *J* = 6,6, CH₃-C(20)), 0,72 i 0,71 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,38; 170,27; 155,12; 151,99; 149,37; 149,02; 134,68; 128,79; 124,91; 121,17; 117,32; 99,13; 79,18; 75,47; 70,85; 53,39; 50,56; 50,53; 49,51; 48,28; 47,48; 44,97; 43,35; 41,52; 37,69; 36,38; 35,47; 34,90; 34,87; 34,22; 34,07; 33,32; 31,28; 28,84; 28,39; 27,25; 26,49; 26,48; 25,48; 22,77; 22,67; 21,59; 21,36; 20,14; 17,89; 12,17. HRMS: *m/z* 823,51447 odgovara molekularnoj formuli C₄₇H₇₁ClN₄O₆H⁺ (greška u ppm 1,19); *m/z* 412,26065 odgovara molekularnoj formuli C₄₇H₇₁ClN₄O₆H₂²⁺ (greška u ppm 0,66).

(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-{[4-(hinolin-4-ilamino)pentil]amino}holan-7,12-diil-diacetat (114**: Smeša diastereomera).**



Po opštem postupku M, alkohol **109** (493,6 mg, 0,8543 mmol) se transformiše u aldehid **110** pomoću PCC (265,2 mg, 1,230 mmol) u CH₂Cl₂ (35 mL). Dobijeni aldehid se zatim korišćenjem amina **146** (238,9 mg, 1,042 mmol), NaBH₄ (52,6 mg, 1,39 mmol) i MeOH (10 mL) prevede u proizvod **114**. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH (NH₃ zas.)=9/1; flash, Biotage SP1, RP kolona 40+M, eluent MeOH/H₂O gradijent od 7/3 do 9/1, MeOH). Prinos 398 mg (59%). Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. Pena, bele boje, topi se na 101–103 °C. $[\alpha]_D^{20} = +48,0$ (MeOH). IR (ATR): 3356sl, 3260sl, 3233sl, 3192sl, 3122sl, 2934j, 2868sr, 1718j, 1622sl, 1580j, 1533j, 1450sr, 1374j, 1168j, 1062sl, 1023sr, 965sl, 890sl, 857sl, 809sl, 764sr, 691sl, 655sl, 609sl, 533sl, 500sl, 474sl, 435sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,55-8,52 (m, H-C(2')), 7,98-7,95 (m, H-C(8')), 7,73 (d, $J = 8,4$, H-C(5')), 7,64-7,59 (m, H-C(7')), 7,42-7,37 (m, H-C(6')), 6,42 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 5,29-5,23 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 5,10-5,06 (m, H-C(12)), 4,91-4,88 (m, H-C(7)), 4,42 (ps, H-N), 3,77-3,68 (m, 1H, ArNHCH(CH₃)-), 3,27 (ps, H-C(3)), 2,69-2,61 (m, 2H, ArNHCH(CH₃)CH₂CH₂CH₂-), 2,61-2,49 (m, 2H-C(24)), 2,10 i 2,09 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,06 i 2,05 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 1,32 (d, 3H, $J = 6,4$, ArNHCH(CH₃)-), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,81 (d, 3H, $J = 6,6$, CH₃-C(20)), 0,71 i 0,70 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,39; 170,28; 155,12; 151,00; 148,89; 148,63; 129,98; 128,87; 124,32; 119,35; 118,83; 98,86; 79,21; 75,48; 70,87; 50,58; 50,54; 49,67; 48,18; 47,45; 44,98; 43,37; 41,54; 37,70; 36,40; 35,49; 34,87; 34,23; 33,32; 31,29; 28,85; 28,40; 27,26; 26,59; 26,56; 26,47; 25,49; 22,79; 22,69; 21,60; 21,38; 20,27; 17,90; 12,18. HRMS: m/z 789,55312 odgovara molekularnoj formuli C₄₇H₇₂N₄O₆H⁺ (greška u ppm 0,84).

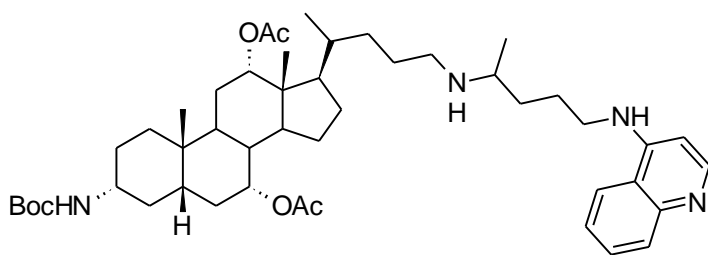
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-({4-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]-1-metilbutil}amino)holan-7,12-diil-diacetat (115**: Smeša diastereomera).**



Po opštem postupku M, alkohol **109** (120,0 mg, 0,2077 mmol) se transformiše u aldehyd **110** pomoću PCC (64,5 mg, 0,299 mmol) u CH₂Cl₂ (12 mL). Dobijeni

aldehyd se zatim korišćenjem amina **153** (67,3 mg, 0,255 mmol), NaBH₄ (12,9 mg, 0,340 mmol) i MeOH (8 mL) prevede u proizvod **115**. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, eluent EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH (NH₃ zas.) gradijent od 95/5 do 8/2). Prinos 132,4 mg (77%). Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. Bezbojno ulje. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +44,6$ (MeOH). IR (ATR): 3341sl, 3055sl, 2935j, 2866sr, 1723j, 1610sl, 1581j, 1538sr, 1451sr, 1371sr, 1332sl, 1249j, 1171sr, 1065sl, 1023sl, 999sl, 852sl, 809sl, 737sr cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,52 (d, $J = 5,2$, H-C(2')), 7,96-7,94 (m, H-C(8')), 7,71-7,68 (m, H-C(5')), 7,35-7,32 (m, H-C(6')), 6,38 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 5,82-5,77 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 5,10-5,06 (m, H-C(12)), 4,91-4,88 (m, H-C(7)), 4,45 (ps, H-N), 3,35-3,20 (m, 3H, ArNHCH₂- i H-C(3)), 2,76-2,69 (m, 1H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH(CH₃)-), 2,67-2,46 (m, 2H-C(24)), 2,09 i 2,09 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,05 i 2,04 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 1,09 (d, 3H, $J = 6,4$, ArNHCH₂CH₂CH₂CH(CH₃)-), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,81 (d, 3H, $J = 6,6$, CH₃-C(20)), 0,71 i 0,70 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,37; 170,27; 155,11; 151,08; 149,86; 149,20; 134,69; 128,78; 124,99; 121,23; 117,26; 98,91; 79,17; 75,47; 70,84; 52,59; 50,78; 47,62; 47,58; 47,47; 44,98; 43,50; 43,37; 41,52; 37,68; 36,38; 35,47; 34,87; 34,69; 34,62; 34,22; 33,41; 33,39; 31,28; 28,85; 28,40; 27,24; 26,80; 25,49; 24,98; 22,77; 22,67; 21,58; 21,36; 20,50; 20,46; 17,89; 12,18. HRMS: m/z 823,51237 odgovara molekulskoj formuli C₄₇H₇₁N₄ClO₆H⁺ (greška u ppm -1,36).

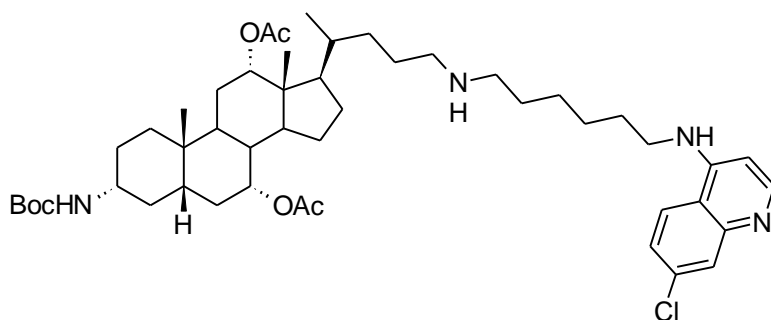
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amin]-24-{[1-metil-4-(hinolin-4-ilamino)butil]amino}holan-7,12-diil-diacetat (116**: Smeša diastereomera).**



Po opštem postupku M, alkohol **109** (440,0 mg, 0,7615 mmol) se transformiše u aldehid **110** pomoću PCC (236 mg, 1,09 mmol) u

CH₂Cl₂ (35 mL). Dobijeni aldehid se zatim korišćenjem amina **152** (221 mg, 0,964 mmol), NaBH₄ (48,6 mg, 1,28 mmol) i MeOH (20 mL) prevede u proizvod **116**. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH (NH₃ zas.) gradijent od 9/1 do 7/3). Prinos 390 mg (65%). Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. Bezbojno ulje. $[\alpha]_D^{20} = +40,0$ (MeOH). IR (ATR): 3337sr, 3190sr, 2932j, 2866j, 2654sl, 1729j, 1582j, 1537j, 1444sr, 1374j, 1244j, 1170j, 1063sl, 1024sr, 966sl, 940sl, 885sl, 856sl, 807sl, 764sr, 656sl, 611sl, 532sl, 406sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,55 (d, $J = 5,3$, H-C(2')), 7,99-7,96 (m, H-C(8')), 7,78-7,74 (m, H-C(5')), 7,64-7,59 (m, H-C(7')), 7,43-7,38 (m, H-C(6')), 6,40 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 5,60 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 5,09-5,06 (m, H-C(12)), 4,91-4,87 (m, H-C(7)), 4,46 (ps, H-N), 3,38-3,20 (m, 3H, ArNHCH₂- i H-C(3)), 2,77-2,69 (m, 1H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH(CH₃)-), 2,67-2,47 (m, 2H-C(24)), 2,09 i 2,08 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,05 i 2,04 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 1,09 (d, 3H, $J = 6,2$, ArNHCH₂CH₂CH₂CH(CH₃)-), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,81 (d, 3H, $J = 6,4$, CH₃-C(20)), 0,70 i 0,69 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,38; 170,26; 155,17; 151,02; 149,78; 148,40; 129,88; 128,88; 124,37; 119,47; 118,78; 98,62; 79,17; 75,46; 70,84; 52,68; 47,65; 47,62; 47,44; 47,41; 44,95; 43,46; 43,35; 41,52; 37,67; 36,37; 35,47; 34,82; 34,64; 34,58; 34,21; 33,39; 33,36; 31,27; 28,84; 28,38; 27,23; 26,70; 25,47; 25,11; 22,76; 22,66; 21,57; 21,35; 20,46; 20,40; 17,88; 12,16. HRMS: m/z 789,54993 odgovara molekulskoj formuli C₄₇H₇₂N₄O₆H⁺ (greška u ppm -3,21); m/z 395,27922 odgovara molekulskoj formuli C₄₇H₇₂N₄O₆H₂²⁺ (greška u ppm -1,64).

(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-({6-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]heksil}amino)holan-7,12-diil-diacetat (117).

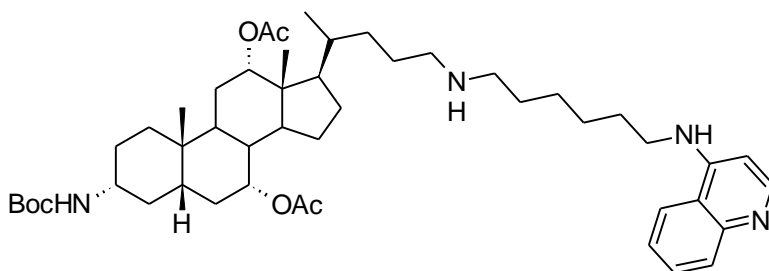


Po opštem postupku M, alkohol **109** (121,4 mg, 0,2101 mmol) se transformiše u aldehid **110** pomoću PCC (65,2 mg, 0,302 mmol) u

CH₂Cl₂ (10 mL). Dobijeni aldehid se zatim korišćenjem amina **AQ6** (82,2 mg, 0,296 mmol), NaBH₄ (15,0 mg, 0,39 mmol) i MeOH (4 mL) prevede u proizvod **117**. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH (NH₃ zas.)=9/1; flash, Biotage SP1, RP kolona 25+M, eluent MeOH/H₂O gradijent od 75/25 do 9/1, MeOH). Prinos 103 mg (58%). Bezbojno ulje.

[α]_D²⁰ = +87,5 (MeOH). IR (ATR): 3344sl, 3054sl, 2933j, 2862sr, 1724j, 1610sl, 1580j, 1536sl, 1451sl, 1371sr, 1331sl, 1249j, 1171sr, 1065sl, 1023sl, 965sl, 884sl, 851sl, 808sl, 737sr, 703sl, 613sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,53 (d, *J* = 5,3, H-C(2')), 7,97-7,94 (m, H-C(8')), 7,66 (d, *J* = 8,9, H-C(5')), 7,37-7,34 (m, H-C(6')), 6,41 (d, *J* = 5,5, H-C(3')), 5,10-5,07 (m, H-C(12)), 5,04-4,99 (m, H-N, izmenjiv sa D₂O), 4,92-4,88 (m, H-C(7)), 4,43 (ps, H-N), 3,35-3,22 (m, 3H, ArNHCH₂- i H-C(3)), 2,65-2,48 (m, 4H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- i 2H-C(24)), 2,10 (s, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,06 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,82 (d, 3H, *J* = 6,4, CH₃-C(20)), 0,71 (s, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,40; 170,28; 155,12; 152,04; 149,64; 149,14; 134,77; 128,86; 125,20; 120,78; 117,08; 99,04; 79,19; 75,49; 70,86; 50,60; 49,96; 47,41; 44,96; 43,36; 43,17; 41,52; 37,69; 36,39; 35,47; 34,83; 34,22; 33,32; 31,29; 30,09; 28,84; 28,81; 28,40; 27,24; 27,11; 27,05; 26,44; 25,48; 22,79; 22,67; 21,60; 21,37; 17,90; 12,17. HRMS: *m/z* 837,52879 odgovara molekularnoj formuli C₄₈H₇₃ClN₄O₆H⁺ (greška u ppm -0,42).

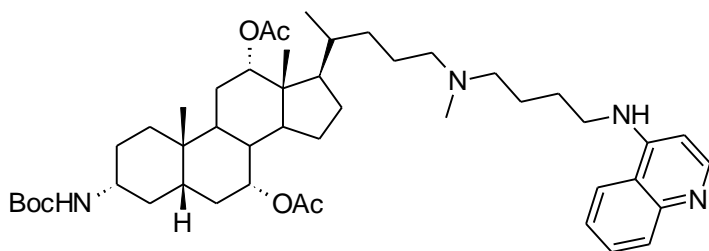
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-[[6-(hinolin-4-ilamino)heksil]amino}holan-7,12-diil-diacetat (118**).**



Po opštem postupku M, alkohol **109** (207,4 mg, 0,3590 mmol) se transformiše u aldehyd **110** pomoću PCC (111,4 mg, 0,5170 mmol) u

CH₂Cl₂ (17 mL). Dobijeni aldehyd se zatim korišćenjem amina **AQ9** (115,4 mg, 0,4742 mmol), NaBH₄ (23,9 mg, 0,632 mmol) i MeOH (5 mL) prevede u proizvod **118**. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, MeOH, EtOAc/MeOH (NH₃ zas.) gradijent od 9/1 do 6/4; flash, Biotage SP1, RP kolona 25+M, eluent MeOH/H₂O gradijent od 75/25 do 9/1, MeOH). Prinos 157 mg (54%). Ulje, bleđožute boje. $[\alpha]_D^{20} = +22,6$ (MeOH). IR (ATR): 3325sl, 2932j, 2862sr, 1725j, 1619sl, 1582j, 1540sr, 1460sl, 1376sr, 1342sl, 1249j, 1172sl, 1127sl, 1065sl, 1024sl, 965sl, 885sl, 810sl, 765sl, 736sl, 608sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,57-8,54 (m, H-C(2')), 7,98 (d, $J = 8,2$, H-C(8')), 7,73 (d, $J = 8,2$, H-C(5')), 7,65-7,60 (m, H-C(7')), 7,45-7,39 (m, H-C(6')), 6,44-6,40 (m, H-C(3')), 5,10-5,06 (m, H-C(12)), 5,05-5,00 (m, H-N izmenjiv sa D₂O), 4,92-4,87 (m, H-C(7')), 4,44 (ps, H-N), 3,36-3,22 (m, 3H, ArNHCH₂- i H-C(3)), 2,65-2,48 (m, 4H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- i 2H-C(24)), 2,10 (s, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,06 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,82 (d, 3H, $J = 6,4$, CH₃-C(20)), 0,71 (s, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,39; 170,27; 155,14; 151,02; 149,60; 148,40; 129,96; 128,90; 124,50; 119,12; 118,66; 98,72; 79,17; 75,48; 70,85; 53,38; 50,58; 49,96; 47,40; 44,95; 43,35; 43,14; 41,51; 37,68; 36,38; 35,47; 34,82; 34,21; 33,31; 31,28; 30,07; 28,85; 28,38; 27,22; 27,12; 27,07; 26,41; 25,47; 22,78; 22,66; 21,58; 21,36; 17,88; 12,16. HRMS: m/z 803,56820 odgovara molekulknoj formuli C₄₈H₇₄N₄O₆H⁺ (greška u ppm 0,11).

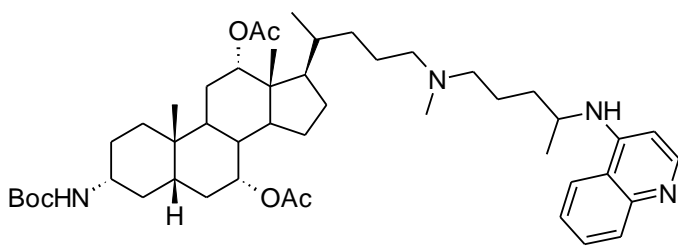
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-{metil[4-(hinolin-4-ilamino)butil]amino}holan-7,12-diil-diacetat (119).



Jedinjenje **119** se sintetiše po opštem postupku L, korišćenjem **112** (340,0 mg, 0,4387 mmol), 37% vodenog rastvora formaldehida (65 μ L,

0,88 mmol), ZnCl₂ (30,0 mg, 0,219 mmol), NaBH₃CN (28,0 mg, 0,439 mmol) i MeOH (5 mL + 5 mL). Prinos 300 mg (87%). Pena, bele boje, topi se na 85–86 °C. $[\alpha]_D^{20} = +60,0$ (MeOH). IR (ATR): 3356sl, 2939j, 2865sr, 2789sl, 1729j, 1711j, 1582j, 1541sr, 1444sl, 1372sr, 1308sl, 1239j, 1170sr, 1123sl, 1063sl, 1024sr, 763sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,59-8,50 (m, H-C(2')), 8,05-7,94 (m, H-C(8')), 7,81-7,75 (m, H-C(5')), 7,65-7,58 (m, H-C(7')), 7,44-7,36 (m, H-C(6')), 6,42-6,37 (m, H-C(3')), 5,94 (ps, H-N, izmenjiv sa D₂O), 5,10-5,06 (m, H-C(12)), 4,92-4,86 (m, H-C(7)), 4,54 (ps, H-N), 3,34-3,22 (m, 3H, ArNHCH₂- i H-C(3)), 2,44-2,39 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂-), 2,36-2,30 (m, 2H-C(24)), 2,22 (s, 3H, CH₃-N), 2,07 (s, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,03 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,83-0,80 (m, 3H, CH₃-C(20)), 0,70 (s, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,36; 170,26; 155,16; 150,87; 150,02; 148,24; 129,67; 128,90; 124,29; 119,71; 118,78; 98,52; 79,13; 75,45; 70,83; 58,11; 57,00; 53,37; 50,71; 47,57; 44,98; 43,35; 43,24; 42,44; 41,52; 37,66; 36,35; 35,47; 34,94; 34,20; 33,54; 31,26; 28,86; 28,38; 27,24; 26,63; 25,48; 25,19; 23,56; 22,76; 22,66; 21,57; 21,33; 17,91; 12,16. HRMS: m/z 789,55095 odgovara molekulskej formuli C₄₇H₇₂N₄O₆H⁺ (greška u ppm -1,91); m/z 395,27983 odgovara molekulskej formuli C₄₇H₇₂N₄O₆H₂²⁺ (greška u ppm -0,09).

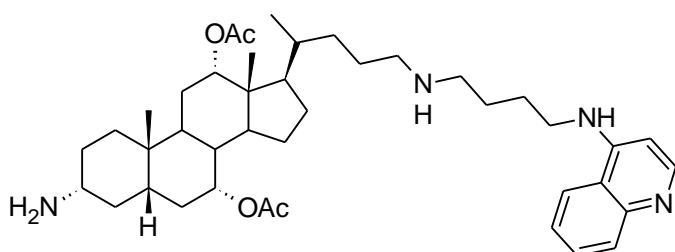
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butoksikarbonil)amino]-24-{metil[4-(hinolin-4-ilamino)pentil]amino}holan-7,12-diil-diacetat (120: Smeša diastereomera).



Jedinjenje **120** se sintetiše po opštem postupku L, korišćenjem **114** (223,0 mg, 0,2826 mmol), 37% vodenog rastvora formaldehida (42 μ L, 0,56

mmol), ZnCl₂ (19,3 mg, 0,141 mmol), NaBH₃CN (17,8 mg, 0,283 mmol) i MeOH (4 mL + 4 mL). Prinos 186 mg (82%). Pena, bele boje, topi se na 85–87 °C. Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. $[\alpha]_D^{20} = +32,8$ (MeOH). IR (ATR): 3354sr, 2939j, 2869sr, 2789sr, 1715j, 1639sl, 1579j, 1534j, 1447sr, 1374j, 1241j, 1168sr, 1063sl, 1022sr, 965sl, 897sl, 857sl, 809sl, 763sl, 612sl, 533sl, 478sl, 426sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,56-8,51 (m, H-C(2')), 8,01-7,95 (m, H-C(8')), 7,77-7,72 (m, H-C(5')), 7,64-7,59 (m, H-C(7')), 7,42-7,38 (m, H-C(6')), 6,45-6,41 (m, H-C(3')), 5,38-5,31 (m, H-N, izmenjiv sa D₂O), 5,10-5,06 (m, H-C(12)), 4,91-4,87 (m, H-C(7)), 4,55 i 4,45 (ps i ps, H-N), 3,77-3,68 (m, 1H, ArNHCH(CH₃)-), 3,28 (ps, H-C(3)), 2,40-2,34 (m, 2H, ArNHCH(CH₃)CH₂CH₂CH₂-), 2,32-2,25 (m, 2H-C(24)), 2,20-2,17 (m, 3H, CH₃-N), 2,09 i 2,07 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,05 i 2,03 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,44 i 1,44 (s i s, preklapaju se, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 1,32 (d, 3H, *J* = 6,4, ArNHCH(CH₃)-), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,81 (d, 3H, *J* = 6,4, CH₃-C(20)), 0,70 i 0,69 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,37; 170,27; 155,11; 150,80; 149,05; 148,44; 129,78; 128,92; 124,32; 124,30; 119,48; 119,44; 118,82; 118,81; 98,86; 79,13; 75,47; 70,85; 58,27; 58,20; 57,47; 57,34; 50,74; 48,18; 48,12; 47,61; 47,52; 44,97; 43,38; 43,32; 42,33; 42,30; 41,52; 37,68; 37,66; 36,37; 35,47; 34,92; 34,89; 34,44; 34,22; 34,20; 33,50; 33,45; 31,26; 28,87; 28,83; 28,39; 27,24; 25,48; 23,86; 23,75; 23,70; 23,59; 22,76; 22,67; 21,59; 21,57; 21,35; 21,34; 20,22; 20,20; 17,91; 12,17; 12,15. HRMS: *m/z* 803,56681 odgovara molekulskoj formuli C₄₈H₇₄N₄O₆H⁺ (greška u ppm -1,62).

(3α,5β,7α,12α)-3-Amino-24-[[4-(hinolin-4-ilamino)butil]amino]holan-7,12-diil-diacetat (121).

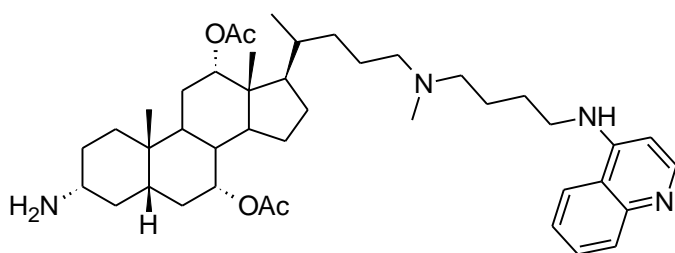


Jedinjenje **121** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **112** (178 mg, 0,230 mmol) i CF₃COOH/CH₂Cl₂ (5,5 mL). Sirovi proizvod se prečisti

hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP1, RP kolona 25+M, eluent MeOH/H₂O gradijent od 75/25 do 9/1, MeOH). Prinos 75 mg (48%). Pena, bele boje, topi se na 67–70 °C. $[\alpha]_D^{20} = +50,0$ (MeOH). IR (ATR): 3279sl, 2937j, 2864sr, 1727j, 1582j, 1543sl,

1440sl, 1377sr, 1342sl, 1248j, 1126sl, 1024sl, 964sl, 806sl, 766sl, 733sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 8,56-8,52 (m, H-C(2')), 7,98-7,95 (m, H-C(8')), 7,79-7,75 (m, H-C(5')), 7,64-7,59 (m, H-C(7')), 7,42-7,36 (m, H-C(6')), 6,41-6,38 (m, H-C(3')), 5,79 (ps, H-N izmenjiv sa D_2O), 5,10-5,06 (m, H-C(12)), 4,91-4,86 (m, H-C(7)), 3,36-3,28 (m, 2H, ArNHCH_2 -), 2,72-2,67 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), 2,65-2,52 (m, 2H-C(24) i H-C(3)), 2,11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(12)$), 2,07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(7)$), 0,90 (s, 3H, CH_3 -C(10)), 0,84-0,80 (m, 3H, CH_3 -C(20)), 0,71 (s, 3H, CH_3 -C(13)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 170,64; 170,61; 151,01; 149,84; 148,38; 129,80; 128,84; 124,28; 119,57; 118,81; 98,55; 75,50; 70,90; 51,62; 50,53; 49,27; 47,48; 44,98; 43,38; 43,15; 41,48; 39,48; 37,74; 35,50; 34,89; 34,34; 33,34; 31,42; 31,22; 28,96; 27,84; 27,24; 26,48; 26,39; 25,55; 22,77; 21,62; 21,46; 17,86; 12,17. HRMS: m/z 675.48325 odgovara molekularnoj formuli $\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_4\text{H}^+$ (greška u ppm -1,68); m/z 338,24629 odgovara molekularnoj formuli $\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_4\text{H}_2^{2+}$ (greška u ppm 1,36). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 9,070, površina 98,83%; metoda B: RT 7,811, površina 96,95%.

(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-{metil[4-(hinolin-4-ilamino)butil]amino}holan-7,12-diil-diacetat (122).

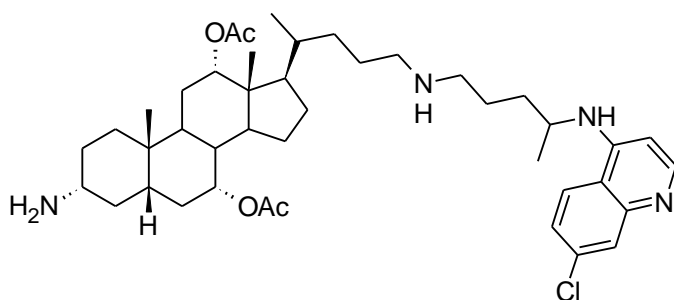


Jedinjenje **122** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **119** (230 mg, 0,33 mmol) i $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (8 mL). Sirovi proizvod se prečisti

hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP1, RP kolona 25+M, eluent $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ gradijent od 75/25 do 9/1, MeOH). Prinos 110 mg (56%). Pena, bele boje, topi se na 77–80 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +59,1$ (MeOH). IR (ATR): 3308sr, 2946j, 2867j, 2795sr, 1730j, 1664sl, 1642sl, 1619sl, 1583j, 1544sr, 1460sr, 1377j, 1343sr, 1246j, 1156sl, 1126sl, 1026sr, 966sl, 767sr cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 8,53 (d, $J = 5,5$, H-C(2')), 7,99-7,95 (m, H-C(8')), 7,79-7,74 (m, H-C(5')), 7,64-7,59 (m, H-C(7')), 7,42-7,37 (m, H-C(6')), 6,39 (d, $J = 5,2$, H-C(3')), 5,94 (ps, H-N, izmenjiv sa D_2O), 5,10-5,05 (m, H-C(12)), 4,90-4,85 (m, H-C(7)), 3,34-3,28 (m, 2H, ArNHCH_2 -), 2,64-2,55 (m, H-C(3)), 2,43-2,38 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), 2,35-2,30 (m, 2H-C(24)), 2,22 (s, 3H, CH_3 -N), 2,09 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(12)$), 2,07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(7)$), 0,90 (s, 3H, CH_3 -

C(10)), 0,81 (d, 3H, $J = 6,6$, $\text{CH}_3\text{-C}(20)$), 0,70 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(13)$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 170,64; 150,89; 150,02; 148,25; 129,65; 128,89; 124,26; 119,70; 118,80; 98,53; 75,50; 70,90; 58,12; 57,11; 51,61; 47,64; 44,99; 43,35; 43,24; 42,38; 41,47; 39,44; 37,73; 35,50; 34,98; 34,33; 33,56; 31,41; 31,18; 28,95; 27,24; 26,66; 25,54; 25,26; 23,66; 22,76; 21,63; 21,43; 17,88; 12,16. HRMS: m/z 689,49878 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_4\text{H}^+$ (greška u ppm -1,82); m/z 345,25311 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_4\text{H}_2^{2+}$ (greška u ppm -1,56). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 7,549, površina 95,60%; metoda B: RT 7,483, površina 97,51%.

(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-({4-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]pentil}amino)holan-7,12-diil-diacetat (123: Smeša diastereomera).

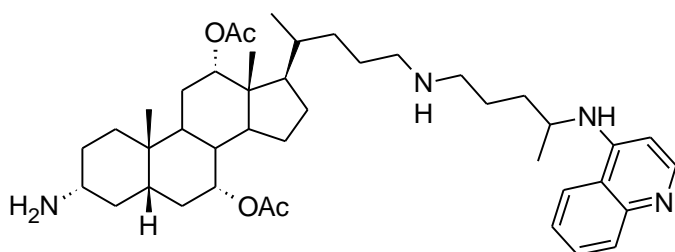


Jedinjenje **123** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **113** (130 mg, 0,16 mmol) i $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (11 mL). Prinos 110,5 mg (97%). Pena, bele boje, topi se na 85–87 °C.

Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +44.8$ (MeOH). IR (ATR): 3301sl, 2937j, 2864sr, 2351sl, 2327sl, 1727j, 1610sl, 1578j, 1538sl, 1451sl, 1377sr, 1334sl, 1246j, 1154sl, 1080sl, 1024sl, 964sl, 878sl, 851sl, 811sl, 766sl, 607sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 8,50 (d, $J = 5,4$, H-C(2')), 7,94-7,92 (m, H-C(8')), 7,69 (d, $J = 9,0$, H-C(5')), 7,34-7,30 (m, H-C(6')), 6,40 (d, $J = 5,4$, H-C(3')), 5,51-5,43 (m, H-N izmenjiv sa D_2O), 5,09-5,06 (m, H-C(12)), 4,91-4,86 (m, H-C(7)), 3,74-3,67 (m, 1H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{-}$), 2,67-2,62 (m, 2H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 2,62-2,50 (m, 3H, H-C(3) i 2H-C(24)), 2,11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(12)$), 2,07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(7)$), 1,31 (d, 3H, $J = 6,4$, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{-}$), 0,90 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(10)$), 0,81 (d, 3H, $J = 6,4$, $\text{CH}_3\text{-C}(20)$), 0,72 i 0,71 (s i s, preklapaju se, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(13)$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 170,64; 170,62; 151,97; 149,34; 149,00; 134,67; 128,75; 124,89; 121,17; 117,30; 99,11; 75,50; 70,90; 51,63; 50,53; 50,50; 49,48; 48,27; 47,49; 44,98; 43,38; 41,49; 39,50; 37,74; 35,50; 34,90; 34,87; 34,35; 34,05; 33,31; 31,42; 31,24; 28,97; 27,24; 26,47; 25,56; 22,77; 21,62; 21,47; 20,13; 17,85; 12,17. HRMS: m/z 723,45837 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{H}^+$ (greška u ppm -3,72). HPLC čistoća: metoda D

($\lambda = 330$ nm): RT 10,367, površina 95,87%; metoda E ($\lambda = 254$ nm): RT 8,879, površina 95,63%.

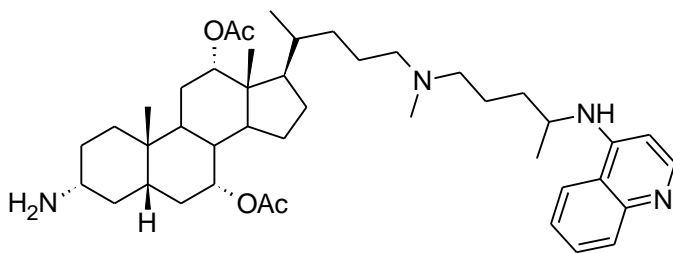
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-[[4-(hinolin-4-ilamino)pentil]amino]holan-7,12-diil-diacetat (124: Smeša diastereomera).



Jedinjenje **124** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **114** (150 mg, 0,19 mmol) i $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5,5 mL). Prinos 92,9 mg (71%). Pena,

bele boje, topi se na 82–83 °C. Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +31,5$ (MeOH). IR (ATR): 3478sl, 3275sr, 3190sr, 3118sr, 3078sr, 2930j, 2861j, 1725j, 1653sl, 1538j, 1496sl, 1445sr, 1377j, 1342sr, 1154sl, 1025sr, 963sl, 892sl, 810sl, 765sr, 656sl, 611sl, 532sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 8,53 (d, $J = 5,5$, H-C(2')), 7,98-7,94 (m, H-C(8')), 7,74 (d, $J = 8,4$, H-C(5')), 7,64-7,59 (m, H-C(7')), 7,42-7,37 (m, H-C(6')), 6,41 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 5,31-5,26 (m, H-N izmenjiv sa D_2O), 5,09-5,06 (m, H-C(12)), 4,90-4,86 (m, H-C(7)), 3,76-3,69 (m, 1H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$), 2,67-2,49 (m, 5H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ i 2H-C(24) i H-C(3)), 2,11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(12)$), 2,07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(7)$), 1,32 (d, 3H, $J = 6,4$, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$), 0,90 (s, 3H, $\text{CH}_3-\text{C}(10)$), 0,81 (d, 3H, $J = 6,6$, $\text{CH}_3-\text{C}(20)$), 0,71 i 0,70 (s i s, preklapaju se, 3H, $\text{CH}_3-\text{C}(13)$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 170,64; 170,62; 150,94; 148,89; 148,56; 129,90; 128,85; 124,28; 119,37; 118,81; 98,81; 75,50; 70,90; 51,63; 50,54; 50,51; 49,62; 48,16; 47,44; 44,97; 43,37; 41,49; 39,50; 37,74; 35,50; 34,86; 34,84; 34,35; 34,18; 33,31; 31,42; 31,23; 28,96; 27,23; 26,54; 26,52; 26,45; 25,55; 22,77; 21,62; 21,47; 20,23; 17,85; 12,16. HRMS: m/z 345,25444 odgovara molekulskoj formuli $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_4\text{H}_2^{2+}$ (greška u ppm 2,27). HPLC čistoća: metoda A ($\lambda = 254$ nm): RT 8,644, površina 95,76%; metoda B ($\lambda = 330$ nm): RT 7,455, površina 95,83%.

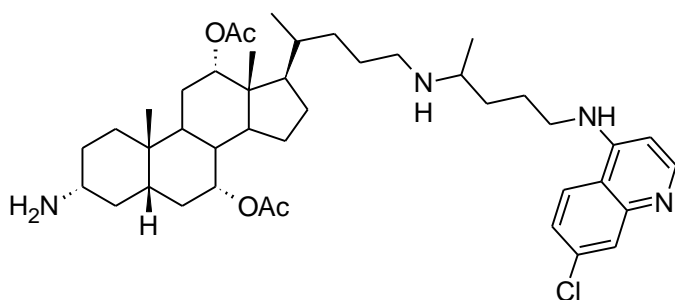
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-{metil[4-(hinolin-4-ilamino)pentil]amino}holan-7,12-diil-diacetat (125: Smeša diastereomera).



Jedinjenje **125** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **120** (90 mg, 0,1 mmol) i $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (8 mL). Sirovi proizvod se prečisti

hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP1, RP kolona 25+M, eluent $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ gradijent od 8/2 do 9/1, MeOH). Prinos 47 mg (60%). Pena, bele boje, topi se na 70–72 °C. Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +39,3$ (MeOH). IR (ATR): 3353sl, 3278sl, 3064sl, 2942j, 2863sr, 2790sl, 1725j, 1579j, 1537sr, 1448sl, 1376sr, 1341sl, 1244j, 1152sl, 1023sl, 765sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 8,58-8,49 (m, H-C(2')), 8,00-7,94 (m, H-C(8')), 7,76-7,71 (m, H-C(5')), 7,64-7,59 (m, H-C(7')), 7,43-7,38 (m, H-C(6')), 6,45-6,40 (m, H-C(3')), 5,33-5,26 (m, H-N, izmenjiv sa D_2O), 5,07 (ps, H-C(12)), 4,90-4,85 (m, H-C(7)), 3,77-3,68 (m, 1H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$), 2,61 (ps, H-C(3)), 2,39-2,33 (m, 2H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,31-2,24 (m, 2H-C(24)), 2,18 (s, 3H, CH_3-N), 2,10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO}-\text{C}(12)$), 2,07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO}-\text{C}(7)$), 1,33-1,30 (m, 3H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$), 0,90 (s, 3H, $\text{CH}_3-\text{C}(10)$), 0,82-0,79 (m, 3H, $\text{CH}_3-\text{C}(20)$), 0,70 i 0,69 (s i s, preklapaju se, 3H, $\text{CH}_3-\text{C}(13)$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 170,71; 150,85; 149,01; 148,44; 129,77; 128,92; 124,30; 119,44; 118,80; 98,86; 75,52; 70,93; 58,26; 57,50; 51,59; 48,18; 48,15; 47,62; 44,98; 43,35; 42,29; 41,45; 39,39; 37,71; 35,48; 34,95; 34,48; 34,34; 33,50; 31,40; 31,15; 28,95; 27,24; 25,54; 23,89; 23,88; 23,73; 22,78; 21,67; 21,48; 20,22; 17,87; 12,17. HRMS: m/z 345,25306 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_4\text{H}_2^{2+}$ (greška u ppm -1,72); m/z 230,50462 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_4\text{H}_3^{3+}$ (greška u ppm -1,04). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 8,574, površina 95,26%; metoda B: RT 6,961, površina 98,08%.

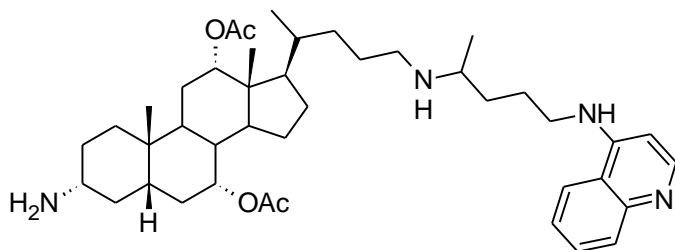
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-({4-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]-1-metilbutil}amino)holan-7,12-diil-diacetat (126: Smeša diastereomera).



Jedinjenje **126** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **115** (120 mg, 0,16 mmol) i CF₃COOH/CH₂Cl₂ (11 mL). Prinos 75,7 mg (72%). Pena, bele boje, topi se na 73–75 °C.

Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. $[\alpha]_D^{20} = +46,9$ (MeOH). IR (ATR): 3284sl, 2931j, 2860j, 1725j, 1652sl, 1610sl, 1578j, 1539sr, 1449sr, 1373sr, 1331sl, 1242j, 1154sl, 1135sl, 1078sl, 1022sl, 963sl, 937sl, 895sl, 849sl, 806sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,51 (d, $J = 5,2$, H-C(2')), 7,96-7,92 (m, H-C(8')), 7,72-7,68 (m, H-C(5')), 7,35-7,31 (m, H-C(6')), 6,38 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 5,79 (ps, H-N izmenjiv sa D₂O), 5,09-5,05 (m, H-C(12)), 4,90-4,86 (m, H-C(7)), 3,36-3,23 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,76-2,69 (m, 1H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH(CH₃)-), 2,67-2,47 (m, 2H-C(24) i H-C(3)), 2,11 i 2,10 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,07 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 1,09 (d, 3H, $J = 6,4$, ArNHCH₂CH₂CH₂CH(CH₃)-), 0,90 i 0,90 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃-C(10)), 0,80 (d, 3H, $J = 6,6$, CH₃-C(20)), 0,71 i 0,70 (s i s, preklapaju se, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,65; 152,04; 149,88; 149,15; 134,70; 128,72; 124,99; 121,23; 117,25; 98,90; 75,51; 70,91; 52,64; 51,63; 47,65; 47,57; 47,52; 44,99; 43,50; 43,39; 41,49; 39,50; 37,75; 35,51; 34,90; 34,69; 34,61; 34,35; 33,42; 33,39; 31,43; 31,23; 28,97; 27,24; 26,87; 26,84; 25,56; 24,95; 22,77; 21,63; 21,47; 20,45; 20,42; 17,86; 12,18. HRMS: m/z 723,45968 odgovara molekularnoj formuli C₄₂H₆₃N₄ClO₄H⁺ (greška u ppm -1,91). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda D: RT 10,536, površina 95,38%; metoda E: RT 8,430, površina 95,36%.

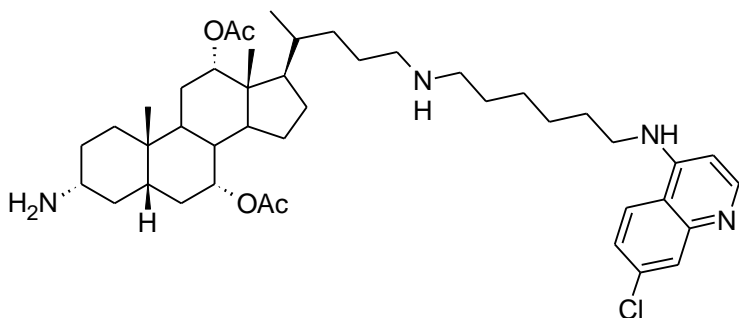
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-[[1-metil-4-(hinolin-4-ilamino)butil]amino]holan-7,12-diil-diacetat (127: Smeša diastereomera).



Jedinjenje **127** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **116** (390 mg, 0,49 mmol) i $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (17 mL). Prinos 319 mg (94%). Pena, bele

boje, topi se na 75–77 °C. Proizvod se dobija kao smeša diastereomera. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +45,6$ (MeOH). IR (ATR): 3265sr, 2938j, 2865j, 1727j, 1623sl, 1583j, 1543sr, 1505sl, 1442sr, 1377j, 1342sr, 1247j, 1154sl, 1127sl, 1082sl, 1026sr, 964sl, 890sl, 809sl, 766sr, 609sl, 540sl, 423sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 8,54 (d, $J = 5,2$, H-C(2')), 7,97 (d, $J = 8,5$, H-C(8')), 7,76 (d, $J = 8,2$, H-C(5')), 7,64-7,59 (m, H-C(7')), 7,43-7,37 (m, H-C(6')), 6,40 (d, $J = 5,2$, H-C(3')), 5,62 (ps, H-N izmenjiv sa D_2O), 5,09-5,05 (m, H-C(12)), 4,90-4,86 (m, H-C(7)), 3,38-3,25 (m, 2H, ArNHCH_2 -), 2,77-2,68 (m, 1H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ -), 2,67-2,47 (m, 2H-C(24) i H-C(3)), 2,10 i 2,10 (s i s, preklapaju se, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(12)$), 2,07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(7)$), 1,09 (d, 3H, $J = 6,2$, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ -), 0,90 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(10)$), 0,81 (d, 3H, $J = 6,4$, $\text{CH}_3\text{-C}(20)$), 0,70 i 0,69 (s i s, preklapaju se, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(13)$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 170,62; 170,60; 150,98; 149,77; 148,36; 129,81; 128,85; 124,34; 119,47; 118,76; 98,58; 75,49; 70,89; 52,72; 51,60; 47,67; 47,60; 47,44; 44,95; 43,44; 43,35; 41,46; 39,47; 37,72; 35,48; 34,84; 34,64; 34,58; 34,32; 33,39; 33,36; 31,40; 31,20; 28,94; 27,21; 26,77; 25,52; 25,08; 22,74; 21,60; 21,44; 20,41; 20,38; 17,83; 12,14. HRMS: m/z 689,49852 odgovara molekulskoj formuli $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_4\text{H}^+$ (greška u ppm -2,19); m/z 345,25324 odgovara molekulskoj formuli $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_4\text{H}_2^{2+}$ (greška u ppm -1,21). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 7,059, površina 98,72%; metoda B: RT 7,502, površina 97,72%.

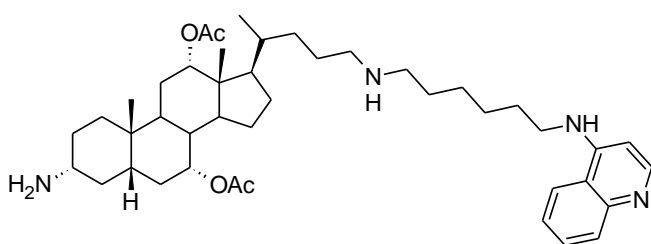
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-({6-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]heksil}amino)holan-7,12-diil-diacetat (128).



Jedinjenje **128** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **117** (51,5 mg, 0,0698 mmol) i CF₃COOH/CH₂Cl₂ (3,5 mL). Prinos 41,5 mg (92%).

Pena, bele boje, topi se na 69–71 °C. $[\alpha]_D^{20} = +66,9$ (MeOH). IR (ATR): 3284sl, 2934j, 2860sr, 1727j, 1610sl, 1581j, 1540sl, 1452sl, 1376sr, 1332sl, 1248j, 1136sl, 1080sl, 1024sl, 964sl, 899sl, 850sl, 807sl, 735sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,53 (d, $J = 5,3$, H-C(2')), 7,98-7,93 (m, H-C(8')), 7,66 (d, $J = 8,9$, H-C(5')), 7,38-7,33 (m, H-C(6')), 6,41 (d, $J = 5,5$, H-C(3')), 5,09-5,06 (m, H-C(12)), 5,02-4,97 (m, H-N, izmenjiv sa D₂O), 4,91-4,86 (m, H-C(7)), 3,34-3,27 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,64-2,48 (m, 5H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- i 2H-C(24) i H-C(3)), 2,11 (s, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,08 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,81 (d, 3H, $J = 6,6$, CH₃-C(20)), 0,71 (s, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,68; 170,65; 152,06; 149,62; 149,16; 134,76; 128,89; 125,21; 120,76; 117,08; 99,06; 75,54; 70,93; 51,66; 50,63; 49,98; 47,41; 44,99; 43,41; 43,18; 41,51; 39,52; 37,77; 35,52; 34,85; 34,37; 33,33; 31,46; 31,26; 30,13; 28,99; 28,82; 27,25; 27,13; 27,07; 26,48; 25,58; 22,80; 21,65; 21,49; 17,88; 12,18. HRMS: m/z 737,47556 odgovara molekulskoj formuli C₄₃H₆₅ClN₄O₄H⁺ (greška u ppm -1,56); m/z 246,49683 odgovara molekulskoj formuli C₄₃H₆₅ClN₄O₄H₃³⁺ (greška u ppm -1,04). HPLC čistoća ($\lambda = 330$ nm): metoda A: RT 9,278, površina 97,57%; metoda B: RT 7,853, površina 97,20%.

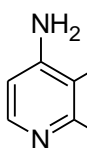
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-{{6-(hinolin-4-ilamino)heksil}amino}holan-7,12-diil-diacetat (129).



Jedinjenje **129** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **118** (170 mg, 0,21 mmol) i CF₃COOH/CH₂Cl₂ (5,5 mL). Sirovi proizvod se prečisti

hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP1, RP kolona 25+M, eluent MeOH/H₂O gradijent od 8/2 do 9/1, MeOH). Prinos 112,8 mg (76%). Pena, bele boje, topi se na 72–75 °C. $[\alpha]_D^{20} = +56,4$ (MeOH). IR (ATR): 3294sl, 3061sl, 2933j, 2860sr, 1726j, 1582j, 1542sl, 1441sl, 1376sr, 1341sl, 1247j, 1156sl, 1125sl, 1084sl, 1023sl, 964sl, 891sl, 808sl, 767sl, 734sl cm⁻¹. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, δ): 8,55 (d, *J* = 5,2, H-C(2')), 8,00–7,95 (m, H-C(8')), 7,74 (d, *J* = 7,8, H-C(5')), 7,64–7,60 (m, H-C(7')), 7,44–7,39 (m, H-C(6')), 6,42 (d, *J* = 5,5, H-C(3')), 5,11–5,05 (m, 2H, H-N, izmenjiv sa D₂O i H-C(12)), 4,90–4,86 (m, H-C(7)), 3,34–3,28 (m, 2H, ArNHCH₂-), 2,63–2,49 (m, 5H, ArNHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- i 2H-C(24) i H-C(3)), 2,11 (s, 3H, CH₃COO-C(12)), 2,07 (s, 3H, CH₃COO-C(7)), 0,90 (s, 3H, CH₃-C(10)), 0,81 (d, 3H, *J* = 6,6, CH₃-C(20)), 0,71 (s, 3H, CH₃-C(13)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 170,62; 170,59; 150,96; 149,59; 148,34; 129,86; 128,85; 124,44; 119,15; 118,63; 98,67; 75,48; 70,87; 51,59; 50,53; 49,90; 47,35; 44,92; 43,35; 43,09; 41,45; 39,45; 37,70; 35,47; 34,79; 34,30; 33,26; 31,40; 31,19; 30,01; 28,93; 28,79; 27,18; 27,08; 27,02; 26,37; 25,52; 22,74; 21,59; 21,43; 17,82; 12,12. HRMS: *m/z* 703,51463 odgovara molekulknoj formuli C₄₃H₆₆N₄O₄H⁺ (greška u ppm -1,50); *m/z* 352,26200 odgovara molekulknoj formuli C₄₃H₆₆N₄O₄H₂²⁺ (greška u ppm 1,49). HPLC čistoća (λ = 330 nm): metoda A: RT 9,134, površina 98,86%; metoda B: RT 7,830, površina 97,20%.

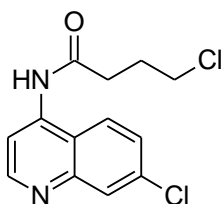
7-Hlorhinolin-4-amin (131).¹²³



4,7-dihlorhinolin (2,00 g, 10,1 mmol) se rastvori u fenolu (9,50 g, 101 mmol) uz grejanje na 110 °C. Polako, u porcijama, se dodaje čvrst (NH₄)₂CO₃ (4,85 g, 50,5 mmol) i zagrevanje produži tokom 3 h na 165 °C. Posle hlađenja do s.t., doda se dietil-etar (150 mL) i organski sloj ispere 10% vodenim rastvorom NaOH (3 × 50 mL). Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH = 9/1, MeOH). Prinos 1,44 g (80%). Praškasta supstanca, bež boje, topi se na 137–139 °C. IR (ATR): 3443sl, 3321sr, 3098j, 2788sl, 2707sl, 1683sl, 1656sr, 1635sr, 1612sr, 1577j, 1505sr, 1444sr, 1371sl, 1329sr, 1285sl, 1204sl, 1165sl, 1125sl, 1107sl, 1076sl, 908sl, 877sl, 853sl, 810sr, 766sl, 640sl, 625sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD, δ): 8,22 (d, *J* = 5,0, H-C(2)), 7,99 (d, *J* = 9,0, H-C(5)), 7,76–7,78 (m, H-C(8)), 7,37–7,25 (m, H-C(6)), 6,57 (d, *J* = 5,6, H-C(3)). ¹³C NMR (50 MHz, CD₃OD, δ):

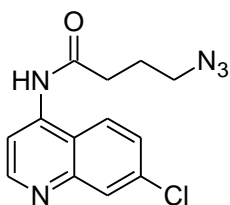
154,44; 151,80; 149,85; 136,56; 127,27; 125,80; 124,96; 118,26; 103,88. HRMS: m/z 179,03644 odgovara molekulkovoj formuli $C_9H_7ClN_2H^+$ (greška u ppm -3,43).

4-Hlor-*N*-(7-hlorhinolin-4-il)butanamid (132).



131 (500,0 mg, 2,799 mmol) se suspenduje u CH_2Cl_2 (20 mL), doda se trietil-amin (0,47 mL, 3,4 mmol) i reakciona smeša ohladi u ledenom kupatilu. Zatim se doda rastvor 4-hlorbutanoil-hlorida (0,38 mL, 3,4 mmol) u CH_2Cl_2 (5 mL), mešanje nastavi još 10 minuta na 0 °C, a zatim 1,5 h na sobnoj temperaturi. Doda se MeOH i reakciona smeša se meša 1 h (da se višak 4-hlorbutanoil-hlorida prevede u metil-estar, zbog lakšeg prečišćavanja proizvoda). Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 3/7). Prinos 707 mg (89%). Kristalna supstanca, bele boje, topi se na 89–90 °C. IR (ATR): 3318j, 3101sl, 2963sl, 2919sl, 2815sl, 1670j, 1614sr, 1571sr, 1526j, 1488j, 1443sr, 1419sl, 1379sl, 1349sl, 1323sr, 1304sr, 1275sl, 1254sl, 1208sr, 1190sl, 1141sl, 1107sl, 1076sl, 1032sl, 967sl, 873sl, 846sl, 819sl, 776sl, 644sl, 598sl, 563sl, 430sl cm^{-1} . 1H NMR (200 MHz, CD_3OD , δ): 8,72 (d, $J = 5,1$, H-C(2)), 8,23-8,12 (m, 2H, H-C(5) i H-C(3)), 7,96-7,93 (m, H-C(8)), 7,60-7,52 (m, H-C(6)), 3,70 (t, 2H, $J = 6,5$, $-CH_2Cl$), 2,79 (t, 2H, $J = 7,3$, $ArNHCOCH_2-$), 2,27-2,12 (m, 2H, $ArNHCOCH_2CH_2-$). ^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD , δ): 174,21; 152,96; 143,98; 136,96; 128,42; 128,25; 124,85; 121,02; 113,83; 97,83; 45,16; 34,72; 29,13. HRMS: m/z 283,04012 odgovara molekulkovoj formuli $C_{13}H_{12}Cl_2N_2OH^+$ (greška u ppm 0,63).

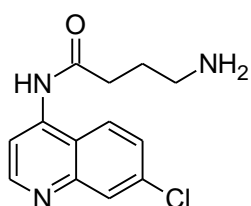
4-Azido-*N*-(7-hlorhinolin-4-il)butanamid (133).



132 (500,0 mg, 1,766 mmol) se rastvori u DMF (2 mL) u atmosferi argona, a zatim se doda se natrijum-azid (459 mL, 7,06 mmol). Reakciona smeša se zagreje na 80 °C i meša 2 h. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se pomoću CH_2Cl_2 i vode prenese u levak za odvajanje. Organski sloj se ispere vodom i suši iznad anhidrovanog Na_2SO_4 . Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/1). Prinos 383 mg (75%). Čvrsta supstanca, bele boje, topi se na 54–55 °C. IR (ATR): 3318j, 2930sr, 2670sr,

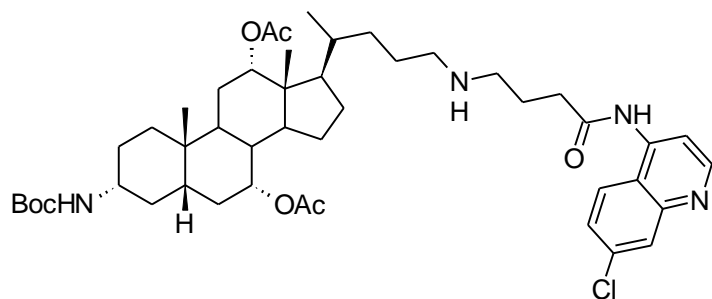
2168sl, 2101j, 1946sl, 1894sl, 1675j, 1613sr, 1570sr, 1525j, 1485j, 1443sr, 1416sl, 1375sl, 1343sl, 1303j, 1253sr, 1217sr, 1189sr, 1161sr, 1108sl, 1072sl, 1040sl, 965sl, 878sl, 847sr, 817sl, 764sl, 642sl, 617sl, 559sl, 475sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ): 8,80 (d, $J = 5,6$, H-C(2)), 8,32 (ps, H-N), 8,17 (d, $J = 5,1$, H-C(3)), 8,09-8,03 (m, H-C(8)), 7,83-7,75 (m, H-C(5)), 7,51-7,40 (m, H-C(6)), 3,46 (t, 2H, $J = 6,5$, $-\text{CH}_2\text{N}_3$), 2,66 (t, 2H, $J = 7,3$, ArNHCOCH_2-), 2,15-1,97 (m, 2H, $\text{ArNHCOCH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ): 170,95; 152,18; 149,24; 140,47; 135,46; 129,20; 127,34; 120,95; 118,62; 111,74; 50,53; 34,25; 24,29. HRMS: m/z 290,08039 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_5\text{OH}^+$ (greška u ppm 0,28).

4-Amino-*N*-(7-hlorhinolin-4-il)butanamid (134).



Prema delimično modifikovanom postupku iz literature,¹²⁴ **133** (382 mg, 1,32 mmol) se rastvori u THF (6 mL), dodaju se trifenilfosfin (380,4 mg, 1,450 mmol) i voda (26 μL , 1,4 mmol) i reakciona smeša se meša 48 h na 65 °C. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se brzo prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9/1$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (NH_3 zas.) = 7/3) i bez karakterizacije koristi u sledećoj reakciji. Prinos 230 mg (66%). Stajanjem se brzo razlaže na amin **131** i pirolidin-2-on **137** (potvrđeno HRMS analizom).

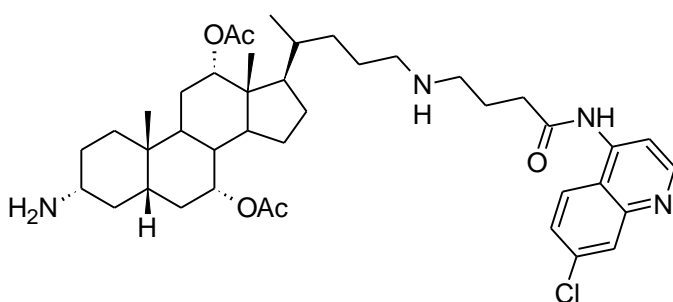
(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-[(*Terc*-butokskarbonil)amino]-24-({4-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]-4-oksobutil}amino)holan-7,12-diil-diacetat (135).



Po opštem postupku M, alkohol **109** (68 mg, 0,12 mmol) se transformiše u aldehid **110** pomoću PCC (36,5 mg, 0,170 mmol) u CH_2Cl_2 (6 mL). Dobijeni aldehid se zatim korišćenjem amina **134** (30,0 mg, 0,113 mmol), NaBH_4 (6,6 mg, 0,17 mmol) i MeOH (3 mL) prevede u proizvod **135**. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, eluent EtOAc, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9, EtOAc/MeOH (NH_3 zas.) gradijent od 95/5 do 8/2). Prinos 42 mg (43%). Pena,

bele boje, omekšava na 80–84 °C. $[\alpha]_D^{20} = +50,5$ (MeOH). IR (ATR): 3305sl, 2933sr, 2866sl, 1710sr, 1616sl, 1567sl, 1526sr, 1450sl, 1373sl, 1307sl, 1240sr, 1167sl, 1063sl, 1022sl, 965sl, 881sl, 850sl, 822sl, 768sl, 675sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 10,26 (ps, 1H, -NHCO-), 8,82 (d, $J = 5,3$, H-C(2')), 8,28 (d, $J = 5,2$, H-C(3')), 8,11-8,07 (m, H-C(8')), 7,90 (d, $J = 8,9$, H-C(5')), 7,48-7,43 (m, H-C(6')), 5,10-5,05 (m, H-C(12)), 4,92-4,87 (m, H-C(7)), 4,41 (ps, H-N), 3,27 (ps, H-C(3)), 2,84-2,78 (m, 2H, ArNHCOCH_2 -), 2,71-2,65 (m, 2H, $\text{ArNHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), 2,63-2,54 (m, 2H-C(24)), 2,10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(12)$), 2,06 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(7)$), 1,44 (s, 9H, -NHCOOC(CH_3)₃), 0,90 (s, 3H, CH_3 -C(10)), 0,77 (d, 3H, $J = 6,4$, CH_3 -C(20)), 0,70 (s, 3H, CH_3 -C(13)). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 172,46; 170,38; 170,26; 155,12; 152,48; 149,47; 141,47; 135,07; 129,25; 126,69; 121,80; 118,96; 111,26; 79,20; 75,42; 70,84; 53,39; 50,25; 48,30; 47,68; 45,01; 43,34; 41,52; 37,69; 36,38; 36,27; 35,47; 35,07; 34,23; 33,32; 31,28; 28,83; 28,40; 27,27; 26,61; 25,48; 24,76; 22,77; 22,68; 21,60; 21,36; 17,86; 12,18. HRMS: m/z 823,47498 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{ClN}_4\text{O}_7\text{H}^+$ (greška u ppm -2,59); m/z 845,45727 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{ClN}_4\text{O}_7\text{Na}^+$ (greška u ppm -2,11).

(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-Amino-24-({4-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]-4-oksobutil}amino)holan-7,12-diil-diacetat (136).

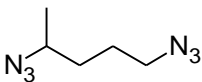


Jedinjenje **136** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **135** (40,0 mg, 0,0486 mmol) i $\text{CF}_3\text{COOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (3,3 mL, 1:10, v/v). Prinos 28 mg (80%). Pena, bele boje, omekšava na

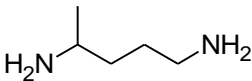
65–67 °C. IR (ATR): 3287sl, 2940j, 2864sr, 1726j, 1616sl, 1567sl, 1531sr, 1491sl, 1446sl, 1377sr, 1307sl, 1249j, 1159sl, 1120sl, 1077sl, 1025sl, 965sl, 883sl, 850sl, 823sl, 735sl, 702sl, 610sl cm^{-1} . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 10,28 (ps, 1H, -NHCO-), 8,82 (d, $J = 5,2$, H-C(2')), 8,28 (d, $J = 5,0$, H-C(3')), 8,10-8,08 (m, H-C(8')), 7,89 (d, $J = 8,9$, H-C(5')), 7,47-7,43 (m, H-C(6')), 5,08-5,05 (m, H-C(12)), 4,90-4,87 (m, H-C(7)), 2,84-2,79 (m, 2H, ArNHCOCH_2 -), 2,71-2,66 (m, 2H, $\text{ArNHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), 2,64-2,54 (m, 3H, 2H-C(24) i H-C(3)), 2,11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(12)$), 2,07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-C}(7)$),

0,90 (s, 3H, CH_3 -C(10)), 0,77 (d, 3H, $J = 6,6$, CH_3 -C(20)), 0,70 (s, 3H, CH_3 -C(13)). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, δ): 172,45; 170,62; 152,48; 149,47; 141,45; 135,07; 129,26; 126,68; 121,78; 118,94; 111,23; 75,48; 70,90; 51,65; 50,24; 48,28; 47,68; 45,04; 43,40; 41,50; 39,51; 37,76; 36,30; 35,51; 35,08; 34,38; 33,32; 31,44; 31,25; 28,98; 27,27; 26,62; 25,58; 24,71; 22,79; 21,65; 21,49; 17,83; 12,20. HRMS: m/z 723,42255 odgovara molekulskej formuli $C_{41}H_{59}ClN_4O_5H^+$ (greška u ppm -2,93); m/z 362,21612 odgovara molekulskej formuli $C_{41}H_{59}ClN_4O_5H_2^{2+}$ (greška u ppm 0,41). Čuva se u inertnoj atmosferi na -20 °C. Na sobnoj temperaturi ili u rastvoru MeOH razlaže se na amin **131** i (3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3-amino-24-(2-oksopirolidin-1-il)holan-7,12-dii-diacetat **138** (potvrđeno HRMS analizom, priloženo na CD-u). HPLC čistoća ($\lambda = 270$ nm): metoda D: RT 10,993, površina 95,23%; metoda E: RT 9,394, površina 96,81%.

1,4-Diazidopentan (141).⁸⁵

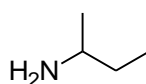
 1,4-dibromopentan (25 g, 0,11 mol) se rastvori u DMF (125 mL). Doda se natrijum-azid (35,35 g, 0,5438 mol) i reakciona smeša se meša tokom 24 h na 50 °C. Posle hlađenja do s.t., doda se voda i reakciona smeša prebaci u levak za odvajanje. Vodeni sloj se ekstrahuje etil-acetatom (3 x 150 mL). Suši se iznad anhidrovanog Na_2SO_4 . Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan). Prinos 16 g (95%). Bezbojno ulje. 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, δ): 3,58-3,39 (m, 1H, $N_3CH(CH_3)$ -), 3,37-3,24 (m, 2H, N_3CH_2 -), 1,83-1,46 (m, 4H, $N_3CH_2CH_2CH_2$ -), 1,32-1,26 (m, 3H, $N_3CH(CH_3)$ -). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, δ): 57,37; 51,04; 33,23; 25,44; 19,34.

1,4-Diaminopentan (142).⁸⁵

 Prema delimično modifikovanom postupku iz literature,¹²⁴ 1,4-diazidopentan (16 g, 0,10 mol) se rastvori u toluenu (175 mL). Doda se Ph_3P (62,61 g, 0,2387 mol) i reakciona smeša zagreva na 120 °C tokom 15 minuta. Posle hlađenja do s.t., doda se voda (22,5 mL) i smeša ostavi da refluktuje preko noći. Balon se zatim ohladi u ledenom kupatilu, kako bi se izdvojio čvrst trifenilfosfin-oksidi. Reakciona smeša se dekantovanjem prenese u levak za odvajanje. Donji sloj se odvoji i dodatkom MeOH(HCl zas.), uz hlađenje u ledenom kupatilu, prevede u odgovarajuću so. Rastvarač se upari na vakuum-uparivaču. Zagrevanjem 1,4-

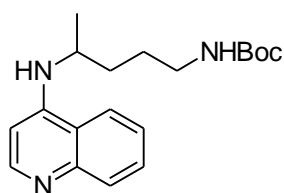
diamonijumpentan-dihlorida (15,21 g, 86,87 mmol) sa čvrstim NaOH (21,45 g, 536,3 mmol), dobija se **142**. Prinos 7,12 g (70%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3359j, 2931j, 2864j, 1600sr, 1457sl, 1381sl, 931sr, 752sr cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 2,87-2,79 (m, 1H, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$), 2,61 (t, $J = 7,2$, 2H, NH_2CH_2-), 1,54-1,42 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,42-1,29 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,06 (d, $J = 6,2$, 3H, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 47,70; 42,70; 37,81; 30,71; 23,20.

***Terc*-butil-(4-aminopentil)karbamat (143).**⁸⁵



1,4-Diaminopentan (5,00 g, 48,9 mmol) se rastvori u apsolutnom EtOH (150 mL), a zatim doda *terc*-butilfenilkarbonat (18,1 mL, 97,9 mmol) i smeša zagreva na 80 °C preko noći. Rastvarač se upari na vakuum-uparivaču. Dodaje se voda i pH podesi na 3 pomoću 3M vodenog rastvora HCl. Vodeni sloj se ekstrahuje pomoću CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) i spojeni organski slojevi odbace. Vodeni sloj se zatim podesi na pH = 12 pomoću 2M vodenog rastvora NaOH i ekstrahuje sa CH_2Cl_2 (2 x 50 mL). Spojeni organski slojevi se isperu zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše iznad anhidrovanog Na_2SO_4 . Rastvarač se upari na vakuum-uparivaču. Prinos 6,73g (68%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3373sr, 2945sr, 1691j, 1628sl, 1583sr, 1526j, 1493j, 1448sr, 1388sl, 1365sr, 1306sl, 1276sr, 1247sr, 1172sr, 982sl, 874sl, 719sl, 632sl, 571sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 3,07-2,98 (m, 3H, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ i NH-BocCH_2-), 1,55-1,39 (m, 13H, $\text{NH-BocCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ i $-\text{NHCOOC}(\text{CH}_3)_3$), 1,15 (d, $J = 6,4$, 3H, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 158,57; 79,90; 48,03; 41,11; 35,62; 28,78; 27,42; 21,24.

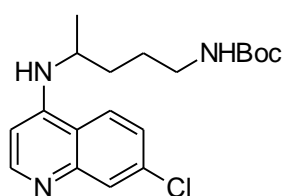
***Terc*-butil-[4-(hinolin-4-ilamino)pentil]karbamat (144).**



Jedinjenje **144** se sintetiše po opštem postupku I, korišćenjem 4-hlorhinolina (216 mg, 1,32 mmol) i *terc*-butil-(4-aminopentil)karbamata **143** (401 mg, 1,98 mmol). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent heksan/EtOAc gradijent od 1/1 do 1/9, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 7/3; flash, Biotage SP, NH kolona, 25+M, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 7/3 do 1/9, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9). Prinos 230,5 mg (53%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3430sl, 3343sr, 3237sr, 3116sl, 3059sl, 2974sr, 2933sr, 2870sl, 1691j, 1618sl,

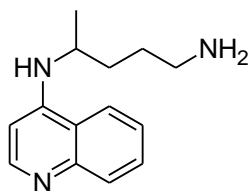
1580j, 1537j, 1453sr, 1394sr, 1367sr, 1343sr, 1258sr, 1171sr, 1045sl, 1024sl, 976sl, 870sl, 810sl, 765sr, 738sr, 703sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,53 (d, $J = 5,4$, H-C(2)), 7,99-7,95 (m, H-C(8)), 7,80-7,74 (m, H-C(5)), 7,64-7,60 (m, H-C(7)), 7,44-7,39 (m, H-C(6)), 6,42 (d, $J = 5,4$, H-C(3)), 5,04-4,94 (m, NH), 4,61 (bs, NH), 3,80-3,70 (m, 1H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$), 3,25-3,10 (m, 2H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,75-1,55 (m, 4H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ i $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,44 (s, 9H, $-\text{NHCOOC}(\text{CH}_3)_3$), 1,32 (d, $J = 6,2$, 3H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 156,11; 151,00; 148,76; 148,64; 129,99; 128,91; 124,46; 119,29; 118,76; 98,88; 79,30; 48,12; 40,33; 33,52; 28,38; 27,03; 20,46. HRMS: m/z 330,21811 odgovara molekularnoj formuli $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2\text{H}^+$ (greška u ppm 1,54).

***Terc*-butil-{4-[(7-hlorohinolin-4-il)amino]pentil}karbammat (145).⁸⁵**



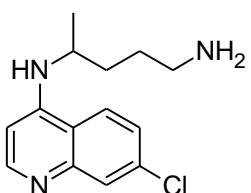
Jedinjenje **145** se sintetiše po opštem postupku I, korišćenjem 4,7-dihlorhinolina (500,0 mg, 2,525 mmol) i *terc*-butil-(4-aminopentil)karbamata **143** (612,8 mg, 3,029 mmol). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, NH kolona, 25+M, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 7/3 do 1/9, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9). Prinos 485 mg (53%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3427sl, 3334sr, 3064sl, 2972sr, 2932sr, 2870sl, 1686j, 1611sl, 1576j, 1534j, 1451sr, 1367sr, 1334sl, 1278sr, 1252sr, 1207sl, 1168sr, 1081sl, 1044sl, 1021sl, 974sl, 906sl, 873sl, 853sl, 808sl, 766sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,51 (d, $J = 5,3$, H-C(2)), 7,96-7,93 (m, H-C(8)), 7,78-7,72 (m, H-C(5)), 7,37-7,32 (m, H-C(6)), 6,40 (d, $J = 5,4$, H-C(3)), 5,15 (bs, H-N), 4,64 (bs, H-N), 3,79-3,69 (m, 1H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$), 3,28-3,09 (m, 2H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,77-1,57 (m, 4H, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ i $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,45 (s, 9H, $-\text{NHCOOC}(\text{CH}_3)_3$), 1,31 (d, 3H, $J = 6,2$, $\text{ArNHCH}(\text{CH}_3)-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 156,25; 151,99; 149,36; 148,90; 134,79; 128,80; 125,12; 121,14; 117,25; 99,14; 79,43; 48,41; 40,25; 33,22; 28,38; 27,27; 20,46. HRMS: m/z 364,17719 odgovara molekularnoj formuli $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -3,95).

***N*⁴-(hinolin-4-il)pentan-1,4-diamin (146).**

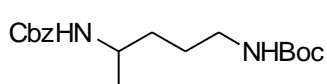


Jedinjenje **146** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **144** (210 mg, 0,64 mmol) i CF₃COOH/CH₂Cl₂ (5,5 mL, 1:10, v/v). Prinos 130 mg (92%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3293sr, 2972sr, 2933sr, 2872sl, 1583j, 1547sr, 1503sl, 1447sl, 1397sl, 1373sl, 1342sl, 1282sl, 1257sl, 1226sl, 1148sl, 917sl, 890sl, 809sl, 769sr cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,32 (d, *J* = 5,5, H-C(2)), 8,17-8,13 (m, H-C(8)), 7,80-7,76 (m, H-C(5)), 7,63-7,57 (m, H-C(7)), 7,43-7,38 (m, H-C(6)), 6,50 (d, *J* = 6,0, H-C(3)), 3,82-3,74 (m, 1H, ArNHCH-), 2,64 (t, 2H, *J* = 7,0, ArCH(CH₃)CH₂CH₂CH₂-), 1,80-1,70 (m, 1H, ArNHCH(CH₃)CH₂-), 1,70-1,50 (m, 3H, ArNHCH(CH₃)CH₂- i ArNHCH(CH₃)CH₂CH₂-), 1,31 (d, 3H, *J* = 6,4, ArNHCH(CH₃)-). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 152,02; 151,25; 149,12; 130,39; 128,82; 125,43; 122,28; 120,33; 99,35; 49,42; 42,51; 34,67; 30,66; 20,43. HRMS: *m/z* 115,58609 odgovara molekulskej formuli C₁₄H₁₉N₃H₂²⁺ (greška u ppm -1,16).

***N*⁴-(7-hlorohinolin-4-il)pentan-1,4-diamin (147).⁸⁵**

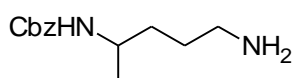


Jedinjenje **147** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem **145** (477 mg, 1,31 mmol) i CF₃COOH/CH₂Cl₂ (22 mL, 1:10, v/v). Prinos 342 mg (99%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3282sr, 3065sl, 2932sr, 2860sl, 1610sr, 1577j, 1539sr, 1488sl, 1451sr, 1425sl, 1377sl, 1333sl, 1280sl, 1252sl, 1202sl, 1148sl, 1081sl, 905sl, 875sl, 853sl, 808sl, 767sl, 642sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,33 (d, *J* = 5,6, H-C(2)), 8,19-8,16 (m, H-C(8)), 7,77-7,75 (m, H-C(5)), 7,38 (dd, *J*₁ = 2,2, *J*₂ = 9,1, H-C(6)), 6,55-6,52 (m, H-C(3)), 3,84-3,76 (m, 1H, ArNHCH-), 2,67 (t, 2H, *J* = 7,0, ArCH(CH₃)CH₂CH₂CH₂-), 1,81-1,71 (m, 1H, ArNHCH(CH₃)CH₂-), 1,70-1,52 (m, 3H, ArNHCH(CH₃)CH₂- i ArNHCH(CH₃)CH₂CH₂-), 1,32 (d, 3H, *J* = 6,4, ArNHCH(CH₃)-). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 152,45; 151,15; 149,92; 136,29; 127,58; 125,81; 124,46; 118,84; 99,83; 49,53; 42,44; 34,60; 30,52; 20,35. HRMS: *m/z* 132,56680 odgovara molekulskej formuli C₁₄H₁₈ClN₃H₂²⁺ (greška u ppm 0,47); *m/z* 264,12605 odgovara molekulskej formuli C₁₄H₁₈ClN₃H⁺ (greška u ppm -0,56).

Benzil-*tert*-butil-pentan-1,4-diilbiskarbamat (148).⁸⁵

Terc-butil-(4-aminopentil)karbamat (**143**) (1,00 g, 4,94 mmol) se rastvori u CH₂Cl₂ (50 mL). Zatim se ukapaju

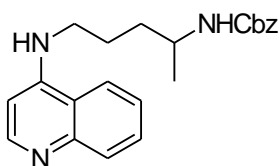
benzil-hlorformijat (1,37 mL, 9,64 mmol) i trietil-amin (1,41 mL, 0,726 mmol) i reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi 3 h. Reakcija se prekida dodatkom vodenog rastvora NH₃ (50 mL). Reakciona smeša se prebaci u levak za odvajanje, doda se voda (200 mL), a proizvod ekstrahuje etil-acetatom (3×100 mL). Spojeni organski slojevi se suše iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO₂, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/1). Prinos 1,58 mg (95%). Bezbojno ulje. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 7,38-7,29 (m, 5H, -Ph), 5,08 (ps, 2H, -CH₂Ph), 4,61 (ps, *H*-N), 3,79-3,64 (m, 1H, CbzNHCH(CH₃)-), 3,19-3,03 (m, 2H, -CH₂NHBoc), 1,56-1,41 (m, 13H, CbzNHCH(CH₃)CH₂-, CbzNHCH(CH₃)CH₂CH₂- i -NHCOOC(CH₃)₃), 1,14 (d, 3H, *J* = 6,6, CbzNHCH(CH₃)-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 155,96; 155,78; 136,59; 128,49; 128,06; 79,10; 66,51; 46,92; 40,36; 34,32; 28,39; 26,68; 21,24.

Benzil-(4-amino-1-metilbutil)karbamat (149).⁸⁵

Jedinjenje **149** se sintetiše po opštem postupku J, korišćenjem

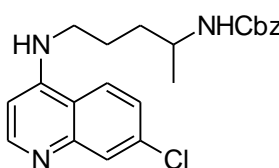
148 (1,00 g, 2,97 mmol) i CF₃COOH/CH₂Cl₂ (22 mL, 1:10, v/v). Prinos 695 mg (99%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3332sr, 3033sl, 2933sr, 2859sl, 1702j, 1537j, 1454sr, 1378sl, 1335sl, 1257j, 1064sr, 1027sl, 915sl, 748sl, 698sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 7,39-7,28 (m, 5H, -Ph), 5,14-5,03 (m, 2H, -CH₂Ph), 4,84-4,74 (m, *H*-N), 3,72 (ps, 1H, CbzNHCH(CH₃)-), 2,74-2,63 (m, 2H, -CH₂NH₂), 1,52-1,42 (m, 4H, CbzNHCH(CH₃)CH₂- i CbzNHCH(CH₃)CH₂CH₂-), 1,28 (ps, 2H, -NH₂), 1,14 (d, 3H, *J* = 6,6, CbzNHCH(CH₃)-). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 155,76; 136,64; 128,45; 128,00; 66,41; 46,93; 41,91; 34,38; 29,90; 21,14.

Benzil-[1-metil-4-(hinolin-4-ilamino)butil]karbamat (150).



Jedinjenje **150** se sintetiše po opštem postupku I, korišćenjem 4-hlorhinolina (195 mg, 1,18 mmol) i benzil-(4-amino-1-metilbutil)karbamata **149** (335 mg, 1,42 mmol). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, NH kolona, 40+M, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/9, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9). Prinos 320 mg (72%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3344sr, 3063sl, 3031sl, 2964sl, 2934sl, 2866sl, 1696j, 1616sl, 1582j, 1539j, 1454sr, 1395sl, 1374sl, 1343sr, 1257sr, 1081sr, 1029sl, 808sl, 764sr, 697sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,54 (d, $J = 5,2$, H-C(2)), 8,00-7,95 (m, H-C(8)), 7,84-7,78 (m, H-C(5)), 7,65-7,59 (m, H-C(7)), 7,44-7,39 (m, H-C(6)), 7,37-7,29 (m, 5H, -Ph), 6,43-6,36 (m, H-C(3)), 5,30 (ps, $H\text{-N}$), 5,11 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{Ph}$), 4,73-4,64 (m, $H\text{-N}$), 3,89-3,80 (m, 1H, $\text{CbzNHCH}(\text{CH}_3)\text{-}$), 3,37-3,30 (m, 2H, $\text{CbzNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 1,85-1,75 (m, 2H, $\text{CbzNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{-}$), 1,65-1,56 (m, 2H, $\text{CbzNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 1,18 (d, 3H, $J = 6,5$, $\text{CbzNHCH}(\text{CH}_3)\text{-}$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 156,02; 151,00; 149,70; 148,40; 136,45; 129,84; 128,94; 128,53; 128,16; 128,09; 124,54; 119,52; 118,77; 98,70; 66,68; 46,76; 43,07; 35,12; 25,13; 21,37. HRMS: m/z 364,20267 odgovara molekularnoj formuli $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{H}^+$ (greška u ppm 1,98).

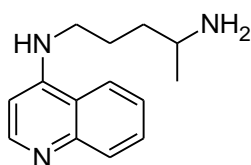
Benzil-{4-[(7-hlorohinolin-4-il)amino]-1-metilbutil}karbamat (151).



Jedinjenje **151** se sintetiše po opštem postupku I, korišćenjem 4,7-dihlorhinolina (400,0 mg, 2,019 mmol) i benzil-(4-amino-1-metilbutil)karbamata **149** (525 mg, 2,22 mmol). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, NH kolona, 40+M, eluent heksan, heksan/EtOAc gradijent od 9/1 do 1/9, EtOAc/MeOH gradijent od 9/1 do 1/9). Prinos 477 mg (59%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3314sr, 3033sl, 2938sr, 1698j, 1610sl, 1581j, 1537sr, 1452sr, 1370sl, 1333sl, 1256sr, 1139sl, 1080sl, 1026sl, 901sl, 878sl, 851sl, 808sl, 738sl, 698sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,30 (d, $J = 5,5$, H-C(2)), 8,10-8,04 (m, H-C(5)), 7,78-7,75 (m, H-C(8)), 7,38-7,34 (m, H-C(6)), 7,34-7,22 (m, 5H, -Ph), 6,50-6,44 (m, H-C(3)), 5,10-5,01 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{Ph}$), 3,76-3,66 (m, 1H, $\text{CbzNHCH}(\text{CH}_3)\text{-}$), 3,38-3,32 (m, 2H, $\text{CbzNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 1,81-1,71 (m, 2H, $\text{CbzNHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{-}$), 1,63-1,54

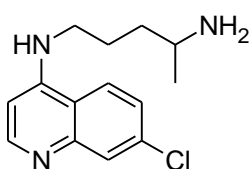
(m, 2H, CbzNHCH(CH₃)CH₂CH₂-), 1,15 (d, 3H, *J* = 6,6, CbzNHCH(CH₃)-). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 158,44; 152,69; 152,36; 149,64; 138,48; 136,26; 129,42; 128,90; 128,69; 127,54; 125,89; 124,32; 118,75; 99,60; 67,23; 47,92; 43,78; 35,38; 26,04; 21,51. HRMS: *m/z* 398,16435 odgovara molekularnoj formuli C₂₂H₂₄ClN₃O₂H⁺ (greška u ppm 3,43).

N¹-(hinolin-4-il)pentan-1,4-diamin (152).



Cbz-zaštićeni amin **150** (305 mg, 0.839 mmol) se podvrgne hidrogenizaciji u prisustvu 10% paladijuma na ugljeniku (30 mg) kao katalizatora pod pritiskom H₂ od 20 psi u MeOH (150 mL). Reakciona smeša se meša 8 h na sobnoj temperaturi, katalizator odvoji ceđenjem, a rastvarač ukloni pod sniženim pritiskom. Prinos 192 mg (>99%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3353sr, 3077sl, 2958sl, 1584j, 1545sr, 1441sl, 1376sl, 1343sr, 1258sl, 1228sl, 1127sl, 1037sl, 884sl, 810sl, 766sl cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,34 (d, *J* = 5,5, H-C(2)), 8,12-8,07 (m, H-C(8)), 7,83-7,78 (m, H-C(5)), 7,65-7,60 (m, H-C(7)), 7,45-7,41 (m, H-C(6)), 6,50 (d, *J* = 5,8, H-C(3)), 3,38 (t, 2H, *J* = 7,1, ArNHCH₂-), 3,03-2,95 (m, 1H, NH₂CH(CH₃)-), 1,85-1,74 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂-), 1,61-1,48 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂CH₂-), 1,14 (d, 3H, *J* = 6,4, NH₂CH(CH₃)-). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 152,67; 151,14; 148,82; 130,49; 128,72; 125,59; 122,21; 120,28; 99,14; 47,92; 43,87; 36,88; 26,12; 22,28. HRMS: *m/z* 230,16532 odgovara molekularnoj formuli C₁₄H₁₉N₃H⁺ (greška u ppm 0,64); *m/z* 115,58652 odgovara molekularnoj formuli C₁₄H₁₉N₃H₂²⁺ (greška u ppm 2,52).

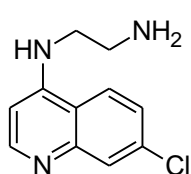
N¹-(7-hlorhinolin-4-il)pentan-1,4-diamin (153).



Prema postupku opisanom u literaturi,¹⁶⁰ Cbz-zaštićeni amin **151** (120 mg, 0,30 mmol) se rastvori u CF₃COOH (2 mL) i smeša se meša na tački ključanja tokom 2 h. CF₃COOH se ukloni pod sniženim pritiskom, a ostatak pomoću CH₂Cl₂/2,5 M NaOH prenese u levak za odvajanje. Organski sloj se ispere pomoću 2,5 M NaOH i suši iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Prinos 77 mg (97%). Praškasta supstanca, bele boje, topi se na 109–111 °C. IR (ATR): 3294sr, 3104sl, 3010sl, 2959sl, 2931sr, 2857sr, 1610sl, 1577j, 1542sr, 1473sl, 1452sr, 1369sr, 1331sl, 1283sl, 1248sl, 1197sl, 1149sl, 1131sl, 1085sl,

1025sl, 953sl, 919sl, 901sr, 850sl, 824sl, 800sr, 767sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,32 (d, $J = 5,5$, H-C(2)), 8,07 (d, $J = 9,2$, H-C(5)), 7,76-7,74 (m, H-C(8)), 7,38-7,34 (m, H-C(6)), 6,48 (d, $J = 5,7$, H-C(3)), 3,34 (t, 2H, $J = 7,2$, ArNHCH_2-), 2,89 (sext, 1H, $J = 6,4$, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$), 1,83-1,69 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2-$), 1,54-1,42 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,09 (d, 3H, $J = 6,4$, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 152,71; 152,44; 149,71; 136,26; 127,60; 125,90; 124,30; 118,77; 99,61; 47,66; 44,06; 37,79; 26,23; 23,26. HRMS: m/z 264,12514 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{H}^+$ (greška u ppm -4,02).

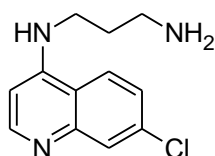
***N*-(7-hlorrhinolin-4-il)etan-1,2-diamin (AQ2).**¹⁶¹



AQ2 se sintetiše po opštem postupku H, korišćenjem 4,7-dihlorrhinolina (5,00 g, 25,2 mmol) i 1,2-diaminoetana (11,8 mL, 176 mmol). Obrada reakcione smeše se vrši izlivanjem u smešu led/voda. Izdvojeni talog se ispere vodom i suši na vazduhu, a potom u vakuum-

sušnici. Prinos 5,3 g (95%). Praškasta supstanca, bleožute boje. IR (ATR): 3247sr, 2923sr, 2190sl, 1586j, 1542j, 1482sr, 1456j, 1427sr, 1389sr, 1348sr, 1323sr, 1291sr, 1254sl, 1212sl, 1166sl, 1140sl, 1112sl, 1082sl, 1047sl, 1023sl, 949sl, 910sl, 867sl, 825sl, 802sl, 769sl, 686sl, 640sl, 609sl, 502sl, 474sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,35 (d, $J = 5,5$, H-C(2)), 8,11 (d, $J = 9,0$, H-C(5)), 7,78-7,76 (m, H-C(8)), 7,42-7,38 (m, H-C(6)), 6,57 (d, $J = 5,7$, H-C(3)), 3,45 (t, 2H, $J = 6,4$, ArNHCH_2-), 2,98 (t, 2H, $J = 6,3$, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 152,86; 152,48; 149,70; 136,39; 127,62; 126,08; 124,34; 118,84; 99,73; 46,13; 40,78. HRMS: m/z 222,07881 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{ClH}^+$ (greška u ppm -1,99).

***N*-(7-hlorrhinolin-4-il)propan-1,3-diamin (AQ3).**¹⁶¹

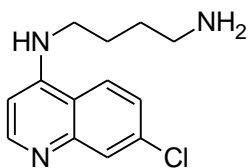


AQ3 se sintetiše po opštem postupku H, korišćenjem 4,7-dihlorrhinolina (5,00 g, 25,2 mmol) i 1,3-diaminopropana (14,8 mL, 176 mmol). Obrada reakcione smeše se vrši izlivanjem u smešu led/voda. Izdvojeni talog se ispere vodom i suši na vazduhu, a potom u vakuum-

sušnici. Prinos 5,7 g (96%). Praškasta supstanca, bleožute boje. IR (ATR): 3261j, 3065sr, 3008sr, 2937sr, 2867sr, 2571sr, 2237sl, 1645sl, 1578j, 1540j, 1479sr, 1387sr, 1337sr, 1316sr, 1281sr, 1218sr, 1135sl, 1079sl, 1012sl, 947sl, 900sl, 850sl, 821sl, 800sr, 766sl,

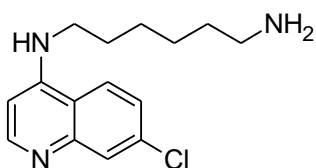
597sl, 538sl, 498sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ): 8,30 (d, $J = 5,5$, H-C(2)), 7,97 (d, $J = 9,0$, H-C(5)), 7,77-7,75 (m, H-C(8)), 7,34-7,31 (m, H-C(6)), 6,41 (d, $J = 5,7$, H-C(3)), 3,37 (t, 2H, $J = 6,9$, ArNHCH_2 -), 2,81 (t, 2H, $J = 7,0$, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), 1,87 (quin, 2H, $J = 6,9$, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2$ -). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, δ): 151,94; 151,74; 149,01; 135,88; 127,34; 125,69; 123,40; 118,18; 99,05; 41,31; 39,82; 31,28. HRMS: m/z 236,09427 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{ClH}^+$ (greška u ppm -2,68).

***N*-(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,4-diamin (AQ4).**¹⁶¹



AQ4 se sintetiše po opštem postupku H, korišćenjem 4,7-dihlorhinolina (270 mg, 1,4 mmol) i 1,4-diaminobutana (0,98 mL, 9,8 mmol). Obrada reakcione smeše se vrši izlivanjem u smešu led/voda. Izdvojeni talog se ispere vodom i suši na vazduhu, a potom u vakuum-sušnici. Prinos 277 mg (81%). Praškasta supstanca, bleožute boje. IR (ATR): 3284sr, 3066sr, 2931j, 2860j, 1580j, 1538sr, 1475sr, 1428sr, 1370sr, 1332sr, 1247sl, 1198sl, 1160sl, 1130sl, 1079sl, 950sl, 904sl, 852sl, 805sl, 788sl, 646sl, 523sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,33 (d, $J = 5,7$, H-C(2)), 8,08 (d, $J = 9,0$, H-C(5)), 7,77-7,75 (m, H-C(8)), 7,39-7,36 (m, H-C(6)), 6,50 (d, $J = 5,8$, H-C(3)), 3,37 (t, 2H, $J = 7,1$, ArNHCH_2 -), 2,75 (t, 2H, $J = 7,2$, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), 1,81-1,74 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2$ -), 1,68-1,60 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 152,72; 152,44; 149,71; 136,30; 127,60; 125,94; 124,30; 118,78; 99,63; 43,71; 41,91; 30,27; 26,74. HRMS: m/z 250,10956 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{ClH}^+$ (greška u ppm -3,97); m/z 125,55890 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{ClH}_2^{2+}$ (greška u ppm -0,14).

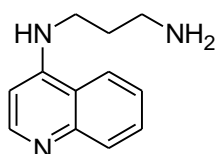
***N*-(7-hlorhinolin-4-il)heksan-1,6-diamin (AQ6).**¹⁶²



AQ6 se sintetiše po opštem postupku H, korišćenjem 4,7-dihlorhinolina (200 mg, 1 mmol) i 1,6-diaminoheksana (1 mL, 7 mmol). Obrada reakcione smeše se vrši ekstrakcijom, a sirovi proizvod prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (NH_3 zas.) gradijent od 9/1 do 8/2). Prinos 222 mg (80%). Praškasta supstanca, bleožute boje. IR (ATR): 3362sl, 3271sl, 3036sl,

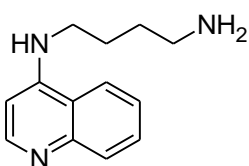
2934sr, 2857sr, 1611sl, 1579j, 1542sr, 1472sl, 1450sl, 1429sl, 1370sr, 1333sl, 1257sl, 1199sl, 1134sl, 1082sl, 1005sl, 938sl, 899sl, 851sl, 799sl, 771sl, 735sl, 651sl, 529sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,32 (d, $J = 5,7$, H-C(2)), 8,08 (d, $J = 9,2$, H-C(5)), 7,77-7,75 (m, H-C(8)), 7,39-7,35 (m, H-C(6)), 6,49 (d, $J = 5,5$, H-C(3)), 3,37-3,33 (m, 2H, ArNHCH_2-), 2,72-2,66 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,79-1,72 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2-$), 1,57-1,38 (m, 6H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 152,77; 152,42; 149,74; 136,28; 127,59; 125,91; 124,30; 118,78; 99,58; 43,90; 42,02; 32,50; 29,32; 28,00; 27,66. HRMS: m/z 139,57450 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{ClH}_2^{2+}$ (greška u ppm -0,48).

***N*-(hinolin-4-il)propan-1,3-diamin (AQ7).**⁸⁵



AQ7 se sintetiše po opštem postupku H, korišćenjem 4-hlorhinolina (750 mg, 4,6 mmol) i 1,3-diaminopropana (2,37 g, 32,1 mmol). Obrada reakcione smeše se vrši ekstrakcijom, a sirovi proizvod prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (NH_3 zas.) gradijent od 9/1 do 8/2). Prinos 851 mg (92%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3619sl, 3298sr, 3058sr, 2936sr, 2206sl, 1584j, 1544sr, 1462sr, 1438sr, 1391sr, 1343sr, 1316sr, 1258sl, 1227sl, 1124sl, 1019sl, 926sl, 877sl, 811sl, 766sr, 689sl, 650sl, 609sl, 548sl, 475 sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,34 (d, $J = 5,8$, H-C(2)), 8,09-8,05 (m, H-C(8)), 7,81-7,77 (m, H-C(5)), 7,64-7,58 (m, H-C(7)), 7,45-7,39 (m, H-C(6)), 6,51 (d, $J = 5,5$, H-C(3)), 3,42 (t, 2H, $J = 7,1$, ArNHCH_2-), 2,79 (t, 2H, $J = 7,0$, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,89 (quin, 2H, $J = 7,1$, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 152,62; 151,26; 148,93; 130,43; 128,83; 125,58; 122,14; 120,31; 99,18; 41,66; 40,33; 32,25. HRMS: m/z 202,13373 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{H}^+$ (greška u ppm -0,73).

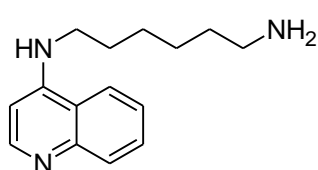
***N*-(hinolin-4-il)butan-1,4-diamin (AQ8).**⁸⁵



AQ8 se sintetiše po opštem postupku H, korišćenjem 4-hlorhinolina (200,0 mg, 1,222 mmol) i 1,4-diaminobutana (754,3 mg, 8,557 mmol). Obrada reakcione smeše se vrši izlivanjem u smešu led/voda. Prinos 263,2 mg (69%). Bela kristalna supstanca. IR (ATR): 3011j, 2941j, 2858j, 1668sl, 1581j, 1544j, 1502sl, 1477sr, 1441sr, 1406sl,

1378sr, 1345sr, 1293sl, 1260sl, 1224sl, 1158sl, 1127sl, 1095sl, 1028sl, 978sl, 957sl, 929sl, 894sl, 863sl, 809sr, 771sr, 685sl, 599sl, 546sl, 509sl, 472sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD , δ): 8,27 (d, $J = 5,6$, H-C(2)), 8,07-7,99 (m, H-C(8)), 7,79-7,70 (m, H-C(5)), 7,60-7,49 (m, H-C(7)), 7,40-7,29 (m, H-C(6)), 6,38 (d, $J = 5,6$, H-C(3)), 3,26 (t, 2H, $J = 7,3$, ArNHCH_2-), 2,61 (t, 2H, $J = 6,7$, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,78-1,42 (m, 4H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD , δ): 152,63; 151,29; 148,96; 130,44; 128,86; 125,54; 122,25; 120,32; 99,14; 43,79; 42,30; 31,38; 26,86. HRMS: m/z 216,14980 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{H}^+$ (greška u ppm 1,27).

***N*-(hinolin-4-il)heksan-1,6-diamin (AQ9).**



AQ9 se sintetiše po opštem postupku H, korišćenjem 4-hlorhinolina (1,00 g, 6,11 mmol) i 1,6-diaminoheksana (4,97 g, 42,8 mmol). Obrada reakcione smeše se vrši ekstrakcijom, a sirovi proizvod prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO_2 , eluent CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (NH_3 zas.) gradijent od 9/1 do 8/2). Prinos 1,21 g (81%). Ulje, žute boje. IR (ATR): 3318sr, 3079sl, 2928sr, 2854sr, 1618sl, 1582j, 1545sr, 1502sl, 1468sl, 1439sr, 1376sl, 1342sl, 1262sl, 1126sl, 935sl, 884sl, 809sl, 771sl cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,34 (d, $J = 5,7$, H-C(2)), 8,11-8,07 (m, H-C(8)), 7,83-7,79 (m, H-C(5)), 7,63-7,59 (m, H-C(7)), 7,44-7,39 (m, H-C(6)), 6,45 (d, $J = 5,5$, H-C(3)), 3,34-3,30 (m, 2H, ArNHCH_2-), 2,61 (t, 2H, $J = 7,1$, $\text{ArNH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2-$), 1,77-1,70 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2-$), 1,51-1,34 (m, 6H, $\text{ArNH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 152,61; 151,23; 148,94; 130,37; 128,82; 125,48; 122,18; 120,28; 99,09; 43,90; 42,48; 33,81; 29,41; 28,09; 27,78. HRMS: m/z 244,18071 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{H}^+$ (greška u ppm -0,49).

▣ Protokoli bioloških testova

Određivanje toksičnosti prema HepG2 ćelijskoj liniji i *in vitro* metabolizam u mišjim i humanim mikrozomima jetre (MLM, HLM).

Eksperimenti su izvršeni prema protokolima koji su detaljno opisani u literaturi.¹⁶³

Određivanje toksičnosti u *in vivo* uslovima (prema embrionima zebra-ribica).

Toksičnost jedinjenja **17 (JK141)** prema embrionima zebrice (*Danio rerio*) procenjena je prema opštim pravilima OECD Smernica za testiranje hemikalija.¹⁶⁴ Svi eksperimenti izvedeni su u skladu sa Evropskom direktivom 2010/63/EU i etičkim smernicama Vodiča za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Odrasle zebrice (*Danio rerio*, divlji soj) čuvane su u ribljem medijumu na 28 °C, sa 14 sati svetlo/10 sati mrak ciklusima i redovno su hranjene dva puta dnevno komercijalnom suvom hranom (TetraMin™ flakes; Tetra, Melle, Nemačka) i jednom dnevno sa *Artemia nauplii*. Embrioni su dobijeni mrešćenjem, sakupljeni i raspoređeni u ploče sa 24 bunara (10 embriona po bunaru i 1 mL vode (0,2 g/L Instant Ocean® Salt u destilovanoj vodi). Ploče su inkubirane na 28 °C. Embrioni su 6 h posle fertilizacije (hpf) tretirani različitim koncentracijama jedinjenja **17 (JK141)** (2,5; 5; 10; 20; 30, 40 i 50 µM), hlorokin-difosfatom kao pozitivnom kontrolom i 0,1% DMSO kao negativnom kontrolom. Eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa 40 embriona za svaku koncentraciju jedinjenja. Apikalne tačke za procenu toksičnosti su zabeležene posle 24, 48, 72, 96 i 120 h pomoću invertnog mikroskopa (CKX41; Olympus, Tokio, Japan). Posle 120 h, embrioni su anestetizirani dodatkom 0,1% (w/v) rastvora trokaina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), fotografisani i uništeni zamrzavanjem na -20 °C ≥ 24 h. LC₅₀ vrednosti su izračunate korišćenjem programa ToxRatPro (ToxRat®, Software for the Statistical Analysis of Biotests, ToxRat Solution GmbH, Alsdorf, Germany, Version 2.10.05).

Određivanje toksičnosti u *in vivo* uslovima (model miša).

Eksperimenti na miševima su izvršeni u Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja, uz dozvolu Etičkog

saveta za rad sa eksperimentalnim životinjama (rešenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine br. 323-07-02444/2014-05/1). Toksičnost jedinjenja u *in vivo* uslovima ispitana je korišćenjem zdravih C57B1/6 miševa, koji su uzgajani u vivarijumu Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Prosečna masa miševa na početku eksperimenta bila je 19-21 g. Miševi su čuvani u odgovarajućim kavezima, izlagani prirodnoj svetlosti, uz uzimanje hrane i vode *ad libitum*. Jedinjenja su u dozi 2,5-600 mg/kg administrirana oralno (u vidu suspenzije 0,5%HEC/0,1%Tween 80 u vodi), intraperitonealno (PEG400/H₂O) ili supkutano (PEG400/H₂O). Ponašanje miševa je praćeno dva puta dnevno tokom 30 dana. Jedinjenje je definisano kao netoksično ukoliko svi miševi dožive 31. dan, bez ispoljavanja vidljivih znakova toksičnosti, kao što su nakostrešeno krzno, usporenost, letargija, odsustvo apetita, dijareja i slično.

***In vitro* HPLC proteolitički esej za određivanje inhibicije BoNT/A LC.**

Eksperiment je izvršen u United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID). Esej se radi u mikrotitar pločicama i koristi 2,5 mM osnovni rastvor 17-mer peptida (P39, acetil-SNKTRIDEANQRATKML-amid) u 50 mM HEPES na pH 7,4. Krajnja koncentracija inhibitora bila je 20 μM, dobijena razblaživanjem osnovnog rastvora koncentracije 120 μM u 50 mM HEPES pH 7,4. Neposredno pre eseja, LcA je razblažen na krajnju koncentraciju od 0,1 mg/mL u 50 mM HEPES pH 7,4 i čuvan na ledu. Krajnje koncentracije su bile: [LcA] = 1,95 μg/mL (20 nM), [BSA] = 0,2 mg/mL, [P39] = 0,25 mM, [Inhibitor] = 20 μM u ukupnoj zapremini od 30 μL. 5 μL radnog rastvora jedinjenja koncentracije 120 μM je termostatirano sa LcA i BSA u 50 mM HEPES 10 minuta na sobnoj temperaturi. Supstrat P39 je zatim dodat i smeša termostatirana još 10 minuta na 37 °C. Proizvodi hidrolize supstrata P39 su analizirani pomoću Shimadzu Prominence ultra-fast liquid chromatography (UFLC) XR sistem koji koristi Hypersil Gold Javelin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) C18 guard kolonu i Hypersil Gold (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) C18 reverzno-faznu analitičku kolonu (50 × 2,1 mm, 1,9 μm). Protok je iznosio 1 mL/min. Temperatura je održavana na 65 °C. Apsorbancija je praćena na talasnim dužinama 214 nm i 280 nm. Kao mobilna faza korišćeni su 0,05% trifluorsirćetna kiselina u vodi (A) i 50% acetonitril + 0,05% trifluorsirćetna kiselina (B). Retencionna vremena praćenih fragmenata bila su 0,9-1,1 min i 1,3-1,5 min.

Esej u motornim neuronima.

Eksperimenti su izvršeni u United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID). Korišćeni su motorni neuroni razvijeni iz embrionalnih matičnih ćelija miša (HBG3 ćelijska linija). Detalji postupka dobijanja motornih neurona nalaze se u prethodno objavljenoj literaturi.^{127,128} Za preintoksikacione eseje, motorni neuroni su raspoređeni u bunarčice mikrotitar pločice (12-well plate) i tretirani sa odgovarajućom koncentracijom inhibitora. Posle 30 minuta termostatiranja, dodat je holotoksin BoNT/A u koncentraciji 500 pM BoNT/A (MetaBiologics, Madison, WI). U slučaju postintoksikacionih eseja, motorni neuroni su prvo tretirani sa 500 pM BoNT/A, a zatim su 30 ili 60 minuta kasnije dodati inhibitori. U oba slučaja ukupno vreme termostatiranja je bilo 4 h na 37 °C u atmosferi 5% CO₂. Ćelije su potom dobro isprane PBS-om, a liziranje je izvršeno pomoću NP-40 pufera. Procenat hidrolize SNAP-25 kvantifikovan je pomoću Western blot tehnike korišćenjem SNAP-25 antitela koja detektuju netaknuti SNAP-25, ali i hidrolizovani ostatak.^{37,38} Ukratko, ćelijski lizati su obrađeni, postavljeni na 12% Tris-glicin gelove (Invitrogen, #XP00125), pa proteini preneti na nitroceluloznu membranu. Membrane su blokirane pomoću 5% nemasnog mleka tokom 1 h, a potom termostatirane preko noći na 4 °C sa primarnim antitelima za GAPDH (Millipore, #MAB374) i SNAP-25 (BioLegend, SMI-81, #836304) u TBST puferu koji sadrži 5% mleka. Za detekciju signala korišćena su sekundarna antitela konjugovana za peroksidazu rena (HRP, Millipore). Western blot je vizualizovan pomoću Pierce ECL Western kita za detekciju.

Ispitivanje ADMET osobina jedinjenja 17 (JK141).

Eksperimenti su izvršeni u Department of Defense, ADMET Center USAMRICD, Gunpowder, Maryland.

Spektrofluorimetrijsko određivanje konstante vezivanja 17 (JK141) za HSA i AGP.¹⁶⁵

Humani serum albumin (HSA), kiseli α -1 glikoprotein (AGP), kalijum-dihidrogenfosfat, natrijum-hidrogenfosfat, natrijum-hlorid, kalijum-hlorid, DMSO i ANS su kupljeni od Sigma Aldrich. Fluorescentni spektri su snimani u kvarcnoj kivetici (dužine optičkog puta 1 cm i zapremine 4 mL) na Horiba Jobin Yvon Fluoromax-4 spektrometru, opremljenim

Peltier-ovim elementom i magnetnom mešalicom za kivetu. UV-Vis spektri su snimani na Thermo scientific evolution 60 s spektrofotometru u kvarcnoj kiveti (dužine optičkog puta 1 cm i zapremine 4 mL) u oblasti 200-500 nm, brzinom snimanja od 500 nm/min i uz odgovarajuću slepu probu. pH Vrednosti rastvora su merene pomoću Crison pH-Burette 24 2S opremljenom kombinovanom mikro pH elektrodom (Crison pH electrode 50 29). pH Elektroda je kalibrisana pomoću standardnih rastvora Crison pufera (pH 4,01; 7,00 i 9,21). Osnovni rastvori AGP ($c=6,05 \times 10^{-5}$ M) i HSA ($c=1,91 \times 10^{-4}$ M) su pripremljeni u PBS (1X, pH 7,34) i čuvani u frižideru. Osnovni rastvor **17 (JK141)** ($c=4,28 \times 10^{-4}$ M) je pripremljen u DMSO. Za određivanje vezivanja **17 (JK141)** za HSA i AGP, rastvori proteina ($c=5 \times 10^{-7}$ M) su sveže pripremljeni od osnovnog rastvora dodatkom pufera. Rastvor HSA/AGP je titrovan rastvorom **17 (JK141)**. Tokom titracije rastvori su mešani i termostatirani ($t=25,0 \pm 0,1$ °C). Vreme između dodatka inkremenata je bilo 10 minuta. Talasna dužina ekscitacije je bila 280 nm, sa otvorom izvora 5 nm; emisioni spektri su snimani u oblasti talasnih dužina 300-450 nm, sa otvorom detektora 5 nm i vremenom integracije 0,1 s. Pozadinski signal PBS je korigovan u svakom spektru. Intenziteti fluorescencije su korigovani za efekat samogašenja merenjem apsorbancije na talasnoj dužini ekscitacije i emisije.¹³⁵ Za eksperiment sa ANS-om, u kvarcnu kivetu za spektrofluorimetar odmereno je 3,000 mL rastvora fosfatnog pufera ($c^{\text{tot}}=30$ mM, $I=0,1$ M, pH 7,36), 8,36 μ L rastvora HSA ($c=1,80 \times 10^{-4}$ M) i 1,44 μ L ANS ($c=1,04 \times 10^{-3}$ M). Koncentracije HSA i ANS-a u kiveti: $c=5 \times 10^{-7}$ M (molski odnos HSA/ANS 1:1). Rastvor je mešan na magnetnoj mešalici 10 minuta na $25,0 \pm 0,1$ °C. Zatim je titrovan sa rastvorom **17 (JK141)** koncentracije $4,28 \times 10^{-4}$ M u alikvotima od po 0,7-2,1 μ L. Posle svakog dodatka **17 (JK141)** i 10 minuta mešanja snimljeni su fluorescentni spektri u opsegu talasnih dužina 400-550 nm. Talasna dužina ekscitacije je iznosila 370 nm (Širina razreza na ekscitacionom monohromatoru: 5 nm, širina razreza na emisionom monohromatoru: 5 nm). UV/VIS spektri su snimani u oblasti talasnih dužina 200-500 nm, brzinom skeniranja od 500 nm/min.

Hromatografsko određivanje procenta vezivanja **17 (JK141) za HSA i AGP.**¹⁶⁵

Eksperimenti su izvršeni u Bio-mimetic Chromatography, Hertfordshire, United Kingdom. Za određivanje vezivanja za AGP korišćena je kolona 150×3 mm (Chiral Technologies Ltd) sa stacionarnom fazom za koju je hemijski vezan AGP. Kao mobilna

faza korišćen je izopropanol/acetatni pufer pH=7,4 (gradijent 0 do 35 % izopropanola tokom 3,5 minuta).¹⁶⁶

Za određivanje vezivanja za HSA takođe je korišćena kolona 150 × 3 mm (Chiral Technologies Ltd) sa stacionarnom fazom za koju je hemijski vezan HSA. Korišćen je izopropanolni gradijent 0-40% tokom 3,5 minuta, po postupku koji je opisan u literaturi.¹⁶⁷ Rezultati su dobijeni analiziranjem odgovarajućih UV spektara.

Uticao vezivanja jedinjenja 17 (JK141) na promenu sekundarne strukture HSA pomoću FTIR.^{168,169}

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom sa umanjenom ukupnom refleksijom (engl. attenuated total reflectance - ATR) i rezolucijom 2 cm⁻¹ rađena je na instrumentu Nicolet 6700 FT-IR sa softverom OMNICS verzija 7,0 (Thermo Scientific, SAD). Pripremljeni su početni rastvori Tris pufera ($C_{\text{tris}}=30$ mM; $C_{\text{NaCl}}=120$ mM; pH=7,37), HSA/Tris ($C_{\text{HSA}}=1,35 \times 10^{-5}$ M) i **17(JK141)**/DMSO/Tris ($C_{\text{JK141}}=9,40 \times 10^{-4}$ M). Radne koncentracije rastvora su iznosile: $C_{\text{HSA}}=5 \times 10^{-6}$ M, $C_{\text{JK141}}=5,00 \times 10^{-6}$ M (1 ekv), $C_{\text{JK141}}=2,50 \times 10^{-5}$ M (5 ekv) i $C_{\text{JK141}}=5,01 \times 10^{-5}$ M (10 ekv). Na postolje za snimanje spektara sa dijamantskim kristalom (Smart Orbit, Thermo Scientific, USA) nanošeno je 2 µL rastvora uzorka, a zatim rastvarač uparavan pod strujom azota sve do dobijanja tankog ATR filma. Za svaki spektar sakupljeno je po 64 snimka. Spektri su korigovani i obrađeni u softveru OMNICS da bi se uklonio šum (za faktor 6,750 cm⁻¹). Takođe je urađena i automatska korekcija za dijamantski kristal.

Određivanje kiselinskih konstanti (pK_a vrednosti).

Kiselinske konstante za jedinjenja **91-93** su određene potenciometrijski u rastvoru MeOH:H₂O (1:1, v:v) na temperaturi 25±1 °C i pri konstantnoj jonskoj sili ($I = 0,1$ M, NaCl). Rastvori NaOH (0,1102 M) i HCl (0,1229 M) su pripremljeni u MeOH:H₂O (1:1, v:v). Jedinjenje je rastvoreno u metanolu, a zatim razblaženo istom zapreminom 0,2 M vodenog rastvora NaCl ($c = (0,5-0,7) \times 10^{-3}$ M). Neposredno pre titracije, 100 µL 0,1229 M rastvora HCl je dodato u 4,00 mL rastvora jedinjenja. Titracija je vršena sa po 2-3 µL 0,1102 M rastvora NaOH (opseg pH 1,8-12,2). U slučaju jedinjenja **17 (JK141)**, koncentracija jedinjenja je iznosila $c = 4,483 \times 10^{-4}$ M, koncentracija HCl 0,1181 M, a koncentracija NaOH 0,0764 M. Vrednosti pK_a su dobijene kao srednja vrednost pet

nezavisnih eksperimenata, korišćenjem programa HyperQuad 2008.¹⁷⁰ Dobijene vrednosti pK_a pri jonskoj sili 0,1 M i u sistemu MeOH/H₂O korigovane su na vrednosti u čistoj vodi pri nultoj jonskoj sili kalibracijom sistema elektroda - pH-metar - titrator Granovom metodom.

Određivanje rastvorljivosti 17 (JK141) *shake-flask* metodom.

Pripremljene su 3 probe zasićenog rastvora **17 (JK141)** tako što je supstanca u višku ($m=1,0\pm 0,1$ mg) dodata u po 1,00 mL TBS (pH 7,31; 30 mM Tris; 0,15 M NaCl). Uzorci su mešani i termostatirani ($t=25\pm 1^\circ\text{C}$) u staklenim posudama tokom ~16 h. Posle mešanja, probe su stajale ~12 h da se talog slegne, a zatim je centrifugiranjem odvojen višak čvrste supstance. Koncentracija **17 (JK141)** u supernatantu je određena spektrofotometrijski. Rastvori za kalibracionu pravu ($c = (0,5-3,0)\times 10^{-5}$ M) pripremljeni su od osnovnog rastvora **17 (JK141)** u MeOH ($c = 3,67\times 10^{-4}$ M) tako da ukupna zapremina MeOH u TBS nije prelazila 8% (v). UV/Vis spektri su snimljeni na Thermo scientific spektrofotometru u opsegu talasnih dužina 220–600 nm. Za korekciju bazne linije korišćeni su spektri rastvora TBS.

Određivanje $\log D$ *shake-flask* metodom.¹⁷¹

Metanol i 1-oktanol su kupljeni od Sigma Aldrich. Za pripremu osnovnog rastvora za konstruisanje kalibracione prave odmereno je 0,65 mg **17 (JK141)** i rastvoreno u 2,500 mL metanola ($c = 3,67\times 10^{-4}$ M). Radni rastvori napravljeni su u TBS puferu (Tris Buffered Saline), pH=7,31. Koncentracije radnih rastvora su bile $0,50\times 10^{-5}$ M; $1,00\times 10^{-5}$ M; $1,50\times 10^{-5}$ M; $2,00\times 10^{-5}$ M i $3,00\times 10^{-5}$ M (zapreminski udeo metanola iznosio je 1,34-7,56%). UV/Vis spektri su snimani u oblasti talasnih dužina 220-500 nm, a merenja su izvedena na talasnim dužinama 341,4 nm i 329,7 nm. Zatim su izvedene 2 serije proba, tako što je u prvoj seriji zapreminski odnos oktanela i TBS pufera bio 0,033, a u drugoj 0,025. Prva serija (3 probe): za pripremu osnovnog rastvora odmereno je 0,90 mg **17 (JK141)** i rastvoreno u 0,500 ml oktanela zasićenog TBS puferom, pH = 7,31 ($c = 0,0025$ M). 100,0 μL ovog rastvora je mućkano sa 3,000 ml TBS pufera (prethodno zasićenog oktanolom) tokom 20 h na $25\pm 1^\circ\text{C}$, a nakon mućkanja rastvori za snimanje su razblaženi 3 puta. Druga serija (3 probe): za pripremu osnovnog rastvora odmereno je 0,70 mg **17 (JK141)** i rastvoreno u 0,400 mL oktanela zasićenog TBS

puferom pH = 7,31 ($c = 0,0025$ M). 75,0 μ L ovog rastvora je mućkano sa 3,000 mL TBS pufera (prethodno zasićenog oktanolom) 20 h na 25 ± 1 °C, a nakon mućkanja rastvori za snimanje su razblaženi 2 puta. Rezultati za $\log D$, kao i srednja vrednost sa standardnom devijacijom na talasnoj dužini od 341,4 nm i 329,7 nm, izraženi su kao srednja vrednost 12 nezavisnih eksperimeneta.

Određivanje $\log D$ reverzno-faznom tankoslojnom hromatografijom.¹⁷²

Korišćena je vertikalna kada dimenzija 10x10cm (Camag, Muttenz, Switzerland). Standardi i ispitivane supstance su hromatografisani korišćenjem komercijalno dostupne stacionarne faze RP-18 W F254s (Art. 13124, Merck, Darmstadt, Germany) i mobilne faze koja se sastojala od acetona/NH₃/H₂O (85/5/10) ili metanola/HCl (70/30). Sve supstance su rastvorene u vodi. 0,5 mL rastvora $c \sim 1$ mg/mL je naneto na pločicu. Detekcija je izvršena korišćenjem UV lampe 254 nm. Svi eksperimenti su izvršeni na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C). Particioni koeficijenti standarda su korelisani sa R_M vrednostima za 1,4-naftohinon (-0,52), 3-nitrobenzaldehyd (-0,52), hlorokin (0,55), 4-bromanilin (-0,43), hidrohion (-0,87), 2-tiofenkarbaldehyd (-0,60), 2-bromtiofen (-0,31), AQ2 (-0,33), AQ3 (-0,14), difenilamin (-0,07), *p*-anizidin (-0,58) i fluoren (0,05). $R_M = 0,288 - 0,934 \log D$; $R^2 = 0,925$; $N = 15$, $SD = 0,145$; $P < 0,0001$. $\log D$ vrednosti ispitivanih supstanci su izračunate iz kalibracione prave dobijene na ovaj način.

***In vivo* farmakokinetička analiza.**

Eksperimenti na miševima su izvršeni u Laboratoriji za parazitologiju Instituta za medicinska istraživanja, uz dozvolu Etičkog saveta za rad sa eksperimentalnim životinjama (rešenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine br. 323-07-02444/2014-05/1). Analiza uzoraka je izvršena u Odeljenju za instrumentalnu analizu, IHTM. Korišćeni su C57Bl/6 miševi, na koje je primenjen isti tretman kao i u slučaju eksperimenata toksičnosti. Jedinjenje **17 (JK141)** je rastvoreno u DMSO, a zatim suspendovano u 0,5% HEC – 0,1% Tween 80 u vodi (za oralnu administraciju) ili u smeši PEG400/voda (za intraperitonealnu i supkutanu administraciju). Krv je vađena iz srca miševa, prethodno anestetiziranih pomoću hloroforma. Uzorci su momentalno centrifugirani i serum čuvan na -20 °C do trenutka analize. Ukupna koncentracija jedinjenja u serumu je određena posle precipitacije

proteina acetonitrilom (50 μ L uzorka i 100 μ L acetonitrila). Uzorci su držani na vorteksu 15 sekundi i u ultrazvučnom kupatilu 30 minuta. Posle centrifugiranja (10 minuta, 13400 rpm), supernatant je analiziran na UPLC/MS-MS. Za određivanje koncentracije slobodnog **17 (JK141)**, korišćen je metod ultracentrifugiranja. 150 μ L uzoraka mišjih seruma su centrifugirani na Beckman Coulter ultracentrifugi (rotor tip SW55 Ti, 25 000 rpm, 24 h, 4 °C, 0,8 mL kivete). Mišji serum je razdvojen u tri sloja i 30 μ L transparentnog srednjeg sloja je izvučeno pomoću šprica i injektovano u UPLC-MS/MS. Kalibracione krive su pripremljene korišćenjem humanog seruma koji je prikupljen od zdravih volontera i čuvan u frižideru do trenutka analize. U slučaju određivanja ukupne koncentracije, osnovni rastvor **17 (JK141)** je pripremljen u DMSO, a radni rastvori napravljeni u humanom serumu od osnovnog rastvora. Sveže pripremljeni rastvori su zatim termostatorirani 30 minuta na 37 °C i tretirani acetonitrilom na isti način kao i uzorci iz miša. Za određivanje koncentracije slobodnog **17 (JK141)**, radni rastvori su napravljeni u supernatantu koji zaostaje posle ultracentrifugiranja humanog seruma pod istim uslovima kao kod uzoraka iz miševa. Koncentracije jedinjenja u mišjem serumu su određene pomoću Waters Acquity UPLC H-Class (WAT-176015007) (Milford, MA, USA) sa Poroshell 120 EC-C18 kolonom (4.6 \times 50mm, 2.7 μ , S.N. USCFU07797) i masenim detektorom (Waters TQ (Tandem Quadrupole, WAT-176001263)). Korišćen je SIR metod (single ion recording experiment), uz praćenje tri jona: $[M+H]^{1+}$ (709), $[M+2H]^{2+}$ (355) i $[M+3H]^{3+}$ (237). Temperatura kolone je održavana na 40 °C. Protok mobilne faze bio je 0.3 mL/min. Mobilnu fazu sačinjavala je 0,2% mravlja kiselina u ultračistoj vodi (TKA Germany MicroPure sistem za prečišćavanje vode, 0,055 μ S/cm) (rastvarač A) i acetonitril (rastvarač B), po sledećem gradijentu: 0-2 min 5%B, 2-8 min 5%B \rightarrow 95%B, 8-12 min 95%B, 12-12,5 min 95%B \rightarrow 5%B, 12,5-15 min 5%B. Injekciona zapremina bila je 10 μ L. Za detekciju ukupne koncentracije limit detekcije (LOD) bio je 1 μ g/mL (S/N > 3:1), a limit kvantifikacije (LOQ) 2 μ g/mL (S/N \geq 10:1).

***In vitro* antimalarijska aktivnost prema aseksualnoj formi parazita.**

Eksperimenti su izvršeni u Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), Silver Spring, USA. Korišćen je Malaria SYBR Green I - Based Fluorescence (MSF) esej,¹⁷³ koji se izvodi u mikrotitar pločama i meri količinu malarijske DNK u prisustvu jedinjenja, tako što dolazi do interkalacije SYBR Green I boje u DNK parazita.

Rezultujuća fluorescencija odgovara broju parazita. Korišćeni su sledeći *P. falciparum* sojevi: D6 (CDC/Sierra Leone), TM91C235 (WRAIR, Thailand) i W2 (CDC/Indochina III). Jedinjenja su testirana u opsegu koncentracija 0,5 – 10000 ng/ml. Kao kontrolno jedinjenje korišćeni su hlorokin i meflokin. Mikrotitar pločice su popunjavane automatski pomoću Tecan Freedom Evo liquid handling system (Tecan US, Inc., Durham, NC) instrumenta. Bunarčići mikrotitar pločica su prvo tretirani rastvorima ispitivanih i kontrolnih jedinjenja, zatim su dodati paraziti *P. falciparum* sojeva u formi kasnih prstenova ili ranih trofozoita (parazitemija 0,3%; hematokrit 2%) i termostatirani na 37 °C u atmosferi 5% CO₂, 5% O₂ i 90% N₂, tokom 72 h. Zatim su dodati 20 mM Tris HCl, 5mM EDTA, 1,6% Triton X, 0,016% saponin i SYBR green I boja (Invitrogen, Catalog #S-7567). Posle termostatiranja na sobnoj temperaturi 24 h, merena je relativna fluorescencija pomoću Tecan Genios Plus (Tecan US, Inc., Durham, NC). IC₅₀ vrednosti su generisane pomoću GraphPad Prism programa (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA) korišćenjem nelinearne regresije (sigmoidal dose-response/variable slope).

***In vitro* antimalarijska aktivnost prema seksualnoj formi parazita.**

Eksperimenti su izvršeni u laboratoriji prof. dr Donatelle Taramelli, Univerziteta u Milanu. Kultura gametocita je održavana po protokolu opisanom u literaturi.¹⁷⁴ U svim eksperimentima je korišćen transgenski soj 3D7-CBG99,¹⁷⁵ koji eksprimira CBG99 luciferazu pod kontrolom gametocit-specifičnog pfs16 promotora. Aktivnost luciferase je uzeta kao mera vijabilnosti gametocita. Metilensko plavo je korišćeno kao pozitivna kontrola. IC₅₀ vrednosti su dobijene nelinearnom regresijom korišćenjem programa software Gen5 1.10, Synergy4 plate reader, Biotek.

Određivanje inhibicije građenja β-hematina.

Korišćen je postupak koji je opisan od strane Taramelli i saradnika.¹⁷⁶ Rezultati su izraženi kao molarni ekvivalenti jedinjenja u odnosu na hemin koji vrše inhibiciju građenja β-hematina 50%. 50 μL 16 mM rastvora hemina u DMSO je raspoređeno u ependorf-tube od 1,5 mL. 80 mM rastvor jedinjenja u DMSO je zatim dodat u opsegu 0,125-5 molskih ekvivalenata. Čist DMSO je dodat umesto jedinjenja u kontrolne uzorke. Zatim je u svaku tubu dodato 100 μL vode (TKA Germany MicroPure sistem za

prečišćavanje vode, 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Formiranje β -hematina je inicirano dodatkom 200 μL 8 M acetatnog pufera (pH=5,2). Koncentracija DMSO je bila 25%. Uzorci su termostatorani na $37,0 \pm 0,1$ °C tokom 18 h, a zatim centrifugirani. Zaostali talog je resuspendovan u 0,5 mL DMSO, kako bi se odstranio neizreagovani hematin. Uzorci su ponovo centrifugirani, supernatant odbačen, a talog (β -hematin) rastvoren u 1 mL 0,1 M NaOH. Alikvoti od po 10 μL su prebačeni u bunarčice mikrotitar pločice (sa 96 bunarčica). Dodato je 190 μL 0,1 M NaOH. 200 μL 0,1 M NaOH je korišćeno kao kontrola. ApSORBancija je merena na 405 nm, sa korekcijom na 670 nm. Kalibraciona kriva je konstruisana od rastvora hemina u 0,1 M NaOH u opsegu $0,4\text{-}4,0 \times 10^{-5}$ M.

Određivanje antimalarijske aktivnosti u *in vivo* uslovima.

Benzotiofenski derivati aminohinolina testirani su u modelu eksperimentalne malarije miša, korišćenjem modifikovanog Thompson-ovog testa. Eksperimenti su izvršeni u Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja, uz dozvolu Etičkog saveta za rad sa eksperimentalnim životinjama (rešenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine br. 323-07-02444/2014-05/1). Korišćeni su miševi soja C57Bl/6 koji je osetljiv na infekciju *P. berghei*, na koje je primenjen isti tretman kao i u slučaju ispitivanja toksičnosti. Grupama od po pet miševa su intraperitonealno ubrizgani *P. berghei* (ANKA soj) eritrociti nultog dana. Jedinjenja su suspendovana u smeši 0,5% hidroksietilceluloze i 0,1% Tween 80 u vodi i administrirana oralno jednom dnevno (tokom 3 ili 4 dana), počevši od trećeg dana posle infekcije. Krvni razmaz uziman je 0, 3, 6, 7, 10, 11, 14, 17, 18, 21, 24, 25, 28 i 31 dana posle infekcije radi određivanja nivoa parazitemije. Miševi koji su doživeli 31. dan bez parazitemije smatraju se izlečenim. Za dodatnu potvrdu u određenim grupama je ovo potvrđivano i detekcijom parazitske DNK (qPCR).

Ekstrakcija genomske DNK i qPCR analiza.¹³⁹

Eksperimenti su izvršeni u Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja. Genomska DNK (gDNK) je izolovana iz krvi i jetre miševa korišćenjem DNeasy kita (Qiagen) prema uputstvima proizvođača. Miševi koji su preživeli 31 dan bez parazitemije su žrtvovani. Izvađene su im jetre i

300-500 μL krvi iz srca. Jetre su isprane sa dPBS i mehanički homogenizovane, a zatim podvrgnute digestiji uz pomoć proteinaze K. Oko 100 μL uzoraka je propuštanu kroz kolonu za ekstrakciju gDNK. Real time PCR: Ukratko, prajmeri i odgovarajuća TaqMan proba umnožavaju i detektuju visoko konzervirani region 18S rRNK gena roda *Plasmodium*. Korišćeni su sledeći prajmeri: uzvodni Plasmo 1: 5' - GTTAAGGGAGTGAAGACGA TCAGA-3' i nizvodni Plasmo 2: 5' - AACCCAAAGACTTTGATTTTC TCATAA-3' i TaqMan proba: 5'-FAM-ACCGTCGTAA TCTTAACCAT AAACCTATGCC GACTAG-TAMRA-3'. Komponente neophodne za jednu reakciju (20 μL): 1X MaximaProbe qPCR Mastermix (Thermo Fisher Scientific), 200 nM svakog prajmera, 50 nM probe, 1U UNG (Thermo Fisher Scientific) i 3 μL ciljne gDNK. Korišćeni su sledeći uslovi: 50 °C tokom 2 min, 95 °C tokom 10 min, 45 ciklusa na 95 °C tokom 15 s, 60 °C tokom 1 min. PCR eksperiment je izvršen na StepOne Plus instrumentu (Applied Biosystems). Uzorci kod kojih je $C_t \geq 40$ (C_t , pragovni ciklus) su smatrani negativnim. Kao pozitivna kontrola korišćena je *P. berghei* gDNK, a kao negativna kontrola korišćena je voda.

Molekulsko modelovanje.

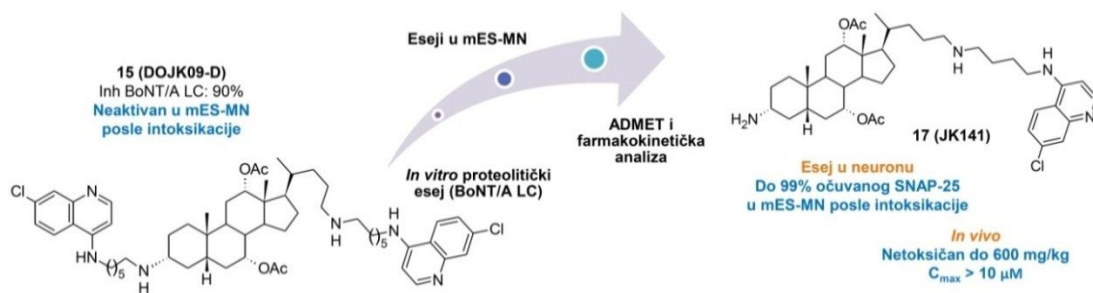
Sve strukture liganada su nacrtane, njihova geometrija optimizovana i određeno njihovo stanje jonizacije u modulima Schrödinger Suite 2016-4 (Schrödinger, LLC: New York, NY, 2016) na način opisan ranije.¹⁰¹ Simulacija vezivanja liganada je izvedena koristeći grid doking iz modula Glide (Glide, Schrödinger, LLC: New York, NY, 2017), uz standardnu preciznost i fleksibilan ligand, bez dodatnih ograničenja. Molekulsko modelovanje je vršeno u pH opsegu $7,0 \pm 1,0$, što odgovara pH vrednosti *in vitro* eksperimenata (pH 7,3). Strukture BoNT/A LC i vezivnog mesta odgovaraju strukturama u prethodno spomenutoj publikaciji.¹⁰¹

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije sintetisana su 44 nova benzotiofenska i 12 novih steroidnih derivata aminohinolina i ispitana njihova sposobnost da vrše inhibiciju botulinum neurotoksina tipa A i inhibiciju proliferacije parazita *Plasmodium falciparum*. Najaktivnija jedinjenja podvrgnuta su ispitivanju toksičnosti u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

Na osnovu ranije predloženog modela uklapanja inhibitora u aktivno mesto kratkog niza BoNT/A,¹⁰¹ izvršen je dizajn novih steroidnih i benzotiofenskih derivata aminohinolina. Strukturna raznovrsnost (različiti supstituenti na benzotiofenskom i aminohinolinskom jezgru, kao i različita struktura mosta) i rezultati *in vitro* aktivnosti prema BoNT/A LC, omogućili su SAR analizu u okviru svake pojedinačne grupe aminohinolinskih derivata. *In vitro* proteolitički esej koji koristi kratki niz BoNT/A upotrebljen je za prvobitnu selekciju jedinjenja. Steroidni derivati aminohinolina su se pokazali kao bolji inhibitori BoNT/A LC od benzotiofenskih derivata, sa procentom inhibicije 37-85% vs 3-84% pri koncentraciji 20 μ M. Kao logičan naredni korak, 8 steroidnih i 7 benzotiofenskih najaktivnijih derivata testirano je u ćelijskoj kulturi, jer se na taj način vrši simulacija kompletnog procesa intoksikacije. Umesto samo kratkog niza, u ovom eseju korišćen je holotoksin, a procenat očuvanog SNAP-25 uziman je kao mera aktivnosti jedinjenja u mES-MN. U preintoksikacionom modelu, i steroidni i benzotiofenski derivati aminohinolina su ostvarili visok procenat zaštite SNAP-25, do 88% i 68%. Šest steroidnih i jedan benzotiofenski derivat, koji su prošli prvobitnu selekciju, dodati su ćelijskoj kulturi 30/60 minuta posle holotoksina, da bi se ispitao njihov potencijal da se koriste u terapeutske svrhe. Steroidni derivat **17 (JK141)**, sa 99% zaštite SNAP-25 kada se primeni 30 minuta posle intoksikacije pri koncentraciji 20 μ M izdvojio se, ne samo u odnosu na ostale derivate prikazane u ovoj disertaciji, već i u odnosu na sve ostale male molekule do sada poznate u literaturi, kojima je ispitana aktivnost prema BoNT/A u različitim ćelijskim kulturama, o čemu je bilo reči u poglavlju 2.1.2.4. Aktivnosti jedinjenja prema BoNT holotoksinu u motornim neuronima, koje su u dobroj saglasnosti sa rezultatima dobijenim u *in vitro* proteolitičkom eseju, predstavljaju dobru osnovu za tvrdnju da novosintetisani derivati,

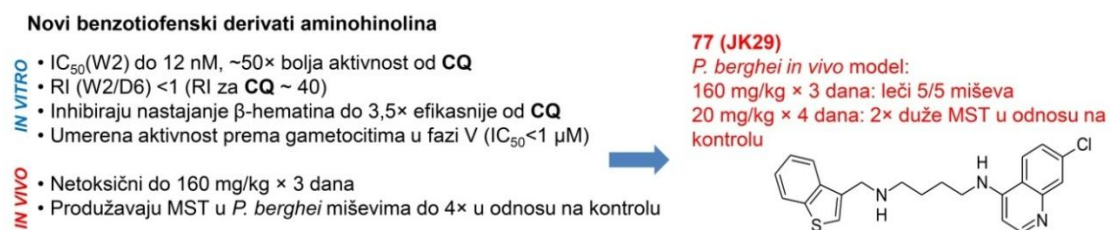
obrađeni u okviru ove disertacije, imaju sposobnost ulaska u ćeliju gde se ponašaju kao inhibitori BoNT/A LC. Osim toga, dobra korelacija između rezultata postignutih u *in vitro* esejima i u neuronima, omogućila je detaljniju SAR analizu. U najranijim fazama razvoja nekog leka, ispitivanje i optimizacija fizičko-hemijskih osobina (poput lipofilnosti) i ADMET osobina je od izuzetne važnosti. Jedinjenje **17 (JK141)** je u izvršenim *in vitro* esejima pokazalo izvrsne karakteristike, kojima bi se postigla odgovarajuća permeabilnost, rastvorljivost, stabilnost i bioraspoloživost u *in vivo* uslovima. Izvršena je detaljna farmakokinetička analiza jedinjenja u modelu miša. Iako nije postignuta željena koncentracija jedinjenja u serumu, činjenica da je ovo prvi primer malih molekula koji se ponašaju kao inhibitori kratkog niza BoNT/A, aktivnih u mES-MN kada se primene posle intoksikacije, upućuje na značaj daljeg unapređenja ovih struktura (slika 68). Od izuzetne važnosti je napomenuti i da je prikazano jedinjenje **17 (JK141)** pokazalo značajno bolju aktivnost u odnosu na dosadašnje aminohinolinske derivate opisane u okviru iste istraživačke grupe. Dodatno, detaljna farmakokinetička analiza koja je izvršena za ovo jedinjenje predstavlja značajan doprinos u polju razvoja novih inhibitora botulinum neurotoksina, imajući u vidu da je do sada ovakva studija sprovedena samo za nekoliko jedinjenja koja su podvrgnuta *in vivo* ispitivanju, o čemu je bilo reči u poglavlju 2.1.2.6.



Slika 68. Pojednostavljene strukture bis-aminohinolinskog derivata steroida koje je dovelo do inhibitora BoNT/A LC aktivnog u neuronima (mES-MN) posle intoksikacije

U drugom delu disertacije, ispitana je *in vitro* antimalarijska aktivnost svih sintetisanih benzotiofenskih derivata aminohinolina prema aseksualnim formama tri *Plasmodium falciparum* soja (D6, W2, TM91C235). Uopšteno govoreći, derivati su pokazali bolju aktivnost u odnosu na standardni lek hlorokin, ukazujući na značajan

doprinos benzotiofenskog jezgra dobro poznatoj antimalarijskoj aktivnosti aminohinolina. Sva jedinjenja su ostvarila indeks rezistencije niži od hlorokina, dok je nekoliko derivata pokazalo $RI < 1$. U BHIA eksperimentu, jedinjenja su se pokazala do 3,5 puta aktivnija od hlorokina. Osim toga, nekoliko derivata je pokazalo umerenu aktivnost prema gametocitima u fazi V *Plasmodium falciparum* soja 3D7, što ukazuje na potencijal ovih jedinjenja da se koriste za suzbijanje proliferacije *Plasmodium* parazita u više faza ciklusa. Jedinjenja su se pokazala kao netoksična u *in vivo* uslovima u visokoj dozi (160 mg/kg/dan \times 3 dana). U modelu eksperimentalne malarije miša, benzotiofenski derivati aminohinolina su doveli do produžetka srednjeg vremena preživljavanja do četiri puta u odnosu na inficirane nelečene kontrolne miševе. Na kraju, istraživanje u okviru ove doktorske disertacije dovelo je do otkrića jedinjenja **77 (JK29)**, koje je u dozi 160 mg/kg/dan \times 3 dana omogućilo izlecenje 5/5 miševa inficiranih parazitima *P. berghei*, dok je u niskoj dozi (20 mg/kg \times 4 dana) produžilo srednje vreme preživljavanja dva puta u odnosu na kontrolu (slika 69).



Slika 69. Antimalarijska aktivnost novih benzotiofenskih derivata aminohinolina

6. CONCLUSION

Herein we report on the synthesis of 44 new benzothiophene and 12 new steroidal derivatives of aminoquinoline and the evaluation of their biological activities as inhibitors of BoNT/A and inhibitors of *Plasmodium falciparum* parasite proliferation. The most active derivatives were also examined for their *in vitro* and *in vivo* toxicity.

We designed our new steroidal and benzothiophene derivatives of aminoquinoline according to previously published model for docking of small molecule inhibitors in BoNT/A LC active site.¹⁰¹ The results of the *in vitro* activities against BoNT/A LC for structures with different substituents on the benzothiophene and aminoquinoline moiety, as well as diverse structures of the linker, enabled SAR studies within each series of aminoquinoline derivatives. *In vitro* proteolytic assay on BoNT/A LC was used for primary screening of the compounds. Steroidal derivatives of aminoquinoline proved to be better inhibitors of BoNT/A LC than benzothiophene derivatives, with 37-85% and 3-84% of BoNT/A LC inhibition at 20 μ M, respectively. As a logical step in further investigation of drugs' anti-BoNT/A potential, 8 steroidal and 7 benzothiophene derivatives that proved to be the most active were evaluated in the cell-based assays, since they mimic the whole intoxication process. Instead of BoNT/A LC, this assay uses BoNT/A holotoxin, and the percent of intact SNAP-25 was used as a measure of activity of compounds in mES-MNs. In preexposure model, both steroidal and benzothiophene derivatives showed remarkable activities and protected SNAP-25 from cleavage up to 88% and 68%, respectively. Using 30/60 minutes post-exposure model, 6 steroidal and 1 benzothiophene derivative were examined for their potential to be used for therapeutic purposes. Steroidal derivative **17 (JK141)** with 99% of protected SNAP-25 when administered 30 minutes post-intoxication at 20 μ M highlighted, not only compared to other derivatives in this dissertation, but also compared to other small molecule inhibitors known in literature, which were examined in various cell cultures, discussed in chapter 2.1.2.4. Activities of compounds in mES-MNs which are in good correlation with results obtained in *in vitro* proteolytic assay, indicate that newly synthesized molecules have the ability to enter the neurons thereby acting as BoNT/A LC inhibitors. Moreover, good correlation between results obtained *in vitro* and in motor neurons, enabled more detailed SAR analysis. In the early stages

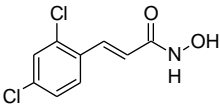
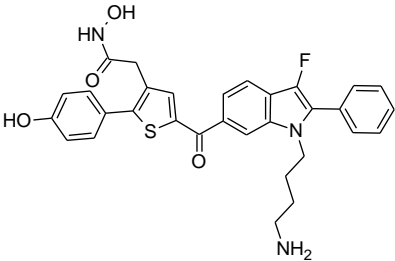
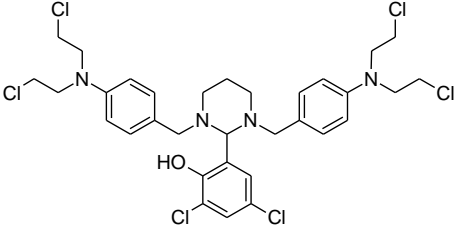
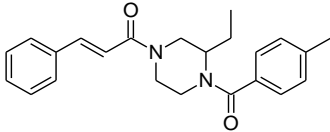
of drug discovery, the optimization of physicochemical properties (e.g. lipophilicity) and ADMET properties is of significant importance. In these *in vitro* assays, compound **17 (JK141)** obtained remarkable characteristics, suggesting the great chance of obtaining the proper balance among permeability, solubility, stability and bioavailability in *in vivo* conditions. Detailed pharmacokinetic analysis of compound **17 (JK141)** in mice was performed. Although adequate drug levels in mice serum were not achieved, the fact that this is the first example of LC inhibitors antagonizing BoNT intoxication in mES-MNs in a postexposure model, strongly supports further work in this series. The importance of this work also lies in the discovery of much more efficient BoNT/A inhibitor compared to other aminoquinoline derivatives reported by the same research group. Moreover, detailed pharmacokinetic study that was performed represents significant contribution in the field of new BoNT/A inhibitors, since such analysis was done only for few compounds that were subjected to *in vivo* evaluation (see Chapter 2.1.2.6.).

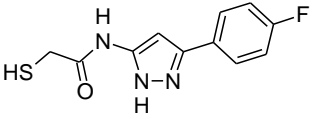
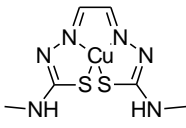
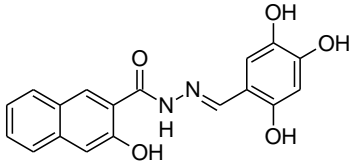
In the second part of this dissertation, all synthesized benzothiophene derivatives of aminoquinoline were examined for their *in vitro* antimalarial activity against asexual forms of three *P. falciparum* strains (D6, W2, TM91C235). In general, these derivatives showed improved activities than standard drug **CQ**, signifying the important contribution of benzothiophene moiety on already well known antimalarial activity of aminoquinolines. All compounds demonstrated resistance index lower than **CQ**, while few derivatives showed $RI < 1$. In BHIA experiment, compounds proved to be up to 3.5 times more active than **CQ**. Besides, few derivatives showed moderate activities against stage V gametocytes of *P. falciparum* 3D7 strain, indicating the potential of these derivatives to be used in several phases of the parasite cycle. At the highest applied dose (160 mg/kg/day \times 3 days), compounds proved to be non-toxic *in vivo*. Examined in mice infected with *P. berghei*, benzothiophene derivatives of aminoquinoline prolonged mean survival time up to four times compared to infected control. The research conducted in this doctoral dissertation, led to compound **77 (JK29)** that afforded cure for 5/5 *P. berghei* infected mice when applied at 160 mg/kg/day \times 3 days dose and prolonged mean survival time two times compared to infected control at lower 20 mg/kg \times 4 days dose.

7. PRILOG

▣ Pregled objavljenih *in vivo* studija na BoNT/A

Tabela P1. Jedinjenja koja su testirana u *in vivo* modelu na BoNT/A

Jedinjenje	Doza i način adiministracije	Rezultat
2,4-DCH ⁴⁵ 	i.v. 0,1 mL 1mM rastvora jedinjenja, praćen i.p. 5LD ₅₀ BoNT/A	16% preživelih (5/31) miševa, bez simptoma botulizma
F4H ⁵² 	i.p. 2 mg/kg, praćeno i.p. 5LD ₅₀ BoNT/A	10% preživelih miševa posle 5 dana
NSC99639 ⁵³ 	Jedinjenje pomešano sa BoNT/A, inkubirano 2 h na 37 °C, a zatim administrirano i.v. (100-4690 M višak jedinjenja sa 1,05LD ₁₀₀ toksina)	50% preživelih miševa pri višku 1200M i 100% preživelih miševa pri 4690M višku
NA-A1B2C10 ⁴⁵ 	i.v. 0,1 mL 2,5M rastvora jedinjenja, praćen i.p. 5LD ₅₀ BoNT/A	Odložilo smrt 3 h u odnosu na kontrolu. Ne omogućava preživljavanje miševa.
ABS252 ⁵⁴	i.v. 1 mg jedinjenja,	Produžava

	posle 5 minuta i.p. 10 U BoNT/A	život miševima jedan i po put u odnosu na kontrolu. Ne omogućava preživljavanje miševa.
Cu(GTSM)⁵⁵ 	i.p. 5LD ₅₀ BoNT/A, 4,6 mg/kg jedinjenja administrirano s.c. posle 1 h	Dovodi do produžetka života u odnosu na kontrolu, ali ne i do izlečenja.
Dyngo-4a⁵⁷ 	i.p. 5LD ₅₀ BoNT/A, posle 3h i.p. 50 mg/kg rastvora jedinjenja	30% preživelih miševa posle 24 h
R12-R1-RGF⁵⁸ oligoarginin-SNAP-25(80-196) sa RGF na C terminusu	100 µg jedinjenja pomešano sa 4LD ₅₀ BoNT/A LC 30 minuta pre administracije	Omogućava preživljavanje svih miševa.
3,4-diaminopiridin (3,4-DAP) + antitelo⁵⁹ Kombinovana terapija	Antitelo administrirano 2 h posle toksina, a 3,4- DAP u dozi 10 mg/kg administriran 3 h posle toksina)	50% miševa ostaje živo do kraja eksperimenta (5000 min).

■ Aktivnost jedinjenja u mES-MN

Tabela P2. Zavisnost očuvanja SNAP-25 od koncentracije primenjenog jedinjenja (0,1 → 20 μ M) u mES-MN kada su jedinjenja dodata pre toksina (rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta).

Jedinjenje	Koncentracija (μ M)	% očuvanog SNAP-25	SEM
DMSO	/	100	0
DMSO+toksin	500 pM	16,6	3,3
15 (DOJK09-D)	0,1	23,1	6,8
	1	23,3	4,8
	5	36,4	9,8
	10	55,5	12,9
	20	78,2	5,0
17 (JK141)	0,1	19,4	3,8
	1	21,1	4,2
	5	25,1	3,4
	10	50,6	14,6
	20	80,7	9,7
121	0,1	25,8	8,1
	1	23,3	7,1
	5	25,5	5,2
	10	40,1	11,4
	20	60,2	11,3
124	0,1	19,5	4,3
	1	19,7	4,1
	5	21,9	4,3
	10	31,7	1,3
	20	61,4	6,0
127	0,1	20,0	6,1
	1	22,1	6,1
	5	22,4	3,7
	10	36,1	6,0
	20	79,3	3,4
20	0,1	18,1	4,7
	1	17,6	4,9
	5	27,0	8,4
	10	40,9	4,1
	20	72,7	8,5
101	0,1	24,1	4,2
	1	24,1	7,2
	5	28,5	8,4
	10	45,2	12,6
	20	69,3	11,4

Tabela P3. Zavisnost očuvanja SNAP-25 od koncentracije jedinjenja **18 (JK227)** (0,25 → 64 μM) u mES-MN kada je jedinjenje doda pre toksina (rezultati su prikazani kao srednja vrednost dva nezavisna eksperimenta).

Jedinjenje	Koncentracija (μM)	% očuvanog SNAP-25	SEM
Tusendanin	10	100	0
DMSO+toksin	500 pM	34,2	4,1
18 (JK227)	0,25	35,8	3,3
	0,5	38,9	3,2
	1	41,9	2,4
	2	40,4	5,0
	4	43,4	4,7
	8	46,4	7,3
	16	57,9	8,3
	32	70,8	5,8
	64	94,0	6,0

Tabela P4. Zaštita SNAP-25 u mES-MN kada se jedinjenja primene posle intoksikacije pri koncentraciji 20 μM (rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta).

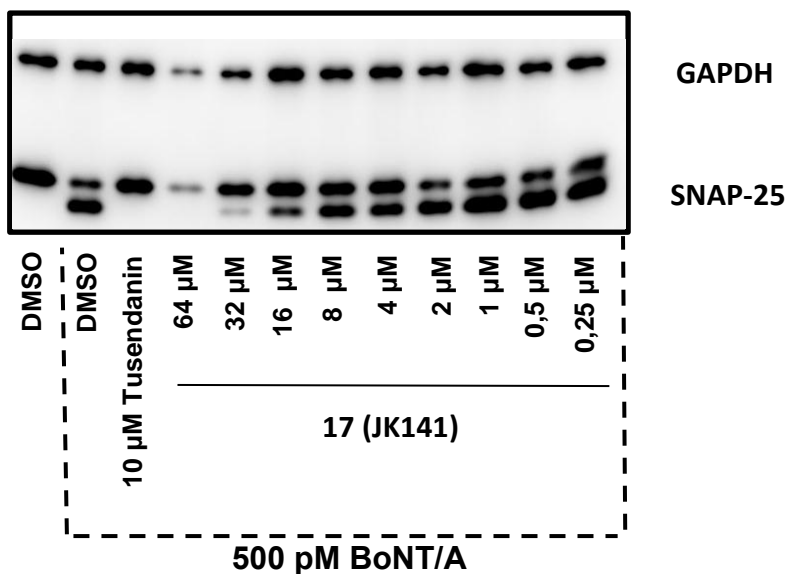
Jedinjenje	% očuvanog SNAP-25 (30 min)	SEM	% očuvanog SNAP-25 (60 min)	SEM
DMSO	100	0	100	0
DMSO+toksin	14,8	2,7	16,2	3,7
15 (DOJK09-D)	35,9	6,0	19,9	3,5
17 (JK141)	99,3	0,3	44,9	9,6
121	48,4	9,1	48,9	24,1
124	38,5	8,0	21,9	2,4
127	49,5	12,0	22,5	1,8
20	16,3	2,4	16,6	2,2

Tabela P5. Zaštita SNAP-25 u mES-MN kada se jedinjenje **17 (JK141)** primeni 30 minuta posle intoksikacije – *dose response* eksperiment u opsegu koncentracija 0,1 do 20 μM - (rezultati su prikazani kao srednja vrednost merenja iz 4 različita eksperimenta).

Jedinjenje	Koncentracija (μM)	% očuvanog SNAP-25	SEM
DMSO	/	100	0
DMSO+toksin	500 pM	15,9	5,6
17 (JK141)	0,1	16,9	2,1
	1	21,2	3,1
	5	40,3	3,9
	10	52,9	4,4
	20	64,4	6,1

Tabela P6. Zaštita SNAP-25 u mES-MN kada se jedinjenja **17 (JK141)** i **18 (JK227)** primene 30 minuta posle intoksikacije – *dose response* eksperiment u opsegu koncentracija 0,25 do 64 μM - (rezultati su prikazani kao srednja vrednost merenja iz 2 različita eksperimenta).

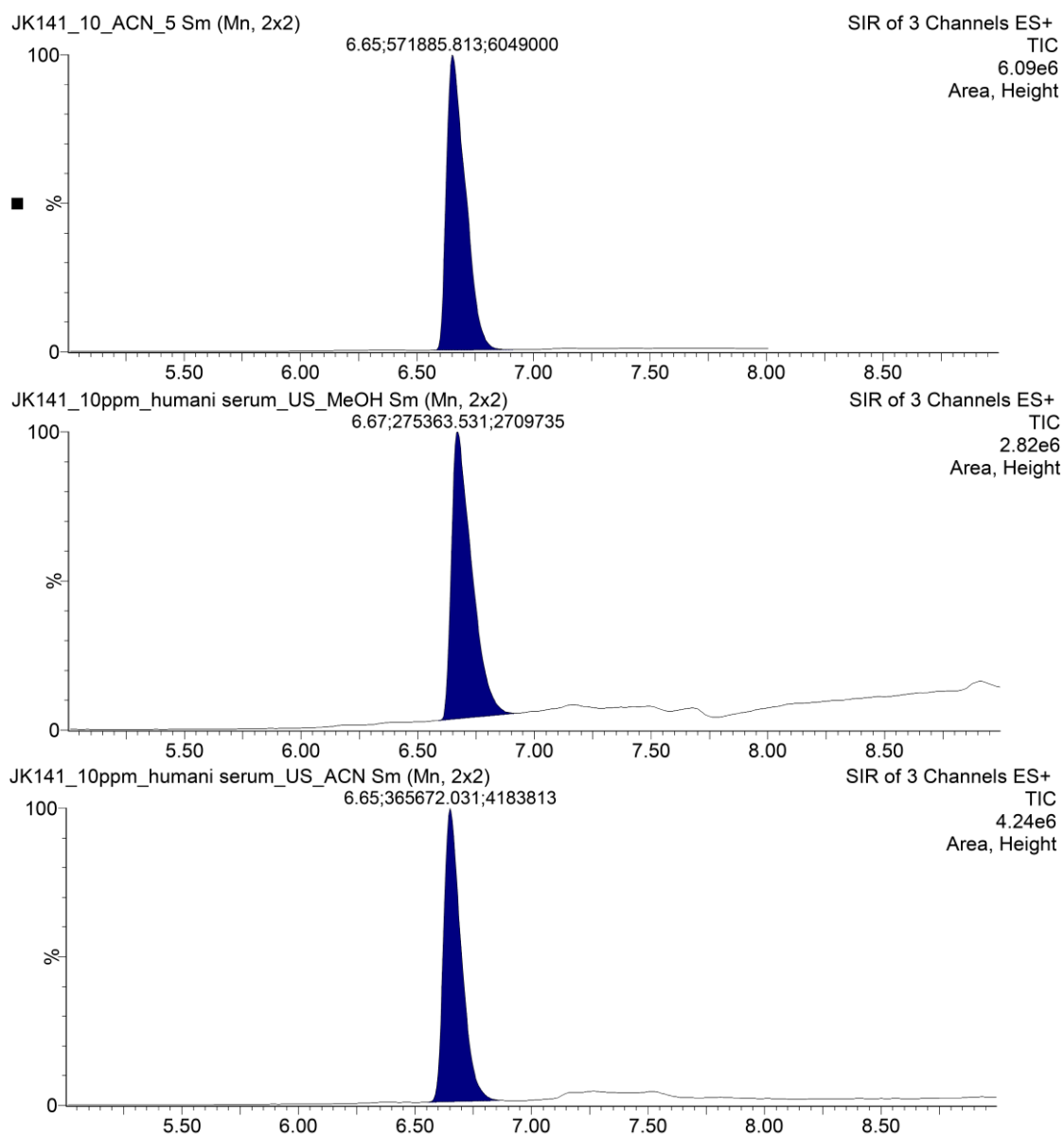
Jedinjenje	Koncentracija (μM)	% očuvanog SNAP-25	SEM
DMSO	/	100	0
DMSO+toksin	500 pM	29,6	3,7
17 (JK141)	0,25	33,2	1,8
	0,5	33,9	3,0
	1	38,8	0,3
	2	37,9	0,9
	4	47,3	6,7
	8	48,2	4,3
	16	71,9	4,0
	32	89,4	2,2
	64	100	0
18 (JK227)	0,25	33,0	3,3
	0,5	36,6	0,9
	1	38,6	5,3
	2	41,0	5,5
	4	44,0	2,5
	8	50,3	5,3
	16	49,2	2,1
	32	52,7	4,3
	64	69,2	4,1



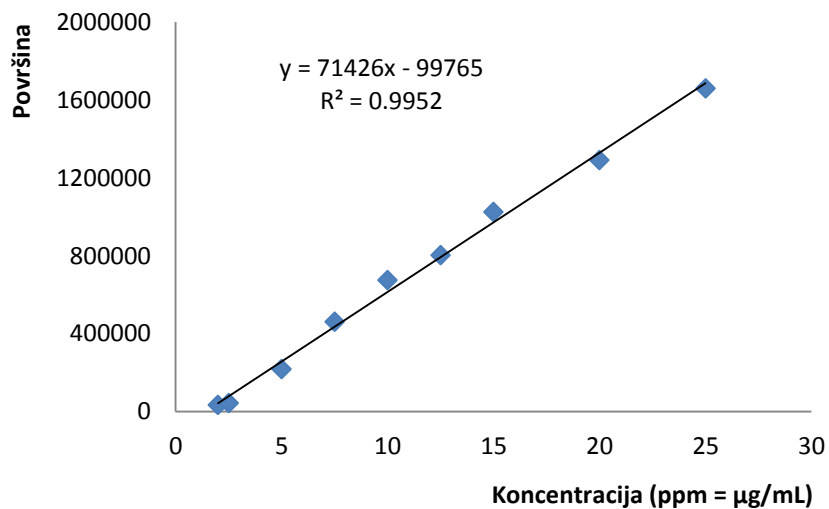
Slika P1. Prikaz Western blot traka dobijenih kada je jedinjenje **17 (JK141)** primenjeno u 9 različitih koncentracija 30 minuta posle intoksikacije. Slabo vidljiva traka GAPDH pri koncentraciji 64 μM ukazuje na potencijalnu toksičnost jedinjenja pri ovoj koncentraciji.

■ Farmakokinetika

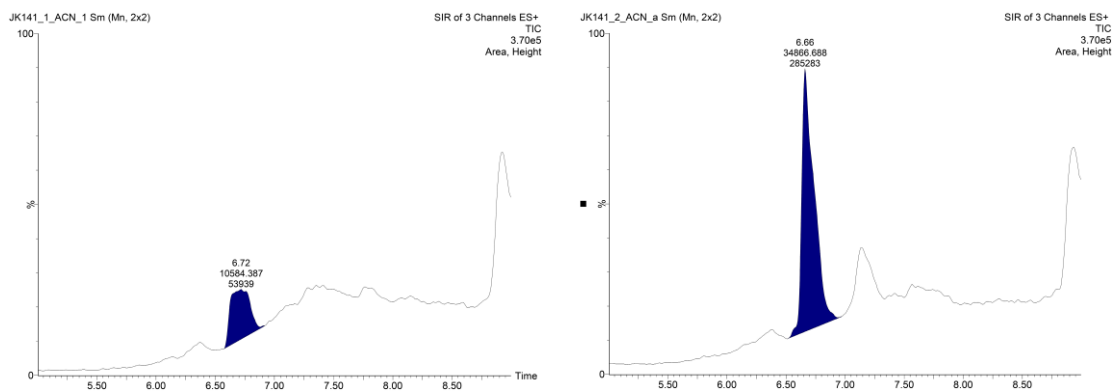
Slika P2. Optimizacija uslova za određivanje ukupne koncentracije **17 (JK141)** u serumu miša



Grafik P1. Kalibraciona prava za određivanje ukupne koncentracije **17 (JK141)** pri oralnoj administraciji



Slika P3. Limit detekcije i limit kvantifikacije (analiza uzoraka pri oralnoj administraciji)

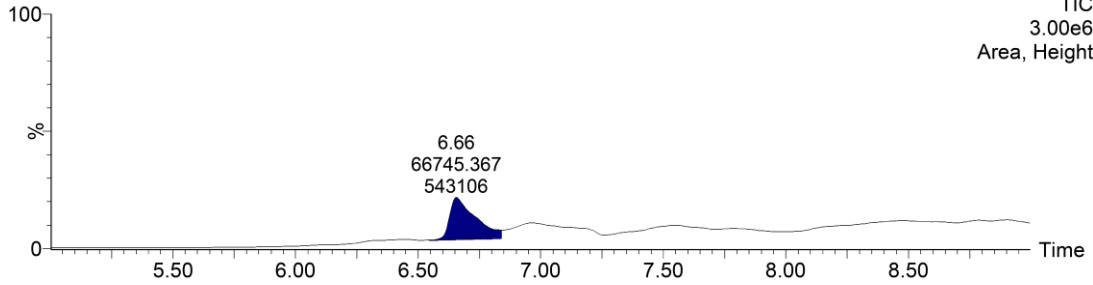


Hromatogrami uzoraka 17 (JK141) - oralna administracija

Slika P4. Doza 400 mg/kg

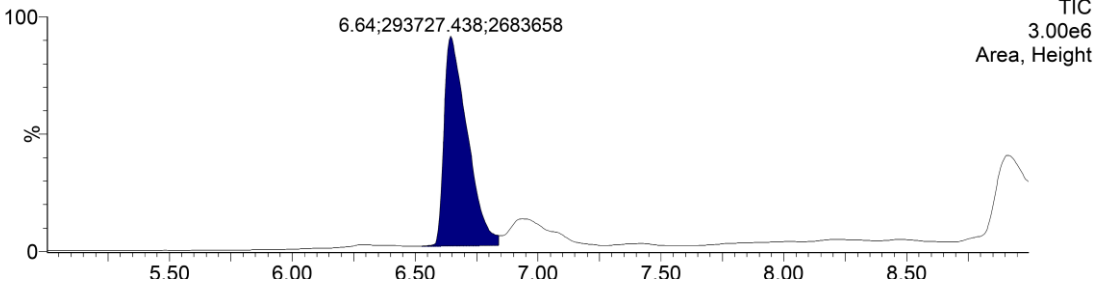
JK141_M_400_15min_1_ACN Sm (Mn, 2x2)

SIR of 3 Channels ES+
TIC
3.00e6
Area, Height



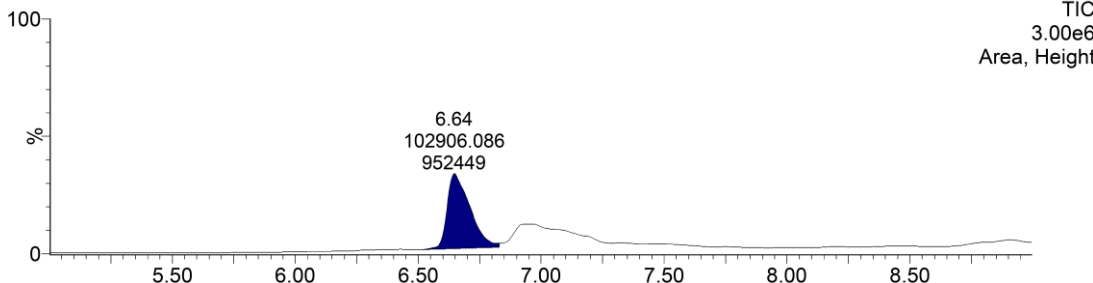
JK141_M_400_22min_2_ACN_a Sm (Mn, 2x2)

SIR of 3 Channels ES+
TIC
3.00e6
Area, Height



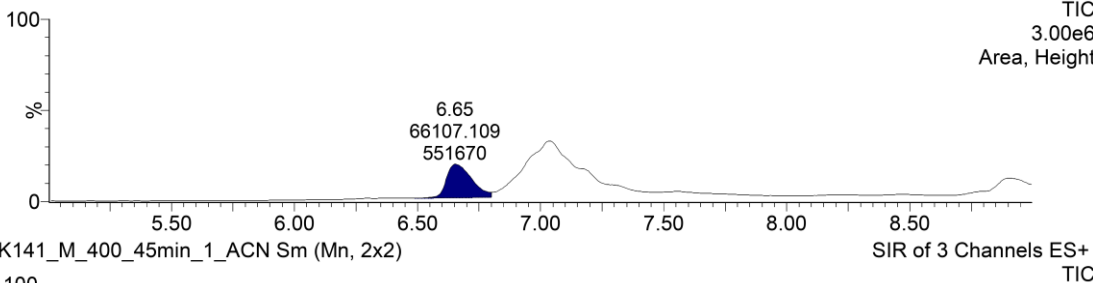
JK141_M_400_30min_1_ACN Sm (Mn, 2x2)

SIR of 3 Channels ES+
TIC
3.00e6
Area, Height



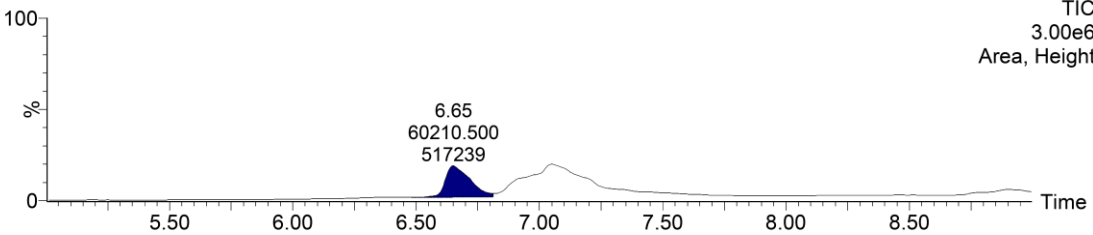
JK141_M_400_45min_2_ACN Sm (Mn, 2x2)

SIR of 3 Channels ES+
TIC
3.00e6
Area, Height



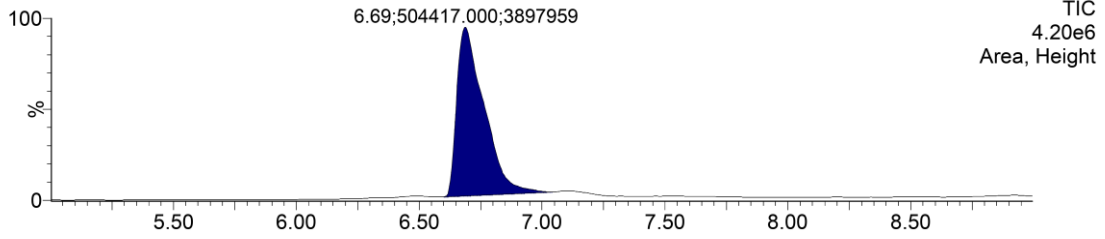
JK141_M_400_45min_1_ACN Sm (Mn, 2x2)

SIR of 3 Channels ES+
TIC
3.00e6
Area, Height

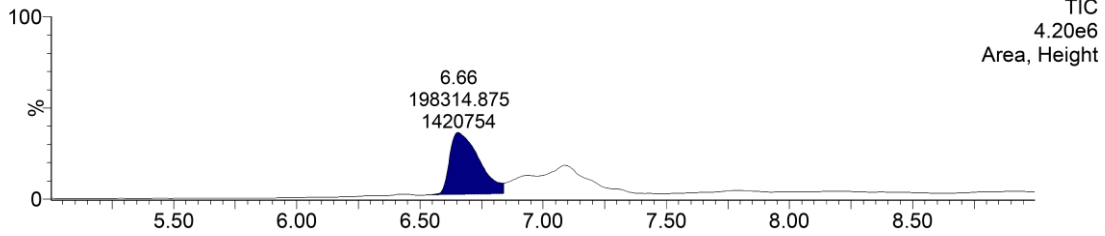


Slika P5. Doza 600 mg/kg

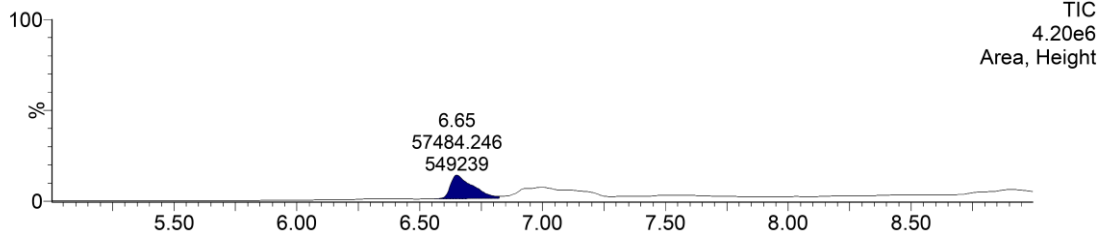
JK141_M_600_15min_2 Sm (Mn, 2x2)



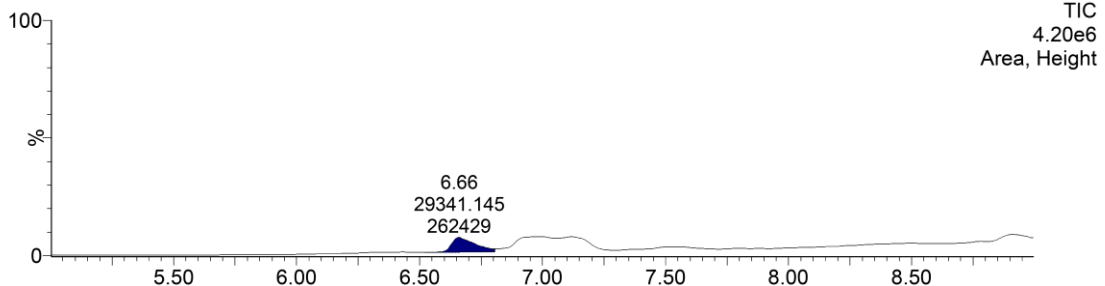
JK141_M_600_30min_2 Sm (Mn, 2x2)



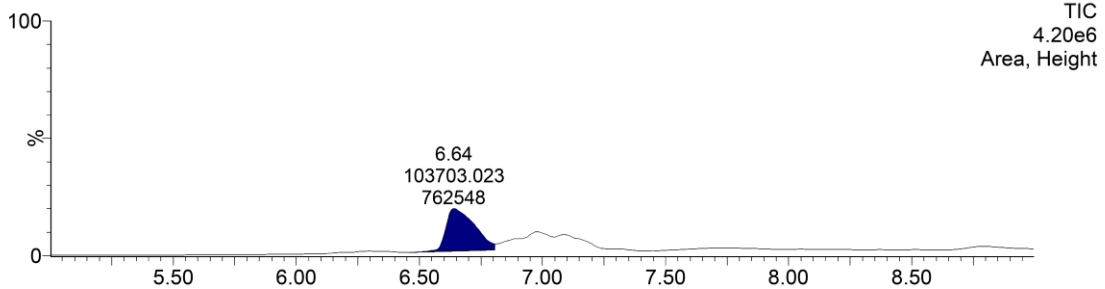
JK141_M_600_45min_1 Sm (Mn, 2x2)

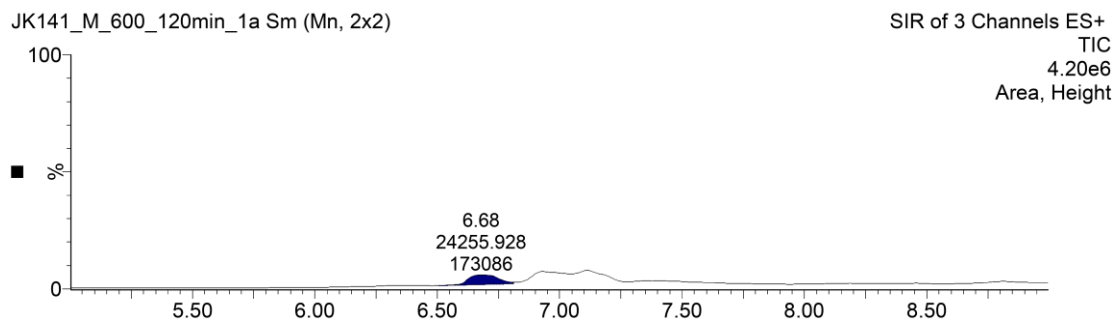


JK141_M_600_60min_2 Sm (Mn, 2x2)

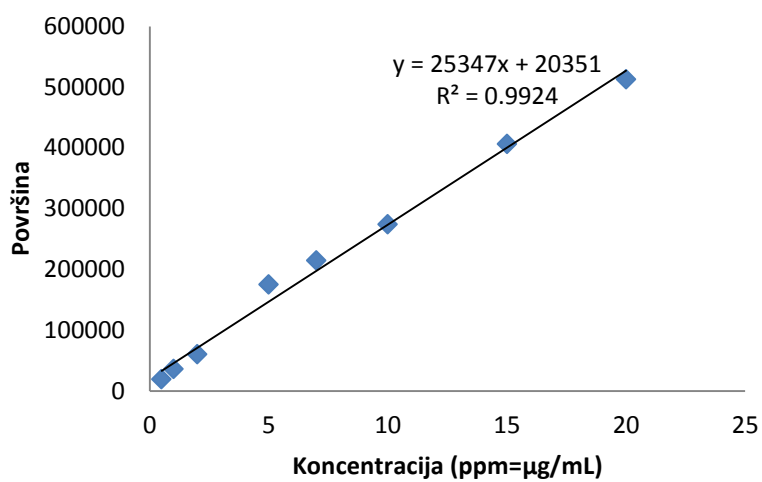


JK141_M_600_90min_2 Sm (Mn, 2x2)

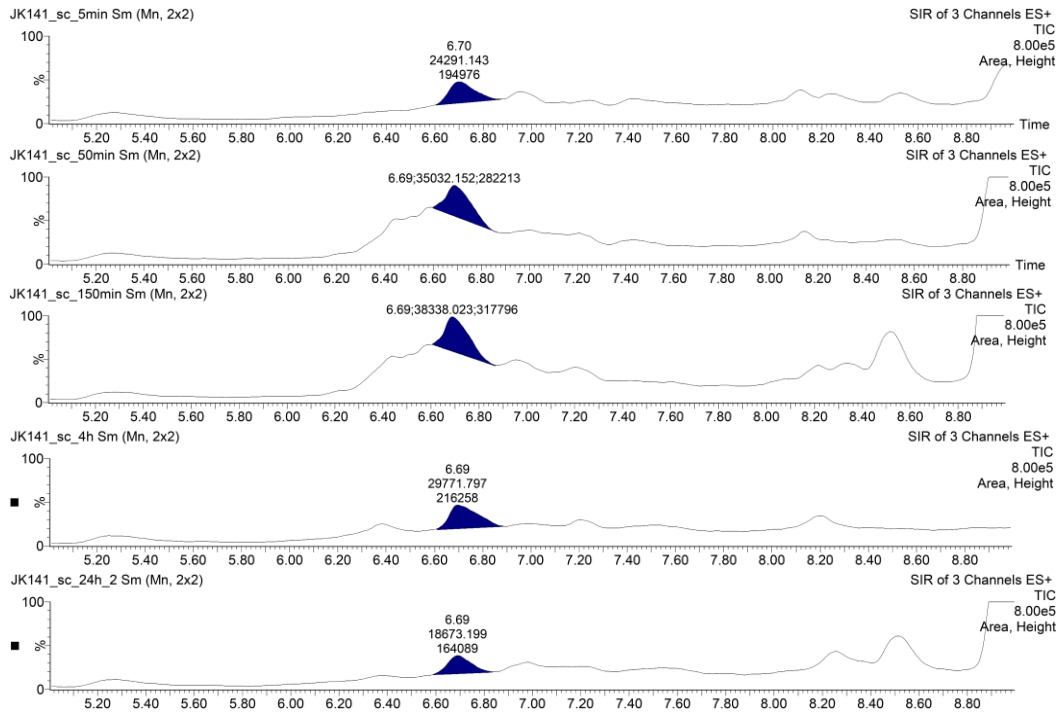




Grafik P2. Kalibraciona prava za određivanje ukupne koncentracije 17 (JK141) pri supkutanoj administraciji



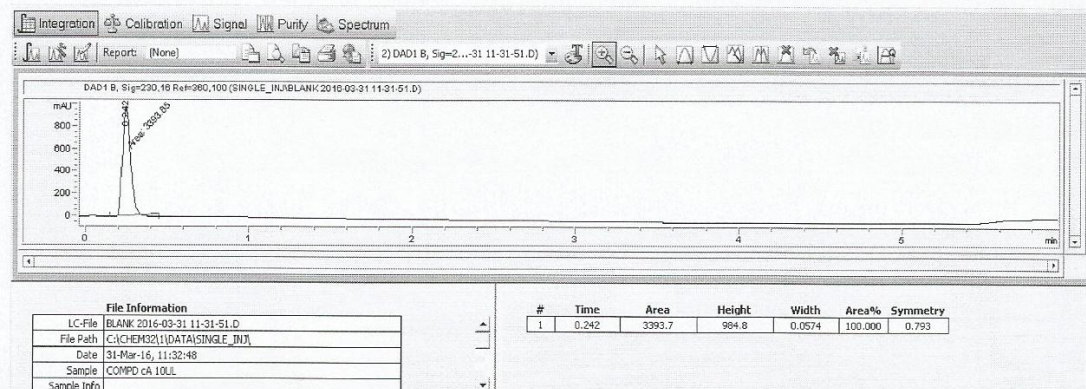
Slika P6. Hromatogrami uzoraka 17 (JK141) - supkutana administracija



■ Hromatografsko određivanje procenta vezivanja 17 (JK141) za AGP

Slika P7. Vezivanje za AGP – jedini signal koji se vidi potiče od DMSO

Concentrated 2mg/ml 10ul



▣ Određivanje pK_a

17 (JK141)

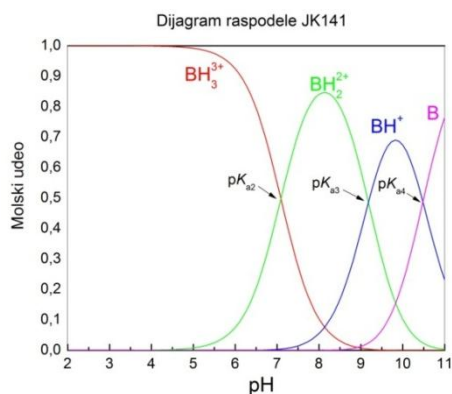
$c_{JK141} = 4,483 \times 10^{-4} \text{ M}$

(0,1 M NaCl u MeOH:H₂O = 1:1)

proba	$pK_{a2} \pm SD$	$pK_{a3} \pm SD$	$pK_{a4} \pm SD$
1	$7,19 \pm 0,05$	$9,27 \pm 0,02$	$10,40 \pm 0,02$
2	$7,00 \pm 0,08$	$9,09 \pm 0,04$	$10,67 \pm 0,04$
3	$6,93 \pm 0,03$	$9,16 \pm 0,01$	$10,07 \pm 0,01$
4	$7,22 \pm 0,06$	$9,18 \pm 0,03$	$10,76 \pm 0,03$
$\langle pK_a \rangle$	$7,09 \pm 0,12$	$9,18 \pm 0,06$	$10,48 \pm 0,27$

pK_{a1} van pH opsega titracija

Grafik P3



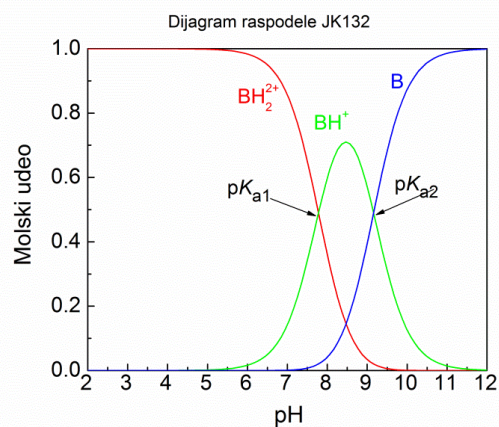
91 (JK132)

$c_{JK132} = 7,1556 \times 10^{-4} \text{ M}$

(0,1 M NaCl u MeOH:H₂O = 1:1)

proba	$pK_{a1} \pm SD$	$pK_{a2} \pm SD$
1	$7,94 \pm 0,03$	$9,26 \pm 0,07$
2	$7,85 \pm 0,05$	$9,31 \pm 0,07$
3	$7,59 \pm 0,03$	$9,07 \pm 0,03$
4	$7,70 \pm 0,04$	$9,08 \pm 0,05$
5	$7,80 \pm 0,02$	$9,09 \pm 0,03$
$\langle pK_a \rangle$	$7,78 \pm 0,05$	$9,16 \pm 0,07$

Grafik P4



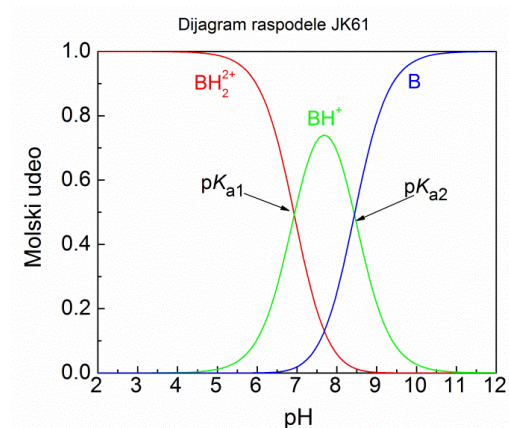
92 (JK61)

$$c_{JK61} = 6,2691 \times 10^{-4} \text{ M}$$

(0,1 M NaCl u MeOH:H₂O = 1:1)

proba	$pK_{a1} \pm SD$	$pK_{a2} \pm SD$
1	$6,86 \pm 0,06$	istaložila se pre postizanja pH = pK_{a2}
2	$7,05 \pm 0,03$	istaložila se pre postizanja pH = pK_{a2}
3	$6,92 \pm 0,05$	$8,7 \pm 0,2$
4	$6,80 \pm 0,06$	$8,7 \pm 0,2$
5	$7,03 \pm 0,03$	$8,43 \pm 0,03$
<pK_a>	$6,93 \pm 0,06$	$8,44 \pm 0,07$

Grafik P5



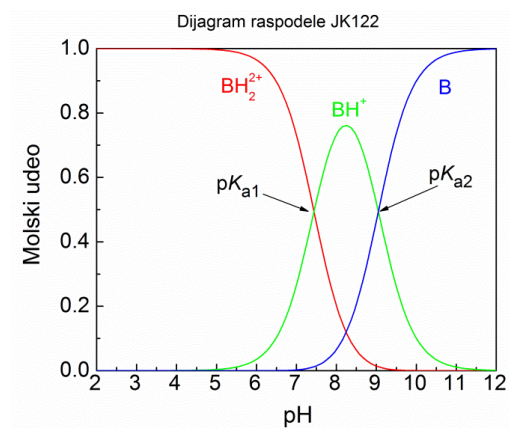
93 (JK122)

$$c_{JK122} = 5,7920 \times 10^{-4} \text{ M}$$

(0,1 M NaCl u MeOH:H₂O = 1:1)

proba	$pK_{a1} \pm SD$	$pK_{a2} \pm SD$
1	$7,39 \pm 0,04$	$9,00 \pm 0,03$
2	$7,41 \pm 0,05$	$9,07 \pm 0,04$
3	$7,38 \pm 0,04$	$8,98 \pm 0,04$
4	$7,43 \pm 0,05$	$9,07 \pm 0,05$
5	$7,60 \pm 0,03$	$9,12 \pm 0,03$
<pK_a>	$7,44 \pm 0,05$	$9,05 \pm 0,07$

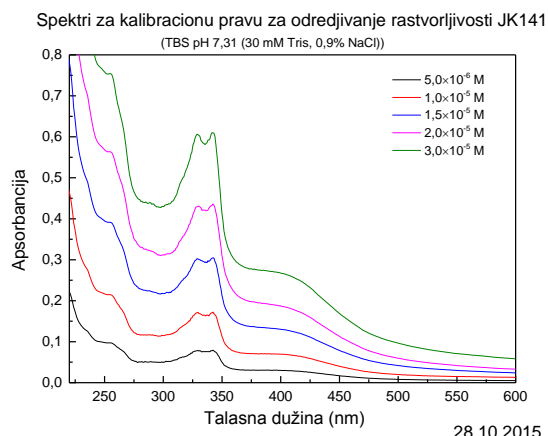
Grafik P6



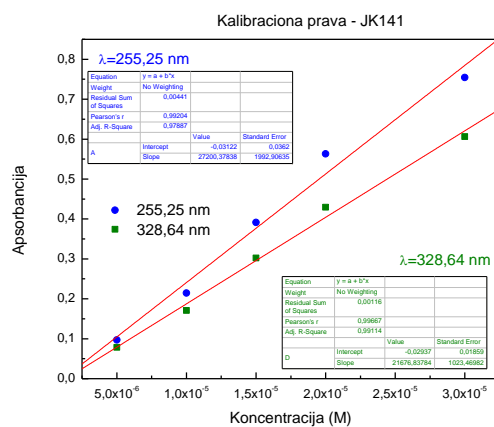
▣ Određivanje rastvorljivosti 17 (JK141)

Kalibraciona prava

Slika P8

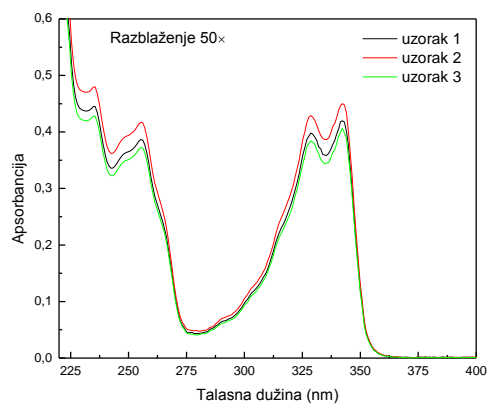


Grafik P7

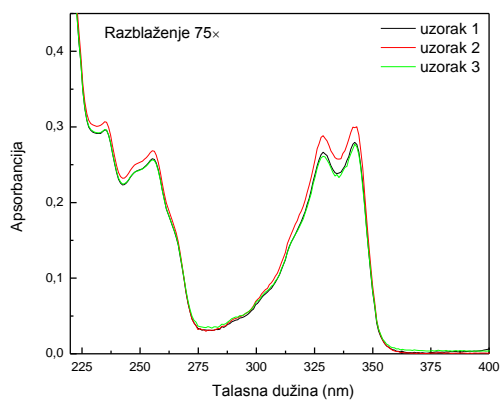


Uzorci

Slika P9

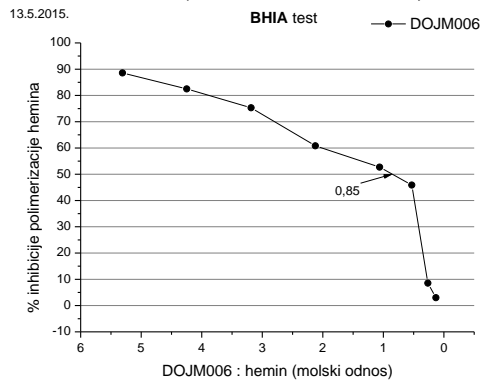


Slika P10

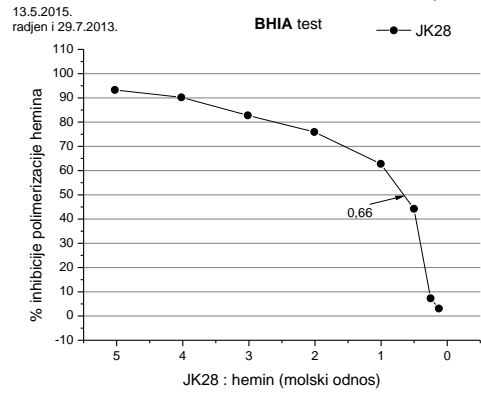


$$\langle R_{JK141} \rangle = (9,1 \pm 1,3) \times 10^{-4} \text{ M} = 0,64 \pm 0,09 \text{ g/L} = 0,64 \pm 0,09 \text{ mg/mL}$$

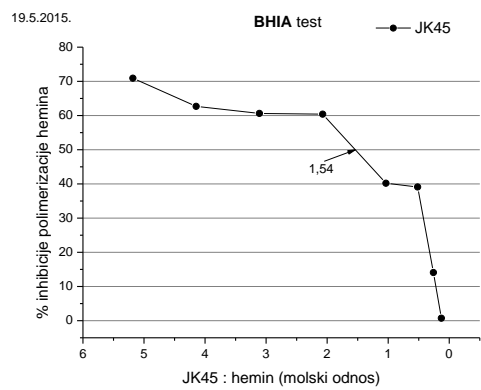
Grafik P8. 62 (JK124=DOJM006)



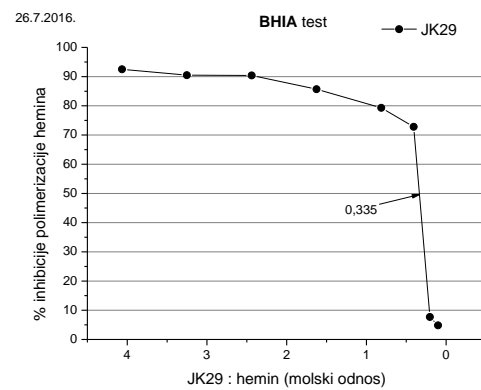
Grafik P9. 75 (JK28)



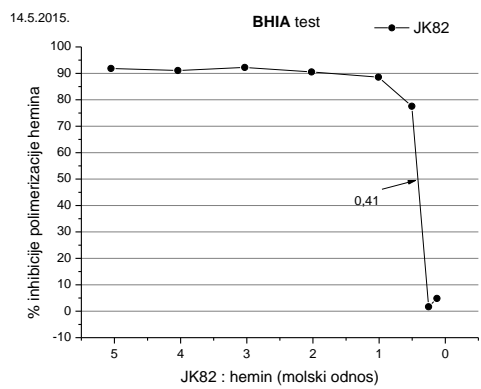
Grafik P10. 76 (JK45)



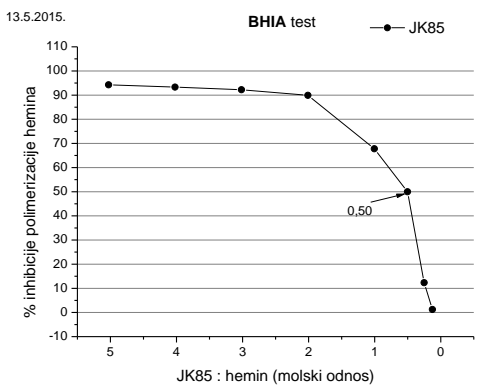
Grafik P11. 77 (JK29)



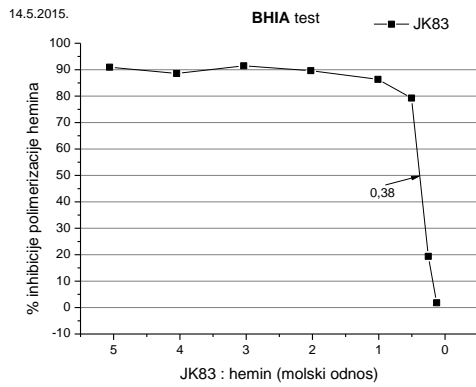
Grafik P12. 79 (JK82)



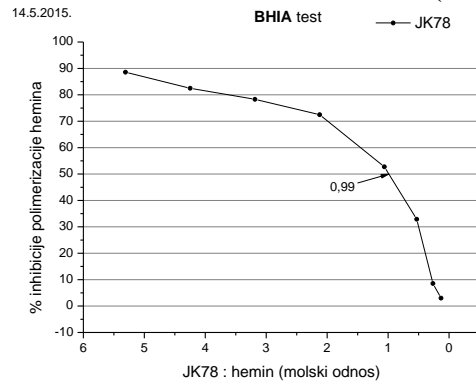
Grafik P13. 80 (JK85)



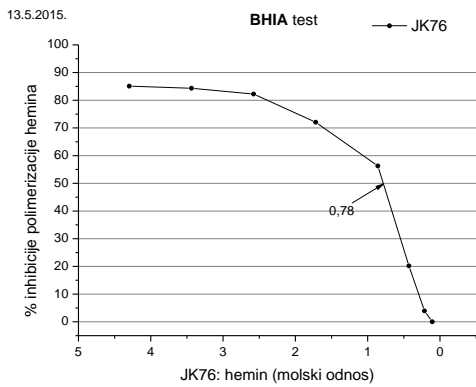
Grafik P14. 82 (JK83)



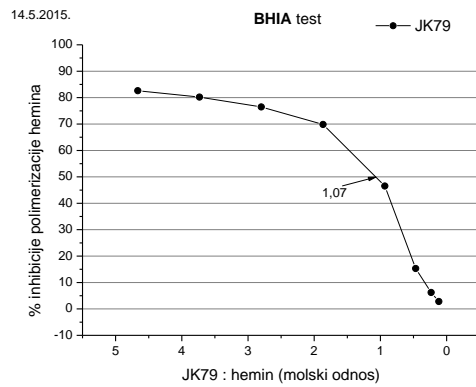
Grafik P15. 84 (JK78)



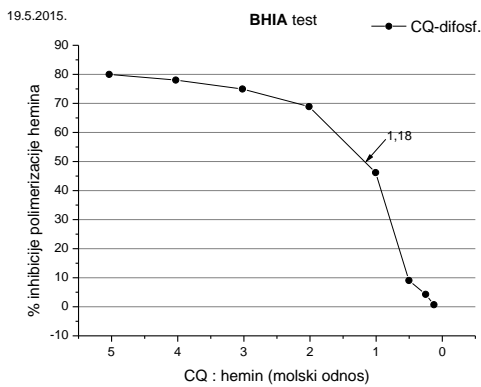
Grafik P16. 85 (JK76)



Grafik P17. 87 (JK79)



Grafik P18. Hlorokin (CQ)



8. LITERATURA

1. Schantz, E. J.; Johnson, E. A. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 80-99.
2. Dover, N.; Barash, J. R.; Hill, K. K.; Xie, G.; Arnon, S. S. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J. Infect. Dis.* **2014**, *209*, 192-202.
3. Pellett, S.; Tepp, W. H.; Lin, G.; Johnson, E. A. Substrate cleavage and duration of action of botulinum neurotoxin type FA (“H, HA”). *Toxicon* **2017**, doi: 10.1016/j.toxicon.2017.12.048.
4. Zhang, S.; Masuyer, G.; Zhang, J.; Shen, Y.; Lundin, D.; Henriksson, L.; Miyashita, S.; Martinez-Carranza, M.; Dong, M.; Stenmark, P. Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nat. Commun.* **2016**, *8*:14130.
5. Eye of science/Science Source, <http://images.sciencesource.com/p/15140693/Clostridium-Botulinum-SEM-BY5403.html>
6. Botulism, Fact sheet, World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs270/en/> (čitano 31. januara 2018).
7. Dhaked, R. K.; Singh, M. K.; Singh, P.; Gupta, P. Botulinum toxin: Bioweapon & magic drug. *Indian. J. Med. Res.* **2010**, *132*, 489-503.
8. Shukla, H. D.; Sharma, S. K. Clostridium botulinum: A bug with beauty and weapon. *Crit. Rev. Microbiol.* **2005**, *31*, 11-18.
9. Turton, K.; Chaddock, J. A.; Acharya, K. R. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 552–558.
10. Shenyan, G.; Rumpel, S.; Zhou, J.; Strotmeier, J.; Bigalke, H.; Perry, K.; Shoemaker, C. B.; Rummel, A.; Jin, R. Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex. *Science* **2012**, *335*, 977-981.
11. Rossetto, O.; Pirazzini, M.; Montecucco, C. Botulinum neurotoxins: Genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 535–549.
12. Preuzeto sa sajta: <https://neupsykey.com/botulinum-toxin-in-movement-disorders/>
13. Chen, S. Clinical uses of botulinum neurotoxins: Current indications, limitations and future developments. *Toxins* **2012**, *4*, 913-939.
14. Bing, Li.; Norton, P. P.; Michelle, M. B.; James, C. B.; Donald, T. M.; Terry, L. B. Small molecule inhibitors as countermeasures for botulinum neurotoxin intoxication. *Molecules* **2011**, *16*, 202-220.
15. Sheridan, R. E.; Deshpande, S. S. Interactions between heavy metal chelators and botulinum neurotoxins at the mouse neuromuscular junction. *Toxicon* **1995**, *33*, 539-549.
16. Adler, M.; Dinterman, R. E.; Wannemacher, R. W. Protection by the heavy metal chelator N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) against the lethal action of botulinum neurotoxin A and B. *Toxicon* **1997**, *35*, 1089-1100.
17. BAT, Botulism Antitoxin Heptavalent (A, B, C, D, E, F, G) - (Equine) [Package Insert], Cangene
18. Duplantier, A. J.; Kane C. D.; Bavari, S. Searching for therapeutics against botulinum neurotoxins: A true challenge for drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 2330-2349.

-
19. Simpson, L. L.; Rapport, M. M. The binding of botulinum toxin to membrane lipids: sphingolipids, steroids and fatty acids. *J. Neurochem.* **1971**, *18*, 1341-1343.
20. Bakry, N.; Kamata, Y.; Simpson, L. L. Lectins from *Triticum vulgare* and *Limax flavus* are universal antagonists of botulinum neurotoxin and tetanus toxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *258*, 830-836.
21. Keller, J. E.; Cai, F.; Neale, E. A. Uptake of botulinum neurotoxin into cultured neurons. *Biochemistry* **2004**, *43*, 526-532.
22. Sheridan, R. E. Protonophore antagonism of botulinum toxin in mouse muscle. *Toxicon* **1996**, *34*, 849-855.
23. Deshpande, S.; Sheridan, R. E.; Alder, M. Efficacy of certain quinolines as pharmacological antagonists in botulinum neurotoxin poisoning. *Toxicon* **1997**, *35*, 433-445.
24. Adler, M.; Scovill, J.; Parker, G.; Lebeda, F. J.; Piotrowski, J.; Deshpande, S. S. Antagonism of botulinum toxin-induced muscle weakness by 3,4-diaminopyridine in rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparations. *Toxicon* **1995**, *33*, 527-537.
25. Burnett, J. C.; Schmidt, J. J.; Stafford, R. G.; Panchal, R. G.; Nguyen, T. L.; Hermone, A. R.; Vennerstrom, J. L.; McGrath, C. F.; Lane, D. J.; Sausville, E. A.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Bavari, S. Novel small molecule inhibitors of botulinum neurotoxin A metalloprotease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310*, 84-93.
26. Burnett, J. C.; Opsenica, D.; Sriraghavan, K.; Panchal, R. G.; Ruthel, G.; Hermone, A. R.; Nguyen, T. L.; Kenny, T. A.; Lane, D. J.; McGrath, C. F.; Schmidt, J. J.; Vennerstrom, J. L.; Gussio, R.; Šolaja, B. A.; Bavari, S. A refined pharmacophore identifies potent 4-amino-7-chloroquinoline-based inhibitors of the botulinum neurotoxin serotype A metalloprotease. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2127-2136.
27. Šolaja, B. A.; Opsenica, D.; Smith, K. S.; Milhous, W. K.; Terzic, N.; Opsenica, I.; Burnett, J. C.; Nuss, J.; Gussio, R.; Bavari, S. Novel 4-aminoquinolines active against chloroquine-resistant and sensitive *P. falciparum* strains that also inhibit botulinum serotype A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4388-4391.
28. Opsenica, I.; Filipovic, V.; Nuss, J. E.; Gomba, I. M.; Opsenica, D.; Burnett, J. C.; Gussio, R.; Šolaja, B. A.; Bavari, S. The synthesis of 2,5-bis(4-amidinophenyl)thiophene derivatives providing submicromolar-range inhibition of the botulinum neurotoxin serotype A metalloprotease. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 374-379.
29. Caglič, D.; Krutein, M. C.; Bompiani, K. M.; Barlow, D. J.; Benoni, G.; Pelletier, J. C.; Reitz, A. B.; Lairson, L. L.; Houseknecht, K. L.; Smith, G. R.; Dickerson, T. J. Identification of clinically viable quinolinol inhibitors of botulinum neurotoxin A light chain. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 669-676.
30. Boldt, G. E.; Kennedy, J. P.; Janda, K. D. Identification of a potent botulinum neurotoxin A protease inhibitor using in situ lead identification chemistry. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1729-1732.
31. Bremer, P. T.; Hixon, M. S.; Janda, K. D. Benzoquinones as inhibitors of botulinum neurotoxin serotype A. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3971-3981.
32. Eubanks, L. M.; Silhár, P.; Salzameda, N. T.; Zakhari, J. S.; Xiaochuan, F.; Barbieri, J. T.; Shoemaker, C. B.; Hixon, M. S.; Janda, K. D. Identification of a natural product antagonist against the botulinum neurotoxin light chain protease. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 268-272.

-
33. Bremer, P. T.; Xue, S.; Janda, K. D. Picolinic acids as b-exosite inhibitors of botulinum neurotoxin A light chain. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 12521-12524.
34. Šilhar, P.; Čapková, K.; Salzameda, N. T.; Barbieri, J. T.; Hixon, M. S.; Janda, K. D. Botulinum neurotoxin A protease: Discovery of natural product exosite inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2868-2869.
35. Toth, S.; Brueggmann, E. E.; Oyler, G. A.; Smith, L. A.; Hines, H. B.; Ahmed, S. A. Tyrosine phosphorylation of botulinum neurotoxin protease domains. *Front Pharmacol.* **2012**, *3*:102.
36. Snyder, D. A.; Kelly, M. L.; Woodbury, D. J. SNARE complex regulation by phosphorylation. *Cell Biochem. Biophys.* **2006**, *45*, 111-123.
37. Kiris, E.; Burnett, J. C.; Nuss, J. E.; Wanner, L. M.; Peyser, B. D.; Du, H. T.; Gomba, G. Y.; Kota, K. P.; Panchal, R. G.; Gussio, R.; Kane, C. D.; Tessarollo, L.; Bavari, S. Src family kinase inhibitors antagonize the toxicity of multiple serotypes of botulinum neurotoxin in human embryonic stem cell-derived motor neurons. *Neurotox Res.* **2015**, *27*, 384-398.
38. Kiris, E.; Nuss, J. E.; Stanford, S. M.; Wanner, L. M.; Cazares, L.; Maestre, M. F.; Du, H. T.; Gomba, G. Y.; Burnett, J. C.; Gussio, R.; Bottini, N.; Panchal, R. G.; Kane, C. D.; Tessarollo, L.; Bavari, S. Phosphatase inhibitors function as novel, broad spectrum botulinum neurotoxin antagonists in mouse and human embryonic stem cell-derived motor neuron-based assays. *PLoS ONE*, **2015**, *10*, e0129264.
39. Pirazzini, M.; Azarnia, T. D.; Zanetti, G.; Megighian, A.; Scorzeto, M.; Fillo, S.; Shone, C. C.; Binz, T.; Rossetto, O.; Lista, F.; Montecucco, C. Thioredoxin and its reductase are present on synaptic vesicles, and their inhibition prevents the paralysis induced by botulinum neurotoxins. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 1870-1878.
40. Seki, H.; Xue, S.; Pellett, S.; Šilhár, P.; Johnson, E. A.; Janda, K. D. Cellular protection of SNAP-25 against botulinum neurotoxin/A: inhibition of thioredoxin reductase through a suicide substrate mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5568-5575.
41. N. R. Shine, US Pat. Appl. 6,504,006 B1, 2003
42. Nuss, J. E.; Wanner, L. M.; Tressler, L. E.; Bavari, S. The osmolyte trimethylamine N-oxide (TMAO) increases the proteolytic activity of botulinum neurotoxin light chains A, B, and E: Implications for enhancing analytical assay sensitivity. *J. Biomol. Screen.* **2010**; *15*, 928-936.
43. Čapková, K.; Hixon, M. S.; McAllister, L. A.; Janda, K. D. Toward the discovery of potent inhibitors of botulinum neurotoxin A: Development of a robust LC MS based assay operational from low to subnanomolar enzyme concentrations. *Chem. Commun.* **2008**, 3525-3527.
44. Pellett, S. Progress in cell based assays for botulinum neurotoxin detection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *364*, 257-285.
45. Eubanks, L. M.; Hixon, M. S.; Jin, W.; Hong, S.; Clancy, C. M.; Tepp, W. H.; Baldwin, M. R.; Malizio, C. J.; Goodnough, M. C.; Barbieri, J. T.; Johnson, E. A.; Boger, D. L.; Dickerson, T. J.; Janda, K. D. An in vitro and in vivo disconnect uncovered through high-throughput identification of botulinum neurotoxin A antagonists. *PNAS*, **2007**, *104*, 2602-2607.
46. Stahl, A. M.; Ruthel, G.; Torres-Melendez, E.; Kenny, T. A.; Panchal, R. G.; Bavari, S. Primary cultures of embryonic chicken neurons for sensitive cell-based assay of

-
- botulinum neurotoxin: implications for therapeutic discovery. *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12*, 370-377.
47. Ruthel, G.; Burnett, J. C.; Nuss, J.E.; Wanner, L. M.; Tressler, L. E.; Torres-Melendez, E.; Sandwick, S. J.; Retterer, C. J.; Bavari, S. Post-intoxication inhibition of botulinum neurotoxin serotype A within neurons by small-molecule, non-peptidic inhibitors. *Toxins* **2011**, *3*, 207-217.
48. Kiris, E.; Kota, K. P.; Burnett, J. C.; Soloveva, V.; Kane, C. D.; Bavari, S. Recent developments in cell-based assays and stem cell technologies for botulinum neurotoxin research and drug discovery. *Expert Rev Mol Diagn.* **2014**, *14*, 153–168.
49. Silhar, P.; Silvaggi, N. R.; Pellett, S.; Capkova, K.; Johnson, E. A.; Allen, K. N.; Janda, K. D. Evaluation of adamantane hydroxamates as botulinum neurotoxin inhibitors: synthesis, crystallography, modeling, kinetic and cellularbased studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1344-1348.
50. Bremer, P. T.; Adler, M.; Phung, C. H.; Singh, A. K.; Janda, K. D. Newly designed quinolinol inhibitors mitigate the effects of botulinum neurotoxin A in enzymatic, cell-based, and ex vivo assays. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 338–348.
51. Tehran, D. A.; Zanetti, G.; Leka, O.; Lista, F.; Fillo, S.; Binz, T.; Shone, C. C.; Rossetto, O.; Montecucco, C.; Paradisi, C.; Mattarei, A.; Pirazzini, M. A novel inhibitor prevents the peripheral neuroparalysis of botulinum neurotoxins. *Sci. Rep.* **2015**, *5*:17513.
52. Pang, Y. P.; Davis, J.; Wang, S.; Park, J. G.; Nambiar, M. P.; Schmidt, J. J.; Millard, C. B. Small molecules showing significant protection of mice against botulinum neurotoxin serotype A. *PloS ONE*, **2010**, *5*, e10129.
53. Eichhorn, T.; Dolimbek, B. Z.; Deeg, K.; Efferth, T.; Atassi, M. Z. Inhibition in vivo of the activity of botulinum neurotoxin A by small molecules selected by virtual screening. *Toxicon*, **2012**, *60*, 1180-1190.
54. Jacobson, A. R.; Adler, M.; Silvaggi, N.R.; Allen, K. N.; Smith, G. M.; Fredenburg, R. A.; Stein, R. L.; Park, J. B.; Feng, X.; Shoemaker, C. B.; Deshpande, S. S.; Goodnough, M. C.; Malizio, C. J.; Johnson, E. A.; Pellett, S.; Tepp, W. H.; Tzipori, S. Small molecule metalloprotease inhibitor with *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* efficacy against botulinum neurotoxin serotype A. *Toxicon* **2017**, *137*, 36-47.
55. Bremer, P. T.; Pellett, S.; Carolan, J. P.; Tepp, W. H.; Eubanks, L. M.; Allen, K. N.; Johnson, E. A.; Janda, K. D. Metal ions effectively ablate the action of botulinum neurotoxin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7264-7272.
56. Harper, C. B.; Martin, S.; Nguyen, T. H.; Daniels, S. J.; Lavidis, N. A.; Popoff, M.R.; Hadzic, G.; Mariana, A.; Chau, N.; McCluskey, A.; Robinson, P. J.; Meunier, F. A. Dynamin inhibition blocks botulinum neurotoxin type A endocytosis in neurons and delays botulism. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35966-35976.
57. Seki, H.; Xue, S.; Hixon, M. S.; Pellet, S.; Remes, M.; Johnson, E. A.; Janda, K. D. Toward the discovery of dual inhibitors of botulinum neurotoxin A: concomitant targeting of endocytosis and light chain protease activity. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6226-6229.
58. Guo, J.; Wang, J.; Gao, S.; Ji, B.; Chan, E. W.; Chen, S. Substrate-based inhibitors exhibiting excellent protective and therapeutic effects against botulinum neurotoxin A intoxication. *Sci. Rep.* **2015**, *5*:16981.

-
59. Harris, T. L.; Lowery, C. A.; Hixon, M. S.; Janda, K. D. A platform stratifying a sequestering agent and a pharmacological antagonist as a means to negate botulinum neurotoxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 632-636.
60. World Malaria Report **2017**,
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf> (čitano 26. januara 2018.)
61. Mahon, C. R.; Lehman, D.C.; Manuselis, G. Textbook of diagnostic microbiology, 5th edition, **2015**, ISBN: 978-0-323-08989-0.
62. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. Medical microbiology, 7th edition, **2013**, ISBN: 978-0-323-08692-9.
63. Ehlgen, F.; Pham, J. S.; de Koning-Ward, T.; Cowman, A. F.; Ralph, S. A. Investigation of the Plasmodium falciparum food vacuole through inducible expression of the chloroquine resistance transporter (PfCRT). *PLoS ONE*, **2012**, *7* (6), e38781.
64. Schlitzer, M. Malaria chemotherapeutics Part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem*, **2007**, *2*, 944-986.
65. Fidock, D. A. Drug discovery: Priming the antimalarial pipeline. *Nature*, **2010**, *465*, 297-298.
66. Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyto, A. P.; Tarning, J.; Lwin, K. M.; Ariey, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S. J.; Ringwald, P.; Silamut, K.; Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P.; Herdman, T.; An, S. S.; Yeung, S.; Singhasivanon, P.; Day, N. P. J.; Lindegardh, N.; Socheat, D.; White, N. J. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455-467.
67. Wongsrichanalai, C.; Meshnick, S. R. Declining Artesunate-Mefloquine Efficacy against Falciparum Malaria on the Cambodia–Thailand Border. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 716-719.
68. Ivers LC, Ryan ET (2012): Pharmacology of Parasitic Infections. Chp 36. In: Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy. 3rd Edition. Golan DE et al (Eds). Lippincott Williams & Wilkins.
69. O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Hawley, S. R.; Ward, S. A.; Park, B. K. 4-Aminoquinolines-past, present, and future: a chemical perspective. *Pharmacol. Ther.* **1998**, *77*, 29-58.
70. WHO Model Prescribing Information, Drugs Used in Parasitic Diseases, 2nd edition, World Health Organization, Geneva, 1995.
71. Pybus, B. S.; Marcsisin, S. R.; Jin, X.; Deye, G.; Sousa, J. C.; Li, Q.; Caridha, D.; Zeng, Q.; Reichard, G. A.; Ockenhouse, C.; Bennett, J.; Walker, L. A.; Ohrt, C.; Melendez, V. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malaria J.* **2013**, *12*, 212.
72. Smith, H. J.; Meremikwu, M. M. Iron-chelating agents for treating malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2003**, *2*, CD001474.
73. Jefford, C. W.; Favarger, F.; Vicente, M. G. H.; Jacquier, Y. The decomposition of cis-fused cyclopenteno-1,2,4-trioxanes induced by ferrous salts and some oxophilic reagents. *Helv. Chim. Acta.* **1995**, *78*, 452-458.
74. Chaturvedi, D.; Goswami, A.; Saikia, P. P.; Barua, N. C.; Rao, P. G. Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 435-454.

-
75. Müller, I. B.; Hyde, J. E. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. *Future Microbiol.* **2010**, *5*, 1857-1873.
76. a) Banerjee, T.; Sharma, S. K.; Kapoor, N.; Dwivedi, V.; Surolia, N.; Surolia, A. Benzothioephene carboxamide derivatives as inhibitors of *Plasmodium falciparum* enoyl-ACP reductase. *IUBMB Life.* **2011**, *63*, 1101-1110; b) Chhibber, M.; Kumar, G.; Parasuraman, P.; Ramya, T. N. C.; Surolia, N.; Surolia, A. Novel diphenyl ethers: Design, docking studies, synthesis and inhibition of enoyl ACP reductase of *Plasmodium falciparum* and *Escherichia coli*. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8086-8098; c) Sharma, S. K.; Parasuraman, P.; Kumar, G.; Surolia, N.; Surolia, A. Green tea catechins potentiate triclosan binding to enoyl-ACP reductase from *Plasmodium falciparum* (PfENR). *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 765-775.
77. Carballeira, N. M.; Bwalya, A. G.; Itoe, M. A.; Andricopulo, A. D.; Cordero Maldonado, M. L.; Kaiser, M.; Mota, M. M.; Crawford, A. D.; Guido, R. V. C.; Tasdemir, D. 2-Octadecynoic acid as a dual life stage inhibitor of *Plasmodium* infections and plasmodial FAS-II enzymes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4151-4157.
78. a) Rackham, M. D.; Brannigan, J. A.; Moss, D. K.; Yu, Z.; Wilkinson, A. J.; Holder, A. A.; Tate, E. W.; Leatherbarrow, R. J. Discovery of novel and ligand-efficient inhibitors of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* N-myristoyltransferase. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 371-375; b) Rackham, M. D.; Brannigan, J. A.; Rangachari, K.; Meister, S.; Wilkinson, A. J.; Holder, A. A.; Leatherbarrow, R. J.; Tate, E. W. Design and synthesis of high affinity inhibitors of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* N-Myristoyltransferases directed by ligand efficiency dependent lipophilicity (LELP). *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2773-2788.
79. a) Slavic, K.; Krishna, S.; Derbyshire, E. T.; Staines, H. M. Plasmodial sugar transporters as anti-malarial drug targets and comparisons with other protozoa. *Malaria Journal.* **2011**, *10*, 165:1-165:10; b) Slavic, K.; Derbyshire, E. T.; Naftalin, R. J.; Krishna, S.; Staines, H. M. Comparison of effects of green tea catechins on apicomplexan hexose transporters and mammalian orthologues. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, *168*, 113-116; c) Saliba, K. J.; Krishna, S.; Kirk, K. Inhibition of hexose transport and abrogation of pH homeostasis in the intraerythrocytic malaria parasite by an O-3-hexose derivative. *FEBS Letters.* **2004**, *570*, 93-96.
80. Witschel, M. C.; Rottmann, M.; Schwab, A.; Leartsakulpanich, U.; Chitnumsub, P.; Seet, M.; Tonazzi, S.; Schwertz, G.; Stelzer, F.; Mietzner, T.; McNamara, C.; Thater, F.; Freymond, C.; Jaruwat, A.; Pinthong, C.; Riangrunroj, P.; Oufir, M.; Hamburger, M.; Mäser, P.; Sanz-Alonso, L. M.; Charman, S.; Wittlin, S.; Yuthavong, Y.; Chaiyen, P.; Diederich, F. Inhibitors of Plasmodial serine hydroxymethyltransferase (SHMT): Cocrystal structures of pyrazolopyrans with potent blood- and liver-stage activities. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3117-3130.
81. Agbor-Enoh, S.; Seudieu, C.; Davidson, E.; Dritschilo, A.; Jung, M. Novel inhibitor of *Plasmodium* histone deacetylase that cures *P. berghei*-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1727-1734.
82. Biamonte, M. A.; Wanner, J.; Le Roch, K. G.; Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2829-2843.
83. Friesen, J.; Borrmann, S.; Matuschewski, K. Induction of antimalaria immunity by pyrimethamine prophylaxis during exposure to sporozoites is curtailed by parasite resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 2760-2767.

-
84. Wells, T. N. C.; Burrows, J. N.; Baird, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends. Parasitol.* **2010**, *26*, 145-151.
85. Terzić, N.; Konstantinović, J.; Tot, M.; Burojević, J.; Djurković-Djaković, O.; Sribljanović, J.; Štajner, T.; Verbić, T.; Zlatović, M.; Machado, M.; Albuquerque, I. S.; Prudêncio, M.; Sciotti, R. J.; Pecic, S.; D'Alessandro, S.; Taramelli, D.; Šolaja, B. A.. Reinvestigating old pharmacophores: Are 4-aminoquinolines and tetraoxanes potential two-stage antimalarials? *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 264–281.
86. Leven, M.; Knaab, T. C.; Held, J.; Duffy, S.; Meister, S.; Fischli, C.; Meitzner, D.; Lehmann, U.; Lungerich, B.; Kuna, K.; Stahlke, P.; Delves, M. J.; Buchholz, M.; Winzeler, E. A.; Avery, V. M.; Mordmuller, B.; Wittlin, S.; Kurz, T. 3-Hydroxy-N-arylidenepropanehydrazonamides with halo-substituted phenanthrene scaffolds cure *P. berghei* infected mice when administered perorally. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6036-6044.
87. Singh, K.; Okombo, J.; Brunschwig, C.; Ndubi, F.; Barnard, L.; Wilkinson, C.; Njogu, P. M.; Njoroge, M.; Laing, L.; Machado, M.; Prudencio, M.; Reader, J.; Botha, M.; Nondaba, S.; Birkholtz, L.-M.; Lauterbach, S.; Churchyard, A.; Coetzer, T. L.; Burrows, J. N.; Yeates, C.; Denti, P.; Wiesner, L.; Egan, T. J.; Wittlin, S.; Chibale, K. Antimalarial pyrido[1,2-a]benzimidazoles: Lead optimization, parasite life cycle stage profile, mechanistic evaluation, killing kinetics, and in vivo oral efficacy in a mouse model. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1432-1448.
88. Turner, H. Spiroindolone NITD609 is a novel antimalarial drug that targets the P-type ATPase PfATP4. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 227-238.
89. Buckling, A.; Ranford-Cartwright, L. C.; Miles, A.; Read, A. F. Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis in vitro. *Parasitology* **1999**, *118*, 339-346.
90. Puta, C.; Manyando, C. Enhanced gametocyte production in Fansidar-treated *Plasmodium falciparum* malaria patients: implications for malaria transmission control programmes. *Trop. Med. Int. Health* **1997**, *2*, 227-229.
- 91 . http://www.who.int/malaria/pq_updated_policy_recommendation_en_102012.pdf
92. Peatey, C. L.; Leroy, D.; Gardiner, D. L.; Trenholme, K. R. Anti-malarial drugs: how effective are they against *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Malaria J.* **2012**, *11*:34.
93. Adjalleya, S. H.; Johnstona, G. L.; Lic, T.; Eastmana, R. T.; Eklanda, E. H.; Eappenc, A. G.; Richmanc, A.; Simc, B. K. L.; Leea, M. C. S.; Hoffmanc, S. L.; Fidocka, D. A. Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmissionblocking activity by methylene blue. *PNAS* **2011**, *108*, e1214-e1223.
94. Miura, K.; Deng, B.; Tullo, G.; Diouf, A.; Moretz, S. E.; Locke, E.; Morin, M.; Fay, M. P.; Long, C. A. Qualification of standard membrane-feeding assay with *Plasmodium falciparum* malaria and potential improvements for future assays. *PLoS ONE*, **2013**, *8*, e57909.
95. Baragaña, B. et al. A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature* **2015**, *522*, 315-320.
96. Sun, W.; Tanaka, T. Q.; Magle, C. T.; Huang, W.; Southall, N.; Huang, R.; Dehdashti, S. J.; McKew, J. C.; Williamson, K. C.; Zheng, W. Chemical signatures and new drug targets for gametocytocidal drug development. *Sci. Rep.* **2014**, *4*:3743.

-
97. Patel, P. R.; Sun, W.; Kim, M.; Huang, X.; Sanderson, P. E.; Tanaka, T. Q.; McKew, J. C.; Simeonov, A.; Williamson, K. C.; Zheng, W.; Huang, W. In vitro evaluation of imidazo[4,5-c]quinolin-2-ones as gametocytocidal antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2907-2911.
98. Lauinger, I. L.; Vivas, L.; Perozzo, R.; Stairiker, C.; Tarun, A.; Zloh, M.; Zhang, X.; Xu, H.; Tonge, P. J.; Franzblau, S. G.; Pham, D.-H.; Esguerra, C. V.; Crawford, A. D.; Maes, L.; Tasdemir, D. Potential of lichen secondary metabolites against Plasmodium liver stage parasites with FAS-II as the potential target. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1064-1070.
99. Bruno, M.; Trucchi, B.; Monti, D.; Romeo, S.; Kaiser, M.; Verotta, L. Synthesis of a potent antimalarial agent through natural products conjugation. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 221-225.
100. Pastrana-Mena, R.; Mathias, D. K.; Delves, M.; Rajaram, K.; King, J. G.; Yee, R.; Trucchi, B.; Verotta, L.; Dinglasan, R. R. A malaria transmission-blocking (+)-usnic acid derivative prevents Plasmodium zygote-to-ookinete maturation in the mosquito midgut. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 3461-3472.
101. Videnović, M.; Opsenica, D. M.; Burnett, J. C.; Gomba, L.; Nuss, J. E.; Selaković, Ž.; Konstantinović, J.; Krstić, M.; Šegan, S.; Zlatović, M.; Sciotti, R. J.; Bavari, S.; Šolaja, B. A. Second generation steroidal 4-aminoquinolines are potent, dual-target inhibitors of the botulinum neurotoxin serotype A metalloprotease and *P. falciparum* malaria. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4134-4153.
102. Zuniga, J. E.; Schmidt, J. J.; Fenn, T.; Burnett, J. C.; Arac, D.; Gussio, R.; Stafford, R. G.; Badie, S. S.; Bavari, S.; Brunger, A. T. A potent peptidomimetic inhibitor of botulinum neurotoxin serotype A has a very different conformation than SNAP-25 substrate. *Structure* **2008**, *16*, 1588-1597.
103. Tenne, M.; Youdim, M. B. H.; Ulitzur, S.; Finberg, J. P. M. Deamination of aliphatic amines by monoamine oxidase A and B using a bioluminescence technique. *J. Neurochem.* **1985**, *44*, 1373-1377.
104. Yu, P. H. Deamination of aliphatic amines of different chain lengths by rat liver monoamine oxidase A and B. *J. Pharm. Pharmacol.* **1989**, *41*, 205-208.
105. <https://www.schrodinger.com/science-articles/docking-and-scoring>
106. Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750-59.
107. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-49.
108. Capek, P.; Zhang, Y.; Barlow, D. J.; Houseknecht, K. L.; Smith, G. R.; Dickerson, T. J. Enhancing the pharmacokinetic properties of botulinum neurotoxin serotype A protease inhibitors through rational design. *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 288-293.
109. Jin, J.; Hanefeld, U. The selective addition of water to C=C bonds; enzymes are the best chemists. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2502-2510.
110. a) Özdemir, A.; Turan-Zitouni, G.; Kaplancikli, Z. A.; Chevallent, P. Synthesis of some 4-arylideneamino-4H-1,2,4-triazole-3-thiols and their antituberculosis activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 511-516. b) Pomarnacka, E.; Gdaniec, M. Synthesis and Anticancer Activity of 2-Amino-8-chloro-5,5-dioxo[1,2,4]triazolo[2,3-

- b)[1,4,2]benzodithiazine Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1259-1267. c) Paprocka, R.; Wiese, M.; Eljaszewicz, A.; Helmin-Basa, A.; Gzella, A.; Modzelewska-Banachiewicz, B.; Michalkiewicz, J. Synthesis and anti-inflammatory activity of new 1,2,4-triazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2664-2667.
111. Perez-Silanes, S.; Berrade, L.; Garcia-Sanchez, R. N.; Mendoza, A.; Galiano, S.; Perez-Solorzano, B. M.; Nogal-Ruiz, J. J.; Martinez-Fernandez, A. R.; Aldana, I.; Monge, A. New 1-aryl-3-substituted propanol derivatives as antimalarial agents. *Molecules*, **2009**, *14*, 4120-4135.
112. Février, B.; Dupas, G.; Bourguignon, J.; Quéguiner. Synthesis of new 4-quinolone-type compounds in the benzo[b]thiophene series. *J. Heterocyclic Chem.*, **1993**, *30*, 1085-1088.
113. Fedi, V.; Altamura, M.; Catalioto, R. M.; Giannotti, D.; Giolitti, A.; Giuliani, S.; Guidi, A.; Harmat, N. J. S.; Lecci, A.; Meini, S.; Nannicini, R.; Pasqui, F.; Tramontana, M.; Triolo, A.; Maggi, C. A. Discovery of a new series of potent and selective linear tachykinin NK2 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4793-4807.
114. Pessoa-Mahana, H.; Kosche, C. J.; Ron, H., N.; Recabarren-Gajardo, G.; Saitz, B., C.; Araya-Maturana, R.; Pessoa-Mahana, C. D. Solvent-free microwave synthesis of 3-(4-benzo[b]thiophene-2-carbonyl)-1-piperazinyl-1-benzo[b]thiophen-2-yl-1-propanones. New hetero bis-ligands with potential 5-HT_{1A} serotonergic activity. *Heterocycles* **2008**, *75*, 1913-1929.
115. Tilstam, U. A continuous protodecarboxylation of heteroaromatic carboxylic acids in sulfolane. *Org. Process. Res. Dev.* **2012**, *16*, 1449-1454.
116. Noland, W. E.; Baude, F. J. The cycloaddition reaction of 3-alkylindoles with p-benzoquinone. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3321-3337.
117. Brendle, J. J.; Outlaw, A.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Patrick, D. A.; Tidwell, R. R.; Werbovetz, K. A. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 797 - 807.
118. Shi, J. P.; Wu, D. L.; Ding, Y.; Wu, D. H.; Hu, H. W.; Lu, G. Y. Synthesis of novel H shaped chromophores. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2770-2777.
119. Kim, S.; Oh, C. H.; Oh, Ko, J. S.; Ahn, K. H.; Kim, Y. J. Zinc-modified cyanoborohydride as a selective reducing agent. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1927-1932.
120. Leonczak, P.; Gao, L.; Ramadori, A. T.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; Jonghe, S. D.; Herdewijn, P. Synthesis and structure-activity relationship studies of 2-(1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione)-3-amino-5-arylthieno[2,3-b]pyridines as inhibitors of DRAK2. *ChemMedChem*. **2014**, *9*, 2587 - 2601.
121. Sham, H. L.; Konradi, A. W.; Hom, R. K.; Probst, G. D.; Bowers, S.; Truong, A.; Neitz, R. J.; Sealy, J.; Toth, G. Preparation of N-(thiophen-3-yl)acetamide derivatives as inhibitors of JNK N-terminal kinase. WO **2010/091310** A1.
122. Antinarelli, L. M. R.; Carmo, A. M. L.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Da Silva, A. D.; Coimbra, E. S.; Salunke, D. B. Increase of leishmanicidal and tubercular activities using steroids linked to aminoquinoline. *Org. Med. Chem. Lett.* **2012**, *2*:16.
123. Korotchenko, V.; Sathunuru, R.; Gerena, L.; Caridha, D.; Li, Q.; Kreishman-Deitrick, M.; Smith, P. L.; Lin, A. J. Antimalarial activity of 4-amidinoquinoline and 10-amidinobenzonaphthyridine derivatives. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3411-3431.
124. Battaglia, A.; Barbaro, G.; Giorgianni, P.; Guerrini, A.; Pepe, A. 1'-Azido- and 1'-amino-1,3-dioxolan-4-ones. *Tetrahedron Asymmetr.* **2001**, *12*, 1015-1023.

-
125. a) Pittelkow, M.; Lewinsky, R.; Christensen, J. B. Selective synthesis of carbamate protected polyamines using alkyl phenyl carbonates. *Synthesis*, **2002**, *15*, 2195-2202; b) Pittelkow, M.; Lewinsky, R.; Christensen, J. B. Mono carbamate protection of aliphatic diamines using alkyl phenyl carbonates [(2-aminoethyl)carbamic acid *tert*-butyl ester]. *Org. Synth.* **2007**, *84*, 209-214.
126. Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P.C.; Funk, L.; Shook, B. C. Nitrile-Containing Pharmaceuticals: Efficacious Roles of the Nitrile Pharmacophore. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7902-7917.
127. Kiris, E.; Nuss, J. E.; Burnett, J. C.; Kota, K. P.; Koh, D. C.; Wanner, L. M.; Torres-Melendez, E.; Gussio, R.; Tessarollo, L.; Bavari, S. Embryonic stem cell-derived motoneurons provide a highly sensitive cell culture model for botulinum neurotoxin studies, with implications for high-throughput drug discovery. *Stem Cell Res.* **2011**, *6*, 195-205.
128. Wichterle, H.; Lieberam, I.; Porter, J. A.; Jessell, T. M. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, **2002**, *110*, 385-397.
129. Di, L.; Kerns, E. H.; Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 402-408.
130. Department of defense, ADMET Center, USAMRICD, Gunpowder, Maryland.
131. Smith, D. A.; Di, L.; Kerns, E. H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 929-939.
132. Marković, O. S.; Cvijetić, I. N.; Zlatović, M. V.; Opsenica, I. M.; Konstantinović, J. M.; Terzić Jovanović, N. V.; Šolaja, B. A.; Verbić, T. Ž. Human serum albumin binding of certain antimalarials. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *192*, 128-139.
133. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
134. Schönfeld, D. L.; Ravelli, R. B. G.; Mueller, U.; Skerra, A. The 1.8-Å crystal structure of α 1-acid glycoprotein (orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 393-405.
135. Lakowicz, R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed. Springer Science Business Media, New York, USA, **2006**.
136. Yamasaki, K.; Chuang, V. T. G.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochimic. Biophys. Acta.* **2013**, *1830*, 5435–5443.
137. Israili, Z. H.; Dayton, P. G. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab. Rev.* **2001**, *33*, 161-235.
138. Bray, P. G.; Park, B. K.; Asadollaly, E.; Biagini, G. A.; Jeyadevan, J. P.; Berry, N. G.; Ward, S. A.; O' Neill, P. M. A medicinal chemistry perspective on 4-aminoquinoline antimalarial drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 479-507.
139. Rougemont, M.; van Saanen, M.; Sahli, R.; Hinrikson, H.P.; Bille, J.; Jatou, K. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5636–5643.
140. Perlman, R. L. Mouse models of human disease. *Evol. Med. Public Health.* **2016**, *2016*, 170-176.

-
141. Chakraborty, C.; Sharma, A. R.; Sharma, G.; Lee, S-S. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *J. Nanobiotechnol.* **2016**, *14*:65.
142. MacRae, C. A.; Peterson, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2015**, *14*, 721-731.
143. Baell, J.; Walters, M. A. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* **2014**, *513*, 481-483.
144. Allen, J. G.; Briner, K.; Cohen, M. P.; Galka, C. S.; Hellman, S. L.; Martinez-Grau, M. A.; Reinhard, M. R.; Rodriguez, M. J.; Rothhaar, R. R.; Tidwell, M. W.; Vistor, F.; Williams, A. C.; Zhang, D.; Boyd, S. A.; Conway, R. G.; Deo, A. S.; Lee, W. M.; Siedem, C. S.; Singh, A. 6-Substituted 2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzo[d]azepines as 5-HT_{2C} receptor agonists, PCT Int. Appl. **2005**, WO 2005082859.
145. Zeng, F.; Alper, H. Palladium-catalyzed domino C-S coupling/carbonylation reactions: An efficient synthesis of 2-carbonylbenzo[b]thiophene derivatives. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2868-2871.
146. Mezlova, M.; Petrickova, H.; Malon, P.; Kozmik, V.; Svoboda, J. Axially chiral 3,3'-bi(1-benzothiophene)-2,2'-dicarboxylic acid and its derivatives. *Collect. Czech. Chem. C.* **2003**, *68*, 1020-1038.
147. Hendrix, M.; Boess, F-G.; Erb, C.; Flessner, T.; Van Kampen, M.; Luithle, J.; Methfessel, C.; Wiese, W. B. Preparation of 2-heteroarylcarboxylic acid amides for therapeutic use as nicotinic acetylcholine receptor agonists. WO **2003**/055878 A1.
148. Zuckerman, N. B.; Kang, X.; Chen, S.; Konopelski, J. P. Synthesis of a ferrocene-functionalized unsymmetrical benzo[b]thienyl-thienylethene photoswitch with a cyclopentene core. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 1482-1485.
149. Cheng, K.; Wang, X.; Yin, H. Small-molecule inhibitors of the TLR3/dsRNA complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3764-3767.
150. Niculescu-Duvaz, D.; Niculescu-Duvaz, I.; Suijkerbuijk, B. M. J. M.; Ménard, D.; Zambon, A.; Davies, L.; Pons, J-F.; Whittaker, S.; Marais, R. Potent BRAF kinase inhibitors based on 2,4,5-trisubstituted imidazole with naphthyl and benzothiophene 4-substituents. *B. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1284-1304.
151. Matsunaga, N.; Kaku, T.; Itoh, F.; Tanaka, T.; Hara, T.; Miki, H.; Iwasaki, M.; Aono, T.; Yamaoka, M.; Kusaka, M.; Tasaka, A. C_{17,20} - Lyase inhibitors I. Structure-based de novo design and SAR study of C_{17,20} - lyase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2251-2273.
152. Mitsumori, S.; Tsuru, T.; Honma, T.; Hiramatsu, Y.; Okada, T.; Hashizume, H.; Kida, S.; Inagaki, M.; Arimura, A.; Yasui, K.; Asanuma, F.; Kishino, J.; Ohtani, M. Synthesis and biological activity of various derivatives of a novel class of potent, selective, and orally active prostaglandin D₂ receptor antagonists. 2. 6,6-Dimethylbicyclo[3.1.1]heptane derivatives. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2446-2455.
153. Datta, S.; De, A. Studies in sulphur heterocycles. Part 6. Convenient synthesis of 5-substituted benzo[b]thiophene derivatives and a facile entry to the thieno[2,3-g]indole system. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I.* **1989**, *3*, 603-607.
154. Hansch, C.; Schmidhalter, B. Synthesis of 6-substituted thianaphthenes. *J. Org. Chem.* **1955**, *20*, 1056-1061.
155. Banerjee, M.; Middya, S.; Shrivastava, R.; Raina, S.; Surya, A.; Yadav, D. B.; Yadav, V. K.; Kapoor, K. K.; Venkatesan, A.; Smith, R. A.; Thompson, S. K. Preparation of heterocycles as inhibitors of the kynurenine pathway. WO **2014**/186035 A1.

-
156. Brabander, H. J. The synthesis of benzo[b]thiophene-3-carboxaldehydes and 3-carboxylic acids by light catalyzed NBS bromination of 3-methylbenzo[b]thiophenes. *J. Het. Chem.* **1973**, *10*, 127–129.
157. Dolzhenko, A. V.; Pastorin, G.; Dolzhenko, A. V.; Chui, W. K. An aqueous medium synthesis and tautomerism study of 3(5)-amino-1,2,4-triazoles. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2124-2128.
158. James, T.; Simpson, I.; Grant, J. A.; Sridharan, V.; Nelson, A. Modular, gold-catalyzed approach to the synthesis of lead-like piperazine scaffolds. *Organic Lett.* **2013**, *15*, 6094-6097.
159. Hequet, A.; Burchak, O. N.; Jeanty, M.; Guinchard, X.; Le Pihive, E.; Maigre, L.; Bouhours, P.; Schneider, D.; Maurin, M.; Paris, J-M.; Denis, J-N.; Jolival, C. 1-(1H-Indol-3-yl)ethanamine derivatives as potent staphylococcus aureus NorA efflux pump inhibitors. *ChemMedChem.* **2014**, *9*, 1534-1545.
160. Mitchell, A. R.; Merrifield, R. B. Occurrence of N-alkylation during the acidolytic cleavage of urethane protecting groups. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2015-2019.
161. Solomon, V. R.; Puri, S. K.; Srivastava, K.; Katti, S. B. Design and synthesis of new antimalarial agents from 4-aminoquinoline. *B. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2157-2165.
162. Musonda, C. C.; Little, S.; Yardley, V.; Chibale, K. Application of multicomponent reactions to antimalarial drug discovery. Part 3: Discovery of aminoxazole 4-aminoquinolines with potent antiplasmodial activity in vitro. *B. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4733-4736.
163. Opsenica, I. M.; Tot, M.; Gomba, L.; Nuss, J. E.; Sciotti, R. J.; Bavari, S.; Burnett, J. C.; Šolaja, B. A. 4-Amino-7-chloroquinolines: probing ligand efficiency provides botulinum neurotoxin serotype A light chain inhibitors with significant antiprotozoal activity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5860.
164. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, **2013**, Test No. 236. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en (čitano 31. januara 2018.)
165. Marković, O. S.; Konstantinović, J. M.; Cvijetić, I. N.; Amézqueta, S.; Valko, K.; Ràfols, C.; Polović, N. Đ.; Šolaja, B. A.; Verbić, T. Ž. Measurements of plasma protein binding – variety of experimental techniques. *6th World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery & Third World Conference on ADMET and DMPK*. Zagreb, Croatia, September 4-7, **2017**, Book of Abstracts, O27, page 30.
166. Valko, K. Physicochemical and biomimetic properties in drug discovery: Chromatographic techniques for lead optimization. Wiley Hoboken NJ; **2014**, str. 85-87.
167. Valko, K.; Nunhuck, S.; Bevan, C.; Abraham, M. H.; Reynolds, D. P. Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2236–2248.
168. Cai, S.; Singh, B. R. Identification of b-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophys. Chem.* **1999**, *80*, 7-20.
169. Cai, S.; Singh, B. R. A distinct utility of the amide III infrared band for secondary structure estimation of aqueous protein solutions using partial least squares methods. *Biochemistry* **2004**, *43*, 2541-2549.

-
170. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.
171. a) Takács-Novák, K.; Avdeel, A. Interlaboratory study of log*P* determination by shake-flask and potentiometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 1405–1413. b) EPA 712-C-96-038, *Product Properties Test Guidelines, OPPTS 830.7550: Partition coefficient (n-octanol/water), shake flask method*; U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C., 1996. c) OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 1. Physical-chemical properties, *Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*, OECD, Paris, 1995. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069626-en> (čítano 31. januara 2018.)
172. Sobanska, A. W.; Wójcicka, K.; Brzezinska, E. Evaluation of the lipophilicity of selected sunscreens – A chemometric analysis of thin-layer chromatographic retention data. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 3074–3081
173. Johnson, J. D.; Denuil, R. A.; Gerena, L.; Lopez-Sanchez, M.; Roncal, N. E.; Waters, N. C. Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1926–1933.
174. D'Alessandro, S.; Silvestrini, F.; Dechering, K.; Corbett, Y.; Parapini, S.; Timmerman, M.; Galastri, L.; Basilico, N.; Sauerwein, R.; Alano, P.; Taramelli, D. A Plasmodium falciparum screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 2048–2058.
175. Cevenini, L.; Camarda, G.; Michelini, E.; Siciliano, G.; Calabretta, M. M.; Bona, R.; Kumar, T. R. S.; Cara, A.; Branchini, B. R.; Fidock, D. A.; Roda, A.; Alano, P. Multicolor bioluminescence boosts malaria research: Quantitative dual-color assay and single-cell imaging in Plasmodium falciparum parasites. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8814–8821.
176. Parapini, S.; Basilico, N.; Pasini, E.; Egan, T. J.; Olliaro, P.; Taramelli, D.; Monti, D. Standardization of the physicochemical parameters to assess *in vitro* the beta-hematin inhibitory activity of antimalarial drugs. *Exp. Parasitol.* **2000**, *96*, 249–256.

Biografski podaci o kandidatu

Jelena Konstantinović rođena je 5. decembra 1988. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani hemičar upisala je 2007. godine. Diplomirala je 12. septembra 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,97 i ocenom 10 na završnom radu. Master studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2011. godine, a završila 8. avgusta 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,50 i ocenom 10 na master radu. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemija upisala je 16. oktobra 2012. godine.

Od 1.11.2012. do 25.7.2013. bila je zaposlena kao istraživač pripravnik u Inovacionom centru Hemijskog fakulteta. Od 26.7.2013. do danas zaposlena je kao asistent pri Katedri za organsku hemiju na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Angažovana je na projektu „Sinteza aminohinolina i njihovih derivata kao antimalarika i inhibitora botulinum neurotoksina A“ (172008), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Osim na osnovnom projektu, bila je angažovana i na projektu „New Inhibitors of Botulinum Neurotoxins“ – NATO project CBP, EAP.SFPP 983638. Kandidatkinja je kao stipendista pohađala „35th Advanced Course of Medicinal Chemistry and “E. Duranti“ National Seminar for PhD Students“, European School of Medicinal Chemistry, u Urbinu, Italiji (28.6-3.7.2015.). U okviru bilateralnog projekta Srbija-Italija (RS16MO04) boravila je u Laboratory of Parasitology/Immunology of the Department of Biomedical, Surgical and Dental Sciences, Univerziteta u Milanu u maju 2016. i 2017. godine.

Kandidatkinja je držala vežbe iz obaveznih predmeta Organska hemija 1 i Organska hemija 2 (Praktikum iz organske hemije i Organska hemija, po novom akreditacionom programu), kao i vežbe iz izbornog predmeta Odabrane oblasti organske hemije na Hemijskom fakultetu.

Dobitnik je Diplome za studenta generacije (podeljeno sa još 3 studenta) na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2011. godine, kao i Specijalnog priznanja za 2012. godinu za izuzetan uspeh ostvaren u toku studija, dodeljenog od strane Srpskog hemijskog društva.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora **Jelena Konstantinović**

Broj indeksa **DH27/2012**

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom

Dizajn i sinteza inhibitora botulinum neurotoksina A i parazita *Plasmodium falciparum*: benzotiofenski i steroidni derivati aminohinolina

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

Jelena Konstantinović

U Beogradu, 8.3.2018.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Jelena Konstantinović**

Broj indeksa **DH27/2012**

Studijski program **doktor hemijskih nauka**

Naslov rada **Dizajn i sinteza inhibitora botulinum neurotoksina A i parazita *Plasmodium falciparum*: benzotiofenski i steroidni derivati aminohinolina**

Mentor **akademik Bogdan A. Šolaja, profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u penziji**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

Jelena Konstantinović

U Beogradu, 8.3.2018.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Dizajn i sinteza inhibitora botulinum neurotoksina A i parazita *Plasmodium falciparum*: benzotiofenski i steroidni derivati aminohinolina

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu, mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

Jelena Končaninović

U Beogradu, 8.3.2018.

Spisak radova i saopštenja:¹

■ Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a):

1. [Konstantinović, J.](#); Kiris, E.; Kota, K. P.; Kugelman-Tonos, J.; Videnović, M.; Cazares, L. H.; Terzić Jovanović, N.; Verbić, T. Ž.; Andjelković, B.; Duplantier, A. J.; Bavari, S.; Šolaja, B. A. New Steroidal 4-Aminoquinolines Antagonize Botulinum Neurotoxin Serotype A in Mouse Embryonic Stem Cell Derived Motor Neurons in Postintoxication Model. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1595-1608.
2. Terzić, N.; [Konstantinović, J.](#); Tot, M.; Burojević, J.; Djurković-Djaković, O.; Srbljanović, J.; Štajner, T.; Verbić, T.; Zlatović, M.; Machado, M.; Albuquerque, I. S.; Prudêncio, M.; Sciotti, R. J.; Pecic, S.; D'Alessandro, S.; Taramelli, D.; Šolaja, B. A. Reinvestigating Old Pharmacophores: Are 4-Aminoquinolines and Tetraoxanes Potential Two-Stage Antimalarials? *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 264-281.
3. Videnović, M.; Opsenica, D. M.; Burnett, J. C.; Gomba, L.; Nuss, J. E.; Selaković, Ž.; [Konstantinović, J.](#); Krstić, M.; Šegan, S.; Zlatović, M.; Sciotti, R. J.; Bavari, S.; Šolaja, B. A. Second Generation Steroidal 4-Aminoquinolines Are Potent, Dual-Target Inhibitors of the Botulinum Neurotoxin Serotype A Metalloprotease and *P. falciparum* Malaria. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4134-4153.

■ Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M21):

4. Marković, O. S.; Cvijetić, I. N.; Zlatović, M. V.; Opsenica, I. M.; [Konstantinović, J. M.](#); Terzić Jovanović, N. V.; Šolaja, B. A.; Verbić, T. Ž. Human serum albumin binding of certain antimalarials. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *192*, 128-139.
5. [Konstantinović, J.](#); Videnović, M.; Srbljanović, J.; Djurković-Djaković, O.; Bogojević, K.; Sciotti, R.; Šolaja, B. Antimalarials with Benzothioephene Moieties as Aminoquinoline Partners. *Molecules* **2017**, *22*, 343.
6. Srbljanović, J.; Štajner, T.; [Konstantinović, J.](#); Terzić-Jovanović, N.; Uzelac, A.; Bobić, B.; Šolaja, B. A.; Djurković-Djaković, O. Examination of the antimalarial potential of experimental aminoquinolines: poor in vitro effect does not preclude in vivo efficacy. *Int. J. Antimicrob Agents*, **2017**, *50*, 461-466.

■ Predavanja po pozivu sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M32):

Predavač: T. Ž. Verbić

1. Marković, O. S.; [Konstantinović, J. M.](#); Cvijetić, I. N.; Amézqueta, S.; Valko, K.; Ràfols, C.; Polović, N. Đ.; Šolaja, B. A.; Verbić, T. Ž. Measurements of plasma protein binding – variety of experimental techniques – invited lecture. 6th World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development, September 4-6, **2017**, Zagreb, Croatia, Abstracts P30.

■ Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34):

1. [Konstantinović, J. M.](#); Bogojević, B. K.; Zlatović, M. V.; Šolaja, B. A. New benzothioephene derivatives as inhibitors of BoNT/A. 35th Advanced Course of Medicinal Chemistry and “E. Duranti” National Seminar for PhD Students, ESMEC, Urbino, Italy, June 28-July 3, **2015**, Book of Proceedings, page 145.

¹ Radovi (redni brojevi 1 i 5) i saopštenja (redni brojevi 1, 3-6) koji su proistekli iz teze su označeni plavom bojom.

■ **Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu (M64):**

2. Konstantinović, J. M.; Terzić, N.; Videnović, M.; Bogojević, K.; Basilico, N.; Gradoni, L.; Šolaja, B. A. Aminoquinoline derivatives with activity against *Leishmania* parasites *in vivo*, Peta konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 29-30. septembar **2017**, izvodi radova KMH03-OP(Y)1, str. 95; ISBN 978-86-7132-067-2.
3. Konstantinović, J. M.; Anđelković, B. D.; Srbljanović, J. D.; Šolaja, B. A. Novi steroidni 4-aminohinolinski derivati kao antagonisti BoNT/A primenjeni posle intoksikacije u motornim neuronima razvijenim iz embrionalnih matičnih ćelija miša, Četvrta konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 5. novembar **2016**, izvodi radova HS P25, str. 61; ISBN 978-86-7132-064-1.
4. Bogojević, K. B.; Konstantinović, J. M.; Zlatović, M. V.; Šolaja, B. A. Uticaj položaja cijano-grupe u novim aminohinolinskim derivatima benzotiofena na inhibitornu aktivnost prema BoNT/A LC, Treća konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 24. oktobar **2015**, izvodi radova HS P12, str. 39; ISBN 978-86-7132-059-7.
5. Konstantinović, J. M.; Bogojević, B. K.; Zlatović, M. V.; Šolaja, B. A. Primena benzotiofenskih derivata u inhibiciji BoNT/A, 52. savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 29-30. maj **2015**, izvodi radova OH P 21, str. 135; ISBN 978-86-7132-056-2.
6. Konstantinović, J. M.; Zlatović, M. V.; Šolaja, B. A. Dizajn i sinteza malih molekula kao inhibitora botulinum neurotoksina tipa A, 51. savetovanje Srpskog hemijskog društva, Niš, 5-7. juni **2014**, izvodi radova OH P 22, str. 112; ISBN 978-86-7132-054-2.
7. Konstantinović, J.; Opsenica, D.; Šolaja, B. A. Novi aminohinolinski benzotiofeni kao inhibitori botulinum neurotoksina tipa E, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 19-20. oktobar **2012**, izvodi radova HS P06, str. 53; ISBN 978-86-7132-050-4.